

발간등록번호
11-1543000-002610-01

# 우리나라 고유수종 황칠나무의 원료 생산 기반구축과 이를 이용한 산업화 최종보고서

2018.12.31.

주관기관 / 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜

참여기관 / 경희대학교

연세대학교

울산대학교

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “우리나라 고유수종 황칠나무의 원료생산 기반구축과 이를 이용한 산업화”  
(개발기간 : 2016.09.05 ~ 2018.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 12. 31.

주관연구기관명 : 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜 (대표자) 적영대, 이해석  
참여기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 이범석  
연세대학교 산학협력단 (대표자) 이원봉  
울산대학교 산학협력단 (대표자) 조홍래

주관연구책임자 : 김용재  
참여기관책임자 : 이정민  
윤호근  
최경철

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	116093-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.01.01.~ 2018.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	우리나라 고유수종 황칠나무의 원료 생산 기반구축과 이를 이용한 산업화			
연구책임자	김용재	해당단계 참여연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 75,000천원 계: 375,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 175,000천원 계: 875,000천원
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인(주)제이웰바이오팜 경희대학교 연세대학교 울산대학교			참여기업명 농업회사법인(주)제이웰바이오팜	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 황칠나무 씨앗 발아 및 육묘방법 개선
- 황칠나무 잎차 제조공정 표준화 및 품목제조보고 완료(천년황칠차)
- 채취시기를 달리한 황칠차 성분분석 결과 학술발표
- 황칠나무 추출물의 피부건강, 항치매, 면역증강 활성연구 완료 및 논문게재 (비SCI 1건, SCI 2건)
- 활성별 황칠나무 추출물의 시험법 밸리데이션 완료
- 황칠나무잎 분말을 이용한 건강기능식품 제품 2건 품목제조신고 완료 (천년황칠 미인, 제이웰 레드퀸)
- 황칠나무 추출물을 포함한 혼합물의 숙취해소 및 간보호 효과 활성시험 완료, 해당결과 비SCI 논문게재(1건) 및 제품 출시(천년황칠 삼보진)
- 황칠나무잎 분말 관련 특허 출원 및 등록 각 1건

보고서 면수

140p.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 황칠나무의 안정적인 원료 확보를 위하여 씨앗 발아율 증대와 뿌리무름병, 입고병 예방 기술 개발</li> <li>○ 황칠나무 원료 채취와 가공 기술 구축</li> <li>○ 황칠나무 새잎차 가공 기술 개발</li> <li>○ 황칠나무의 부위별 기능평가(피부건강, 항치매, 면역증강)</li> <li>○ 건강기능식품 원료 황칠나무잎 분말 함유 건강기능식품 제품 산업화</li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<p><b>[연구개발 내용]</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 황칠나무의 안정적인 원료 확보를 위하여 씨앗 발아율 증대와 뿌리무름병, 입고병 예방 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무 씨앗 발아율 증가를 위한 종자 처리 기술 개발</li> <li>- 육묘 중 뿌리무름병, 입고병 예방 무농약 처리 기술개발</li> </ul> </li> <li>2. 황칠나무 원료 채취와 가공 기술 구축             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무잎, 가지, 잎+가지 혼합물의 채취, 건조 제조공정 표준화</li> </ul> </li> <li>3. 황칠나무 새잎차 가공 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무 어린잎을 이용하여 침출차 개발</li> </ul> </li> <li>4. 황칠나무의 부위별 기능평가             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무의 산업화 원료로 활용도를 높이고자 3~5년생 어린나무의 잎+가지혼합물, 15년생 황칠나무(잎, 가지, 잎+가지 2:8혼합물)을 대상으로 피부건강, 항치매, 면역증강 기능을 평가</li> </ul> </li> <li>5. 건강기능식품 원료인 황칠나무잎 분말 함유 건강기능식품 산업화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무잎 분말과 체지방감소 건강기능식품 원료를 혼합하여 체지방감소+피부건강 기능을 가지는 건강기능식품 제품 산업화</li> <li>- 황칠나무잎 분말과 여성갱년기 건강기능식품 원료를 혼합하여 여성갱년기+피부건강 기능을 가지는 건강기능식품 제품 산업화</li> </ul> </li> <li>6. 황칠나무 추출물을 함유하는 숙취해소 식품 산업화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무 추출물음 함유하는 숙취해소 제품의 숙취해소 및 간보호 활성 평가 완료, 해당 결과물 학술발표 완료</li> </ul> </li> </ol> <p><b>[연구개발 성과]</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 논문게재 및 학술발표 : SCI 2편, 비 SCI 2편, 학술발표 7건</li> <li>○ 특허 : 등록 1건, 출원 1건</li> <li>○ 인력양성 : 4명, 고용창출 : 3명</li> <li>○ 산업화 : 4건(식품 2건, 건강기능식품 2건)</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 황칠나무의 부위별 기능을 평가하여 산업화 원료로 사용 가능성을 제시</li> <li>○ 다류 시장에 새로운 소재로 황칠나무 잎 차 진입 가능</li> <li>○ 우리나라 고유수종 황칠나무의 효능에 대한 학술적 가치 입증</li> <li>○ 황칠나무 씨앗의 발아율과 육묘 방법 개선으로 우량묘 확보 가능</li> <li>○ 증가하고 있는 황칠나무 재배농가의 안정적인 소득창출 기회 제공</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>황칠나무</p>	<p>재배</p>	<p>원료가공</p>	<p>기능평가</p>	<p>산업화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p><i>Dendropanax morbifera</i></p>	<p>Cultivation</p>	<p>Processing raw materials</p>	<p>Assess effect</p>	<p>Industrialization</p>

\* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

제1장 연구개발과제의 개요 .....	6
1절 연구개발 목적 .....	6
2절 연구개발의 필요성 .....	7
3절 연구개발 범위 .....	10
제2장 연구수행 내용 및 결과 .....	12
1절 연구개발 전략·방법 및 추진체계 .....	12
2절 연구방법 및 내용 .....	15
3절 연구개발성과 .....	119
제3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	128
1절 최종목표 .....	128
2절 목표 달성여부 .....	128
제4장 연구결과의 활용 계획 .....	133
붙임. 참고 문헌 .....	134

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1절. 연구개발 목적

- 두릅나뭇과에(Araliaceae)에 속하는 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Nakai)는 우리나라 고유의 경제적 가치가 높은 아열대성 상록교목으로 전라남도의 서남해안 지역과 제주도의 한라산 일대에 자생하는 상록활엽교목임
- 황칠나무는 본초강목, 보제방, 태평해민화제국방, 의방유치 등에 질병치료에 사용되었다는 기록이 있으며, 학술 발표에 따르면 항암, 항균, 신경안정, 면역력 증진, 항산화 활성, 간기능개선, 정혈작용이 있는 것으로 알려져 있음
- 황칠나무를 이용한 산업화는 관련 연구가 부족하며 현재까지 건강기능식품 원료로는 제이웰바이오팜이 보유하고 있는 “황칠나무잎 분말(제201600100112호, 2016년 5월 1일)”이 유일하며 그 외 제품은 식품으로서 황칠나무가 가지고 있는 가치를 인정받지 못하고 있음
- 현재 황칠나무를 이용한 기존 제품은 식품으로 생산되고 있어 기능표기를 할 수 없음



- 또한, 대부분의 황칠나무는 소규모로 재배되고 있어 원료 채취와 가공기술이 표준화 되어있지 못함, 그러나 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜은 제주에 국내 최대의 황칠나무 농장을 보유하고 있어(약 21만평, 애월 어음리 576,793 m<sup>2</sup>, 표선면 가시리 51,140 m<sup>2</sup>, 성산읍 삼달리 70,620 m<sup>2</sup>, 성목 약 7만주, 묘목 약 200만본), 황칠나무 부위별 원료 채취, 가공기술 개발이 가능하므로 본 연구를 통하여 개발되는 기술은 황칠나무를 이용한 제품 생산의 활용도가 큼



- 본 연구에서는 건강기능식품 원료인 “황칠나무잎 분말과 가르시니아감보지아추출물”을 함유하는 복합제와, “황칠나무잎 분말과 석류추출물”을 함유하는 복합제를 건강기능식품으로 산업화 할 예정임

황칠나무잎 분말 + 가르시니아캄보지아추출물	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 피부건강·항산화에 도움을 줄 수 있음</li> <li>• 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방감소에 도움을 줌</li> </ul>
황칠나무잎 분말 + 석류추출물	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 피부건강·항산화에 도움을 줄 수 있음</li> <li>• 갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음</li> </ul>

- 황칠나무는 높은 생리활성소재로 알려져 있어 최근 수요처가 급격하게 증가하고 있으나 원료 부족과 활성 연구 부족으로 아직까지는 산업화가 미미한 수준임, 본 연구를 통하여 황칠나무의 부위별 효능을 검증함으로써 향후 황칠나무를 이용한 제품개발에 응용 가능함
- 본 연구를 통하여 우리나라 고유수종인 황칠나무의 효능에 대한 인식이 재고 될 것이며, 재배농가에 활력을 불어일으킬 수 있음

## 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 대상



- 황칠나무(*Dendropanax morbifera* Nakai)는 상록성 교목으로 잎과 가지를 식품의 제한적 사용원료로 사용하도록 하고 있음(식품의약품안전처, 식품공전), 황칠나무는 파종 후 약 10년이 지나면 하단부의 직경이 약 7cm 정도 자라게 되고 이때부터 가지를 잘라서 잎과 함께 식품의 원료로 사용하고 있음
- 그러나, 최근 황칠나무의 효능이 알려지면서 원료 부족으로 어린나무의 가지를 사용하거나, 채취 후 최소 2년 이상 재배 후 다시 채취해야 하지만 무분별하게 채취하여 사용하고 있음
- 황칠나무의 부위별 효능에 대한 과학적인 평가가 필요한 시점임



## 2. 핵심개발기술

**핵심 개발기술 : 재배기반구축 / 부위별 기능 평가**

논문게재, 특허 확보  
황칠나무 부위별 과학적인 효능검증  
(피부건강, 항치매, 면역증강)

황칠나무 발아, 육묘기술 개발로 재배기술 확산  
황칠나무 잎, 가지 원료 가공기반 구축으로 안정적인 원료 확보  
황칠나무 새잎차 개발로 황칠나무 제품 확산  
황칠나무를 건강기능식품으로 산업화하여 효능 제고

**우리나라 고유수종 황칠나무 효능 인식 재고, 산업화 확산**

**세부개발기술 1 : 씨앗 발아율 증대 / 뿌리무름병, 입고병 예방기술**

황칠나무 씨앗

바이러스 오염

- 황칠나무 열매를 채취하여 과육을 제거하고 발아시켜 육묘를 하고 있으나, 씨앗채취 후 보관 기술 부족으로 발아율이 약 10% 정도로 낮음, 또한 육묘 중 농약을 사용하지 않기 때문에 뿌리무름병 / 입고병에 노출되어 있음, 따라서 발아율을 높일 수 있는 방법과 뿌리무름병 / 입고병으로부터 안전한 묘목을 생산할 수 있는 기술 개발이 필요함

## 세부 개발기술 2 : 황칠나무 원료 채취 및 가공 기반기술



- 우리나라의 황칠나무는 상록성 교목으로 채취시기가 특정되어 있지 않고, 일반적으로 11월~4월에 채취하여 사용하고 있으며 부위별 원료 가공방법이 표준화 되어있지 않음, 본 연구를 통하여 건강기능식품 원료로 사용되는 잎의 가공방법과 가지, 잎+가지 혼합물의 가공기술을 표준화하고자 함

## 세부 개발기술 3 : 황칠나무 새잎차 가공기술



- 어린 황칠나무 새잎을 이용하여 기존의 다류와 차별화되는 고유의 향미와 색상을 가지는 침출차 개발(기존 제품의 방법이 아닌 살청→유념→건조 방법으로 개발)

## 기술개발 4 : 황칠나무 부위별 기능평가



- 우리나라 황칠나무의 기능을 제시하고자 시장요구도가 높은 피부건강, 향치매, 면역증강 연구를 수행하여 황칠나무의 기능을 규명함으로써 황칠나무의 위상을 제고하고자 함
- 본 연구를 통하여, 3~5년생 어린나무의 잎+가지혼합물, 15년생 황칠나무(잎, 가지, 잎+가지 2:8혼합물)을 대상으로 지표성분을 분석하고 피부건강, 향치매, 면역증강의 효능을 검증함으로써 황칠나무 산업화 원료 표준화를 이루고자 함

## 세부 개발기술 5 : 황칠나무 함유 건강기능식품 산업화



- 황칠나무를 주원료로 하는 건강기능식품을 개발하여 기존의 황칠나무 제품들과 차별화
- 주관기관이 보유하고 있는 건강기능식품 원료 황칠나무잎 분말과 체지방감소 건강기능식품 원료를 혼합하여 건강기능식품으로 개발
- 황칠나무잎 분말과 갱년기 여성 건강 건강기능식품 원료를 혼합한 건강기능식품 산업화

### 3절. 연구개발 범위

#### 1. 황칠나무 산업화 원료 기반구축과 함유제품 산업화

- 황칠나무 씨앗 발아율 증가 기술개발
- 황칠나무 묘목 육묘 중 뿌리무름병, 입고병 예방 무농약 재배기술 개발
- 황칠나무를 이용하여 식품 및 건강기능식품 원료로 사용 가능한 표준화된 원료 가공기술 개발
- 어린 황칠나무 잎을 이용한 황칠나무 새잎차 개발과 기능평가
- 황칠나무 3~5년생 어린나무의 잎+가지혼합물, 15년생 황칠나무(잎, 가지, 잎+가지 2:8혼합물)을 대상으로 물, 20% 주정, 50% 주정으로 이용하여 황칠나무 부위별 기능 연구소재 12종 생산
- 건강기능식품 원료 “황칠나무잎 분말”을 이용한 피부건강·갱년기 개선 건강기능식품, 피부건강·체지방감소 건강기능식품 제품개발

#### 2. 황칠나무의 피부건강 기능평가

- 황칠나무 각 부위별 추출물의 아토피 피부염 억제 관련 *in vitro* screening
- 동물 실험을 통한 황칠나무추출물의 아토피피부염 억제 생리활성 평가
- 황칠나무추출물의 아토피피부염 억제 기작규명

### 3. 황칠나무의 항치매 기능평가

- 황칠나무 각 부위별 추출물의 *in vitro* 항치매 유효성평가
- 황칠나무추출물의 *in vivo* 항치매 유효성평가
- 황칠나무추출물의 활성기작 규명

### 4. 황칠나무의 면역증강 기능평가

- 황칠나무 각 부위별 추출물의 면역 기능 *in vitro* 생리활성 평가
- 황칠나무추출물의 *in vivo/ex vivo* 활성 평가
- 황칠나무추출물의 기전 규명

## 제 2장 연구수행 내용 및 결과

### 1절. 연구개발 전략·방법 및 추진체계

#### 1. 연구개발 추진전략 및 방법



- 1) 황칠나무의 안정적인 원료 확보를 위하여 재배방법 개선
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 황칠나무 씨앗 발아율 증가를 위한 종자처리 기술개발
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 육묘의 뿌리무름병 / 입고병 예방 무농약 기술개발
- 2) 황칠나무 원료 채취와 가공 기술개발
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 자사 농장에서 재배 중인 황칠나무를 이용하여 원료 채취 방법을 표준화함
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 건강기능식품 원료 및 가공식품의 원료로 사용될 황칠나무 각 부위별 원료의 건조 방법 등 제조공정을 개발하고 표준화함
- 3) 황칠나무 새잎차 개발과 기능평가
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 황칠나무 어린잎을 이용하여 침출차를 개발
- 4) 황칠나무의 부위별 기능평가
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 3~5년생 어린나무의 잎+가지혼합물, 15년생 황칠나무 (잎, 가지, 잎+가지 2:8혼합물)을 이용하여 연구시료 12종을 제작
  - 연세대의대(공동연구기관)은 연구시료 12종을 대상으로 항치매 기능을 평가
  - 경희대(공동연구기관)은 연구시료 12종을 대상으로 피부건강 기능을 평가
  - 울산대의대(공동연구기관)은 연구시료 12종을 대상으로 면역증강 기능을 평가
- 5) 건강기능식품 원료 황칠나무잎분말 함유 건강기능식품 산업화
  - 제이웰바이오팜(주관기관)은 황칠나무잎 분말과 체지방감소 건강기능식품 원료를 혼합하여 체지방감소+피부건강 기능을 가지는 건강기능식품 제품 산업화

- 제이웰바이오팜은(주관기관)은 황칠나무잎 분말과 여성갱년기 건강기능식품 원료를 혼합하여 여성갱년기+피부건강 기능을 가지는 건강기능식품 제품 산업화
- 6) 황칠나무 추출물을 함유하는 숙취해소 식품 산업화
- *In vitro, in vivo* 평가를 통하여 숙취해소 및 간보호 활성확인
  - 연구성과 학술지 게재 및 산업화

## 2. 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	우리나라 고유수종 황칠나무의 원료 생산 기반구축과 이를 이용한 산업화	주관연구책임자 김용재 외 총 25명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업	-	-
중견기업	-	-
중소기업	1 (농업회사법인)	6
대 학	3	20
국공립(연)	-	-
출 연 (연)	-	-
기 타	-	-

1협동연구기관
황칠나무의 원료 생산 기반구축과 이를 이용한 산업화
김용재 외 25명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 황칠나무 원료가공기술 표준화</li> <li>• 황칠나무 활용 제품 산업화</li> <li>• 황칠나무 각 부위별 기능평가</li> </ul>

농업회사법인(주) 제이웰바이오팜	연세대학교 의과대학	경희대학교	울산대학교 의과대학
황칠나무 산업화 원료 기반구축과 함유제품 산업화	황칠나무의 항치매 기능평가	황칠나무의 피부건강 기능평가	황칠나무의 면역증강 기능평가
김용재 외 5명	윤호근 외 6명	이정민 외 7명	최경철 외 4명
담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용	담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>-황칠나무 원료 생산기반 구축</li> <li>-황칠나무 새잎차 개발</li> <li>-황칠나무 잎 분말을 이용한 건강기능식품 제품 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-황칠나무추출물을 이용한 항치매 활성연구</li> <li>• <i>in vitro</i></li> <li>• <i>in vivo</i></li> <li>• 활성기작 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-황칠나무추출물을 이용한 피부건강 활성연구</li> <li>• <i>in vitro</i></li> <li>• <i>in vivo</i></li> <li>• 활성기작 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-황칠나무추출물을 이용한 면역증강 활성연구</li> <li>• <i>in vitro</i></li> <li>• <i>in vivo</i></li> <li>• 활성기작 규명</li> </ul>

### 3. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위:천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	황칠나무 씨앗 채취														7,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
2	부위별 연구시료 제작														8,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
3	황칠나무 새잎차 개발														15,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
4	피부건강/체지방 감소 건기식개발														20,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
5	항치매 기능평가														25,000	윤호근 (연대의대)
6	피부건강 기능평가														25,000	이정민 (경희대)
7	면역증강 기능평가														25,000	최경철 (울산대의대)
2차년도																
1	씨앗 채취/육묘 기술개발														20,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
2	황칠나무 새잎차 개발														40,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
3	건기식개발														125,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
4	항치매 기능평가														60,000	윤호근 (연대의대)
5	피부건강 기능평가														70,000	이정민 (경희대)
6	면역증강 기능평가														60,000	최경철 (울산대의대)
3차년도																
1	황칠나무 씨앗 채취														30,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
2	건기식개발														135,000	김용재 (제이웰 바이오팜)
3	항치매 기능평가														60,000	윤호근 (연대의대)
4	피부건강 기능평가														70,000	이정민 (경희대)
5	면역증강 기능평가														60,000	최경철 (울산대의대)

## 2절. 연구방법 및 내용

### 1. 황칠나무의 안정적인 원료확보를 위한 재배방법 개선

#### 가. 황칠나무 육묘 기술 개발

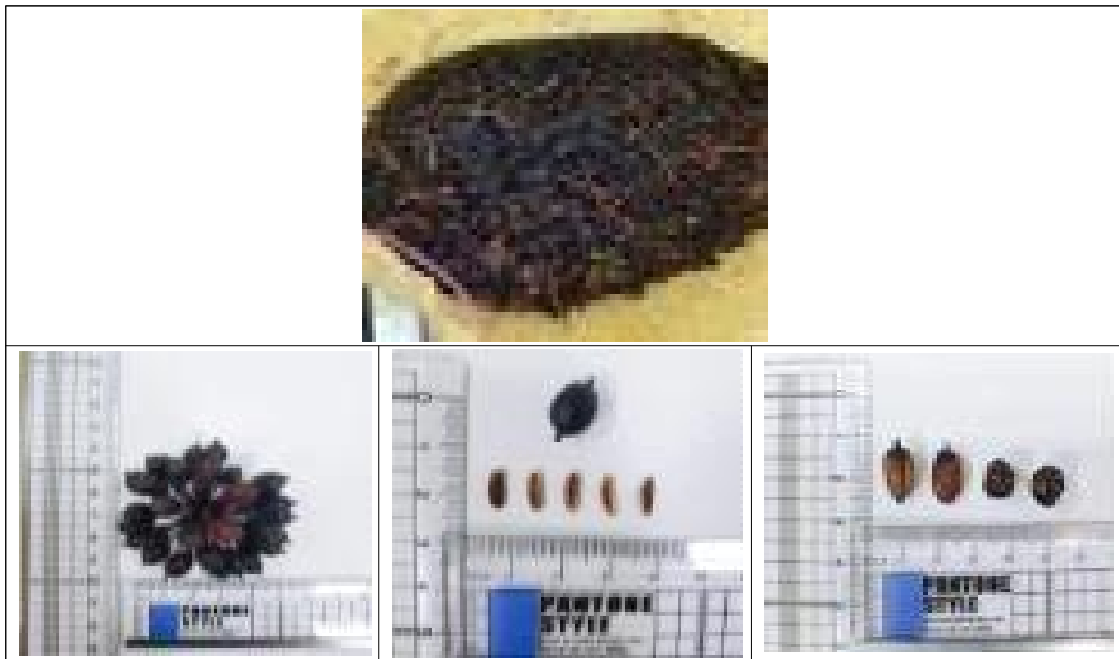
##### (1) 방법

- 본 연구는 2016년 11월 ~ 2018년 12월까지 2회에 걸쳐 수행하여 육묘기술을 표준화하고자 함
- 1차 : 제주, 전남지역에서 5년, 10년 전 후의 황칠나무에서 씨앗을 채취하여 과육을 제거하고 냉장 저장, 건사저온 저장방법으로 보관하여 2차년도 봄에 파종하고자 함
- 2차 : 2017년 11월 2차 씨앗을 채취하고, 2017년 봄에 파종하여 발아된 황칠나무 묘목을 평가하여 가장 좋은 발아율을 보인 방법으로 씨앗을 처리하여 2018년 봄 파종하고 황칠나무 육묘기술을 표준화하고자 함

##### (2) 결과

###### ① 1차 씨앗채취

- 제주산 황칠나무씨앗을 채취하고, 전라남도 고흥군에서 전남산 황칠나무 씨앗을 채취하였음





지역	수령	씨앗 채취량(g)	과육제거 후(g)	시료번호
제주	5년~9년	2,000	50	JJ05
	10년 이상	20,000	490	JJ10
전남	5년~9년	2,000	45	JN05
	10년 이상	4,000	110	JN10

② 씨앗 보관 및 육묘

저장방법	시료명	파종량(g)		발아묘		1차 이식 후 생존묘	
		무게(g)	수량 (약/개)	수량 (약/개)	발아율 (%)	수량 (약/개)	생존율 (%)
냉장저장	JJ05R	20	1,200	450	37.5	300	66.7
	JJ10R	200	12,000	5,250	43.8	3,300	62.9
	JN05R	20	1,200	400	33.3	250	62.5
	JN10R	50	3,000	1,350	45.0	850	66.7
	평균				39.9		64.7
건사저온 저장	JJ05S	20	1,200	550	45.8	400	72.7
	JJ10S	200	12,000	7,350	61.3	5,700	77.6
	JN05S	20	1,200	450	37.5	350	77.7
	JN10S	50	3,000	1,650	55.0	1,250	75.7
	평균				49.9		75.9



- 황칠나무는 무농약 재배를 원칙으로 하고 있어 살균제를 사용하지 못하므로 황칠나무 씨앗 발아 시 뿌리무름병과 입고병의 방제를 위한 상토의 오염원 처리방법을 도입하였음

<뿌리무름병의 발병 원인>

- ◆ 뿌리무름병은 역병균이나 자웅이주 피시움에 의해 발병되는 것으로서 역병균의

병원균은 *Phytophthora cactorum*으로 알려져 있으며, 토양의 오염과 관수시 또는 빗물의 오염으로 인하여 지상부에서 발생한 병이 토양으로 유입되어 발병되는 것으로 알려져 있음

- ◆ 입고병은 *Rhizoctonia*나 *Pythium*에 의하여 발병되는 것으로 알려져 있으며 *Rhizoctonia solani* Kuhn.은 묘포장에서 급속히 발생하는 병으로 토양전염성이 강함, 무병지의 상토를 사용하고 지나치게 습한 토양에서 발병하기 쉬우므로 과습하지 않게 관리해야 함, *Pythium ultimum* Trow.은 상토의 표면이 과습하고 질소질 비료의 사용이 과할 경우 발병하며 밀식하여 밀도가 높을 경우 발병률이 높음
- 친환경 농업에 많이 사용되고 있으며 살균 작용이 있는 것으로 알려진 왕겨 훈탄(燻炭)을 상토와 배합하여 뿌리무름병과 입고병 방제 효과를 가지는 발아용 상토를 사용함
- 상토와 왕겨훈탄을 혼합(상토 9 : 왕겨훈탄 1) 한 후 삼목상자에 파종한 후 충분한 물을 주어 온도와 습도를 유지하여 발아시키고 육묘하였음
- 저장방법으로 볼 때 냉장저장 방법의 발아율은 39.9% 이었으며 건사저온저장은 49.9%로서 황칠나무씨앗의 저장방법으로는 건사저온저장방법이 적합하였음
- 황칠나무 성장기간에 따른 발아율은 5년생 보다는 10년생 이상의 황칠나무 씨앗이 발아율이 우수하였음
- 발아묘의 1차 이식 후 생존율은 냉장 저장 씨앗은 64.7%이었으며, 건사저온저장 씨앗은 75.9% 이었음
- 지역별 발아율은 큰 차이는 보이지 않았지만 제주지역에서 채취한 황칠나무씨앗이 전남지역에서 보다 좋았음
- 이렇게 볼 때 황칠나무 육묘는 10년생 이상의 성목에서 채취한 황칠나무씨앗을 건사저온저장방법으로 보관하여 파종하는 방법이 적합하였음
- 1차 육묘 결과를 반영하여 2차년도에는 10년 이상된 성목에서 황칠나무씨앗을 채취하여 건사저온저장 후 발아율을 검토할 필요가 있음

### ③ 2차 발아 및 육묘

- 1차 발아율 연구 결과를 반영하여 제이웰바이오팜의 어음리 농장과 삼달리 농장에서 황칠나무 씨앗을 채취하여 1차 발아율 연구에서 우수한 결과를 보인 방법으로 발아를 시도하였음(발아율 77%)
- 발아 후 1차 이식을 실시하였으며 육묘장에 포트로 옮겨 담아 2차 이식을 하였음
- 1차 발아율 연구로 육묘한 묘목을 성목으로 직사광선을 피할 수 있는 그늘로 옮겨 노지 재배 적응기간을 갖도록 하였음



## 2. 황칠나무 원료 채취와 가공 기술개발

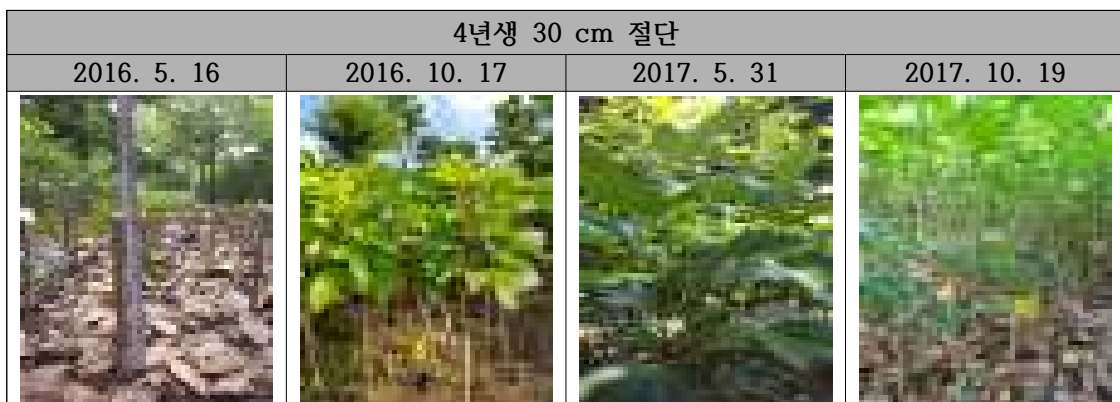
### 2-1. 황칠나무 원료 채취와 가공 기술개발

#### (1) 방법

본 연구를 통하여 잎 채취 시범포용 조성하여 황칠나무 잎 생산과 가공기술을 표준화 하고 10년생 이상의 성목에서 잎+가지, 가지를 채취하여 가공하고 채취한 원료의 지표성분을 정량함으로서 표준화하고자 함

#### ① 잎 채취 시범포 조성

제이웰바이오팜의 서귀포시 가시리 농장에 조성한 4년생 황칠나무 재배지에 황칠나무 각 200그루를 지상부 70 cm와 30 cm 각각 절단하여 잎 채취를 위한 시범포를 조성하였음



② 각 부위별 가공기술 표준화

ㄱ. 원료채취

황칠나무 잎, 잎+가지, 가지 가공기술을 개발하기 위하여 원료를 채취하고 개방식 대형 건조기를 이용하여 건조하고 제조공정을 표준화하고자 함

황칠나무 원료 채취	
잎	잎+가지, 가지
	

ㄴ. 원료가공

• 원료절단

황칠나무 원료를 채취하여 종전에는 목재 파쇄기를 이용하여 파쇄하는 방법으로 절단하여 사용하고 있었으나 파쇄 후 파쇄물에서 많은 열이 발생하여 쉽게 변패 되는 등 절단 공정 개선이 필요하다. 본 연구에서는 직각 절단기를 이용하여 황칠나무 원료를 일정한 크기로 절단하고자 함



• 원료건조

황칠나무 원료를 절단 후 건조는 전열건조기를 이용하여 건조하여 사용하고 있었으나 1회 건조 시 건조물 기준으로 약 30 kg을 건조하는데 약 24시간 정도 소요되고 있어 건조시간을 단축시키고 연속 건조가 가능하도록 개방식 대형 건조기를 사용하여 건조 공정을 개발하고자 함



**(2) 결과**

① 황칠나무 원료가공 공정 표준화 결과

- 황칠나무 가지를 절단하여 잎, 가지, 잎+가지로 분리하여 채취하고 절단 → 세척 → 건조하는 제조공정을 표준화하였음
- 건조 수율은 황칠나무 잎 15%, 황칠나무 가지 20%, 황칠나무 잎+가지 혼합물 17% 이었음



**2-1. 황칠나무 부위별 채취시기별 지표성분 분석**

**(1) 방법**

- 1차년에는 황칠나무 부위(잎, 가지, 혼합(잎+가지), 묘목)별 지표성분 분석하였음
- 2차년에는 황칠나무의 안정적인 원료확보를 위하여 재배 시범포를 조성하여 분기별

(3월, 6월, 9월)로 활성평가 소재인 잎과 가지를 채취하여 건조 절단 후 지표성분을 분석하였음

### ① Quercetin

#### ㄱ. 표준용액의 제조

표준품 Quercetin 7 mg을 취하여 25 ml용량플라스크에 넣고 DMSO 5 ml로 충분히 녹인 후 60% EtOH로 25 ml정용하여 280 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액을 희석하여 표준용액으로 함

#### ㄴ. 시험용액의 제조

검체 1 g을 환류플라스크에 취하여 60% EtOH 40ml, 6 N HCl 5 ml을 넣고 혼합한 후 95℃로 2시간동안 환류 추출함

60% EtOH로 50 ml 정용한 후 0.45 um nylon filter로 여과한 것을 시험용액으로 함

#### ㄷ. 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 370 nm)
- 칼 럼 : Shiseido Capell pak UG120 길이 250\*4.6 mm I.D, 5 um
- 온 도 : 35 ℃
- 유 속 : 0.8 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 : H<sub>2</sub>O : 5% Acetic acid : ACN(40 : 30 : 30)
- 분석시간: 40 min
- 계산식

$$\text{Quercetin 정량(mg/g)} = \frac{\text{검액의 Quercetin농도 (ug/ml)} * \text{검액의 최종부피 (ml)}}{\text{검체 칭량(g)} * 1000 \text{ (ug/mg)}}$$

### ② Ginsenoside Rg1+Rb1+Rg3

#### ㄱ. 표준용액의 제조

Ginsenoside Rg1, Rb1, Rg3를 각 5 mg을 정밀히 취하고, MeOH 5 ml로 녹인 후 1 ml씩 혼합하여 표준용액으로 함

#### ㄴ. 시험용액의 제조

검체 4 g을 환류플라스크에 취하여 70% MeOH 50 ml을 가하여 80℃로 1시간 동안 환류 추출하여, 식힌 후 3000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상등액을 환저 flask에 취한 다음 잔류물에 대하여 위의 조작을 1회 반복함. 상등액을 수욕 중에서 60℃이하로 감압농축하고 농축물을 증류수 3 ml에 용해한 후 0.45 um nylon filter로 여과한 것을 시험용액으로 함

#### ㄷ. 기기조건

- 검출기 : PDA Detactor (측정파장 203 nm)

- 칼 럼 : Shiseido Capell pak MGII 길이 250\*4.6 mm I.D, 5 um
- 온 도 : 30 ℃
- 유 속 : 1 ml/min
- 주입량 : 10 ul
- 이동상 : A-0.2% Phosphoric acid  
B-ACN
- 이동상조건

시간(분)	A	B
0	75	25
13	75	25
13.01	65	35
17	65	35
25	65	35
40	50	50
50	50	50
55	25	75
60	25	75
65	75	25

- 계산식

$$\text{(Rg1, Rb1 및 Rg3) 정량 (mg/g)} = \frac{\text{검액의 개별 진세노사이드 농도 (ug/ml) * 검액의 최종부피 (ml)}}{\text{검체 칭량(g) * 1000 (ug/mg)}}$$

## (2) 결과

### ① 황칠나무 부위별 지표성분 분석

- Quercetin

: 황칠나무 부위별 Quercetin을 정량한 결과 황칠 잎 2.71 mg/g, 가지 0.10 mg/g, 혼합 2.21 mg/g, 묘목 5.40 mg/g으로 묘목>잎>혼합>가지의 순이었음

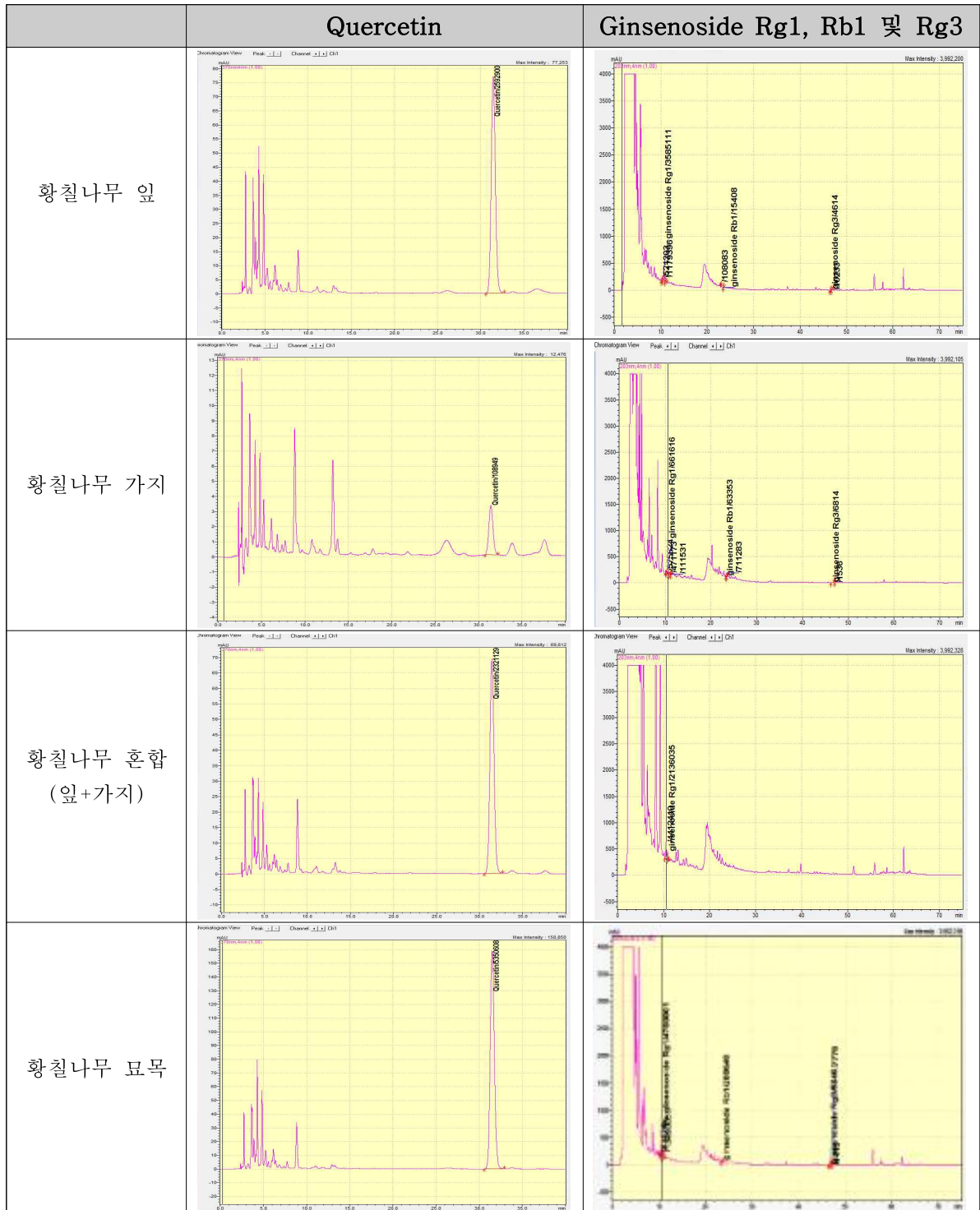
검체명	검체칭량 (g)	최종부피 (mL)	피크면적	Quercetin 정량 (mg/g)
황칠나무 잎	1.1497	50	2592900	2.718
황칠나무 가지	1.2628	50	108949	0.104
황칠나무 혼합	1.2661	50	2321129	2.210
황칠나무 묘목	1.1954	50	5350608	5.395

- Ginsenoside Rg1, Rb1 및 Rg3

: 황칠나무 부위별 Ginsenoside (Rg1, Rb1, Rg3의 합)를 정량한 결과 황칠 잎 0.72 mg/g, 가지 0.16 mg/g, 혼합 0.43 mg/g, 묘목 1.054 mg/g으로 묘목>혼합>잎>가지의 순의 결과를 나타냄

검체명	Ginsenoside(Rg1+Rb1+Rg3) 정량(mg/g)
황칠나무 잎	0.219
황칠나무 가지	0.157
황칠나무 혼합	0.431
황칠나무 묘목	1.054





② 황칠나무 잎, 가지 채취시기별 지표성분 분석

- Quercetin

: 황칠나무 잎과 가지를 분기별로 채취하여 Quercetin을 정량한 결과 황칠 잎은 3월 3.144 mg/g, 6월 8.700 mg/g, 9월 4.357 mg/g의 결과를 나타내었고, 황칠나무가지는 3월 0.116 mg/g, 6월 0.117 mg/g, 9월 0.116 mg/g으로 분기별 유의적 차이는 보이지 않았음

검체명		검체칭량 (g)	최종부피 (ml)	피크면적	Quercetin 정량(mg/g)
황칠나무 잎	3월	3.1415	50	10092067	3.144
	6월	3.2750	50	29109218	8.700
	9월	3.0103	50	13400008	4.357
황칠나무 가지	3월	3.0364	50	359258	0.116
	6월	3.0565	50	364465	0.117
	9월	3.0668	50	364677	0.116

• Ginsenoside Rg1, Rb1 및 Rg3

: 황칠나무 잎과 가지를 분기별로 채취하여 Ginsenoside (Rg1 Rb1, Rg3의 합)를 정량한 결과 황칠 잎은 3월 0.468 mg/g, 6월 0.255 mg/g, 9월 0.207 mg/g 였으며, 가지의 경우 3월 0.105 mg/g, 6월 0.102 mg/g, 9월 0.098 mg/g 으로 분기에 따른 유의적 차이는 크게 나타나지 않았음

검체명		Ginsenoside Rg1+Rb1+Rg3의 합(mg/g)
황칠나무 잎	3월	0.468
	6월	0.255
	9월	0.207
황칠나무 가지	3월	0.105
	6월	0.102
	9월	0.098

### 3. 황칠나무 새잎차 개발과 기능평가

#### 가. 제조공정 표준화 연구

##### (1) 방법

황칠나무 새잎차의 제조공정은 (1) 원료채취 (2) 살청 (3) 초청 (4) 유념 (5) 건조 (6) 포장 및 보관 과정이며 제조공정에 따른 침출액의 색, 맛 등을 비교하기 위하여 유념 횟수(1회, 2회)와 건조시간(3시간)을 변화하여 표준화를 진행하였음

- 제조공정 :

원료 채취 → 살청 → 초청 → 유념 → 건조 → 포장 및 보관



그림 1. 황칠나무 새잎차 제조방법

- 방법 1 : 1회 유념

제조공정					
원료	살청	초청	유념	건조	포장
원료 채취	마이크로파용량: 1 kw 속도(1~10) : 5	온도: 250℃ 시간: 7분30초	20분	온도: 180℃ 시간: 8분	

- 방법 2 : 2회 유념

제조공정							
원료	살청	1차 초청	1차 유념	2차 초청	2차 유념	건조	포장
원료 채취	마이크로파용량: 1 kw 속도(1~10) : 5	온도: 250℃ 시간: 7분30초	20분	온도: 250℃ 시간: 7분30초	10분	온도: 180℃ 시간: 8분	

- 방법 3 : 3시간 건조

제조공정					
원료	살청	초청	유념	건조	포장
원료 채취	마이크로파용량: 1 kw 속도(1~10) : 5	온도: 250℃ 시간: 7분30초	20분	온도: 180℃ 시간: 3시간	

## (2) 결과

### ① 공정변화에 따른 찻잎의 색상변화

유념횟수와 건조시간을 변화시켜 공정에 차이를 두고 제조한 찻잎의 색변화를 관

찰한 결과, 1회 유념과 2회 유념한 찻잎의 색변화는 없었으며 3시간 건조의 경우에는 찻잎색이 녹갈색을 띄었음



② 찻잎 침출액 시간별 색변화

- 70℃의 먹는물 300 ml에 찻잎 3 g을 넣어 침출시간에 따른 색변화를 관찰하였음
- 5분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 24시간 동안 관찰하였으며, 시간이 갈수록 모든 차의 침출색은 진해졌음
- 1회 유념은 연한 녹색을, 2회 유념은 시간이 경과할수록 갈색을 띄었으며 3시간 건조한 찻잎은 가장 진한 갈색을 띄는 것을 확인하였음

침출시간	사진
0분	
30분	
1시간	
4시간	



③ 미감 테스트

방법 3(3시간 건조)의 새잎차는 황칠 고유의 향과 맛이 느껴지지 않아 황칠잎차의 특이성이 없고, 방법 1(1회 유념)과 방법 2(2회 유념)의 침출 시 방법 3(3시간 건조) 새잎차보다 황칠고유의 향과 색이 더 나은 것을 확인하였음

④ 천년황칠차 품목제조보고

- 황칠나무 새잎차(천년황칠차)는 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜의 제주농장에서 새잎을 채취하여, 제주특별자치도 제주시 소재의 제주다 영농조합법인의 생산시설을 이용하여 제조하였음
- 표준제조과정 : 원료 채취 → 증제(살청) → 초청 → 1회 유념 → 건조 → 포장



그림 2. 제주황칠차 제품



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

제출자	제출자명(법인명)	제출자명(법인명)		
	소재지	1979년 02월 29일		
	주소	연락처	전화번호	
제출처	연락처(이름)	제출처명(법인명)		
	연락처(직책) / 연락처(이메일)	2006007988		
	소재지			
제품정보	식품의 유형	제품명	제조일자 / 유통기한	제조번호
	제조업자	제조업자명	2006007988-01	
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
	제조업자	제조업자명		
품목의 특성 ■ 2월분 : 0월분 식품 특성 세부 : [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] ■ 3월분 : 0월분 식품 특성 세부 : [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]				
기타 :				
* 식품위생법 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.				
2017년 11월 29일 보고한 사람				
제주특별자치도 제주시장 귀하				
제출처(인)				
제출일자	식품안전관리정보센터	제출처명	주소명	제출일자
	식품안전관리정보센터	제출처명	주소명	2017년 11월 29일







나. 천년황칠차 안전성 및 신뢰도 확보

(1) 방법

- 중금속 4종(카드뮴, 납, 총 비소, 총 수은)  
: 식품공전 제7. 일반시험법, 7.1 중금속시험에 따라 시험함
- 잔류농약  
: 「농수산물 품질관리법」 제98조 및 같은법 시행규칙 제126조에 따라 시험함

(2) 결과

황칠나무 새잎차에서 잔류농약 102종 모두 불검출 되었으며, 중금속은 납 0.274 mg/kg, 카드뮴 0.114 mg/kg, 수은 0.010 mg/kg, 비소 0.040 mg/kg 검출되었음

잔류농약(102종)					중금속 4종 (납,카드뮴,수은,비소)				
 <b>시험 성적서</b> <small>(08595)서울특별시 금천구 법안로 1130, 806호 (가산동, 디지털영리아이빌딩)  TEL : 070-4044-8831 FAX: 070-4032-1902 www.oatc.co.kr</small> * 발급번호 : 잔류농약02-0944호					 <b>시험 성적서</b> <small>(08595)서울특별시 금천구 법안로 1130, 806호 (가산동, 디지털영리아이빌딩)  TEL : 070-4044-8831 FAX: 070-4032-1902 www.oatc.co.kr</small> * 발급번호 : 중금속-02-0216호				
신청인	성명(기관명)	농업회사법인(주)황칠재미오람	생년월일	-	신청인	성명(기관명)	농업회사법인(주)황칠재미오람	생년월일	-
	주소	제주특별자치도 제주시 법안로 213-3, 301호 (영동동, 제주영리아이빌딩 301호 영리빌딩)	전화번호	010-9695-9677		주소	제주특별자치도 제주시 법안로 213-3, 301호 (영동동, 제주영리아이빌딩 301호 영리빌딩)	전화번호	010-9695-9677
생산자	성명	-			생산자	성명	-		
	생산지(재배일자)	-				생산지(재배일자)	-		
접수번호	ORB(FE)-17-02-0944				접수번호	ORB(HM)-17-02-0216			
접수일자	2017년 08월 24일				접수일자	2017년 08월 24일			
검사품목	황칠새잎차				검사품목	황칠새잎차			
검사목적	참고용				검사목적	참고용			
검사항목	잔류농약-102종				검사항목	중금속 4성분			
검사결과	검출성분	검출치(mg/kg)	허용기준(mg/kg)	적용기준(통칙)	검사결과	검출성분	검출치(mg/kg)	허용기준(mg/kg)	비고
		-	-	-		납	0.274	-	기준치 미만
		-	-	-		카드뮴	0.114	-	기준치 미만
		-	-	-		비소	0.040	-	기준치 미만
		-	-	-		수은	0.010	-	기준치 미만
담당검사원	성명	박경진 			담당검사원	성명	박경진 		
검사결과와 검출성분 외 모든 성분 불검출입니다. 위와 같이 시험성적서를 교부합니다.					위와 같이 시험성적서를 교부합니다.				
<small>* 본 시험성적서는 제품원 시료에 한하며, 광고,전단,홍보 및 소송 등의 법적 효력을 사용할 수 없습니다.            2017년 08월 28일</small> <b>주식회사 오에이티씨 (OATC Inc.)</b> 					<small>* 농수산식품질관리법, 제64조에 따라 국립농산물관리원장이 지정한 안전성검사기관입니다.            * 본 시험성적서는 제품원 시료에 한하며, 광고,전단,홍보 및 소송 등의 법적 효력을 사용할 수 없습니다.            2017년 08월 30일</small> <b>주식회사 오에이티씨 (OATC Inc.)</b> 				

## 다. 채취시기를 달리한 황칠나무 새잎차 시생산 및 성분분석

### (1) 방법

황칠나무 새잎차 개발에 앞서 조사한 바에 의하면 녹차의 경우 녹차의 품질은 품종, 채취시기, 재배토양의 성질, 기후조건, 제다방법에 따라 달라지고 성분의 함량도 이들 조건에 따라 변화하고 차의 풍미도 달라짐

따라서, 본 연구는 제주지역 황칠나무 새잎차에 대한 화학 및 무기물 성분분석을 통한 황칠나무 새잎차의 적정 채취시기를 결정하고자 하였음

### (2) 결과

#### ① 영양성분 분석

항목	결과	비고
열량(Kcal/100g)	296.79	
수분(%)	3.8	
회분(%)	6.52	
조단백질(%)	14.36	
조지방(%)	5.15	
탄수화물(%)	70.17	
식이섬유(%)	43.84	

#### ② 무기물 분석

K, Cu, Mg 채취시기 늦어질수록 함량이 감소하였으며, Ca은 반대로 채취시기가 늦어질수록 함량 증가하였음

항목	결과		
	5월	8월	11월
망간(mg/100g)	9.04	29.67	20.25
셀레늄(ug/100g)	10.11	7.44	8.81
칼슘(mg/100g)	623.99	1194.06	1,521.76
철(mg/100g)	6.44	7.25	7.11
칼륨(mg/100g)	2005.38	1708.46	1,477.69
구리(mg/100g)	0.81	0.57	0.54
아연(mg/100g)	4.68	7.63	7.28
마그네슘(mg/100g)	333.53	330.83	322.39

### ③ 화학물질 분석

카페인은 모든 채취분에서 불검출 되었음, polyphenol과 GABA의 경우 채취시기가 늦어질수록 함량이 감소하였음

항목	결과		
	5월	8월	11월
에피갈로카테킨 (mg/100g)	-	42.05	16.23
에피갈로카테킨갈레이트 (mg/100g)	6.45	0.98	-
에피카테킨 (mg/100g)	-	27.89	-
에피카테킨갈레이트 (mg/100g)	-	-	-
카페인 (mg/kg)	-	-	-
총 폴리페놀 (mg/g)	21.60	15.04	8.12
GABA (mg/100g)	11.92	9.87	1.81

### 라. 결론

황칠나무 새잎차 개발을 위해 제조공정을 표준화 하였으며, 해당 새잎차를 “천년황칠차”로 품목제조신고를 완료하였음. 또한, 채취시기를 표준화 하기위해 채취시기를 달리하고 제조공정은 동일하게 새잎차를 제조하여 무기물과 화학물질을 분석하였음. 그 결과, 채취시기에 따른 화학 및 무기물 성분의 차이가 있었으며, 이러한 차이가 황칠나무 새잎차 제조시 영향을 미칠것으로 사료되며 본 연구결과는 황칠나무 잎을 분류하는 기준을 제시



할 수 있을 것으로 생각됨. 이러한 결과로 볼 때, 황칠나무 잎차는 4~6월에 채취하여 상용화 하는 것이 바람직 하다고 판단됨

#### 4. 황칠나무 연구시료 개발




##### 4-1. 황칠나무 연구시료 12종 제작

###### (1) 방법

- 황칠나무는 농업회사법인(주)제이웰바이오팜에서 보유하고 있는 제주농장에서 채취 하였음
- 추출, 농축 및 동결건조 공정은 강원도 춘천소재 ㈜테코스에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95 v/v%를 사용 하였음
- 황칠나무추출물 제조과정은 아래와 같이 (1) 원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결건조 (5) 보관 과정으로 진행하였음

###### ① 원료평량

추출에 사용할 소재를 칭량하고 비율에 맞게 주정과 정제수를 투입

원료명	사진	기타
황칠나무 묘목		3~5년생 어린나무 가지+잎 혼합물
황칠나무 잎		15년생 황칠나무 잎
황칠나무 가지		15년생 황칠나무 가지
황칠나무 혼합		15년생 황칠나무 잎+가지 혼합물

###### ② 추출

추출기를 이용하여 원료의 10배수의 용매를 넣고 아래와 같은 조건에서 추출

용매	추출온도	추출시간
물	100℃	5시간
20% 주정	95℃	
50% 주정	90℃	

③ 농축

농축기를 이용하여 60~70 cmHg 조건에서 18±5 Brix 이상으로 농축하였음

④ 동결건조

농축액을 동결건조기를 이용하여 동결건조하고 수득물을 측정하였음

⑤ 보관

건조가 끝난 추출물은 분쇄한 후 기밀 포장하여 저온보관소에 보관하였음

(2) 결과

상기 기술한 방법을 통하여 추출을 실행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었음

① 황칠나무 묘목

코드명		DS 0	DS 20	DS 50
용매		정제수	20% 주정	50% 주정
추출	황칠나무 묘목 (g)	15,000	15,000	15,000
	용매량(L)	150	150	150
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	90℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(L)	19.25	21.91	27.03
건조	건조량(g)	3,447	4,411	3,271
	수득률(%)	22.98	29.41	21.81

② 황칠나무 잎

코드명		DL 0	DL 20	DL 50
용매		정제수	20% 주정	50% 주정
추출	황칠나무 잎 (g)	15,000	15,000	15,000
	용매량(L)	150	150	150
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	90℃ / 5hr.

농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(L)	20.61	19.52	19.52
건조	건조량(g)	3,704	3,751	3,774
	수득률(%)	24.69	25.01	25.16

③ 황칠나무 가지

코드명		DB 0	DB 20	DB 50
용매		정제수	20% 주정	50% 주정
추출	황칠나무 가지 (g)	15,000	15,000	15,000
	용매량(L)	150	150	150
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	90℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(L)	6.99	4.80	7.11
건조	건조량(g)	973	827	865
	수득률(%)	6.49	5.51	5.77

④ 황칠나무 혼합(잎+가지)

코드명		DM 0	DM 20	DM 50
용매		정제수	20% 주정	50% 주정
추출	황칠나무 혼합 (g)	15,000	15,000	15,000
	용매량(L)	150	150	150
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	90℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(L)	10.47	10.29	9.70
건조	건조량(g)	1,776	1,818	1,764
	수득률(%)	11.84	12.12	11.76

4-1. 각 선정 기능별 황칠나무 추출물 연구시료 제작

(1) 방법

- 기능 평가를 통해 선정된 황칠나무 잎 물추출물, 황칠나무 잎 20% 주정추출물, 황칠

나무 가지 물추출물을 제작하고자 농업회사법인(주)제이웰바이오팜 농장에서 각 부위별 황칠나무를 채취하였음

- 추출, 농축 및 분무건조 공정은 전남 나주시 소재 전남식품산업연구센터에서 보유한 기기를 이용하였으며, 시험에 사용되어진 발효에탄올(이하 주정)은 식음용 Assay 95 v/v%를 사용하였음
- 각 황칠나무추출물 제조과정은 아래와 같이 (1) 원료평량 (2) 추출 (3) 농축 (4) 부원료 혼합 (5) 분무건조 (6) 보관 과정으로 진행하였음
- 부원료는 텍스트린을 농축물의 건조물 대비 100%를 혼합하였음

(2) 결과

코드명		황칠나무 잎 물추출물 (DL0)	황칠나무 20% 잎 주정추출물 (DL20)	황칠나무 가지 물추출물 (DB0)
용매		정제수	20% 주정	물
추출	원료(g)	20,000	20,000	20,000
	용매량(L)	30	30(주정 6, 물 24)	20
	온도/시간	100℃ / 5hr.	95℃ / 5hr.	100℃ / 5hr.
농축	온도/감압	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg	50℃/60~70cmHg
	농축량(kg)	26.05	25.5	9.32
혼합	부원료(g)	4,935	4,785	1,305
분무 건조	건조량(g)	7,750	7,405	1,825
	수득률(%)	38.7	37.0	9.1

5. 피부건강, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무 추출물 정량분석 및 표준화

5-1. 피부건강, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무추출물 지표성분 분석

(1) 방법

- 1차년 연구 시, 황칠나무 부위별 , 용매별 12종 추출물을 대상으로 공동연구기관인 경희대(피부건강개선), 연세대(항치매), 울산대(면역증강)에서 활성연구를 진행하였으며 연구성과를 바탕으로 각 기능별 (피부건강개선, 항치매, 면역증강)활성을 가지는 황칠나무 추출물을 선정하였음

활성명	시료명
피부건강개선	황칠나무 잎 물추출물
항치매	황칠나무 잎 20% 주정추출물
면역증강	황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 부위와 상관없이 잎(물, 20% 주정), 가지(물) 추출물 모두 지표성분은 Quercetin으로 설정하였으며, 분석 방법은 제이웰바이오팜의 표준화된 Quercetin 정량 방법을 사용하였음

## (2) 결과

검체명		검체칭량 (g)	최종부피 (ml)	피크면적	Quercetin 함량 (mg/g)
피부건강개선	황칠나무잎 물 추출물	1.4545	50	9130488	6.27
항치매	황칠나무잎 20% 주정 추출물	1.4579	50	15198889	10.42
면역증강	황칠나무 가지 물 추출물	1.2400	50	384380	0.310

- 피부건강개선, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무 추출물의 지표성분인 Quercetin을 정량한 결과 피부건강개선에 활성을 가지는 황칠나무 잎 물추출물은 6.3 mg/g, 항치매 활성을 갖는 황칠나무 잎 20% 주정추출물은 10.4 mg/g, 면역증강 활성을 갖는 황칠나무 가지 물추출물은 0.3 mg/g의 결과를 나타내었음

## 5-2. 피부건강, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무추출물 분석법 밸리데이션

### 가. 각 활성별 황칠나무 추출물의 지표성분 시험법 밸리데이션

1, 2차년 연구성과를 바탕으로 각 기능별 활성을 가지는 황칠나무 추출물을 선정하였고, 해당 추출물의 지표성분인 Quercetin의 정량 분석을 통해 본 연구의 소재인 황칠나무 추출물의 원료표준화를 이루고자 시험법 밸리데이션을 실시하여, 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 범위를 검증하고자 함

#### (1) 방법

##### ① 표준품

- Quercetin (제조사 : Sigma aldrich, 함량 :  $\geq 95\%$ )

##### ② 시험검체

- 황칠나무 잎 물추출물
- 황칠나무 잎 20% 주정추출물
- 황칠나무 가지 물추출물

##### ③ 시약

- 에탄올 (Ethanol) (제조사 : Burdick&Jackson, Grade :HPLC)
- 아세토나이트릴 (Acetonitrile) (제조사 : J.T. Baker, Grade :HPLC)
- 초산 (Acetic acid) (제조사 : J.T. Baker, Grade : HPLC)
- 염산 (Hydrochloric acid, HCl) (제조사 : JUNSEI, Grade :Extra Pure)

④ 기기 및 설비

기 기 명		제 조 사	모 델 명
HPLC	Pump 등	Shimadzu	LC20AD
Column		Shiseido	Capcell-pak UG120 (4.6*250mm)
전자저울		Shimadzu	AUX220
초음파추출기		화신테크	Power sonic 410
항온수조		DAIHAN	WEB -6

⑤ 시험방법 타당성(밸리데이션) 검토항목 적용

기능성분		유해물질 (정량)
정량시험	확인시험	
<input checked="" type="checkbox"/> 특 이 성	<input type="checkbox"/> 특 이 성	<input type="checkbox"/> 특 이 성
<input checked="" type="checkbox"/> 직 선 성	<input type="checkbox"/> 직 선 성	<input type="checkbox"/> 직 선 성
<input checked="" type="checkbox"/> 정 밀 성	<input type="checkbox"/> 정 밀 성	<input type="checkbox"/> 정 밀 성
<input checked="" type="checkbox"/> 정 확 성	<input type="checkbox"/> 정 확 성	<input type="checkbox"/> 정 확 성
<input checked="" type="checkbox"/> 범 위	<input type="checkbox"/> 범 위	<input type="checkbox"/> 범 위
<input type="checkbox"/> 정량한계	<input type="checkbox"/> 정량한계	<input type="checkbox"/> 정량한계

⑥ 분석조건

- 이동상 : H<sub>2</sub>O : 5% Acetic acid : Acetonitrile (40:30:30)
- Injection Vol. : 10  $\mu$ l
- Column Oven Temp. : 35°C
- Sample Rack Temp. : 실온
- Detector : Diode Array Detector (UV 370 nm)
- Run time : 25 min
- Flow Rate : 0.8 mL/min

(2) 결과

① 특이성

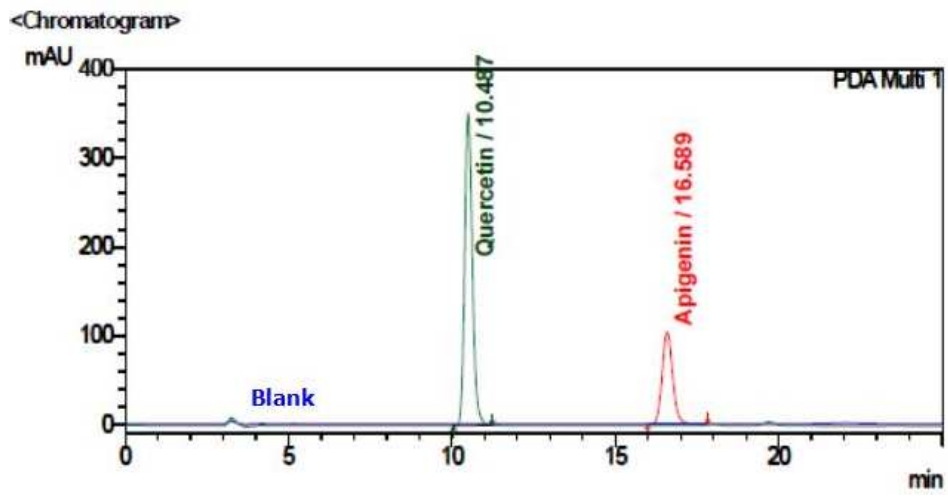


그림1. Blank, Quercetin표준용액, Apigenin표준용액 비교

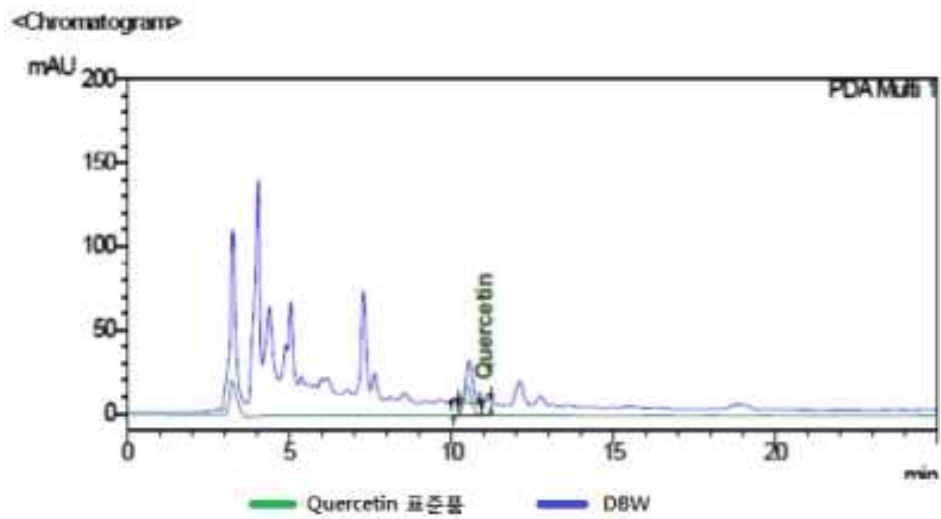
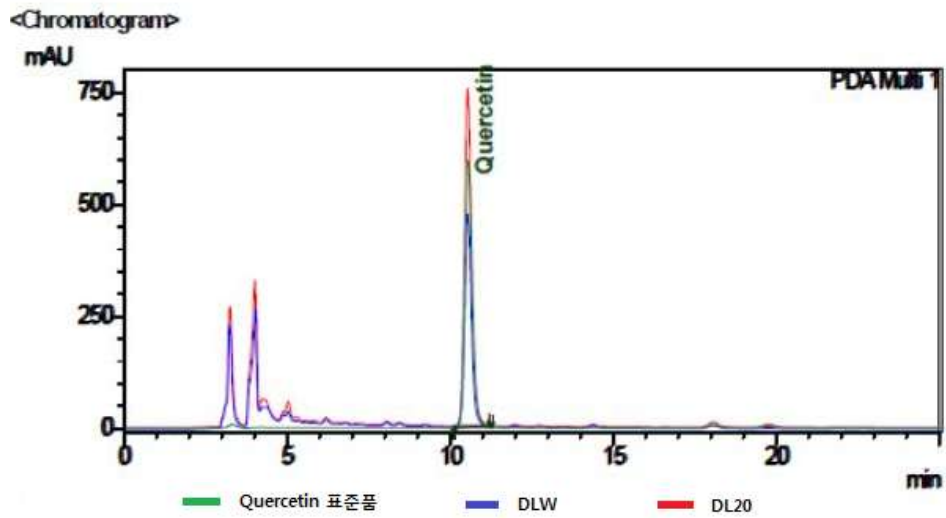


그림2. 표준용액(Quercetin) 및 검체 Chromatogram 비교

구 분	Sample Name	유지시간 (분)	Quercetin 표준용액과 유지시간의 차이 (분)
Blank	Blank	-	-
Apigenin 표준용액	Apigenin	16.589	6.102
Quercetin 표준용액	Quercetin	10.487	0.000
황칠나무 잎 물추출물(DL0)	DL0-001	10.544	0.057
황칠나무 잎 20% 주정추출물(DL20)	DL20-001	10.540	0.053
황칠나무 가지 물추출물(DB0)	DB0-001	10.541	0.054

각 추출물의 Quercetin 피크는 각 표준품과 동일한 시간대에 분석되었고, 각 표준품의 분리도 및 피크의 Peak Purity를 피크시간과 피크높이 1/3, 2/3에서 유지시간에서 UV Spectrum으로 확인하여 분석조건에 검체의 다른물질과 특이적으로 분석됨을 검증하였음

### ② 직선성

직선성 결과 분석조건에서 Quercetin 표준용액의 농도구간인 5~300 ug/mL에서 각 표준품의 농도 (x Data)와 피크면적 (y Data)의 결정계수가 0.999 이상으로 농도와 피크면적이 선형적인 관계가 있음을 검증하였음

### ③ 정밀성

#### • 황칠나무 잎 물추출물 (DL0-001)

분석일내(Intra-day precision)의 경우 함량 균일성은 상대표준편차(평균/표준편차 \*100, %RSD)는 1%이하, 분석일자간 (Inter-day precision)의 경우 1%이하가 얻어졌음.

#### • 황칠나무 잎 20% 주정추출물 (DL20-001)

분석일내(Intra-day precision)의 경우 함량 균일성은 상대표준편차(평균/표준편차 \*100, %RSD)는 1%이하, 분석일자간 (Inter-day precision)의 경우 2%이하가 얻어졌음.

#### • 황칠나무 가지 물추출물 (DB0-001)

분석일내(Intra-day precision)의 경우 함량 균일성은 상대표준편차(평균/표준편차 \*100, %RSD)는 2%이하, 분석일자간 (Inter-day precision)의 경우 3%이하가 얻어졌음.

본 결과에 따라 분석조건에서 황칠나무 추출물의 Quercetin의 농도가 재현성있게 얻어졌음



표 1. 동일 분석일내(Inter-day) 정밀성

구분 / 제조번호	DL0-001	DL20-001	DB0-001
정밀성4의 검액1 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.1716	10.1558	0.3057
정밀성4의 검액2 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.2293	10.4789	0.3071
정밀성4의 검액3 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.1645	10.2083	0.3069
정밀성4의 검액4 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.2263	10.4569	0.3092
정밀성4의 검액5 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.2228	10.4039	0.3149
정밀성4의 검액6 유래 Quercetin 정량(mg/g)	6.0888	10.4794	0.3017
표준편차 (A)	0.0547	0.1447	0.0044
평균 (B)	6.184	10.364	0.308
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.9	1.4	1.4

표 2. 동일 분석일간(Intra-day) 정밀성

구분 / 제조번호	DL0-001	DL20-001	DB0-001
정밀성1의 Quercetin 정량(mg/g) 평균값	6.188	10.248	0.305
정밀성2의 Quercetin 정량(mg/g) 평균값	6.112	10.138	0.306
정밀성3의 Quercetin 정량(mg/g) 평균값	6.221	10.039	0.318
표준편차 (A)	0.056	0.105	0.007
평균 (B)	6.174	10.142	0.310
%RSD (상대표준편차 = A / B * 100)	0.9	1.0	2.2

④ 정확성

분석용액에 일정량의 각 표준품을 첨가한 회수율 (실험농도/예측농도\*100) 평가에  
서 각각 원료의 회수율은 황칠나무 잎 물 추출물 94~101%, 황칠나무잎 20% 주정  
추출물 97~102%, 황칠나무 가지 물추출물 99~103%로 정확하게 얻어짐을 검증하였  
음

⑤ 범위

각각 황칠나무 추출물의 범위는 직선성, 정밀성, 정확성이 만족되는 구간으로  
Quercetin 농도로서 황칠나무 잎 물추출물 96~144 ug/mL, 황칠나무 잎 20% 주정추출  
물 160~240 ug/mL, 황칠나무 가지 물추출물 4.8~7.2 ug/mL을 선정하였음

⑥ 분석조건에 각각의 Quercetin 함량을 황칠나무 잎 물추출물 6 mg/g, 황칠나무 잎 20%  
주정추출물 10 mg/g, 황칠나무 가지 물추출물 0.3 mg/g을 분석결과 기준으로 정하였으  
며 Quercetin 정량은 검체 내 다른성분에 간섭을 받지 않고, 정밀하고 정확한 결과가

언어지므로, “황칠나무 잎 물 추출물, 황칠나무 잎 20% 주정추출물, 황칠나무 가지 물 추출물의 정량분석법”은 황칠나무 추출물 정량 시험법으로 타당한 분석법임을 검증하였음

### (3) 결론

1, 2차년 연구성과를 바탕으로 황칠나무의 피부건강, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무 추출물을 선정 후 지표성분 밸리데이션을 통하여 황칠나무 산업화 원료를 표준화하였음. 본 연구결과를 바탕으로 각각 활성별 황칠나무 추출물을 건강기능식품 원료 및 산업화 원료로서 활용이 가능할 것임

## 6. 황칠나무 추출물의 피부건강 기능평가(공동연구기관 : 경희대학교)

### 가. 아토피 피부염 억제 관련 *in vitro* screening

#### (1) 방법

##### ① 재료

HaCaT cell (keratinocyte)과 MC/9 cell은 각각 경기바이오 센터와 American Type Cultured Collection(ATCC; Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 실험하였음. High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS), PBS, penicillin-streptomycin, L-glutamin, sodium pyruvate, hepes, NEAA mixture은 Thermo scientific (hyclone, thermo fisher scientific, MA, USA)에서 구입하였고, gentamicin reagent solution은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였음. Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), human tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ), Interferon gamma(IFN- $\gamma$ )은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였음. 그 외의 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였음

##### ② 세포독성 실험(MTT assay)

HaCaT cell을  $1 \times 10^4$  cells/well의 농도로 96well plate에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 12h 동안 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24h 동안 더 배양하였음. 배양 후 phosphate buffered saline(DPBS, pH 7.4)에 5 mg/mL의 농도로 용해시킨 MTT 용액을 3시간 처리하였음. well plate에 있는 200  $\mu$ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 수용액에 용해되지 않는 MTT formazan을 용해시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였음

##### ③ Real-time polymerase chain reaction에 의한 TRAC, IL-4 및 HR 측정

Keratinocyte인 HaCaT cell에 추출물을 처리하여 cytokines(TRAC, IL-4 및 HR) mRNA expression 측정은 Keratinocyte(HaCaT cell)를 12 well plate에 각 well당  $2 \times 10^5$  cells/well을 500  $\mu$ L 씩 분주 후 TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)와 IFN- $\gamma$ (20 ng/mL)로 피

부 과민성으로 자극시킨 후, 추출물을 처리한 후 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하고 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성한 후 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였음. cDNA는 각각 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였음. 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization 하였음. HaCaT cell을 TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)와 IFN- $\gamma$ (20 ng/mL)로 자극하여 활성화 시킨 후, 추출물을 처리한 후 세포를 수집하여 RNA 추출과 cDNA를 합성한 후 추출물이 TARC, IL-4 및 HR mRNA 유전자 발현에 관여하는지 관찰하였음

**Table 2. Oligonucleotides used in RT-PCR.**

Name of genes	Oligonucleotide Sequence (5'---3')	
IL-4 (H)	F	CACAGGCACAAGCAGCTGAT
	R	CAGGCCCCAGAGGTTTCCT
TARC (CCL-17) (H)	F	GAAGACGTGGTACCAGACATCTGA
	R	CCCTGCACAGTTACAAAAACGA
Histamine receptor 1(H)	F	GCCGTCGTCATGCCTATGA
	R	GAGAGGACGGCCCAGTGA
GAPDH (H)	F	CAAGGCTGTGGGCAAGGT
	R	GGAAGGCCATGCCAGTGA

## (2) 결과

### ① 세포독성평가

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay 검사법을 이용하여 실시하였음. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법임. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례하고, 세포가 많이 살아 있을수록 MTT로 환원이 많이 되어 더 진한 보라색을 띠게 됨. Sample의 적정농도를 결정하기 위해 용해도 실험을 거친 후 HaCaT 세포를 이용한 세포의 생존율을 측정된 결과는 Fig.1에 나타내었음

- Sample 'DL 0' 은 정상세포 Normal control 0  $\mu\text{g/mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 처리 군과 대비하여 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았으나 그 이후 300  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 부터는 세포 독성이 나타났으며, Sample 'DL 20'은 정상세포 Normal control 0  $\mu\text{g/mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 400  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지는 세포독성이 나타나지 않았으나 500  $\mu$

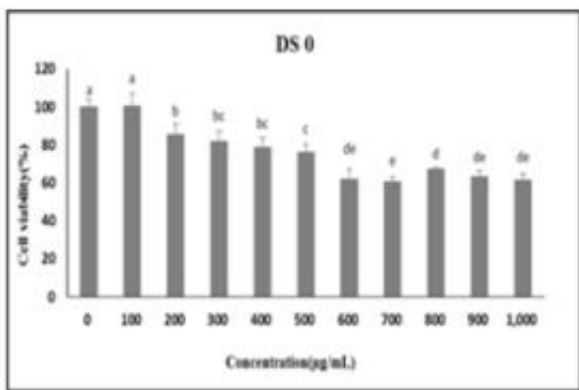
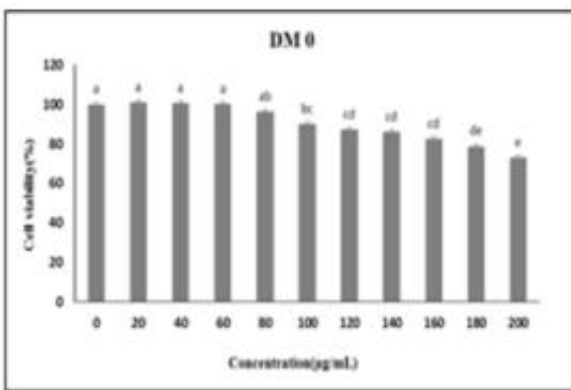
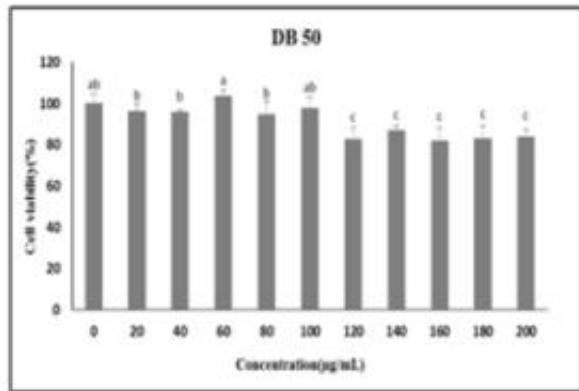
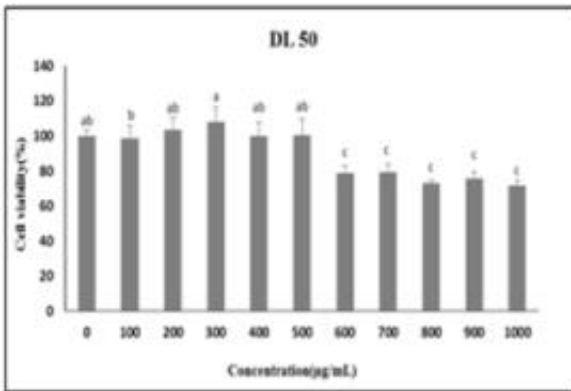
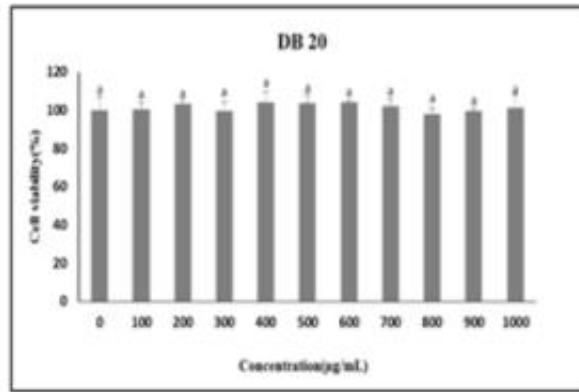
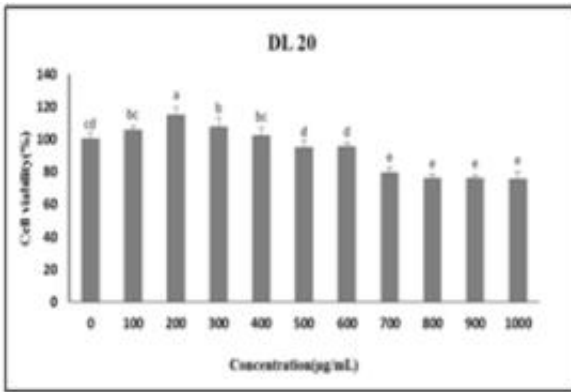
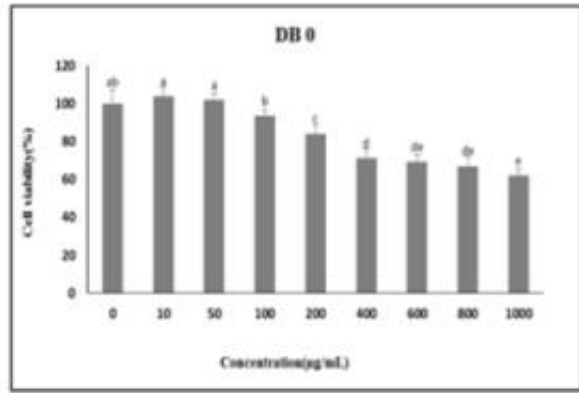
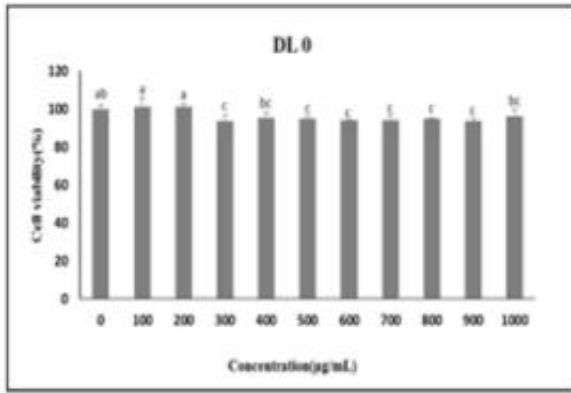
g/mL의 농도부터 서서히 독성을 보였으며 700 µg/mL 농도부터는 모두 70%의 낮은 세포 생존율을 보였음

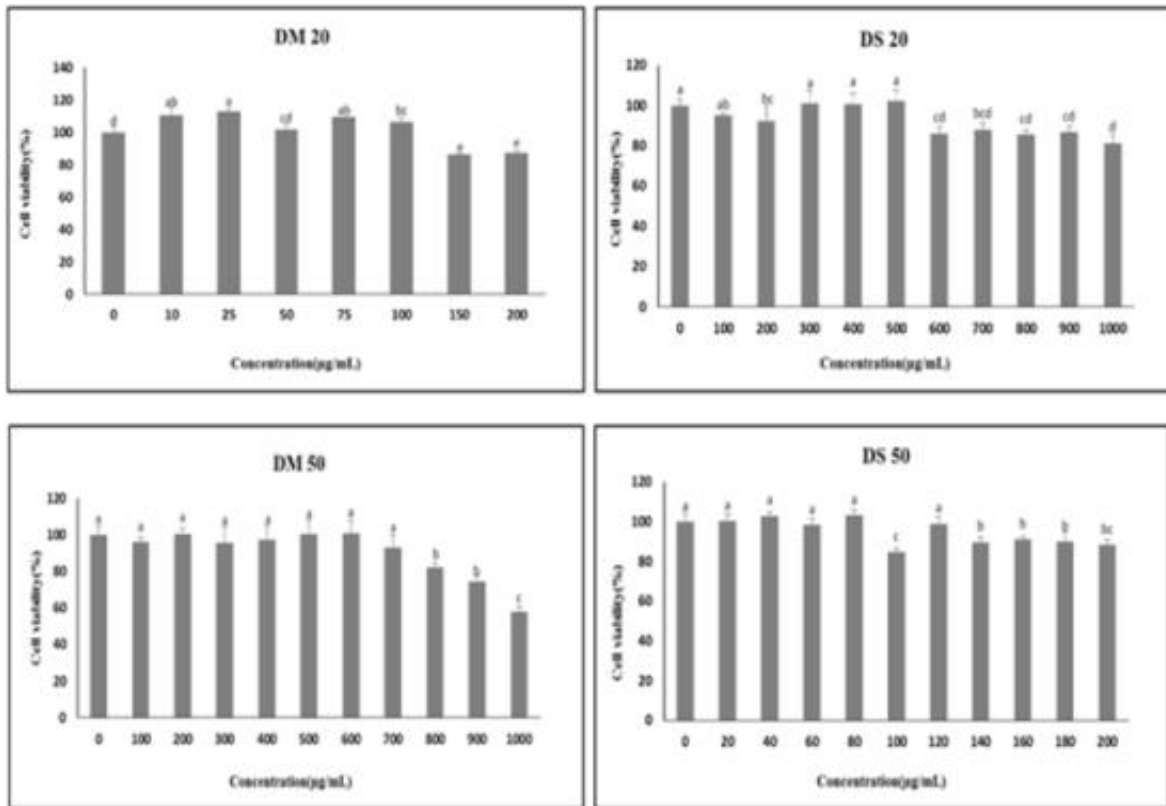
- Sample 'DL 50'은 정상세포 Normal control 0 µg/mL 의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 sample 농도 500 µg/mL까지는 높은 세포 생존율을 보였으나 600 µg/mL에서 뚜렷한 세포독성으로 70%의 낮은 세포 생존이 나타났음
- Sample 'DB 0' 은 정상세포 Normal control 0 µg/mL의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 처리 군과 대비하여 10, 50 µg/mL의 농도에서는 세포 독성이 나타나지 않았으나 200 µg/mL의 농도에서 부터는 84.16%의 세포 독성이 나타나 DB 0은 100 µg/mL 농도 이하에서 실험을 진행하였으며, Sample 'DB 20'의 sample에서는 정상세포 Normal control 0 µg/mL의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 1000 µg/mL의 농도까지 세포독성이 나타나지 않아 고농도에서도 높은 세포 생존율을 보였음. Sample 'DB 50'은 정상세포 Normal control 0 µg/mL의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 sample 농도를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL의 농도로 1차적으로 실험한 결과 100 µg/mL의 농도에서 85.32%, 200 µg/mL의 농도에서는 75.39%의 세포독성을 보여 sample의 최종 실험 농도를 200 µg/mL까지 하고 200 µg/mL까지의 농도를 다시 세분화 하여 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/mL의 농도로 2차 재 실험을 진행한 결과 20, 40, 60, 80, 100µg/mL의 농도에서는 각각 96.13%, 95.87%, 103.7%, 94.78%, 97.7%의 세포 독성이 나타나지 않았으며 120 µg/mL의 농도부터는 세포 독성이 나타나 실험은 100 µg/mL 농도 이하에서 실험을 진행하였음
- Sample 'DM 0'은 정상세포 Normal control 0 µg/mL의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 sample 농도를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL의 농도로 1차적으로 실험한 결과 100 µg/mL의 농도에서 86.36%, 200 µg/mL의 농도에서는 61.56%의 높은 세포독성을 보여 sample의 최종 실험농도를 200 µg/mL까지 하고 200 µg/mL까지의 농도를 다시 세분화 하여 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 µg/mL의 농도로 2차 재실험을 진행한 결과 20, 40, 60, 80 µg/mL의 농도에서는 각각 100.98%, 100.46%, 100.2%, 96.40% 세포독성이 나타나지 않았으며 100 µg/mL의 농도부터는 89.92%의 세포 독성이 나타나 실험은 100µg/mL 농도 이하에서 실험을 진행하였음. Sample 'DM 20'은 정상세포 Normal control 0 µg/mL의 세포 생존율을 100% 기준으로 하여 sample 농도를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL의 농도로 1차적으로 실험한 결과 100µg/mL의 농도에서 88.44%, 200 µg/mL의 농도에서는 72.09%의 높은 세포독성을 보여 sample의 최종 실험 농도를 600 µg/mL까지 하고 600 µg/mL까지의 농도를 다시 세분화 하여 10, 50, 100, 150, 200, 400, 600µg/mL의 농도로 2차 MTT 재실험을 진행한 결과 10, 50, 100 µg/mL의 농도에서는 각각

100.28%, 92.56%, 89.3%로 나타났으며 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터는 82.37%로 뚜렷한 세포 독성이 나타났으나 정확한 세포 독성 실험을 진행하고자 3차 재실험을 실행하였음. 최종 실험 농도를 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하고 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도를 더 세분화 하여 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 3차 재실험을 진행한 결과 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 각각 110.46%, 112.77%, 101.60%, 109.38, 106.22%로 세포 독성이 나타나지 않았으며 150, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도부터는 각각 86.23, 87.20%의 세포 독성이 나타나 실험은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 실험을 진행하였음. Sample 'DM 50'은 정상 세포 Normal control 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 농도 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 높은 세포 생존율을 보였으나 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포독성으로 82.25%의 낮은 세포 생존율을 나타내어 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 실험을 진행하였음

- Sample 'DS 0'은 정상세포 Normal control 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 100.83%, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 52.40%의 세포 독성을 보여 안전범위인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도에서 농도를 세분하여 실험을 진행하였음. Sample 'DS 20'은 정상세포 Normal control 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 농도 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 95.17%, 92.21%, 100.93%, 100.74%, 102.19%로 세포독성이 나타나지 않았으나, 그 이후의 농도 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 86.09%의 세포독성이 나타나 실험은 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 진행하였다. Sample 'DS 50'은 정상세포 Normal control 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 세포 생존율을 100% 기준으로 sample 농도를 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 1차적으로 실험한 결과 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 부터 85.37%의 세포독성을 보여 sample의 최종 실험 농도를 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 하고 농도를 세분화 하여 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 2차 재 실험을 진행한 결과, 20, 40, 60, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 각각 100.4%, 102.9%, 98.31%, 103.08%의 세포 독성이 나타나지 않았으나 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 1차 실험과 유사한 결과인 84.70%로 1차 실험과의 1% 오차로 세포독성을 보여 실험은 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 이하에서 실험을 진행하였음

따라서, 각 sample에서 적정 농도를 살펴본 결과 동일 농도에 속하는 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 선정하여 스크리닝 실험을 진행하였음





**Fig. 1. Effect of *Dendropanax moribifera* extracts on cell viability in HaCaT cells.**

Cells were incubated with extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was assessed by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of pine cone extract, compared with untreated control(0 µg/mL) cells, taken as 100%. All data are presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were performed by Duncan's multiple range tests after one-way ANOVA using SPSS software. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

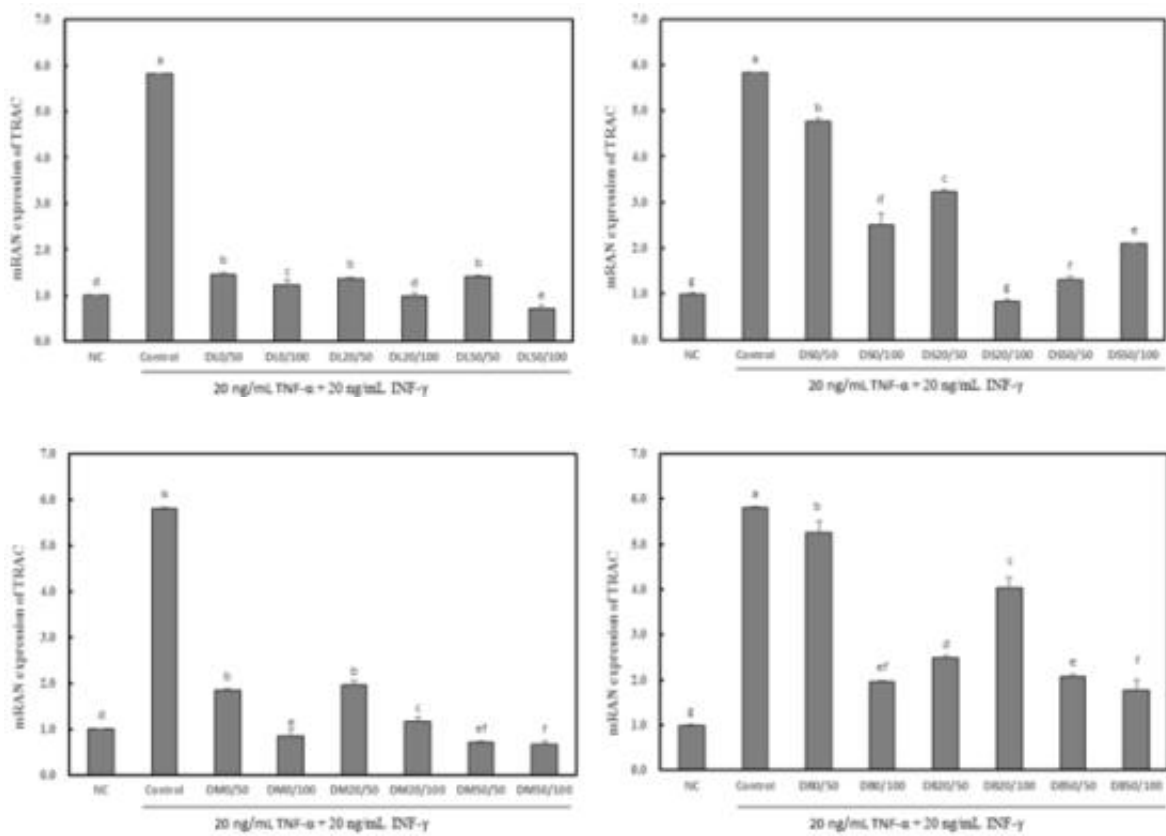
DL0, DS0, DB0, DM0 : Water extract, DL20, DS20, DB20, DM20 : 20% EtOH extract, DL50, DS50, DB50, DM50 : 50% EtOH extract.

## ② TARC(CCL-17) 유전자 발현

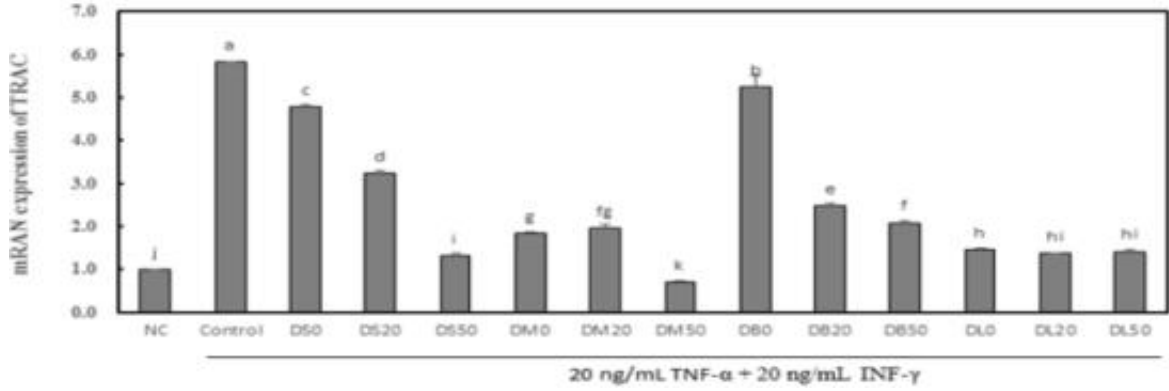
- 아토피 유발을 위해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리한 HaCaT 세포에 sample을 각 농도 별로 처리한 후 TARC의 발현량에 대한 변화는 Fig.2에 나타내었음
- TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC군에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control군에서 5.8배 TRAC의 유전자 발현량이 유의적으로 증가함을 확인 하였음
- Sample DL0, DL20, DL50을 50, 100 µg/mL을 처리한 결과, TRAC의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, DL0, DL20, DL50 처리시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음
- Sample DS0, DS20, DS50을 50, 100 µg/mL을 처리한 결과, TRAC의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, 특히 DS0, DS20 은 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였으나, DS50의 경우 농도의존적으로

증가하였음

- Sample DB0, DB20, DB50을 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과, TRAC의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 특히 DB0, DB50은 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였으나, DB20의 경우 농도의존적으로 증가하였음
- Sample DM0, DM20, DM50을 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 처리한 결과, TRAC의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 특히, DM0, DM20은 농도의존적으로 감소함을 확인하였음. DM50은 농도가 높아질수록 감소하는 경향이 있음
- 모든 sample에서 효과가 나타난 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 비교한 결과, TRAC의 유전자 발현량이 모든 sample에서 Control에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, 특히 DL은 추출용매와 관계없이 TRAC의 유전자 발현을 50%이상 감소시키는 것을 확인하였음







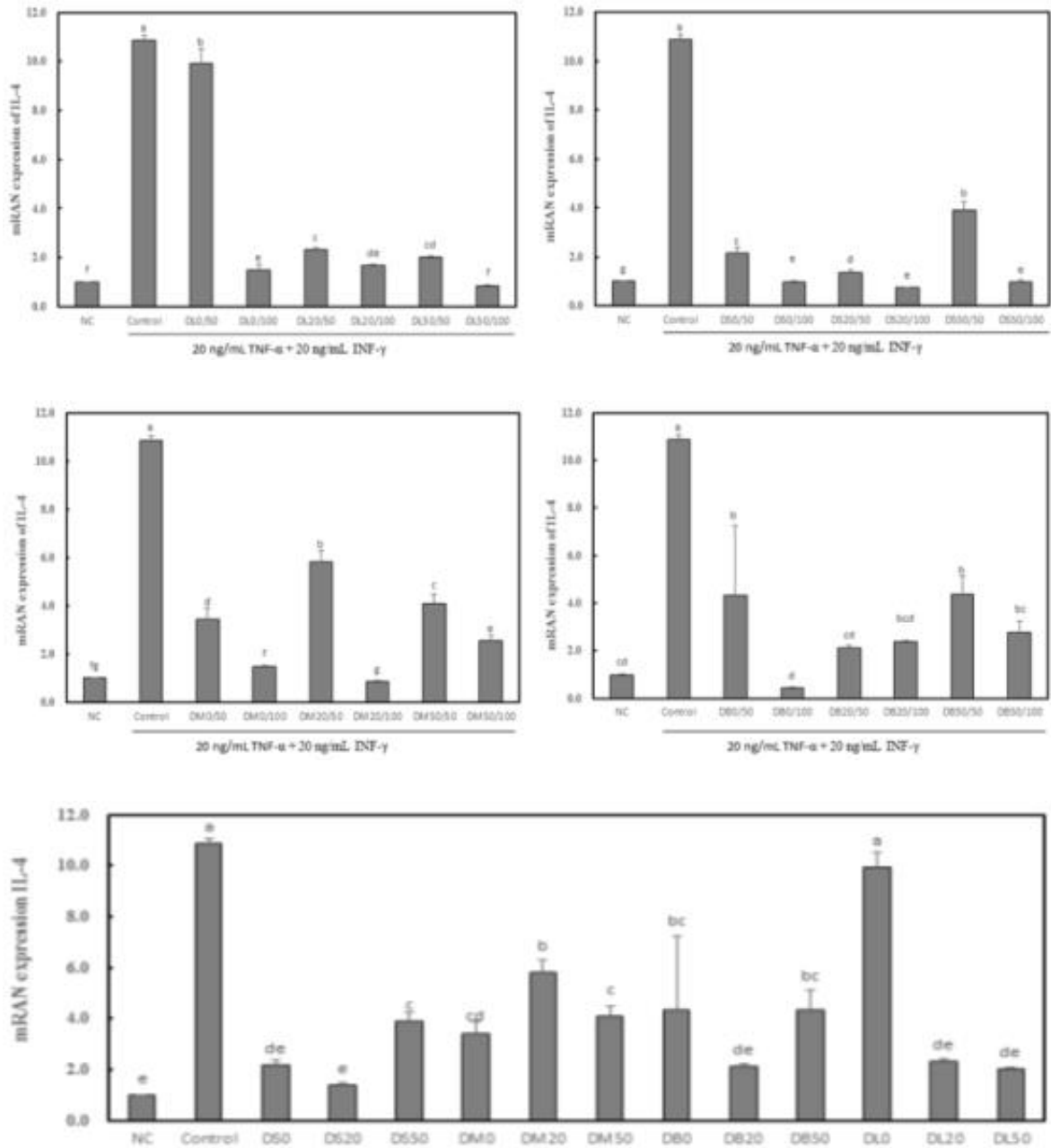
**Fig. 2. Effect of *Dendropanax moribifera* extracts on mRNA expression of TRAC in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  treated HaCaT cells.**

The results were presented means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

DL0, DS0, DB0, DM0 : Water extract, DL20, DS20, DB20, DM20 : 20% EtOH extract, DL50, DS50, DB50, DM50 : 50% EtOH extract.

### ③ IL-4 유전자 발현

- Th2 type cytokine들은 B세포에서 면역글로불린의 생산을 자극시켜 혈중 면역글로불린을 증가시켜 면역을 활성화시키게 함
- TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC군에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control군에서 10.9배 IL-4의 유전자 발현량이 유의적으로 증가함을 확인하였음
- Sample DL0, DL20, DL50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, IL-4의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, DL0, DL20, DL50 처리시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음
- Sample DS0, DS20, DS50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, IL-4의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, DS0, DS20, DS50 처리시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음
- Sample DB0, DB20, DB50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, Control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, DB0, DB20, DB50 처리 시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음
- Sample DM0, DM20, DM50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, Control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 특히, DM0, DM50은 농도의존적으로 감소함을 확인하였음. DM20은 농도가 높아질수록 감소하는 경향이 있음
- 모든 sample에서 효과가 나타난 50  $\mu$ g/mL를 비교한 결과, DL0 처리시 Control군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 다른 sample에서는 Control군에 비해 유의적으로 감소하였음



**Fig. 3. Effect of *Dendropanax morbifera* extracts on mRNA expression of IL-4 in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  treated HaCaT cells.**

The results were presented means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

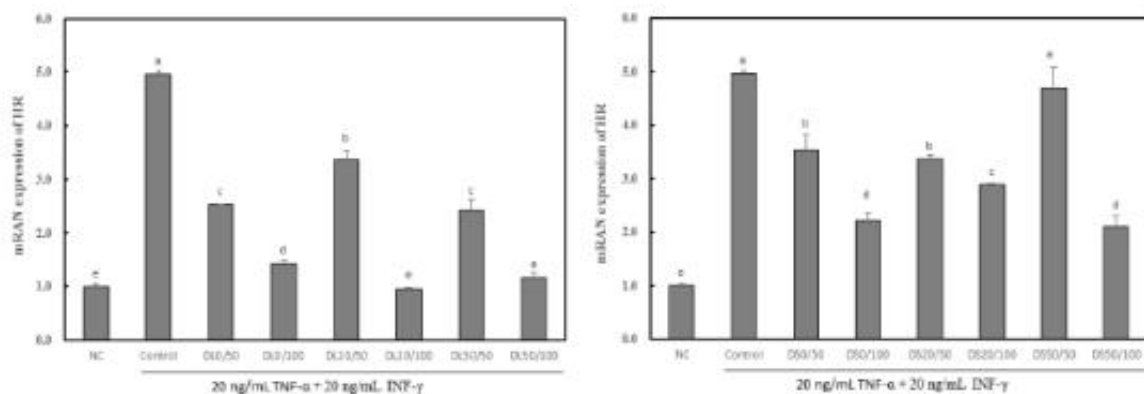
DL0, DS0, DB0, DM0 : Water extract, DL20, DS20, DB20, DM20 : 20% EtOH extract, DL50, DS50, DB50, DM50 : 50% EtOH extract.

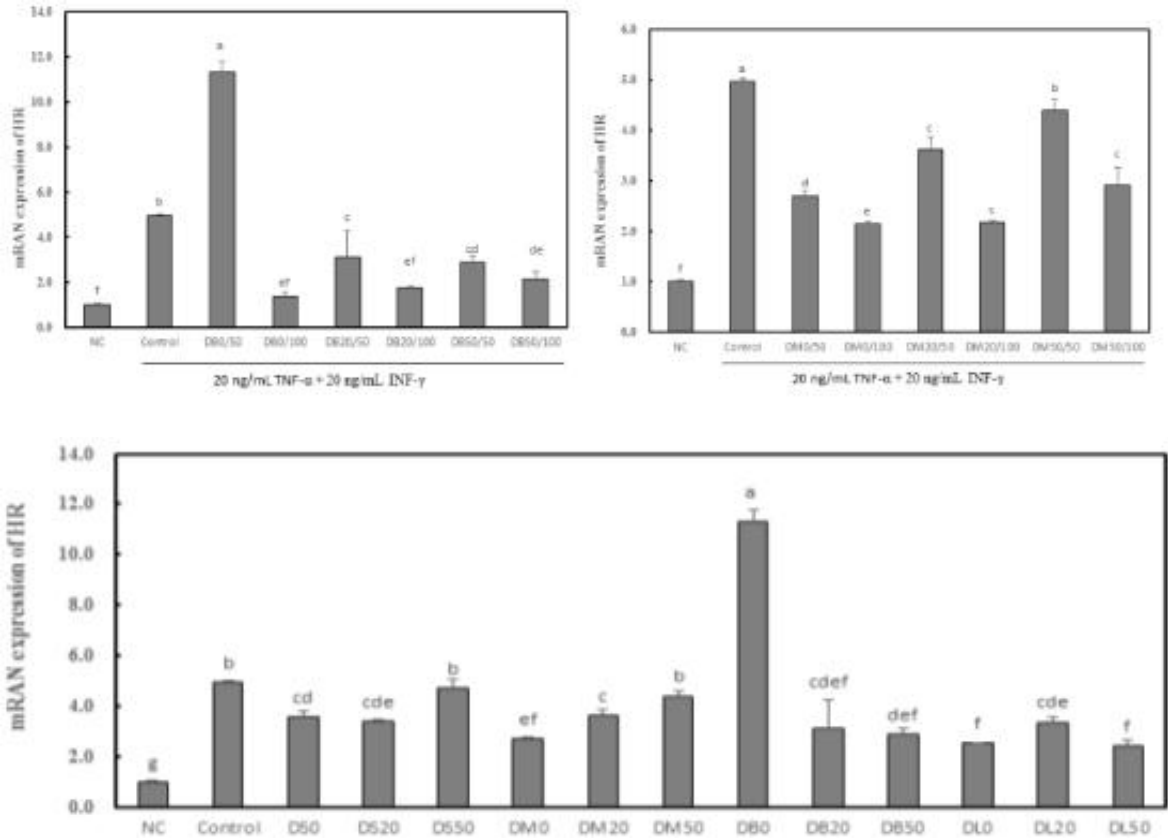
#### ④ HR 유전자 발현

- Histamine은 mast cell안에 저장되어 있다가 mast cell이 자극되어 손상되면 방출되어 혈과의 이완과 투과성을 증가시켜 혈구와 여러 혈장단백질들이 세균이 침입한 부위로 빨리 이동할 수 있도록 염증반응을 일으키는데, 과도한 면역 반응으

로 인해 histamine의 과다 분비는 알러지 반응과 아나필락시스를 일으키기도 함. HR 유전자 발현을 측정함으로써 histamine의 분비를 간접적으로 측정하였음

- TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC군에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control군에서 HR의 유전자 발현량이 5.0배 유의적으로 증가함을 확인하였음
- Sample DL0, DL20, DL50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, HR의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, DL0, DL20, DL50 처리시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음
- Sample DS0, DS20, DS50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, HR의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, DS0, DS20 처리시 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였으나, DS50은 농도의존적으로 감소는 하였으나, 50  $\mu$ g/mL 농도 처리시 Control군과 유의적인 차이가 나타나지 않았음
- Sample DB0, DB20, DB50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, HR의 유전자 발현량이 DB0 50  $\mu$ g/mL 농도 처리시 Control군에 비해 유의적으로 증가함(약2.3배)을 확인하였고, DB20 처리시 Control에 비해 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였음. DB50 처리시 Control에 비해 유의적으로 감소는 하였지만 농도의존적이지는 않았음
- Sample DM0, DM20, DM50을 50, 100  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, HR의 유전자 발현량이 Control군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였고, 특히, DM0, DM20, DM50은 농도의존적으로 감소함을 확인하였음
- 모든 sample에서 효과가 나타난 50  $\mu$ g/mL를 비교한 결과, HR의 유전자 발현량이 DB0에서 가장 높게 나타났고, DS50, DB50은 Control과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. DB0, DS50, DB50을 제외한 다른 sample에서는 Control과 유의적인 차이가 나는것을 확인하였음





**Fig.4. Effect of *Dendropanax morbifera* extracts on mRNA expression of IL-4 in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  treated HaCaT cells.**

The results were presented means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

DL0, DS0, DB0, DM0 : Water extract, DL20, DS20, DB20, DM20 : 20% EtOH extract, DL50, DS50, DB50, DM50 : 50% EtOH extract.

### (3) 결론

1차년도에서는 황칠나무의 부위별, 추출용매별에 따른 아토피 피부염 억제 효과 scerning에 대한 평가를 진행하였음. *in vitro* 상에서 진행된 실험에서 측정가능한 중요 marker를 TRAC, IL-4, HR로 선정하여 진행하였고, 추출용매에 따른 효과는 물추출물이 경제적인 면과 효능적인 면에서 적합한 것으로 나타났으며, 부위별에 따른 효과는 잎이 가장 뛰어난 것으로 판단되어, 추후 DL0으로 실험을 진행하고자 함

## 나. 황칠나무 잎 물추출물의 아토피 피부염 억제 효능 평가

### (1) 방법

#### ① 실험동물 및 식이 공급

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice와 정상대조군에 사용할 Balb/c mice를 (주 새론바이오에서 공급받아 동물사육실에서 일정한 조건(온도 :  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도 :  $50 \pm 5\%$ , 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주일 동안 주위 환경에 적응 시킨 후

사용하였음. 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 6마리의 마우스를 이용하여 군 분리를 하였음. 정상대조군(Normal control; NC), 아토피대조군(AD control; atopy C.), 양성대조군( $\gamma$ -rinolenic acid, Positive control; PC), 텍스트린(Dextrin ;MD), DL0 100 mg/kg b.w.(100), DL0 500 mg/kg b.w.(500) 으로 분리하여 정상대조군을 제외한 모든 군의 마우스는 1% DNCB를 총 4회 도포하여 아토피 피부염을 유발하였음. 모든 식이는 AIN93G를 기본으로 제작하였으며, 식이와 음수는 자유공급 하였음

② 경표피 수분 함량 측정

피부 측정 기기인 CM825(Courage & Khazaka GmbH, Cologne, Germany)을 이용하여 아토피 피부염 상태에서 변화하는 피부 수분 지수를 측정 및 분석하였음. 희생 전 동물의 귀 부위 피부를 5회 연속 측정하여 평균값을 얻었으며 측정 장소는 실내 온도 21~23°C, 습도 50~60%가 유지되는 조건에서 측정하였음

③ 혈중 면역 글로불린 측정

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 mouse immunoglobulin E(IgE), mouse immunoglobulin G1(IgG1), mouse immunoglobulin G2a(IgG2a) ELISA kit(abcam, USA)를 이용하여 IgE, IgG1, IgG2a를 측정하였음

④ Splenocyte에서 T 세포 및 B 세포 증식능 측정

동물에서 분리한 splenocyte은 PBS로 세척한 후 0.45  $\mu$ m cell strainer를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었음. 단일 세포 부유액을 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L-glutamine(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)으로 세척 후 red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈 시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^6$  cells/well을 200  $\mu$ L 씩 분주하였음. T 세포 증식능 측정을 위하여 concanavalin A(Con A)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5  $\mu$ g/ml를 처리하였고, B세포 증식능 측정을 위하여 lipopolysaccharide(LPS)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5  $\mu$ g/ml를 처리한 후 48시간 동안 37°C에서 배양하였음. 48시간 후, EZ-Cytox(Deilab INC, Korea)를 20  $\mu$ L씩 분주하고 4시간 동안 37°C에서 배양시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였음

⑤ Splenocyte에서 cytokines 측정

Splenocyte를 96 well plate에 각 well당  $1 \times 10^6$  cells/well을 100  $\mu$ L 씩 분주 후, Con A 5  $\mu$ g/ml를 처리하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ 의 생성을 자극시켰음. IL-2, IL-4, IL-10은 24시간 배양 후에, IFN- $\gamma$ 은 72시간 배양 후에 상층액을 수집하였음.

상층액의 cytokine의 양은 DuoSet sandwich ELISA mouse kit (R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)를 이용하여 측정하였음. ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100  $\mu$ L씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS (IL-4, -10) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- $\gamma$ ))를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어냈음. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 비장세포의 배양액을 100  $\mu$ L씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 2시간 동안 처리하였음. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100  $\mu$ L씩 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산하였음

#### ⑥ 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean $\pm$ SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성  $P < 0.05$ 수준에서 검정하였음

## (2) 결과

### ① 식이 효율 및 장기무게 변화

- 황칠나무 잎 물추출물의 섭취에 따른 식이효율 및 장기무게 변화는 Table 2에 나타내었음
- 식이효율은 모든 그룹간의 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음
- 비장은 면역세포가 밀집되어 있어 면역 체계에서 가장 중요한 림프기관이고, 비장은 항원이 제시되거나 면역 반응이 급속하게 진행되어 이에 반응하여 크기가 증가하여 비장비대증이 유발됨
- 비장의 무게를 관찰한 결과, atopy C.군에서 NC군에 비해 유의적으로 증가되었음을 확인하여 면역 반응이 증가되었음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- MD군은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음
- PC, 100, 500군에서는 atopy C.군에 비해 각각 48.69%, 53.14%, 56.00% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- 간의 무게 변화에서는 atopy C.군에서 NC군에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, PC, MD, 100, 500군은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음

**Table 2. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on FER and organ weights of NC/Nga mice.**

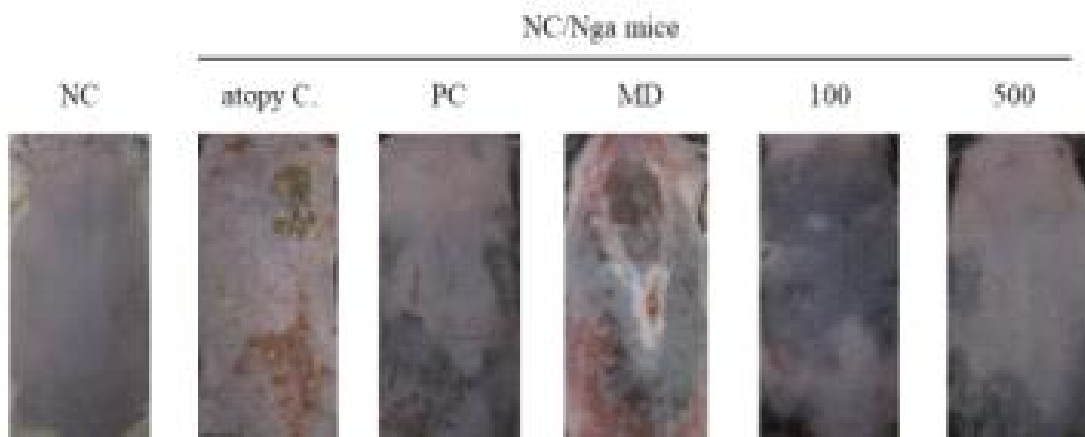
	NC	NC/Nga mice				
		atopy C.	PC	MD	100	500
FER <sup>1)</sup>	5.48±1.14 <sup>ns</sup>	5.13±1.44	4.87±1.08	5.88±0.26	4.91±0.39	5.04±0.80
Spleen(g)	0.09±0.01 <sup>b</sup>	0.21±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.02 <sup>b</sup>	0.19±0.07 <sup>a</sup>	0.10±0.02 <sup>b</sup>	0.09±0.01 <sup>b</sup>
Liver(g)	1.22±0.13 <sup>b</sup>	1.70±0.13 <sup>a</sup>	1.49±0.25 <sup>a</sup>	1.68±0.04 <sup>a</sup>	1.44±0.11 <sup>ab</sup>	1.47±0.21 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>FER (Food efficiency rate) = {weight (g) / food intake (g)} \* 100

ns; no significant, NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w.. Values are presented as means±SD. Different letters show a significantly difference at  $P<0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

② 피부 형태학적 변화 관찰

- 황칠나무 잎 물추출물의 섭취에 따른 피부 형태학적 변화는 Fig. 5에 나타내었음
- 아토피유발(atopy C., PC, MD, 100, 500)의 피부를 정상대조군과 비교하여 살펴 보았을 때, 홍반, 부종, 건조, 형질 짓무름, 발진 등의 증상이 나타났음을 확인하였음
- 이러한 아토피 피부염의 형태학적인 변화는 육안으로 살펴보았을 때, DL0의 식이투여가 아토피 피부염 증상을 완화시키는 것을 확인하였음

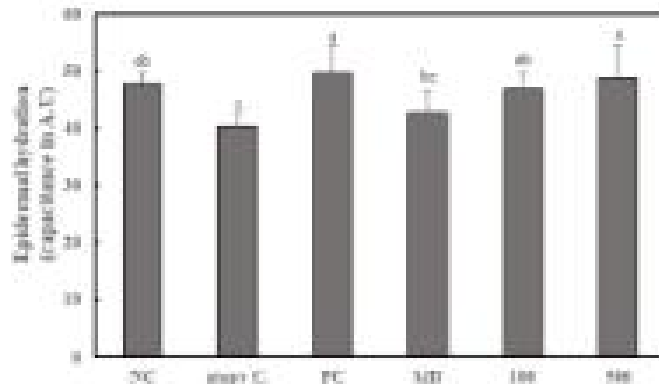


**Fig. 5. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on macroscopic morphological change of the back in mice.**

NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w..

### ③ 경표피 수분량 측정

- 황칠나무 잎 물추출물의 섭취에 따른 경표피 수분량 측정 결과는 Fig. 6에 나타내었음
- 피부는 표피, 진피 및 피하지방의 세 개의 층으로 구성되어 있으며, 표피의 가장 외층인 stratum corneum 층은 외부의 침범에 대한 방어벽으로 작용할 뿐만 아니라, 피부 내 수분량을 적절하게 유지시키는 역할을 함
- 아토피 피부염 환자 피부의 표피에서 stratum corneum의 지질성분이 감소되고 이러한 결과로 피부건조와 각질생성이 증가되고 가려움에 의해 긁음으로서 표피 층 손상이 일어나 더욱 그 현상이 악화됨. 따라서 피부의 수분함량은 아토피 피부염 유발 정도를 평가하는 지표로 사용됨
- NC군은  $47.75 \pm 20.2$  A.U인 반면, atopy C.군은  $40.50 \pm 2.41$  A.U으로 표피 수분 함량이 유의적으로 감소되었음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- 반면, PC, 100, 500에서 표피 수분함량이 atopy C.군과 비교하였을 때 각각 22.84%, 16.05%, 20.74% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음( $P < 0.05$ ).
- 따라서 DL0의 식이섭취를 통해 효능이 유의적으로 증가되었음을 확인하였음



**Fig. 6. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on epidermal hydration of skin in mice.**

NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w.. Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

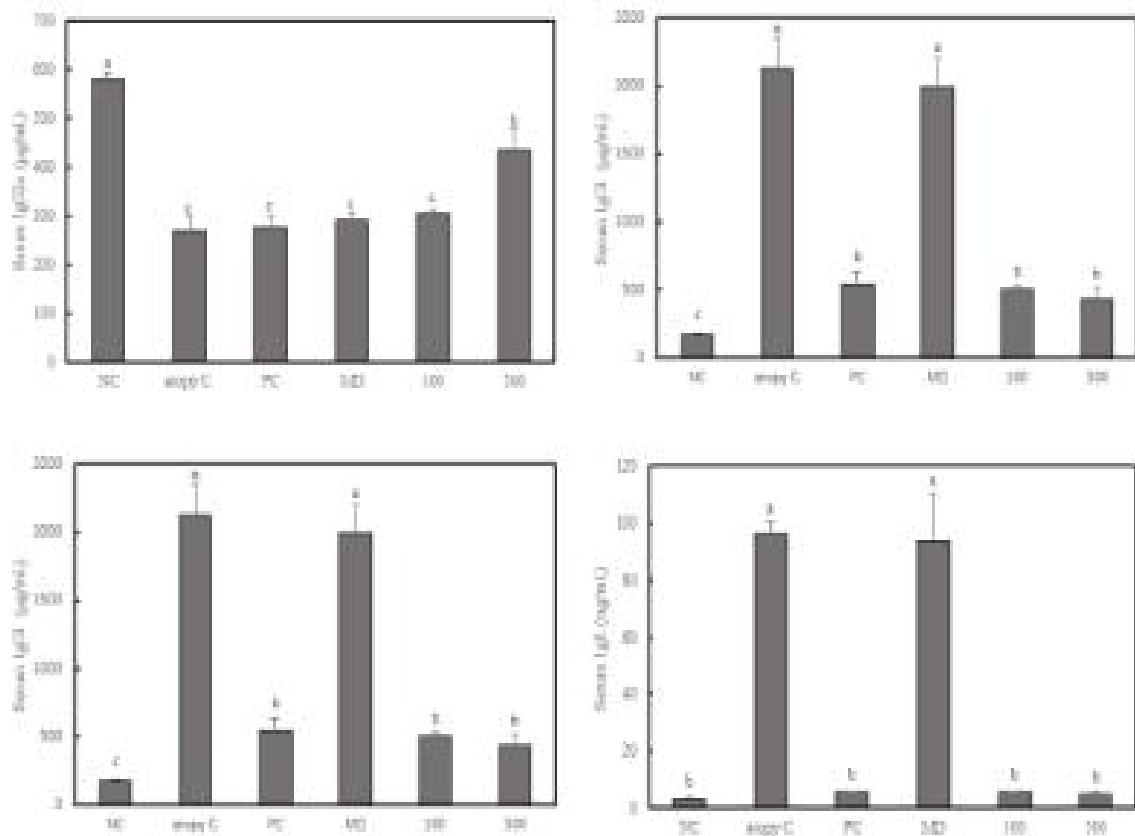
### ④ 혈중 면역글로불린 및 히스타민 농도 변화

- 알레르겐에 노출되게 되면 B 세포가 IL-4에 의해 IgM이 IgG와 IgE으로 isotype switching이 일어나게 되어 mast cell과 결합하여 자극시킴으로서 활성화시킴
- 본 연구에서는 IgE, IgG1과 Ig2a의 혈중 농도를 비교하여 알레르겐 반응을 확인하였음(Fig. 7)
- 혈중 IgG2a의 농도는 NC군에 비해 atopy C.군에서 유의적으로 감소한 것을 확



인하였음( $P<0.05$ )

- PC, MD, 100군은 atopy C.군에 비해 유의적인 차이가 없었고, 500군은 atopy C.군에 비해 62.62% 유의적으로 증가하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- 혈중 IgG1과 IgE의 농도는 NC군에 비해 atopy C.군에서 유의적으로 증가하였음을 확인하였음( $P<0.05$ ). MD군의 혈중 IgG1, IgE의 농도는 atopy C.군에 비해 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음
- 혈중 IgG1 농도는 PC, 100, 500군은 atopy C.군에 비해 74.41%, 76.24%, 79.64% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- 혈중 IgE 농도는 PC, 100, 500군은 atopy C.군에 비해 각각 94.45%, 94.52%, 95.24% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- 혈중 히스타민 농도는 NC군( $59.91\pm 7.87$  ng/ml)에 비해 atopy C.군( $77.43\pm 6.18$  ng/ml)에서 유의적으로 증가하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- MD 군과 100군은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었고, PC군과 500군은 atopy C.군에 비해 각각 15.74%, 16.58% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )



**Fig.7. Effect of *Dendropanax moribifera* leaf water extract on serum IgG2a, IgG1, IgE and Histamine production in Nc/Nga mice.**

NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w.. Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P<0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

⑤ T 세포 및 B 세포 증식능

- atopy C.군은 NC군과 비교하여 T 세포의 증식능( $62.01 \pm 2.64\%$ )은 유의적으로 감소하였고, B 세포의 증식능( $239.69 \pm 31.01\%$ )은 유의적으로 증가하였음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- T 세포 증식능은 atopy C.군에 비해 PC, 100, 500군에서 각각 25.16%, 31.86%, 40.53% 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, B 세포 증식능은 atopy C.군에 비해 각각 52.85%, 53.43%, 55.07% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- 본 연구에서 아토피에 의해 T 세포의 증식능 감소한 것으로 확인함으로써 T 세포의 정상적인 기능이 상실되었음을 예측할 수 있었으며, B 세포의 증가로 면역 글로불린의 과생성에 의해 IgE의 증가로 mast cell이 활성화되어 histamine 생성을 촉진시켜 가려움을 유발하고 염증을 유발시킨 것으로 보임

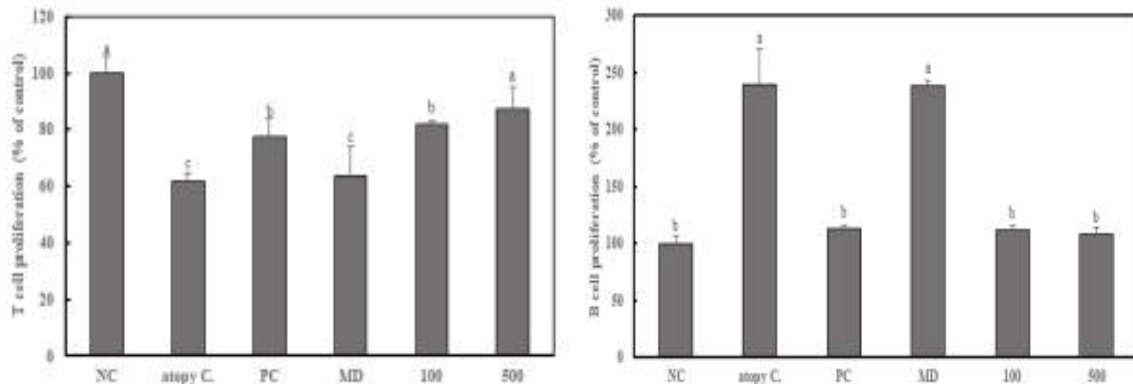


Fig. 8. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on T cell and B cell proliferation from primary splenocytes.

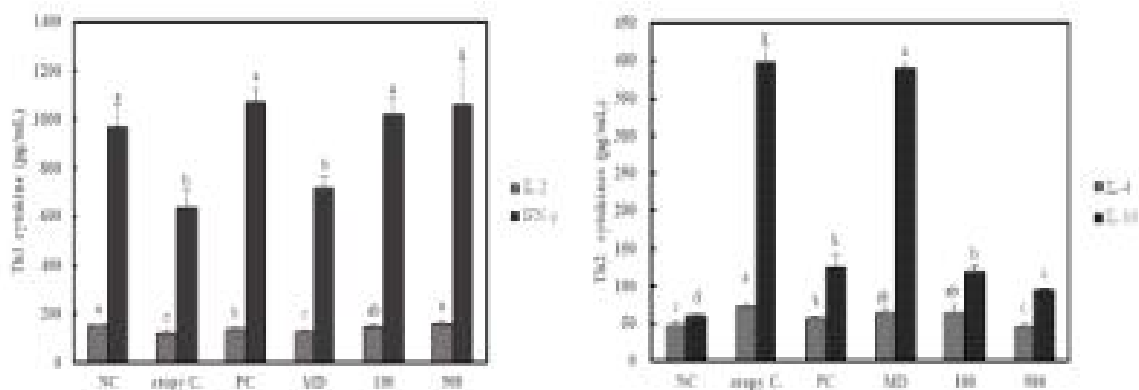
NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w.. Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

⑥ Th1 cytokien 생성 변화

- CD4+ Th1 세포에는 Th1 type cytokines을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있음
- Th1 type cytokine은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type cytokine은 B 세포의 활성을 자극시켜 항체 생산을 증가시키는 역할을 하는데, 이러한 Th1/Th2 type cytokine의 상호보완적인 조절에 의해 면역이 균형을 유지하게 되는데, 아토피 피부염 상태에서는 Th1 type cytokine은 감소되어 있고, Th2 type cytokine은 증가되어 있다고 보고되었음
- Th1 type cytokine으로는 IL-2, IFN- $\gamma$ 가 대표적인 것으로 NC에 비해 atopy C. 군에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였음( $P < 0.05$ )
- IL-2 생성량은 MD군은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었던 반면, PC, 100,

500군은 atopy C.군에 비해 각각 17.39%, 27.12%, 37.30% 유의적으로 증가하였음을 확인하였고, 특히 100과 500군은 NC군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음( $P<0.05$ )

- IFN- $\gamma$  생성량 또한 MD군은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였고, PC, 100, 500군은 atopy C. 군에 비해 각각 67.78%, 59.81%, 66.48% 유의적으로 증가하였고 이러한 증가는 NC군과 유의적인 차이가 없는 수준이었음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- 따라서 DL0의 식이 섭취가 감소된 Th1 type cytokine의 생성을 증가시켜 아토피 피부염 유발로 인한 cytokine 분비를 정상화 시켜줄 수 있을 것으로 사료됨
- Th2 type cytokines은 B 세포에서 면역글로불린의 생산을 자극시켜 면역을 활성화시키게 되고, Th1 type cytokine의 증가는 Th2 type cytokines을 감소시켜 조절하게 됨
- NC군과 비교하여 atopy C.군에서 Th2 type cytokines인 IL-4와 IL-10 모두 생성량이 유의적으로 증가되었음을 확인하였음( $P<0.05$ ). MD군의 IL-4와 IL-10 생성량은 atopy C.군과 유의적인 차이가 없었음을 확인하였음
- IL-4의 생성량은 PC, 100, 500군에서 atopy C.군에 비해 각각 20.78%, 9.23%, 36.01% 감소하였고, PC군과 500군에서 유의적인 차이가 있었음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- IL-10의 생성량은 PC, 100, 500군에서 atopy C.군에 비해 각각 68.48%, 69.87%, 76.15% 유의적으로 감소하였음을 확인하였음( $P<0.05$ )
- 따라서, PC 및 DL0의 식이 섭취가 아토피 피부염 유발로 인해 증가된 Th2 type cytokine 생성량을 감소시켜 아토피 증상을 완화시켜줄 수 있을 것으로 사료됨



**Fig.9. Effect of *Dendropanax morbiifera* leaf water extract on Th1 type cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ ) and Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) production from ConA-stimulated primary splenocytes.**

NC : normal control, atopy C. : AD control, PC: positive control, MD : dextrin 100 : DL0 100 mg/kg b.w, 500 : DL0 500 mg/kg b.w. Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P<0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

## (2) 결론

- 본 연구에서는 아토피 피부염 개선 소재 개발을 위하여 황칠나무 잎 물추출물(DL0)의 효능을 평가하였음
- 아토피 피부염 유발을 위해 NC/Nga mice에 1%DNCB를 총 4회 도포하였고, 식이는 AIN-93 식이를 기본으로 하여 DL0 100, 500 mg/kg b.w.을 투여한 후 경표피 수분량을 측정된 결과 atopy C.군에서 가장 낮았으며, DL0의 섭취를 통해 경표피 수분함량이 증가하였음을 확인하였음
- 식이 투여 후 혈액 내 면역글로불린과 히스타민 농도 변화를 측정된 결과, IgG2a의 생성은 atopy C.군에 비해 DL0 500 mg/kg b.w.군에서 유의적으로 증가하였음. IgG1, IgE 및 히스타민 생성은 atopy C.군에 비해 DL0 500 mg/kg b.w.군에서 유의적으로 감소하였음을 확인하였음
- DL0의 투여 후 splenocyte에서 T/B 세포의 증식능을 측정된 결과, T 세포 증식능은 NC군에 비해 atopy C.군에서 유의적으로 감소하였고, 식이 섭취가 감소된 T 세포 증식능을 증가시켜주는 것을 확인하였음. B 세포 증식능은 NC 군에 비해 atopy C.군에서 유의적으로 증가하였는데, 식이 섭취를 통해 증가된 B 세포 증식능이 감소되는 것을 확인하였음. 따라서 T/B 세포의 붕괴된 balance를 식이 섭취를 통해 정상화 되는 것을 확인하였음
- NC/Nga mice에 DL0 100, 500 mg/kg b.w.을 투여한 후 splenocyte에서 Th1/Th2 type cytokine 생성을 측정된 결과, Th1 cytokine인 IL-2, IFN- $\gamma$ 의 생성은 NC군에 비해 atopy C.에서 유의적으로 감소하였고, Th2 cytokine인 IL-4, IL-10의 생성은 NC군에 비해 atopy C.에서 유의적으로 증가하였음을 확인하였음
- 이와 같이 atopy C.에서 Th1/Th2 cytokine 분비가 불균형을 나타나게 되었고, 이러한 불균형은 식이 섭취를 통해 정상화 되는 것을 확인하였음
- 따라서, 본 연구의 결과에서 황칠나무 잎 물추출물(DL0)이 섭취가 아토피 피부염에서 나타나는 여러 가지 면역 조절 작용을 통해 아토피 피부염의 개선 효과가 있음을 확인하였음

## 다. 황칠나무 잎 물추출물의 아토피 피부염 개선 기작규명

### (1) 방법

#### ① 재료

HaCaT cell(keratinocyte)과 MC/9 cell은 각각 경기바이오 센터와 American Type Cultured Collection(ATCC; Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 실험하였음. High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS), PBS, penicillin-streptomycin, L-glutamin, sodium pyruvate, hepes, NEAA mixture은 Thermo scientiric(hyclone, thermo fisher scientific, MA, USA)에서 구입

하였고, gentamicin reagent solution은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였음. Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), human tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ), Interferon gamma(IFN- $\gamma$ )은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였음. 그 외의 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였음

## ② Western blot

HaCaT 세포를 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 overnight 하였음. 이후 배지를 제거하고 10 ng/mL TNF- $\alpha$ 와 10 ng/mL IFN- $\gamma$ 를 처리한 후 DL0을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL을 처리한 후 24시간 CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였음. 세포를 2~3회 DPBS로 세척한 후 350  $\mu$ L의 protease inhibitor 첨가된 lysis buffer를 넣어 조직을 균질화하여 ice에 두어 일정시간 유지 후 원심분리(12000rpm, 20분, 4 $^{\circ}$ C)하여 단백질을 분리하였음. 단백질 정량은 BSA와 Bio-rad protein assay Dye Reagent Concentrate(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 이용하여 Bradford법으로 정량하였음. Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE, 10%)을 이용하여 각 샘플당 20  $\mu$ L씩 loading하여 전기영동으로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질을 전이하였음. 그 후, TBST buffer에 용해시킨 5% skim milk(TBS containing 0.5% Tween 20)로 1시간 동안 blocking을 하였고, 1차 항체 JAK1, STAT1, phospho-STAT1, STAT6, 및 phospho-STAT6(Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)과 beta-actin(Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA) 상온에서 3시간 반응시킨 후 membrane을 HRP가 중합된 2차 항체(Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)에 60분간 반응시켰고, enhanced chemiluminescent(ECL, Amershampharmacia Biotech, UK)를 이용해 발색한 후 Easy photo를 사용하여 촬영하였음. 촬영된 Western blot band 이미지들은 Image J software(NIH, Bethesda, MD)를 사용하여 band의 밀도를 측정하였음

## ③ Real-time polymerase chain reaction에 의한 RANTES 및 MDC 측정

Keratinocyte인 HaCaT cell에 추출물을 처리하여 Chemokines(RANTES, MDC) mRNA expression 측정은 Keratinocyte (HaCaT cell)를 12 well plate에 각 well당  $2 \times 10^5$  cells/well을 500 $\mu$ L 씩 분주 후 TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)와 IFN- $\gamma$ (20 ng/mL)로 피부 과민성으로 자극시킨 후, 추출물을 처리한 후 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하고 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성한 후 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였다. cDNA는 각각 농도당 3개씩 PCR하여 평균값을 사용하였음. 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 normalization 하였음.

HaCaT cell을 TNF- $\alpha$ (20 ng/mL)와 IFN- $\gamma$ (20 ng/mL)로 자극하여 활성화 시킨 후, 추출물을 처리한 후 세포를 수집하여 RNA 추출과 cDNA를 합성한 후 추출물이 RANTES 및 MDC mRNA 유전자 발현에 관여하는지 관찰하였음

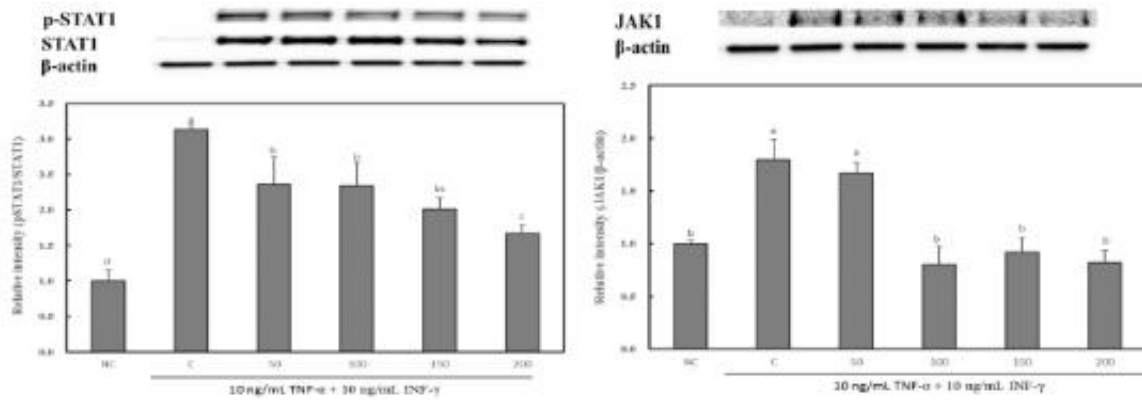
#### ④ 통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean $\pm$ SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성  $P < 0.05$ 수준에서 검정하였음

## (2) 결과

### ① 아토피 피부염 관련 JAK-STAT 신호전달에 미치는 영향

- Signal transducer and activator of transcription (STAT)1은 IFN- $\gamma$ 에 반응하는 Janus kinases(JAK)에 의해 발현되는 세포질 내 전사인자임. 세포질 내 영역에서 인산화된 JAK에 STAT이 결합하게 되고, STAT이 JAK에 의해서 다시 인산화됨. 인산화된 STAT은 homodimers나 heterodimers를 형성한 후 핵 내로 이동하고, specific DNA sequences에 결합하여 cytokine, chemokine과 같은 염증인자의 발현을 조절하게 된다고 알려져 있음
- MDC와 RANKL 생성에 관련있다고 알려진 JAK-STAT 신호전달 경로에 대한 황칠나무 잎 물추출물의 영향을 조사한 결과는 Fig. 9에 나타내었음
- pSTAT1/STAT1을 측정한 결과, TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control에서 약 1.8배 유의적으로 증가함을 확인하였음
- 황칠나무 잎 물추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, p-STAT1/STAT1의 발현이 control에 비해 유의적으로 감소하였음. 그러나 농도의존성은 나타나지 않았음
- JAK1을 측정한 결과, TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control에서 약 2.1배 유의적으로 증가함을 확인하였음
- 황칠나무 잎 물추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, Control에 비해 JAK1의 발현이 유의적으로 감소함을 확인하였으나 농도의존성은 나타나지 않았음



**Fig. 9. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on JAK-STAT signaling in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  stimulated HaCaT Cells.**

Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

② 아토피 피부염 관련 Chemokine(RANTES, MDC 및 TRAC)에 미치는 영향

- 아토피 피부염에서 RANTES(regulated on activation in normal T-cell expressed and secreted)는 eosinophil과 T세포의 이동과 활성화에 관여하는데 lymphocyte가 내피세포 표면에 부착되는 것을 유도하여 염증을 유발시킴
- MDC와 TRAC는 대표적인 Th2 chemokine으로 CCR4를 경유하여 염증부위로 Th2 세포의 이동과 침윤을 유도하는 것으로 알려져 있음
- RANTES 유전자 발현을 측정된 결과, TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control에서 약 2.7배 유의적으로 증가함을 확인하였음
- 황칠나무 잎 물추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, RANTES의 유전자 발현이 control에 비해 농도의존적으로 감소하였음. 그러나 50  $\mu$ g/mL의 농도를 처리 시 Control과 유의적인 차이는 나타나지 않았음
- MDC 및 TARC 유전자 발현을 측정된 결과, TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리하지 않은 NC에 비해 TNF- $\alpha$ +IFN- $\gamma$ 를 처리를 처리한 Control에서 각각 약 3.6, 약 3.4배 유의적으로 증가함을 확인하였음
- 황칠나무 잎 물추출물을 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL을 처리한 결과, MDC 및 TRAC 유전자 발현이 control에 비해 농도의존적으로 감소하였음

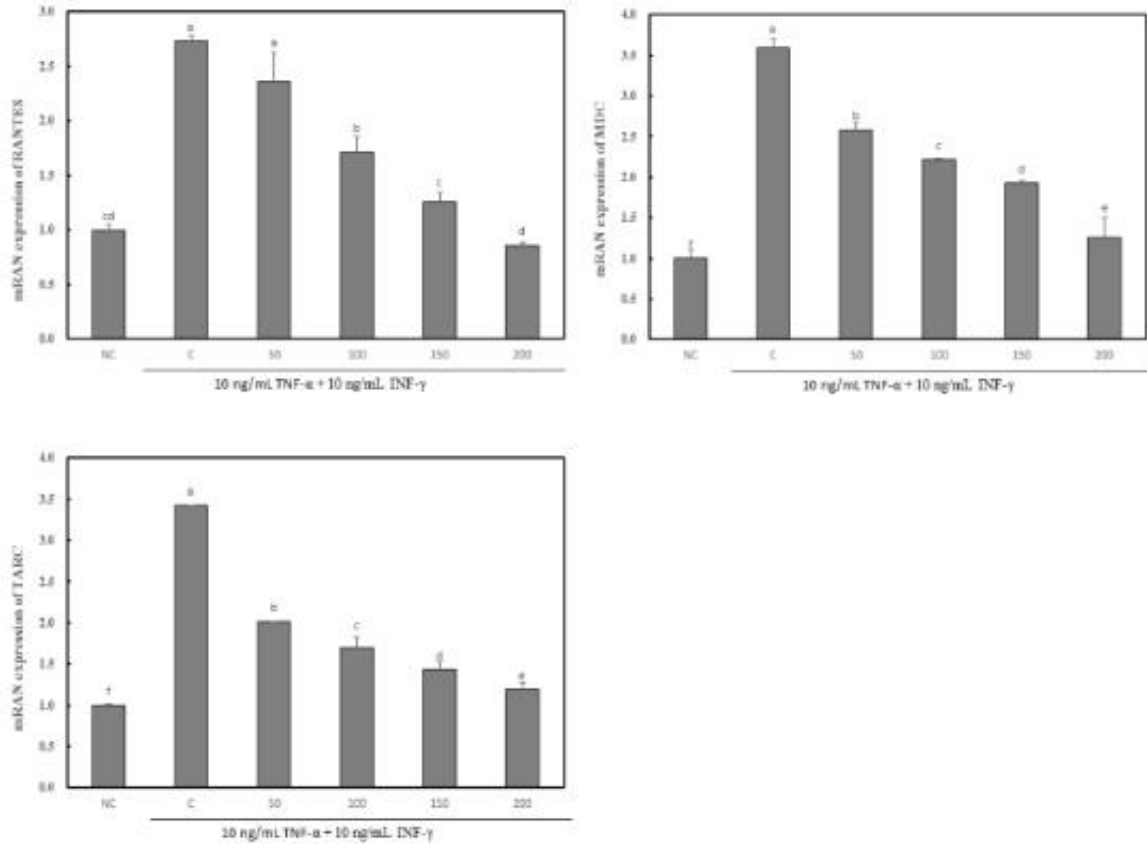


Fig. 10. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf water extract on mRNA expression of RANTES, MDC, and TARC in TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  stimulated HaCaT Cells.

Values are presented as means $\pm$ SD. Different letters show a significantly difference at  $P < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

### (3) 결론

- 황칠나무 추출물을 이용하여 아토피 피부염 억제 효과를 평가하기 위해 1차년도에서는 황칠나무 부위별, 용매에 따른 추출물을 *in vitro* 실험을 통해 screening 실험을 진행하였고, 그 결과 황칠나무 잎 물추출물(DL0)이 효과가 뛰어났음을 밝혔음
- 2차년도에서는 1차년도에 선정된 DL0을 이용하여 아토피 피부염 유발 모델인 NC/Nga mice를 통해 효능을 평가한 결과, DL0에서 아토피 피부염 개선에 긍정적인 효과가 있었음을 확인하였음
- 3차년도에서 어떠한 기전을 통해 DL0이 아토피 피부염을 억제하는지 평가를 진행하였고, 그 결과, Chemokine을 유발하는 JAK-STAT 신호전달 경로를 억제함으로써 아토피 피부염을 개선시키는 것을 확인하였음
- 따라서, 황칠나무 잎 물추출물이 JAK-STAT 신호전달 경로를 억제하여 chemokine의 분비를 억제시키고, 여러 가지 면역 조절 작용을 통해 아토피 피부염 개선 효과가 있는 것으로 보여짐



## 7. 황칠나무 추출물의 항치매 기능평가(공동연구기관 :연세대학교)

### 가. 황칠나무의 부위별 추출물 대상 라디칼 소거능 및 소재 독성 검사

#### (1) 방법

- 황칠나무 부위별 추출물(0, 20, 50% 주정추출)을 대상으로 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)법을 이용한 라디칼 소거능 측정  
: 각 시료의 자체 항산화능을 측정하기 위하여 DPPH법을 이용하여 각 시료의 라디칼 소거능을 측정함. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)시약 자체가 질소 중심의 라디칼 형태이며, 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정화된 상태로 존재하고 있음. 우선 DPPH시약을 100% ethanol에 녹인 후 517 nm에서 흡광도가 0.9~1이 되게끔 농도를 조절한 뒤 96-well plate에 5% DMSO에 녹인 시료(5, 10 mg/ml) 25  $\mu$ l와 DPPH시약 225  $\mu$ l을 넣고 plate reader기를 이용하여 흡광도 517nm에서 측정. 대조군은 시료대신 5% DMSO를 이용하였으며 양성 대조군은 ascorbic acid로 하였음
- 황칠 나무의 부위별 추출물(0, 20, 50 % 주정추출)을 대상으로 cell cytotoxicity 측정  
: 각 시료의 세포 독성을 보기 위해 WST 방법을 적용한 EZ-cytox kit(Daeilbio, Korea)를 이용하여 cell cytotoxicity를 측정함. PC12 cell(Rat adrenal pheochromocytoma cell line)을 대상으로 하여 시료의 독성을 측정함. 상기 독성검사를 기반으로 최대 활성, 유효 효능 및 저독성을 보인 시료를 각 과제별 최종시료로 선정하여 나머지 *in vitro* test를 실시함

#### (2) 결과

각 시료의 소재별 추출물(0, 20, 50% 주정추출)을 대상으로하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)시약을 이용하여 시료 자체의 라디칼 소거능을 측정하여 항산화 효과가 있다고 보여지는 시료를 선별함. 모든 시료는 5% DMSO에 녹여서 사용했으며, 양성 대조군은 라디칼 소거능이 높은 ascorbic acid(A.A)를 이용하였음. 그 결과 고농도(5 mg/ml) 에서는 전반적으로 에서 탁월한 라디칼 소거능을 보였으며 소재의 경우 가지 및 혼합 추출물에서 그 효능이 높았으며, 소재별 열수 추출물에 비해 주정추출물에서 소거능이 높은 것을 확인함(Fig. 1)

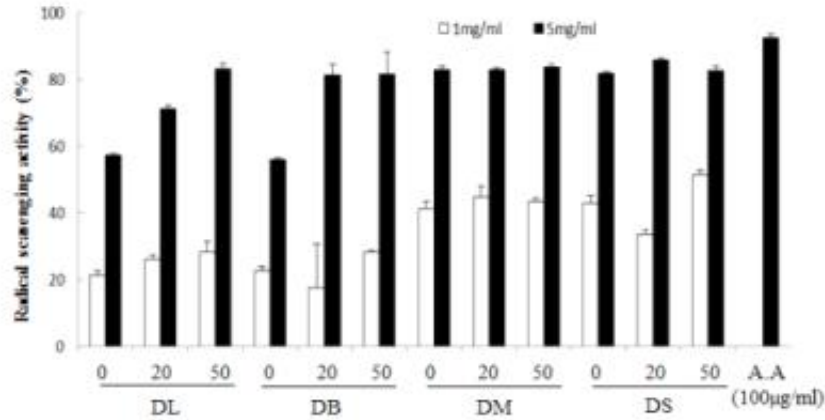


Fig. 1. Radical scavenging activity of samples.

DL: 황칠 잎 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DB: 황칠 가지 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DM: 황칠 잎 + 가지 혼합 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DS: 황칠 모목 추출물 (0, 20, 50% EtOH)

- 황칠 나무의 부위별 추출물(0, 20, 50% 주정추출)을 대상으로 cell cytotoxicity 측정 : 그 결과 고농도 시료 처리시 높은 세포독성을 보였으며 대부분 시료의 IC<sub>50</sub>은 1 mg/ml 농도의 시료 처리 시 나타나는 것으로 확인됨 따라서 시료의 효능 검증을 위해서는 위의 농도 이하에서 효능을 확인하고자 함(Fig. 2)

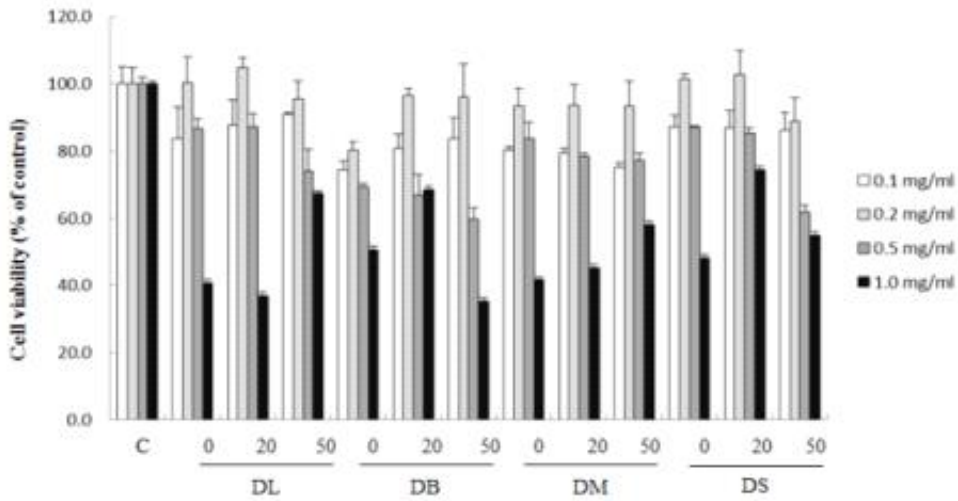


Fig. 2. Cell cytotoxicity of *Dendropanax morbifera*

DL: 황칠 잎 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DB: 황칠 가지 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DM: 황칠 잎 + 가지 혼합 추출물 (0, 20, 50% EtOH)  
 DS: 황칠 모목 추출물 (0, 20, 50% EtOH)

#### 나. 황칠나무의 부위별 추출물로부터 뇌세포 보호 효능 검색

##### (1) 방법

- ① Cell cytotoxicity 확인 후 저독성 시료의 농도 범위에서의 각 시료의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리에

의해 유발된 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과 검색함

: 신경 세포주인 PC12 cell 또는 Neuro2A cell을 antimicrotics/antibiotics, 10% horse serum 및 5% FBS를 함유한 RPMI-1640 배지 및 antimicrotics/antibiotics, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하고 96-well plate에 세포수가  $2 \times 10^5$  cell/ml가 되도록 seeding 한 후 16시간 지난 후에 각각의 시료(10ul/well)를 처리함. 시료 처리 후 16-24시간 뒤에  $400 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ 를 6 hr 처리하여 oxidative stress를 유도하여 소재의 보호효과를 측정함

② *In vitro* 상에서의 Neuro2A cell line을 이용하여 A $\beta$ 의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과 및 cell 내 oxidative stress protection system(SOD, catalase)의 활성 측정

: A $\beta$  peptide에 의해 유발되는 oxidative damage에 대하여 선정된 소재의 세포 보호 효과 및 세포내 oxidative stress protection system인 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT)의 활성 측정함. 우선 Neuro2A cell을 96-well plate에 세포수가  $2 \times 10^5$  cell/ml가 되도록 seeding 한 후 16시간 지난 후에 각각의 시료(10ul/well)를 처리함. 각각의 시료를 처리 한 후 16시간 뒤에 A $\beta_{25-35}$ (15  $\mu\text{M}$ )를 처리 후 48h 후에 cell viability를 EZ-cytox kit 이용하여 측정함

## (2) 결과

① 황칠나무의 부위별 추출물의 뇌세포 보호 효능 검색

: Cell cytotoxicity 확인 후 독성이 나타나지 않는 시료 농도 범위에서의 각 시료의  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리 및 A $\beta$  peptide에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과를 검색함. 실험 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리에 대한 시료별 효과 확인 결과, 200 ug, 500 ug/ml 시료 처리 시 보호효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 200 ug/ml의 시료 처리 시 효과가 높은 것을 확인하였음(Fig. 3). 위의 결과 및 A $\beta$  peptide에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과를 검색함. 실험 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리에 대한 시료별 효과 확인 결과 200 ug, 500 ug/ml 시료 처리 시 보호효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 200 ug/ml의 시료 처리 시 효과가 높은 것을 확인하였음(Fig. 3). 위의 결과에서 보호효과가 상대적으로 높게 나온 시료를 선별하여 A $\beta$  peptide에 의해 유발되는 산화적 스트레스에 대한 뇌신경 보호 효과를 검색함. 그 결과 황칠 잎 주정추출물에서 보호효과가 상대적으로 높게 나오는 것을 확인하였음(Fig. 4)

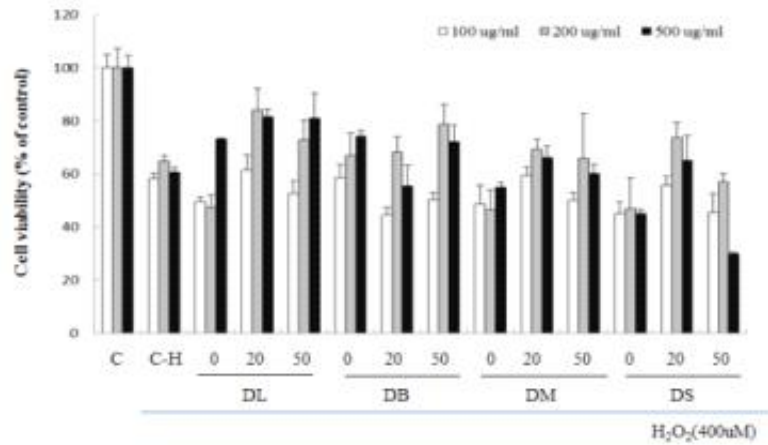


Fig. 3. Protection effects of *Dendropanax morbifera* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

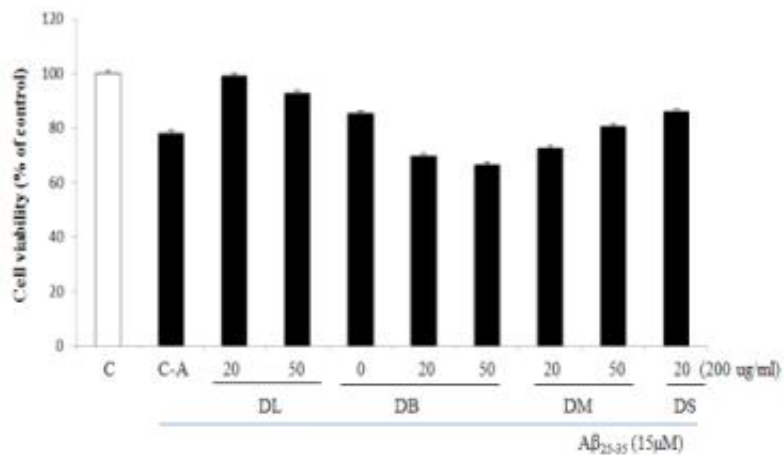


Fig. 4. Protection effects of *Dendropanax morbifera* against Aβ-peptide

② 선정된 시료 대상 *in vitro* 상에서의 Aβ peptide의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과 확인

: *In vitro* 상에서의 Aβ의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과 및 cell 내 oxidative stress protection system(SOD, catalase)의 활성능 측정함. 우선 Aβ peptide에 의해 유발되는 oxidative damage에 대하여 선정된 소재의 세포 보호효과를 확인 결과 황칠 잎 주정 추출 시료에서 세포 보호효과가 다른 선정 소재들에 비해 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었음(Fig. 4). 세포내 oxidative stress protection system인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성 측정한 결과 선정된 시료 중 황칠나무 잎 처리 군에서의 SOD 및 CAT활성 효과가 다른 시료 대비 높은 것을 확인하였음(Fig 5, 6)

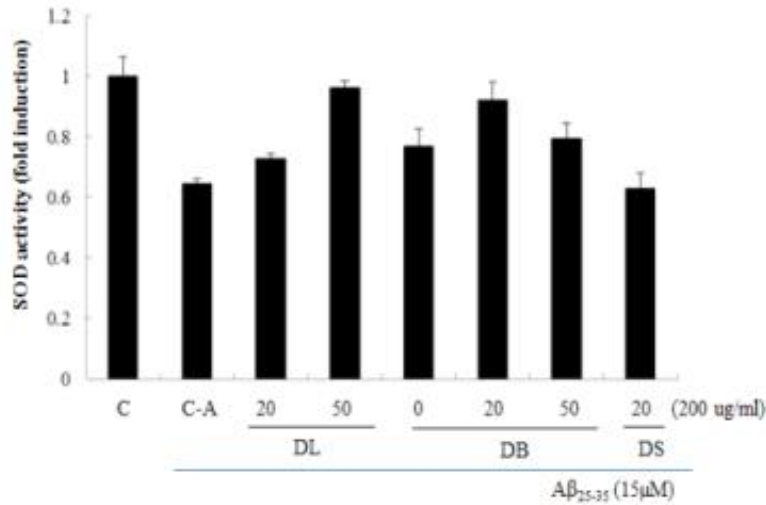


Fig. 5. Protection effects of *Dendropanax morbifera* against A $\beta$ -peptide: superoxide dismutase (SOD) activity

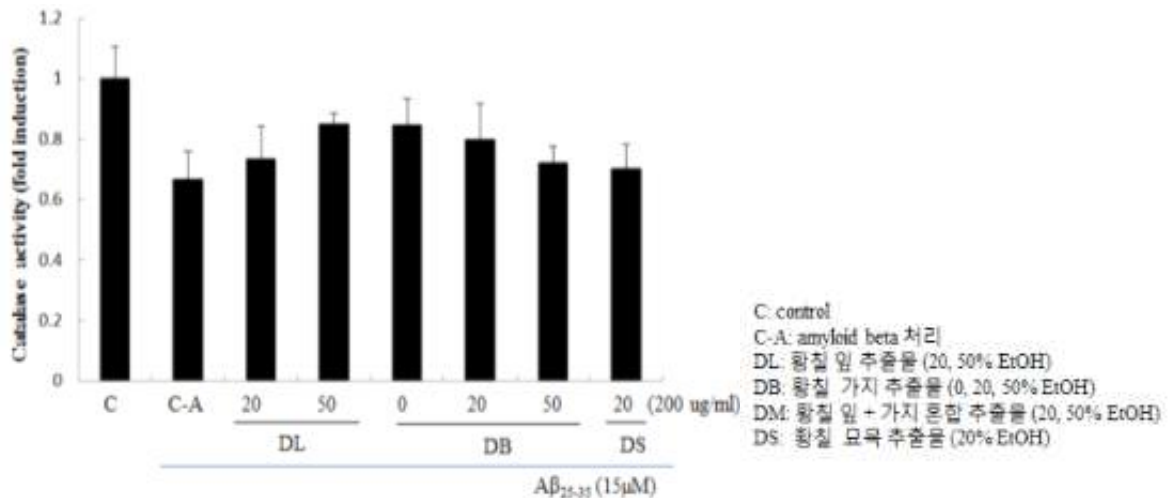


Fig. 6. Protection effects of *Dendropanax morbifera* extracts against A $\beta$ -peptide: catalase (CAT) activity

다. 황칠나무의 부위별 추출물 뇌세포 신호전달 분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 억제능 측정

(1) 방법

PC12 cell을  $1 \times 10^7$ /ml로 100 mm dish에 seeding 후 cell lysis buffer를 이용하여 cell lysate를 얻은 후 각각의 시료를 농도별로 처리 하여 AChE의 활성 억제 효과를 Ellman's method를 이용하여 확인함

(2) 결과

각 시료의 AChE의 활성 억제 효과를 Ellman's method를 이용하여 확인함. 50-500 ug/ml의 농도 순으로 각 시료 처리 시 주정 추출물에서의 AChE inhibition 효과가 높

은 것을 확인 할 수 있었음(Fig. 7) 세포의 독성이 낮은 농도를 감안하여 100 ug/ml의 농도에서의 AChE inhibition효과를 비교한 결과, 황칠나무 잎 주정추출물(20, 50% EtOH), 황칠나무 가지 추출물(0, 20, 50% EtOH) 및 황칠나무 묘목 물추출물(0% EtOH)에서 그 효능이 높은 것을 확인하여 후보 시료를 선정함

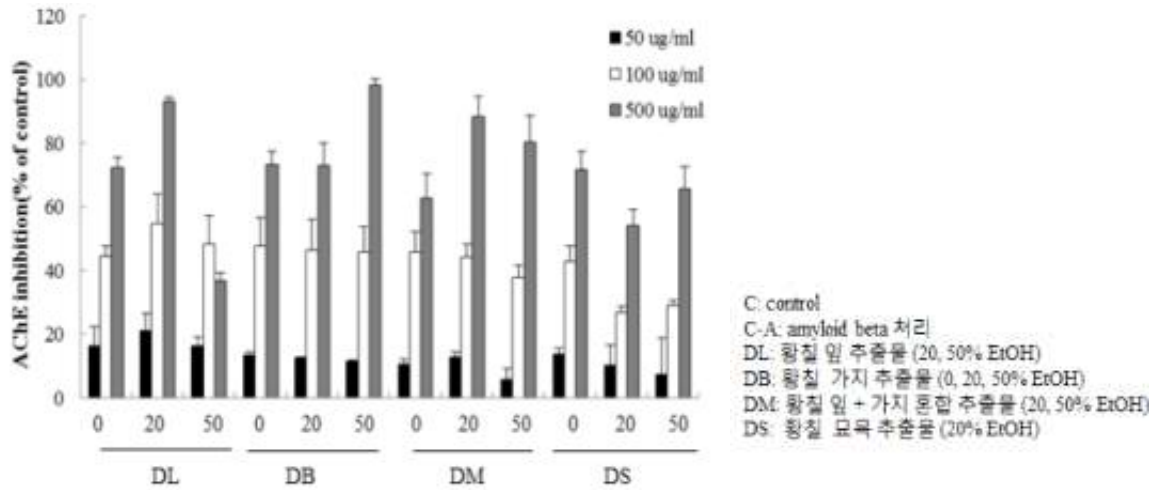


Fig. 7. Effects of *Dendropanax morbiifera* on AChE inhibition

#### 라. 선정된 황칠나무 시료의 neurite out growth 관련 인자의 발현 영향성 측정

##### (1) 방법

신경세포의 생존 및 신장과 관련된 인자들의 발현 정도를 mRNA level 및 protein level에서 확인함. 신경세포를 이용하여 신경세포의 신장 및 생존에 영향을 주는 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)는 mRNA level과 protein level에서의 발현정도를 확인 하였으며 신경세포 신장에 neurite growth maker인 NF-68(neurofilament-68)는 황칠 시료의 영향을 mRNA level에서 확인함. 신경세포에 선정된 황칠 시료 및 NGF (neuronal growth factor, positive control)를 3일간 처리 후 protein 및 mRNA를 수거 하여 관련 인자들의 발현 정도를 western blotting 및 PCR을 이용하여 확인함

Primer (5'-3')		
GAPDH	forward	GTGTTCCCTACCCCCAATGTGT
	reverse	GGAGACAACCTGGTCCTCAGT
BDNF	forward	TTGTTTTGTGCCGTTACCA
	reverse	GGTAAGAGAGCCAGCCACTG
NF-68	forward	TCTGGCTCTTTGATGCCAG
	reverse	TTTCCGACACCTCGTCCTTG

## (2) 결과

신경세포의 생존 및 신장과 관련된 인자들의 발현 정도를 mRNA level 및 protein level에서 확인함. 신경세포를 이용하여 신경세포의 신장 및 생존에 영향을 주는 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)는 mRNA level과 protein level에서, neurite growth maker인 NF-68 (neurofilament-68)는 mRNA level에서 확인함(Fig. 8-10). BDNF 발현의 경우 positive control인 NGF 처리군 대비 황칠나무 잎 주정추출물(50% EtOH) 와 황칠 가지 주정추출물(20% EtOH)에서 높은 것을 확인 할 수 있었으며 neurite growth 관련 인자의 경우도 유사한 양상을 확인 함. 이는 위의 두 소재가 신경세포의 발달 및 세포 보호에 효과가 있을 가능성이 있을 것으로 사료됨

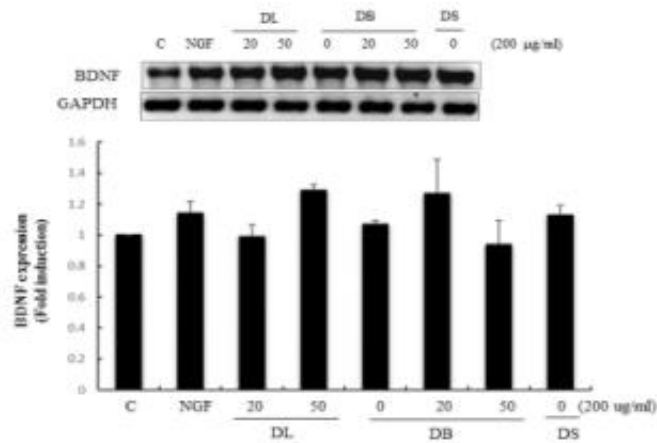


Fig. 8. Effects of *Dendropanax moribifera* on BDNF expression(mRNA level)

C: control /NGF: neuro growth factor (50 ng/ml)/DL: 황칠 잎 추출물 (20, 50% EtOH)/  
DB: 황칠 가지 추출물 (0, 20, 50% EtOH)/DS: 황칠 묘목 추출물 (0% EtOH)

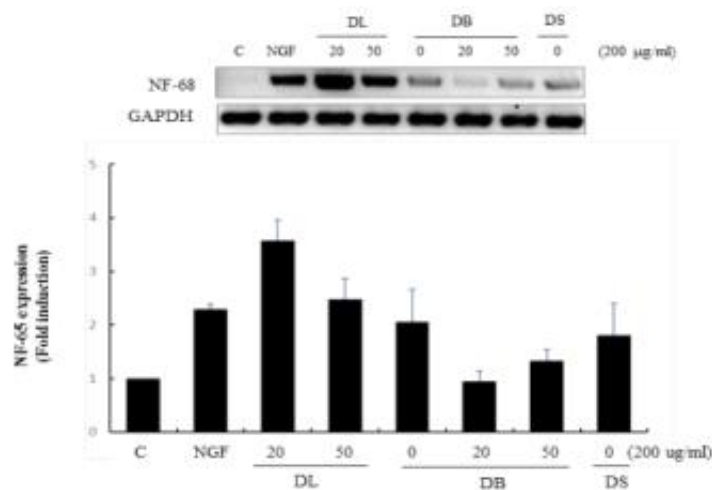


Fig. 9. Effects of *Dendropanax moribifera* on neurite growth (mRNA level)

C: control /NGF: neuro growth factor (50 ng/ml)/DL: 황칠 잎 추출물 (20, 50% EtOH)/  
DB: 황칠 가지 추출물 (0, 20, 50% EtOH)/DS: 황칠 묘목 추출물 (0% EtOH)

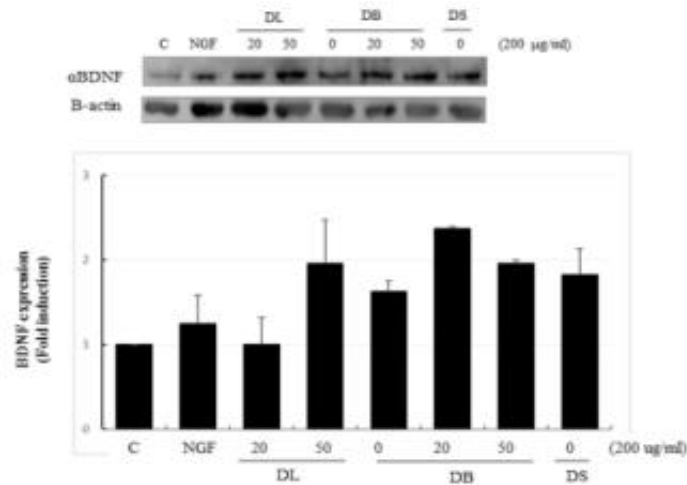


Fig. 10. Effects of *Dendropanax morbifera* on BDNF expression (protein level)

C: control / NGF: neuro growth factor (50 ng/ml) / DL: 황칠 잎 추출물 (20, 50% EtOH) / DB: 황칠 가지 추출물 (0, 20, 50% EtOH) / DS: 황칠 모목 추출물 (0% EtOH)

#### 마. 선정된 황칠나무 잎 추출물 대상 amyloid beta(A $\beta$ )-peptide에 대한 세포 보호효과 확인

##### (1) 방법

- 1차 년도 *in vitro* 연구에서 선정한 황칠나무 잎 20% 및 50% 주정추출물을 대상으로 *in vitro* 상에서의 활성 효능을 확인함

① Amyloid beta(A $\beta$ )-peptide 유발 세포독성에 대한 황칠나무 잎 추출물의 세포 보호 효과 확인

: Mouse neuroblastoma cell line(N2A)에 황칠나무 잎 20% 및 50% 주정추출물을 농도별로 처리 후 16시간 이후에 A $\beta$ -peptide를 처리 하고 48시간 뒤에 세포 생존율을 WST 방법을 적용한 EZ-cytox kit(Daeilbio, Korea) 이용하여 측정하여 보호 효능 확인함

② Amyloid beta (A $\beta$ )-peptide에 의해 생성된 세포내 ROS 소거 효소 활성 확인

: A $\beta$  peptide에 의해 유발되는 oxidative damage에 대하여 세포내 oxidative stress protection system인 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성 측정함. 우선 N2A 세포를 60 mm dish에 1x10<sup>6</sup>cell/plate되도록 seeding 후 16시간 지난 후에 각각의 시료를 농도별로 처리 하고 6시간 이후 A $\beta$ -peptide를 처리 한 후 30시간 이후 효소의 활성을 측정함

##### (2) 결과

선정된 황칠나무 잎 20% 및 50% 주정추출물을 대상으로 *in vitro*상에서 A $\beta$ -peptide에 대한 세포 보호효과 및 oxidative stress protection system인 superoxide



dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성을 측정 한 결과, 황칠나무 잎 20% 및 50% 주정 추출물 모두 농도별로 세포 보호 효과를 확인하였으며 아울러 세포내 항산화 효소의 활성이 A $\beta$ -peptide 처리 군에 비하여 증진되는 효과를 확인하였음

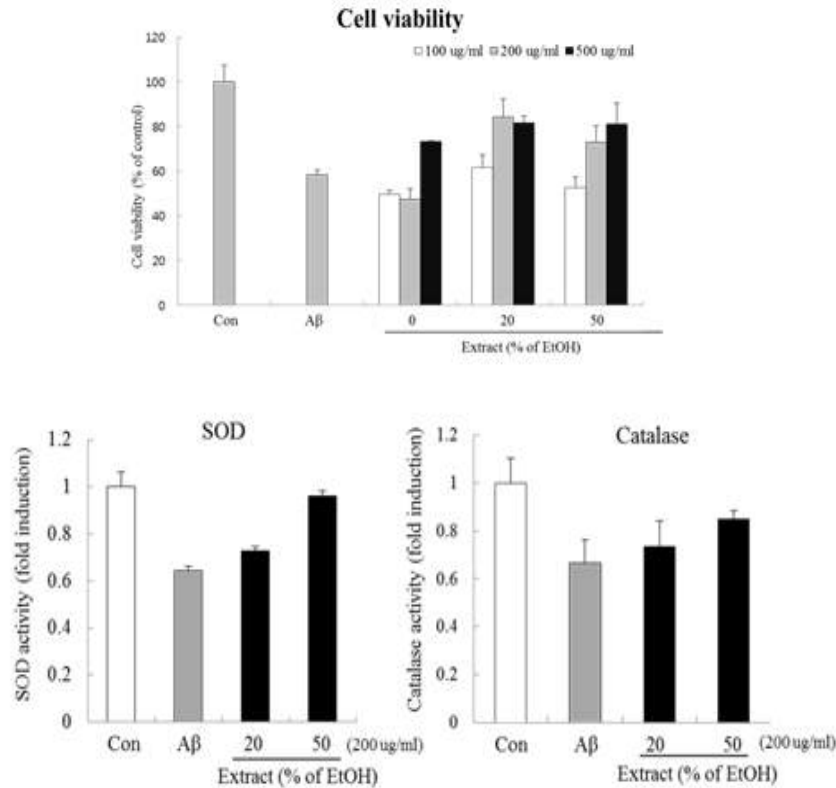


Fig. 11. Protection effects of *Dendropanax morbifera*(DM) against A $\beta$ -peptide

#### 바. 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 신경세포 성장인자(BDNF) 생성 조절 효과 확인

##### (1) 방법

- 예비로 선정된 황칠나무 잎 20% 및 50% 주정추출물 중 1차 년도 *in vitro* 실험에서 세포 독성이 낮고, 세포 보호효과 및 항산화 효소능 증진에 효과가 있는 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 최종 시료로 선정하여 신경세포 성장인자 (BDNF)의 생성 조절 효과를 protein level에서 확인함. 1차 년도 추출 부위 및 추출 분획별 신경세포 성장 인자(BDNF)의 생성 조절에 대하여 mRNA 수준에서 그 발현 정도를 확인한 결과 황칠나무 잎 추출물 처리 시 효능이 상대적으로 높게 나타난 것을 확인하였으므로, 이에 선정된 시료를 대상으로 하여 농도별 효능을 확인함
- N2a 세포를 60 mm dish에  $1\sim 2 \times 10^6$  cell/plate로 seeding 후 16시간 1% FBS-DMEM 배로 바꿔준 후 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 농도별로 처리 함. 이후 6시간 뒤에 A $\beta$ -peptide를 처리하고 약 48시간 처리함. 중간에 세포의 밀집도를 확인하고 media change를 하고 처리시간 이후 세포를 수거하여 western blotting을 실시함

## (2) 결과

- 신경세포의 생존 및 신장과 관련된 인자들의 발현 정도를 protein level에서 확인함. 신경세포의 신장 및 생존에 영향을 주는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor)의 발현 및 이에 관련된 CREB, p-CREB, TrkB, p-TrkB 등을 함께 확인하였음. 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 농도별 처리에 따라 A $\beta$ -peptide에 의한 세포내 BDNF의 낮은 생성 및 그와 관련된 인자들의 비정상적 발현이 일어나지 않도록 보호 또는 개선이 되는 것을 확인할 수 있었음

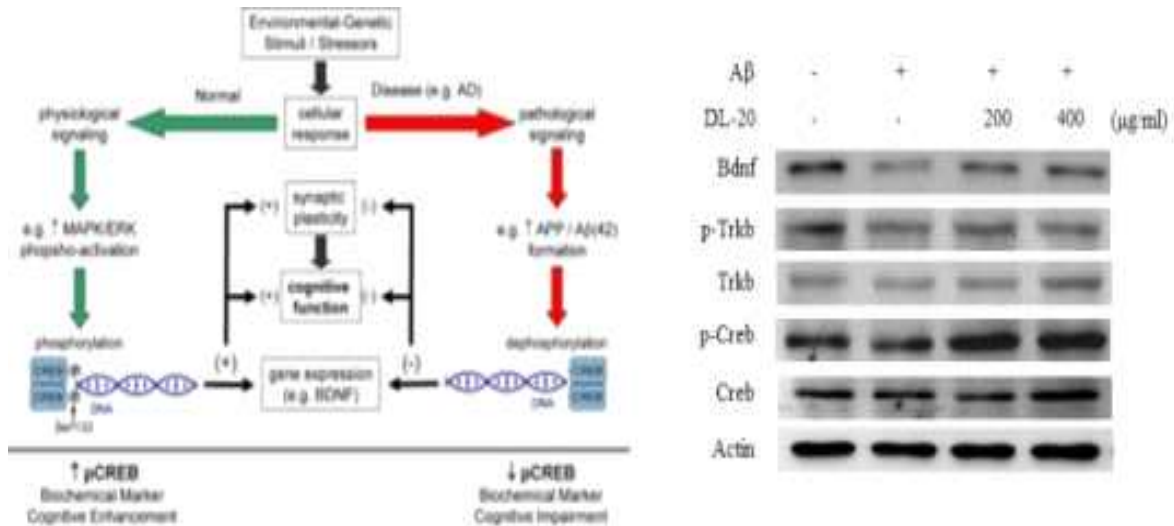


Fig. 12. Effects of *Dendropanax morbilifera*(DM) on BDNF expression and CREB-pCREB signaling

## 사. 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 amyloid beta(A $\beta$ ) peptide 생산 억제 확인

### (1) 방법

황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로 A $\beta$ -peptide의 생성을 억제 하는 능력을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행함. mouse neuroblastoma cell(N2a) 세포 및 amyloid precursor protein의 변이 form인 swedish amyloid precursor protein gene transfected -N2a stable cell line(NSW)을 이용하여 선정된 시료 처리 시, A $\beta$ -peptide의 생산 억제 효능에 대하여 western blotting을 이용하여 측정함. N2a 및 NSW 세포를 60 mm dish에 1~2x10<sup>6</sup> cell/plate 로 seeding 후 16시간 뒤에 1% FBS-DMEM 배지로 바꿔주고 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 농도별로 처리 함. 24시간 이후 세포 및 배지를 수거함. 이후 배지를 농축하여 western blotting을 실시하여 A $\beta$ -peptide의 생산 정도를 비교함

### (2) 결과

선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로 *in vitro*상에서의 A $\beta$ -peptide의 생

산억제 관련 효능을 확인하였음. N2a 세포 및 NSW 세포에 선정된 시료의 처리 시 세포 외로 유출된 A $\beta$ -peptide의 생산량을 비교한 결과, N2a에 시료를 처리 및 비처리군에서의 A $\beta$ -peptide의 생산을 비교한 결과 유의적으로 변화가 없었으나, swedish amyloid precursor protein gene이 transfection 되어 A $\beta$ -peptide의 과발현이 유도된 N2a 세포의 경우 선정 시료의 처리 비처리 군의 발현정도 비교 시, 시료 처리 군에서 A $\beta$ -peptide의 생성이 억제됨을 확인할 수 있었음. 따라서 A $\beta$ -peptide의 생성억제에 선정 시료인 황칠나무 잎 20% 주정추출물이 효능이 있는 것으로 판단됨

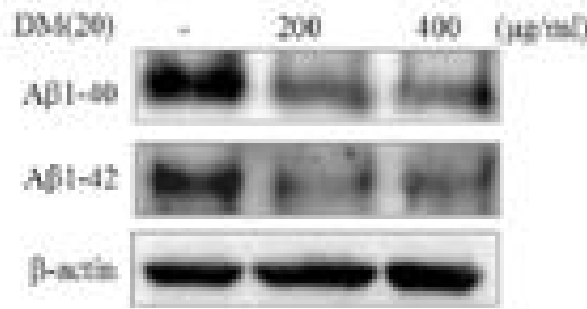


Fig. 13. Regulation effect of *Dendropanax morbifera*(DM) on A $\beta$  products

#### 아. 선정된 황칠나무 잎 추출물의 BACE-1( $\beta$ -secretase) 발현 억제 확인

##### (1) 방법

선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로하여  $\beta$ -secretase의 발현을 억제 하는 능력을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행함. Amyloid precursor protein의 변이 form인 swedish amyloid precursor protein gene transfected-N2a stable cell line (NSW)을 이용하여 선정된 시료 처리 시  $\beta$ -secretase의 발현 억제 효능에 대하여 western blotting을 이용하여 측정함. NSW 세포를 60 mm dish에  $1\sim 2 \times 10^6$  cell/plate 로 seeding 후 16시간 뒤에 1% FBS-DMEM 배지로 바꿔주고 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 농도별로 처리 함. 24시간 이후 세포 및 배지를 수거함. 이후 세포의 mRNA를 추출 하여 PCR을 통하여  $\beta$ -secretase 발현 정도를 비교함

##### (2) 결과

선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로 *in vitro*상에서의  $\beta$ -secretase 1, 2의 발현억제 관련 효능을 확인하였음. NSW 세포에 선정된 시료의 처리 시 세포 내에서 A $\beta$ -peptide의 생산과 연관이 있는  $\beta$ -secretase의 발현정도를  $\beta$ -secretase 1, 2으로 나누어 mRNA level에서의 변화를 비처리 군과 비교한 결과, 비처리 군에 비하여  $\beta$ -secretase 1(BACE1)의 경우 저농도(200  $\mu$ g/ml)부터 감소하는 경향을 보였으며,  $\beta$ -secretase 2(BACE 2)의 경우, 고농도 처리군에 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었음. 위의 결과로 보아, 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 처리가  $\beta$ -secretase의 발현에

도 영향을 주는 것으로 사료되며 이로 인해 A $\beta$ -peptide의 생성에도 영향을 주는 것으로 판단됨

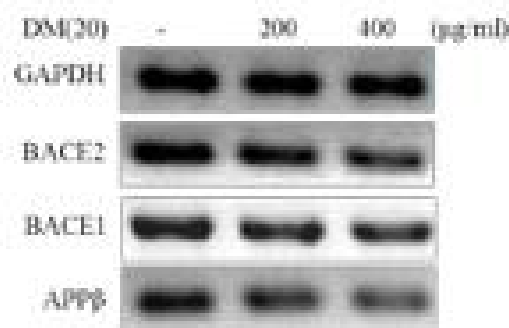


Fig. 14. Regulation effect of *Dendropanax morbifera*(DM) on  $\beta$ -secretase mRNA expression

### 자. 선정된 황칠나무 잎 추출물의 인지력 및 행동능력 증진 효과 확인

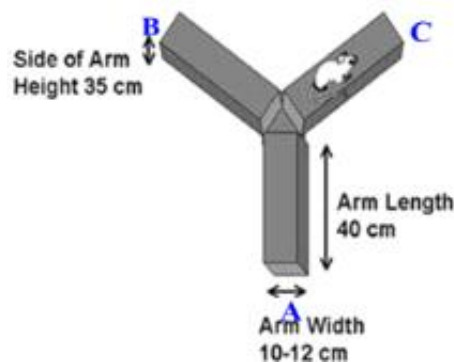
#### (1) 방법

선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로 A $\beta$ -peptide 처리한 동물모델을 이용하여 인지력 및 행동능력에 미치는 영향을 확인함

- 우선 A $\beta$  peptide 투여 농도를 확인하기 위해 C57/BL6-male mice (5주령)을 이용하여 식이와 물은 자유급식 하고 1주일 적응 후 뇌세포상해 유발성 물질인 A $\beta_{1-42}$ 을 이용 intracerebroventricular(ICV) injection을 통하여 치매 모델을 제작한 뒤 본 실험 기간과 같은 기간인 3주 후 행동실험을 Y-maze 방법을 이용하여 측정함
- 이후 황칠 나무 잎 추출물의 효능을 1차적으로 확인하기 위하여 예비실험 단계로 한 가지 농도만 처리 하여 위와 같은 방법으로 동물모델을 제작 후 약 2주간 투여하고 Y-maze test를 통하여 인지력 및 행동능력 증진 효과를 확인함

#### ① Y-maze test (인지능력평가)

: A $\beta_{1-42}$ 를 투여 후 기억력 개선 효과를 측정하기 위하여 Y자 미로를 이용하여 시행함. 암실에서 본 실험을 진행하기 1시간 전에 적응 시킨 후, Y자 미로에 실험동물을 넣은 뒤 8분간 동물이 지나간 arm을 측정하여 그 값을 계산하여 수치화함



## (2) 결과

선정된 시료 투여 전 A $\beta$ -peptide의 농도별 투여에 따른 인지능력 및 행동능력에 대한 영향을 확인하기 위하여 예비실험을 진행하였음. A $\beta$ -peptide를 37°C, 5일간 incubation 한 후 농도별로 ICV injection을 하여 모델을 제작함. 3주 후 Y-maze 방법을 통하여 인지력 및 행동능력에 대한 영향을 확인한 결과, 전반적으로 약 20% 또는 그 이상으로 인지능력이 저하됨을 확인할 수 있었음. 각 처리군 중 군 내 편차가 적으면서 영향이 있는 A $\beta$ -peptide 2.0  $\mu$ g/마리를 동물모델 제작 시의 처리 기준으로 정함 (fig. 5). 아울러 황칠나무 잎 추출물의 효능을 1차적으로 확인하기 위하여 예비실험 단계로써 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 약 2주간 투여 한 후 위의 실험을 통하여 얻은 농도로 A $\beta$ -peptide를 동물에 투여하여 치매 동물 모델을 제작한 후 Y-maze test를 진행하여 효능을 확인하였음. 그 결과 단일 농도 투여 (300 mg/Kg B.W)로 투여 기간이 짧았음에도 불구하고 인지능력이 증가됨을 확인할 수 있었음, 추후 위의 농도를 기준으로 하여 본 실험에서는 저농도, 고농도를 정하여 인지능력 측정 및 기작 연구를 진행하고자 함

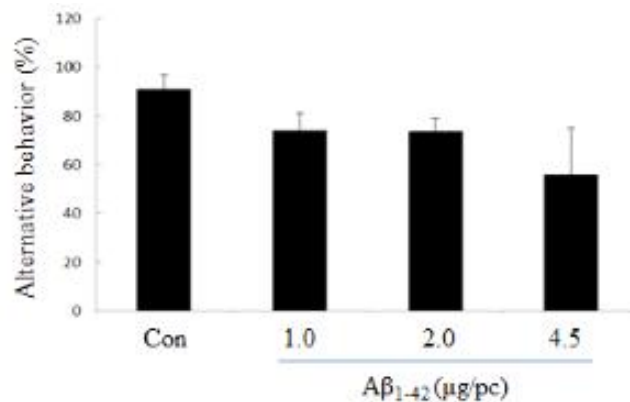


Fig. 15. Effects of A $\beta$ -peptide on spontaneous alternative behavior

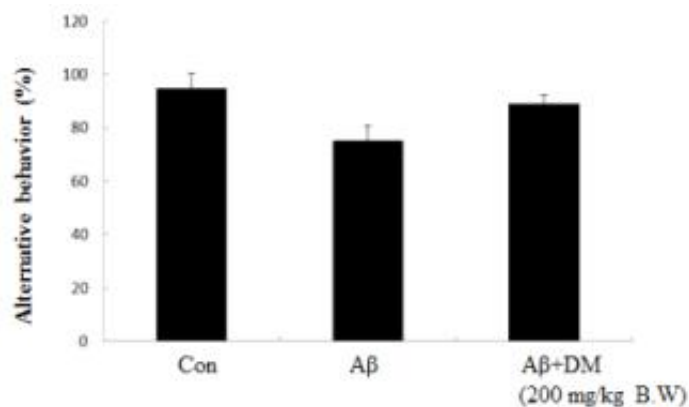


Fig. 16. Effect of *Dendropanax moribifera*(DM) on spontaneous alternative behavior

차. 동물모델에서 행동실험을 통한 선정된 시료의 인지능력 및 기억력 개선 효능 검토  
 2차년도 연구에서 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 효능을 치매 모델을 이용하여 인지능력 개선에 대한 효능 검토함

(1) 방법

- C57/BL6-male mice (5주령)을 이용하여 식이와 물은 자유급식 하고 1주일 적응 후 control, positive control 및 A $\beta$  투여군, A $\beta$  투여군, 시료 및 A $\beta$  복합 투여군으로 군분리 하였으며, 시료인 황칠나무 잎 20% 주정추출물(DL20)를 농도별 (100 mg/kg B.W, 300 mg/kg B.W)로 투여함. 이 때 positive control은 홍삼추출물(진세노사이드 10 mg/g)로 하였음. 추출물은 약 28일간 투여함
- 투여 후 21일째 되는 날 oligomer화 된 A $\beta$  peptide를 ICV injection 방법을 통하여 뇌에 투여하여 치매 동물모델을 제작함. 투여 4일 후에 Y-maze 및 passive avoidance test를 실시함
- 행동실험이 완료 되면 실험동물을 희생하여 기전 연구 및 분석을 위해 혈액 및 뇌조직을 채집해 놓음

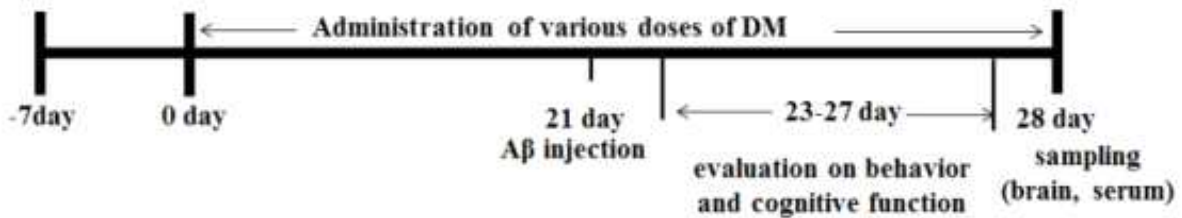


도표 1. 선정된 소재 대상 항치매 효능 검증 계획

① Y-maze test (인지능력평가)

: 인지능력 효과를 측정하기 위하여 Y자 미로를 이용하여 시행함. 암실에서 본 실험을 진행하기 1시간 전에 적응 시킨 후, Y자 미로에 실험동물을 넣은 뒤 8분간 동물이 지나간 arm을 측정하여 그 값을 계산하여 수치화함

② Passive avoidance test (기억력 평가)

: 기억력 개선 효과를 측정하기 위하여 passive chamber를 이용하여 측정함. 본 실험 진행 하루 전 암실에서 1시간 전에 적응 시킨 후 passive chamber를 이용하여 적응 훈련 및 전기 자극을 이용한 training을 진행함. 다음 날 비암실에 쥐를 넣고 암실로 들어가는 시간까지를 측정하여 그 값을 수치화함

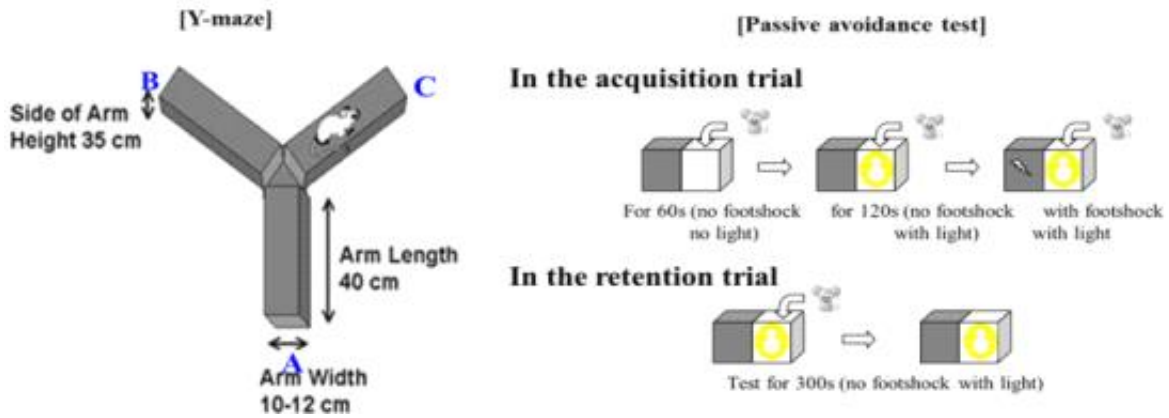


도표 2. 선정된 소재 대상 항치매 효능 행동 실험 방법 도표

(2) 결과

2차년도에 선정한 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 대상으로 하여 항치매 효능을 동물모델을 대상으로 검증하였음. 시료는 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 이용하여 농도별로 효능을 검토함. positive control은 홍삼추출물(진세노사이드 10 mg/g)으로 하였음. 유효성 평가는 t-test를 진행하였음

① 몸무게 변화

: 각 군당 몸무게의 변화는 대조군(control) 과 유사하게 나타났음. 시료가 몸무게 변화에 영향을 주지 않는 것으로 사료됨

Table 1. 몸무게 변화

		Initial	Final
Control		26.1±1.7	28.3±1.9
A β	control	26.2±1.4	28.2±1.1
	Dextrin	26.0±1.5	27.6±1.7
	DL20-200	26.1±1.0	28.2±0.9
	DL20-600	25.8±1.7	27.3±2.5
	RG	26.3±2.1	27.6±2.1

- Control: non-treatment
- Aβ-control: treatment of Aβ(2.0 μg/마리)
- Dex: Dextrin(300 mg/kg B.W.)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10 mg/g)(100 mg/kg B.W.)

② Y-maze test (인지능력평가)

: Aβ 투여 후 5일 뒤에 인지능력 검사를 위하여 Y-maze test를 수행하였음. 그 결과 Aβ 투여군과 텍스트린 복합 투여군의 경우 차이가 없었으며, 시료 투여군에서

는 개선되는 효능을 확인하였음. 따라서 인지능력에 대한 텍스트린의 영향은 없는 것으로 판단됨

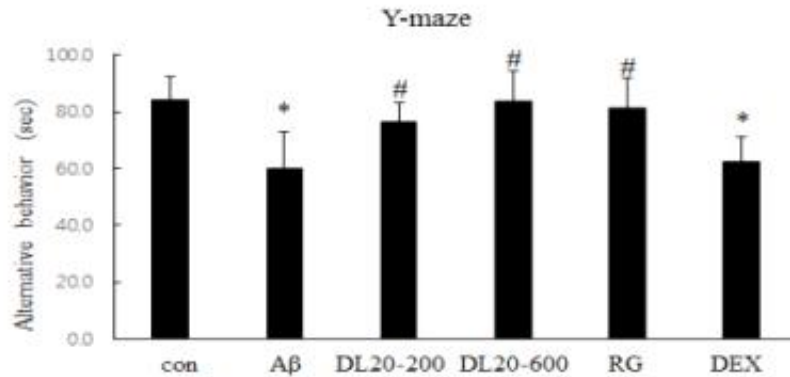


Fig. 17. Effect of *Dendropanax morbifera*(DM) on spontaneous alternative behavior

- \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs.  $A\beta_{1-42}$ -injected group.
- Control: non-treatment
- Aβ-control: treatment of Aβ(2.0 μg/마리)
- Dex: Dextrin(300 mg/kg B.W.)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10 mg/g)(100 mg/kg B.W.)

③ Passive avoidance test (기억력 평가)

: Y-maze test가 끝난 후 본 실험 전에 training을 통하여 passive chamber에 대한 적응 훈련 및 전기자극을 주어 passive chamber에서의 두려움을 선행 학습함. 이후 다음날, 전기 자극 없이 비암실에 쥐를 넣고 암실로 들어가기까지의 시간을 측정함. 그 결과 Y-maze의 결과와 유사한 양상으로 결과가 도출 되었음. Y-maze task와 마찬가지로 부형제로 들어간 텍스트린이 인지능력 뿐만 아니라 기억력에도 영향을 주지 못하는것으로 확인 됨. 그러므로 추후 결과에서는 텍스트린에 대한 분석은 진행하지 않았음

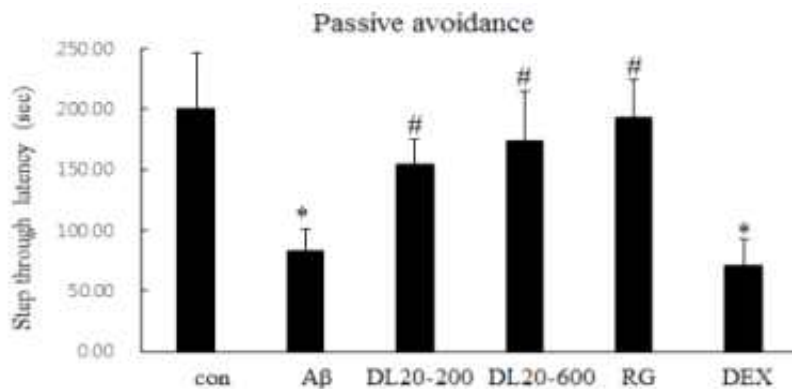


Fig. 18. Effect of *Dendropanax morbifera*(DM) on step-through latency in  $A\beta_{1-42}$  injected mice \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs.  $A\beta_{1-42}$ -injected group.

- Control: non-treatment



- A $\beta$ -control: treatment of A $\beta$ (2.0  $\mu$ g/마리)
- Dex: Dextrin(300 mg/kg B.W.)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10mg/g)(100 mg/kg B.W.)

#### 카. 동물모델 뇌조직에서의 선정된 시료의 신호전달 시스템 조절 개선 효능 평가

2차년도 연구에서 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 효능에 대한 신경세포 신호전달 시스템(cholinergic system)의 개선 효과 확인함

##### (1) 방법

###### ① 뇌세포 신호전달 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 측정

: 뇌조직 lysate를 이용하여 Ellman's method를 이용하여 acetylcholinesterase 활성 억제 측정 및 Acetylcholine 함량을 측정함. 채취한 brain에서 hippocampus를 분리하여 lysis buffer(10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100)를 이용하여 균질화 함. 균질화된 시료를 centrifugation 하여 상층액을 얻어 이를 대상으로 실험을 진행함

###### ② 뇌세포 신호전달 물질(acetylcholinesterase) 측정

: 뇌조직 lysate를 이용하여 acetylcholine 함량을 Vincent's method를 이용하여 측정함. 96 well에 lysate와 1% hydroxylamine를 넣고 15 min, 25°C에서 incubation 진행 후 250  $\mu$ l FeCl<sub>3</sub> 를 넣은 후 540 nm 파장에서 측정함

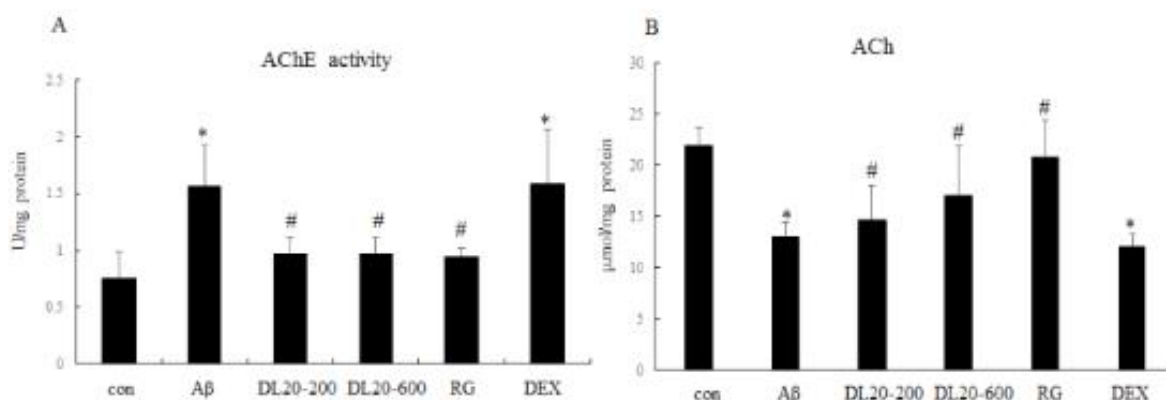
##### (2) 결과

###### ① 뇌세포 신호전달 분해효소(acetylcholinesterase, AChE) 억제능 측정

: 뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 AChE 활성 억제능을 측정한 결과 시료 처리군 모두에서 AChE 활성 억제 효과가 있는 것으로 확인되었음. 아울러 텍스트린 처리군의 경우, 인지능력 관련 실험 결과와 유사하게 A $\beta$  peptide 단독 처리군과 유사한 결과를 나타내었음. 이는 텍스트린이 관련 인자에 영향을 주지 않는다고 사료됨

###### ② 뇌세포 신호전달 물질(acetylcholine, ACh) 측정

: 뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 ACh 함량을 측정하였음. 그 결과 시료 처리군 모두에서 ACh 함량이 A $\beta$  peptide 처리 군에 비해 증가됨을 확인 할 수 있었음. 이는 선정된 시료가 AChE의 활성을 억제하여 ACh의 함량이 보존되는 것으로 사료됨



**Fig. 19. Effect of the *Dendropanax morbifera*(DM) on cholinergic system in Aβ<sub>1-42</sub>-injected mice** (A) acetylcholinesterase(AChE) activity and (B) the acetylcholine(ACh) content in AD mice model. The data are the mean ± SD (n = 8). \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs. Aβ<sub>1-42</sub>-injected group.

- Control: non-treatment
- Aβ-control: treatment of Aβ(2.0 μg/마리)
- Dex: Dextrin(300 mg/kg B.W.)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10 mg/g)(100 mg/kg B.W.)

#### 타. 동물모델 뇌조직에서의 선정된 시료의 항산화 시스템(antioxidant system) 개선 효능 평가

2차년도 연구에서 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 효능에 대한 항산화 효소인 SOD(superoxide dismutase), catalase 및 GSH(glutathione)의 활성 및 함량 개선 효과 확인함

##### (1) 방법

###### - 뇌세포의 항산화 시스템(antioxidant system) 개선 효능 평가

###### ① 뇌세포 내의 항산화 효소인 SOD, catalase 및 GSH 활성 개선 효과 측정

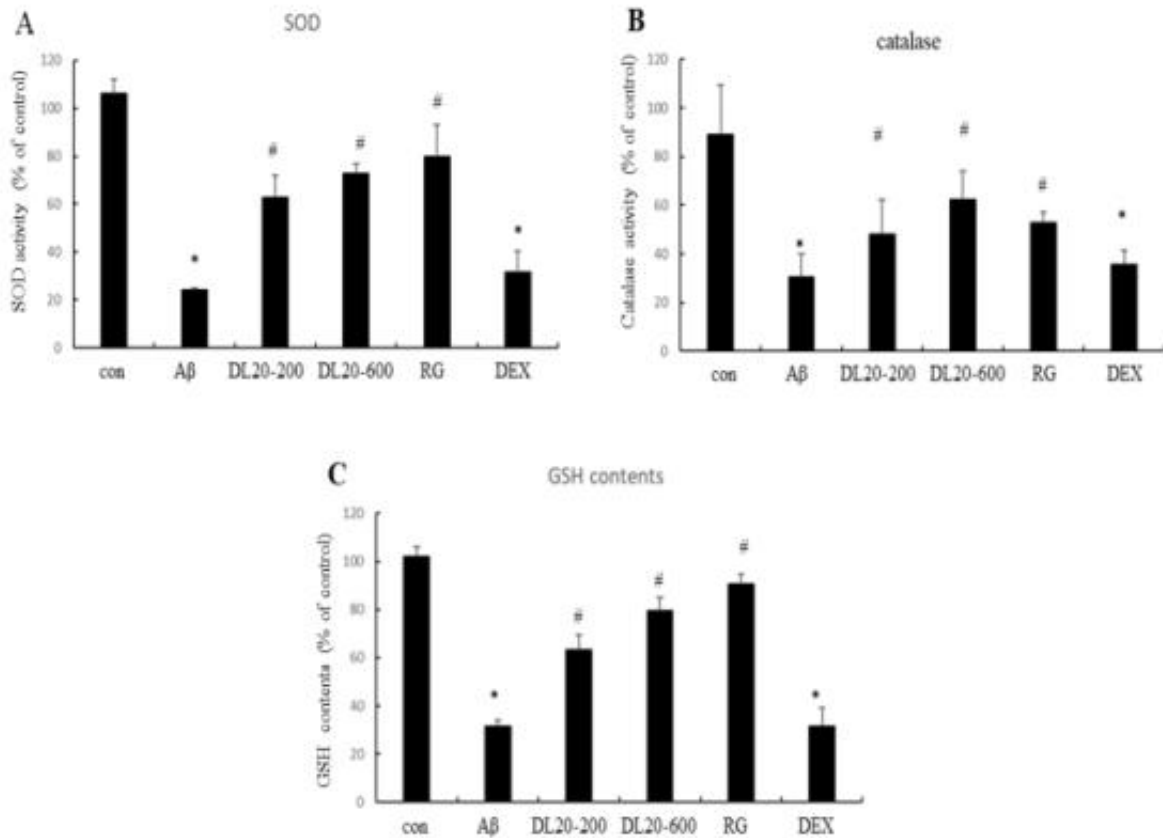
: 뇌조직 lysate를 대상으로 하여 GSH 함량은 Akerboom's method를 이용하여 측정하고, SOD 및 catalase의 활성은 Dojindo 및 Biovision에서 구입한 kit를 이용하여 측정함

##### (2) 결과

###### ① 뇌세포의 항산화 시스템(antioxidant system) 개선 효능 평가

: 뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 항산화 시스템 중 SOD, catalase 효소 활성 및 GSH 함량을 측정된 결과 시료 처리 군에서 개선 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 이중 고농도(300 mg/ kg B.W.)를 처리한 군의 경우 positive control인 홍삼추출물을 처리한 군과 유사한 활성 개선을 보이는 것으로 확인되었음. 아울러 텍스트린 처리군의 경우, 인지능력 관련 실험 결과와 유사하게 Aβ peptide 단독 처리

군과 유사한 결과를 나타내었음. 이는 덱스트린이 관련 인자에 영향을 주지 않는다고 사료됨



**Fig. 20. Effect of the *Dendropanax morbilifera*(DM) on antioxidant system in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected mice** (A) SOD(superoxide dismutase) activity, (B) catalase activity (C) GSH(glutathione) contents in AD mice model. The data are the mean  $\pm$  SD (n = 8). \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs. A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected group.

- Control: non-treatment
- A $\beta$ -control: treatment of A $\beta$ (2.0  $\mu$ g/마리)
- Dex: Dextrin(300 mg/kg B.W.)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extrac (containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10 mg/g)(100 mg/kg B.W.)

#### 파. 동물모델 뇌조직에서의 선정된 시료의 뇌세포 신장 물질 및 관련 signal에 대한 영향 평가

2차년도 연구에서 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 및 연관 signal 인 CREB(cyclic-adenosine monophosphate response element binding protein)-pCREB에 대한 영향을 확인함

##### (1) 방법

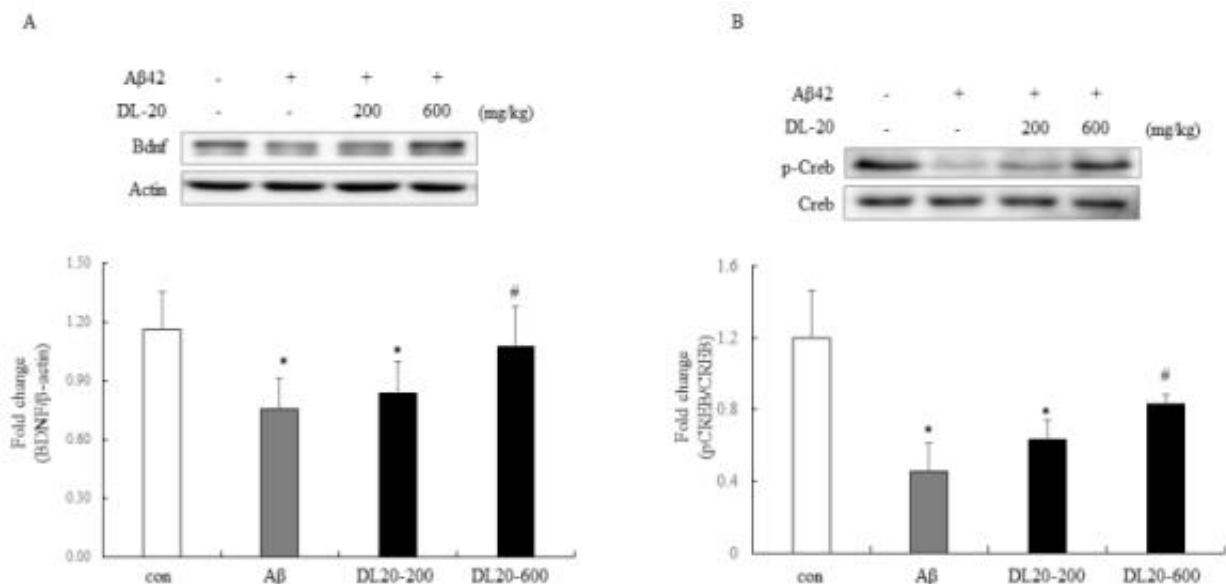
선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 뇌신경세포 성장인자(BDNF)의 생성 조절

효과 및 CREB-pCREB signal의 영향을 protein level에서 western blotting을 이용하여 hippocampus 부분을 대상으로 측정함. Hippocampus를 lysis buffer(0.5% triton X-100, 20 mM HEPES(pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM DTT, and 1 mM PMSF를 이용하여 lysate를 만듦. 이후 8% 또는 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리 후 nitroceluose membrane에 transfer를 진행함. 이후 membrane을 5% (w/v) non-fat Difco™ skim milk blocking buffer로 1시간 처리 후 BDNF(Abchem), CREB(Santacruz Biotechnology), Phosphate-cyclic-adenosine monophosphate response element binding protein(p-CREB, Abchem) and  $\beta$ -actin(Sigma Aldrich) antibody들을 1:1000 또는 1:500으로 하여 4°C에서 O/N 처리함. 2차 항체를 horseradish peroxidase-conjugated antibody를 1시간 처리한 후 Enhanced Chemiluminescence System(Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 발현을 확인함

## (2) 결과

### ① 뇌세포의 항산화 시스템(antioxidant system) 개선 효능 평가

: 뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 뇌신경 세포 성장인자 (BDNF)의 생성 조절 효과 및 CREB-pCREB signal의 영향을 protein level에서 western blotting을 이용하여 hippocampus 부분에서 측정하였음. 그 결과 시료 처리군 모두에서 BDNF-CREB signal의 개선 효과가 나타남을 확인할 수 있었음. positive control 인 홍삼추출물 처리군 및 텍스트린 처리군의 경우 시료의 부족으로 측정할 수 없었으나 위의 다른 결과와 유사할 것으로 사료됨



**Fig. 21. Effect of the *Dendropanax morbilifera*(DM) on BDNF level and CREB-pCREB signaling in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected mice** The relative expression levels of BDNF(A) and pCREB(B) in the hippocampus were determined by densitometry and normalized by  $\beta$ -actin and CREB. The data are the mean  $\pm$  SD (n = 5). \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs. A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected group.

- Control: non-treatment
- A $\beta$ -control: treatment of A $\beta$ (2.0  $\mu$ g/마리)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)

하. 동물모델 뇌조직에서의 선정된 시료의 BACE-1(beta secretase-1) 의 활성 측정  
 - 2차년도 연구에서 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 A $\beta$  peptid 생산에 관여하는 BACE-1( $\beta$ -secretase)의 활성 측정

(1) 방법

선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 BACE-1 활성에 대한 효능을 ELISA kit를 이용하여 hippocampus lysate를 대상으로 측정함. Hippocampus를 PBS buffer(1 mM PMSF)를 이용하여 lysate를 만든 후 kit를 이용하여 측정함

(2) 결과

뇌 조직의 lysate를 대상으로 하여 선정된 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 BACE-1 활성 효능에 대해 hippocampus 대상으로 하여 ELISA kit를 이용하여 측정함. 그 결과, 대조군 및 A $\beta$  처리군, 시료 처리군과의 유의적 차이가 없었음을 확인할 수 있었음. 이는 외부에서 임의적으로 처리한 A $\beta$  peptid가 조직 내의 A $\beta$  peptid 생성 signal에는 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료됨. 또한 시료처리에 따른 영향도 크지 않는 것으로 사료됨

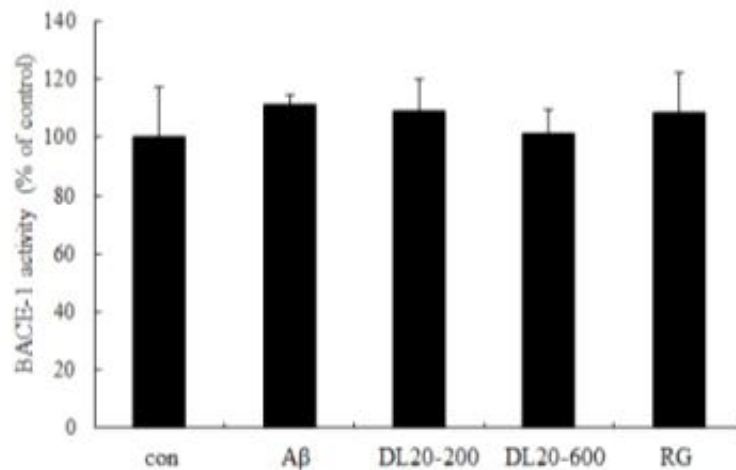


Fig. 22. Effect of the *Dendropanax morbifera*(DM) on BACE-1 activity in A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected mice. The data are the mean  $\pm$  SD (n = 5). \*  $P < 0.05$  vs. control. #  $P < 0.05$  vs. A $\beta$ <sub>1-42</sub>-injected group.

- Control: non-treatment
- A $\beta$ -control: treatment of A $\beta$ (2.0  $\mu$ g/마리)
- DL20-200: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(200 mg/kg B.W.)
- DL20-600: DL 20% EtOH extract(containing 50% Dextrin)(600 mg/kg B.W.)
- RG: Red ginseng extract(ginsenoside 10 mg/g)(100 mg/kg B.W.)

### (3) 결론

본 연구에서는 1차년도에서 황칠나무의 각 추출물 대상으로 *in vitro*에서의 퇴행성 뇌질환과 관련된 다양한 인자들의 활성 등을 측정하고, 상기 연구 결과를 토대로 2차년도에서는 황칠나무 잎 추출물을 예비 선정 소재로 하여 *in vitro* 상에서 관련인자들에 대한 효능을 검토 하여 황칠나무 잎 20% 주정추출물을 선정하였음. 이를 토대로, *in vivo*상에서의 행동실험 등의 예비 실험을 통해 기능성을 검토하였음. 3차년도에서는 치매 동물모델을 대상으로 항치매 효능평가 검증을 위한 실험을 진행하여 인지능력 기억력 개선 효과가 있음을 확인하였으며, 관련 인자들에 대한 기작 연구를 통하여 선정시료가 A $\beta$  peptide에 의해 손상 또는 비정상적인 기전들에 대하여 보호 효과 및 개선 효과를 보이는 것으로 확인하였음. 이는 황칠나무 잎 20% 주정추출물이 퇴행성 뇌질환에 대한 개선의 효과를 보이는 것으로 사료되고 따라서 위 소재는 퇴행성 질환 유발 기억력 및 인지능력 개선 등에 대한 기능성 소재로서의 효용성이 있을 것으로 사료됨

## 8. 황칠나무 추출물의 면역증강 기능평가(공동연구기관 : 울산대학교)

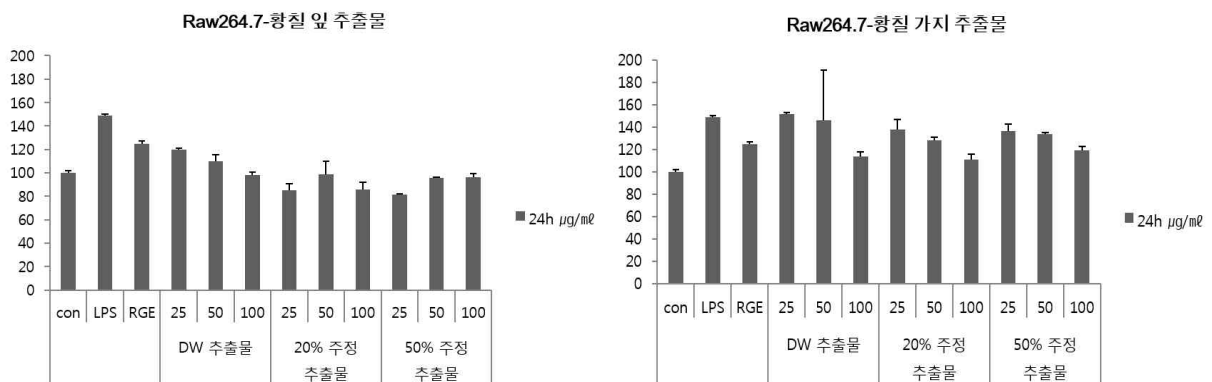
### 가. 면역세포에 황칠나무 추출물 처리 후 독성평가

#### (1) 방법

- 면역세포에서 황칠나무 추출물을 처리 했을 때 독성을 평가하기 위해서 WST-1 실험을 진행함
- 실험에 사용한 EZ-CYTOX는 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정함으로써 Cell Viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay 등에 사용함. 면역세포 Raw264.7 cell을 96well plate에 seeding하여 12h incubation 후 12종 추출물과 control (negative control), LPS-RGE(홍삼추출물)(positive control)을 treat 함. 24, 48h 후에 WST-1 assay를 이용하여 각각의 well의 cell viability 변화를 control과 비교하여 독성평가를 함

#### (2) 결과

##### ① 24시간



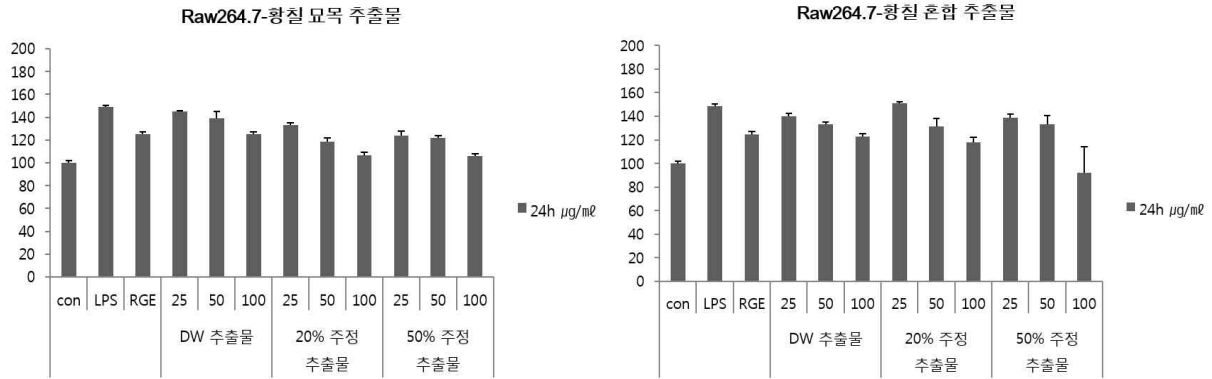


Fig. 1. Cell viability effects of DL, DB, DS, DM extracts during 24h in RAW264.7 cells.

DL; 황칠나무 잎 추출물, DB; 황칠나무 가지 추출물, DS; 황칠나무 묘목 추출물, DM; 황칠나무 혼합 추출물

- 면역세포에서 총 4개의 부위를 3가지의 추출용매를 사용하여 추출한 12종 추출물을 가지고 24시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타났으며 가지, 묘목, 혼합은 시중에 시판되고 있는 홍삼(RGE)와 비견할 정도로 성장이 높아진 것 나타났음

② 48시간

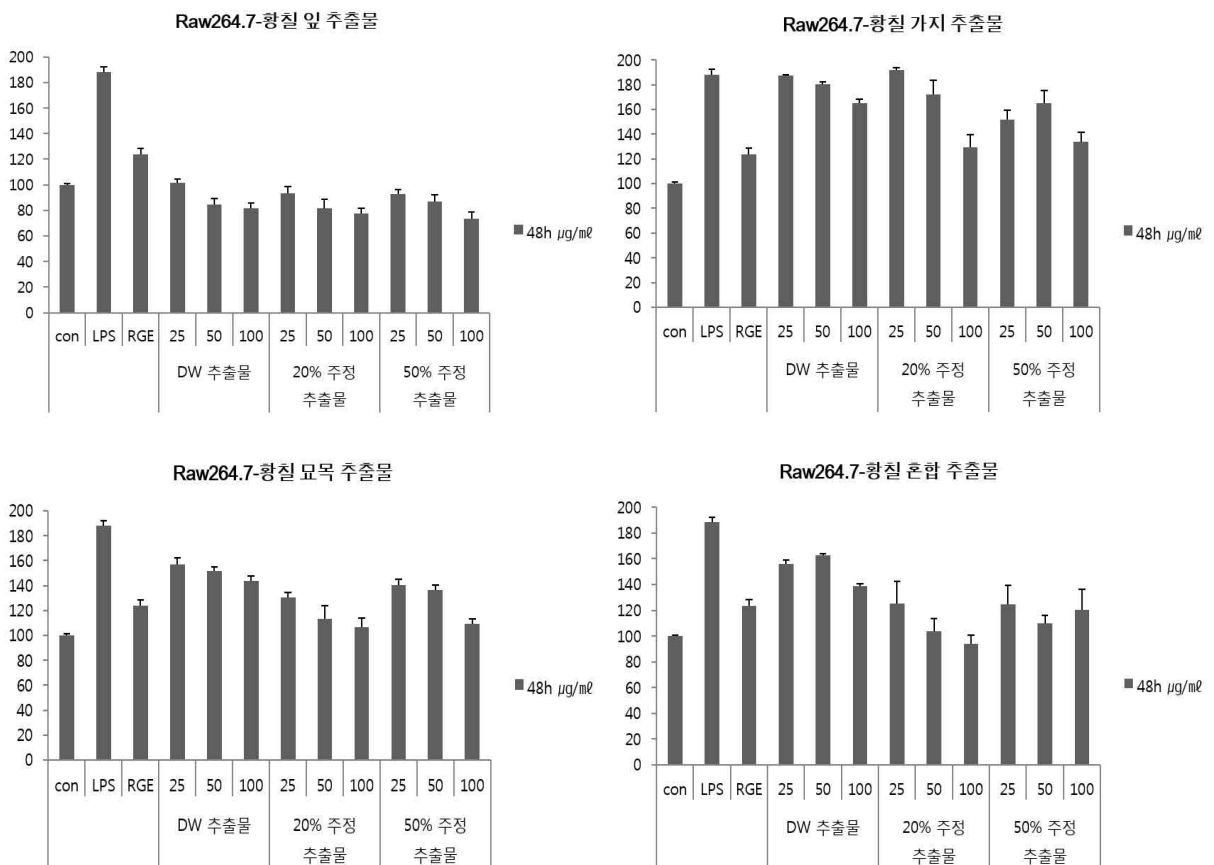


Fig. 2. Cell viability effects of DL, DB, DS, DM extracts during 48h in RAW264.7 cells

DL; 황칠나무 잎 추출물, DB; 황칠나무 가지 추출물, DS; 황칠나무 묘목 추출물, DM; 황칠나무 혼합 추출물

- 면역세포에서 총 4개의 부위를 3가지의 추출용매를 사용하여 추출한 12종 추출물을 가지고 48시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타 났으며 24시간에 비해 낮은 cell viability가 떨어졌지만 큰 독성이 있지는 않아 보임
- 반면에 가지, 묘목, 혼합은 시중에 시판 되고 있는 홍삼(RGE)와 비견할 정도로 성장이 높아진 것 나타났다. 특히 가지 추출물에서는 positive control인 LPS만큼 증가한 것을 알 수 있었음

## 나. 면역세포에 황칠나무 추출물 처리 후 면역관련 cytokine level 측정

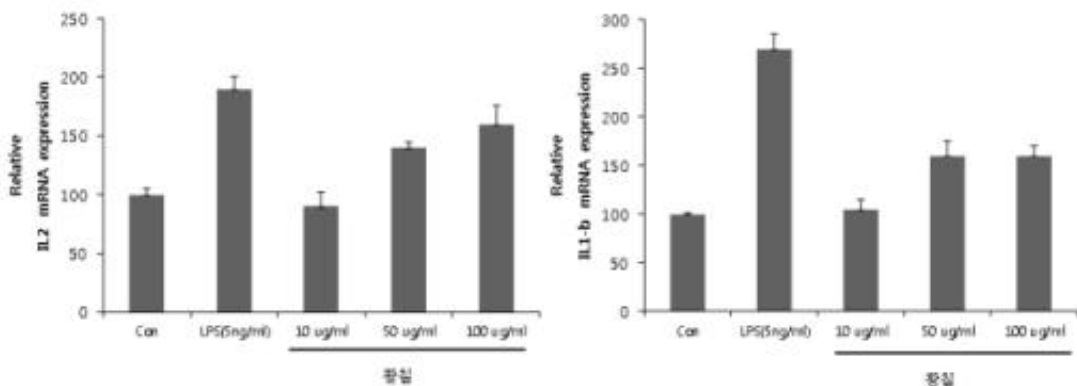
### (1) 방법

면역세포의 면역과 관련된 cytokine 인자들의 발현 정도를 mRNA level에서 확인함. Raw264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12h이 지난 후 12종 추출물 treat하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 RNA prep kit로 RNA extraction 후 cDNA 합성. 합성된 cDNA를 가지고 cytokine 관련 인자의 primer를 이용하여 real-time PCR or Reverse transcriptase PCR 진행

### (2) 결과

#### ① 1차

- 황칠나무 부위별 추출물의 효능을 확인하기에 앞서 황칠나무 전체 추출물을 이용한 면역력 증강에 관여하는 NK세포의 활성화 증가에 효과를 검증함. RAW264.7 cell에 대한 세포의 활성화로 IL-2, IL1b를 측정함으로써 RAW264.7 cell의 활성을 평가한 결과, 전체 추출물 50  $\mu$ g/mL에서부터 macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 나타남. 또한, 면역에 관여하는 macrophage cell line인 RAW264.7 세포에서 LPS와 황칠나무 잎 추출물을 함께 처리한 결과, NO를 생성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 증가 것을 확인하였으며 macrophage를 활성화 시키는 cytokine인 IFN- $\gamma$ 의 발현을 증가시키는 한 것을 선행 연구에서 확인함





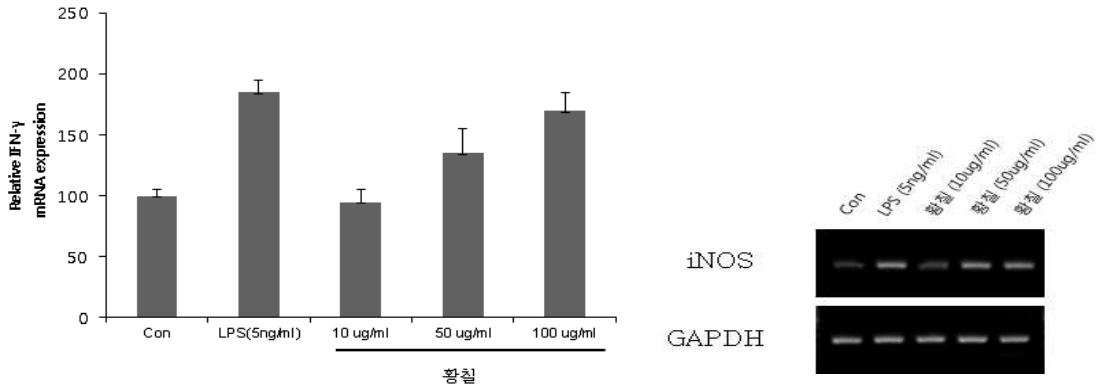


Fig. 3. Cytokine expression effects of *D. moribifera* total extracts.

Con; control(정상균), LPS; Lipopolysaccharides(리포 다당류, 대조균)

② 2차

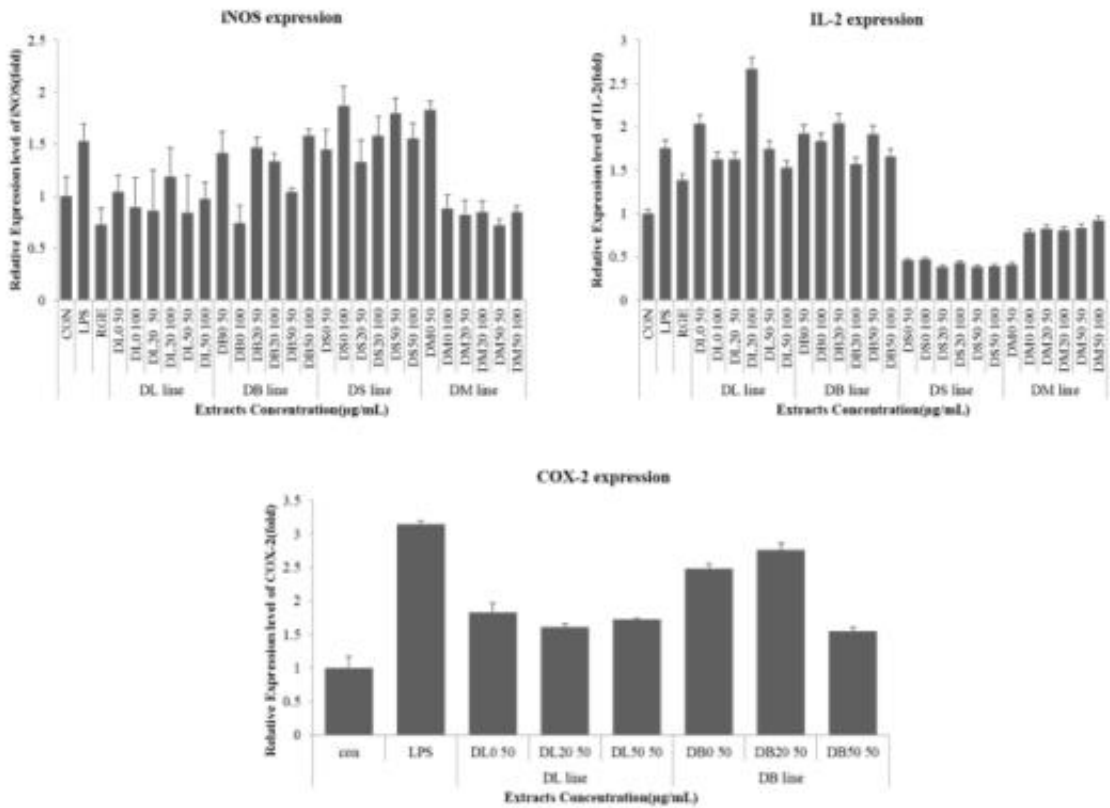


Fig. 4. DL, DB, DS, DM extracts enhanced cytokine expression in RAW264.7 cells.

Con; control(정상균), LPS; Lipopolysaccharides(리포 다당류, 대조균), Dex; dextrin(덱스트린, 대조균), DL 0; 황칠나무 잎 물추출물, DL 20; 황칠나무 잎 20% 주정추출물, DL 50; 황칠나무 잎 50% 주정추출물 DB 0; 황칠나무 가지 물추출물, DB 20; 황칠나무 가지 20% 주정추출물, DB 50; 황칠나무 가지 50% 주정추출물 DS 0; 황칠나무 묘목 물추출물, DS 20; 황칠나무 묘목 20% 주정추출물, DS 50; 황칠나무 묘목 50% 주정추출물 DM 0; 황칠나무 혼합 물추출물, DM 20; 황칠나무 혼합 20% 주정추출물, DM 50; 황칠나무 혼합 50% 주정추출물

- 1차 선행연구에서 면역에 관여하는 macrophage cell line인 RAW264.7 세포에서 LPS와 RGE(홍삼 추출물), 황칠나무 전체 추출물을 함께 처리한 결과, NO를 생

성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 유의성 있게 증가한 것을 확인함

- 1차 선행연구에서 황칠나무 전체 추출물에서 확인한 내용을 다른 부위 추출물에서도 확인
- RAW264.7 cell에 대한 세포의 활성화로 IL-2를 측정함으로써 Raw264.7 cell의 활성을 평가한 결과, IL-2에서는 황칠나무 잎 추출물, 황칠나무 가지 추출물에서 macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 나타남. 그래서 황칠나무 잎, 가지 추출물 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 COX-2 발현을 확인한 결과 control 대비하여 증가한 것으로 나타남

## 다. 면역세포에 황칠나무 추출물 처리 후 면역 조절 관련인자 활성평가

### (1) 방법

면역세포에서 황칠나무 추출물을 처리한 후 면역 조절 관련인자가 어떠한 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 protein level에서 확인함. RAW264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12h이 지난 후 12종 추출물 treat하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 면역 관련 인자의 antibody를 이용하여 western blot 진행

### (2) 결과

- RT & qPCR을 통하여 mRNA level로 세포 활성을 본 것과 같이 western blot을 통하여 황칠나무 4종 추출물을 처리했을 때 면역 조절 관련 인자가 어떻게 변화 하는지 본 결과, IL-1 $\beta$ 를 측정함으로써 RAW264.7 cell의 활성을 평가함. 황칠나무 가지 물, 20% 주정추출물에서 시판되는 RGE(홍삼 추출물)보다도 높게 나왔을 뿐더러 LPS와 비슷한 수준으로 활성이 높게 나타났음. 즉, macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 나타남에 따라 면역 조절에 영향을 미친 것으로 생각됨

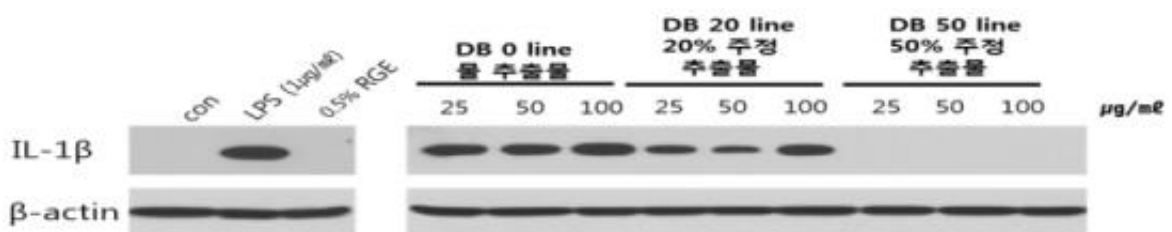


Fig. 5. DB extracts induced the expression of IL-1 $\beta$  in RAW264.7 cells.

Con; control(정상군), LPS; Lipopolysaccharides(리포 다당류, 대조군), RGE; Red ginseng extract(홍삼추출물, 대조군), DB 0; 황칠나무 가지 물추출물, DB 20; 황칠나무 가지 20% 주정추출물, DB 50; 황칠나무 가지 50% 주정추출물

라. 면역세포에 황칠나무 추출물에 의한 산화질소(NO) 효과 측정

(1) 방법

면역세포에서 황칠나무 추출물을 처리한 후 NO 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 protein을 가지고 NO assay로 확인함. RAW264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12h이 지난 후 12종 추출물 treat하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량하였음. 정량한 protein을 가지고 NO assay 진행하였음

(2) 결과

- 면역에 관여하는 macrophage cell line인 RAW264.7 세포에서 황칠나무 4종 추출물을 함께 처리한 결과, NO를 생성하여 면역반응에 효과가 있는 물질은 황칠나무 가지 추출물에서 유의성 있게 증가 한 것을 확인함

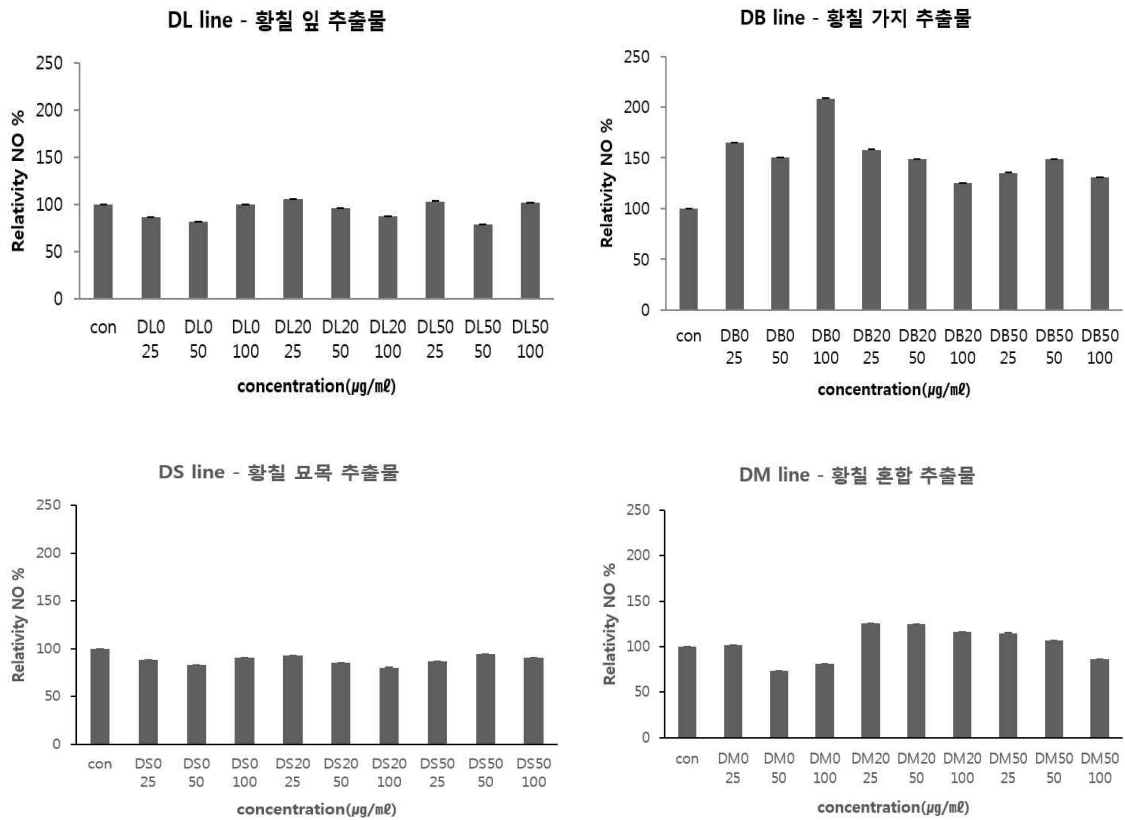


Fig. 6. DB extracts enhanced NO activity in RAW264.7 cells.

Con; control(정상군)

DL 0; 황칠나무 잎 물추출물, DL 20; 황칠나무 잎 20% 주정추출물, DL 50; 황칠나무 잎 50% 주정추출물

DB 0; 황칠나무 가지 물추출물, DB 20; 황칠나무 가지 20% 주정추출물, DB 50; 황칠나무 가지 50% 주정추출물

DS 0; 황칠나무 묘목 물추출물, DS 20; 황칠나무 묘목 20% 주정추출물, DS 50; 황칠나무 묘목 50% 주정추출물

DM 0; 황칠나무 혼합 물추출물, DM 20; 황칠나무 혼합 20% 주정추출물, DM 50; 황칠나무 혼합 50%주정추출물

NO; Nitric Oxide, 일산화질소

## 마. *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물의 독성평가

### (1) 방법

- *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 처리 했을 때 독성을 평가하기 위해서 단기, 장기간으로 황칠나무 가지 물추출물을 투여하여 mouse body weight와 condition 관찰함
- 단기, 장기 투여 후 mouse를 sacrifice시켜 spleen, Lung, Kidney, Liver 각각의 장기에서 장기 size나 이상징후가 발견 되지 않았는지 관찰함. 그 후 Liver 조직은 H&E staining을 통하여 Liver 조직에 독성 병변이 있는지 살펴보았음. 또한, spleen을 primary culture하여 WST-1으로 번식능을 확인함. 평가를 실험에 사용한 EZ-CYTOX는 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정함으로써 Cell Viability, Proliferation & Cytotoxicity Assay등에 사용함. 비장세포 mouse splenocyte를 96well plate에 seeding하여 12h incubation 후 황칠나무 가지 물추출물과 control(negative control), Dex(덱스트린)-RGE(홍삼추출물)(positive control)을 treat 함. 24, 48h 후에 WST-1 assay를 이용하여 각각의 well의 cell viability 변화를 control과 비교하여 독성평가를 함

### (2) 결과

#### ① mouse body weigh 변화

- body weigh에 별다른 변화가 없고 죽거나 condition이 좋지 않은 mouse가 없었기에 1차적으로 독성이 없는 것으로 사료되었음

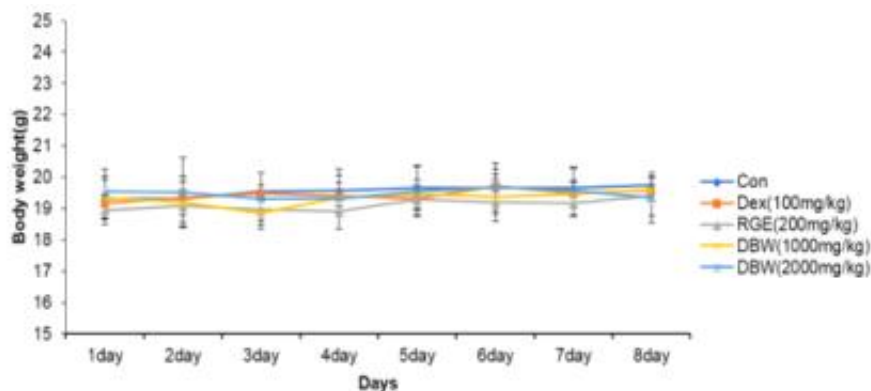


Fig. 7. Toxicity of *Dendropanax morbifera* branches water extract *in vivo* for 8 days(short-term).

Con; control, Dex; dextrin, RGE; Red ginseng extract, DBW; *Dendropanax morbifera* branches water extract

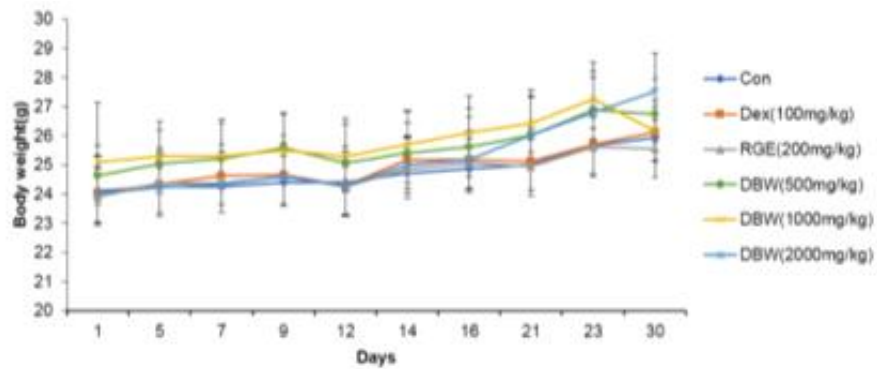


Fig. 8. Toxicity of *Dendropanax morbifera* branches water extract *in vivo* for 30 days(long-term).

Con; control, Dex; dextrin, RGE; Red ginseng extract, DBW; *Dendropanax morbifera* branches water extract

② 단기(8일) 비장세포 독성평가

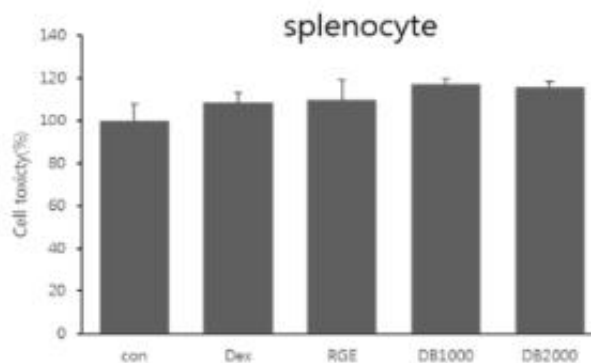


Fig. 9. Cell cytotoxicity of *Dendropanax morbifera* branches water extract on short-term mouse splenocyte for 24 hours.

Con; control, Dex; dextrin, RGE; Red ginseng extract, DB; *Dendropanax morbifera* branches water extract

- 비장세포 mouse splenocyte에서 황칠나무 가지 물 추출물을 사용하여 추출한 24

시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타났음

③ 48시간

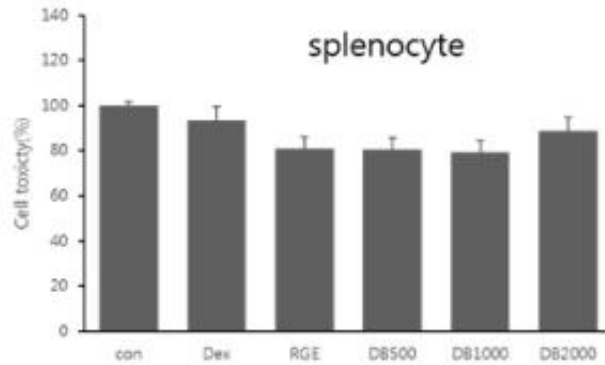


Fig. 10. Cell cytotoxicity of *Dendropanax morbiifera* branches water extract on long-term mouse splenocyte for 48 hours.

Con; control, Dex; dextrin, RGE; Red ginseng extract, DB; *Dendropanax morbiifera* branches water extract

- 비장세포 mouse splenocyte에서 황칠나무 가지 물추출물을 사용하여 추출한 48시간 동안 독성 테스트를 해 본 결과 control에 대비하여 독성이 없는 것으로 나타났음

④ ALT, AST, creatine, Urea를 통한 독성 확인

Treatment (mg/kg)	Con	Dex	RGE	DBW 1000	DBW 2000
ALT(U/I)	37.51±5.66	37.65±4.35	38.65±4.22	36.65±4.22	39.1±3.99
AST(U/I)	61.98±8.72	60.24±9.01	62.24±5.11	54.06±10.08	62.12±8.94
Creatine (mg/dl)	0.5±0.1	0.578±0.077	0.553±0.045	0.565±0.081	0.563±0.065
Urea (mmol/l)	1.2±0.03	1.27±0.078	1.15±0.024	1.17±0.05	1.13±0.056

Fig. 11. ALT, AST, creatine, and urea levels in plasma of mice fed DBW 500, 1000 mg/kg) for 8 days(short-term).

Con; 정상군, Dex; 텍스트린, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 단기간으로 8일 동안 경구 투여하였음. ALT, AST, creatine, Urea를 통한 독성을 확인한 결과 모든 시료들 정상 범위 내에 활성을 보였음. 따라서 단기 투여에서는 독성이 없는 것으로 확인함

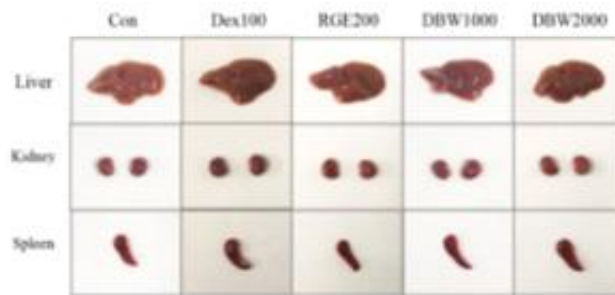
Treatment (mg/kg)	Con	Dex	RGE	DBW 500	DBW 1000	DBW 2000
ALT(U/I)	29.19±10.97	30.25±4.67	25.50±0.55	30.55±2.22	33.83±0.03	22.96±7.59
AST(U/I)	61.65±1.06	64.57±13.44	52.98±3.45	60.77±7.11	66.75±20.15	54±8.48
Creatine (mg/dl)	0.54±0.1	0.88±0.045	0.31±0.099	0.49±0.081	0.53±0.2	0.48±0.23
Urea (mmol/l)	1.3±0.09	1.5±0.07	1.6±0.03	1.5±0.09	1.6±0.08	1.6±0.18

Fig. 12. ALT, AST, creatine, and urea levels in plasma of mice fed DBW 500, 1000 mg/kg) for 30 days(long-term).

Con; 정상군, Dex; 텍스트린, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 장기간으로 30일 동안 경구 투여 하였음. ALT, AST, creatine, Urea를 통한 독성을 확인한 결과 모든 시료들 정상 범위 내에 활성을 보였음. 따라서 장기 투여에서도 독성이 없는 것으로 확인함

⑤ 장기 독성 확인

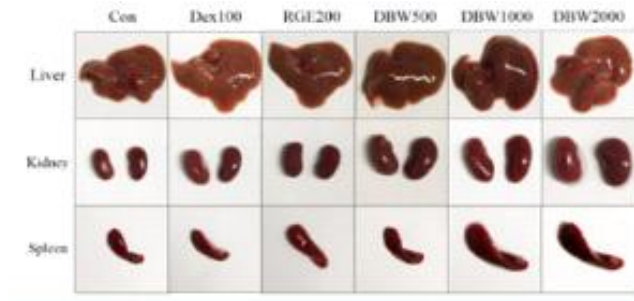


Treatment(mg/ml)	Con	Dex100	RGE200	DBW1000	DBW2000
Liver(g)	1.1225	1.095	1.1525	1.18	1.0625
Kidney(g)	0.3375	0.295	0.315	0.3425	0.315
Spleen(g)	0.1	0.1075	0.0975	0.11	0.12

Fig. 13. The weight of mouse organs was measured during short term.

Con; 정상군, Dex; 텍스트린, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 단기간으로 8일 동안 경구 투여 하였음. 8일 후 해부를 통하여 각각의 전체적인 장기들의 독성을 확인하였으며, 장기 독성을 볼 때 주로 확인 하는 Liver, Kidney, Spleen을 확인하여 병변 확인 및 무게 측정을 통해 독성 확인함



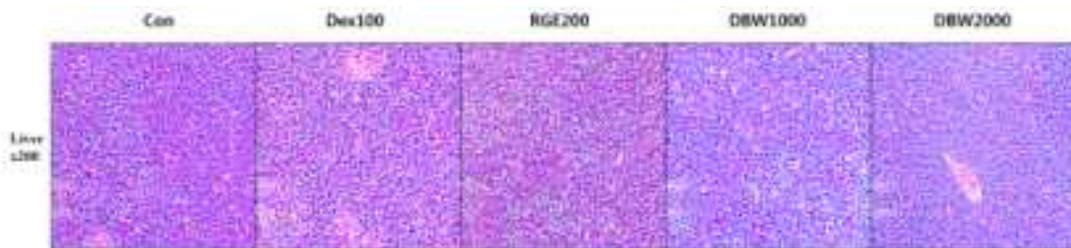
Treatment(mg/kg)	Groups					
	Con	Dex100	RGE200	DBW500	DBW1000	DBW2000
Liver(g)	1.517	1.535	1.457	1.56	1.569	1.544
Kidney(g)	0.426	0.454	0.444	0.492	0.453	0.537
Spleen(g)	0.132	0.143	0.122	0.147	0.129	0.156

**Fig. 14. The weight of mouse organs was measured during long term.**

Con; 정상군, Dex; 텍스트린, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 장기간으로 30일 동안 경구 투여 하였음. 30일 후 해부를 통하여 각각의 전체적인 장기들의 독성을 확인하였으며, 장기 독성을 볼 때 주로 확인 하는 Liver, Kidney, Spleen을 확인하여 병변 확인 및 무게 측정을 통해 독성 확인함

#### ⑥ 간 독성 확인



**Fig. 15. Liver sections stained with H&E, 8 days after DBW treatment.**

Con; 정상군, Dex; 텍스트린, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 단기간으로 8일 동안 경구 투여 하였음. 8일 후 해부를 통하여 각각의 전체적인 장기들의 독성을 확인하였으며, 약물 독성을 볼 때 간 독성을 일반적으로 확인하기 때문에 Liver tissue를 IHC하여 독성 확인한 결과 독성이 나타나지 않았음





**Fig. 16. Liver sections stained with H&E, 30 days after DBW treatment.**

Con; 정상군, Dex; 덱스메타손, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 단기간으로 30일 동안 경구 투여 하였음. 30일 후 해부를 통하여 각각의 전체적인 장기들의 독성을 확인하였으며, 약물 독성을 볼 때 간 독성을 일반적으로 확인하기 때문에 Liver tissue를 IHC하여 독성 나타나지 않음

#### 바. Mouse splenocyte에서 황칠나무 가지 물추출물 처리 후 비장세포 활성화 측정

##### (1) 방법

- 면역세포의 면역과 관련된 cytokine 인자들의 발현 정도를 mRNA level에서 확인함
- 단기, 장기 투여 후 spleen을 적출하여 장기를 lysis하여 RNA 정제 후 qPCR로 cytokine mRNA level 확인하여 *in vivo*에서 효과를 측정
- spleen으로 primary cell culture를 한 mouse splenocyte를 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12h이 지난 후 황칠나무 가지 물추출물 treat하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 RNA prep kit로 RNA extraction 후 cDNA 합성. 합성된 cDNA를 가지고 cytokine 관련 인자의 primer를 이용하여 real-time PCR or Reverse transcriptase PCR 진행함으로써 *ex vivo*에서 효과를 확인함

##### (2) 결과

###### ① *in vivo*

황칠나무 가지 물추출물을 이용한 면역력 증강에 관여하는 cytokine 인자들의 활성화 증가에 효과를 검증함. mouse splenocyte cell에 대한 세포의 활성화로 IL-6, IL-1 $\beta$  등을 측정함으로써 mouse splenocyte cell의 활성을 평가한 결과, 황칠나무 가지 물추출물을 처리 하였을 때 양성대조군과 같이 macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 나타남. 또한, NO를 생성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 증가 한 것을 확인하였으며 macrophage를 활성화 시키는 cytokine 발현을 증가시키는 한 것을 확인함

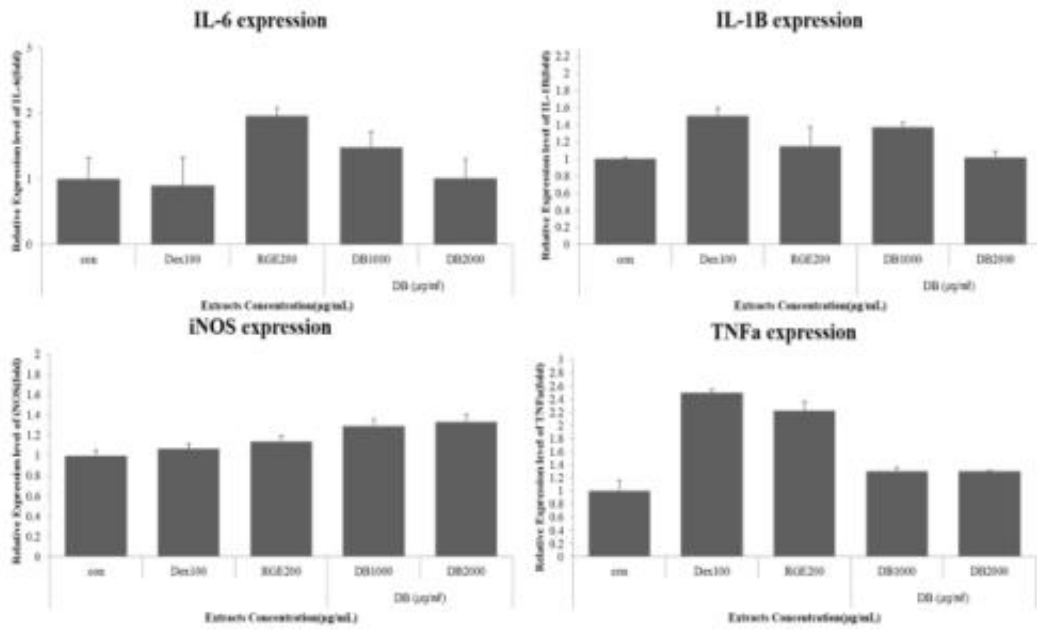


Fig. 17. *In vivo* Cytokine mRNA level of *Dendropanax morbifera* branches water extract. Con; control(정상군), Dex; 텍스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

② *ex vivo*

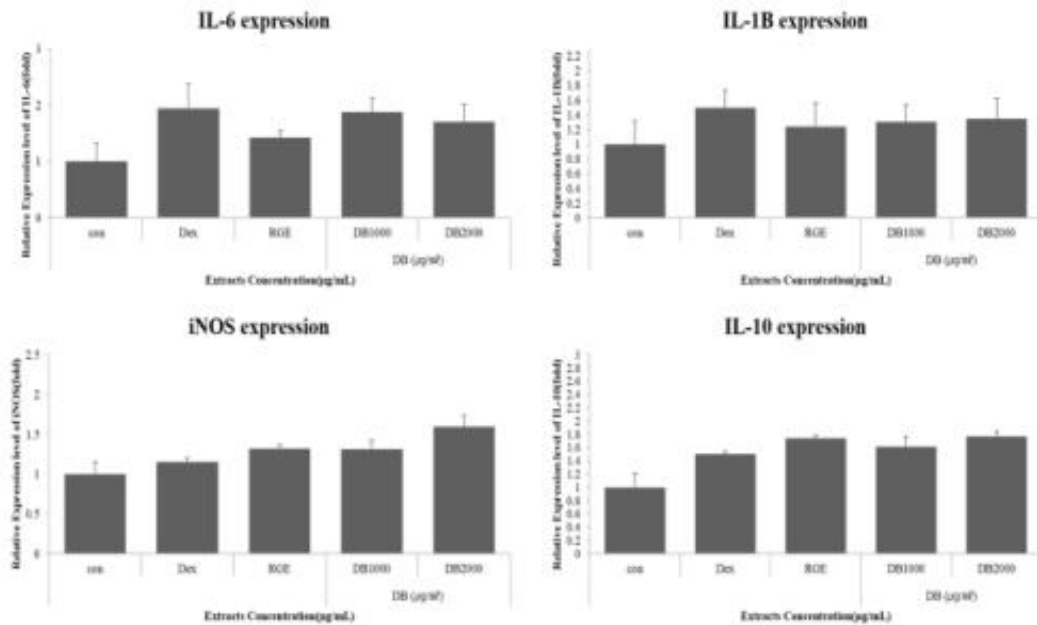


Fig. 18. *Ex vivo* Cytokine mRNA level of *Dendropanax morbifera* branches water extract. Con; control(정상군), Dex; 텍스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- 황칠나무 가지 물추출물을 이용한 면역력 증강에 관여하는 cytokine 인자들의 활성 증가에 효과를 검증함. mouse splenocyte cell에 대한 세포의 활성으로 IL-6, IL-1β 등을 측정함으로써 mouse splenocyte cell의 활성을 평가한 결과, 황칠나무 가지 물추출물을 처리 하였을 때 양성대조군과 같이 macrophage 세포의 활성

에 도움을 주는 것으로 나타남. 또한, NO를 생성하여 면역반응에 있어 중요한 지표인 iNOS의 발현이 증가 것을 확인하였으며 macrophage를 활성화 시키는 cytokine 발현을 증가시키는 한 것을 확인함

사. *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물 처리 후 면역 조절 관련인자 활성평가

(1) 방법

*In vivo*에서 단기, 장기 황칠나무 가지 물추출물을 처리한 후 면역 조절 관련인자가 어떠한 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 protein level에서 확인함. 각각 투여 후 군마다 spleen을 적출하여 Homogenizers를 함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 면역관련 인자의 antibody를 이용하여 western blot 진행

(2) 결과

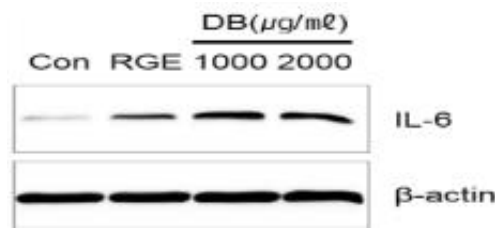


Fig. 19. *In vivo* cytokine protein level of *Dendropanax morbifera* branches water extract.

Con; control(정상군), Dex; 텍스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DB; 황칠나무 가지 물추출물

- Real-time PCR을 통하여 mRNA level로 세포 활성을 본 것과 같이 western blot을 통하여 황칠나무 가지 물추출물을 처리했을 때 면역 조절 관련 인자가 어떻게 변화 하는지 본 결과, 다양한 면역인자를 활성을 확인했을 때 IL-6에서 황칠나무 가지 물추출물을 처리했을 때 음성, 양성대조군에 비해 활성이 증가됨을 측정함. 즉, macrophage 세포의 활성화에 도움을 주는 것으로 나타남에 따라 면역 조절에 영향을 미친 것으로 나타남

아. *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물에 의한 LDH assay 진행

(1) 방법

*In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 투여한 후 면역세포 *in vitro* 실험에서와 같이 NK 세포활성에 부정적인 영향 없이 독성이 없는지 확인하기 위함. NK 세포 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse splenocyte protein sample을 가지고 LDH assay kit를 진행함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 LDH assay 진행

(2) 결과

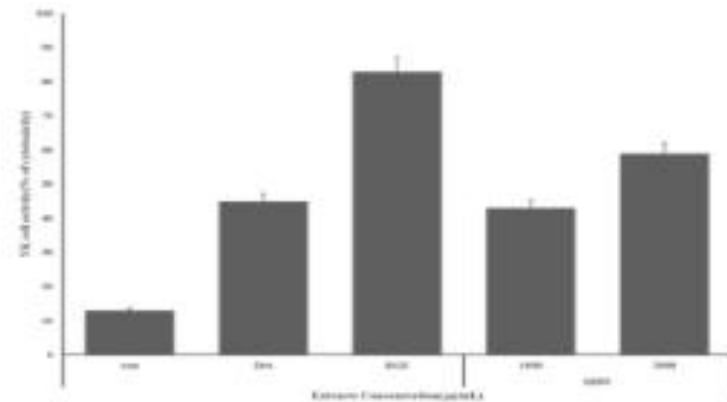


Fig. 20. Effects of LDH production *in vivo* with *Dendropanax morbifera* branches water extract treatment for 8 days(short-term).

Con; control(정상군), Dex; 덱스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 8일 단기간으로 투여한 후 면역세포 *in vitro* 실험에서와 같이 NK 세포활성에 부정적인 영향 없이 독성이 없는지 확인함. NK 세포 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse splenocyte protein sample을 가지고 LDH assay kit를 진행하였을 때 대조군 보다 높은 활성을 보였으며 양성대조군과 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었음

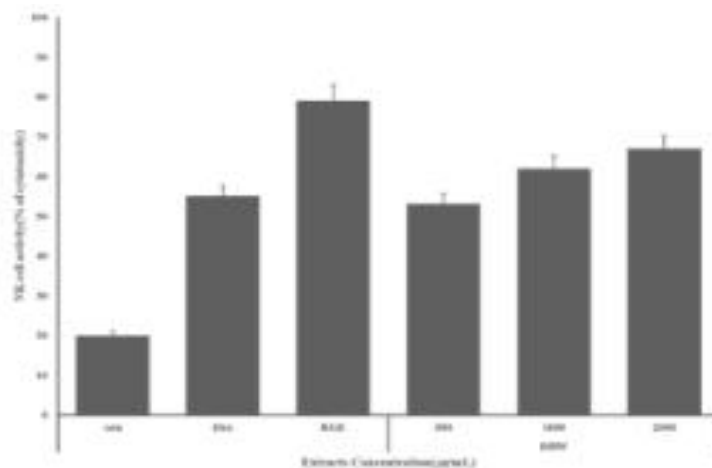


Fig. 21. Effects of LDH production *in vivo* with *Dendropanax morbifera* branches water extract treatment for 30 days(long-term).

Con; control(정상군), Dex; 덱스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 30일 장기간으로 투여한 후 면역세포 *in vitro* 실험에서와 같이 NK 세포활성에 부정적인 영향 없이 독성이 없는지 확인함. NK 세포 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse splenocyte protein

sample을 가지고 LDH assay kit를 진행하였을 때 대조군 보다 높은 활성을 보였으며 양성대조군과 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었음

자. *In vivo* mouse 혈액에서 LDH를 측정하여 *in vivo* NK 세포 활성 측정 및 분석

(1) 방법

*In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 투여한 후 면역세포 *in vitro* 실험에서와 같이 NK 세포활성에 부정적인 영향 없이 독성이 없는지 확인하기 위함. NK 세포 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse blood sample을 가지고 LDH assay kit를 진행함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 LDH assay 진행

(2) 결과

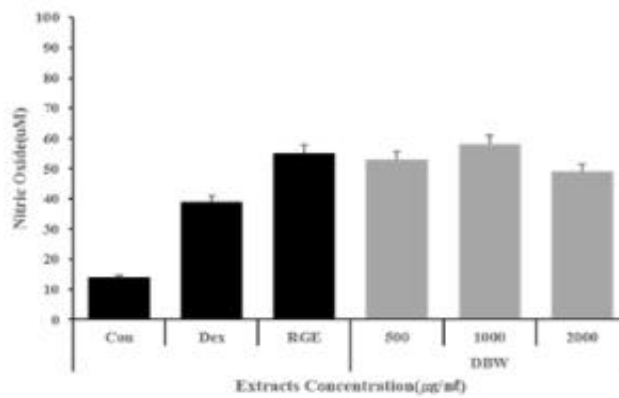


Fig. 22. Effects of Nitric Oxide *in vivo* mouse blood sample with *Dendropanax morbifera* branches water extract treatment for 30 days(long term).

Con; control(정상군), Dex; 텍스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 30일 장기간으로 투여한 후 Nitric Oxide 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse 혈액 sample을 가지고 Nitric Oxide kit를 진행하였을 때 대조군보다 높은 활성을 보였으며 양성대조군과 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인함

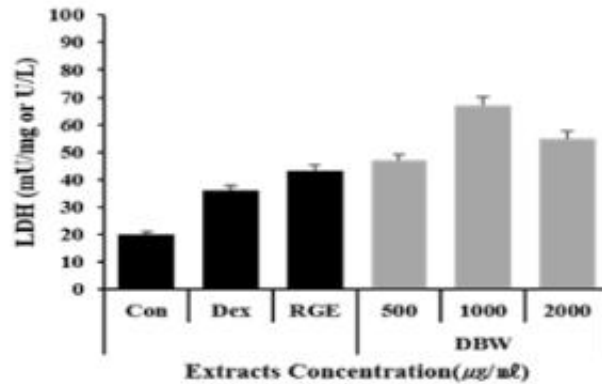


Fig. 23. Effects of LDH production *in vivo* mouse blood sample with *Dendropanax morbifera* branches water extract treatment for 30 days(long term).

Con; control(정상군), Dex; 텍스트린, 대조군, RGE; 홍삼추출물, 대조군, DBW; 황칠나무 가지 물추출물

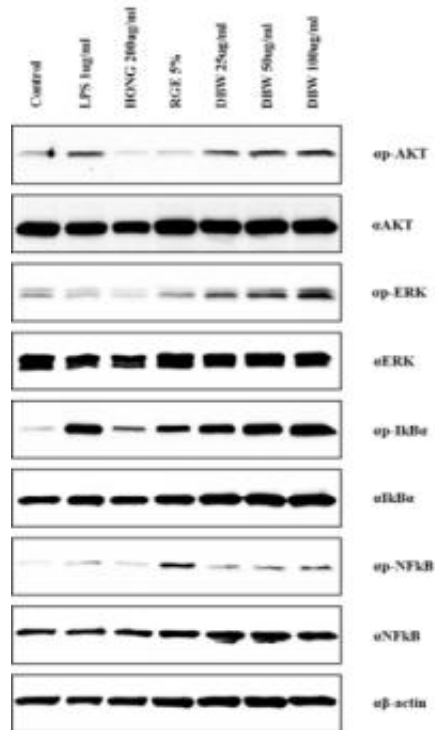
- *In vivo*에서 황칠나무 가지 물추출물을 30일 장기간으로 투여한 후 NK 세포 활성 변화가 생기는지 평가하기 위하여 mouse 혈액 sample을 가지고 LDH assay kit를 진행하였을 때 대조군보다 높은 활성을 보였으며 양성대조군보다도 좋은 결과를 나타내는 것을 확인함

#### 차. 황칠나무 가지 물추출물에 의한 NK세포 활성 확인 및 기작 규명

##### (1) 방법

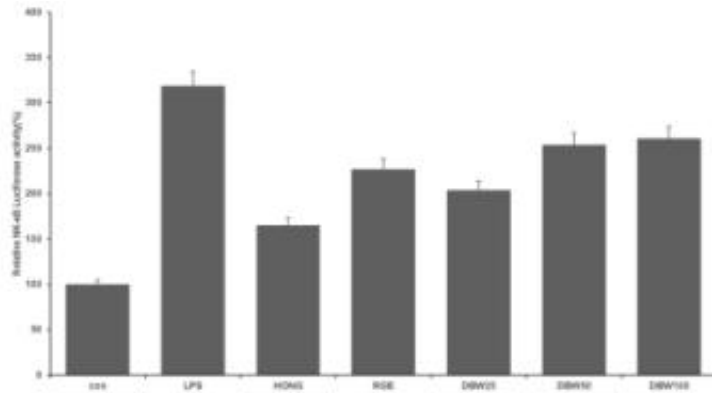
면역세포에서 황칠나무 가지 물추출물을 처리한 후 NK세포 활성 관련 인자를 평가하기 위하여 protein level에서 확인함. RAW264.7 cell을 6well plate에  $7 \times 10^5$  cell/ml로 seeding 후 12h이 지난 후 황칠나무 가지 물추출물 treat하여 6시간 뒤 scrapper로 harvest함. cell pellet을 protein lysis buffer를 이용하여 protein extraction 후 정량. 정량한 protein을 가지고 면역 관련 인자의 antibody를 이용하여 western blot 진행

##### (2) 결과



**Fig. 24. DBW enhance the p-p65 level and NK-kB promoter activity in RAW264.7 cell lines.**  
 Con; control(정상군), LPS; Lipopolysaccharides(대조군), Hong; Rhodiola Rosea extract(홍경천, 대조군), RGE; Red ginseng extract(홍삼추출물, 대조군), DBW; 황칠나무 가지 물추출물

- DBW 매개 면역 증진을 연구하기 위해 우리는 0에서 48 시간까지 RAW264.7 세포의 LPS 또는 DBW 처리를 통해 AKT와 Iκ-Ba의 신호 전달 경로를 조사했음. AKT 및 Iκ-Ba의 발현을 웨스턴 블롯에 의해 확인하였음. AKT 및 Iκ-Ba는 세포를 LPS 또는 DBW에 노출시킨 후에 인산화되었음. p-AKT 및 p-Iκ-Ba 발현 수준도 초기에 증가하였음. 이러한 결과는 DBW에 의한 AKT 및 IκBa의 과발현을 입증하였음. DBW 추출물의 투여량이 세포 증식 및 면역 촉진제 생산에 미치는 영향은 세포 증식이 증가한 것이 AKT 경로 활성화의 주요 결과임을 시사함. 루시퍼라제 분석을 사용하여 LPS, HONG(홍경천)및 RGE(홍삼 추출물) 또는 DBW 처리 후 293T 세포에서 NF-κB 전사 활성을 측정했음. NF-κB 전사 활성은 DBW와 RGE에 의해 동등하게 증가되었음. DBW는 NF-κB 신호 전달에 긍정적인 영향을 미치므로 면역 자극에 영향을 미치고 NF-κB 신호 전달 경로를 조절할 수 있음. 따라서 DBW의 면역 증강 효과가 HONG(홍경천), RGE (홍삼 추출물)의 효과와 비슷하다는 결과가 나왔음



**Fig. 25. DBW enhance the p-p65 level and NK-κB promoter activity in RAW264.7 cell lines.**  
 Con; control(정상군), LPS; Lipopolysaccharides(대조군), Hong; Rhodiola Rosea extract(홍경천, 대조군), RGE; Red ginseng extract(홍삼추출물, 대조군), DBW; 황칠나무 가지 물추출물

### 카. 결론

결론적으로 이 연구에서 DBW가 쥐의 비장 세포 및 대식세포에서 사이토카인 분비를 증가 시킨다는 것을 발견했음. NF-κB 경로를 통해 면역계 활동이 일어나는지를 결정하기 위해 DBW를 더 조사했음. DBW는 인산화 된 IκBa 및 NF-κB를 통해 전 염증성 사이토카인 IFN-γ 및 TNF-α와 같은 다양한 사이토카인을 활성화시켰음. 따라서 DBW가 NF-κB 신호 전달을 통해 면역계를 조절한다는 것을 발견했음. NF-κB 경로를 통한 면역 효과를 RAW264.7 세포를 사용하여 평가하였음. DBW는 우수한 면역 자극제이며 시험관 내 및 생체 내에서 마우스의 면역계 증진을 필요로 하는 치료법의 미래 개발에 좋은 가능성을 가지고 있음. 전체적으로, DBW는 마우스 비장 세포 및 대식세포에서 사이토카인 분비를 증가시키는 것으로 밝혀졌음

## 9. 건강기능식품 원료 황칠나무잎 분말 함유 건강기능식품 산업화

주관기관인 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜이 보유하고 있는 건강기능식품 원료 “황칠나무잎 분말(제201600100112호)”는 피부건강에 도움을 줄 수 있음, 항산화에 도움을 줄 수 있음의 기능성을 가지며, 해당 원료를 이용하여 체지방 감소 및 여성갱년기 개선 건강기능식품 원료와 혼합, 해당기능성을 가지는 건강기능식품 제품을 개발하고자 함

### 9-1. 황칠나무잎 분말 함유 피부건강 및 체지방 감소 건강기능식품 산업화

#### 가. 황칠나무잎 분말 함유 피부건강 및 체지방 감소 제품(천년황칠 미인) 개발

##### (1) 방법

일일 복용량을 고려하여 소형환제로 결정하고, 기능성원료(황칠나무잎 분말, 맥류약엽, 히알루론산, 비타민 C, 비타민 E)와 부원료를 혼합, 연합, 제환, 당의, 건조의 공정을 거쳐 건강기능식품 시험기준에 적합한 소형환제 시제품을 제작하였음

##### ① 기능성 원료 선정



본 연구에서 황칠나무잎 분말과 함께 선정된 기능성 원료는 맥류약엽, 가르시니아 캄보지아추출물, 히알루론산, 비타민C, 비타민 E이다. 소재의 기능성 및 일일섭취량은 아래와 같음

원료	기능성	일일 섭취량
황칠나무잎	피부건강 • 항산화에 도움을 줄 수 있음	총 엽록소로서 8 ~ 150 mg
맥류약엽	피부건강 • 항산화에 도움을 줄 수 있음	총 엽록소로서 8 ~ 150 mg
가르시니아캄보지아 추출물	항산화 • 체지방감소 • 혈중콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	HCA로서 750 ~ 2800 mg
히알루론산	피부보습에 도움을 줄 수 있음	히알루론산으로서 120 ~ 240 mg
비타민 C	결합조직 형성과 기능유지에 필요, 철의 흡수에 필요, 유해산소로부터 세포를 보호 하는데 필요	30 ~ 1,000 mg
비타민 E	유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요	3.3 ~ 400 mg α-TE

## ② 배합비

No	원료명	배합비율(%)
1	황칠나무잎분말	5
2	맥류약엽	15
3	가르시니아캄보지아추출물	32
4	히알루론산	3.4
5	비타민 C	3.5
6	비타민 E혼합제제분말	1.5
7	옥수수전분	20.9
9	결정셀룰로오스	18.7
합 계		100

## ③ 시제품



## (2) 결과

황칠나무잎 분말과 체지방 감소 소재 함유 건강기능식품을 산업화하기 위한 기능성 원료를 선정하였고, 일일 복용량을 고려하여 본 사업에서 개발하고자하는 제형(소형환)을 결정하였다. 건강기능식품전문제조업을 갖고 있는 메가바이오숲과 협력하여 부원료 선정 및 제환 공정을 개발하여 1일 1회 복용할 수 있는 시제품을 생산하였다. 기준 및 규격에 따라 시제품 시험이 적합하였으며, 건강기능식품으로 생산하기 위한 유통기한 설정시험을 완료하고, 2017년 11월 28일 “천년황칠 미인”으로 품목제조신고를 완료하였음

### 나. 천년황칠 미인 유통기한 설정시험

#### (1) 방법

- ① 시험기간 : 2017. 01. 09 ~ 2017. 07. 31
- ② 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- ③ 시험조건

: 본 시험에 사용된 제품은 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜이 시판을 위해 생산한 최종 제품을 25℃, 35℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였음

이때, 성상, 지표성분(총엽록소, HCA(총(-)-Hydroxycitric acid), 히알루론산, Ascorbic acid(Vit C), α-Tocopherol(Vit E)), 대장균균, 봉해 시험은 매 1개월 마다, 중금속 시험은 0개월과 6개월에 시험을 진행하였음

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	고유의 향미가 있는 녹색의 소형환
사용원료	황칠나무잎 분말, 맥류약염, 가르시니아캄보지아 추출물, 히알루론산, Vit C, Vit E
제조·가공공정	원료→칭량→혼합→엽합→제환→당의→건조→포장→검사→출하대기

포장재질	PE
포장방법	알루미늄 호일 및 지함
포장단위	4,000 mg×35포
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

④ 유통기한설정시험 방법

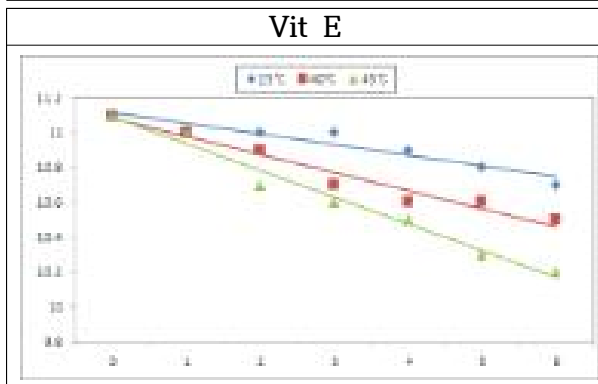
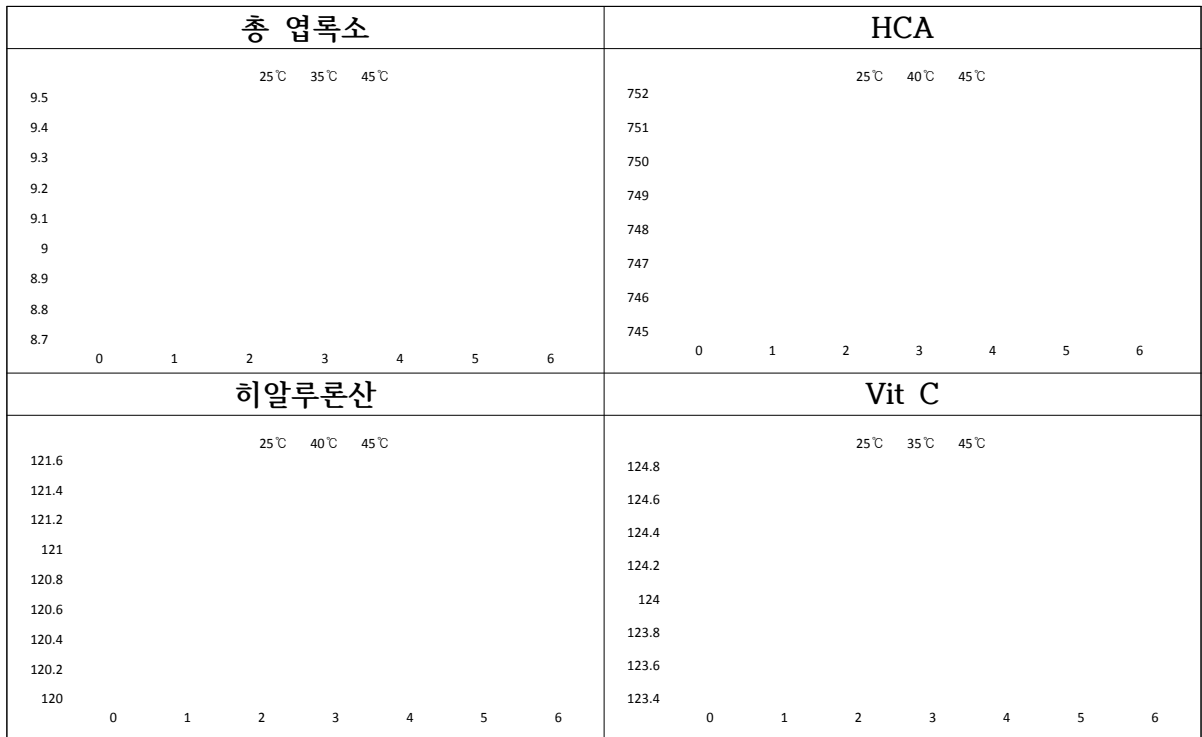
품질지표		기준 및 규격	시험방법
성상		고유의 향미가 있는 녹색의 소형환	관능검사
붕해도		제1액에서 60분, 덜 녹았을 시 제2액에서 60분 이내	식품공전 제II권 제 7. 일반시험법 9. 일반시험법 9.6 붕해시험
지표 성분 (mg/4g)	총엽록소	8 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-56-1총엽록소(제1법)
	HCA	750 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-44 총(-)-Hydroxycitric acid
	히알루론산	120 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-74 히알루론산
	Vit C	100 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-14-3 비타민C(제3법)
	Vit E	11 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-4-3 비타민E(제3법)
대장균군		음성	식품공전 제II권 제7. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군
중금속		납(Pb) : 1.0 mg/kg이하 카드뮴(Cd):1.0 mg/kg이하 비소(As) : 1.0 mg/kg이하 수은(Hg) : 0.4 mg/kg이하	식품공전 제II권 제 7. 일반시험법> 7. 식품 중 유해물질시험법> 7.1.2 금속별 시험> 7.1.2.1~4 납 (Pb), 카드뮴(Cd), 비소(As), 수은(Hg) 1)시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가) 원자흡광광도법(AAs)로 측정

(2) 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 고유의 향미가 있는 녹색의 소형환
- 지표성분 : 시험 시 총 엽록소의 최저값 8.9 mg/4 g, HCA 최저값 746.4 mg/4 g, 히알루론산 최저값 120.5 mg/4 g, Vit C 최저값 123.6 mg/4 g, Vit E 최저값 10.2 mg/4 g 이었으며, 각 원료의 최저 기준인 80%(각 원료의 80% 해당 값 : 총 엽록소 6.8 mg/4 g, HCA 최저값 600 mg/4 g, 히알루론산 최저값 96 mg/4 g, Vit C 최저값 80 mg/4 g, Vit E 최저값 8.8 mg/4 g) 보다 높아 기준에 적합함
- 대장균균 : 음성으로 적합함
- 봉해도 : 제1액에서 60분 이내에 모두 봉해되어 적합하였음
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합하였음

② 저장온도별 품질변화



③ 유통기한 설정 시험 결과

황칠나무잎 분말 함유 체지방 감소 소형환을 가속시험조건(25, 35, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 대장균군, 지표성분(총염류소, HCA, 히알루론산, Vit C, Vit E), 붕해도, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 총 5가지 지표성분의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온유통 시 유통기한은 최소 45개월로 산출되었다. 산출된 유통기한에 안전계수(0.7)를 곱하고 유통과정 중의 안전을 고려하여 최종 유통기한은 24개월로 결정하였음

9-2. 황칠나무잎 분말 함유 피부건강 및 여성갱년기 개선 건강기능식품 산업화

가. 황칠나무잎 분말 함유 피부건강 및 여성갱년기 개선(제이웰 레드퀸) 개발

(1) 방법

일일 복용량을 고려하여 소형환제로 결정하고, 기능성원료(석류추출물, 히알루론산, 가르시니아캄보지아 추출물, 비타민 E, 비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>)와 부원료(황칠나무잎 분말 등)를 혼합, 연합, 제환, 당의, 건조의 공정을 거쳐 건강기능식품 시험기준에 적합한 소형환제 시제품을 제작하였음

① 기능성 원료 선정

본 연구에서 황칠나무잎 분말과 함께 선정된 기능성 원료는 석류추출물, 히알루론산, 가르시니아캄보지아 추출물, 비타민 E, 비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>임. 소재의 기능성 및 일일섭취량은 아래와 같음

원료	기능성	일일 섭취량
석류추출물	갱년기 여성의 건강에 도움을 줄 수 있음	석류추출물로서 1.5 g
가르시니아캄보지아 추출물	항산화·체지방감소·혈중콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음	HCA 로서 750 ~ 2800 mg
히알루론산	피부보습에 도움을 줄 수 있음	히알루론산으로서 120 ~ 240 mg
비타민 E	유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요	3.3 ~ 400 mg α-TE
비타민 B <sub>1</sub>	탄수화물과 에너지 대사에 필요	0.36 ~ 100 mg
비타민 B <sub>2</sub>	체내 에너지 생성에 필요	0.42 ~ 40 mg

② 배합비

No	원료명	배합비율(%)
1	석류추출물	37.5
2	가르시니아캄보지아 추출물	32
3	히알루론산	3.4
4	비타민 E	1.4
5	비타민 B <sub>1</sub>	0.5
6	비타민 B <sub>2</sub>	0.4
7	옥수수전분	6
9	황칠나무잎 분말	2
10	결정셀룰로스	16.8
합 계		100

### ③ 시제품



### (2) 결과

황칠나무잎 분말을 함유하는 피부건강, 여성갱년기 개선, 체지방 감소 소재 함유 건강기능식품을 산업화하기 위한 기능성원료를 선정하였고, 일일 복용량을 고려하여 본 사업에서 개발하고자하는 제형(소형환)을 결정하였다. 건강기능식품전문제조업을 갖고 있는 메가바이오숲과 협력하여 부원료 선정 및 제환 공정을 개발하여 1일 1회 복용할 수 있는 시제품을 생산하였다. 기준 및 규격에 따라 시제품 시험이 적합하였으며, 건강기능식품으로 생산하기 위한 유통기한설정시험을 완료하고, 2018년 6월 28일 “제이웰 레드퀸”으로 품목제조신고를 완료하였음

### 나. 제이웰 레드퀸 유통기한 설정시험

#### (1) 방법

① 시험기간 : 2017. 10. 01 ~ 2018. 04. 30

② 시험기준 : 안정성시험(가속시험)

③ 시험조건

: 본 시험에 사용된 제품은 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜이 시판을 위해 생산한 최종 제품을 25℃, 35℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였음

이때, 성상, 지표성분(Ellagic acid, HCA(총(-)-Hydroxycitric acid), 히알루론산, Vit E, Vit B<sub>1</sub>, Vit B<sub>2</sub>), 대장균군, 봉해 시험은 매 1개월 마다, 중금속 시험은 0개월과 6개월에 시험을 진행하였음

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 환
사용원료	석류추출물, 가르시니아캄보지아 추출물, 히알루론산, Vit E, Vit B <sub>1</sub> , Vit B <sub>2</sub>
제조 • 가공공정	원료→칭량→혼합→연합→제환→건조→충진→포장→검사→출하대기
포장재질	PE
포장방법	PE 및 지합
포장단위	4000mg*30포/box, 4000mg*35포/box, 4000mg*60포/box, 4000mg*70포/box 외
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

④ 유통기한설정시험 방법

품질지표		기준 및 규격	시험방법
성상		고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 환	-
붕해도		120분 이내 붕해	식품공전 제II권 제 7. 일반시험법 9. 일반시험법 9.6 붕해 시험
지표 성분 (mg/4g)	석류추출물	1.14 mg/4g	표준품 Ellagic acid는 메탄올로 용해하여 표준원액으로 하고, 시험용액은 검체 4g을 추출용매(에탄올:중류수:염산 = 65:25:10) 50ml에 녹인 후 90℃, 1시간 동안 수욕상에서 가수분해 및 추출하여, 0.45um PTFE 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 함 (석류추출물 건강기능식품 기능성 원료 인정서 2015-28호)
	히알루론산	120 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-74 히알루론산
	HCA	750 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-44 총(-)-Hydroxycitric acid
	Vit E	10 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-4-2 비타민E(제2법)
	Vit B <sub>1</sub>	10 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-6-2 비타민B <sub>1</sub> (제2법)
	Vit B <sub>2</sub>	10 mg/4g	건강기능식품 공전>시험법>3-7-2 비타민B <sub>2</sub> (제2법)
대장균군		음성	식품공전 제II권 제7. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.7 대장균군
중금속		납(Pb) : 0.5mg/kg이하 카드뮴(Cd):0.1mg/kg이하 비소(As) : 0.1mg/kg이하 수은(Hg) : 0.5mg/kg이하	식품공전 제II권 제 7. 일반시험법> 7. 식품 중 유해물질시험법> 7.1.2 금속별 시험> 7.1.2.1~4 납(Pb), 카드뮴(Cd), 비소(As), 수은(Hg) 1)시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가) 원자흡광광도법(AAs)로 측정

## (2) 결과

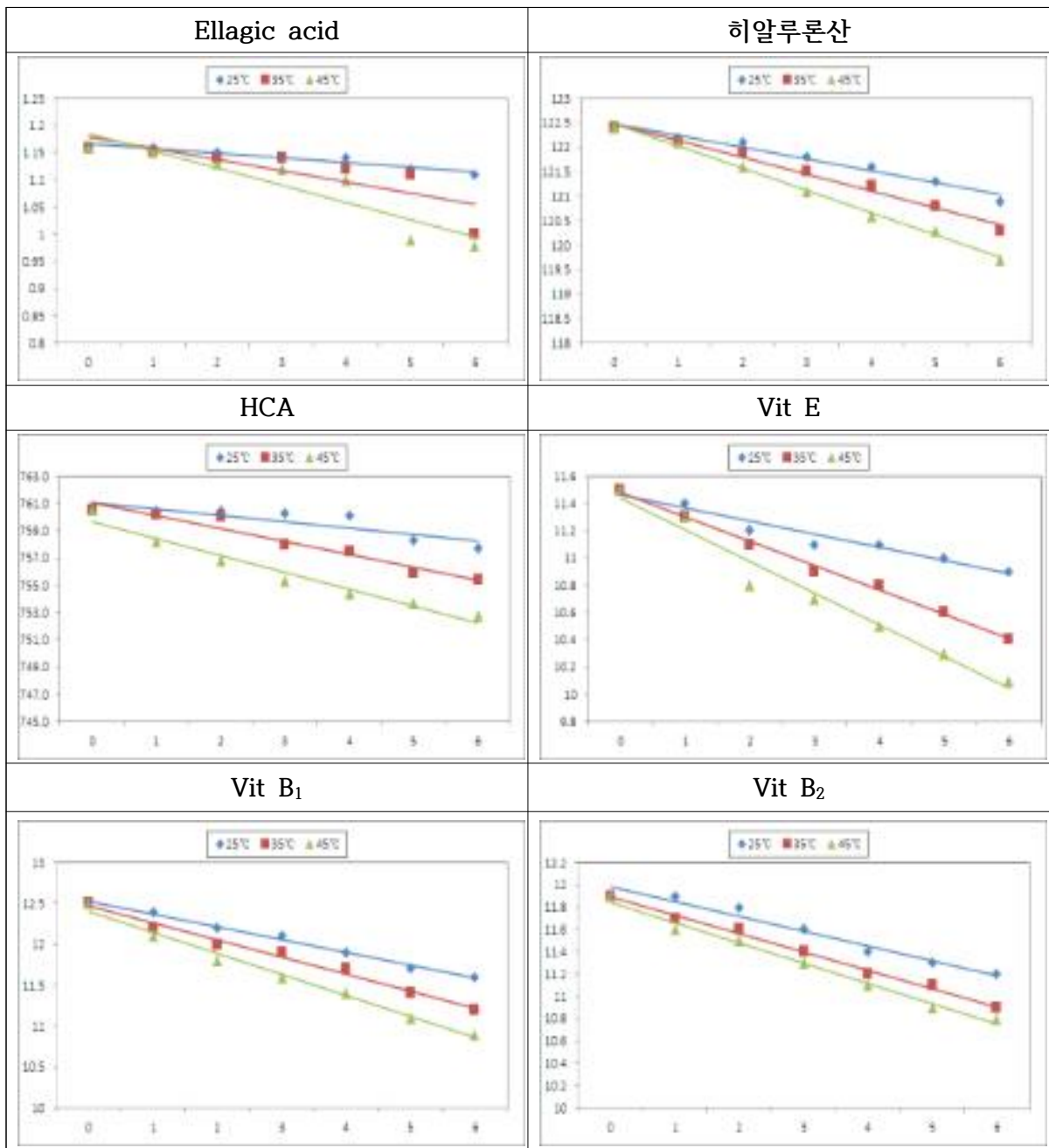
### ① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 고유의 향미가 있는 연한 황갈색의 소형환
- 지표성분 : 시험 시 석류추출물의 Ellagic acid 최저값 0.98 mg/4g, HCA 최저값 752.8 mg/4g, 히알루론산 최저값 119.7 mg/4g, Vit E 최저값 10.1 mg/4g, Vit B<sub>1</sub> 최저값 10.9 mg/4g, Vit B<sub>2</sub> 최저값 10.8 mg/4g 이었으며, 각 원료의 최저 기준인 80%(각 원료의 80% 해당 값 : Ellagic acid 0.912 mg/4g, HCA 600 mg/4g, 히알루론산 96 mg/4g, Vit E 8 mg/4g, Vit B<sub>1</sub> 8 mg/4g, Vit B<sub>2</sub> 8 mg/4g) 보다 높아 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 붕해도 : 120분 이내에 모두 붕해되어 적합하였음
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합하였음
- 주원료별 유통기한 결과



② 저장온도별 품질변화

주원료	산출개월 수	안전계수를 적용한 개월 수
석류 추출물	39.48	27.63
히알루론산	133.65	93.55
HCA	501.64	351.1
Vit E	53.82	37.67
Vit B <sub>1</sub>	40.86	28.60
Vit B <sub>2</sub>	38.87	27.21



### ③ 유통기한 설정 시험 결과

제이웰 레드퀀을 가속시험(25, 35, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 봉해도, 대장균군, 지표성분(Ellagic acid, 히알루론산, HCA, Vit E, Vit B<sub>1</sub>, Vit B<sub>2</sub>), 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 가장짧은 유통기한을 보인 지표성분 비타민 B<sub>2</sub>의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온 유통 시 유통기한은 38.87개월로 산출되었다. 산출된 유통기한에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.7을 곱하여 27.2개월이 도출되었으며 최종 유통기한은 24개월로 결정하였음

## 10. 황칠나무 추출물 함유 숙취해소 및 간보호 기능평가

본 연구에서는 항산화 효과가 알려져 있는 소재 추출물을 혼합하여 숙취해소 및 간보호 효과가 있는 천연유래 숙취해소 음료소재를 개발하고자 황칠나무, 가시오가피, 복분자, 갈근 및 홍삼 추출물을 함유한 SBJ 혼합물을 대상으로 알코올로 유도한 산화적 스트레스에 의해 유도되는 간 독성에 대한 세포보호효과와 숙취 유발 동물모델에서 급성 알코올 섭취에 따른 숙취해소 활성 및 간 보호 효과 기전을 규명하여 숙취 음료 개발을하고자 하였음

### (1) 방법

#### ① 시료 추출 및 제조

황칠나무 추출물은 제이웰바이오팜에서 추출한 것을 사용하였으며, 부원료로 가시오가피 농축액, 복분자즙 농축액, 갈근 농축액, 홍삼 농축액을 함유하는 혼합물 제품(SBJ, 22brix)을 시료로 사용하였음. 비교군으로 숙취음료 여명808<sup>®</sup>(YM808)은 시중에서 구입(14 Brix)하여 감압 농축(30 Brix)한 것과, 황칠나무 추출물을 제외한 모든 추출 농축물을 SBJ와 동일하게 혼합하여 제조한 것을 비교군(SBJ)으로 실험에 사용하였음

#### ② 세포배양 및 Cell viability

간 보호 효과를 확인하기 위해 인간 간암세포주인 HepG2 cell을 실험에 사용하였음. 세포의 성장과 cell viability 확인을 위하여 96-well cell culture plate에 HepG2 세포를 배지 100 μL에 2×10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 각 well에 분주하여 24시간 배양한 다음 혼합물(SBJ 및 SBJ)을 다양한 농도로 희석하여 처리하였고, 2시간 후 300 mM의 ethanol을 처리하였음. 24시간 배양한 후 MTT와 LDH를 측정하여 세포의 생존율 및 손상 정도를 확인하였음

#### ③ 실험동물 설계 및 처치

실험동물은 SD rat(Sprague Dawley, male) 6주령을 (주)샘타코(Osan, Korea)에서 구입하였으며, 7일 동안 순화 후 이상이 없는 개체를 선별하여 실험을 진행하였음. 실험동물은 1주일 동안 사육환경에 적응시킨 후 5그룹으로 10마리씩 동인한 체중 평균을 갖는 정상군(CTL), 알코올 투여군(EtOH), SBJ 혼합물 저농도 투여군(2 mL/kg

body weight/day, SBJ-L), SBJ 혼합물 고농도 투여군(4 mL/kg body weight/day, SBJ-H), 양성대조군로는 기존의 타사제품으로 숙취음료 제품군인 YM808 투여군 (PCTL)으로 분리하였음(Table 1). 사료 섭취로 인한 위장관의 알코올 흡수 방해를 막기 위해 시료 및 알코올 투여 전 16시간 동안 절식시켰음

알코올 투여를 통한 숙취를 유발하기 위하여 Ethanol(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 체중 kg 당 2.3 g 내지 4.6 g 수준으로 경구 투여 하였음. 첫째 날은 생리식염수(saline) 또는 SBJ 혼합물만 전처리 경구 투여하였고, 둘째와 셋째날 은 saline 또는 SBJ 혼합물을 경구 투여하고 1시간이 경과한 후, 20%(2.3 g/kg body weight/day) 알코올(w/v)을 경구 투여 하였음. 시험 마지막 날은 시험물질 투여 16시간 전 절식하고, 시험물질 투여 1시간 후 40%(4.6 g/kg body weight/day) 알코올 (w/v)을 경구 투여 하였음

**Table 1. Experimental design of animals**

(N=10)

Groups	Treatment
CTL	saline + saline
EtOH	Ethanol + saline
SBJ-L	Ethanol + SBJ 2 mL/kg B.W./day
SBJ-H	Ethanol + SBJ 4 mL/kg B.W./day
PCTL	Ethanol + YM808 6.2 mL/kg B.W./day

④ 혈중 알코올 농도 측정

혈장에 함유되어 있는 알코올 측정은 시간별로 채혈한 혈액의 2배 양의 10% trichloroacetic acid로 처리하여 단백질을 변성시켜서 1,000 ×g(4℃)에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 취하여 혈장 중의 알코올 농도는 알코올 측정 kit(Biovision, Mipitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였음

⑤ 간기능 지표 효소 활성 측정

혈중 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), LDH (lactate dehydrogenase)는 자동생화학분석기(DRI-CHEM NX 500i, Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하여 U/L로 제시하였음

⑥ 간조직의 ADH 및 ALDH 활성 측정

ADH(alcohol dehydrogenase)의 활성 측정은 ADH activity colorimetric assay kit(Biovision, Mipitas, CA, USA)을 이용하여 측정하였으며, ALDH(aldehyde

dehydrogenase) 활성측정은 ALDH activity colorimetric assay kit(Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 각 kit에서 제시한 계산식을 이용하여 mU/mL로 제시하였음

⑦ 간 조직 중 항산화 효소의 활성 측정

간 0.1 g을 각각 취하여 생리식염수로 씻은 후 여과제로 물기를 제거하고, 0.25 M sucrose 용액을 가하여 병냉하에서 균질화한 후 600 ×g(4°C)에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 분리하여 실험에 사용하였음. SOD 측정은 ELISA kit(BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 측정하였으며, WST-1 용액, SOD 효소용액과 혼합하여 20분간 37°C에서 반응시킨 후 450 nm에서 측정하였음. glutathione S-transferase(GST), reduced glutathione(GSH), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) 함량 및 활성 측정은 BioVision(Milpitas, CA, USA)사의 kit를 이용하였으며, GR(glutathione reductase)는 Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)사의 kit를 이용하여 nmol/min/mL로 계산하여 표기하였음

⑧ Malondialdehyde(MDA) 측정

간 조직 1 g당 1.15% KCl용액 9 mL을 가하여 병냉하에서 마쇄한 균질액을 얻었으며, 600 ×g(4°C)에서 15분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층액을 얻었음. 상층액 0.1 mL에 8.1% SDS용액을 0.2 mL 가하고 20% acetic acid solution을 1.5 mL 가하여 0.8% thiobarbituric acid(TBA)를 1.5 mL 가한 후 총 4 mL이 되도록 맞춘 후 95°C에서 60분간 반응한 후 MDA 측정 kit(BioVision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 532 nm에서 측정하고 MDA 표준곡선에 따라 nmol/mg으로 표기하였음

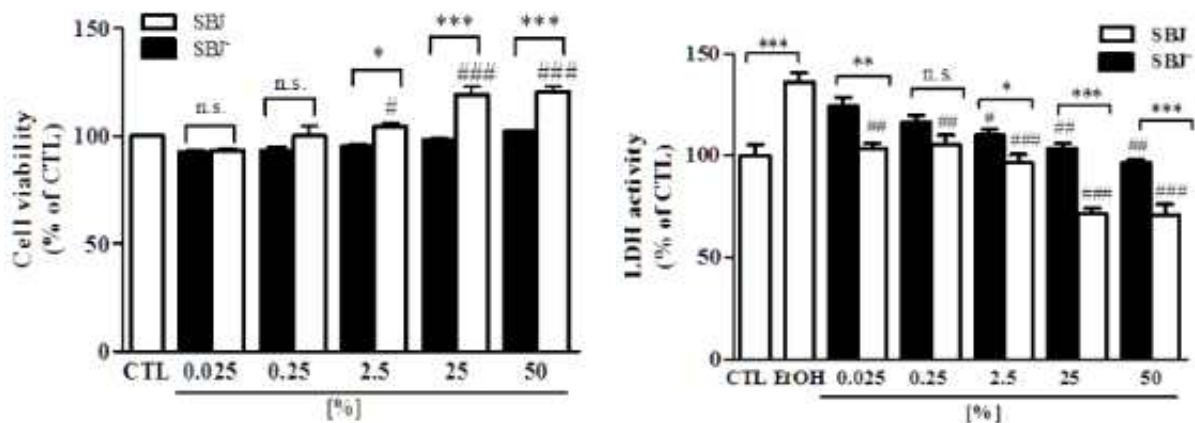
(2) 결과

① *In vitro*에서 알코올 처리에 의한 간세포 보호효과

HepG2 세포주를 이용하여 황칠나무 추출물을 함유한 SBJ 혼합물을 희석하여 세포생존율을 확인한 결과, 50% 희석한 농도의 경우에도 독성은 나타나지 않았으며, 2.5% 희석한 농도에서부터 약간씩 간세포가 증식하는 결과를 보였음. 이러한 결과는 Yoon 등이 보고한 검정쌀이 산화적 스트레스로 세포사멸을 유발한 HepG2 세포주에서 세포 보호 작용이 있음을 보고한 연구에서 검정쌀의 세포독성 여부를 판단하기 위해 실시한 검정쌀 단독 처리군에서 HepG2 세포주가 증식하였고 이러한 결과는 본 연구의 SBJ 혼합물 단독 처리한 결과와 유사한 결과임. 이러한 결과는 검정쌀 추출물에 포함된 phytochemical들의 작용으로, 이러한 물질들의 전처리로 인한 산화적 스트레스를 극복하기 위해 ROS 생성 등을 미리 억제하였기 때문에 세포 증식효과가 발생하였다고 보고하였음. 이는 SBJ 혼합물이 간세포에 독성을 보이지 않으며 오히려 간세포의 항산화 능력 강화에 따른 간 보호 효과가 있음을 시사함. 또한 황칠나무

추출물을 제외한 추출 농축물을 함유한 SBJ 혼합물을 같은 농도로 처리하였을 경우에도 50% 희석한 농도까지 독성을 보이지 않았음. 그러나 SBJ에서 관찰되었던 간세포 증식 효과는 SBJ 혼합물에서는 보이지 않았음. 따라서 SBJ 혼합물에서의 간세포 증식효과는 혼합물 중 황칠나무 추출물에 의한 것으로 사료됨. 이를 토대로 독성이 없는 농도 범위로 SBJ 혼합물을 0.025-50% 희석배수로 희석하여 실험을 진행하였음. 간세포 보호효과를 *in vitro*로 확인하기 위하여 SBJ 혼합물과 대조군으로 SBJ 혼합물을 농도별로 전 처리한 후 300 mM 알코올로 독성을 유발하여 세포막 손상 시 세포 배지에 방출되는 LDH의 함량을 측정된 결과(Fig. 1), 알코올에 의해 CTL 대비 36.2%( $p<0.001$ ) 수준으로 증가한 것을 확인하였음. SBJ 혼합물은 농도 의존적이며 유의적으로( $p<0.01$ ) 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 그러나 SBJ 혼합물에는 농도 의존적이며, SBJ 혼합물 보다 더욱 유의적으로( $p<0.001$ ) 감소하는 것을 확인하였고 이를 통해, SBJ 혼합물의 알코올에 대한 간세포 보호효과를 확인하였음. 이러한 결과는 우리의 사전연구에서 황칠나무 물추출물이 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 수준에서 알코올에 의한 세포손상을 유의하게 억제하였음을 보고한 것과 유사한 농도의 수준으로 기존의 연구결과와 같은 결과로 볼 수 있음

본 연구결과 황칠나무 추출물을 함유한 SBJ 혼합물은 알코올로 유도된 독성으로 유발된 간세포 손상에 대한 보호효과가 있는 것으로 확인되었으며, 숙취개선효과를 확인하기 위하여 *in vivo* 상에서 알코올을 투여한 실험동물에 미치는 영향을 확인하였음



**Fig. 1. Hepatoprotective effects of SBJ extracts on ethanol (300 mM)-induced apoptosis in Hep G2 cells. (A) Cell viability confirmed by MTT assay; (B) LDH activity assay.**

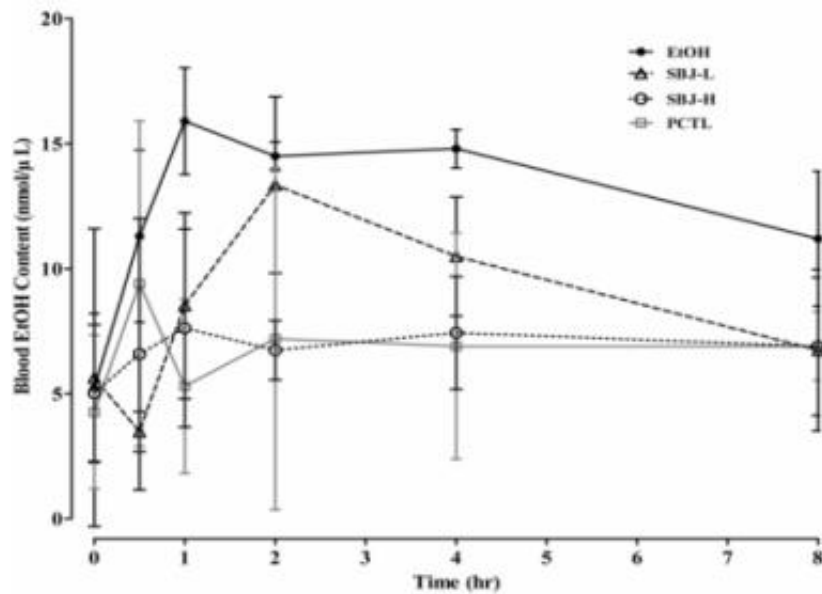
Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$ , \* $p<0.05$ , ### $p<0.001$  ## $p<0.01$  and # $p<0.05$ . Statistical significance was tested with the Dunnett's Multiple Comparison test. CTL: control group, EtOH: ethanol treated. All data were representative of five independent experiments.

## ② 혈중 알코올 농도

흰쥐를 이용한 숙취 연구 모델에서 SBJ 혼합물을 투여하고 1시간 후에 알코올을

경구 투여한 후 시간 경과에 따른 혈중 알코올 농도에 미치는 효과를 알아보기 위해 SBJ 혼합물을 저농도(2 mL/kg body weight/day)와 고농도(4 mL/kg body weight/day)로 경구 투여 하고 1시간 후 40% 알코올(w/v)을 경구 투여 하여 0.5, 1, 2, 4, 8시간 경과에 따라 혈장을 획득하여 혈장 내 알코올 농도를 측정 한 결과는 Fig. 2에 나타내었음

음주 시 알코올은 소화기의 점막을 통해 빠르게 흡수되어 5분 내에 혈중에 나타나기 시작하며, 30-90분 사이에 최대농도를 보이는 것으로 알려져 있음. 알코올 투여군의 혈장 알코올 수준은 섭취 후 1시간까지 지속적으로 증가하다가(15.90±2.13 mM), 서서히 감소하는 경향을 나타내었음. SBJ-L(13.35±3.53 mM; 2 h), SBJ-H(9.40±6.5 mM; 0.5 h)과 PCTL(7.62±3.96 mM; 1 h)은 알코올 투여군에 비해 혈중 알코올 농도가 크게 증가하지 않는 경향이 관찰되었음. SBJ-L군은 0.5, 1시간에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었음(3.48±0.80 mM, 8.52±3.72 mM, p<0.01). SBJ-H군은 1, 2, 4시간에서 알코올 투여군과 유의적 차이를 보였으며(5.30±3.48 mM; p<0.005, 7.20±6.84 mM; p<0.01, 6.90±4.53 mM; p<0.01), PCTL군 또한 1, 2, 4시간에서 유의적 차이가 관찰되었음(7.62±3.968 mM; p<0.01, 6.74±1.19 mM; p<0.01, 7.43±2.26 mM; p<0.05). 따라서 저농도 SBJ 및 고농도 SBJ 혼합물 투여군이 혈중 알코올 농도를 저하시키는 효과가 있음을 알 수 있으며 이는 알코올 분해 효소를 촉진시켜 나타나는 결과로 생각됨



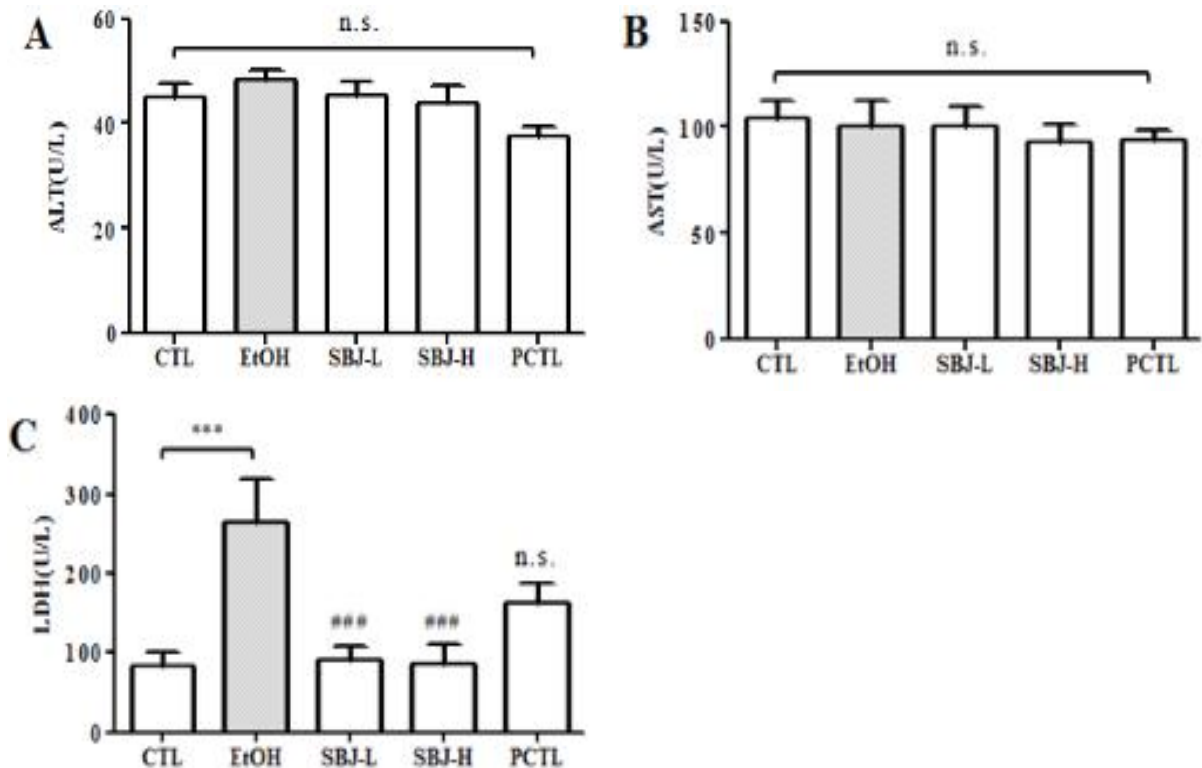
**Fig. 2. Effects of the SBJ on ethanol levels in blood after administration of ethanol in SD rat.**

Data are expressed as mean±SD. #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.005 vs EtOH. Statistical significance was tested with the 2way ANOVA test. All data were representative of five independent experiments.

③ 혈장 중 간기능 지표 효소활성

CTL군과 EtOH군, SBJ군 및 PCTL군의 혈장 ALT, AST 및 LDH 결과는 Fig 3 와 같음. 알코올을 지속적으로 섭취하면 간 손상이 유발되며, 간세포 손상은 수송기능 및 막 투과성에 변화를 초래하여 결국 세포로부터 효소들을 혈액으로 방출시켜 AST 및 ALT의 수치도 높아짐. 따라서 ALT 및 AST의 순환계로의 많은 방출은 알코올 또는 약물에 의한 독성화 과정동안에 간 조직막에 심각한 손상이 있었음을 의미함. 본 연구에서는 혈중 ALT, AST 인자들은 알코올 및 시료 처리에 의한 유의적인 차이가 관찰되지 않았고, 이는 단기간의 알코올 처리로 인한 간 손상 지표인자인 ALT, AST의 큰 변화가 나타나지 않은 Park 등의 연구와 유사한 결과를 보여 본 실험에서의 단기간 알코올 투여에 의한 AST 및 ALT의 방출 증가가 이뤄지지 않음을 시사하며, 특히 SBJ 혼합물 또한 간 손상을 유발하는 독성이 없어 안전한 건강기능식품 소재로서 활용이 가능하다는 것을 확인하였음

반면, LDH (Fig. 3C)는 EtOH군에서 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였으며, SBJ 혼합물투여로 LDH의 수치가 CTL군과 유사한 수준( $p < 0.005$ )으로 감소되는 것을 확인하였음. PCTL군 또한 LDH를 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았음. Van Waes의 연구에 따르면 LDH 활성은 심장질환에서나 알코올성 간질환이 발생하였을 때 증가하고, 알코올 섭취를 중지하면 정상화 된다고 보고하였음. 섭취 중단에 따른 LDH 수치의 정상화는 본 연구에서 확인하지 않았지만, 알코올 섭취에 따른 LDH 증가와 SBJ 혼합물 투여로 LDH 감소효과를 확인하였음



**Fig. 3. Biochemistry index concentration after administration of ethanol in SD rats.**

A, ALT; B, AST; C, LDH contents in serum.

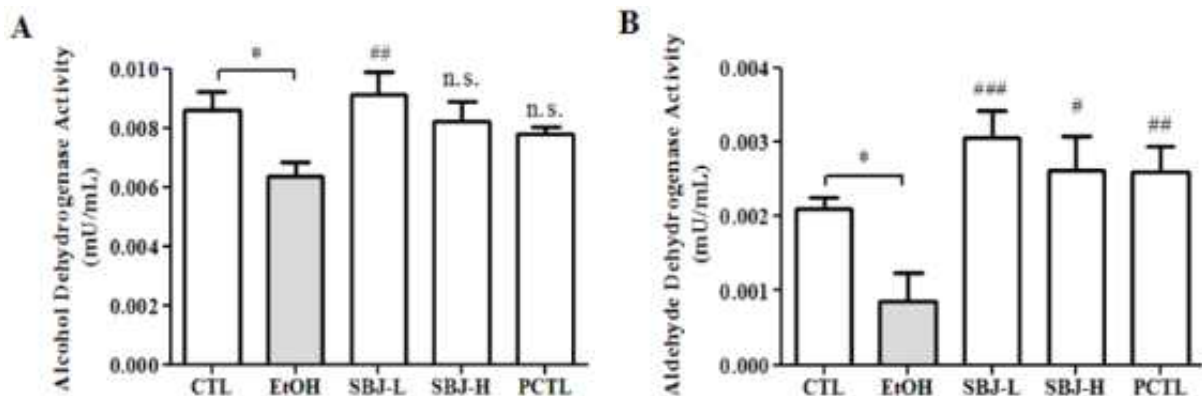
Data are expressed as mean±SEM. \*\*\*p<0.005 vs CTL and ###p<0.005 vs EtOH. Statistical significance was tested with the Dunnett's Multiple Comparison test. All data were representative of ten independent experiments.

④ 간 조직의 ADH 및 ALDH 활성 측정

알코올 섭취에 따른 알코올 대사효소에 SBJ 혼합물의 섭취가 미치는 효과를 알아보기 위해 간 조직의 ADH와 ALDH 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었음. CTL군의 ADH 활성은 0.0086±0.0006 mU/mL(p<0.05)로 나타났고, EtOH군은 0.0064±0.0005 mU/mL로 통계적으로 낮아진 것으로 보아 알코올 섭취 후 간에서 ADH 및 ALDH가 작용하였음을 알 수 있었음. SBJ-H군의 ADH 활성은 EtOH군에 비해 유의적인 차이를 볼 수 없었지만 오히려 저농도 처리군인 SBJ-L군은 0.0091±0.0007 mU/mL(p<0.01)로 EtOH군보다 통계적으로 높은 ADH 활성을 나타내었음

CTL군의 ALDH 활성은 0.0020±0.0001 mU/mL로 나타났고, EtOH군은 0.0010±0.0004 mU/mL로 CTL군보다 통계적으로 낮은 활성을 나타내었음. SBJ-L군은 0.0030±0.0004 mU/mL로 EtOH군에 통계적으로 높은 ALDH 활성을 나타내었음 (p<0.005). SBJ-H군은 0.0025±0.0005 mU/mL(p<0.05)로 PCTL군은 0.0029±0.0002 mU/mL(p<0.01)으로 모두 EtOH군과 유의적인 차이를 보였음

SBJ 혼합물 투여에 의해 ADH의 활성 보다는 ALDH 활성이 증가되어 숙취해소에 더 큰 영향을 미치는 것을 확인하여 SBJ 혼합물이 숙취해소 소재로서 활용도가 매우 높을 것으로 판단됨



**Fig. 4. The changes of ADH and ALDH concentrations in blood after administration of ethanol in SD rat.**

A, alcohol dehydrogenase(ADH); B, aldehyde dehydrogenase(ALDH) in serum of SD rat.

Data are expressed as mean±SEM. \*p<0.05 vs CTL and #p<0.05 ##p<0.01 and ###p<0.005 vs EtOH. Statistical significance was tested with the Dunnett's Multiple Comparison test. All data were representative of ten independent experiments.



⑤ 항산화 효소 및 MDA에 미치는 영향

알코올 투여 쥐에 대한 SBJ 혼합물이 간조직의 항산화 효소계에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었음. SOD의 활성(Fig. 5A)은 알코올 섭취에 의해 감소하며, SBJ 혼합물 투여에 의하여 CTL군 수준으로 회복하는 것을 확인하였음. 특히 고농도에서는 유의적인 차이가 확인되었음( $p < 0.05$ )

CAT 활성은(Fig. 5B) CTL군과 비교했을 때, EtOH군 및 SBJ 혼합물 투여군간 큰 차이가 발견되지 않은 반면, GPx 활성은(Fig. 5C) EtOH군에서 13.2% 수준이 감소하는 경향이 관찰되었으며, SBJ 혼합물에 의하여 농도의존적으로 회복되는 것이 확인되었음. 특히 SBJ-H군은 유의적( $p < 0.05$ ) 수준으로 회복시키는 것이 관찰되었으며, 이는  $H_2O_2$  제거가 CAT활성에 의해서라기보다는 GPx 활성에 의존한 것으로 사료됨

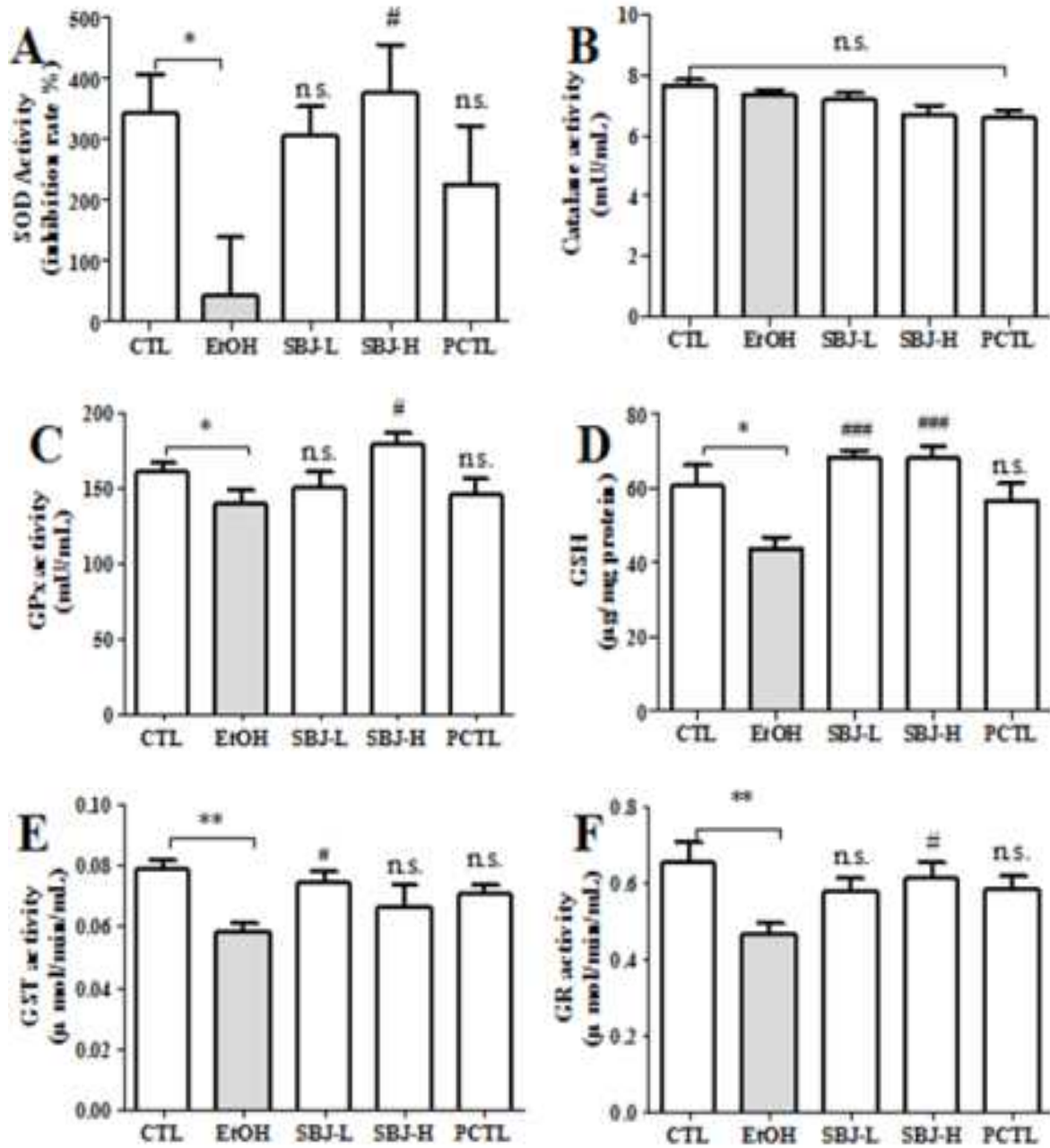
GSH를 측정된 결과(Fig. 5D), EtOH군에서 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), SBJ 혼합물 투여에 의하여 유의적으로 크게 증가하는 것( $p < 0.005$ )을 확인하여, SBJ 혼합물이 GSH의 유지 및 회복에 큰 역할을 수행할 것으로 예상됨

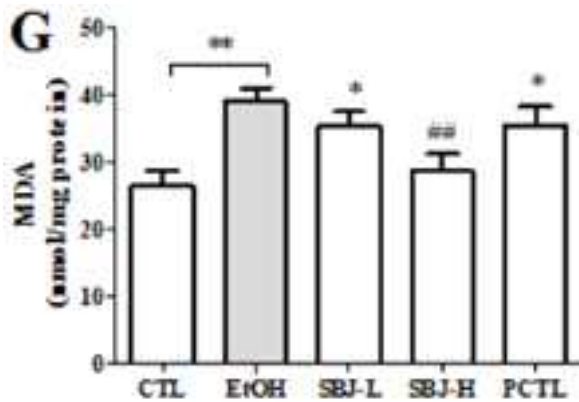
간 조직 내 oxygen free radical 해독계 효소로 알려진 GST의 활성(Fig. 5E)은 EtOH군이 CTL군과 비교하여 26.1% 정도 감소하여 유의적인 감소( $p < 0.01$ )경향이 관찰되었으며, SBJ-L, SBJ-H 및 PCTL군에서 모두 EtOH군에 비해 회복하는 경향을 확인하였음. 특히 SBJ-L군은 EtOH군에 비하여 유의적인 수준으로 회복하였으며, GR의 활성(Fig. 5F) 또한 알코올치리에 의하여 유의적으로 감소하고 SBJ 혼합물에 의하여 회복하며, 특히 고농도에서는 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음( $p < 0.05$ )

지질과산화 반응은 자유 라디칼 연쇄 반응 메커니즘에 의한 세포막 지질의 산화성 열화 과정을 통해 세포 손상을 초래함. 그것은 불안정한 산화 생성물을 생성하는데 그중에서 가장 일반적인 것은 MDA임. 간조직에서 MDA 생성 역시 항산화 효소의 변화와 유사한 경향을 보여(Fig. 5G), EtOH군은 CTL군에 비해 유의적으로 과산화지질이 증가하였으며, SBJ 혼합물 투여에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였음( $p < 0.05$ )

Kurose 등 및 Wu와 Cederbaum은 알코올에 의한 간세포 독성은 ROS의 증가와 항산화활성의 감소와 관련이 있다고 보고한 것과 같이, EtOH군은 CTL군보다 SOD, GST, GPx, GST 및 GR의 활성 및 GSH가 유의적으로 낮아졌으며, SBJ 혼합물 투여군인 SBJ-L군과 SBJ-H군에서 다시 유의적으로 상승하는 경향을 보였음. 또한 지질과산화는 알코올에 의해 증가하였으나 SBJ 혼합물에 의하여 회복하는 경향을 확인하였음. 본 연구에서 검증한 SBJ 혼합물의 주요성분인 황칠나무 추출물을 단독으로 연구한 선행연구 결과에 따르면 알코올에 의한 간손상 동물모델에서 황칠나무 추출물 100 mg/kg 투여에 따라 MDA 생성이 유의적으로 억제되었으며 CYP2E1의 발현을 유의적으로 억제함으로써 알코올성 간손상을 억제함을 보고하였고, 본 연구에서 투여

한 SBJ 혼합물에 포함된 황칠나무 추출물과 유효 농도 범위가 유사하여, SBJ 혼합물에서의 주원료인 황칠나무 추출물이 알코올성 간손상을 억제시키는 주원료일 것으로 사료됨





**Fig. 5. Effect of oral administration of SBJ on enzymatic antioxidant activities of SD rat in acute alcohol exposure.**

A, superoxide dismutase; B, catalase; C, glutathione peroxidase; D, glutathione; E, glutathione-S-transferase; F, glutathione reductase; G, malondialdehyde contents in liver.

Data are expressed as mean±SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs CTL and #p<0.05, ##p<0.01 ###p<0.005 vs EtOH. Statistical significance was tested with the Dunnett's Multiple Comparison test. All data were representative of ten independent experiments.

### (3) 결론

황칠나무 추출물을 포함한 혼합물의 *in vitro* 및 *in vivo*에서 알코올 유도된 간 손상에 대한 보호효과를 검토하였음. HepG2세포에서 300 mM 알코올과 SBJ 혼합물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 LDH 수치가 감소하였으며, *In vivo*에서 SBJ 혼합물의 보호효과를 확인하고자 흰쥐에 알코올과 SBJ 혼합물을 투여한 결과, 알코올 투여 후 1 시간까지 급격하게 혈중 알코올 수치가 EtOH군에서 증가하는 것이 관찰되었으며, SBJ 혼합물 투여군은 유의적인 차이로 감소되었음이 관찰되었으며 또한 농도 의존적인 경향을 확인하였음. ADH 및 ALDH 활성의 증가는 SBJ 혼합물의 알코올 분해 및 대사산물의 제거 활성에 기여할 것으로 예상됨. 뿐만 아니라, 알코올에 의하여 증가한 LDH의 농도가 대조군과 유사한 수준으로 유지하는 것을 확인하였으며, GST, SOD, GPx 및 reduced glutathione와 같은 항산화 인자 및 효소의 활성은 대조군보다 EtOH군이 유의적으로 감소했으며, SBJ 혼합물에 의해 개선되는 경향을 관찰하였음. 이를 통해 SBJ 혼합물은 ADH, ALDH 활성 증가 및 항산화 방어계를 향상시킴으로써 산화적 스트레스 감소를 통한 간보호 효과가 있는 것으로 생각됨

### 3절. 연구개발성과

#### 1. 연구개발 성과 목표 대비 실적

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시			
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF		
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건				
가중치	10				50	10		10						10	5			5			
최종목표	1	1*		2	10	3	210	-	3	-	2	2	1	-	6	5	4	-	2	-	
1 차 년 도	목 표	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
	실 적	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
2 차 년 도	목 표	1	-	-	-	2	110	-	1	-	1	-	-	-	3	2	2	-	1	-	
	실 적	1	-	-	-	2	110	-	1	-	1	-	-	-	3	2	2	-	1	-	
3 차 년 도	목 표	-	1	-	2	10	1	100	-	2	-	1	2	1	-	3	2	2	-	1	-
	실 적	-	1	-	4	24.5	1	128.7	-	2	-	1	2	2	-	4	3	2	-	1	-
소 계	목 표	1	1*	-	2	10	3	210	-	3	-	2	2	1	-	6	5	4	-	2	-
	실 적	1	1	-	4	24.5	4	238.7	-	3	-	2	2	2	-	7	6	4	-	2	-
종료 1차년도	-	1	-	-	-	-	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 2차년도	-	-	-	-	-	-	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 3차년도	-	-	-	-	-	-	220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 4차년도	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
종료 5차년도	-	-	-	-	-	-	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
소 계	0	1	-	0	0	0	1,120	-	0	-	0	0	0	-	0	0		0	0		
합 계	1	2	-	4	24.5	3	1,358.7	-	3	-	2	2	2	-	7	6	4	0	2		

## 2. 연구개발 성과 세부내역

### 가. 과학적 성과

논문(국내외 전문학술지) 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	흰쥐에서 황칠나무 열수 추출물을 포함한 혼합물의 혈중 알코올 농도와 숙취 해소 효과	한국키티닌토산학회지	나주련	23(4)	대한민국	한국키티닌토산학회	비SCI	2018.12.19
2	황칠나무 잎 열수추출물 섭취가 아토피 동물모델 NC/ Nga mice에서 면역 조절에 미치는 영향	한국식품영양과학회	이민희		대한민국	한국식품영양과학회	비SCI	2월7일 투고예정
3	<i>Dendropanax moribifera</i> Branch Water extract (DBW) increase the immune-enhancing activity of in RAW264.7 macrophage cells and mouse primary Splenocytes	J. Med. Food	송지혜		대한민국	한국식품영양과학회	SCI	2월11일 투고예정
4	Ameliorative effects of <i>Dendropanax moribifera</i> on cognitive impairment via enhancing cholinergic functions and BDNF expression in $\beta$ -amyloid-induced mice	J. Med. Food	김미정		대한민국	한국식품영양과학회	SCI	2월 (accepted)

국내 및 국제 학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Transforming the future through science (Experimental Biology, 2017)	김혜숙	2017.04.24	McCormick place convention center	미국
2	The role of food scientists & food industries for food security	김미정	2017.06.23.	제주컨벤션센터	대한민국
3	Translational Food & Nutrition Research for Healthy Life	최경철	2017.11.09	경주화백컨벤션센터	대한민국
4	Food,Nutrition and Health: human microbiome	손선아	2018.11.01	BEXCO	대한민국
5	Food,Nutrition and Health: human microbiome	송지혜	2018.11.02	BEXCO	대한민국
6	Food,Nutrition and Health: human microbiome	김미정	2018.11.02	BEXCO	대한민국
7	Food,Nutrition and Health: human microbiome	김다경	2018.11.02	BEXCO	대한민국

### 나. 기술적 성과

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	다량의 총염록소 성분 및 케르세틴 함량을 갖는 비증숙 황칠나무 추출물 또는 이의 분말을 제조하는 제조방법 및 이를 함유한 건강기능식품	대한민국	농업회사법인 (주) 제이웰바이오팜	2017.08.25	10-2017-0107814				100
2	다량의 총염록소 성분 및 케르세틴 함량을 갖는 증숙 황칠나무 추출물 또는 이의 분말을 제조하는 제조방법 및 이를 함유한 건강기능식품	대한민국	농업회사법인 (주) 제이웰바이오팜	2016.03.16	10-2016-0031429	농업회사법인 (주) 제이웰바이오팜	2018.03.05	10-1837067	100



- 저작권(소프트웨어, 서적 등) : 해당없음
- 신기술 지정 : 해당없음
- 기술 및 제품 인증

No	인증분야	인증기관	인증내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증번호		
1	건강기능식품 품목제조신고	광주지방식품의약품안전청	천년황칠 미인	201600100114	2017.11.22	대한민국
2	건강기능식품 품목제조신고	광주지방식품의약품안전청	제이웰레드퀸	201600100115	2018.06.28	대한민국



표준화 : 해당없음

다. 경제적 성과

시제품 제작 : 해당없음

기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	직접실시	황칠나무잎 분말을 함유하는 체지방 감소 건강기능식품 개발	제이웰 바이오팜	2018.12.31	24,500,000원	
2	직접실시	황칠나무 추출물을 함유하는 숙취해소 식품개발	제이웰 바이오팜	2018.12.31		
3	직접실시	황칠나무잎 분말을 함유하는 여성갱년기 건강기능식품 개발	제이웰 바이오팜	2018.12.31		
4	직접실시	황칠나무잎을 함유하는 고행차 개발	제이웰 바이오팜	2018.12.31		

사업화 투자실적 : 해당없음

사업화 현황

(단위 : 명, 년)





□ 고용 창출

No	사업화명	사업화업체	2016년	2017년	2018년	합계
1		제이웰바이오팜	0 명	1 명	2 명	3 명
합계			0 명	1 명	2 명	3 명

□ 산업지원(기술지도) : 해당없음

라. 사회적 성과

□ 법령반영 : 해당없음

□ 정책활용 내역 : 해당없음

□ 설계기준/시방서/지침/가이드라인에 반영 : 해당없음

□ 전문연구 인력양성

No	기준년도	현 황										
		학위별				성별		지역별				
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	2018	1	1				2	2				
2	2019	1	1				2	2				

□ 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	한국식품영양과학회 추계대회	Health food industrialization by utilizing Jeju herb	제주 국제컨벤션 센터	1	2016.10.01. 15:40~17:40 (120분)	20
2	친환경 바이오 융합 인력양성사업	생약자원을 이용한 건강기능식품 소재개발	목포대학교 생약자원학과	1	2017.05.12 10:30~12:00 (90분)	20
3	자체교육	건강기능식품 소재개발에 관한 지도(개별인정형 건기식 원료개발)	(주)산들촌 회의실	1	2017.05.29 17:00~18:00 (60분)	20
4	자체교육	우리나라 바이오산업의 현황과 건강기능식품개발	전남대학교 식품영양학과	1	2018.04.12. 15:00~17:00 (120분)	20
5	자체교육	황칠나무를 이용한 제품개발에 관한 지도 및 마케팅	제이웰그린	1	2018.04.17. 13:00~14:00 (60분)	30
6	자체교육	건강기능식품 갱년기개선 원료 개발에 관한 교육	제이웰그린	1	2018.05.15. 17:00~18:00 (60분)	40

- 타 연구개발사업에의 활용 : 해당없음
- 국제화 협력성과 : 해당없음
- 기술무역 : 해당없음
- 홍보실적

No	홍보유형	매체명	제목	일자
1	박람회	(사)한국유기농업협회	제16회 친환경유기농무역박람회 (식품 및 마스크팩)	2017.08.17
2	지방일간지	NewsWire	제이 웰바이오팜 '제주 특산자원 황칠나무를 이용한 숙취해소제' 본격산업화	2018.12.26



- 포상 및 수상실적 : 해당없음

### 3. 사업화 성과 및 매출실적

#### 가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	2.38 억원	
			향후 3년간 매출	15 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	2 억원	
			향후 3년간 매출	10 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.02 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 1 % 국외 : 0.01 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 0.005 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			10 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			6 위

나. 사업화 계획 및 매출

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2015. 09. 05 ~ 2018. 12. 31(28개월)			
	소요예산(백만원)	875			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		2.38	15	35	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.02	1	5
국외		0	0.01	0.03	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 황칠나무추출물을 이용한 건강기능식품 원료 및 제품 산업화</li> <li>- 황칠나무추출물을 함유하고 있는 숙취해소 제품 산업화</li> </ul>			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0	0	0	
	수 출	0	10	30	

# 제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 1절. 최종목표

- 황칠나무의 안정적인 원료 확보를 위한 씨앗 발아율 증대와 뿌리무름병 / 입고병 예방기술 개발
- 황칠나무 원료 채취와 가공 기술 구축
- 황칠나무 새잎차 가공 기술 개발
- 황칠나무의 부위별 기능평가
  - 황칠나무 추출물의 피부건강 기능평가
  - 황칠나무 추출물의 항치매 기능평가
  - 황칠나무 추출물의 면역증강 기능평가
- 건강기능식품 원료 황칠나무잎 분말을 함유한 복합제품으로 건강기능식품을 산업화

## 2절. 목표 달성여부

### 1. 목표달성도

가. 황칠나무 산업화 원료 기반구축과 함유제품 산업화(주관기관 : 제이웰바이오팜)

구분	평가의 착안점 및 척도			
	세부연구목표	연구개발 수행결과	척도 (점수)	달성도 (%)
1 차년도	황칠나무 씨앗채취, 묘목 뿌리무름병 / 입고병 예방 재배 기술 개발	• 황칠나무 씨앗채취(제주, 전남) 및 뿌리무름병 / 입고병 예방 육묘기술 개발 계획수립	15	100
	식품 및 건강기능식품 원료로 사용가능한 표준화된 원료 가공기술 개발	• 제주 가시리 농장 시범포 조성 • 원료 건조 후 파쇄 및 건조 공정 개선 • 4/4분기 채취한 잎, 가지, 혼합(잎+가지), 묘목 원재료 지표성분(Ginsenoside 및 Quercetin) 정량 완료	20	100
	황칠나무 잎을 이용한 황칠나무 새잎차(튀음차) 시제품 생산	• 제조공정 중 유념횟수 및 건조시간을 달리한 시제품 제조완료	25	100
	건강기능식품 원료 황칠나무잎 분말을 이용한 피부건강·체지방감소 건강기능식품 제품개발	• 황칠나무잎 분말, 히알루론산, 비타민 C, 비타민 E를 함유 건강기능식품 시제품 제작 완료	30	100
	황칠나무 각 부위별 연구시료 12종 제작	• 연구시료 12종 생산 및 배포완료	10	100
2차	황칠나무 씨앗채취, 묘목 뿌리	• 제주, 전남 고흥지역의 씨앗 발아 완료	10	100

년도	리무름병 / 입고병 예방 재배 기술 개발	(1차) • 10년생 이상의 성목에서 채취한 황칠나무 씨앗을 건사저온저장방법으로 보관하여 파종하는 방법이 적합하였음		
	식품 및 건강기능식품 원료로 사용가능한 표준화된 원료 가공기술 개발	• 제주 가시리 농장에 4년생 황칠나무의 지상부 70cm, 30cm로 절단 후 시범포 조성하여 재배 • 황칠나무 잎, 가지, 혼합(잎+가지)을 채취하였음. 절단 및 건조 공정 개발완료하였음 • 1/4~3/4분기 채취한 잎, 가지 지표성분(Ginsenoside Rg <sub>1</sub> , Rb <sub>1</sub> , Rg <sub>3</sub> 및 Quercetin) 정량 완료	10	100
	황칠나무 잎을 이용한 황칠나무 새잎차(뉘음차) 시제품 생산	• 제조공정 표준화 • 중금속 4종, 잔류농약 102종 공인성적서 발급 • '천년황칠차' 품목제조보고 완료	15	100
	건강기능식품 원료 황칠나무 잎 분말을 이용한 피부건강 · 체지방감소 건강기능식품 제품개발	• 피부건강 및 체지방 감소 소형환제 가속시험을 통한 유통기한 설정 시험 완료 • 공인시험성적 발급 후 품목제조신고 완료(제품명 : 천년황칠 미인)	30	100
	건강기능식품 원료 황칠나무 잎 분말을 이용한 여성갱년기 개선 건강기능식품 제품개발	• 시제품(소형환제) 제작 • 3온도(25, 35, 45℃)에서 6개월 가속시험을 통한 유통기한 설정시험 완료	20	100
	활성 보이는 황칠나무 추출물 생산 및 지표성분 분석	• 피부건강(황칠나무 잎 물추출물), 항치매(황칠나무 잎 20% 주정추출물), 면역증강(황칠나무 가지 물추출물) 활성 황칠나무 추출물 제작 완료 • 황칠나무 잎 물 추출물, 황칠나무 잎 20% 주정추출물, 황칠나무 가지 물추출물 모두 Quercetin이 가장 많이 검출되어 지표성분으로 설정, 분석하였음	15	100
3차년도	황칠나무 씨앗 채취, 뿌리무름병 / 입고병 예방 육묘기술 표준화	• 제주에서 씨앗을 채취하여 2차 발아 연구를 수행하였음(발아율 77%) • 1차년도 발아 연구 결과물을 1, 2차 이식하였으며, 노지 재배 적응을 시작하였음	10	100
	분기별 황칠나무 잎차 시생산 및 품질평가	• 황칠나무 잎을 5, 8, 11월 채취하여 새잎차 시생산 • 분기별 생산한 새잎차의 화학물질 및 무기물 분석결과 성적서 발행 후, 해당 결과 학술발표 완료	15	100
	피부건강, 항치매, 면역증강 활성을 가지는 황칠나무 추출물 표준화	• 피부건강(황칠나무 잎 물추출물), 항치매(황칠나무 잎 20% 주정추출물), 면역증강(황칠나무 가지 물추출물) 활성 추출물의 지표성	20	100

		분인 Quercetin 시험법 밸리데이션 완료		
	황칠나무잎 분말을 이용한 피부건강 및 여성갱년기 개선 건강기능식품 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 피부건강, 여성갱년기 개선, 체지방 감소 소형환제 가속시험을 통한 유통기한 설정 시험 완료</li> <li>• 공인시험성적 발급 후 품목제조신고 완료(제품명 : 제이웰레드퀸)</li> </ul>	30	100
	황칠나무 추출물 함유 개발 제품의 알코올 분해(숙취해소) 기능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 황칠나무 추출물을 함유 제품을 개발하고 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>를 통해 숙취해소 및 간보호 활성을 확인하였음</li> <li>• 해당결과를 국내학회지에 게재하였으며, 해당 제품을 출시하였음</li> </ul>	25	100

나. 황칠나무의 피부건강 기능평가(공동연구기관 : 경희대학교)

구분	평가의 착안점 및 척도			
	세부연구목표	연구개발 수행결과	척도 (점수)	달성도 (%)
1 차 년도	아토피 피부염 억제 관련 biomarker 확인	• 유전, 피부장벽, 면역 시스템 등의 관점에서 biomarker 확인 완료	10	100
	추출물의 용매 선정 실험	• 용매선정 위한 용해도 실험 완료	10	100
	추출물의 독성 확인 실험진행 (MTT Assay)	• 세포 생존률 확인 후 안전농도 확인	20	100
	keratinocyte에 추출물 처리하여 cytokines mRNA 발현 측정	• RT PCR 진행하여 cytokines 분비 억제효과 확인	40	100
	keratinocyte에 추출물 처리하여 histamine receptor H1 mRNA 발현 측정	• RT PCR 진행하여 histamine receptor 발현 억제 효과 확인	20	100
2 차 년도	경피피 수분함량측정	• DL0 섭취 시 수분함량 증가	10	100
	혈액지표 평가	• IgG2a 생성 증가 • IgG1, IgE, Histamine 생성 감소	30	100
	T/B 세포 증식능	• T 세포 증식능 증가, B세포 증식능 감소	30	100
	사이토카인 측정	• Th1 cytokine 생성 증가 • Th2 cytokine 생성 감소	30	100
3 차 년도	아토피 피부염 억제 관련 Chemokine mRNA 발현 측정	• RANTES 및 MDC 농도의존적으로 감소	45	100
	아토피 피부염 억제 관련 단백질 측정	• STAT1 및 STAT6 단백질 감소 • JAK1 단백질 감소	55	100

다. 황칠나무의 항치매 기능평가(공동연구기관 : 연세대학교)

구분	평가의 착안점 및 척도			
	세부연구목표	연구개발 수행결과	척도	달성도

			(점수)	(%)
1 차 년도	황칠나무 각 부위별 추출물의 <i>in vitro</i> 항치매 유효성평가	• 황칠나무 부위별 추출물 소재의 라디칼 소거능 확인	10	100
		• 황칠나무 부위별 추출물 소재의 A $\beta$ -peptid에 대한 세포 보호 효과	25	100
		• 황칠나무 부위별 추출물 소재의 A $\beta$ -peptid에 대한 antioxidant system 개선 효과	20	100
		• 황칠나무 부위별 추출물 소재의 acetylcholinesterase(AChE) inhibition 효과	25	100
		• 황칠나무 부위별 추출물 소재의 신경세포 보호 및 발달 효과	20	100
2 차 년도	황칠나무 추출물의 항치매 기능평가	• 황칠나무 잎 20% 주정 추출물의 amyloid beta 생성 억제능 확인	30	100
		• 황칠나무 잎 20% 주정 추출물의 beta secretase 발현 억제 효과 측정	30	100
		• 황칠나무 잎 20% 주정 추출물 대상 1차 유효성 평가 진행	40	100
3 차 년도	황칠나무 추출물의 항치매 기작규명	• <i>In vivo</i> $\beta$ -secretase(BACE-1) 활성 측정 및 A $\beta$ 생성 억제능 확인	15	100
		• 뇌세포 신호전달 분해효소(acetylcholinesterase) 억제능 확인	40	100
		• <i>In vivo</i> 뇌세포 사멸 억제능 평가 (Tunel assay)	15	100
		• <i>In vivo</i> 뇌세포 사멸 관련 항산화 효소 활성 및 관련 인자 발현 확인	30	100

라. 황칠나무의 면역증강 기능평가(공동연구기관 : 울산대학교)

구 분	평가의 착안점 및 척도			
	세부연구목표	연구개발 수행결과	척도 (점수)	달성도 (%)
1 차 년도	황칠나무 각 부위별 추출물의 <i>in vitro</i> 면역증강 유효성평가	• 면역세포에 황칠나무 추출물 처리 후 독성평가	15	100
		• 면역세포에 추출물 처리 후 면역관련 cytokine level 측정	20	100
		• 면역 조절 관련 인자 활성 평가	35	100
		• 면역세포에 추출물 처리 후 NO 효과 측정	30	100
2 차 년도	황칠나무 가지 물 추출물의 <i>in vivo/ex vivo</i> 활성 평가	• 황칠나무 가지 물 추출물의 <i>in vivo</i> 독성평가	15	100
		• 황칠나무 가지 물 추출물의 mouse의 비장세포 활성 측정	20	100
		• 면역 관련 cytokine level 측정	30	100
		• 황칠나무 가지 물 추출물의 LDH assay kit 측정	35	100

3 차 년도	황칠나무 가지 물 추출물의 면역기능 개선 기작 규명	• 황칠나무 가지 물 추출물을 투여한 mouse 혈액에서 LDH 측정하여 <i>in vivo</i> NK 세포 활성 측정 및 분석	40	100
		• 황칠나무 가지 물 추출물에 의한 NK세포 활 성을 확인하여 선천성면역조절 기작 규명	60	100

## 2. 관련 분야 기여도

- 본 연구의 목표 및 성과 등에 입각하여 총 4건의 제품을 상품화 하였음(천년황칠차, 천년황칠 미인, 제이웰 레드퀸, 천년황칠 삼보진). 또한, 특허의 출원 및 등록, 매출, 고용 창출, 홍보 및 교육등의 실적을 달성한 것으로 판단함
- 본 연구의 주관기관인 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜은 황칠나무를 이용한 건강기능식품원료로 유일한 “황칠나무잎 분말”을 보유하고 있으며, 이를 이용하여 본 연구에서는 총 2건(천년황칠 미인, 제이웰 레드퀸)의 건강기능식품을 품목제조신고 하였음. 이러한 결과는 황칠나무를 건강기능식품으로 활용하는 첫 사례임
- 또한, 3차년에는 추가연구로 황칠나무 추출물을 함유한 숙취해소 제품의 숙취해소 및 간보호 활성평가를 완료, 국내학술지에 게재하였음
- 황칠나무를 이용한 활성평가(피부건강, 항치매, 면역증강)를 모두 수행하였으며, 해당 내용을 기반으로 추후, 인체적용시험 등을 수행하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 위한 기초연구자료로 사용가능함

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



## 제 4 장 연구결과의 활용 계획

### 1. 황칠나무 산업화 원료 기반구축과 함유제품 산업화

- 황칠나무 씨앗 발아 및 묘목 육묘 등 재배 기술 등을 황칠나무 재배농가에 전수하여 안정적인 원료재배를 통한 안정적인 소득창출을 제공할 수 있음
- 안정적인 황칠나무 재배는 황칠나무를 원료로 이용하는 식품 및 건강기능식품의 원재료 공급이 가능함
- 황칠나무 잎차를 제조하는 표준제조공정을 구축하였으며, 채취시기를 달리한 새잎차의 화학물질 및 무기물 분석을 통해 채취시기를 결정하고자 하였음. 이러한 결과는 황칠나무 잎을 분류하는 기준을 제시 할 수 있을 것이며, 학술적 자료로 사용가능할 것임
- 주관기관인 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜은 건강기능식품 원료로 “황칠나무잎 분말”을 품목제조신고 하였음. 해당원료를 이용하여, 체지방 감소, 여성 갱년기 개선제품을 유통기한설정 시험을 통해 품목제조신고 완료하였음. 황칠나무잎 분말은 다른 원료와 혼합 시, 여러 가지 활성을 가지는 건강기능식품 제품으로 출시 가능함
- 또한, 본 사업을 통해 연구된 활성(피부건강, 항치매, 면역증강)의 차후 연구로 인체 적용시험 등을 진행하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 등으로 개발할 수 있음
- 본 연구를 통해 개발된 제품은 농업회사법인(주) 제이웰바이오팜에서 계속 산업화 할 예정으로 내수 및 수출을 통한 매출 증대가 기대됨

### 2. 황칠나무의 피부건강 기능평가

- 본 연구를 통하여 황칠나무 잎 물추출물의 피부건강 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고하였으며, 황칠나무 제품 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 가능함

### 3. 황칠나무의 항치매 기능평가

- 본 연구를 통하여 황칠나무 잎 20% 주정추출물의 항치매 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고하였으며, 황칠나무 제품 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 가능함

### 4. 황칠나무의 면역증강 기능평가

- 본 연구를 통하여 황칠나무 가지 물추출물의 면역증강 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고하였으며, 황칠나무 제품 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 가능함

### 5. 황칠나무 추출물 함유 숙취해소 제품 산업화

- 숙취해소 제품으로 개발한 “천년황칠 삼보진”은 학술지 게재완료되어 숙취해소 기능 표기 가능함
- 국내유통 및 해외 수출 추진예정

## 붙임. 참고문헌

1. 식품공전, 식품의약품안전처
2. Kim, C. M., J. H. Choi, and S. K. Oh. 1983. Chemical change of major tea constituents during tea manufacture. *Kor. J. Food Nutri.* 12: 99-104.
3. Park, S.J., Kang, J.H., Kong, H.J., Hwang, S.J., Jang, J.H., Yang, K.M.: Effects of *Gastrodiae rhizoma* on the liver function and alcohol metabolism in alcohol treated rats. *Korean J. Food Cook Sci.*, 2016, 32, 818-827
4. Bae, D., Kim, J., Lee, S.Y., Choi, E.J., Jung, M.A., Jeong, C.S., Na, J.R., Kim, J.J., Kim, S.: Hepatoprotective effects of aqueous extracts from leaves of *Dendropanax moribifera* Leveille against alcohol-induced hepatotoxicity in rats and *in vitro* anti-oxidant effects. *Food Sci. Biotechnol.*, 2015, 24, 1495-1503
5. Rajendram, R., Preedy, V.R.: Effect of alcohol consumption on the gut. *Dig. Dis.*, 2005, 23, 214-221
6. Tolstrup, J.S., Grønbaek, M., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G.: Alcohol intake, alcohol dehydrogenase genotypes, and liver damage and disease in the Danish general population. *Am. J. Gastroenterol.*, 2009, 104, 2182-2188
7. Saygi S, Konuklugil B, Kutsal O, Uzbay IT, Deniz G, Gören Z (2003) Assessment of therapeutic effect of inula heterolepis boiss in alcoholic rats. *Phytother Res*, 17, 683-687
8. Park, E.M., Ye, E.J., Kim, S.J., Choi, H.I., Bae, M.J.: Eliminatory effect of health drink containing *Hovenia dulcis* Thunb extract on ethanol-induced hangover in rats. *Korean J. Food Culture*, 2006, 21, 71-75
9. Van Waes, L., Lieber, C.S.: Glutamate dehydrogenase, a reliable marker of liver cell necrosis in the alcoholic. *Br. J. Med.*, 1977, 2, 1508-1510
10. Halliwell, B., Chirico, S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993, 57, 715S-724S
11. Wu, D., Cederbaum, A.I.: Ethanol cytotoxicity to a transfected HepG2 cell line expressing human cytochrome P4502E1. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 23914-23919
12. Kurose, I., Higuchi, H., Miura, S., Saito, H., Watanabe, N., Hokari, R., Hirokawa, M., Takaishi, M., Zeki, S., Nakamura, T., Ebinuma, H., Kato, S., Ishii, H.: Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology*, 1997, 25, 358-378
13. Tan HY, Zhang AL, Chen D, Xue CC, Lenon GB. 2013. Chinese herbal medicine for atopic dermatitis: a systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 69: 295-304
14. Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. 2012.

- Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon grandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull.* 35:1222-1229
15. Shin YK, Son HU, Kim JM, Heo JC, Lee SH, Kim JG. 2015. *Cinnamomum cassia* bark produced by solid-state fermentation with *Phellinus baumii* has the potential to alleviate atopic dermatitis-related symptoms. *Int J Mol Med.* 35: 187-194
  16. Miles EA, Calder PC. 2014. Omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and allergic diseases in infancy and childhood. *Curr Pharm Des.* 20: 946-953
  17. Weise C, Heunemann C, Loddenkemper C, Herz U, van Tol EA, Worm M. 2011. Dietary docosahexaenoic acid in combination with arachidonic acid ameliorates allergen-induced dermatitis in mice. *Pediatr Allergy Immunol.* 22: 497-504
  18. Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, Harima M, Suzuki H, Nomoto M, Miyashita S, Suzuki K, Nakamura M, Watanabe K. 2015. Modulation of HMGB1 translocation and RAGE/NF $\kappa$ B cascade by quercetin treatment mitigates atopic dermatitis in NC/Nga transgenic mice. *Exp Dermatol.* 24: 418-423
  19. Ishiguro-Oonuma T, Ochiai K, Hashizume K, Morimatsu M. 2015. The role of IFN- $\gamma$  in regulating Nfkbiz expression in epidermal keratinocytes. *Biomed Res.* 36: 103-107.
  20. Akaogi J, Barker T, Kuroda Y, Nacionales DC, Yamasaki Y, Stevens BR, 2006 Reeves WH, Satoh M. Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 5: 429-435
  21. Sivaranjani N, Rao SV, Rajeev G. 2013. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res.* 7: 2683-2685
  22. Boguniewicz M, Leung DY. 2011. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev.* 242: 233-246
  23. Werfel T, Wittmann M. 2008. Regulatory role of T lymphocytes in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy.* 94: 101-11
  24. Bhol KC, Schechter PJ. 2005. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol.* 152: 1235-1242
  25. Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 9: 461-466
  26. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. 2011. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 41: 245-253
  27. Wakame K, Komatsu K, Inagawa H, Nishizawa T. 2015. Immunopotentiator from

- Pantoea agglomerans Prevents Atopic Dermatitis Induced by Dermatophagoides farinae Extract in NC/Nga Mouse. *Anticancer Res.* 35: 4501–4508
28. Park SJ, Lee HA, Kim JW, Lee BS, Kim EJ. 2012. Platycodon grandiflorus alleviates DNCB-induced atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. *Indian J Pharmacol.* 44: 469–474
  29. Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan PS, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H. 2009. Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* 56: 37–42
  30. Kim MS, Hur YG, Kim WG, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. 2011. Inhibitory effect of Platycodon grandiflorum on T(H)1 and T(H)2 immune responses in a murine model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 106: 54–61
  31. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107: 129–134
  32. Leung DY. 1992. Immunopathology of atopic dermatitis. *Springer Semin Immunopathol* 13: 427–440
  33. Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, Krutmann J. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19: 359–361
  34. Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY. 1992. Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 90: 323–331
  35. Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. 2014. Expression of thymus and activation-regulated chemokine (TARC) by human dermal cells, but not epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 76: 90–95
  36. Terada N, Hamano N, Nomura T, Numata T, Hirai K, Nakajima T, Yamada H, Yoshie O, Ikeda-Ito T, Konno A. 2000. Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 30: 348–355
  37. Cooper KD. 1994. Atopic dermatitis: Recent trends in pathogenesis and therapy. *J Invest Dermatol* 102: 128–137
  38. Sidbury R, Hanifin JM. 2000. Old, new, and emerging therapies for atopic dermatitis. *Dermatol Clin* 18: 1–11
  39. Lowell A. Goldsmith, Stephen I. Katz, Barbara A. Gilchrest, Amy S. Paller, David J.

- Leffell, Klaus Wolff. 2012. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 8th ed. McGraw-Hill New York. The United States. 225-356
40. Hohl D. 2010. Dermatology. Rev Med Suisse 6: 15-17
  41. Sharma L. 2001. Diagnostic clinical features of atopic dermatitis. Indian J Dermatol Venereol Leprol 67: 25-27
  42. Won TJ, Kim B, Song DS, Lim YT, Oh ES, Lee DI, Park ES, Min H, Park SY, Hwang KW. 2011. Modulation of Th1/Th2 balance by lactobacillus strains isolated from Kimchi via stimulation of macrophage cell line J774a.1 in vitro. J Food Sci 76: 55-61
  43. Kim, C. M., J. H. Choi, and S. K. Oh. 1983. Chemical change of major tea constituents during tea manufacture. Kor. J. Food Nutri. 12: 99-104.
  44. Citron M: Alzheimer disease: treatment in discovery and development. *Nat Neurosci* 2002;5:1055-1057
  45. Elyse R, Margaret F: CREB expression mediates amyloid  $\beta$ -induced basal BDNF downregulation. *Neurobiol Aging* 2015;36:2406-2413.
  46. Yuana JH, Pana F, Chen F, *et al*: Neuroprotection by plumbagin involves BDNF-TrkB-PI3K/Akt and ERK1/2/JNK pathways in isoflurane-induced neonatal rats. *J Pharm Pharmacol* 2017;69:896-906
  47. Li J, Ding X, Zhang R, *et al*: Harpagoside ameliorates the amyloid- $\beta$ -induced cognitive impairment in rats via up-regulating BDNF expression and MAPK/PI3K pathways. *Neuroscience* 2015;10;103-114.
  48. Cho N, Lee HK, Jeon BJ, *et al*: The effects of *Betula platyphylla* bark on amyloid beta-induced learning and memory impairment in mice. *Food Cheml Toxicol* 2014;74:156-163.
  49. Park BY, Min BS, Oh SR, *et al*: Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax moribifera*. *J Ethnopharmacol* 2004;90:403-408.
  50. Blois MS: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-1200.
  51. Yamaguchi Y, Kawashima S: Effects of amyloid-  $\beta$ -(25 - 35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. *Eur JPharmacol* 2001;421:256-272.
  52. Shen Z, Wangn G, Linn SZ: Two-way shuttle box avoidance conditioning and brain NADH in rats. *Physiol Behav* 1990;48:515-517.
  53. Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, *et al*: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.

54. Zhang J, Shi R, Li H, *et al.*: Antioxidant and neuroprotective effects of *Dictyophora indusiata* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans*. *J Ethnopharmacol* 2016;192:413-422.
55. Abramov AY, Canevari L, Duchen MR: Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci* 2004;14:565-75.
56. Zheng H, Niu S, Zhao H, *et al.*: Donepezil improves the cognitive impairment in a tree shrew model of Alzheimer's disease induced by amyloid- $\beta$ 1-40 via activating the BDNF/TrkB signal pathway. *Metab Brain Dis* 2018;33:1961-1974.
57. Lee JW, Kim KS, An HK, *et al.*: Dendropanoxide induces autophagy through ERK1/2 Activation in MG-63 human osteosarcoma cells and autophagy inhibition enhances dendropanoxide-induced apoptosis. *PLoS One* 2013;17: 1-8

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.