

보안 과제(), 일반 과제() / 공개(), 비공개()발간등록번호()

발간등록번호

11-1543000-002300-01

117016-1

농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업

참당귀주정추출물의 갱년기 뼈건강 기능성 효능 검증 최종보고서

2018. 7. 20.

주관연구기관 / (주)이비오
협동연구기관 / (주)메디언스

기능성
효능
검증
최종보고서

참당귀주정추출물의
갱년기
뼈건강

2017

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “참당귀주정추출물의 갱년기 뼈건강 기능성 효능 검증”(개발기간 : 2017. 4. ~ 2017. 4.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 7 . 20 .

주관연구기관명 : (주) 이비오 (대표자) 전 순 복 (인)

신청기관명 : (주)메디언스 (대표자) 박 상 재 (인)



주관연구책임자 : 서 윤 희

신청기관책임자 : 김 경 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117016-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. ~ 2018.04.20	단 계 구 분	1차년/ 1차년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업			
연구과제명	대 과 제 명	참당귀주정추출물의 갱년기 뼈건강 기능성 효능 검증			
	세부 과제명				
연구책임자	서윤희	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 33,340천원 계:133,340천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 33,340천원 계:133,340천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 이비오			신청기업명 (주)메디언스	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수 51
---	--------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>목적: 참당귀주정추출물의 갱년기 모델에서의 뼈건강 효능 검증 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 참당귀주정추출물의 에스트로겐 활성화 검증을 위한 in vitro 시험 ● 난소제거 시험동물을 이용한 여성갱년기 뼈건강 기능성 평가 - OVX 동물모델에 참당귀주정추출물 경구투여 - 혈액 내 호르몬 분석 - 혈액 내 골형성 관련 지표 분석 - 뇨 골흡수 관련 지표 분석 - 대퇴골 골밀도 측정 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● MCF-7 세포주를 이용한 in vitro 시험 - 여성 유방암 세포주인 MCF-7을 사용. - MCF-7의 증식에 영향을 미치는 ESRα의 발현 억제 - MCF-7 증식 억제에 영향을 미치는 ESRβ의 발현 증가 - ESRs에 의하여 발현이 조절되는 pS2의 발현을 조절 - 참당귀 주정추출물은 암세포 증식 억제에 효과가 있으며 에스트로겐 리셉터 조절에도 영향을 미치는 것을 확인 ● OVX 모델을 이용한 갱년기 뼈건강 기능성 평가 - 암컷 SD rat의 난소를 적출하여 여성 갱년기 모델을 제작하고 참당귀 주정추출물을 투여하여 뼈 건강과 관련된 바이오마커를 측정 - 골 다공증에서 혈액에서 증가되는 지표인 ALP, bALP 및 Ca의 양은 감소 됨. - 골 흡수시 뇨에서 증가되는 지표인 DPD와 NTX1의 농도를 감소 - microCT로 골 미세구조를 측정한 결과 골밀도 및 관련 지표들이 골다공증 개선에 효과가 있는 것으로 평가 - 난소 적출로 감소한 혈액 내 에스트라디올은 증가하였고 증가된 황체호르몬은 감소 - 난소를 제거한 동물의 자궁내 증가된 ESRα의 발현량에는 영향을 미치지 않았으나, 감소된 ESRβ의 발현을 증가 - 난소가 제거되어 에스트로겐 분비가 감소된 여성갱년기 동물 모델에서 참당귀 주정추출물의 투여는 골다공증 개선에 효능이 있으며 호르몬 수치 개선에 도움을 줄 수 있음 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 지금까지 참당귀 주정추출물의 항염, 인지능력 개선 및 진통 효과에 대한 보고는 있었지만, 본 과제를 통하여 뼈건강에 도움을 줄 수 있음을 확인 - 참당귀 주정추출물의 활용 범위를 확장하여 수출 및 내수 증대 - 개별인정소재 개발을 통한 독점적인 권리 확보 - 수용화 공정을 적용한 업그레이드 소재 개발 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>참당귀</p>	<p>데커신</p>	<p>갱년기</p>	<p>골다공증</p>	<p>뼈 건강</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Angelica gigas NAKAI</p>	<p>Decursin</p>	<p>Menopause</p>	<p>Osteoporosis</p>	<p>Bone health</p>

<본문목차>

< 목 차 >

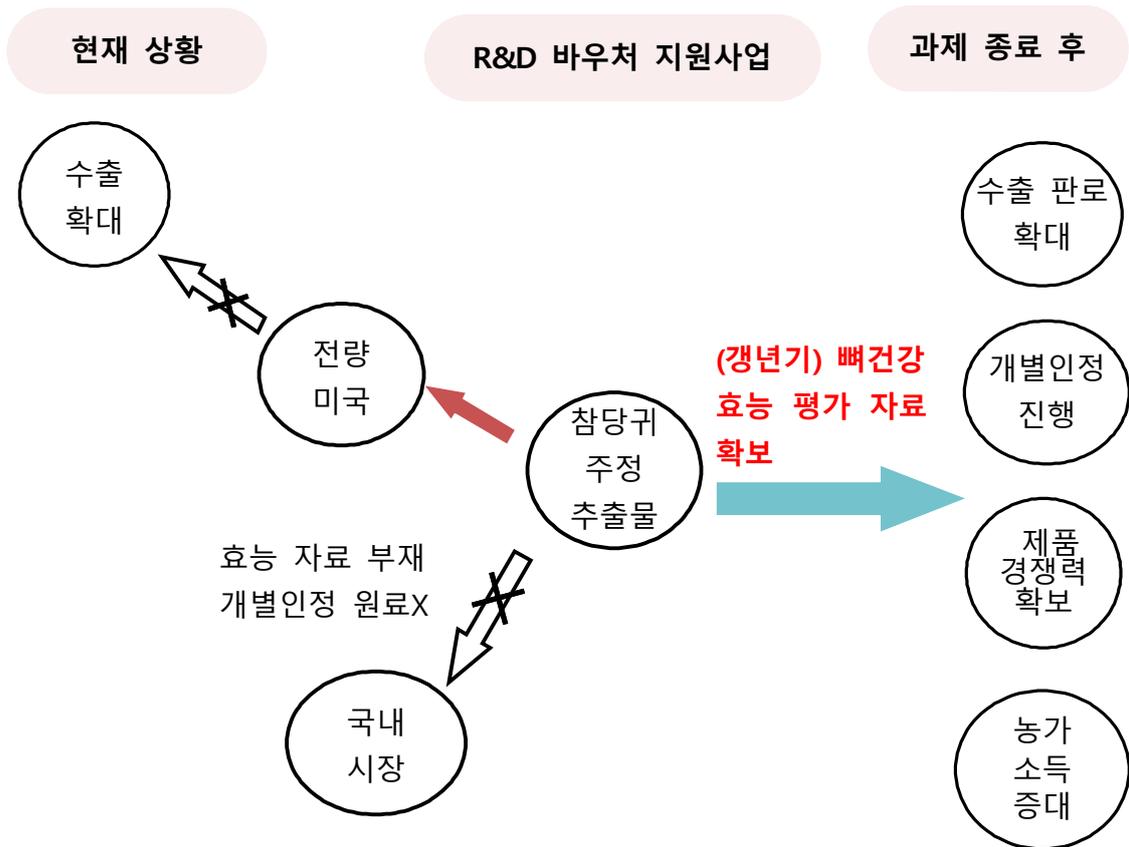
1. 연구개발과제의 개요	7
1-1 연구개발의 목적	7
1-2 연구개발의 필요성	8
1-3 연구개발 대상의 국내외 현황	9
1-4 연구개발의 중요성	15
1-5 연구개발의 범위	17
2. 연구수행 내용 및 결과	19
2-1 시험방법	19
2-2 시험결과	23
2-3 결론	49
2-4 사업성과 및 매출실적	50
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	51
3-1 목표	51
3-2 목표 달성여부	51
3-3 목표 미달성 원인 및 차후대책	51
4. 연구결과의 활용 계획 등	52

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

○ 연구개발 목적

- (주) 메디언스의 수출주력제품인 ‘참당귀주정추출물’은 국산(평창) 당귀를 주원료로 하며, 기능성분인 decursin과 decursinol angelate가 고함량으로 함유 되어 있음.
- 기능성분인 decursin은 인지기능개선, 항염, 진통, 관절 건강등 다양한 약리효과가 알려져 있음.
- 참당귀주정추출물을 갱년기 여성을 타겟으로 하여, 골다공증 예방효과를 가지는 식품으로 개발하고자 이에 관련한 효능 평가를 수행하고자 함.
- 참당귀주정추출물에 대한 효능자료를 확보하여, 국내에서는 개별인정 기능성식품 개발을 진행하고, 국내외 영업 자료로 활용하여 판로 확대의 발판을 마련하고자 함.



1-2. 연구개발의 필요성

■ 수출 주력 제품 - 참당귀주정추출물

- (주)메디언스는 국산(평창 진부) 참당귀를 주정으로 추출하여, 유효성분인 decursinol 0.1% 이상, Decursin & Decursinol angelate의 합으로 10% 이상으로 한 참당귀주정추출물을 개발하여, 전량 미국으로 수출하고 있음.

<표> (주)메디언스의 참당귀주정추출물의 수출 현황

2013년	2014년	2015년	2016년
\$90,161	\$75,837	\$289,642	\$117,162

- 참당귀에서 유효성분으로 알려진 decursinol, decursin, decursinol angelate는 중국산 당귀나 일본 당귀에는 미량으로 존재하지만, 국산 당귀에는 다량으로 존재하기 때문에 값싼 중국산 원료로 대체 불가능함.
- 당귀는 추출 용매에 따라 추출되는 성분이 명확하고, 이에 따라 효능이 다르게 나타나기 때문에 제조 방법에 따라 다양한 기능성 식품 개발이 가능한 원료임.

<표> 참당귀의 주요 약리성분 및 제조 특성

추출 용매	주요 성분	기능성
주정	decursinol, decursin, decursinol angelate	항염, 인지기능개선, 진통
물	nodakenin, 다당류	갱년기증상완화, 면역증강

- 참당귀를 주정으로 추출한 경우 인지기능 개선과 관절 건강 관련 효능이 많이 알려져 있다. 이러한 효능으로 인해 당사에서 제조한 참당귀 주정추출물은 미국에서 관절 건강 제품의 부원료로 사용되고 있으며, 수년간 꾸준히 사용되고 있음.

1-3. 연구개발 대상의 국내외 현황

가. 국내 · 외 기술 수준 및 시장 현황

■ 기술현황

(1) 주원료가 당귀인 개별인정형 건강기능식품 현황

원료명	인정번호/업체명	기능성	섭취량
참당귀주정추출분말	제 2004-6호 (주)사이제닉	노인의 인지능력 저하의 개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성 2등급)	참당귀주정추출분말로써 800 mg/일
HemoHIM 당귀등 혼합추출물	제 2006-17호 콜마비앤에이치 (주)선바이오텍사업부 문	면역기능개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성 2등급)	당귀등혼합추출물로 20~40 g/일
당귀등추출복합물	제2011-3호 대웅바이오(주)	노인의 기억력 개선에 도움을 줄 수 있음	당귀등추출복합물로서 800 mg/일
참당귀추출분말	제 2014-44호 (주) 뉴트라젠	① 노화로 저하된 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있음 (생리활성 2등급) ② 관절건강에 도움을 줄 수 있음 (생리활성 2등급)	① 인지기능 개선 : 참당귀추출분말로써 800 mg/일 ② 관절건강 도움 : 참당귀추출분말로서 1000mg/일

(2) 뼈/관절 건강 관련 기능식품 원료 현황

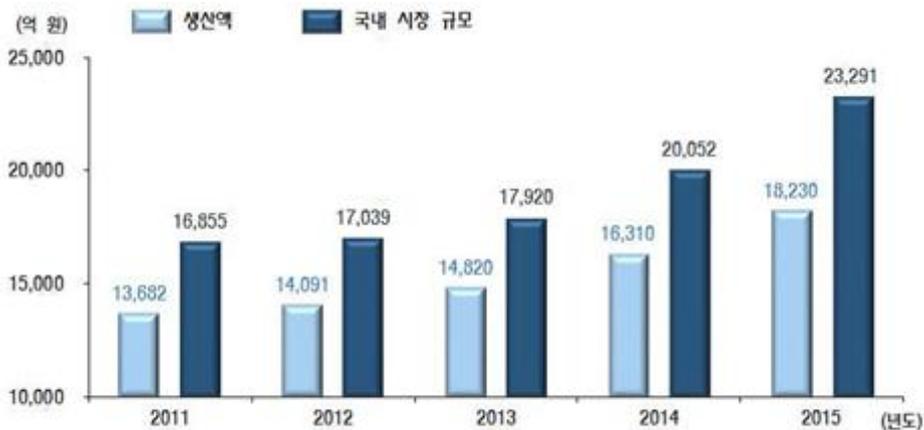
	원료명	기능성 내용	섭취량
고시형 원료	비타민 D	① 칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요 ② 뼈의 형성과 유지에 필요 ③ 골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌	1.5~10 µg/일
	칼슘	① 뼈와 치아 형성에 필요 ② 신경과 근육 기능 유지에 필요 ③ 정상적인 혈액 응고에 필요 ④ 골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌	210~800 mg
	대두이소플라본	뼈 건강에 도움을 줄 수 있음	대두이소플라본 비배당체로서 24~27 mg
개별인정형 원료	흑효모배양액분말 (제2011-2호, (주)글루칸)	뼈 건강에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함 (생리활성기능 3등급)	흑효모배양액분말로써 150 mg/일
	가시오가피속지황 복합추출물	뼈건강에 도움을 줄 수 있음 (생리활성기능2등급)	가시오가피속지황 복합추출물로

(제2013-14호, ㈜ 오스 코텍)		서 800 mg/일
유단백추출물 (제2015-16호, 주영엔 에스(주))	뼈건강에 도움을 줄 수 있음 (생리활성 2등급)	유단백추출물로 서 40 mg/일

■ 시장현황

(1) 국내 시장 규모

- 건강기능식품 시장규모는 약 21억 달러(2조 3,291 억원, 2015년)로 약 18억 달러(2조 52 억원, 2014년)에 비해 16.2%가 증가하였으며 2011년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있음.
- 생산액은 약 16억 달러(1조 8,230억 원, 2015년)로 약 15억 달러(1조 6,310억 원, 2014년)에 비해 11.8% 증가하였음
 - 최근 5년간 건강기능식품 생산액의 평균 성장률은 7.4%로 국내 제조업 국내총생산(GDP) 성장률 2.3%보다 3.2배 높은 수준임
 - 건강관리에 대한 관심 증가로 면역기능 개선 제품이나 비타민 등과 같은 영양 보충용 제품에 대한 수요가 증가한 것이 생산 증가의 주요 요인으로 분석됨.



<그림> 국내 건강기능식품 생산실적 및 시장 규모(2011~2015년)

- 건강에 대한 경각심 확대가 빠르게 나타나고 있어 건강 유지를 위하여 건강기능식품 소비 비율은 점진적으로 증가할 것으로 전망됨
 - OECD 국가별로 본인의 건강상태가 양호하다고 생각하는 비율을 조사한 결과, 한국은 35.1%만 자신이 건강하다고 응답하여 평균이 69.2%임을 감안했을 때 매우 낮은 수치임.

- 개별인정형 원료가 국내·외에서 인정받기 시작하면서 소비자의 신뢰도가 높아지고 있으며 일반식품 형태의 건강기능식품도 인정이 가능해지면서 다양한 형태 또는 제형의 제품 개발이 이루어질 것으로 예상됨.

(2) 해외 시장 동향

- 세계 건강기능식품 시장 규모는 1,179억 달러(약 131조원, 2015년 기준) 규모로 추산되며 연평균 7.3% 성장하여 1,677억 달러(약 187조원, 2020년)에 이를 것으로 전망됨



(출처: NB's global supplement&nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

- 세계 시장에서 가장 큰 규모를 차지하는 곳은 미국으로 약 404억 달러 규모이며, 중국 약 163억 달러, 일본 약 109억달러임.

<표> 국가별 건강기능식품 시장 규모 전망

(단위: 억 달러 또는 %)

구분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015년 기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
그 외	127	168	6.2	10.8
합계	1,179	1,677	7.3	100.0

(출처 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

(3) 소비 동향

- 2000년대 초·중반 건강기능식품은 기초 영양소 및 특정 성인병 위주의 기능 개선 선호 현상이 나타난 반면 2000년대 후반으로 접어들면서 점차 질병 예방 및 건강 관리 제품의 선호 현상이 나타남.
- 2010년 이후로는 여성 및 어린이 건강으로 소비자의 관심 대상이 확대 되었으며 특히 여성의 건강관리와 관련된 기능성이 다양화되었음.
 - 어린이 키성장, 여성 질 건강, 월경 전 불편감 개선, 수면의 질 개선이 신규 기능성으로 인정 받음.
 - 원료의 다양화와 제형에 규제가 없어진 점이 소비층을 확대하는데 역할을 한 것으로 보임

(4) 갱년기 여성 건강

- 폐경이 되기 전인 폐경 이행기, 폐경, 폐경 이후의 시기를 모두 포함하여 갱년기라고 하며, 이 시기에는 여성호르몬인 에스트로겐의 수준이 감소함.
 - 호르몬의 변화와 함께 다양한 갱년기 증상이 나타나며 개인에 따라 나타나는 증상의 정류, 중증도, 기간의 차이가 있음.
 - 가장 대표적인 갱년기 증상으로 비뇨생식기 증상인 질 건조증이 있으며 대표적인 혈관운동 증상인 안면 홍조는 갱년기 여성이 병원을 찾는 주요 원인임.
- 갱년기 여성건강과 관련된 기능성 원료는 백수오 등 복합추출물, 석류 추출/농축물, 홍삼(홍삼농축액), 회화나무 열매 추출물, 석류 농축액이 있음.
- 개별인정 원료 수는 적지만, 원료별 다양한 제품이 출시되어 있어 갱년기 여성 건강 관리에 대한 관심 증가를 반영하는 것으로 분석됨.

<표> 갱년기 여성건강 개별인정형 건강기능식품 현황

원료명	주요제조기업	주요제품명
백수오 등 복합추출물	(주)네추럴엔도텍	백수오, 백수오 퀴 프리미엄, 백수오 궁
석류추출액/농축액	네이처퓨어코리아(주)	리플라워 퀴
	대상 (주)	발효식초석류복합물
	비엔지웰푸드	석류추출물
	(주)더존피에이치씨	페이케어, 여다움

	(주)서흥	여왕의 석류, 닥터레드퀸
	(주)에이치엘사이언스	닥터석류진, 닥터석류진 알파, 황실보감, 황후의 시크릿, 레드클레오
	(주)케이지앤에프	엑스-T 석류추출물
	(주)한풍네이처팜	금단미인궁
	천호식품(주)	우먼솔루션
	코스맥스바이오(주)	에버플라본 석류, 가르시니아 맥스 석류맛, 미애 석류
	콜마비엔에이치(주) 푸디팜 사업부문	석류골드프리미엄
회화나무 열매 추출물	극동에치팜(주)	우먼스립
	(주)노바렉스	렉스플라본, 보옴 씨쿨라케어, 감마리놀렌산 플러스 회화나무, 건미락 에스지골드, 디어우면
	(주)알피바이오	회화 궁
	(주)유유헬스케어	화화춘
	(주)한풍네이처팜	퀸즈 트리플케어
	콜마비엔에이치(주) 푸디팜 사업부문	애틀미소포라퀸
	한국코러스(주) 건강기능식품사업부	여자의 청춘2

■ 경쟁기관현황

○참당귀추출물로 관절 건강, 인지기능 개선 가능성을 인정받은 (주)뉴트라젠은 관련 제품을 출시하여 활발히 판매하고 있음.

제품명	제품사진	가격
김영옥의 관절엔데커신		132,000원(1개월분)
김영옥의 데커신관절7080		148,000원(1개월분)

데커신 케어조인트		180,000원(1개월분)
인지 Q		154,000원(1개월분)

■ 지식재산권현황

○ 현재까지 당귀를 이용해 갱년기 여성의 뼈건강 효능에 관련된 특허가 없으며, 최근 10년간 당귀 관련 등록 특허는 다음과 같음.

분류	출원번호	특허명
등록	1020070045441	유해활성산소 소거효과가 있는 참당귀추출물의 추출 방법
등록	1013876310000	참당귀 잎으로부터 데쿠시놀안젤레이트 함유 추출물을 제조하는 방법
등록	1014041680000	참당귀 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품
등록	1014376300000	효소처리에 의한 참당귀의 기능성 다당류 추출방법 및 이의 추출물
등록	1013490840000	압출성형 공정을 이용한 참당귀 수용화 방법
등록	1011363610000	참당귀로부터 분리된 신규생리활성물질, 이의 추출방법 및 이를 포함하는 약학 조성물 (치매 예방)

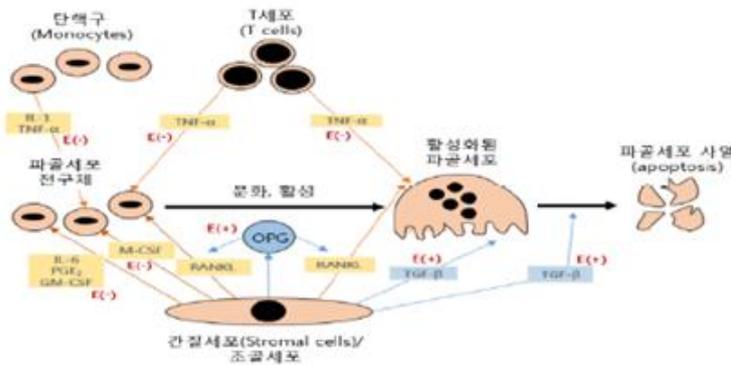
1-4. 연구개발의 중요성

■ 참당귀주정추출물의 신규 기능성 개발 연구의 중요성

- ‘참당귀주정추출물’은 (주)메디언스의 주력제품임에도 불구하고, 효능자료를 확보하지 못하여 국내 시장 진출 및 미국 시장 확대에 어려움을 겪고 있음.
- 국내에서 참당귀주정추출물의 경우 이미 타사에서 인지기능개선과 관절 건강으로 개별인정을 받았기 때문에 개별인정을 신규로 받지 않을 경우 두 가지 기능성의 제품을 제조 판매할 수 없어 이를 해결할 필요가 있음.
- (주) 메디언스는 참당귀주정추출물의 신규 기능성을 개발하고자 하며, 기존의 연구자료를 조사한 결과 갱년기 여성의 뼈건강 기능성 개발 가능성이 높음을 확인함.
- (주)메디언스는 참당귀주정추출물에 대한 오랜 제조 노하우를 가지고 있고 제조 공정 표준화가 완료되었기 때문에 동물 자료확보 이후 빠르게 개별인정 개발 추진이 가능함. 따라서 본 사업을 통해 확보한 자료를 기반으로 하여 장기적으로는 개별인정형 기능성식품으로 개발하여 국내에서의 제품 경쟁력을 확보하고자 함.

■ 갱년기여성의 뼈건강 관리의 중요성

- 골다공증은 골량이 감소하고 골의 미세구조적인 변화가 나타나 작은 충격에도 쉽게 골절이 되는 대사성 질환임. 폐경기의 에스트로겐 결핍은 골 손실을 가속화시킨다고 알려져 있으며, 에스트로겐 요법은 골다공증성 골절의 위험을 감소시킨다고 함.

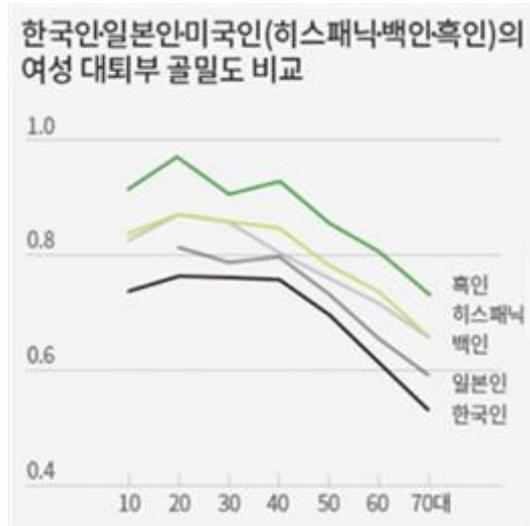
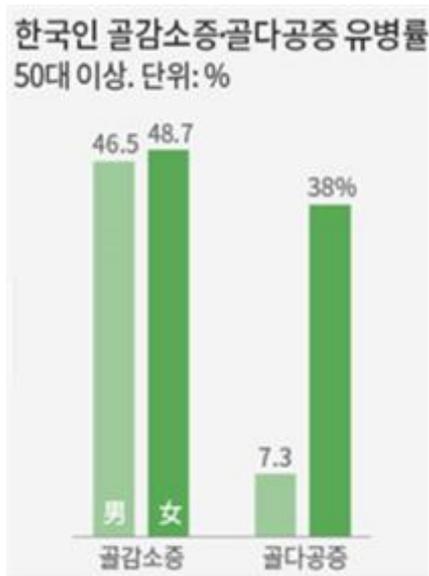


E(-), reduced by estrogen; E(+), increased by estrogen; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; TNF-α, tumor necrosis factor-α; PGE2, prostaglandin-E2; GM-CSF, granulocyte macrophage colony-stimulating factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; OPG, osteoprotegerin

- 에스트로젠은 골 흡수를 억제한다고 알려져 있는데, 골수에서 파골세포 전구체의 양을 증가시키는 염증성 사이토카인, 즉 IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF, M-CSF, prostaglandin-E2)를 감소시킴, 그리고 에스트로젠은 TGF- β 를 증가시켜 파골세포의 활성을 낮추고 세포 사멸을 유도하며, 조골세포에서 오스테오크로테그린 분비를 증가시켜 RANKL을 무력화시키는 역할을 함.

■ 한국인 골감소증·골다공증 유병률

- 2008~2011년 국민건강영양조사를 바탕으로 한국인의 골감소증·골다공증 유병률을 조사한 결과, 50대 이상에서 골다공증 전단계인 골감소증 유병률은 남성 46.5%, 여성 48.7%에 달했고, 골다공증 유병률은 남성 7.3%, 여성 38%로 나타남.
- 또한 한국인은 미국, 일본사람보다 뼈가 더 약한 것으로 나타났음. 같은 조사에서 10세 이상 한국인, 일본인, 미국인(히스패닉, 백인, 흑인)의 고관절, 대퇴골, 요추의 골밀도를 분석한 결과 한국인인 가장 낮게 나타남.



- 골다공증 유병률은 여성이 남성보다 5배가 높음. 그 이유는 여성호르몬 분비가 안 되는 ‘폐경’ 때문임. 일반적으로 폐경 직후 5년간 매년 3%씩 뼈가 소실되는 것으로 알려져 있음. 5년이 지난 후에는 매년 1%씩 감소하며 60세가 되면 전체 골량의 20%, 80세가 되면 전체 골량의 40%가 감소해 골절의 위험이 크게 높아짐.

1-5. 연구개발 범위

가. 1차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관((주)이비오) : 참당귀주정추출물의 여성갱년기 뼈건강 기능성 효능 검증
- 참여기관 1 ((주)메디언스) : 주관기관이 연구에 사용할 표준화된 참당귀주정추출물의 시료 제조 및 제공

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관((주)이비오) :

a. in vitro: MCF-7(Human breast cancer cell)을 이용한 여성갱년기 뼈건강 기능성 검증

여성갱년기에는 에스트로겐 분비가 감소되며 골밀도가 감소되는 현상을 보인다. 에스트로겐의 양과 골밀도는 밀접한 관련이 있다. 에스트로겐 신호전달은 에스트로겐 수용체를 매개하여 일어난다. 시험물질의 에스트로겐 활성을 평가하기 위하여 에스트로겐 수용체의 활성화나 단백질 발현량을 측정한다. 본 과제에서는 에스트로겐이 없는 상태에서 시험물질을 처리하여 에스트로겐 수용체를 활성화 하는지 에스트로겐 수용체가 많이 존재하는 MCF-7 세포를 통해 확인하는 시험을 진행한다.

- 세포독성시험: 시험물질의 독성 유무를 확인하고 시험에 사용할 용량 결정
- 세포증식시험: 시험물질이 암세포 증식에 미치는 영향을 검토
- 에스트로겐 수용체 발현량 측정: ER(estrogen receptor) α , ER β
유전자 발현량: RT-PCR
단백질 발현량: ELISA
- 에스트로겐 수용체 매개 유전자 발현 측정(RT-PCR): ESRI, pS2

b. 난소제거(OVX) 시험동물을 이용한 여성갱년기 뼈건강 기능성 평가

시험동물에서 난소를 제거하면 여성호르몬 분비가 일어나지 않아 사람의 갱년기와 유사한 생체 반응을 나타낸다. 따라서 OVX 모델은 여성갱년기 유효성 평가에 주로 사용되고 있다. OVX 모델의 경우 체중 증가, 호르몬 감소, 골밀도 감소가 관찰되며, 본 시험의 목적인 여성갱년기 뼈건강에 적합한 모델이라고 생각된다.

- 시험동물에서 난소를 제거한 후 8주간 시험물질을 투여
- 투여 종료 후 채혈, 자궁 적출, 대퇴골 발골
- 혈액 내 지질관련 인자 분석(혈액생화학분석):
중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤
- 혈액 내 호르몬 분석(ELISA): Estradiol, Lutenizing hormone
- 혈액 내 골형성 관련 지표 분석(ELISA):
Total alkaline phosphate, Bone alkaline phosphate, Osteocalcin
- 혈액 중 Ca, P 농도 분석: 혈액생화학분석
- 뇨 중 골흡수 관련지표 분석(ELISA):

Deoxyypyridinoline, Type I collagen cross-linked telopeptide(NTX)

-자궁 내 에스트로겐 수용체 유전자 분석(RT-PCR): ER α , ER β

- 대퇴골 골밀도 측정: μ CT scan

- 참여기관 1 ((주) 메디언스)

: Decursin&Decursinol angelate의 합으로 8% 이상 시료 제조하여 연구 기간 동안 주관기관에 제공한다.

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 시험방법

가. in vitro 시험

(1) 세포배양

MCF-7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 제공 받아 사용하였다. Fetal bovine serum (Gibco, BRL, Life technologies CO. USA) 및 Antibiotics (Gibco, BRL, Life technologies CO.)가 포함된 RPMI배지 (Gibco, BRL, Life technologies CO.)에 3일에 한번씩 계대 배양 하였다. 세포는 5% CO₂가 유지되는 37°C incubator에서 배양하여 사용하였다.

(2) 세포 독성 시험

96-well plate에 MCF-7세포를 3×10^4 cells/well의 농도로 seeding하고 24시간 배양하였다. 시험물질을 농도 별로 처리하고 24시간 배양 후에 CCK-8 (Dojindo, Japan) 10 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 30분 추가 배양하였다. Microplate reader (Victor TMx3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정상 대조군의 세포생존률 대비 각 농도별 세포생존률을 구하였다.

(3) 세포 증식 시험

96-well plate 에 MCF-7 세포를 7×10^3 cells/well의 농도로 seeding하고 24시간 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 양성 대조군과 시험물질이 농도 별로 포함된 배양배지를 처리하였다. 24시간 단위로 3일간 배양 후 CCK-8 (Dojindo, Japan) 10 µL를 첨가하여 37°C incubator에서 1시간 30분 추가 배양하였다. Microplate reader (Victor TMx3, PerkinElmer, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 용매 대조군의 세포 증식률 대비 각 농도별 세포증식률을 구하였다.

(4) RT-qPCR

100 mm cell culture dish에 MCF-7 세포를 2×10^6 cells/dish 도로 seeding하고 24시간 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 양성 대조군과 시험물질이 농도 별로 포함된 배양배지를 처리하였다. 세포를 수거하여 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology, Korea)의 매뉴얼에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 Spectrophotometer (UV-2450, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Real time PCR machine(Chromo4, BIO-RAD, CA, U.S.A.)을 이용하여 Estrogen receptor α , β 및 pS2 의 RT-qPCR을 실시하였다. RT-qPCR은 iTaq™ Universal SYBG® Green One-Step kit (Bio-Rad, USA)를 사용하였으며 다음과 같은 조건으로 수행되었다. Reverse transcription reaction at 50°C for 10 min, polymerase activation and DNA denaturation 95°C for 60 sec,

denaturation at 95°C for 10 sec, Annealing & Extension at 60°C for 30 sec, 40 cycles. 모든 반응은 house keeping gene인 β -actin으로 보정하고 용매대조군 (참당귀 주정추출물 0 %)을 기준으로 normalize 하였다. Normalization은 Vandesompele의 방법으로 계산하였다. 시험에 사용한 primer의 정보는 다음과 같다.

Primer information for MCF-7 cell

Gene	Accession No.	Sequence for primers (5'-3')	
ESR1	JF810888	forward	CTGGCTAGAGATCCTGATGATTG
		reverse	TTCCTGTCCAAGAGCAAGTTAG
ESR2	AF051427	forward	GATCGCTAGAACACACCTTACC
		reverse	AGTGAGCATCCCTCTTTGAAC
pS2	NM_003225.2	forward	CCCTGGTGCTTCTATCCTAATAC
		reverse	GTCAGGATGCAGGCAGAT
β -actin	NM_001101	forward	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
		reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

(5) 통계처리

실험에서 얻어진 모든 자료들은 평균과 표준편차 또는 표준오차로 나타내었으며 SPSS (SPSS Version 20.0 Inc. U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. 용매대조군과 시험물질 투여군간의 유의성을 확인하기 위하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시 (유의수준: 0.05)하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 단측 0.05). 의 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시 (유의수준: 0.05)한 결과, 유의성이 관찰되면 용매대조군에 대한 각 시험군간의 유의성을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다.

나. in vivo 시험

(1) 시험동물의 구입 및 유지

5주령 암컷 SD Rat 43마리를 오리엔트바이오 (Korea)로부터 공급받아 사용하였다. 온도 22 ~ 25 °C, 상대습도 50 ~ 60 %, 명암주기 12시간, 조도 200 ~ 300 LUX가 유지되는 동물시험시절에서 사육하였다. Rat용 폴리카보네이트 상자에 2마리씩 사육하고 동물용 고형사료와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(2) 군구성

일주일 순화 후 7마리는 위수술을 시행하고 36마리는 난소를 적출(OVX)한 후 14일간 순화하였다. 임상 증상에 이상이 없는 동물 중 평균 체중이 유사하도록 군당 6마리씩 군분리하였다. 시험군은 위수술군(Sham), 난소 적출군(OVX), 참당귀 주정추출물 투여군 (OVX+62.5 mg/kg, OVX+125 mg/kg, OVX+250 mg/kg) 및 Estradiol 투여군 (OVX+30 μ g/kg)으로 총 6군으로 구성되었다.

(3) 시험물질 투여

위수술군 및 OVX참당귀 주정추출물은 증류수를 일 1회 28일간 매일 경구투여 하였다. 참당귀 주정추출물 투여군은 용량대로 일 1회 28일간 매일 경구투여 하였다. Estradiol은 corn oil (Sigma-aldrich, U.S.A.)에 조제하여 주 2회 4주간 피하투여 하였다.

(4) 조직 채취

마지막 시험물질 투여 2일전 시험동물을 절식판이 놓아진 케이지에 4시간 동안 넣고 소변을 채취하여 시험에 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

시험물질투여 마지막 날 저녁부터 절식하고 다음 날 아침 조직을 적출하였다. 혈액은 배대동맥에서 채혈용 주사기를 이용하여 채취하여 SST tube (BD, U.S.A.)에 넣고 원심분리기 (Hanil, Korea)를 이용하여 3,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 혈청을 취하여 시험에 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

자궁은 적출하여 무게를 측정하고 시험에 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

대퇴골은 조직을 제거하고 10% 중성포르말린에 넣어 microCT를 측정하였다.

(5) 혈액생화학분석

Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride(TG), ALP, Ca, P, AST 및 ALT는 혈액생화학분석기 (Hitich, Japan)를 사용하여 부검일에 측정하였다.

(6) ELISA

Estradiol (R&D System, U.S.A.), Lutenizing hormone (Novus, U.S.A.), Osteocalcin (Quidel, U.S.A.), bALP (CUSABIO, U.S.A.), Deoxypyridinoline (Quidel, U.S.A.) 및 Type I collagen cross-linked telopeptide(NTX1; Abbexa, UK)은 ELISA assay kit를 이용하여 각 kit의 manual 대로 실시하였다.

(7) RT-qPCR

easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology, Korea)의 매뉴얼에 따라 자궁에서 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 Spectrophotometer (UV-2450, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Real time PCR machine(Chromo4, BIO-RAD, CA, U.S.A.)을 이용하여 Estrogen receptor 1 과 2 및 β -actin의 RT-qPCR을 실시하였다. RT-qPCR은 iTaq™ Universal SYBG® Green One-Step kit (Bio-Rad, USA)를 사용하였으며 다음과 같은 조건으로 수행되었다. Reverse transcription reaction at 50°C for 10 min, polymerase activation and DNA denaturation 95°C for 60 sec, denaturation at 95°C for 10 sec, Annealing & Extension at 60°C for 30 sec, 40 cycles. 모든 반응은 house keeping gene인 β -actin으로 보정하고 sham군을 기준으로 normalize 하였다. 시험에 사용한 primer의 정보는 다음과 같다.

Primer information for Rat

Gene	Accession No.	Sequence for primers (5'-3')	
ESR α	AB477039	forward	TCCTCCTCATCCTTTCCCATA
		reverse	GTCATAGAGAGGCACGACATTC
ESR β	AB012721	forward	GATCACTAGAGCACACCTTACC
		reverse	CCCTCTTTGCGTTTGGACTA
β -actin		forward	CTTCCTTCCTGGGTATGGAATC
		reverse	CTGTGTTGGCATAGAGGTCTT

(8) 대퇴골 골밀도 측정

골밀도는 오송첨단의료산업진흥재단 실험동물센터 (Osong, Korea)에 의뢰하여 측정하였다. Quantum FX micro-CT (Perkin Elmer, U.S.A.) 기기를 사용하여 영상을 촬영하고, Analyze 12 (Mayo Clinic, U.S.A.)를 이용하여 골밀도, 골미세구조 및 영상 분석을 실시하였다.

(9) 통계처리

실험에서 얻어진 모든 자료들은 평균과 표준오차로 나타내었으며 SPSS (SPSS Version 20.0 Inc. U.S.A.)를 사용하여 검정하였다. Sham(G1)군과 OVX(G2)군은 independent t-test를 실시하였다. Levene의 등분산 검정 결과로 등분산성을 확인하고 (유의수준: 양측 0.05), 등분산성 검정 결과에 따라 평균의 동일성에 대한 t-검정 결과를 선택하였다 (유의수준: 단측 0.05).

OVX군 (G2)에 대한 각 시험군 (G3~G5)간의 유의성 확인을 위하여 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시 (유의수준: 0.05)하여 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다 (유의수준: 단측 0.05). 의 One-way analysis of variance (ANOVA)를 실시 (유의수준: 0.05)한 결과, 유의성이 관찰되면 OVX(G2)에 대한 각 시험군 (G1~G5)간의 유의성을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였다.

OVX(G2)군과 estradiol (G6)군은 independent t-test를 실시하였다. Levene의 등분산 검정 결과로 등분산성을 확인하고 (유의수준: 양측 0.05), 등분산성 검정 결과에 따라 평균의 동일성에 대한 t-검정 결과를 선택하였다 (유의수준: 단측 0.05).

다. 참당귀주정추출물 준비

참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 국내산으로 구매하였다. 참당귀 무게의 10배수의 주정을 넣고 80°C에서 2회 추출하였다. 추출물은 여과하여 농축 냉각 후 다시 여과하였다. 여과물에 미세결정셀룰로오스를 혼합하여 건조하였다. (주)이비오 측에 decursin 및 decursinol angelate 총 함량이 100mg/g의 원료를 제공하였다.

2-2. 시험결과

가. in vitro 시험

(1) 세포독성시험 (그림 1)

- 참당귀 주정추출물을 농도별로 MCF-7 세포에 처리했을 때 용매대조군을 기준으로 세포의 생존률을 측정하였다.
- 참당귀 주정추출물을 농도별로 처리하였을 때 0.5%에서 세포생존률은 용매대조군 대비 60%, 1%에서 37%의 세포 생존률을 나타내어 독성이 있는 것으로 확인되었다.
- 0.06 및 0.125% 처리하였을 때 용매대조군 대비 세포 생존률은 114 및 123%로 세포 증식이 일어난 것을 확인하였다.
- 0.0017 ~0.03% 처리하였을 때 용매대조군 대비 세포 생존률은 90 ~102%로 용매대조군과 차이를 보이지 않았다.
- MCF-7 세포는 유방암 세포이므로 세포 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되는 0.03%를 시험에 사용할 최고 농도로 설정하였다.

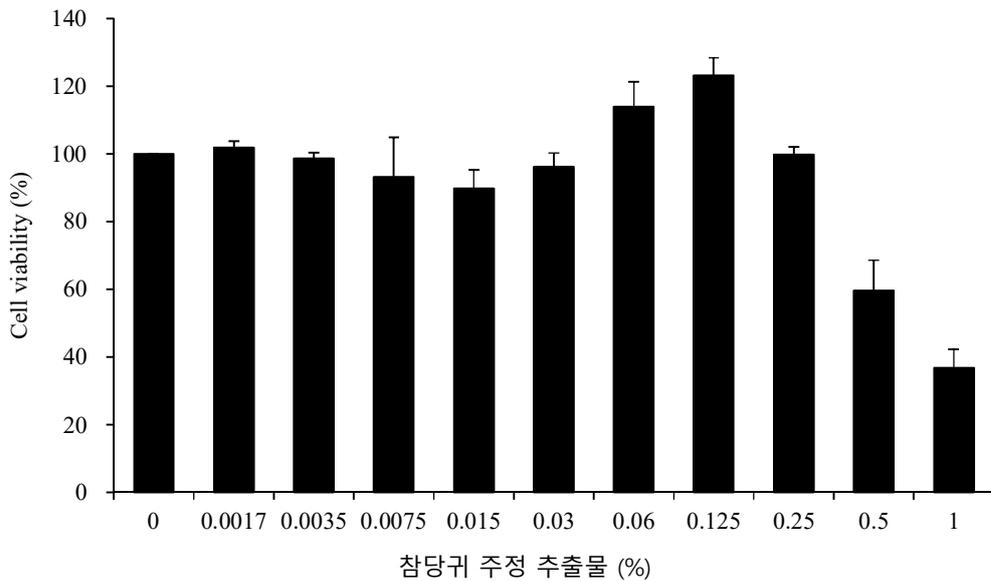


그림 1. 참당귀 주정추출물이 MCF-7 세포의 생존률에 미치는 영향

Each point represents mean+S.D., n=3

(2) 세포증식시험 (그림 2)

- 참당귀 주정추출물을 0.0012, 0.006 및 0.03 %로 MCF-7 세포에 처리했을 때 0시간의 세포 수를 기준으로 세포의 증식률을 측정하였다.
- 용매대조군 (참당귀 주정추출물 0%)의 세포 성장률은 0, 24, 48 및 72시간에서 각각 평균 100, 156, 294 및 417%의 세포 증식을 보였다.
- 참당귀 주정추출물을 0.0012%로 처리하였을 때 0, 24, 48 및 72시간에서 각각 평균 100, 154, 274 및 441%의 세포 증식을 보였으며 모든 측정 시점에서 용매대조군과 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물을 0.006%로 처리하였을 때 0, 24, 48 및 72시간에서 각각 평균 100, 115, 234 및 306%의 세포 증식을 보였으며 모든 측정 시점에서 용매대조군과 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물을 0.03%로 처리하였을 때 0, 24, 48 및 72시간에서 각각 평균 100, 154, 274 및 441%의 세포 증식을 보였으며 모든 측정 시점에서 용매대조군과 비교하여 증식률은 감소하였고, 24시간에서 통계학적으로 유의한 ($p < 0.05$) 차이를 나타내었다.

세포독성 평가에서 참당귀 주정추출물을 0.03%로 처리하였을 때 용매대조군과 차이를 보이지 않았지만 세포증식률은 감소하였다. 세포독성 평가에서는 MCF-7 세포를 cell culture dish에서 24시간 배양한 후 참당귀 주정추출을 처리하였고, 세포증식률 평가에서는 배양과 동시에 참당귀 주정추출물을 처리하였기 때문에 배양 초기에 세포 성장을 억제한 것으로 생각된다.

따라서, 참당귀 주정추출물을 사람 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 0.03%로 처리하였을 경우 암세포 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

- 양성대조군인 estradiol을 MCF-7 세포에 1 nM로 처리하였을 때 0, 24, 48 및 72시간에서 각각 평균 100, 151, 311 및 444%의 세포 증식을 보였으며 모든 측정 시점에서 용매대조군과 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.

참당귀 주정추출물을 MCF-7 세포에 0.0012 및 0.006%로 처리하였을 때 용매대조군과 비교하여 세포 증식률 차이를 보이지 않았으나, 0.03%를 처리하였을 때 세포 증식 억제에 효과가 있는 것으로 생각된다.

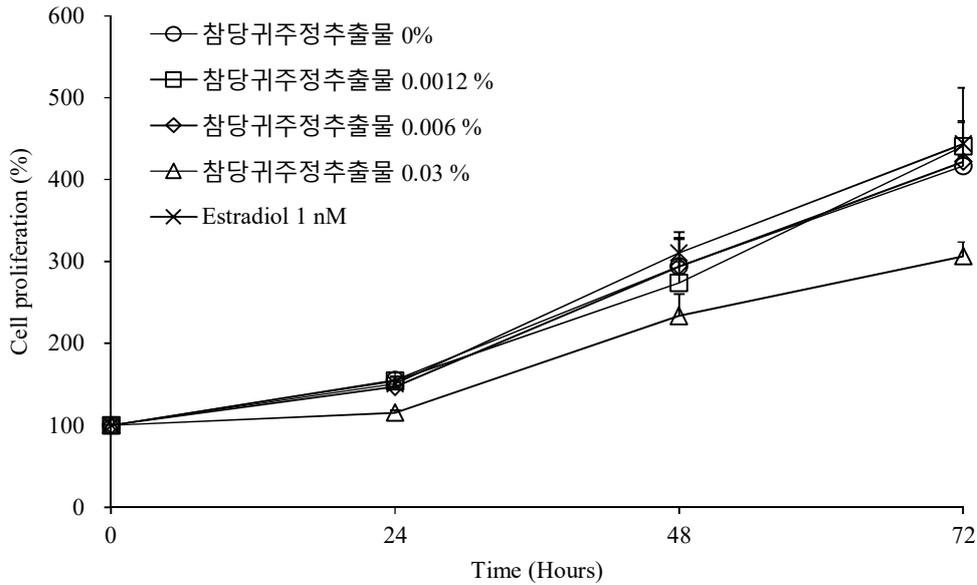


그림 2. 참당귀 주정추출물이 MCF-7 세포의 증식에 미치는 영향

Each point represents mean+S.E., n=3

*p<0.05, Significant difference from the vehicle group by Dunnett's t-test.

(3) 참당귀 주정추출물이 MCF-7 세포의 estrogen receptor의 발현에 미치는 영향 (그림 3)

(가) Estrogen receptor α (ER α)

- 참당귀 주정추출물 0.0012 및 0.006 %처리군의 ER α 발현률은 각각 용매대조군 대비 평균 1.07 및 1.24 배로 증가되는 경향을 나타내었으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 0.03% 처리군의 ER α 발현률은 용매대조군 대비 평균 0.48 배로 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물의 주요 성분인 decursin을 처리한 군의 ER α 발현률은 용매대조군 대비 0.45 배로 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- MCF-7 세포에서 ER α 의 stimulation되면 세포 증식이 이루어지는 것으로 보고되고 있다. 따라서 참당귀 주정추출물은 ER α 의 발현을 억제하여 세포 증식을 억제하는 것으로 판단된다.

(나) Estrogen receptor β (ER β)

- 참당귀 주정추출물 0.0012 및 0.006 %처리군의 ER β 발현률은 각각 용매대조군 대비 평균 1.06 및 0.97 배로 용매대조군과 차이를 보이지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 0.03% 처리군의 ER β 발현률은 용매대조군 대비 평균 2.38 배로 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물의 주요 성분인 decursin을 처리한 군의 ER β 발현률은 용매대조군 대비 3.16 배로 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.
- MCF-7 세포에서 ER β 가 stimulation되면 세포 증식이 감소되는 것으로 보고되고 있다. 따라서

참당귀 주정추출물은 ER β 의 발현을 억제하여 세포 증식을 억제하는 것으로 판단된다.

(다) pS2

- 참당귀 주정추출물 0.0012, 0.006 및 0.03 %처리군의 pS2 발현률은 각각 용매대조군 대비 평균 1.46, 1.78 및 3.01 배로 증가되는 경향을 나타내었으며 모든 처리 농도에서 통계학적으로 유의성 (P<0.01)을 나타내었다.
- 참당귀 주정추출물의 주요 성분인 decursin을 처리한 군의 pS2 발현률은 용매대조군 대비 3.14 배로 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.
- pS2는 promotor에 estrogen receptor와 결합하는 element가 존재하여 ESR α 와 ESR β 에 의해 전사가 조절되는 유전자로, 본 시험에서는 ESR β 에 의해 발현이 촉진 된 것으로 판단된다.

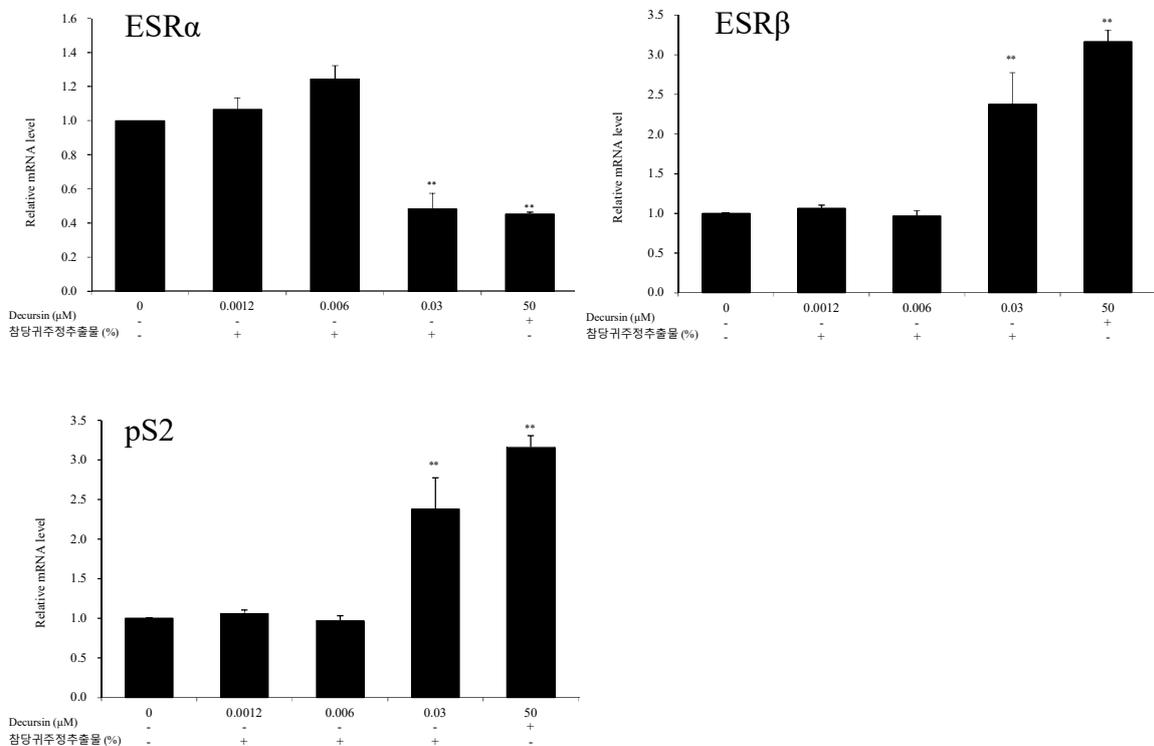


그림 3. 참당귀 주정추출물이 MCF-7 세포의 estrogen receptor 발현에 미치는 영향

Each point represents mean+S.E., n=3

**p<0.01, Significant difference from the vehicle group by Dunnett's t-test.

나. in vivo 시험

(1) 체중 증가량 (그림 4)

- Sham군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 213.8 g에서 투여 종료일 270.4 g으로 꾸준히 증가하였으며, 56.6 g의 체중 증가를 나타내었다.
- OVX군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 237.4 g에서 투여 종료일 341.4 g으로 꾸준히 증가하였으며, 104.0 g의 체중 증가를 나타내었다. Sham군과 비교하여 모든 시험기간 동안 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)한 체중의 증가를 나타내었고 체중 증가율 또한 통계학적으로 유의 ($P < 0.01$)하게 증가되었다. 난소를 절제한 암컷 동물은 정상동물과 비교하여 체중이 증가되므로, 본 시험에서 실험동물에 난소 적출이 정상적으로 이루어진 것을 확인 할 수 있었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 238.4 g에서 투여 종료일 341.7 g으로 꾸준히 증가하였으며, 103.3 g의 체중 증가를 나타내었다. OVX과 비교하여 모든 시험기간 동안 체중과 체중 증가율에 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 236.0 g에서 투여 종료일 343.1 g으로 꾸준히 증가하였으며, 107.1 g의 체중 증가를 나타내었다. OVX과 비교하여 모든 시험기간 동안 체중과 체중 증가율에 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 235.7 g에서 투여 종료일 334.5 g으로 꾸준히 증가하였으며, 98.7 g의 체중 증가를 나타내었다. OVX과 비교하여 모든 시험기간 동안 체중과 체중 증가율에 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 체중은 시험물질 투여일에 평균 234.9 g에서 투여 종료일 276.5 g으로 꾸준히 증가하였으며, 41.6 g의 체중 증가를 나타내었다. OVX과 비교하여 시험물질 투여 4일부터 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 체중이 감소되었으며 체중증가율 또한 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.

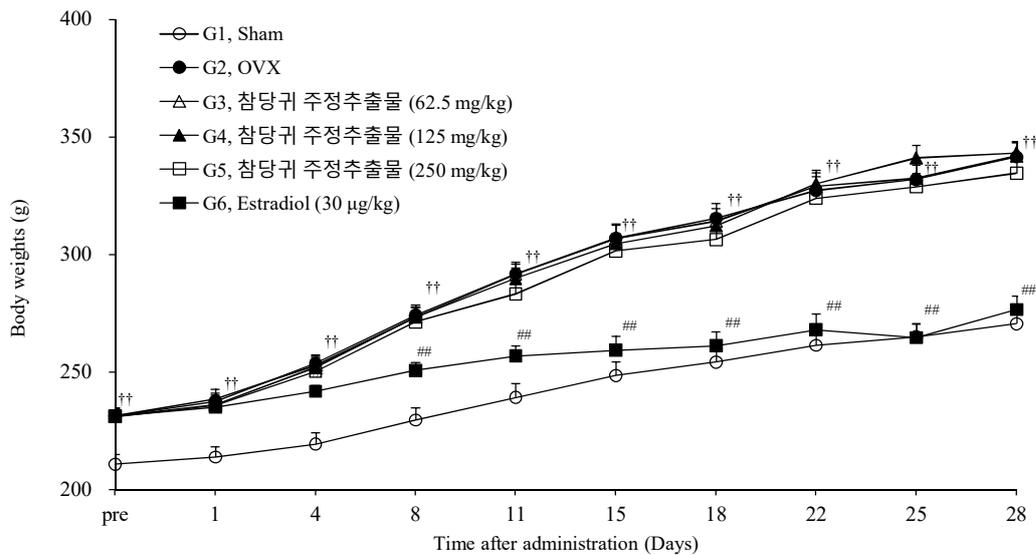


그림 4. 시험기간 중 체중의 변화

Each point represents mean+S.E.

††p<0.01, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

##p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the Sham group (G2) (p>0.05, ANOVA).

(2) 혈액 내 지질관련 바이오 마커 분석 (표1)

① 콜레스테롤

- Sham군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 75.1, 42.7 및 23.5 mg/dL를 나타내었다.

- OVX군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 98.0, 58.7 및 26.1 mg/dL로 Sham군과 비교하여 증가하였으며, 총콜레스테롤 및 저밀도 콜레스테롤은 통계학적으로 유의하게 증가되었다.

- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 94.0, 50.0 및 27.3 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 96.9, 45.8 및 28.2 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 98.6, 56.8 및 29.2 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 총콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 및 고밀도 콜레스테롤은 각각 평균 90.7, 43.7 및 26.8 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여

총콜레스테롤은 감소하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았고 저밀도 콜레스테롤은 통계학적으로 유의 ($P < 0.05$)하게 감소하였고 고밀도 콜레스테롤은 차이를 나타내지 않았다.

② 중성지방

- Sham군의 혈액 내 중성지방은 평균 39.5 mg/dL를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 중성지방은 평균 47.7 mg/dL로 Sham군과 비교하여 증가하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 중성지방은 평균 38.4 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 중성지방은 평균 44.8 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 중성지방은 평균 36.5 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 혈액 내 중성지방은 평균 37.6 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.

표 1. 혈액 내 지질 관련 바이오 마커 분석

Group/ Dose(mg/kg)		Cholesterol (mg/dL)			TG
		Total	LDL	HDL	mg/dL
G1 0	Mean	75.1	42.7	23.5	39.5
	S.E.	4.1	4.7	1.1	3.5
	N	6	6	6	6
G2 0	Mean	98.0	58.7	26.1	47.7
	S.E.	3.2	5.6	0.9	8.7
	N	6 ††	6 †	6	6
G3 62.5	Mean	94.0	50.0	27.3	38.4
	S.E.	5.8	7.7	1.5	4.6
	N	6	6	6	6
G4 125	Mean	96.9	45.8	28.2	44.8
	S.E.	5.3	5.0	1.6	4.0
	N	6	6	6	6
G5 250	Mean	98.6	56.8	29.2	36.5
	S.E.	3.4	4.2	1.0	4.1
	N	6	6	6	6
G6 30 µg/kg	Mean	90.7	43.7	26.8	37.6
	S.E.	5.5	5.3	1.2	5.5
	N	6	6 #	6	6

G1: Sham, G2: OVX, G3 ~ G5: OVX+참당귀주정추출물, G6: OVX+Estradiol

S.E.: Standard error

N: Number of animals

† p<0.05, Significant difference from the Sham control group (G1) by Student t-test.

†† p<0.01, Significant difference from the normal control group (G1) by Student t-test.

p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the OVX group (G2) (p>0.05, ANOVA).

(3) 혈액 내 뼈건강 관련 바이오 마커 분석 (표2)

① ALP

- Sham군의 혈액 내 ALP는 평균 220.7 IU/L를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 ALP는 평균 332.3 IU/L로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 증가하였다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 ALP는 평균 308.3 IU/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 ALP는 평균 294.3 IU/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성을 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 ALP는 평균 249.5 IU/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 ALP는 평균 168.3 IU/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.

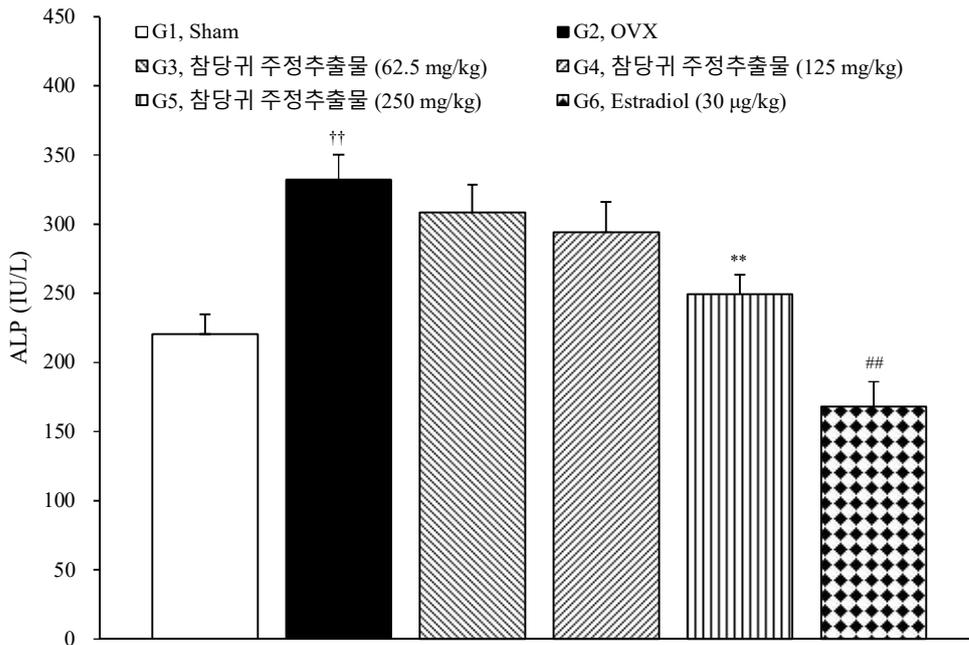


그림 5. 혈액 내 ALP

Each point represents mean+S.E.

††p<0.01, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

**p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

##p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

② bALP (bone ALP)

- Sham군의 혈액 내 bALP는 평균 0.153 O.D.를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 bALP는 평균 0.248 O.D.로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.05)하게 증가하였다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 bALP는 평균 0.166 O.D.를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학으로 유의 (P<0.05)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 bALP는 평균 0.148 O.D.를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 bALP는 평균 0.125 O.D.를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 bALP는 평균 0.111 O.D.를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.

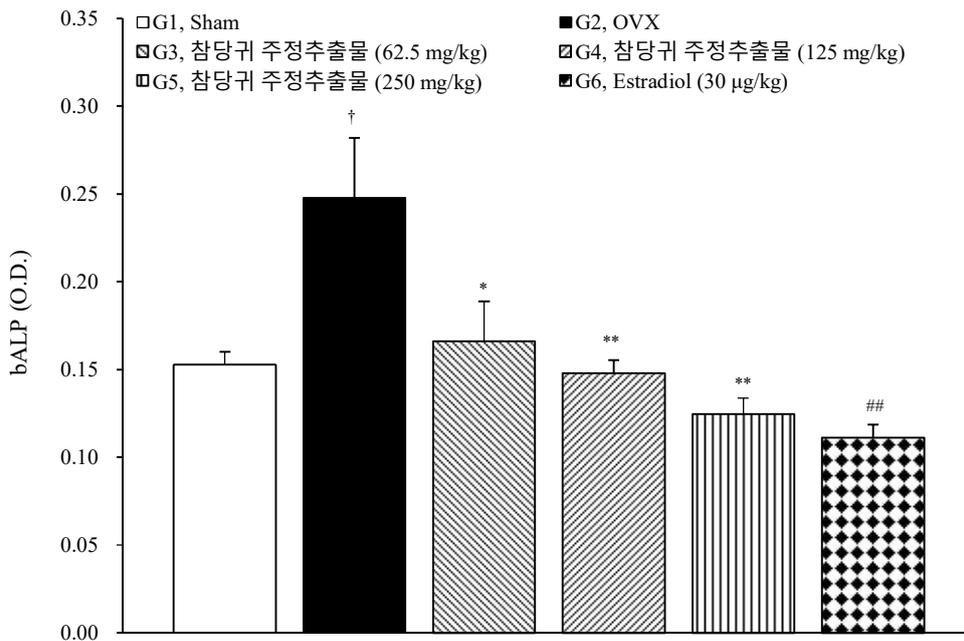


그림 6. 혈액 내 bALP

Each point represents mean+S.E.

†p<0.05, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

*p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

**p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

##p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

③ Ca

- Sham군의 혈액 내 Ca은 평균 9.5 mg/dL를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 Ca은 평균 10.02 mg/dL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 Ca은 평균 9.68 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 Ca은 평균 9.67 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 Ca은 평균 9.88 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 혈액 내 Ca은 평균 9.92 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.

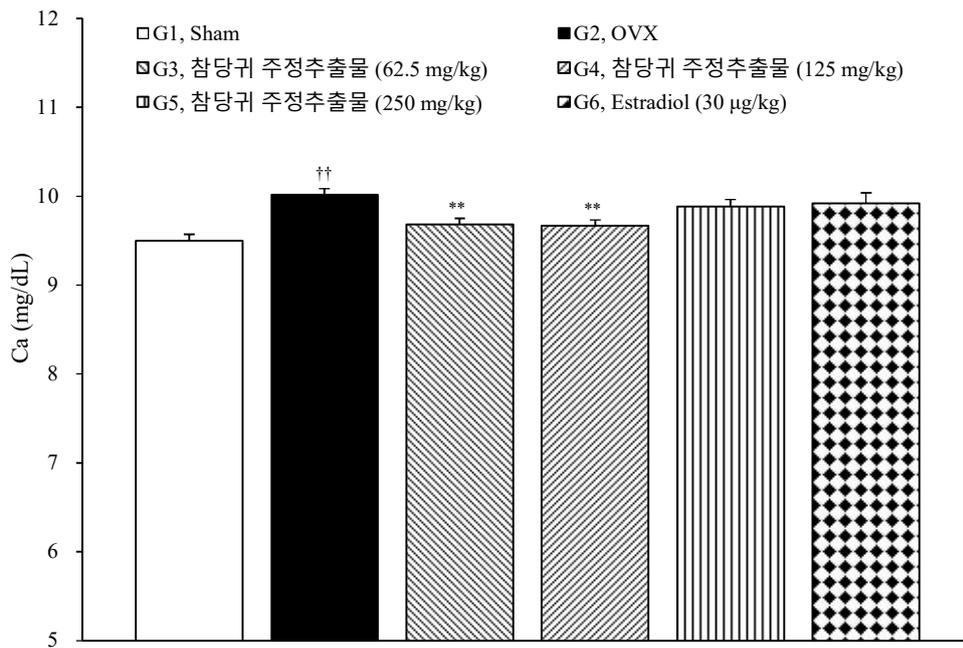


그림 6. 혈액 내 Calcium

Each point represents mean+S.E.

†† $p<0.01$, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

** $p<0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

④ IP

- Sham군의 혈액 내 인은 평균 6.22 mg/dL를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 인은 평균 7.33 mg/dL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 인은 평균 7.37 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 인은 평균 7.07 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 인은 평균 7.15 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 인은 평균 6.02 mg/dL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소하였다.

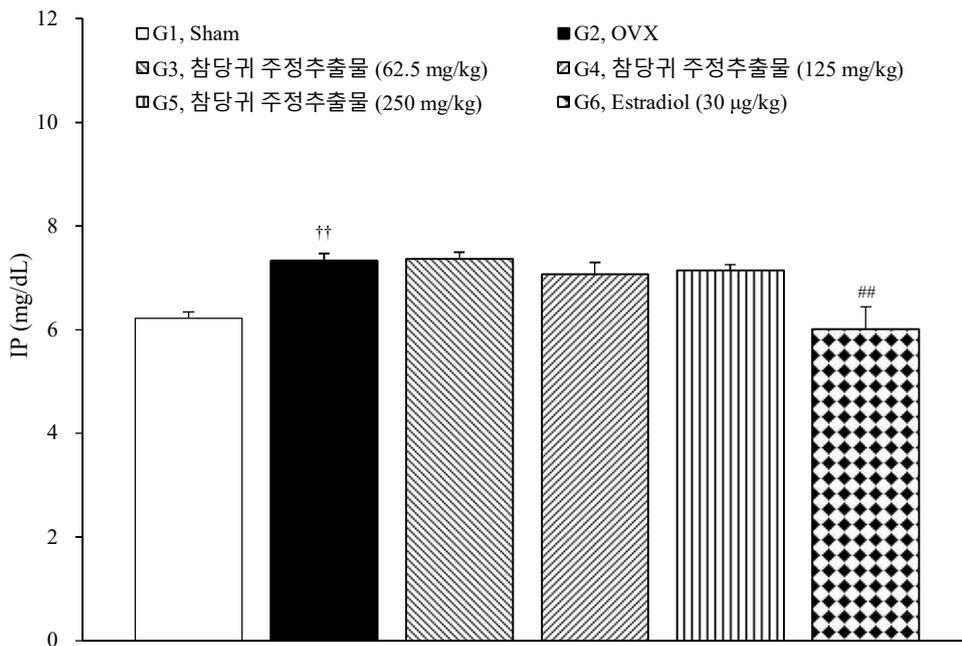


그림 7. 혈액 내 Phosphorus

Each point represents mean+S.E.

††p<0.01, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

##p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the OVX group (G2) (p>0.05, ANOVA).

⑤ Osteocalcin

- Sham군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 22.48 ng/mL를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 28.43 ng/mL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 28.16 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 29.40 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 24.49 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 혈액 내 osteocalcin은 평균 22.47 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($P < 0.01$)하게 감소하였다.

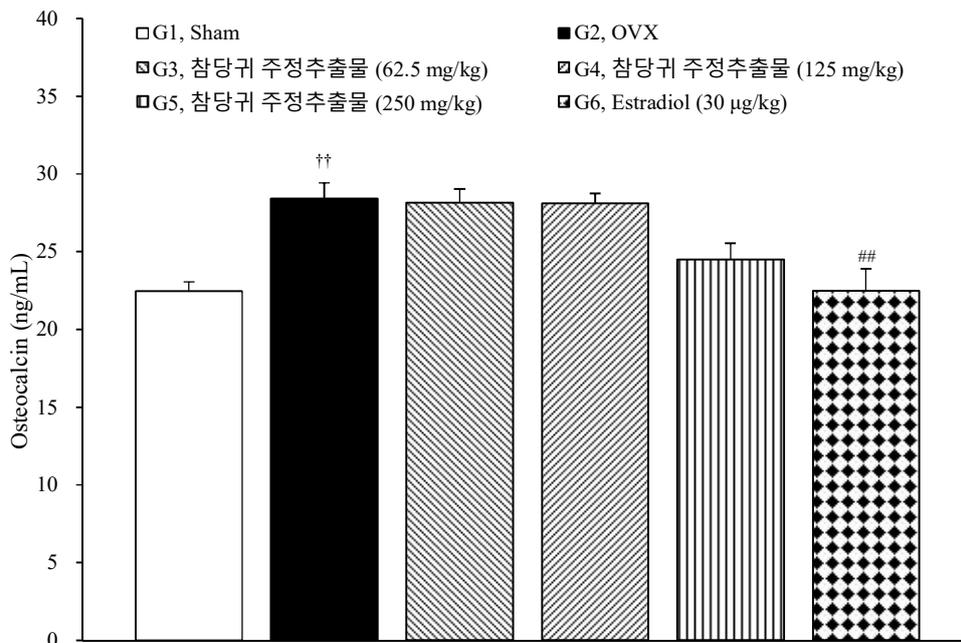


그림 8. 혈액 내 Osteocalcin

Each point represents mean+S.E.

†† $p < 0.01$, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

$p < 0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the OVX group (G2) ($p > 0.05$, ANOVA).

(4) 뇨 내 뼈건강 관련 바이오 마커 분석 (표3)

① Deoxypyridinoline (DPD)

- Sham군의 혈액 내 DPD는 평균 614.37 nmol/L를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 DPD는 평균 997.54 nmol/L로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.05)하게 증가하였다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 DPD는 평균 995.70 nmol/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 DPD는 평균 897.151 nmol/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 DPD는 평균 358.9 nmol/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적인 유의성은 나타나지 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 DPD는 평균 491.5 nmol/L를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (P<0.01)하게 감소되었다.

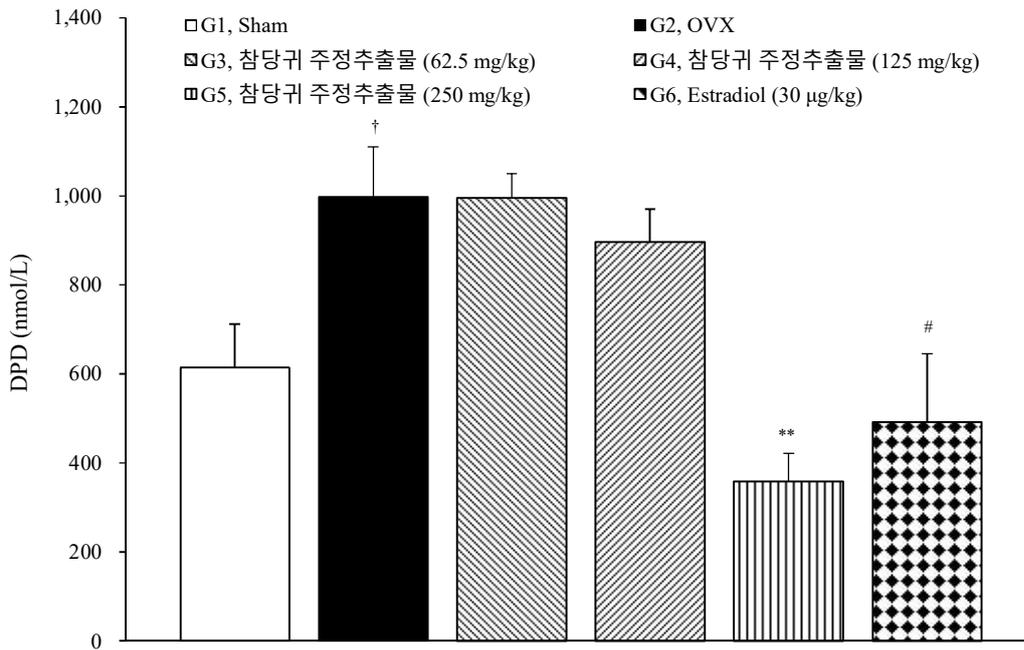


그림 9. 뇨 내 Deoxypyridinoline

Each point represents mean+S.E.

†p<0.05, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

**p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

#p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

② Type I Collagen cross-linked telopeptide (NTX I)

- Sham군의 혈액 내 NTX I 은 평균 3.14 ng/mL를 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 NTX I 은 평균 6.37 ng/mL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.05)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 NTX I 은 평균 4.49 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 NTX I 은 평균 2.85 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 NTX I 은 평균 1.87 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 혈액 내 NTX I 은 평균 3.64 ng/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.05)하게 감소되었다.

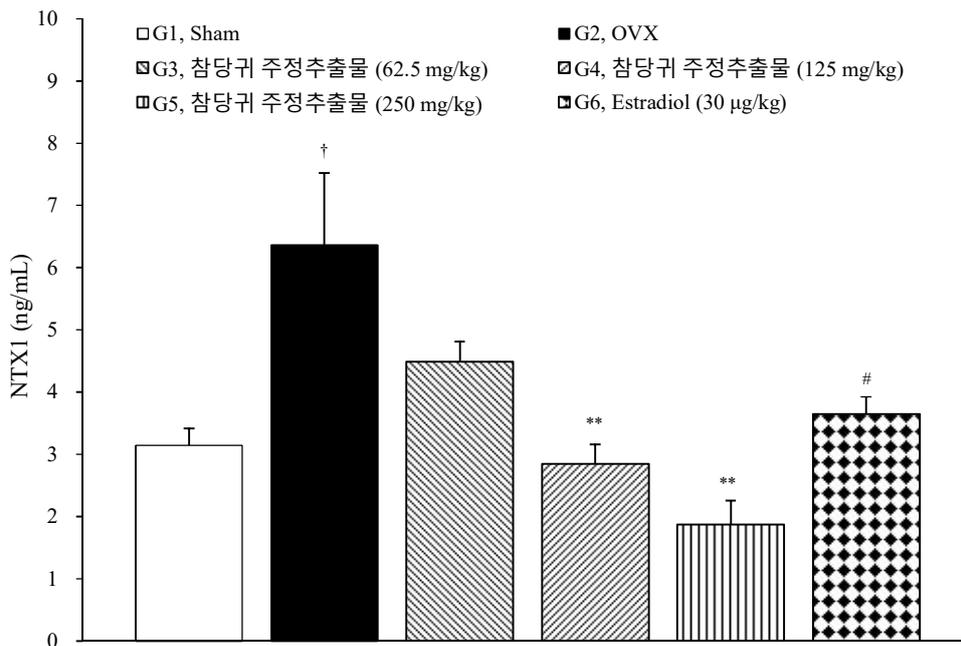


그림 10. 뇨 내 Type I Collagen cross-linked telopeptide (NTX I)

Each point represents mean+S.E.

†p<0.05, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

**p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

#p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

(5) 대퇴골 골밀도 분석 (표2)

① **Trabecular volume** (해면골 부피)

- Sham군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 3.03 mm³을 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 0.30 mm³로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 0.53 mm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 0.49 mm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 0.60 mm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 부피는 평균 0.63 mm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.05)하게 증가되었다.

② **Bone Mineral Density (Trabecular BMD; 해면골 골밀도)**

- Sham군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 317.62 mg/cm³을 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 25.96 mg/cm³로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 45.23 mg/cm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 41.64 mg/cm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 47.45 mg/cm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 골밀도는 평균 60.03 mg/cm³를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.

③ **Trabecular number (Tb. N; 해면골 수)**

- Sham군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 1.58 1/mm을 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 0.16 1/mm로 Sham군과 비교하여 통계학적으로

유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.

- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 0.27 1/mm를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 0.26 1/mm를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 0.26 1/mm를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 수는 평균 0.38 1/mm를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 증가되었다.

④ Trabecular thickness (Tb. Th; 해면골 두께)

- Sham군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 119.37 μ m를 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 84.37 μ m로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 92.13 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 91.08 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 90.28 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 두께는 평균 94.67 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

⑤ Trabecular separation (Tb. Sp; 해면골 분리)

- Sham군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 304.05 μ m를 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 276.88 μ m로 Sham군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성은 나타나지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 314.77 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 351.65 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 350.47 μ m를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- Estradiol 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 대퇴골 해면골의 분리는 평균 345.63 μm 를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.05$)하게 증가되었다.

⑥ Structural model index (SMI)

- Sham군의 대퇴골 SMI는 평균 0.13을 나타내었다.

- OVX군의 대퇴골 SMI는 평균 0.47로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.

- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 SMI는 평균 0.31을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 SMI는 평균 0.33을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 SMI는 평균 0.33을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- Estradiol 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 대퇴골 SMI는 평균 0.30을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.

⑦ Connectivity density (Conn. D)

- Sham군의 대퇴골 Conn. D는 평균 34.94 $1/\text{mm}^3$ 을 나타내었다.

- OVX군의 대퇴골 Conn. D는 평균 1.43 $1/\text{mm}^3$ 로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.

- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 Conn. D는 평균 3.74 $1/\text{mm}^3$ 를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 Conn. D는 평균 2.96 $1/\text{mm}^3$ 을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 Conn. D는 평균 3.20 $1/\text{mm}^3$ 을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

- Estradiol 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군의 대퇴골 Conn. D는 평균 4.76 $1/\text{mm}^3$ 을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.

⑧ Bone surface (BS; 뼈 면적)

- Sham군의 대퇴골 뼈면적은 평균 97.28 mm^2 을 나타내었다.

- OVX군의 대퇴골 뼈면적은 평균 14.17 mm^2 로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.

- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 뼈면적은 평균 23.52 mm²를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 뼈면적은 평균 21.39 mm²를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 뼈면적은 평균 26.02 mm²를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 대퇴골 뼈면적은 평균 26.31 mm²를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.05)하게 증가되었다.

⑨ Bone volume fraction (Bone volume/Total volume; BV/TV)

- Sham군의 대퇴골 BV/TV는 평균 18.72%를 나타내었다.
- OVX군의 대퇴골 BV/TV는 평균 1.57%로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 대퇴골 BV/TV는 평균 2.70%를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 대퇴골 BV/TV는 평균 2.48%를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 대퇴골 BV/TV는 평균 2.85%를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- Estradiol 30 µg/kg 투여군의 대퇴골 BV/TV는 평균 3.59%를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 (p<0.01)하게 증가되었다.

표 2. 대퇴골 골밀도 관련 지표

Group/ Dose(mg/kg)		Trabeculae Volume mm ³	Trabeculae BMD mg/cm ³	Tb.N 1/mm	Tb.Th μm
G1 0	Mean	3.03	317.62	1.58	119.37
	S.E.	0.21	30.44	0.13	6.80
	N	6	6	6	6
G2 0	Mean	0.30	25.96	0.16	84.37
	S.E.	0.05	4.76	0.02	7.23
	N	6 ††	6 ††	6 ††	6 ††
G3 62.5	Mean	0.53	45.23	0.27	92.13
	S.E.	0.09	8.16	0.04	6.88
	N	6	6	6	6
G4 125	Mean	0.49	41.64	0.26	91.08
	S.E.	0.11	8.92	0.05	5.61
	N	6	6	6	6
G5 250	Mean	0.60	47.45	0.26	90.28
	S.E.	0.17	10.38	0.05	7.48
	N	6	6	6	6
G6 30 μg/mL	Mean	0.63	60.03	0.38	94.67
	S.E.	0.12	11.28	0.07	6.69
	N	6 #	6 ##	6 ##	6

G1: Sham, G2: OVX, G3 ~ G5: OVX+참당귀주정추출물, G6: OVX+Estradiol

S.E.: Standard error

N: Number of animals

†† p<0.01, Significant difference from the Sham control group (G1) by Student t-test.

p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Student t-test.

p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the OVX group (G2) (p>0.05, ANOVA).

표 2. (Continued)

Group/ Dose(mg/kg)		Tb.Sp μm	SMI	Conn.D 1/mm ³	BS mm ²	BV/TV (%)
G1 0	Mean	304.05	0.13	34.94	97.28	18.72
	S.E.	17.35	0.02	4.69	5.35	1.78
	N	6	6	6	6	6
G2 0	Mean	276.88	0.47	1.43	14.47	1.57
	S.E.	25.17	0.01	0.31	2.20	0.28
	N	6	6 ††	6 ††	6 ††	6 ††
G3 62.5	Mean	314.77	0.31	3.74	23.52	2.70
	S.E.	22.53	0.06	1.04	3.34	0.49
	N	6	6	6	6	6
G4 125	Mean	351.65	0.33	2.96	21.39	2.48
	S.E.	35.45	0.04	0.93	4.24	0.53
	N	6	6	6	6	6
G5 250	Mean	350.47	0.33	3.20	26.02	2.85
	S.E.	37.74	0.04	0.98	6.87	0.62
	N	6	6	6	6	6
G6 30 μg/mL	Mean	345.63	0.30	4.76	26.31	3.59
	S.E.	19.56	0.02	1.05	4.28	0.67
	N	6 #	6 ##	6 ##	6 #	6 ##

G1: Sham, G2: OVX, G3 ~ G5: OVX+참당귀주정추출물, G6: OVX+Estradiol

S.E.: Standard error

N: Number of animals

†† p<0.01, Significant difference from the Sham control group (G1) by Student t-test.

p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Student t-test.

p<0.05, Significant difference from the OVX group (G2) by Student t-test.

No statistically significant differences was noted in the substance groups from the OVX group (G2) (p>0.05, ANOVA).

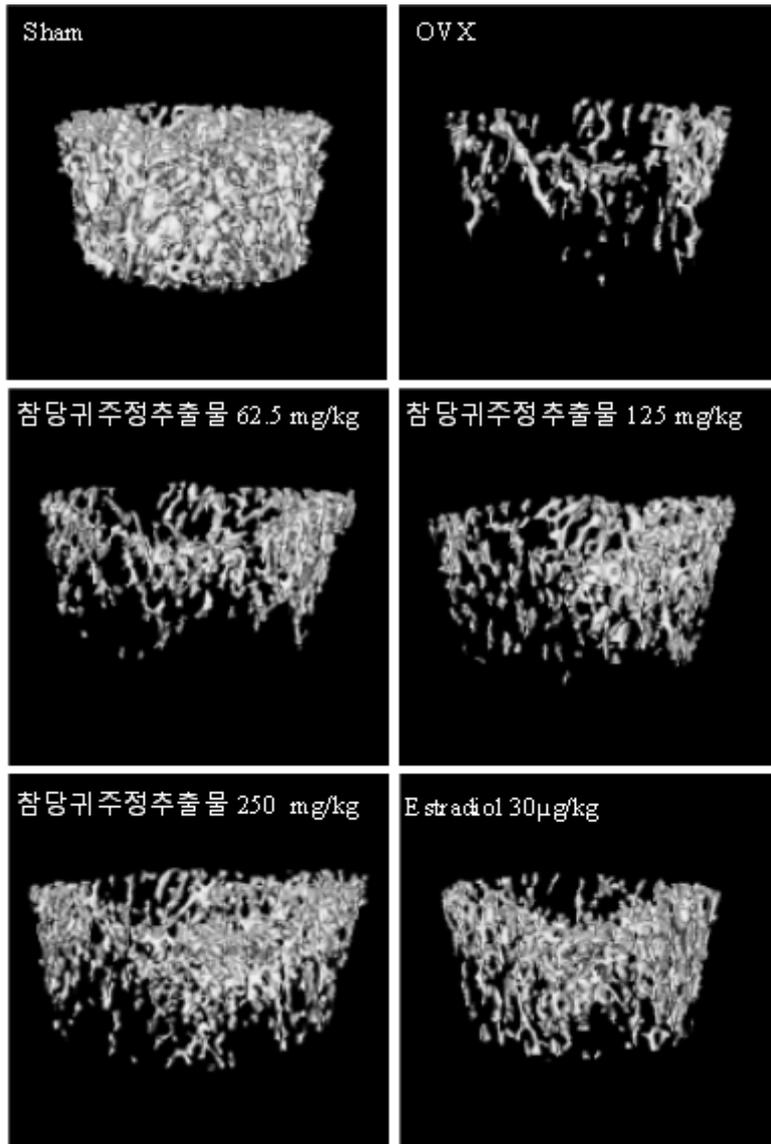


그림 11. 대퇴골 골밀도 3-D 사진

(5) 혈액 내 호르몬 관련 바이오 마커 분석

① Estradiol

- Sham군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 127.32 pg/mL을 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 44.29 pg/mL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 28.18 pg/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 55.05 pg/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 증가하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 62.27 pg/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 증가하였다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군의 혈액 내 estradiol의 농도는 평균 31.02 pg/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.

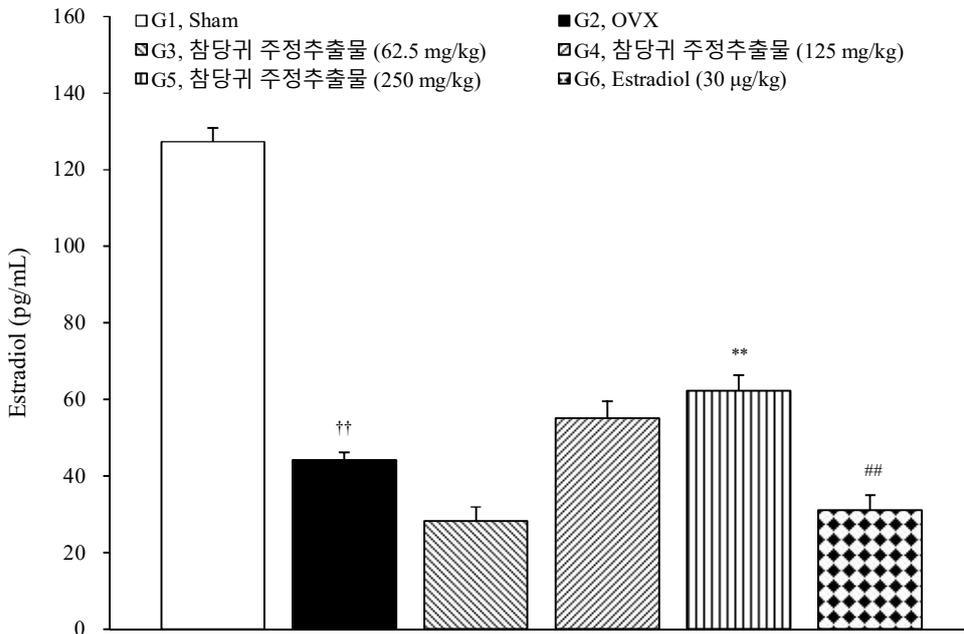


그림 12. 혈액 내 Estradiol 농도

Each point represents mean+S.E.

†† $p < 0.01$, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

** $p < 0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

$p < 0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

② Lutenizing hormone (LH)

- Sham군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 592.7 mIU/mL을 나타내었다.
- OVX군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 798.5 mIU/mL로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 757.4 mIU/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 감소하였으나 통계학적으로 유의성을 나타내지는 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 548.7 mIU/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소하였다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 596.4 mIU/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소하였다.
- LH 30 μ g/kg 투여군의 혈액 내 LH의 농도는 평균 528.0 mIU/mL를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p < 0.01$)하게 감소되었다.

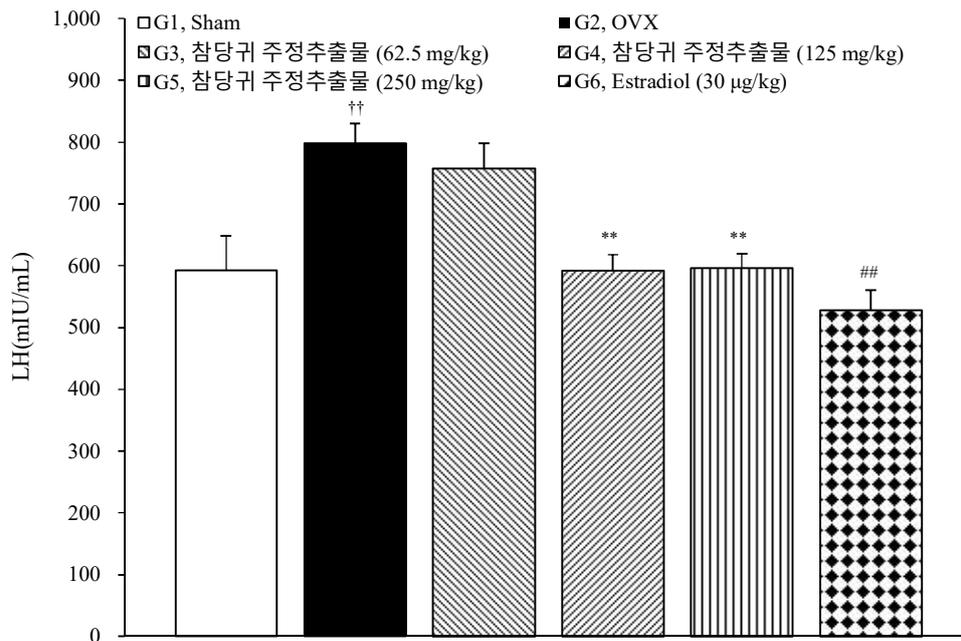


그림 13. 혈액 내 lutenizing hormone 농도

Each point represents mean+S.E.

†† $p < 0.01$, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

** $p < 0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

$p < 0.01$, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

(6) 자궁 조직에서 estrogen receptor (ESR) 발현량 측정

① ESR α

- Sham군 자궁조직의 ESR α 의 발현을 평균 1.03으로 나타내었다.
- OVX군 자궁조직의 ESR α 발현은 3.36으로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR α 발현은 평균 3.17을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR α 발현은 평균 3.18을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR α 발현은 평균 2.95를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군 자궁조직의 ESR α 발현은 평균 1.32를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.

② ESR β

- Sham군 자궁조직의 ESR β 의 발현을 평균 1.07로 나타내었다.
- OVX군 자궁조직의 ESR β 발현은 0.50으로 Sham군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.
- 참당귀 주정추출물 62.5 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR β 발현은 평균 0.88을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 125 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR β 발현은 평균 0.72를 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 증가되었다.
- 참당귀 주정추출물 250 mg/kg 투여군 자궁조직의 ESR β 발현은 평균 0.58을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 차이를 나타내지 않았다.
- Estradiol 30 μ g/kg 투여군 자궁조직의 ESR β 발현은 평균 0.07을 나타내었으며 OVX군과 비교하여 통계학적으로 유의 ($p<0.01$)하게 감소되었다.

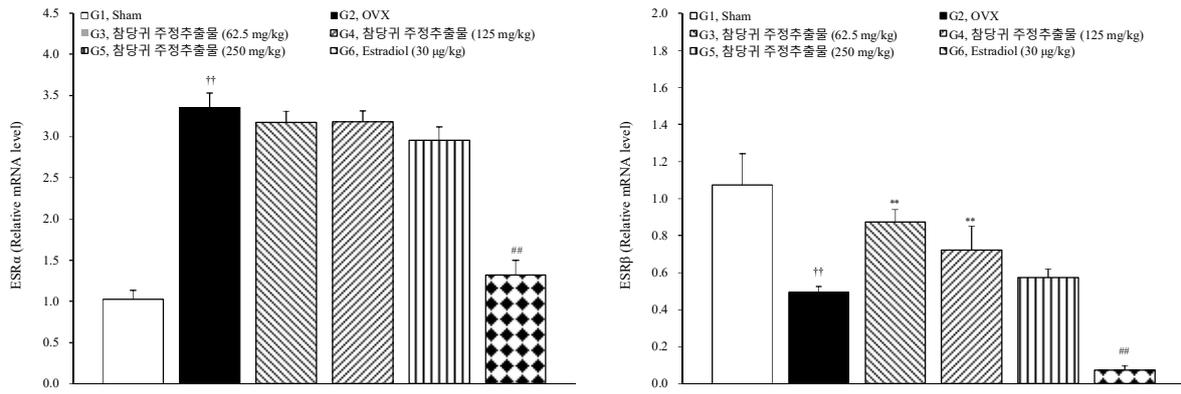


그림 14. 자궁조직에서 estrogen receptors의 mRNA 발현량

Each point represents mean+S.E.

†† p<0.01, Significant difference from the Sham group (G1) by student t-test.

** p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by Dunnett's t-test.

p<0.01, Significant difference from the OVX group (G2) by student t-test.

2-3. 결론

- 사업화 성과

갱년기 여성의 신체에서는 에스트로겐의 분비가 줄어들며 여러 가지 신체적 변화를 겪게 된다. 에스트로겐은 골 흡수를 억제하는 역할을 하게 되는데, 갱년기에는 에스트로겐의 감소로 인하여 골 흡수가 증가되고 결국 골다공증에 이르게 된다. 때문에 골다공증은 남성에 비하여 여성에서 5배 정도 유병률이 높아 노년의 삶의 질을 떨어뜨리는 요인이 되고 있다. 갱년기 여성에게 에스트로겐을 투여하게 되면 유방암 및 생식기 암의 유병률이 증가되어 치료에 제약이 많다. 따라서 여성의 신체에 무리가 되지 않는 치료 방법이 절실하다.

참당귀는 예로부터 여성의 갱년기 증상 개선에 사용되던 약용식물로서 본 과제는 참당귀 주정추출물이 여성갱년기의 뼈건강 개선에 도움을 줄 수 있는지 평가하고자 실시되었다.

참당귀 주정추출물이 에스트로겐 리셉터에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 여성 유방암 세포주인 MCF-7을 사용하였다. 참당귀 추출물은 MCF-7의 증식에 영향을 미치는 ESR α 의 발현을 억제하고 증식 억제에 영향을 미치는 ESR β 의 발현은 증가시켜 암세포 증식 억제에 효과가 있으며 에스트로겐 리셉터 조절에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 ESRs에 의하여 발현이 조절되는 pS2의 발현을 조절하였다.

암컷 SD rat의 난소를 적출하여 여성 갱년기 모델을 제작하고 참당귀 주정추출물을 투여하여 뼈 건강과 관련된 바이오마커를 측정하였다.

참당귀 주정추출물은 에스트로겐 분비 감소로 인하여 증가된 체중 및 혈액 내 지질 관련 인자의 감소에는 큰 영향을 미치지 못 하였다. 하지만 골 다공증에서 혈액에서 증가되는 지표인 ALP, bALP 및 Ca의 양은 감소시켰으며, 골 흡수시 뇨에서 증가되는 지표인 DPD와 NTX1의 농도를 감소시켰다. microCT로 골 미세구조를 측정한 결과 골밀도와 관련 지표들이 골다공증 개선에 효과가 있는 것으로 평가되었다. 난소 적출로 감소한 혈액 내 에스트라디올은 증가하였고 증가된 황체호르몬은 감소되었다.

참당귀 주정추출물은 난소를 제거한 동물의 자궁내 증가된 ESR α 의 발현량에는 영향을 미치지 않았으나, 감소된 ESR β 의 발현을 증가시켰다.

따라서, 난소가 제거되어 에스트로겐 분비가 감소된 여성갱년기 동물 모델에서 참당귀 주정추출물의 투여는 골다공증 개선에 효능이 있으며 호르몬 수치 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

(주)메디언스에서 생산하는 참당귀 주정추출물의 데커신 함량은 당귀 추출물과 비교하여 월등하며 미국으로 수출이 이루어지고 있다. 지금까지 참당귀 주정추출물의 항염, 인지능력 개선 및 진통 효과에 대한 보고는 있었지만, 본 과제를 통하여 뼈건강에 도움을 줄 수 있음을 확인하였다. 이 과제로 인하여 앞으로 참당귀 주정추출물의 활용 범위를 확장하여 수출 및 내수 증대에 발판을 마련하고 인체적용 시험을 진행하여 개별인정 소재로 개발 가능할 것으로 기대된다.

2-4. 사업성과 및 매출식적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	9 억원	
			향후 3년간 매출	20 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	2 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 2 % 국외 : 0.001 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 1% 국외 : 0%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			3 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			2 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3 년		
	소요예산(백만원)		400		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			9	20	30
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	2	10
		국외	0	0.001	0.002
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 현재 개발 소재를 수용화 또는 나노화하여 관련 기능성을 극대화한 제품 개발 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	1	2	
	수 출	2	5	10	

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 목표

번호	성과목표명	단위	목표	가중치
1	특허출원	건	1	5
2	수출액	백만원	200	45
3	고용창출	명	1	30
4	학술발표	건	1	20

나.

- 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술
 - 최종 성과목표 및 평가방법, 단계 성과목표 및 평가방법, 연차별 성과목표, 개발내용 및 개발 범위, 성과목표별 가중치 (합이 100%이내), 달성도 등을 구체적으로 기술
- 목표 미달성 시 원인(사유) 및 후속연구의 필요성 등 차후대책을 구체적으로 기술

3-2. 목표 달성여부

가. 성과

번호	성과목표명	단위	목표	성과	달성여부
1	특허출원	건	1	1	달성
2	수출액	백만원	200	350	달성
3	고용창출	명	1	1	달성
4	학술발표	건	1	0	미달성

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

당해년도 연구기간 동안 학술발표 1건에 대한 목표가 미달성 되었다. 시험의 일정 상 시험 데이터에 대한 분석을 완료하지 못 하였기 때문으로 2018년 7월 18일 ~ 20일 개최되는 2018 KALAS International Symposium (주최:한국실험동물학회)에서 포스터 발표를 진행할 예정이다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

■ 국내/외 판로 확대

- 확보한 연구자료로 국내 식품 및 건강기능식품 업체 판로 개척을 위한 마케팅 자료 활용
- 국내외 식품 및 건기식 소재 대기업 판로 개척
- 미국 거래처에서 당귀에 대한 기능성 연구 자료를 지속적으로 요구하고 있음. 따라서 본 과제 수행 후 연구결과를 제공 시 신규 거래처 발굴이 용이할 것으로 기대함.

■ 장기적으로는 개별인정소재 개발을 통한 독점적인 권리 확보

- 제조공정 표준화, 기시법 개발, 안전성이 확보된 소재이므로, 효능 자료 확보 후 인체 적용시험을 진행하여 빠르게 개별인정 소재로 개발 예정

■ 수용화 공정을 적용한 업그레이드 소재 개발

- 참당귀주정추출물의 경우, 지용성 물질로 이루어진 추출물로 생체 이용률이 낮을 것으로 생각됨. 수용화 소재 개발을 통해 섭취량을 낮추고 효능을 극대화 하여 타기업과의 차별화된 소재로 개발할 계획임.

■ 경제적·산업적 측면

- 강원도 대표 농산물을 이용한 다양한 기능성 발굴
- 현재 (주) 메디언스는 국산 당귀를 이용한 면역증강 기능성 소재 개발을 위해 관련된 연구를 진행하고 있음. 당귀는 다양한 기능성분이 함유되어 있고, 제조 방법에 따라 다른 기능성을 나타낼 수 있는 훌륭한 소재로 이를 최대한 활용하고자 함.
- 당귀는 중국산 대체 불가능한 원료로 이를 활용한 제품 개발은 관련 농가의 소득 향상에 기여할 수 있음.
- 참당귀주정추출물은 현재도 전량 미국으로 수출하는 제품으로, 효능 자료 확보에 따른 신규 거래처 확보로 수출 증가 효과를 기대할 수 있음.
- 경쟁력 있는 원재료를 활용한 제품의 생산 및 고품질화로 고기능성, 고부가가치 제품으로의 개발이 가능하여 기업의 성장을 견인할 수 있음.

■ 사업화 계획

○ 국내시장

1단계 : 식품소재로서 출시하여 부원료로서 판매.

2단계 : 뼈건강 또는 개별인정허가를 위한 추가 연구를 진행하여 독점적인 권리 확보

3단계 : 완제품으로 제조 후 독점적인 판매 및 온라인 판매.

4단계 : 대량 판매를 위한 케이블, 홈쇼핑 등 연계 판매 촉진

○ 국외시장

1단계 : 본 과제에서 확보한 효능자료를 적극 활용하여 미국시장에 소재로 판매. 판매망은 별도의 단독 Agent를 통하여 기존의 판매망을 최대한 활용하는 것으로 하되 현지에서의 Supplside East, Supplside West와 같은 대형 전시회에 참가하여 원료 구매 대형식품완제품 제조사를 대상으로 판촉을 추진함.

2단계 : (주) 메디언스의 특허 소재인 나노칼슘과 혼합하여 임상 시험을 진행하여 추가 효능자료 확보 후 판매 촉진

3단계 : 중국, 동남아 시장으로 진출

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.