

발간등록번호

11-1541000-001054-01

성인형 난치성질환 예방용 고기능, 고효능
인삼 제품개발연구

(Development of high potency ginseng products for
prevention of metabolic diseases)

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “성인형 난치성질환 예방용 고기능, 고효능 인삼 제품개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 06월 24일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김보연

연 구 원 : 안종석

연 구 원 : 이상구

연 구 원 : 배은영

연 구 원 : 김경아

연 구 원 : 권오송

연 구 원 : 하 룡

연 구 원 : 김선옥

연 구 원 : 장준필

협동연구기관명 : 경희대학교

협동연구책임자 : 심인섭

협동연구기관명 : 건양대학교

협동연구책임자 : 유영춘

참 여 기 업 : 금산천년홍삼

참여기업 대표 : 신현중

요 약 문

I. 제 목

성인형 난치성질환 예방용 고기능, 고효능 인삼 제품개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 인삼은 우리나라를 종주국으로 하는 대표적인 의용식물로서 삼국시대부터 고려, 조선시대에 이르러는 중국과 일본 등지에 가장 큰 비중의 무역상품으로 각광을 받아왔으나 1990년을 정점으로 우리나라 인삼은 과거 30%에서 최근 1% 이하로 줄었음
- 인삼 연구에 대한 투자가 급증하고 있는 외국의 현실을 감안하면 인삼의 효능을 과학적으로 입증해야 부가가치를 높일 수 있고 기존의 효능을 증가하는 인삼의 개발이 필수적임
- 최근 고조되고 있는 흑삼의 구성성분들에 대한 과학적 연구를 통해 흑삼의 해외시장 진출을 이루어 다시한번 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 높일 필요성이 큼
- 최근에 등장하고 있는 흑삼 등 가공인삼의 구성성분의 변화와 이들의 효능에 대해 과학, 기술적 분석이 부족하여 세계적으로도 가장 우수한 한국의 인삼임에도 불구하고 세계시장에서 밀리고 있는 형편임. 더구나 흑삼도 그 가공시간과 방법 등의 차이에 의해서도 생리효능이 월등히 차이가 나고 있어, 고기능성 인삼의 제조공법의 확립이 필요하고 이때 생성되는 각 인삼성분의 효과를 분석하여 이를 토대로 하여 고기능 인삼제품의 개별인증화 및 해외수출이 절실히 필요함

III. 연구개발 내용 및 범위

(1) 비만 및 당뇨 예방 및 치료용 고효율 가공인삼 제품개발에 관한 연구

- 인삼의 가공방법의 변화에 따른 구성성분의 변화 분석: 지표물질 분리 및 구조분석
- 인삼 구성성분의 세포내 비만 및 당뇨 억제활성 분석: Akt, AMPK, ACC 등과 전사조절 단백질의 인산화, 활성화 분석
- 비만세포의 glucose uptake 유도활성 분석
- 인삼 우수 지표물질의 유도체 합성
- 합성 유도체의 세포내 비만 및 당뇨 억제활성 분석
- 가공인삼의 비만 및 당뇨 치료효과 동물 실험
- 합성 유도체의 비만 및 당뇨 치료효과 동물 실험

(2) 고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효과 증진에 관한 연구

- 면역학적 유용성 해석에 필요한 실험법의 확립: in vitro/in vivo 실험법 확립
- 가공인삼의 면역증강 혹은 면역 억제활성 유무의 판정
- 비특이적 면역에 대한 면역증강효과의 검증 (macrophage 및 natural killer cell)
- 점막면역에 대한 증강효과의 검토
- 면역강화 기능 최적화 시스템의 구축
- 면역세포와의 상호작용에 관한 연구
- Apoptosis 유도활성 및 작용기전의 해석
- 가공인삼의 암세포 운동성의 억제 활성, 암세포 부착, 이동에 대한 억제활성 규명
- in vivo에 있어서의 종양세포의 증식억제 활성 해석
- 종양 유도성 혈관신생에 대한 억제효과 해석
- 항암제 개발의 가능성 탐색: 독성시험/약리활성의 최적화
- 기존의 항암제와의 병용투여에 의한 시너지 효과 및 독성 경감효과 (in vitro 및 in vivo)
- 산업적 응용 가능성의 타진

(3) 제2협동연구기관: 뇌졸중 및 치매 예방과 치료효과 증진용 고효능 가공인삼에 관한 연구

- 전뇌허혈 동물 모델 확립 및 가공인삼의 기억및 운동증진 효능검증
- 치매동물모델 확립 및 가공인삼의 인지개선 효능검증
- 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합제의 in vivo 뇌허혈 및 치매 동물모델에서의 활성 검증

IV. 연구개발결과(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

(1) 비만 및 당뇨 예방 및 치료용 고효율 가공인삼 제품개발에 관한 연구

- 비만/당뇨 조절물질을 흑삼으로부터 분리하였는데 Rg1 유도체(Rg1d 명명)임으로 밝혀짐
- Rg1d가 당뇨 억제의 중요 단백질인 AMPK의 인산화를 유도함
- Alloxan 처리에 의한 당뇨유발 쥐에서 흑삼은 혈당을 낮추었으며 alloxan 자체에 의한 체중 감소도 억제하였음
- OGTT(oral glucose tolerance test), IVGTT(intravenous glucose tolerance test) 시험에서 alloxan에 의한 당내성을 흑삼이 억제하였음

-alloxan에 의한 당뇨쥐에서 물소모량이 흑삼에 의해 현저히 감소하였음

-alloxan에 의한 당뇨쥐에서 기초대사량, 체력증가(수영시간), 인슐린 분비 등이 흑삼에 의해 현저히 증가하였음

(2) 고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효과 증진에 관한 연구

-흑삼 추출물은 암세포에 대한 직접독성에 의해 종양을 억제하는 효과는 거의 없으나, 림프구 및 수지상 세포의 활성화를 유도하는 작용과 경구투여에 의해 NK세포의 암세포 살해활성을 상승시키는 작용을 통해 암세포의 증식을 억제하고, 혈관신생을 저지하며, 나아가 암세포의 전이를 억제하는 효과를 지니는 것으로 추정됨

(3) 제2협동연구기관: 뇌졸중 및 치매 예방과 치료효과 증진용 고효능 가공인삼에 관한 연구

-치매 동물모델을 제작하였음

-흑삼은 Morris water maze 실험에서 쥐의 공간지각능력을 증가시킴

-흑삼은 2VO 전뇌허혈 중풍 모델 쥐에서 뇌 손상 보호효과를 분명하게 보여주고 있음

-흑삼은 뇌허혈 모델 쥐에서 기억능력을 증가시킴

V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

-국외논문 4편이 게재되었고, 5편의 논문이 투고 중 혹은 투고 준비 중에 있음

-4건의 국내특허 출원

-특허출원에 이어 흑삼의 개별인증화를 받을 계획임

-참여기업인 금산천년홍삼에서 기술이전을 받아 향후 5년 이내에 사업화 목표

SUMMARY

I. Title

Development of high potency ginseng products for prevention of metabolic diseases

II. Objective and importance of research

○ Ginseng was a medicinal plant originating from Korea and has been recognized the most important trade product for China and Japan since the dynasty of early Korea. However, its export is now reduced to 1% from 30% of the past.

○ Considering the current status of foreign countries actively investing on the research of ginseng, scientific investigation of the efficacy of ginseng would increase its value, requiring an extensive R&D to get highly innovated ginseng

○ Through the scientific investigation on the components of ginseng, there could be another chance to export black ginseng, setting up the status of Korea as a world-leading country.

○ Due to the lack of scientific investigation on the components and their efficacies of modified ginseng coming out recently, Korea ginseng has been inferior to foreign ones in world market although it is the best in the world. In addition, black ginseng showed different physiological effects depending on the manufacturing systems. Thus, high potency ginseng requires a tactic program for manufacturing, component analysis, leading to the individual authorization and export of ginseng.

III. Scope and content of research

(1) Development of high potency ginseng against obesity and diabetes

- Analysis of ginseng components depending on the manufacturing process: isolation and structure determination of standard compounds
- Functional analysis of ginseng components against obesity and diabetes mellitus: Akt, AMPK, ACC, etc and phosphorylation and activation of transcription factors

- Glucose uptake of obese cells
- Synthesis of effective components in ginseng and the analysis of their function against obesity and diabetes in cells
- in vivo test of modified ginseng and synthetic derivatives against obesity and diabetes

(2) Development of high potency ginseng for immuno-therapeutic use

- Experimental design of vitro/in vivo immunological application
- Determination of immune regulation effect of modified ginseng
- Test of immunological effect (macrophage and natural killer cell)
- Setting up an best condition for improvement in immune response
- Determination of interaction with immune cells
- Apoptosis induction and its mechanism
- Effect of modified ginseng on cancer cell proliferation, adhesion and migration
- Effect on cancer cell proliferation in vivo
- Effect on cancer angiogenesis
- Determination of anti-cancer drug development: toxicology, pharmacology
- Effect on combined therapy with other anti-cancer drugs in vivo and in vitro
- Determination of commercialization

(3) Development of high potency ginseng for ischemia treatment

- Setting up in vivo model of ischemia and test of ginseng for memory and activity
- Setting up in vivo model of alzheimer and test for cognition improvement
- Standard components of modified ginseng and their derivatives in vivo

IV. Results

(1) Development of high potency ginseng against obesity and diabetes

- Rg1 derivative, Rg1d, is isolated and identified to be able to regulate obesity/diabetes

- Rg1d induces AMPK phosphorylation which is a key protein in diabetes
- Black ginseng reduces blood pressure as well as body weight loss in alloxan-treated diabetic mice
- Black ginseng reduces alloxan-induced glucose tolerance in OGTT (oral glucose tolerance test) and IVGTT (intravenous glucose tolerance test)
- Black ginseng reduces water consumption of alloxan-induced diabetic mice
- Black ginseng significantly increases basic metabolism, health (swimming) and insulin secretion in alloxan-induced diabetic mice

(2) Development of high potency ginseng for immuno-therapeutic use

- Extracts of black ginseng does not directly affect cell cytotoxicity but prevents cancer cell proliferation by NK cell activation through lymphocytes and dendritic cell activation, leading to the inhibition of angiogenesis and metastasis of carcinoma cells

(3) Development of high potency ginseng for ischemia treatment

- Black ginseng increases space cognition ability of mice in Morris water maze experiment
- Black ginseng clearly protects brain damage in 2VO brain ischemia model mice
- Black ginseng increases memory capacity in brain ischemia model mice

V. Accomplishment and its application Plan

- Four SCI(E) publications abroad, five under preparation
- Four domestic patents
- Commercialization in 5 years by the accompanying company

CONTENTS

Chapter 1. INTRODUCTION

Chapter 2. STATE OF DOMESTIC AND FOREIGN ART

1. Foreign state
2. Domestic state

Chapter 3. CONTENT AND RESULTS OF RESEARCH

1. Research contents and methods
2. Results
 - (1) Research on obesity and diabetes
 - (2) Research on immune-mediated anti-cancer
 - (3) Research on ischemia

Chapter 4. ACHIEVEMENT OF OBJECTIVE

1. Final goal of research
2. Annual research goal and contents
3. Achievement
4. Contribution to related fields

Chapter 5. APPLICATION OF RESULTS

Chapter 6. INFORMATION OF FOREIGN SCIENCE

Chapter 7. REFERENCES

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 해외 인삼 기술개발 현황

제2절 국내 인삼 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행 내용 및 방법

제2절 연구내용 및 결과

1. 비만 및 당뇨 예방 및 치료용 고효율 가공인삼 제품개발에 관한 연구
2. 고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효과 증진에 관한 연구
3. 뇌졸중 및 치매 예방과 치료효과 증진용 고효능 가공인삼에 관한 연구

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발의 최종목표

제2절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

제3절 연구목표 달성도

제4절 관련분야의 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

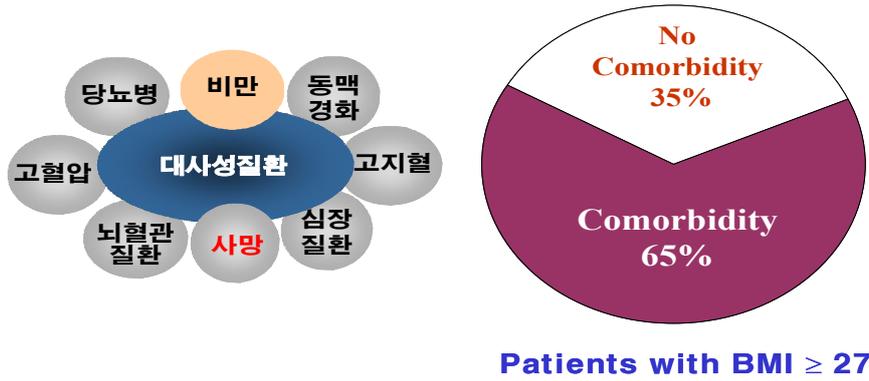
제 1 장 연구개발과제의 개요

- ◆ 인삼은 우리나라를 종주국으로 하는 대표적인 의용식물로서, 삼국시대부터 1500여년 동안 우리나라의 손꼽히는 수출품이었으며, 고려, 조선시대에 이르러는 중국과 일본 등지에 가장 큰 비중의 무역상품으로 각광을 받아왔음
- ◆ 1990년을 정점으로 우리나라 인삼은 과거 30%에서 최근 1%도 안되는 해외시장율을 나타내고 있어 인삼 종주국이라는 말이 무색할 정도임
- ◆ 스위스(진사나), 미국/캐나다(화기삼) 등의 국가에서 현재 인삼 세계시장을 석권하고 있는 이유는 이들이 인삼에 대한 과학적 결과를 바탕으로 접근하였기 때문이며 중국(삼칠삼)에서도 최근 정부의 적극적 지원하에 인삼 기초연구를 수행하고 있어 한국에 역수출하고 있음. 따라서, 인삼의 효능을 과학적으로 입증해야 부가가치를 높일 수 있고 기존의 효능을 증가하는 인삼의 개발이 필수적임
- ◆ 흑삼은 기존의 인삼(홍삼)을 열처리로 변형하여 비만/당뇨 치료에 더욱 우수한(20% 이상) 활성을 나타냄을 확인되었고, 이 흑삼의 구성성분들에 대한 과학적 연구를 통해 흑삼의 해외시장 진출을 이루어 다시한번 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 높이고자 함
- ◆ 인삼의 효능은 다양한 분야에서 익히 잘 알려져 있는데, 산후에 몸이 허약할 때, 소아 발육부진증, 여성의 냉병, 기혈보호, 심신안정, 위장, 가래, 혈액순환, 암, 불면증, 협심증, 만성기관지염, 피부윤택, 식욕부진, 저혈압, 식은땀, 자궁내막염 등 매우 많은 종류의 질병치료에 효과적임인 것으로 현재 치료제로 사용을 시도 중이다. 그러나, 백삼, 홍삼, 그리고 최근에 등장하고 있는 흑삼 등 가공인삼의 구성성분의 변화와 이들의 효능에 대해 과학, 기술적 분석이 부족하여, 세계적으로도 가장 우수한 한국의 인삼임에도 불구하고 세계시장에서 밀리고 있는 형편이다. 더구나 흑삼도 그 가공시간과 방법 등의 차이에 의해서도 생리효능이 월등히 차이가 나고 있어, 고기능성 인삼의 제조공법의 확립이 필요하고 이때 생성되는 각 인삼성분의 효과를 분석하여 이를 토대로 하여 고기능 인삼제품의 개별인증화 및 해외수출이 절실히 필요하다.

1. 고기능성 가공인삼의 비만 및 당뇨 치료 효능에 관한 연구

- ◆ 난치성 대사질환의 위험성

동반질환



Patients with BMI ≥ 27

- 성인형 난치성 대사질환은 고혈압, 고지혈, 뇌혈관질환, 동맥경화, 심장질환 등과 같은 심혈관계 질환의 부류가 대부분을 차지하는데, 이들은 대부분이 비만, 당뇨가 그 근본 시작점이 되거나 직, 간접적으로 연관되어 있어 결국에는 사망에 이르게 하는 매우 무서운 질병이나, 대부분의 사람들이 이를 질병이라 여기지 않고 지내기 때문에 그 병의 심각성이 더욱 두드러지고 있다. 그림에서 보는 바와 같이 비만측정지수인 BMI 27 이상인 환자의 겨우 동반질환 (Comorbidity)를 가질 확률이 65%나 되어 비만에 의한 사망률이 매우 높아질 수 있음을 말해 준다.

◆ 당뇨병 예방 및 치료효과

- 인삼은 인슐린의 분해억제 작용을 증강, 항지방 분해작용, 당뇨병 수반증상의 개선작용이 있고, 당뇨병의 발생 시기를 지연시키고 발생율을 현저하게 감소시키며, 췌장과 혈액 중의 인슐린 함량도 증가시키며 특히 당뇨병 환자에게 홍삼을 투여하면 환자에 따라 혈당량이 저하되고, 인슐린 치료환자에 있어서 투여량 감소조절이 가능하며, 특히, 자각증상으로 현기증, 어깨 결림, 흉부압박감, 갈증, 전신 권태감, 머리가 무거운 증상 등이 크게 개선됨.

◆ 고지혈증, 동맥경화, 혈압조절효과

- 인삼은 혈관 확장작용을 가지고 있어 혈류 순환을 개선시키는 등 동맥경화증의 발생 억제와 혈관 내피세포의 손상을 방어해주는 효과가 있다. 또한 백삼 사포닌은 지방, 혈중 콜레스테롤 등의 지질대사와 관련한 효소활성을 촉진하고, 콜레스테롤의 대사변화(cholesterol turnover)를 촉진시킴으로서 동맥경화의 중요한 위험인자인 고지혈증을 개선하는 효과가 있음.

- 인삼은 저혈압인 경우 혈압을 높여 정상화시켜 주고, 고혈압은 혈압 강하에 작용하며, 정상인의 혈압은 유지시켜주는 효과가 있는 신비의 영약으로 백삼은 혈압을 정상화시키는 작용을

하며 고혈압 환자가 인삼을 복용하면 수축기 혈압과 이완기 혈압을 감소시키며, 특히 사포닌 함량이 비교적 많은 백삼농축액을 택하여 소량 복용하는 것보다 비교적 대량으로 복용할 때 그 효과가 크며 혈압을 강하시키는 작용이 있으며 혈액의 흐름을 촉진하여, 뇌에 혈액의 공급을 원활하게 함으로서 저혈압의 치료에 효과를 나타냄.

◆ 시사저널 등에서의 인삼의 효과 발표

- 시사주간지 “시사IN” 12호, 2007년 12월 04일:

인삼에서 고지혈증 치료효과가 있는 치료제를 전임상 시험중

- “영주시민신문” 56호, 2002년 12월 17일

인삼은 성인병 예방(고혈압.동맥경화.비만.콜레스테롤)에 탁월한 효과가 있고 항암효과가 뛰어나며 노화방지와 심신안정, 기력회복에 매우 효과가 큼

◆ 그러나 인삼의 비만/당뇨, 고지혈증 치료 등에서 단일성분에 대한 기초연구는 매우 부진한 상태

◆ 현재까지는 사포닌이 인삼의 주 구성성분이며 대사성질환 치료에 매우 효과적임이 잘 알려져 있으나, 인삼성분의 변화에 의한 새로운 제품을 개발함으로써 과학기술적 토대위에서의 세계시장 공략은 요원한 문제였음.

2. 고기능성 가공인삼의 뇌졸중 및 치매 치료 효능에 관한 연구

◆ 천연물과 같은 대체 약물이 치료와 예방목적으로써 그 이용이 증가하고 그중에서 인삼은 세계적으로 가장 널리 사용되어지고 있는 전통 약초임

◆ 인삼추출물이 forebrain 또는 myocardial ischemia animal model에서 신경세포 사멸을 막아 준다는 보고가 있음

◆ 최근에는 ginsenoside가 일차 배양한 흰쥐의 대뇌피질 신경세포에서 glutamate에 대한 신경독성을 억제함이 발표되었음

◆ 그러나 세포수준에서 인삼 성분의 기전 연구를 통해 그 효능을 입증할 필요가 있지만 뇌신경 세포수준에서의 연구는 거의 초기 단계임

3. 고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효능에 관한 연구

◆ 인체는 여러 종류의 세포로 구성되어 있으며 신진대사에 의해 신생세포와 노화세포의 교체가 이루어진다. 그런데 이 신생 세포가 만들어지는 과정에서 잘못된 세포가 나타나면 그대로 세포분열로 증식하여 암과 같은 난치병이 되는 일도 있다. 이와 같이 체내 이상 세포가 증식한

다든지 세균이 침입하는 것은 매우 위험한 일로서 이것을 방지하지 않으면 생명이 위험한 경우가 발생한다. 이것을 예방하기 위한 기능이 바로 면역이다. 인체의 면역체계는 외부인자, 즉 바이러스, 박테리아 기생충 등의 침입을 방어하는데 아주 기본적으로 기여하고 또한 내부적으로는 암세포의 발달을 저지하는 등 그 기능이 인체의 정상적 기능을 유지하는데 절대적인 체계이다. 정상인에서는 이러한 체계가 활발히 작용하고 알맞게 유지되어 생활하는데 별 문제가 없다. 하지만 이러한 면역체계가 정상 적으로 작용을 하지 못할 경우 면역계 질환은 물론 여러 다양한 질병에 노출되어 건강에 위협을 주는 결과를 초래한다.

◆ 최근 환경오염과 더불어 사회적 스트레스의 증가 또한 고령화에 따른 노인층의 증가로 인해 면역기능의 약화나 면역체계의 교란과 같은 면역질환 환자가 증가하고 있으며, 특히 어린이에게 있어서는 자기면역질환(auto-immune disease)이나 과민성 알레르기와 아토피 피부염과 같은 면역질환과 소아당뇨와 같은 질병의 발생이 늘어나고 있는 실정이다. 한편 사망원인 중 여전히 가장 많은 비율을 차지하는 암의 발생에 있어서도 면역기능의 저하 또는 억제가 깊이 관련되어 있다는 것은 주지의 사실이기도 하다. 이러한 측면에서 볼 때, 숙주의 생체방어에 유효한 질서정연한 면역체계의 성립과 각종 심혈관계 및 대사성 질환의 예방은 건강한 생활을 유지하는데 있어 대단히 중요한 것임을 알 수 있다.

◆ 면역기능을 필두로 하여 각종 성인병에 대해 예방 내지는 치료적인 효과를 나타내는 기능성 식품의 섭취는 오래 전부터 유행을 이루고 있으며, 특히 경제수준이 높은 사회일수록 삶의 질(quality of life)을 추구하는 경향이 강해 이러한 기능성 식품의 수요가 증가하는 추세이다. 경구적으로 섭취함으로써 면역기능과 항암 및 항염증작용을 부여해 주는 작용을 갖는 기능성 식품소재로서는 버섯류를 위시하여, 프로폴리스, 키틴·키토산, 인삼유래 사포닌, 녹용성분, 로얄제리 등이 널리 이용되고 있으며, 최근 국내에서는 동충하초가 면역기능의 강화작용과 더불어 큰 인기상품으로 등장하였으며, 현재 기능성 식품 시장에서는 단일품목으로서는 높은 시장 점유율을 나타내고 있다.

◆ 면역강화를 비롯하여 항염증 작용과 같은 면역조절 작용을 타깃으로 한 기능성 식품소재의 출처(source)로서 식물, 미생물 심지어 곤충에 이르기까지 천연에서 유래하는 다양한 생물체의 추출물과 단리물질이 이용되고 있다. 하지만 우리나라에서 오래 전부터 보약의 형태로 섭취되어 온 인삼을 특수한 방법으로 가공 처리한 구증구포 흑삼에 관하여, 생리활성의 우수성에 대해서는 경험적 결과들이 다소 알려져 있으나, 아직까지 정확한 효능에 대한 과학적 데이터나 홍삼과의 비교실험 결과, 또한 흑삼의 제조과정에서 나타나는 사포닌을 비롯한 주요 성분들의

질적 및 양적 변화와 생리활성과의 상관관계 등에 대해서는 거의 보고된 바가 없는 실정이다.

◆ 인삼에는 사포닌성분으로 대표되는 생체의 기능조절에 유효한 성분이 다량으로 함유되어 있으며, 이들 사포닌 성분은 면역기능과 항암작용 또는 당뇨와 고혈압과 같은 성인병의 예방과 증상개선 혹은 치료 등에 유용한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 국내에서는 오래 전부터 인삼이 다량으로 재배되어, 체질증강과 면역력 보강을 위하여 전통적인 민간요법에 많이 사용되어 왔으며, 최근에는 국내와 일본 및 중국 등지에서 인삼에서 추출한 사포닌 성분(ginsenoside)을 의약품화 하거나 의약품료로 응용하기 위한 재료로서 널리 사용하고 있다.

◆ 인삼의 생리활성을 좌우하는 성분은 ginsenoside라 불리는 사포닌 성분, 이들 사포닌의 함량과 종류에 따라 효능에 차이가 생기게 된다. 인삼의 생리활성을 높이기 위한 시도로서 인삼에 열을 가하여 훈증하는 방식을 통해 사포닌 성분의 화학적 변화와 농축을 유도하여 생리활성의 강화는 물론, 새로운 생리활성의 창출도 가능하다. 한 예로서 인삼을 1회 훈증하여 만든 것을 홍삼이라 부르며, 홍삼은 인삼보다 생리활성이 뛰어난 것으로 알려져 있다.

◆ 일반적으로 인삼을 1회 열처리하여 만드는 홍삼의 경우, 열처리에 의한 성분의 변화의 변화에 의해 면역력과 기력 증강 등의 효과가 높아지는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 홍삼은 국내외에서 인삼제품의 대표적인 브랜드로서 인식되어 있다. 하지만 인삼을 9회나 열처리하여 얻어지는 흑삼은 홍삼보다도 더 효과적이라는 복용자들의 평가를 받고 있어 과학적인 검토가 필요하다.

◆ 최근 약 5년 전부터 국내에서 인삼으로 유명한 충남 금산지역을 중심으로 인삼을 열처리 및 건조 처리하여 만든 흑삼(black ginseng)의 제조기법이 도입되어, 몇몇 인삼 가공업체에서 상업화되고 있다. 그 중에서도 인삼을 9회 열처리와 건조를 반복하여 만든 구증구포(九蒸九曝) 흑삼은 성분분석 결과 인체의 생리활성 조절에 기능하는 사포닌 성분(특히 ginsenoside-Rg3)의 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

◆ 본 개발에서는 구증구포 흑삼의 우수성을 입증할 수 있는 실험적 데이터를 확보하여 흑삼을 주성분으로 한 건강식품을 개발하고, 나아가 흑삼 추출물을 기능식품 및 의약소재로 발전시키기 위하여, 정확한 실험기법을 통해 흑삼의 제조방법에 따른 구성성분의 화학적 변화를 조사하고, 또한 성분변화에 따른 생리활성의 변화를 면역조절작용(면역강화 활성, 항염증 및 항알러지 효과 등)과 항암활성의 관점에서 해석한다. 본 개발을 통해 얻어진 연구결과는 흑삼의 성분변화와 생리활성 간의 상관관계를 정립하고, 흑삼 효능의 최적화에 새로운 개념을 도입하는 첫 시도가 될 것이며, 이를 통해 인삼관련 제품의 국내외적 인지도의 제고는 물론 인삼관련 산

업의 활성화에 크게 기여할 것으로 기대된다.

◆ 방송매체를 통한 인삼의 재발견

- 2005년 11월 29일, KBS 1TV 22:00~23:00 "생/로/병/사의 비밀"에서 "인삼 재발견"이라는 제목으로 인삼의 면역증강 효과에 관해 상세한 방송이 된 바 있음

- 프랑스 약학사전에 등록되어 있는 인삼은 한국의 고려인삼 뿐인데, 서양삼이나 중국삼에 비해 약리성분인 '진세노사이드'의 종류가 훨씬 더 많기 때문이다. 암 예방과 면역력 증가 등은 새롭게 밝혀지고 있는 고려인삼의 놀라운 효능을 이다.

- 덴마크국립병원의 아르잘란 카라즈마박사는 4년여에 걸쳐 인삼의 뿌리를 이용한 연구결과, 인삼이 체내의 면역세포를 보호하는 효과가 있음을 밝혀냈다.

- 에이즈 치료의 열쇠, 면역력을 지키는 인삼의 힘- 20세기의 재앙이라 불리는 질병, 에이즈. 21세기 첨단 의료기술의 발전에도 불구하고 에이즈 치료의 길은 아직 열리지 않고 있다. 에이즈의 사망률이 높은 이유는 외부 바이러스에 감염되면 몸속에 있는 면역세포를 파괴시켜 면역력을 점차 떨어뜨리게 된다. 인삼과 에이즈 환자의 면역력 관계에 대한 임상연구를 진행한 결과에 따르면 인삼은 면역력 유지에 탁월한 것으로 확인됐다.

- 면역증강을 통한 암(癌) 재발 억제에 탁월한 효과를 보이는 인삼: 인체의 질병 원인이 되는 각종 자극에 대하여 저항할 수 있는 방어력을 강화시켜주는 효력을 가지고 있으며 미생물 감염에 대한 저항력을 증가시키며 인삼의 면역 효과 및 면역 항진 효과는 기초대사 항진, 혈청 단백질의 증가, 혈구수의 증가뿐만 아니라 인삼의 항암성분이 암세포에 직접 작용하여 증식을 억제하는 직접효과와 숙주의 방어능력과 면역기전 강화에 의한 간접효과를 가지고 있음

- 위암환자를 대상으로 면역력 증강에 따른 암재발과 전이여부에 대한 임상연구 결과, 위암 수술을 받은 환자 42명에게 인삼을 복용시키자 먹지 않은 환자들에 비해 생존률을 높였고, 암 수술 후 화학치료 과정 동안의 면역력도 증가시키는 효과를 보였다.

- 인삼의 잎에서 추출한 다당체 'MB-40'를 동물에게 투여하자 투여받지 않은 쥐에 비해 면역세포들이 13배 이상 활성화되었다.

- 그러나 아직도 면역계 질환에서 각 인삼성분의 효능에 대한 분석이 매우 미진한 상태

4. 해외 인삼 잠재시장 개척 및 다양한 형태의 인삼제품 개발의 필요성

◆ 고려인삼이 해외에서 인정은 받고 있으나 중국, 일본 등의 인삼시장에 잠식을 당하고 있으며, 더욱이 한국은 인삼의 각 성분에 대한 기초자료 연구가 미비하므로 인삼의 과학기술적 데

이터가 뒷받침 될 경우 이러한 세계시장에서 우위권을 점할 수 있음

◆ 따라서, 현재까지의 인삼개발의 형태를 변화시켜 새로운 제품이 개발되어야 할 필요성이 매우 크므로 해외 인삼시장의 권역별 시장특성과 소비자의 선호도에 적합한 다양한 고부가가치 인삼제품을 개발하여 출시하는 노력이 필요함 인삼을 단순하게 가공한 제품에서 탈피하여 권역별 소비자의 특성을 고려한 획기적인 신상품 개발에 주력하여야 함

◆ 그러므로, 단순 1차 가공 인삼 제품을 지향하고 새로운 개념의 2차, 3차 인삼제품을 개발하여 단순 건강기능식품이 아닌 특정 기능성을 지닌 인삼제품 뿐만 아니라 나아가서 의약품 수준에 도달할 수 있는 새로운 개념의 인삼제품 개발이 절실히 요구됨.

◆ 결국, 인삼의 제조과정을 획기적으로 변화시킴으로써 인삼내의 구성성분의 변화를 가져오고 이들 각 성분들의 조합의 변화에 의해 비만/당뇨, 뇌질환, 면역계질환 등 대표적 성인병 대사질환의 치료효과를 분석함이 필요함

5. 인삼산업의 경제적·산업적 중요성

◆ 세계 인삼시장은 40억 달러에 육박하고 있으며, 인삼 소비 현황으로 세계 전체 인삼 소비량은 약 4만톤 정도로 연 평균 4%의 증가 추세로 있음.

◆ 최근 실소비자들은 수요층별로 기호 적성에 부합하면서도 차별화가 되는 제품을 요구하고 있고 Well-Being 시대를 맞이하여 돈의 가치보다는 건강을 최우선 과제로 삼는 시대가 도래했다. 그리고, 최근 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활에 있다는 것이 속속 밝혀지고 있고, 또한 의약품의 오남용에 따른 부작용이 널리 인식됨에 따라 건강 증진 내지 질병예방을 위한 접근방법의 하나로 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있음.

◆ 세계 인삼류 시장의 규모는 대략 40억불을 상회한다고 추정되나 한국 인삼 산업은 위기임. 한국산 고려인삼은 가격이 비싸지만 상품의 품질이 가격에 미치지 못하여 한국산 고려인삼의 신규수요가 계속 감소하고 있는 추세임. 한국산 고려인삼의 세계시장 점유율은 80년대 초 30-40% 수준이었으나 현재는 10%이하에 머물고 있음. 현재 국내 인삼 시장 개방은 최소시장 접근(MMA)이 허용된 인삼류는 20%의 저율관세로 수입이 가능하며, 95년 34톤(국내 생산량의 0.3%)에서 2004년 56.8톤 (국내 생산량의 0.5%)까지 시장을 개방하였음. 국내 시장을 더욱 더 개방해야 하기 때문에 중국 및 화기삼과 같은 중저가 인삼 수입이 급증할 것으로 예상되므로 인삼을 경작하는 농민들에게 커다란 경제적 손실을 초래할 것임.

◆ 따라서 새로운 고부가가치 인삼상품을 개발한 후 이를 이용한 건강기능성 식품 및 의약품 수준의 제품 개발이 절실히 요구됨. 또한 현재 인삼수출이 화교권 국가와 비화교권 국가에 치우쳐져 있는데 향후 수출의 다변화가 절실히 요구됨. 즉, 중동과 같은 아랍권, 동남아, 남미, 북유럽 등과 같은 잠재 인삼수요시장을 개척하여 신시장 수용층 입맛에 맞는 다양한 형태의 인삼제품을 개발하여 인삼수출을 늘려야 할 것임. 이러한 노력의 결과는 현재 위기에 직면해 있는 인삼분야에 종사하는 수많은 농민들에게 희망을 줄 수 있는 요소이므로 본 연구는 경제·산업적 측면에서 볼 때 아주 중요하다고 판단됨. 그러므로 과학기술적 연구를 통한 새로운 인삼제품 개발은 WTO 체제하 및 FTA를 대비하여 농민들로 하여금 농가소득 증대는 물론 수출을 통하여 막대한 외화를 벌어들임으로서 국가 경제 발전에 크게 이바지 할 수 있으리라 판단됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 해외 인삼 기술개발 현황

- ◆ 미국, 캐나다, 중국 등지에서 건강음료, 캡슐, 타블렛, 엑기스, 차 등 다양한 제품들이 개발 중에 있음
- ◆ 현재 세계 인삼 시장의 규모는 연간 200억달러 가량으로 스위스 다국적 제약회사 베링거 인겔하임의 자회사인 파마톤사가 인삼 성분인 사포닌(Saponin)으로 만든 자양강장 캡슐 ‘진사나’(Ginsana)로 해마다 30억달러의 매출을 기록하고 있음
- ◆ 중국은 1980년대 중반부터 정부의 국가적 지원이 확대되면서 인삼 추출물을 당뇨병과 심장병 치료 주사제로 사용하고, ‘삼일캡슐’이라는 항암제로도 개발하였는데, 이는 인삼 약효 성분을 밝혀내고 성분의 도달 지점을 과학적으로 규명한 결과였음
- ◆ 미국 FDA는 인삼을 GRAS(Generally Recognized As Safty)[일반적으로 안전한 식품]으로 분류하여 일반 식품점에서도 구입할 수 있도록 저가의 상품으로 개발하고 있음
- ◆ 동북아권
 - 중국은 대표적인 인삼의 생산대국이면서 소비 및 수출대국으로 연간 평균 2만톤 정도의 인삼을 생산하며 수출액은 3,442만 달러(2002년 기준) 정도임. 중국인들은 인삼제품을 건강보조식품으로 인식하고 있어 캡슐, 정제제품 외에도 음료, 화장품 등 다양한 제품으로 가공하여 활용하고 있으며 점차 건강보조식품에 대한 관심의 증가와 인삼의 의약적 성분과 효능에 대한 활발한 연구 및 다양한 인삼 응용제품의 개발로 인삼수요가 향후 꾸준히 증가할 것으로 예상되나 인삼을 의약품으로 분류하여 수입절차가 까다롭기 때문에 홍삼을 제외하고는 사실상 수입산이 거의 없는 실정 임.
 - 홍콩은 아시아 수출을 위한 북미의 인삼제품 집결지(80%이상)로써 2002년 수입 1억3,379만 달러와 재수출 5,793만 달러에 이르며 건강보조식품과 자연식품에 대한 관심 및 수요증가로 인삼제품의 수요 역시 높고 안정된 상태이고 인삼수입에 대해 수입관세나 제한이 없지만 여전히 약과 독물 범물의 허가를 받아야만 함.
 - 대만은 인삼소비국으로 2002년 수입총액은 1,749만 달러로 대만에서 한국산 제품은 최고로 인정받고 있지만 고가격 등 여러 가지 요인으로 한국 인삼에 대한 수요가 점차 감소하는 추세 임.

- 일본은 한약을 먹는 습관이나 문화가 발달하지 않아 일반인들은 인삼 고유의 맛과 향에 익숙하지 않기 때문에 인삼시장의 규모가 큰 편은 아니어서 2002년 기준 총 수입액은 19억 2,000만엔이며 총 수출액은 1억 8,200만엔 임. 일본은 동일한 인삼이라 할지라도 제품별 분류에 차이를 두고 있으며 인삼을 수출할 때 중국산은 무관세이지만 한국산은 4.3% - 5%의 관세를 부과하기 때문에 한국산의 가격경쟁력 열위임.

◆ 북미 및 호주권

- 미국시장에서의 인삼수요는 60%가량을 동양인들이 차지하고 비동양계는 드링크, 영양제, 과자류 등 가공제품을 선호하는 것으로 나타났으며 중국산이 시장의 50%를 차지하고 있고 한국산은 품질은 우수하나 가격이 비싸고 향이 강하고 인지도가 높지 않아 뿌리삼과 엑기스는 가격이 저렴한 중국산을 선호하고 가공제품은 미국산을 선호하는 것으로 조사됨. 미국산은 꾸준한 재배기술과 품종개량으로 효능이 향상되어 한국삼의 가장 강력한 경쟁상품으로 부각되고 있고 미국시장에서의 수요도 증가하는 추세임.

- 캐나다는 중국과 한국에 이어 세계 3위의 인삼생산국으로 수출 집약적 생산구조를 유지하고 있고 캐나다 인삼시장은 인삼의 약효에 대한 인지도가 있는 아시아계 이민자 위주로 아시아산 인삼이 약재로써 선호됨. 또한 건강식품으로 현지인이나 아시아계 교민위주로 북미삼이 선호되고 있어 수요증가가 예상됨. 북미삼과 한국삼은 성질 및 사용용도가 상이하며 가격경쟁력은 현지산 북미삼이 우세하나 한약재시장으로 유통되는 아시아삼의 경우 한국삼의 우수한 품질이 인정되고 가격 또한 최고임.

- 호주시장은 아시아계 이민자들은 가공되지 않은 삼을 선호하며 비아시아계는 식용보다는 화장품, 비누, 샴푸 등 가공제품을 선호함. 호주시장은 중국산 인삼이 수입물량의 대부분을 차지하고 있으며 현지 수입업체들은 저렴한 가격의 북미삼을 선호. 호주는 인삼을 생산하는 초기단계 또는 소규모 재배농들이 많은 실정으로 현지 생산규모가 아직은 미미하며 인삼에 대한 수입관세를 부과하지 않고 있는 상태임.

◆ 남미권

- 멕시코는 저가의 중국삼을 선호하고 있으며 특히 미국삼이 한국삼보다 2배 정도의 높은 가격을 형성하고 있고 현지 소비자들의 인식부족 탓에 시장진출에 어려움 노정

- 칠레의 인삼시장은 인삼제품이 대부분 캡슐형태로만 유통되며 콜롬비아나 한국에서 수입하거나 또는 생뿌리의 형태로 중국 등지로부터 수입하여 현지에서 분말을 만들어 캡슐로 제조하여 판매. 2003년 인삼이 스포츠 건강식품으로 분류되어 인삼과 관련된 다양한 제품이 소개되고

있음

◆ 유럽권

- 이태리의 인삼제품은 엑기스가 50%를 차지하고 캡슐이 30%이며 인삼의 수입국가는 중국, 홍콩, 캐나다 순이며 한국은 7위임. 현지에서 한국의 인삼제품이 가장 선호되기는 하지만 중국과 미국제품들과 경쟁하고 있음

- 프랑스는 인삼뿌리 및 분말 수입시장이나 자국에서 생산된 인삼이 인삼제품의 원료로 사용되면서 인삼의 효력이 알려지기 시작했음. 인삼에 대한 인지도는 다른 건강식품 및 보조식품에 비해 아직 낮은 상태여서 인삼제품 수요분을 창출하기에는 향후 많은 시간이 걸릴 것으로 예상

- 독일은 뿌리삼보다는 가공제품 위주이며 강정제로 많이 활용되고 있으나, 점차 인삼미용 스튜디오, 인삼빵, 개사료 등 용도가 다양화되는 추세. 독일은 주로 인삼뿌리, 엑기스, 사탕류를 수입하고 있으며 수입시 연방 약제부의 엄격한 검열을 받아야 함.

- 스위스에서 유통되는 인삼제품은 비가공 인삼제품(75%), 가공인삼제품(25%), 인삼 아로마 또는 인삼향첨가(1%미만) 제품 등이며 일반소비자들은 서양식 의약품에 대한 대체수단으로 아시아 자연산 제품에 대한 효능을 점차 인식하면서 인삼제품 수요가 늘어가고 있는 추세. 주 수입국은 중국으로 전체의 80.5%를 차지하며 독일이 12.7%를 기록하고 있음.

◆ 기타권

- 인도에서는 많은 제약회사들의 적극적인 광고로 인해 인삼시장의 성장이 예상되나 인삼차의 경우 인도시장의 특성상 성장에 한계가 있을 것으로 예상. 2002년에 인도의 인삼근 수입액은 56만 달러이며 수출액은 191만 달러임.

- 이집트는 인삼에 대한 인지도가 매우 높은 편으로 건강보조식품이라는 인식이 강하지만 일반인들의 구매력이 극히 낮아 수요계층이 한정적이며 인삼에 대한 인식이 크게 변하지 않는 한 향후 수요도 현 수준을 유지할 것으로 전망됨. 인삼은 주로 인삼뿌리와 분말을 위주로 수입되고 있음.

제2절 국내 인삼 기술개발 현황

1. 국내 인삼산업의 현황 및 문제점

◆ 국내 홍삼소비는 늘어나고 있지만 1990년을 정점으로 국제인삼시장에서 시장 점유율이 뚜렷한 하향세를 보이고 있음(국내 인삼의 홍콩 시장 점유율은 1990년 금액기준으로 22.9% 이었

으나 2002년에는 9% 이하로 급격히 줄어들었음).

◆ 경쟁국에 비해 저렴한 비용으로 좋은 원료삼을 생산하고, 해외소비자들이 좋아하는 다양한 신제품을 개발하거나 세계시장을 향한 마케팅이 미진함.

- 인삼 수출이 중국과 일본에 대부분 편중되어 있으며, 대만, 일부 동남아시아, 미국, 일부 유럽국가에 머무르고 있음.

◆ 세계시장의 흐름에 부응하는 다양한 제품개발 소홀

◆ 파마톤사의 “파마톤”과 “진사나”와 같이 인삼소비의 큰 흐름이 효능에 기초한 의약품이나 건강기능성식품 형태로 전환되었지만(우리나라 2002년 총 인삼 수출액인 5,600만불의 2-3배 정도인 연간 1-2억 불 수출하고 있음) 이러한 의약품 형태의 고부가가치 상품을 개발하지 못하고 있음.

◆ 인삼 종주국으로서 제조기술이 우수하나 과학적 연구에 의한 뒷받침이 부족해 식품으로서의 해외시장 공략에 실패하고 있음

◆ 인삼 재배지의 염류농도 증가로 각종 생리장애가 발생하자 미국과 오스트레일리아 등지로 떠나는 인삼농가도 늘어나고 있음

◆ 수삼, 백삼, 태극삼, 홍삼 등 인삼류에 주로 의존하고 있고, 인삼제품으로서 엑기스, 초코릿, 비타민, 인삼차 등 100여가지 제품 출시되고 있음

2. 국내 인삼 개발의 연구현황

◆ 1998년 인삼·당귀 등 순수 생약재를 원료로 바르는 조루증 치료제 ‘SS크림’을 개발한 연세대의대 영동세브란스병원 비뇨기과팀은 홍삼이 남성의 성기능 개선에 효과적이라는 임상결과를 발표했다

◆ 몇 년 전에 한 벤처기업에서 ‘헤브리진생’이라는 상품명으로 해외시장을 목표로 출시하였는데, 이는 기존의 인삼성분보다 4배 이상의 고농도의 성분으로 상품화된 것임

◆ 인삼 약리효능은 주로 인삼 사포닌에 관한 것으로 중추신경계에 대한 작용, 뇌기능에 대한 작용, 항발암과 항암작용, 면역기능 조절작용, 항당뇨 작용, 간기능 강화 작용, 심혈관 장애 개선 작용, 혈압 조절작용, 갱년기 장애 개선작용, 항스트레스와 항피로작용, 항산화작용 등이 보고되었음

◆ 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 및 중성지방 수준을 감소와 인삼의 분획물들의 간장내 지방축적 감소효과가 보고되었음. 그러나 인삼은 부위별, 년근별 및 원료삼류에 따라 사포닌의 함량이나

조성이 상이한 것으로 밝혀졌고, 추출용매의 에탄올 농도에 따라서도 엑스 수율과 사포닌 함량도 상이한 것으로 일부 보고된 바 있음

◆ 인삼의 주요 성분인 사포닌은 진세노사이드(ginsenoside)라 부르는데 다른 식물에서 발견되는 사포닌과 다른 특이한 구조뿐 아니라 그 효능도 차이가 있음. 최근 분리분석 기술의 발달에 따라 지금까지 30여종의 인삼사포닌의 화학구조가 밝혀졌는데, 인삼 사포닌은 화학구조의 특성에 따라 파낙사디올 (PD계), 파낙사트리올(PT계), 올레안계 사포닌으로 구분하는데 현재까지 각각 19종, 10종, 1종의 화합물이 분리 정제 되었음. 식물계에 존재하는 대부분의 사포닌은 올레안계이고 인삼사포닌은 타 식물계에 거의 존재하지 않는 dammarane 계열의 triterpenoid 사포닌으로 알려져 있음.

◆ 프로토파낙사디올(PD계)는 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂ 로 구성되어 있는데 Ginsenosides의 주요 약리작용은 중추신계를 비롯하여 내분비계, 면역계, 대사계 등에 영향을 미쳐 신체기능 조절에 다양한 효과를 미치는 것으로 밝혀졌음. 즉, Ginsenoside-Rb₁는 진통, cjlauS, 정신안정 등 중추 신경계를 억제하며 Ginsenoside-Rb₂는 평형장애 개선작용, 콜레스테롤 저하작용, DNA RNA 합성촉진작용, 항산화 활성 물질생성 촉진작용, 부신피질 호르몬분비 촉진작용, 암독소 홀몬에 대한 길항작용, 중앙 혈관신생 억제작용, Plasmin 활성화에 작용하는 것으로 알려져 있음. Ginsenoside-Rc는 중추억제작용을 비롯하여, RNA 합성억제작용, 혈청 단백질 합성 촉진작용, 부신피질 홀몬 분비 촉진작용, Plasmin 활성화작용을 함이 밝혀 졌고, Ginsenoside-Rd는 부신피질 홀몬 분비 촉진, Ginsenoside-Rg₃은 혈소판 응집 억제작용, 히스타민 유리 및 카테콜아민 분비 억제작용, 암의 전이 억제작용과 Ginsenoside-Rh₂는 암세포 증식 억제작용, 중앙 증식 억제작용, 암세포의 재 분화 유도 작용 등이 밝혀져 왔음. 이들 성분들과 가공인삼이 우울증 등에 대한 광범위한 연구결과는 보고된 바가 거의 없음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행 내용 및 방법

1. 연구범위 및 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
가공인삼의 지표성분 분석	흑삼 추출액을 LC-MS를 통해 구성성분을 분석	<ul style="list-style-type: none"> • Ginsenoside Rg1, Rg3, Rc, Rb1, Re standard와 흑삼 추출액을 LC-Mass를 통해 비교하여 흑삼내의 지표물질을 분석 • Rg1 유도체 발굴(신규추정)
지표성분의 세포내 비만 및 당뇨 억제 활성 분석	지방대사 혹은 비만/당뇨와 관련된 단백질 인산화 및 지방 분해 조절기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼추출액과 순수분리된 물질을 L6 지방세포에서 단백질 인산화 조절기능 분석 • PTP1B와 lipase 기능 억제활성 분석 • Glucose uptake, 인슐린수용체 인산화 분석 • 당뇨 신호전달의 소포체스트레스 (ER-stress) 조절기능 분석
대사 증후군에 대한 가공인삼 성분의 증상개선 효과	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 성분의 경구투여에 따른 지구력 및 대사량 증강 활성 • 당뇨유발 마우스에 있어서 혈당조절 효과 • 혈당억제 관련 제요인에 대한 흑삼 성분 경구투여 의 조절활성 	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 성분을 경구투여한 마우스에 있어서 기초 대사량 증가 활성을 측정 • 수영시험에서 흑삼 성분을 투여한 마우스에서 수영시간 연장 효과를 도출 • alloxan을 투여한 당뇨유발 동물모델을 확립 • 가공인삼 성분의 경구투여에 의한 혈당조절 및 당뇨관련 제 요인들의 억제 활성을 측정 (glucose, 음수량, insulin 등) • 당뇨유발 마우스에서 당내성에 대한 흑삼 성분의 억제효과 측정
마우스 면역세포에 대한 비특이적 활성화 작용	<ul style="list-style-type: none"> • in vivo실험계에서 흑삼 추출액을 투여한 마우스의 비장세포를 회수하여 증식작용에 대한 증강활성 측정 • in vitro실험계에서는 	<ul style="list-style-type: none"> • 비장세포에 대한 세포증식 반응 측정 (MTT assay에 의함) • T세포 및 B세포 특이적인 활성화 반응 (mitogen에 대한 증식반응의 증가 측정) • T세포로부터 사이토카인 분비유도 활성 (ELISA kit을 이용한 정량법) • 대식세포 활성화 측정 (ELISA kit을 이용한 정량법)

	<p>macro- phage 및 비장세포에 흑삼 추출액을 직접 처리한 후 면역세포의 증식반응과 사이토카인 분비활성을 측정함</p>	<p>-사이토카인의 분비 및 mRNA의 발현 -Nitric oxide의 분비</p> <ul style="list-style-type: none"> • 경구투여에 따른 항원 특이적인 전신면역 (systemic immunity) 기능의 변화 <p>-사이토카인 발현의 조사 (ELISA kit 및 PCR법에 의한 조사)</p> <p>-Th-1/Th-2 type 사이토카인에 대한 분비능의 조사</p>
<p>흑삼 추출물에 의한 항알러지 활성의 측정</p>	<p>OVA로 유도된 마우스 알러지 모델에서 항원 특이적인 면역반응의 억제 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Total IgE의 혈중 농도 측정을 통한 IgE 분비 기능의 억제 측정 • OVA-specific한 IgE 및 IgG의 측정을 통한 알러젠에 대한 항체반응 억제 분석
<p>흑삼성분에 의한 항암활성의 해석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • in vitro 실험계에서 흑삼 추출물에 의한 암세포 증식억제 효과 측정 (direct cytotoxicity) • in vivo 종양모델에서 항암활성 해석 	<ul style="list-style-type: none"> • In vitro에서 암세포 살해활성 측정 • 암세포 살해기전의 해석 (apoptosis의 여부) • 암전이 억제활성 (B16-BL6 및 colon 26세포에 의한 폐전이 모델)
<p>수지상 세포에 대한 흑삼 추출물의 활성화 유도작용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 수지상 세포의 증식에 대한 흑삼 추출물의 효과 • 수지상 세포로부터 사이토카인 분비능에 미치는 영향 	<ul style="list-style-type: none"> • 수지상 세포 분리법의 확립 • 수지상 세포 증식에 미치는 흑삼추출물의 활성을 MTT 법에 의해 측정 • 수지상 세포로부터 분비되는 사이토카인의 ELISA에 의한 정량
<p>대식세포의 염증반응 및 T세포의 ConA매개 활성화 모델에서 면역학적 억제활성</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LPS에 의해 유도된 대식세포 증식반응의 조절 • LPS 자극 대식세포로부터 사이토카인 분비에 대한 흑삼 추출물의 억제 효과 • ConA매개 T세포 활성화에 미치는 흑삼 추출물의 조절작용 	<ul style="list-style-type: none"> • MTT법을 이용한 대식세포 증식반응의 측정 • LPS 자극 대식세포에 있어서 흑삼 추출물 처리의 염증성 사이토카인 분비능의 억제를 측정 (ELISA에 의한 정량법) • 항CD3e 항체의 자극에 의한 T세포 활성화 모델 확립 • 활성화 T세포에 있어서 흑삼 추출물의 증식억제 효과를 MTT법에 의해 측정 • 활성화 T세포로부터 사이토카인 분비능에 미치는 흑삼 추출물의 억제활성을 ELISA 정량에 의해 확인

<p>흑삼 추출물의 암세포에 대한 독성 조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 각종 암세포에 대한 직접 상해활성 조사 (in vitro 독성시험) 	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스 암세포(B16-BL6, colon 26)와 사람의 암세포(MCF-7, MDA-231)에 대한 세포독성을 MTT assay를 통해 분석
<p>흑삼 추출물 경구투여에 의한 암세포의 증식, 전이 및 혈관신생의 억제 효과</p>	<ul style="list-style-type: none"> • In vivo 실험모델에서 종양 증식에 대한 억제활성 • 실험적 폐전이 모델에서 전이억제 효과 조사 • 실험적 간 및 비장 전이모델에서 전이억제 효과 • 자연 폐전이 모델에서 전이억제 활성의 조사 • In vivo 모델에서 암세포에 의한 혈관신생 억제효과 조사 	<ul style="list-style-type: none"> • C57BL/6 마우스에 B16- BL6 melanoma 세포를 이식한 종양이식 모델에서 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 종양증식 효과 조사 • B16-BL6 및 colon 26 암세포의 정맥주사에 의한 실험적 폐전이 모델에서 억제활성 조사 • L5178Y-ML25 암세포에 의한 간 및 비장 전이모델에서 억제활성 조사 • B16-BL6 암세포의 피하이식에 의해 유발되는 혈관신생에 대한 억제효과 조사
<p>흑삼 추출물의 항암활성에 관련된 면역학적 작용기전 해석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • NK세포에 의한 세포살해활성 조사 • NK세포 deletion에 의한 NK세포활성의 관여 조사 • 흑삼 추출물 경구투여에 의한 면역세포 활성화 조사 	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 NK세포의 세포살해활성 증가 유도 조사 • 항asialo GM1 항체 투여에 의한 NK세포 deletion 모델에서 흑삼 추출물의 항암활성에 대한 NK세포 활성화 관련 여부 탐색 • 흑삼 추출물을 경구투여한 후, 비장세포의 증식 및 사이토카인 분비의 증가활성 조사
<p>전뇌허혈 중풍모델 확립 및 다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의 동물 모델 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 4VO 전뇌허혈 중풍모델 확립 • 다양한 행동학적 검사를 통한 학습/기억 및 운동장애 동물 모델 확립 • 신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 	<ul style="list-style-type: none"> • 4VO 전뇌허혈 중풍 모델 확립 • 흰쥐의 경동맥을 묶고, 제작된 probe를 삼입하여 중대 뇌동맥의 기시부를 폐쇄하였다. • Morris water를 기억력 측정 • 수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm 높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 22± 2℃되는 물이 30cm 높이로 채워진다. 수중 미로의 주변은 비디오 카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 있는 수온 조절용 장치등 공간단서들을 일정하게 유지한다. 도피대는 직경이 12cm인

		<p>원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm 낮게 위치시킨다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지고, 나머지중 하나가 출발위치로 사용된다. 실험동물들은 하루에 4시행씩 7일간 훈련을 받으며 7일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사시행이 삽입되는데, 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 된다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 검사시행에서는 훈련시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 측정한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rota-rod이용 motor function 측정 <p>전뇌허혈 모델에 가공인삼 처치 후, 회전봉이 5분간 0-40rpm까지 회전하는 가속 회전법을 사용하여 뇌허혈이 유발된 흰쥐를 봉의 가운데에 균형을 잡아 놓은 후, 회전을 시작한 시간부터 흰쥐가 떨어질 때까지의 시간을 측정하여 평가하였다. 각 흰쥐마다 3회 실시하여 평균값을 측정한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cresyl violet염색으로 뇌세포 염색 <p>Gelatin으로 코팅된 슬라이드에 조직을 붙여 말린 후, 100%,95%,70%알콜에 담귀 탈수 후, cresyl violet용액에 5분간 담귀 염색 후, DW에 여러번 세척후, 다시 70%,95%,100%알콜에 담근다. Xylene에 담귀 봉합 후 현미경으로 관찰한다.</p>
<p>TMT를 이용한 치매모델 확립 및 다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 행동학적 검사를 통한 학습/기억 및 운동장애 동물 모델 확립 • 신경 화학적 방법에 	<ul style="list-style-type: none"> • 치매 모델 확립 <p>TMT를 (6,7,8mg/kg)로 saline에 녹여 복강 내 투여 후, 기억장애최적의 모델 확립.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morris water를 기억력 측정 <p>수중미로로 이용되는 수조는 직경이 180cm</p>

<p>동물 모델 확립</p>	<p>의한 뇌세포 염색</p>	<p>높이가 50cm인 원형 통으로 온도가 22±2℃되는 물이 30cm 높이로 채워진다. 수중미로의 주변은 비디오 카메라, 실험대, 그리고 실험대 위에 잇는 수온 조절용 장치등 공간단서들을 일정하게 유지한다. 도피대는 직경이 12cm인 원형 투명 아크릴에 받침대를 부착하고, 수면보다 1.5cm낮게 위치시킨다. 수중미로는 4개의 동일한 사분원으로 나누어져서 북동(NE), 북서(NW), 남동(SE), 남서(SW)로 구분되고 이중 북동 사분원의 중심부에 도피대가 놓여지고, 나머지중 하나가 출발위치로 사용된다. 실험동물들은 하루에 4시행씩 7일간 훈련을 받으며 7일째 마지막 시행이 끝나면 자유수영 검사시행이 삽입되는데, 이때 동물들은 도피대가 제거된 채로 60초간 수영을 하게 된다. 모든 동물들의 행동은 비디오 카메라로 녹화되는데, 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 검사시행에서는 훈련시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 측정한다.</p>
-----------------	------------------	--

2. 추진전략

(1) 가공인삼의 공급

본 연구과제의 참여기업인 “금산천년홍삼”를 통하여 공급될 예정이다. 가공인삼제조는 현재 참여 기업을 통하여 다량 확보된 상태이며 이를 주관기관인 한국생명공학연구원과 협동기관인 건양대, 카톨릭의대에서 각각의 연구를 수행할 계획임

(2) 모델동물 확보

본 연구를 위한 비만/당뇨의 모델동물은 주관기관에서 이미 비만형 혹은 당뇨형 마우스를 공급하고 있고, 또한 high fat diet 마우스 또한 주관기관에서 사용하고 있음. 면역세포 및 항암 동물모델도 제1협동기관인 건양대에서 이미 연구를 수행하고 있고, 뇌허혈중/치매 동물모델도 제2협동기관인 카톨릭의대에서 수행하고 있으나 본 연구를 위한 목적에 부합하는 모델은 본

연구를 통해 변형시켜 확보할 계획임

(3) 가공인삼 지표물질의 분석

본 연구의 주관기관은 20여년 이상 동안 신약개발을 목표로 한 연구를 수행하고 있어, 물질의 분리, 구조분석은 세계적 수준임.

(4) 지표물질 유도체 합성

본 연구의 주관기관에 유기화학 전공자가 있어, 가공인삼의 각 성분중에서 효능이 우수한 물질들에 대해 화학합성을 통해 대량의 유도체를 확보할 계획임

(5) 지표물질 및 유도체의 임상적 안전성 검증

지표물질의 개별인증화 확보를 위하여 본 연구사업 3차년도에는 카톨릭의대 김정수 교수팀과의 협동연구에 의해 물질의 안정성을 시험할 계획임

(6) 가공인삼의 개별인증화

본 연구에서는 개별인증화를 확보하기 위한 과학적 근거를 마련하고 이로써 효능이 확실한 제품을 개발함이 목표로서, 본 연구수행 완료시기에는 개별인증화 작업에 들어갈 예정임

(7) 가공인삼제품의 시장개척

주관기업인 한국생명공학연구원의 주관연구책임자팀은 일본의 이화학연구소(RIKEN)과 MOU를 통하여 국제공동연구를 수행하고 있다. 일본측도 신물질 개발에 매우 집중적 연구를 수행하였고, 현재도 우수한 효능의 물질이 확보된다면 언제든지 공동연구를 위한 협력을 시작할 수 있는 여건이 마련되어 있다. 그리고, 본 연구에는 “금산천년인삼”과 “우리지엔에스”의 두 업체가 참여기업으로 들어오게 되는데, “금산천년인삼”은 일본측과의 공동연구를 확장해 나갈 계획이고, “우리지엔에스”는 그동안 화장품과 건강식품 수출의 경험이 풍부하므로 이를 기반으로 하여 국내외 판로를 개척할 계획이다.

3. 연구개발방법

(1) 비만세포의 분화유도

L6 비만세포에서의 생리활성을 보기 위하여는 먼저 분화를 시켜야 하는데, 2% horse serum을 넣고 5일 동안 매일 배지를 바꾸어 배양한다.

(2) 분화된 비만세포에서의 유효물질 처리

L6 분화된 세포에서 serum을 제거한 배지에서 하루를 배양한 후 유효물질을 농도별로 1시간 동안 처리하고 세포를 lysis 시킨다.

(3) 단백질 인산화 분석

분화된 L6 비만세포를 lysis 시킨후 전기영동하여 비만, 당뇨에 필수적으로 관여하는 Akt, AMPK, ACC 등의 단백질의 인산화를 분석한다.

(4) Glucose uptake

분화된 L6 비만세포에 동위원소로 표지된 [3H]glucose를 세포에 처리하여 1시간을 배양한 후 유효물질을 처리하여 1시간을 더 방치한다. 그후 세포를 PBS 완충용액으로 세척하고 lysis 시켜 세포내 잔류 glucose의 양을 Liquid scintillation counter로 측정한다.

(5) 비만 마우스에서의 저해활성 측정

ob/ob 비만 마우스와 high fat diet 마우스에 유효물질을 섞은 사료를 처리하여 2개월 동안 몸무게 및 체지방량, 시상하부의 NPY와 CCK의 발현정도를 측정한다.

(6) 마우스 면역세포에 대한 비특이적 활성화

- ① 비장세포에 대한 세포증식 반응 측정
- ② T세포 및 B세포 특이적인 활성화 반응
- ③ T세포로부터 사이토카인 분비유도 활성화
- ④ 대식세포 활성화 측정
 - 사이토카인의 분비 및 mRNA의 발현
 - Nitric oxide의 분비

(7) 마우스에서의 점막면역 증강 효과 조사

- ① 흑삼성분별 경구투여에 의한 면역세포의 활성화 측정 (유효 추출물의 선택)
- ② 면역세포 활성화에 관련된 작용기전의 해석
 - 혈청 및 소장 내 항체생산 능의 조사 (IgA 및 IgG; 효소면역법에 의한 측정)
 - 점막면역세포에 대한 활성화 기전 해석(소장점막세포 및 장점막 면역세포)

(8) 경구투여에 따른 항원 특이적인 전신면역(systemic immunity) 기능의 변화

- ① 사이토카인 발현의 조사 (ELISA kit 및 PCR법에 의한 조사)
 - Th-1/Th-2 type 사이토카인에 대한 분비능의 조사

- ② 세포성 면역의 변화 (DTH 및 CTL활성의 변화)

(9) 흑삼성분에 의한 항원 특이적인 면역증강(adjuvant)활성 측정

- ① KLH항원과 co-immunization에 의한 항체유도 활성의 증가
- ② 항원에 대한 세포성 면역의 증가 (DTH반응, 사이토카인 분비 등)

- ③ 특이적 면역증강의 최적 투여조건의 확립
- (10) 항염증 및 항알러지 활성 실험
 - ① 세균내 독소(LPS)에 의한 대식세포 염증모델에서의 항염증 활성 측정
 - ② 항염증 활성에 관련된 신호전달 체계의 해석
 - ③ OVA유도성 알러지에서의 활성의 해석
 - ④ OVA알러지 모델에서 IgE분비 및 Th-1/Th-2 type 사이토카인 분비의 조절
- (11) 마우스 면역세포와의 상호작용 해석
 - ① 대식세포와 흑삼성분의 특이적 반응 여부 확인
 - ② Dendritic cell과 흑삼성분의 상호작용 해석 (증식 활성화, 사이토카인 유도)
 - ③ 면역세포 활성화 기전 해석 (신호전달, FACS에 의한 발현 분자의 변화)
- (12) 마우스의 생리학적 변화 측정
 - ① 체중변화, 기초 대사량의 변화
 - ② 현수 테스트에서의 체력증강 효과 측정
- (13) 마우스 in vivo실험에서의 독성 테스트
 - ① 간 독성 테스트 (GPT, GTP 측정)
 - ② 신 독성 테스트 (CRE, BUN 측정)
 - ③ 각 투여량 별 체중, 각 장기의 중량 감소 조사
 - ④ 해부 조직학적 소견 검사
- (14) 흑삼성분에 의한 항암활성의 해석
 - ① In vitro에서의 암세포 apoptosis유도활성
 - ② Apoptosis유도에 관련한 작용기전 해석(caspase activation, 신호전달 등)
 - ③ 암전이 억제활성 (B16-BL6 및 colon 26세포에 의한 폐전이 모델)
 - ④ 암세포의 접착(adhesion) 및 침입(invasion) 억제 실험
 - ⑤ 흑삼성분에 의한 항 angiogenesis활성
 - ⑥ 기존의 항암제와의 병용투여에 의한 항암활성 증가
 - ⑦ 효능의 최적화에 필요한 투여경로 및 투여량의 결정
- (15) 전뇌 허혈성 동물모델의 확립

웅성 모래쥐(mongolian gerbil, 70-80g)을 70% N₂ /30% O₂ 와 혼합된 30% isoflurane으로 흡입마취시킨 후, 경부를 절개하여 흉골허근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 5분동

안 양쪽 총경동맥을 동맥지혈 클립으로 폐색시킨다. 절개된 부위를 봉합한 후 마취에서 회복시킨다. 수술 및 마취 회복동안 온도 조절 장치를 이용하여 직장내 온도를 37°로 유지시킨다.

(16) 치매실험동물

실험에 사용하는 흰쥐는 Sprague-Dawley계로 생후 8주령(체중 280±10g)의 수컷(샘타코, 한국)을 구입하여 동물실험실 내 사육실에서 7일간의 적응기간을 갖도록 한다. 사육실의 온도는 23±3°C, 상대습도 50±10%의 환경을 유지하면서 08:00부터 20:00까지 12시간 간격으로 명암을 조절하고, 고품사료(삼양사료, 경기도)와 물은 무제한 공급한다.

해마로 투사하는 acetylcholine성 신경세포의 주 입력구조물인 medial septum, nucleus basalis 등에 ibotenic acid (a glutamate analogue) 국소 주입에 의한 손상 또는 Medial septum, nucleus basalis 부위에 192 IgG-saporin (a highly specific immunotoxin against cholinergic neurons) 국소 주입에 의한 손상모델을 이용한다.

실험군 분리는 모의시술군(Sham, 대조군), 내측 중격의 신경세포를 손상시키는 ibotenic acid 손상군, ibotenic acid 손상+ 약물투여군으로 나뉜다.

실험군은 쥐에 sodium pentobarbital(50mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 입체정위 수술장치(stereotaxic apparatus)를 이용하여 내측 중격(AP:-0.2, L: ±0.3, H:-6.2)위치에 ibotenic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 양쪽으로 4μg씩 주입하였다. 미세주입은 1ml gas-tight glass syringe(Hamilton, Reno, NV, USA)에 polyethylene 튜브로 연결하여 perfusion pump(Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA)를 이용하여 0.2μl/min 유속으로 1μl 주입 후에 5분간 방치한 다음 syringe를 제거한다. 각각 손상군에 대한 약물처치는 그 다음날부터 시행한다. 대조군은 손상약물 대신 145mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 1.0mM MgCl₂로 만든 인공 뇌척수액을 같은 방식으로 주입한다.

(17) 조직염색법을 통한 전뇌허혈성 및 치매 조직의 손상 확인

중풍 및 치매 유발 부위의 확인을 위하여 우선 조직 염색 이전, 고정을 위해 몇가지 buffer를 준비한다. formalin buffer는 100ml formalin(37%), 900ml 증류수, 6.5g Na₂HPO₄(dibasic) 4g NaH₂PO₄·HCl(monobasic)을 mixing하여 만들고, 생리식염수 9g의 NaCl을 증류수 1ℓ에 녹여서 준비한다. 다음으로 Pre-stain solution 으로 증류수, 70% alcohol, 95% alcohol, 100% alcohol, xylene 용액을 갖추고, 끝으로 염색용 solution인 cresyl violet solution(cresyl violet acetate 0.5g)을 제조한다. Buffer를 모두 준비한 뒤, 본격적인 조직 검사에 들어가기 앞서서 고정을 위한 생리식염수와 formalin buffer를 각각 4ℓ Wkfl 증류수 통에 넣어 peristaltic

pump(Ismates ISM22IC)에 연결하여 tube를 통해 관류할 수 있도록 한 뒤 모래쥐 위 복부에 sodium pentobarbital을 80mg/kg을 주사하여 마취시킨 뒤 수술대에 고정하여 흉곽을 열고 descending aorta를 결찰시켰다. 심첨 부위에 침자하여 먼저 생리식염수를 300ml/min의 유속으로 흘려서 혈액을 씻어낸 뒤, 처음에는 formalin buffer를 300ml/min의 유속으로 충분히 관류한 뒤 130ml/min의 유속으로 흘린다. 두개골로부터 뇌를 분리하여 formalin buffer에 2시간동안 고정해 두었다가 20% sucrose에 넣어서 4°C에서 overnight해 둔다. Microtome을 이용하여 뇌로부터 30 μ m의 뇌절편을 만들어 뇌를 염색하기 이전 증류수(5min), 70% alcohol(5min) 100% alcohol(5min), 95% alcohol(5min), 70% alcohol(5min), 증류수(5min)순으로 담구어서 탈지, 탈수를 시킨 뒤, cresyl violet buffer로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경으로 관찰한다. Paxinos와 Watson의 Atlas에서 주어진 coordinate를 참고하여 뇌손상 부위를 확인하였으며 중풍 유발부위를 검증한다. 위와 동일한 방법으로 흑홍삼과 그 유효성분들의 신경세포 보호효과를 조직 염색법을 이용하여 평가한다.

(18) 치매 동물 모델에서의 신경 화학적 변화에 관한 연구

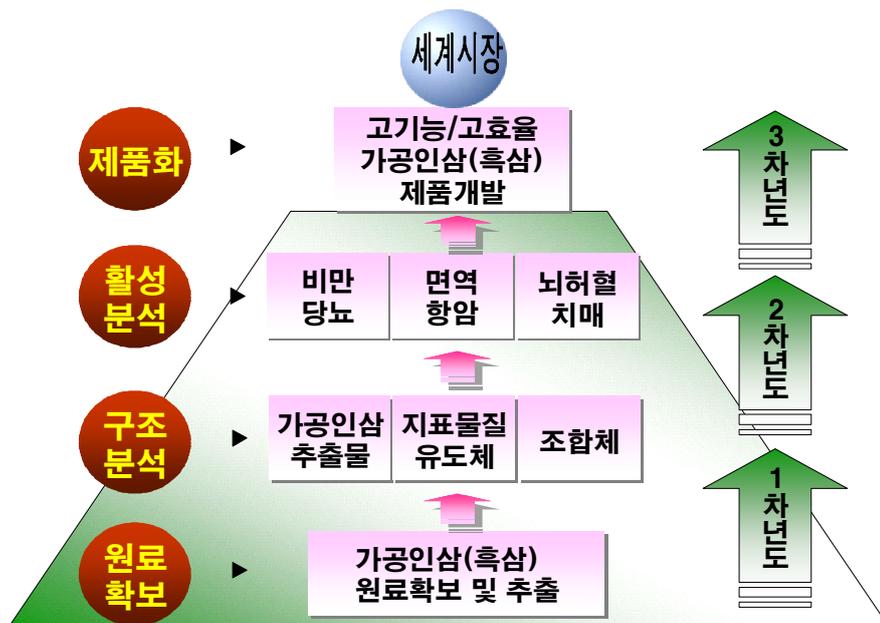
- Medial septum, hippocampus 부위에서 ChAT(choline Acetyltransferase) 면역화학조직염색을 통한 acetylcholine성 신경세포 관찰: 모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital(100mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 고정액(fixative) 900ml로 심장을 통해 관류한다. 처음 고정액 200ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml은 25분간 천천히 관류한다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 인산완충액(PBS)에 넣어 4°C에서 하루동안 보관한다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 microtome(Leica, CM1850, Germany)을 이용하여 뇌 조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, 내측 중격 부위에서 30 μ m의 두께로 자른 다음 PBS로 조직을 몇 차례 씻은 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용한다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azide(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양한다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC

reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine(DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정한다.

- Hippocampus에서 AChE(Acetylcholinesterase) 조직염색법을 통한 acetylcholine의 활성 정도를 관찰: 뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer(NaH₂PO₄·H₂O, pH 6.0) 325ml에 acetylcholine iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 후 수초간 기다리면 옅은 녹색을 나타내는데 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 1~2시간동안 배양한다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰한다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 100배로 확대하여 해마에서 AchE 신경세포의 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정한다.

4. 연구개발의 추진체계



제2절 연구내용 및 결과

1. 비만 및 당뇨 예방 및 치료용 고효율 가공인삼 제품개발에 관한 연구

가. 인삼가공을 통한 흑삼의 제조

121°C에서 autoclave를 2시간동안 한 후에 30분을 상온에 방치 후 다시 2시간의 autoclave를 실시하여 검갈색의 흑삼을 만든다. 다만 이때 autoclave와 상온 방치시에 각각 조금씩의 노하우가 필요하다 (Fig. 1)..

나. 흑삼의 당흡수(glucose uptake) 효과 분석

◆ L6 근육세포에서의 glucose uptake

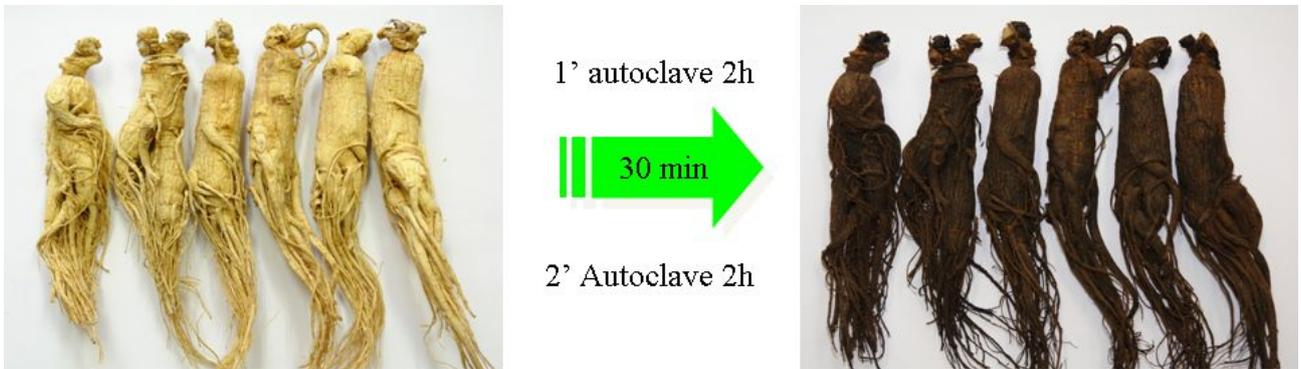
세포를 12 well plate에 1×10^5 개를 넣어 분화시킨 후, 혈청 없는 배지로 24시간동안 처리하고, 다시 Krebs-Ringer HEPES (KRH, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgSO_4 1.5 mM, HEPES 20 mM) 완충액으로 세척한다. 활성물질을 1시간 동안 세포에 처리한 다음, 1 μCi 2-deoxy-D- ^3H glucose 가 들어있는 KRH 완충액으로 세척한다. 차가운 PBS 용액으로 반응을 종결하고, 다시 3 회 세척하여 준다. 그 후 세포를 0.1% SDS가 들어간 0.5 M NaOH 용액에 용해시켜 liquid scintillation counter로 활성화 정도를 측정한다.

◆ 흑삼의 glucose uptake 효과 분석

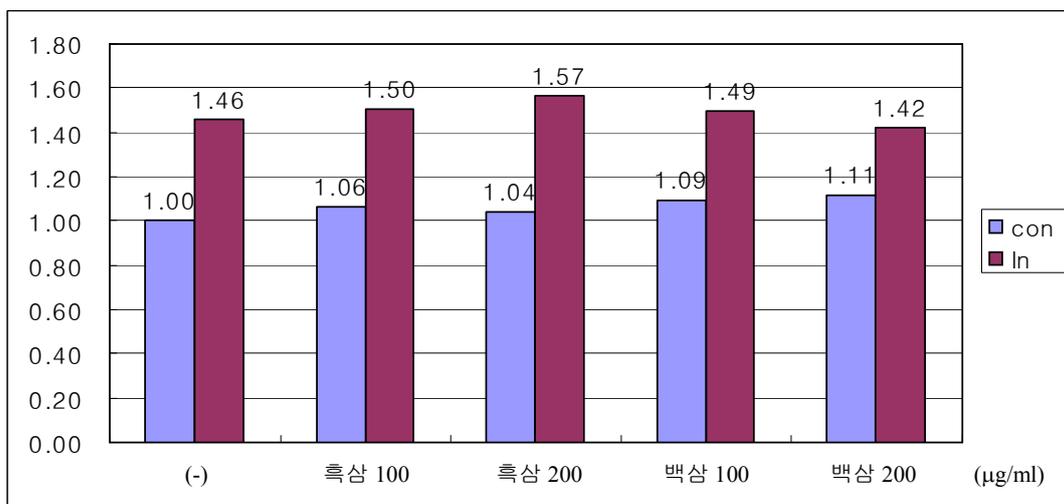
비만/당뇨를 억제하기 위해 인슐린은 L6 세포의 AMPK 인산화를 촉진시키고 glucose uptake를 증가시킨다. 흑삼이 이러한 효과를 가지고 있는지 살펴보았는데, 인슐린의 유무에 관계없이 흑삼은 glucose uptake에는 영향을 주지 않음을 확인하였다 (Fig. 2)..

다. 흑삼의 pancreatic lipase 억제활성 분석

Pancreatic lipase는 췌장에서 분비되는데, 세포내 지방을 지방산으로 분해하여 세포나 조직에서 흡수토록하며 이에 따라 지방이 체내에 축적되게 된다. 그러므로 pancreatic lipase의 활성을 저해하면 비만을 저해할 수 있는데, 현재 Orlistat가 유일하게 이의 저해제로 사용되고 있다. 아래 <표1>에서 보는바와 같이 흑삼은 pancreatic lipase 활성에는 거의 영향을 주지 않고 있음을 알 수 있다.



<Fig. 1> 변형된 방법에 의한 흑삼의 제조과정



<Fig. 2> 흑삼에 의한 당 흡수도의 변화

<표1> 흑삼의 pancreatic lipase 효소활성에의 영향

Name	Lipase inhibitory activity (100 µg/ml; %)
KH	70.0
GC	29.7
JH	21.3
GP	39.2
흑삼	27.3

라. 흑삼의 protein tyrosine phosphatase inhibitory activity

PTP1B는 인슐린 신호전달과정에서 인슐린수용체(IR)의 인산화를 막는 역할을 함으로써 당뇨의 원인을 제공한다. 흑삼이 PTP1B 저해활성을 가지고 있는지 알아보기 위해 in vitro상에서 assay를 수행한 결과 MDP, JJY, GA 등의 한약재들은 PTP1B 저해효과를 보이고 있으나 흑삼은 전혀 활성을 보이지 않고있다 (표2).

마. 흑삼의 소포체스트레스 조절에 의한 비만/당뇨 억제

소포체스트레스(ER-stress)는 단백질 post-modification에 결정적인 역할을 하는 소포체(endoplasmic reticulum)에서 그 기능이 제대로 되지 않거나 지방 등이 많이 세포에 축적될 경우 스트레스가 일어나게 되는데, 이러한 ER-stress를 조절함으로써 당뇨 치료가 될 수 있음이 Science 등에 보고되고 있다(Science, 2005, 2006). 흑삼이 이러한 ER-stress 조절을 통해 비만/당뇨를 치료할 수 있는 기능이 있는지 알아보기 위해 먼저 ER-stress의 대표적 마커인 XBP-1 단백질의 splicing과 chaperone 단백질인 GRP78의 expression, 그리고 세포사멸인자인 CHOP 단백질의 발현 등을 조사하였다.

두 가지 가공법에 의한 흑삼1, 흑삼2 모두 ethylacetate와 hexane으로 추출하였을 때 XBP-1 splicing이 일어났으며 두 가지 용매가 함께 사용될 때 더욱 강한 splicing이 일어나고 있다. GRP78의 경우엔 다소 약하지만 흑삼에 의한 발현 증가 경향은 확인할 수 있으며 CHOP의 발현은 두드러지게 나타나고 있다 (Fig. 3). 따라서 흑삼이 ER-stress을 조절하며 ER-stress에 의한 당뇨 조절 가능성을 시사해주고 있으나 2차년도 연구에서 더욱 심도 있는 분석이 필요하다.

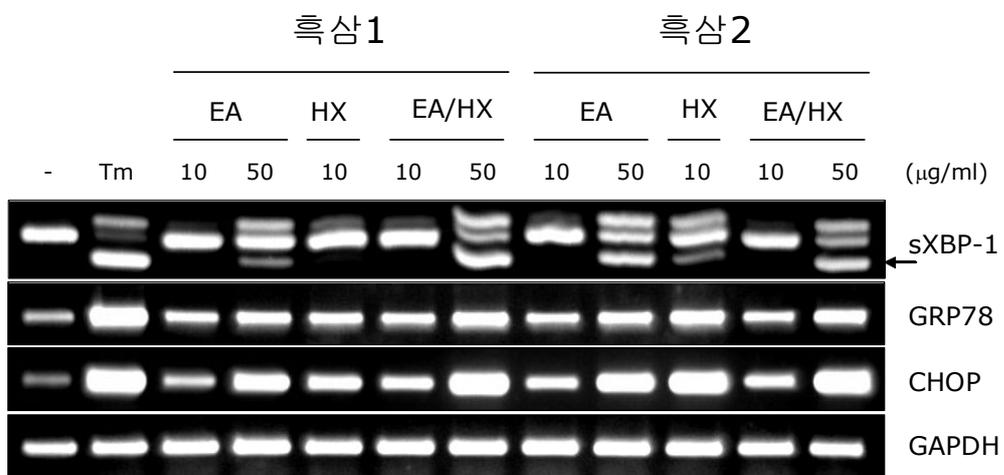
바. 흑삼의 인슐린 수용체 (insulin receptor) 인산화 증진 효과

인슐린이 부족하거나 인슐린 수용체 결핍 혹은 이상으로 인하여 세포내에서 인슐린 신호전달이 제대로 일어나지 않을 경우 비만/당뇨의 원인이 됨은 이미 잘 알려진 사실이다. 32D^{IR} 세포에 흑삼추출물을 처리하였을 때 아래 그림과 같이 인슐린 수용체(IRb)의 타이로신부위 인산화가 증가됨이 확인되었다 (Fig. 4). 이때 흑삼의 효과는 인슐린과 거의 비슷한 정도의 활성을 보이고 있어 매우 강력한 비만/당뇨 치료효과를 보일 것으로 예상되고 있다.

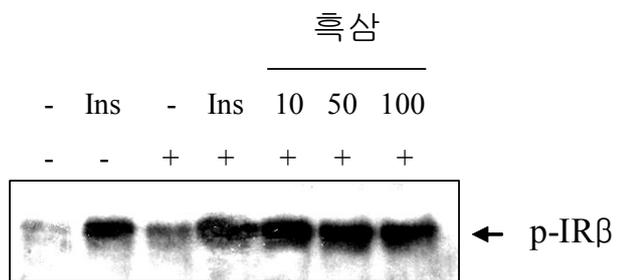
<표2> 흑삼 분획물의 PTP1B 저해활성 분포

◆PTP1B inhibitory activity

Name	100 µg/ml (%)	50 µg/ml (%)
MDP	75.4	61.1
SH	10.6	-
JJY	82.0	76.0
JGP	-	-
CP	-	-
흑삼	-	-
AD	-	-
AS	-	-
FA	-	-
GA	82.9	64.5



<Fig. 3> 흑삼 추출물의 ER-stress 유도활성



<Fig. 4> 흑삼의 인슐린 수용체 인산화에 대한 농도별 영향
 흑삼 처리 농도: microgram/ml. 처리시간: 인슐린 처리 전 30분간

사. L6 근육세포에서 비만/당뇨 조절 단백질 AMPK, Akt1의 인산화

◆ L6 근육세포의 분화

Rat L6 근육세포를 10% FBS가 들어있는 DMEM 배지에서 단층을 형성하도록 배양시킨다. 분화시키기 위하여 1×10^5 개의 세포를 60 mm dish에 넣어 하룻밤동안 배양한 후, 2% horse serum이 들어간 DMEM 배지로 7일 동안 매일 배지를 바꾸어준다. 분화된 후 혈청이 없는 배지로 하룻밤동안 배양한 다음, 분리한 활성물질을 1시간동안 세포에 처리 하고 세포를 lysis한다. Whole lysate를 웨스턴 블랏팅하여 p-AMPK의 활성화된 정도를 측정한다.

◆ 다음과 같은 방법에 의해 L6 세포를 가공인삼 성분으로 처리하고 단백질 인산화 조사하였다 (Fig. 5).

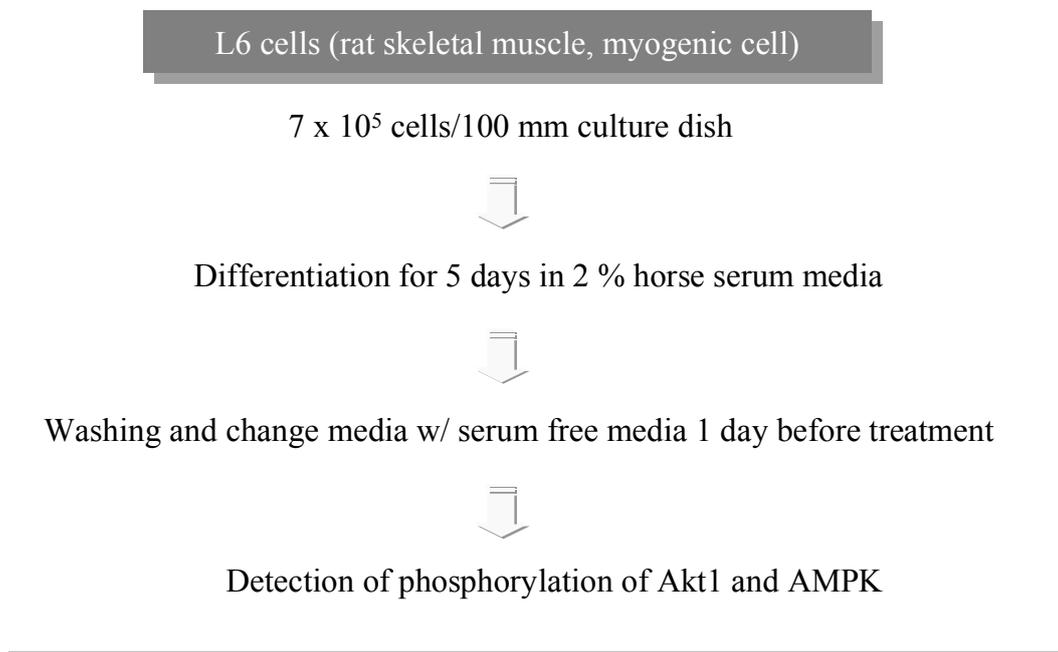
◆ 흑삼의 L6 근육세포에서 AMPK, Akt1 인산화 증진효과

먼저 L6 세포에서 흑삼의 단백질 인산화 증진효과를 조사하기 위해 다른 몇 가지의 한약재와 함께 세포에 처리하여보았다.

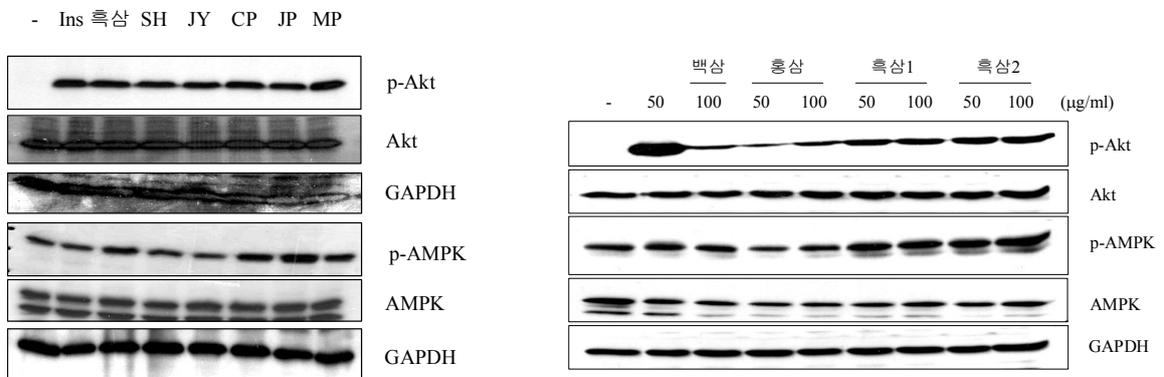
왼쪽 그림에서와 같이 흑삼은 인슐린과 비슷한 정도의 Akt1 인산화 효과를 나타내었으며, AMPK의 경우 인슐린은 원래 AMPK 인산화를 일으키지 않는다고 알려진 바와 같이 효과를 보이지 않고 있으나 흑삼은 AMPK 인산화를 증가시키고 있다. 좀더 자세히 그 효과를 조사하기 위해 흑삼을 농도별로 세포에 처리하여보았다. L6 세포를 분화시킨 후 각 시료를 50 혹은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 L6 세포에 30분 처리 후 AMPK, Akt1의 인산화를 조사하였는데, 위의 오른쪽 그림에서와 같이 백삼은 AMPK와 Akt의 인산화 활성화에는 거의 영향을 보이지 않았으며 홍삼 또한 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서만 Akt1의 인산화를 약하게 증가시킴을 알 수 있다. 그러나 흑삼의 경우 각 제조 시기가 다른 두 가지 종류를 사용하였을 때 거의 비슷한 양상의 인산화 증진효과를 볼 수 있었다 (Fig. 6).

한편, AMPK 인산화 유도물질로 잘 알려진 AICAR를 대조물질로 사용하여 흑삼2를 HPLC column을 통해 그 분획물들의 AMPK 인산화 정도를 조사하였다 (Fig. 7).

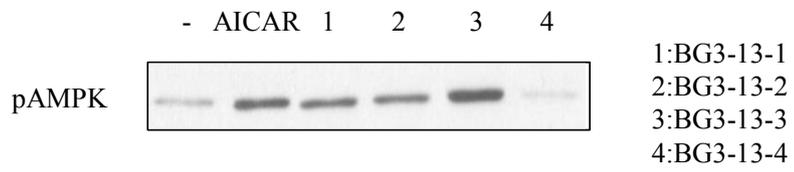
그림에서와 같이 분획물 4는 전혀 활성을 보이지 않고 3번 분획물은 HPLC 분리시 peak의 양이 적고 2번 분획물의 양이 가장 많아 BG3-13-2의 구조결정을 실시하였다.



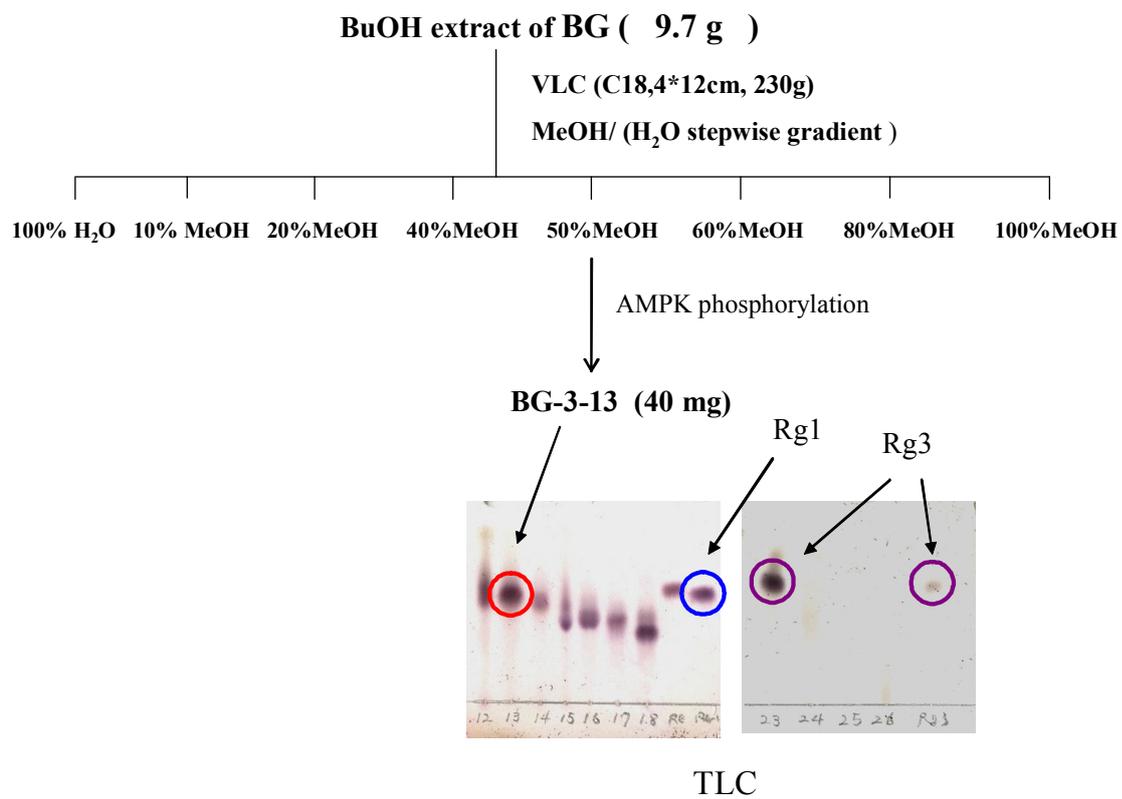
<Fig. 5> L6 근육세포에서의 Akt1과 AMPK 인산화 측정 방법



<Fig. 6> 흑삼의 Akt1, AMPK 단백질 인산화 증진 효과



<Fig. 7> 흑삼 HPLC 분획성분의 AMPK 인산화 증진 효과



<Fig. 8> 흑삼 구성성분의 구조분석 과정

아. 흑삼추출물의 지표물질 분석

◆ 흑삼추출

9.7 그림의 흑삼 부탄을 추출물을 메탄올로 다시 추출하고 MeOH/H₂O gradient 용액으로 column에 적용한다. 50% MeOH에서 AMPK 인산화 활성 분획이 가장 많으므로 이 fraction을 TLC에 spotting하여 분리하고 HPLC와 LC-Mass에 적용한다 (Fig. 8).

◆ AMPK 인산화 증진효과를 나타내는 성분 구조분석

흑삼을 추출하여 HPLC와 LC-Mass를 거쳐 (Fig. 9) 그 구성성분과 구조를 최종 확인하였다 (Fig. 10).

흑삼추출물의 main peak(BG-3-13)을 LC-Mass로 분석한 결과 Rg1과 분자량이 비슷한 것으로 나타나 조사를 한 결과 흑삼의 main 지표물질은 분자량이 803의 물질로서 Rg1에서 이중 결합 하나가 떨어져 나간 유도체인 것으로 분석되고 있으며 이는 아직까지 학계에 보고되지 않은 신규물질로 추정되고 있다.

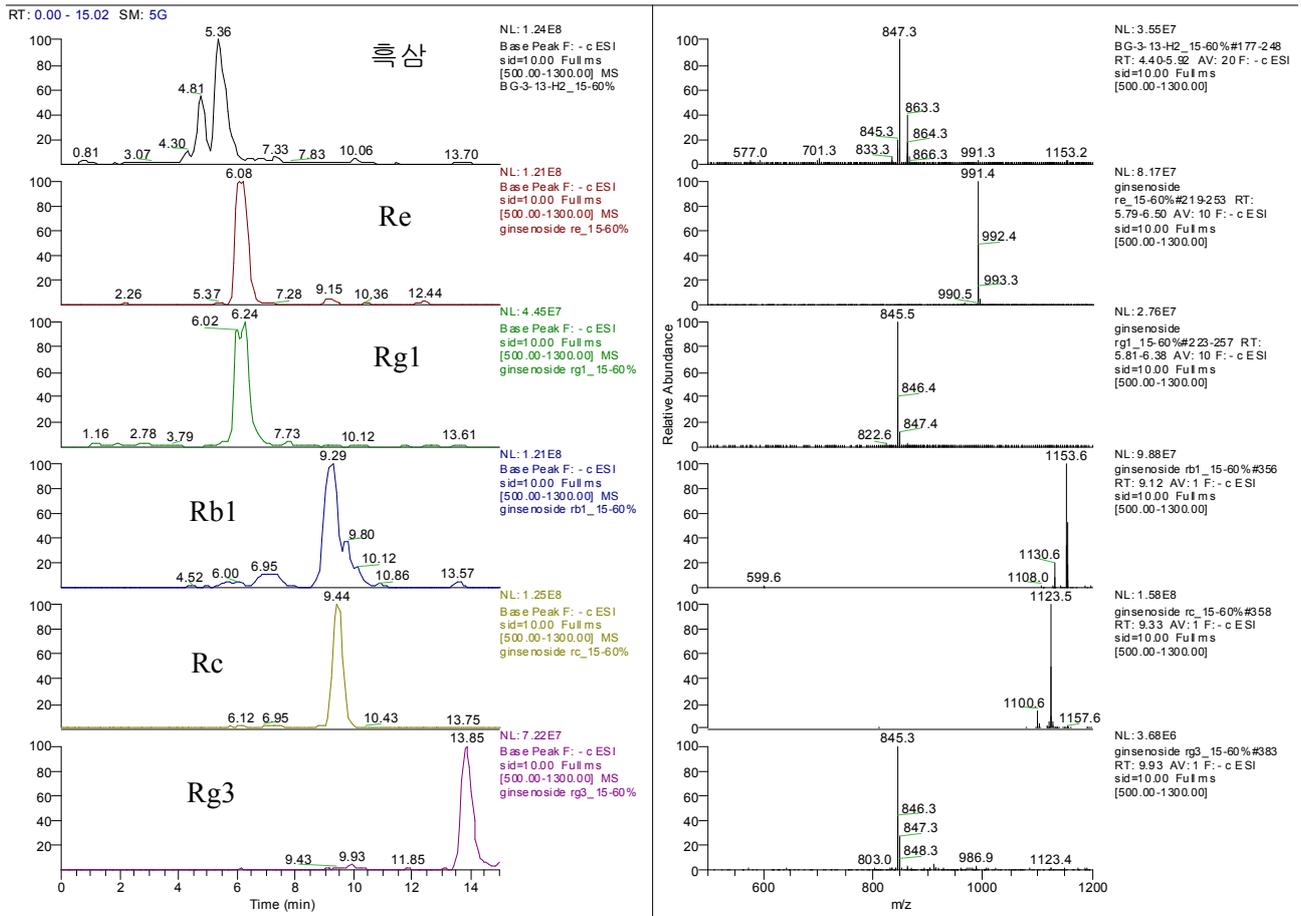
한편, BG-3-13 이후의 한 성분은 비사포닌계열의 물질로 추정되고 있어 일반적으로 인삼에서는 사포닌이 생리활성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에 이 새로운 성분의 구조분석을 현재 진행하고 있어 이의 활성 및 구조가 매우 기대되고 있다.

다. 흑삼 추출물에 의한 대사성 증후군 개선효과

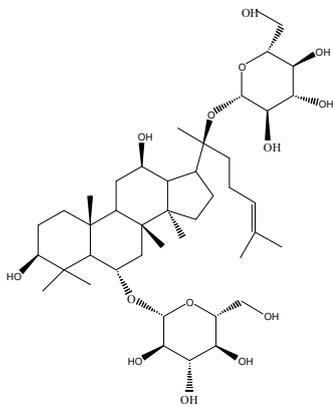
흑삼 추출물의 대사조절에 관한 실험을 수행하는 중에, 흑삼 추출물을 3 혹은 5 mg/mouse의 양으로 투여한 마우스에 있어서 기초대사량이 현저히 증가하는 활성이 관찰되었다 (Fig. 11). 이 결과를 기초로 하여 흑삼 추출물이 대사증후군에 대해 증상개선 효과를 가질 가능성이 시사되어, 당뇨를 중심으로 하는 대사성 질환의 조절효과를 조사하였다.

대사증후군의 대표적 질환인 당뇨에 대한 억제효과를 조사하기 위하여, alloxan투여에 의한 당뇨유발 마우스를 제작하여 당뇨에 대한 예방 혹은 치료 효과를 <Fig. 12>와 같은 프로토콜을 이용하여 검토하였다.

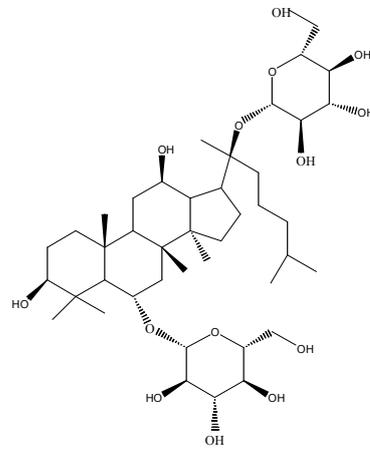
먼저 alloxan을 처리하기 전에 흑삼 추출물을 투여하는 예방효과에 관한 실험에서 흑삼 추출물은 혈당을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 13). 또한 이러한 혈당조절 효과는 alloxan 처리 후의 투여에 있어서도 동일하게 인정되었다 (Fig. 14).



<Fig.9> 흑삼 구성성분의 LC-Mass 결과

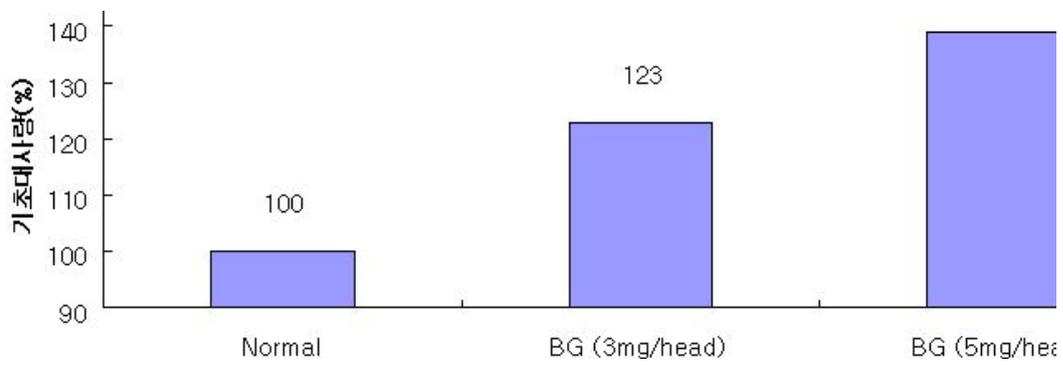


Ginsenoside Rg1 (MW 801)



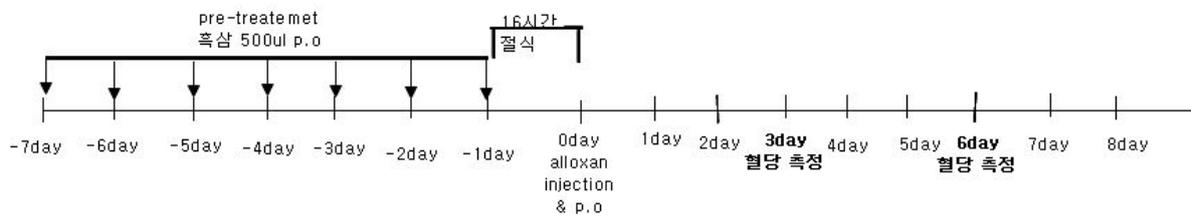
흑삼 (MW 803)

<Fig. 10> 흑삼 main 구성성분의 분자구조 및 Rg1의 구조 비교

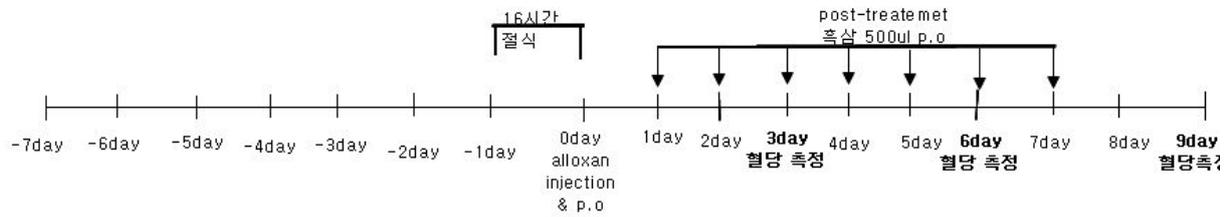


<Fig. 11> 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 기초 대사량 증가활성

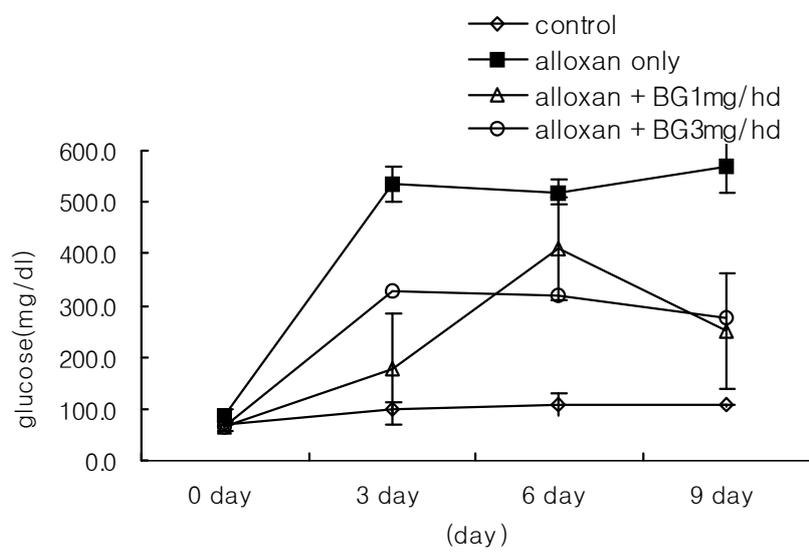
1) 예방효과 실험



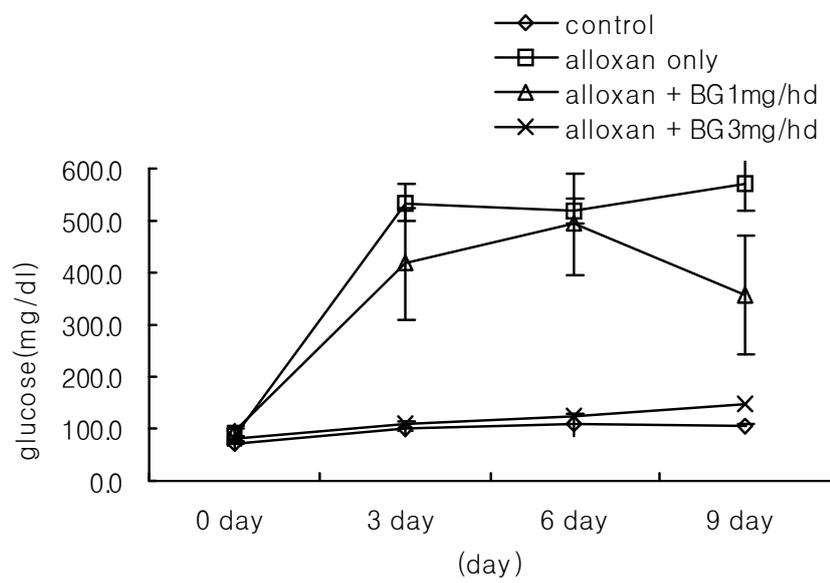
2) 치료효과 실험



<Fig. 12>. 흑삼 추출물의 항당뇨 활성 실험 프로토콜



<Fig. 13> Alloxan 처리 전 흑삼 추출물 투여의 혈당조절 효과



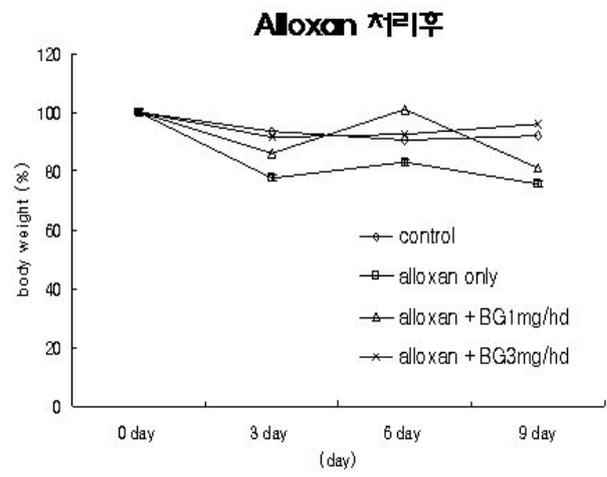
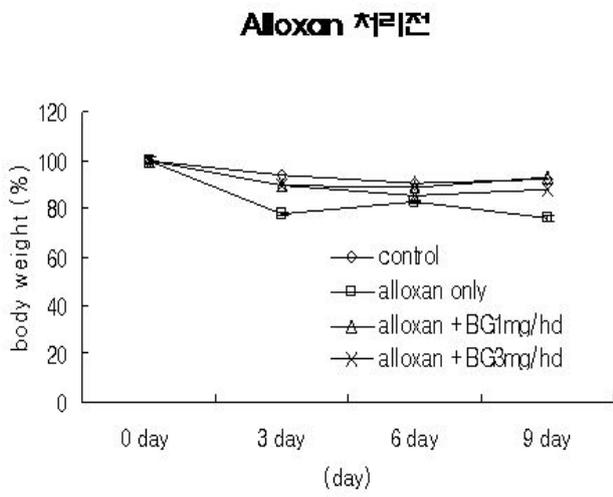
<Fig. 14> Alloxan 처리 후 흑삼 추출물 투여의 혈당조절 효과

한편 alloxan을 처리할 경우 개체의 체중이 감소하는 경향이 나타나는데, 이 경우 흑삼을 alloxan 투여 전 혹은 후에 경구투여함으로써 당뇨증상에 의한 체중감소가 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 15). 즉 흑삼의 투여는 당뇨에 의해 동반되는 체중감소 증상을 억제하는 효과가 있음을 시사한다.

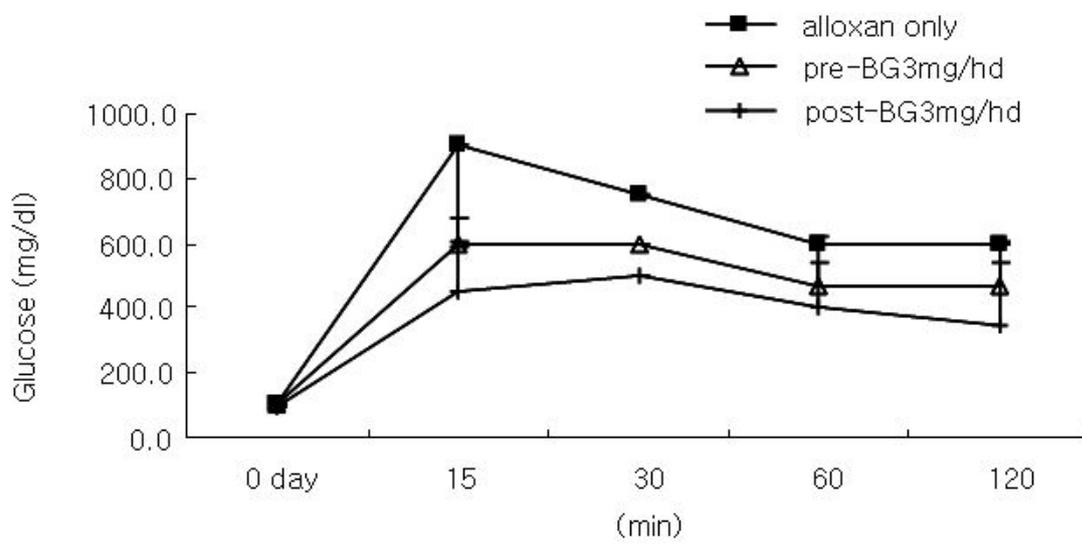
당뇨증상의 유발 기전에는 여러 가지 요인이 있으나, 포도당에 대한 내성(당부하)에 의해 혈당조절이 용이해지지 않는 현상이 수반된다. 흑삼 추출물에 의한 항당뇨 활성이 당내성에 대한 억제와 관련되어 있는가를 조사하기 위하여, OGTT(oral glucose tolerance test)시험과 IVGTT(intravenous glucose tolerance test)시험을 이용하여 각각 장(腸)과 혈관 내에서의 포도당 흡수에 대한 내성 여부를 검토하였다. 그 결과 OGTT시험과 IVGTT시험 모두에서 alloxan 투여 전 혹은 후에 흑삼 추출물을 경구투여함으로써 당내성에 대해 높은 억제활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (Fig. 16, 17)

한편 당뇨증상과 관련하여 함께 동반되는 물소모량(음수량)의 증가에 대해 흑삼 추출물의 투여가 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다. 그 결과 흑삼 추출물을 투여한 alloxan유발 당뇨 마우스는 흑삼을 투여하지 않은 당뇨 마우스에 비해 음수량이 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 18). 또한 흑삼 추출물을 투여한 당뇨 마우스는 정상 마우스 실험에서와 동일하게 (Fig. 11 참조) 기초 대사량이 증가하였으며 (Fig. 19), 물 속에서 수영시간을 측정하는 체력시험에서도 흑삼 추출물 투여 마우스에서 수영시간이 현저히 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 20). 이들 결과로부터 흑삼 추출물의 투여는 기초 대사량과 체력을 증가시켜 대사성 질환의 하나인 당뇨를 억제하는 효과를 나타내며, 또한 당뇨증상과 함께 발현되는 음수량 증가와 같은 증상을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

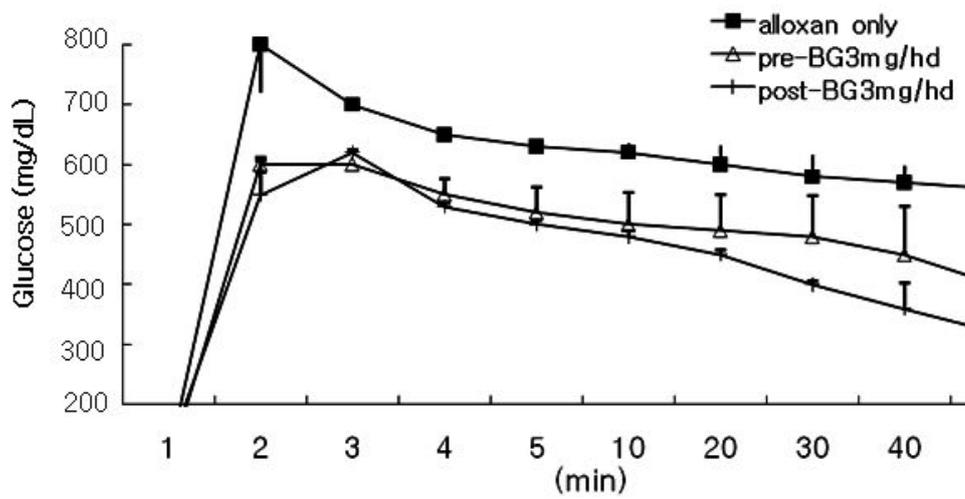
마지막으로 흑삼 추출물의 항당뇨 활성에 관련한 작용기전에 췌장에서의 인슐린 분비 증가가 관련되어 있는가를 조사하였다. Alloxan을 처리하기 전 혹은 후에 흑삼 추출물을 경구투여한 후, 혈중의 인슐린 농도를 측정하였다. 그 결과 흑삼 추출물의 투여에 의해 인슐린 농도가 상승하는 것으로 나타났다 (Fig. 21). 즉 흑삼 추출물은 베타세포를 자극하여 인슐린의 분비를 촉진하고 결과적으로 혈당 저하와 당뇨증상을 개선시키는 활성을 나타내는 것으로 추정되었다. 향후 in vivo 및 in vitro 실험모델을 이용하여 당뇨를 비롯한 대사증후군의 조절활성과 이에 관련된 작용기전을 구체적으로 분석해 갈 예정이다.



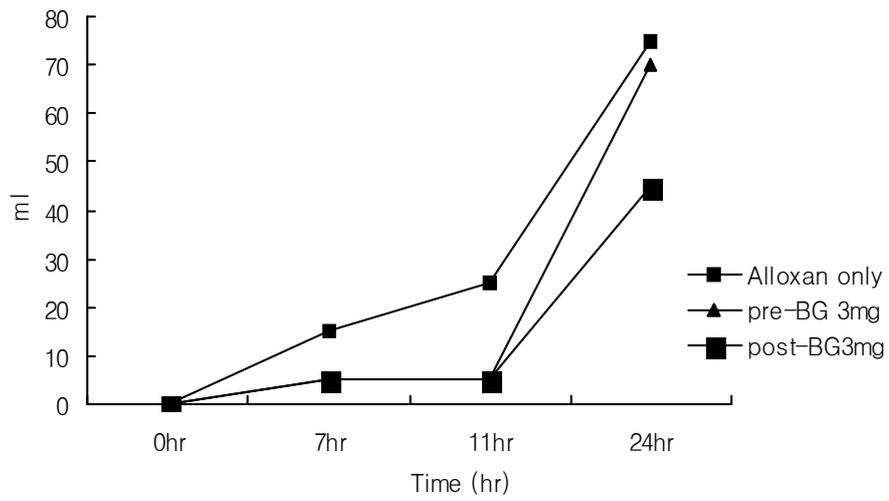
<Fig. 15> alloxan유발 당뇨 마우스에서 흑삼 추출물 투여에 의한 체중감소 억제효과



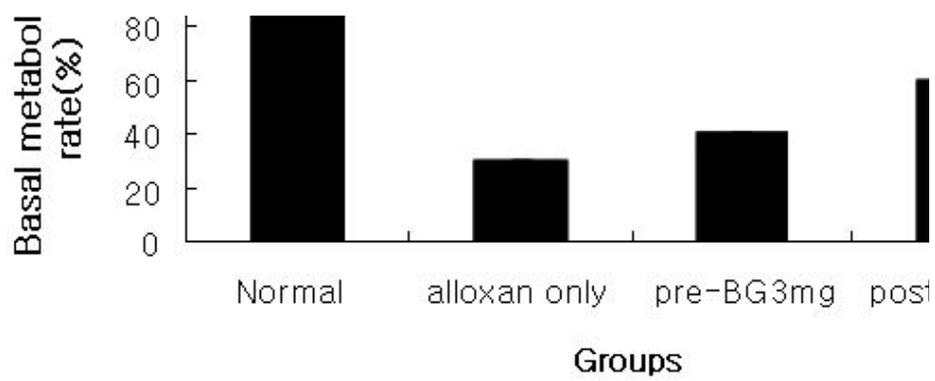
<Fig. 16> OGTT시험에서 흑삼 추출물의 당내성 억제활성



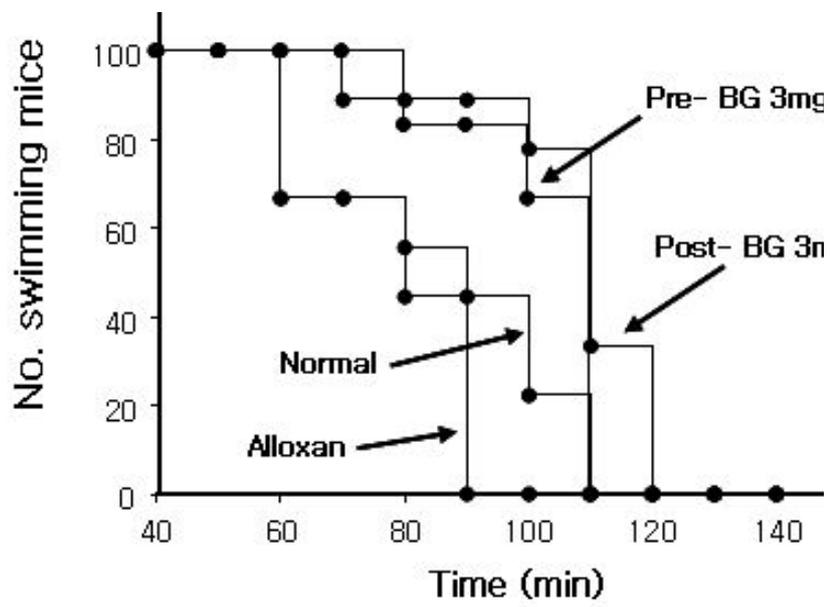
<Fig. 17> IVGTT시험에서 흑삼 추출물의 당내성 억제활성



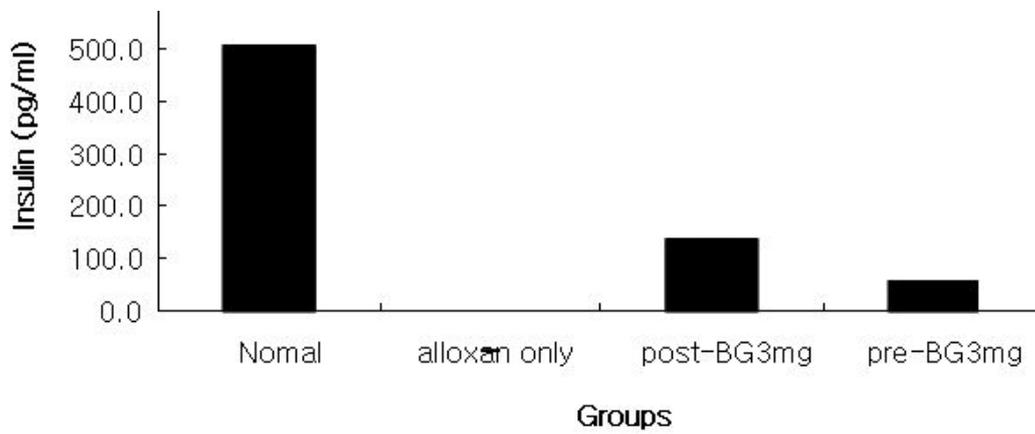
<Fig. 18> 흑삼 추출물 투여에 의한 당뇨 마우스 음수량 증가의 억제



<Fig. 19> 흑삼 추출물 투여에 의한 당뇨 마우스의 기초 대사량 증가



<Fig. 20>. 흑삼 추출물 투여에 의한 당뇨 마우스의 체력증진 효과



<Fig. 21> 흑삼 추출물 투여에 의한 당뇨 마우스의 인슐린 분비 증가 활성화

2. 고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효과 증진에 관한 연구

가. 흑삼 추출물의 면역세포 활성화효과

(1) 림프구 활성화 효과

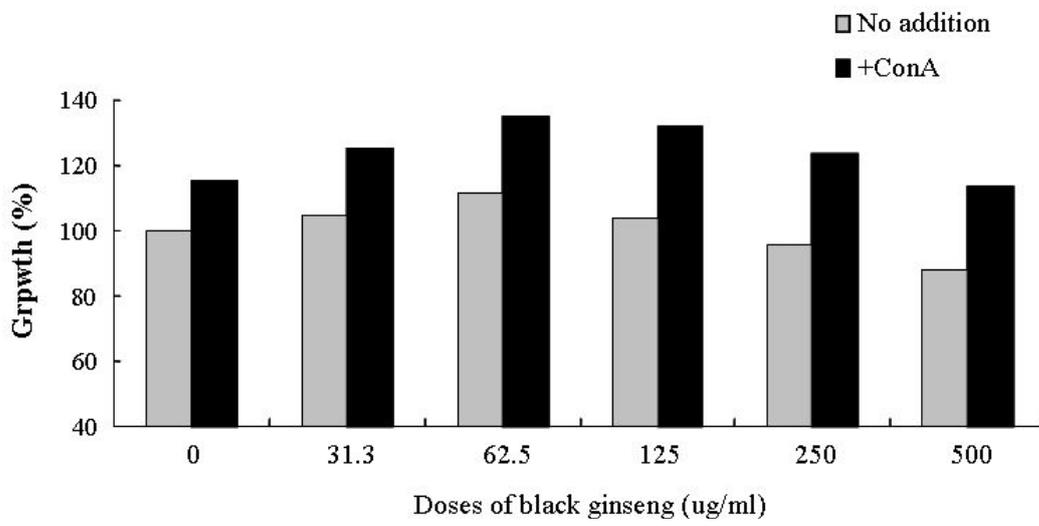
흑삼 추출물의 면역세포 활성화 유도작용을 검토하기 위하여, 먼저 마우스의 비장세포를 흑삼 추출물로 직접 처리하여 이들 면역세포의 증식과 사이토카인 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 흑삼 추출물을 여러 농도로 비장세포에 처리한 후 비장세포의 증식에 미치는 영향을 측정한 결과, 흑삼 추출물은 다소 낮은 농도(약 100 ug/ml 이하)에서 비장세포의 증식을 증가시키는 것으로 나타났으며 (Fig. 22), 이러한 증가효과는 ConA (1 ug/ml)를 첨가한 실험에서도 동일하게 다소 낮은 농도에서 증식반응을 높이는 것으로 확인되었다. 또한 ConA를 첨가한 비장세포에 있어서 낮은 농도의 흑삼 추출물을 처리한 그룹에서 IL-2의 분비가 약간 상승하는 것으로 나타났다 (Fig. 23).

한편 흑삼 추출물을 3 mg/mouse 혹은 5 mg/mouse의 투여량으로 마우스에 6회 경구투여한 후, 7일째의 비장세포를 회수하여 mitogen에 대한 비장세포의 반응성 변화를 측정한 결과, 흑삼 추출물을 투여한 마우스에서는 T세포의 mitogen인 ConA와 B세포 혹은 macrophage에 대한 mitogen인 LPS에 대한 감수성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 24, Fig. 25). 또한 5 mg/mouse로 투여한 경우에 있어서도 mitogen을 처리하지 않은 상태에서 비장세포의 증식증가가 관찰되었다 (Fig. 26).

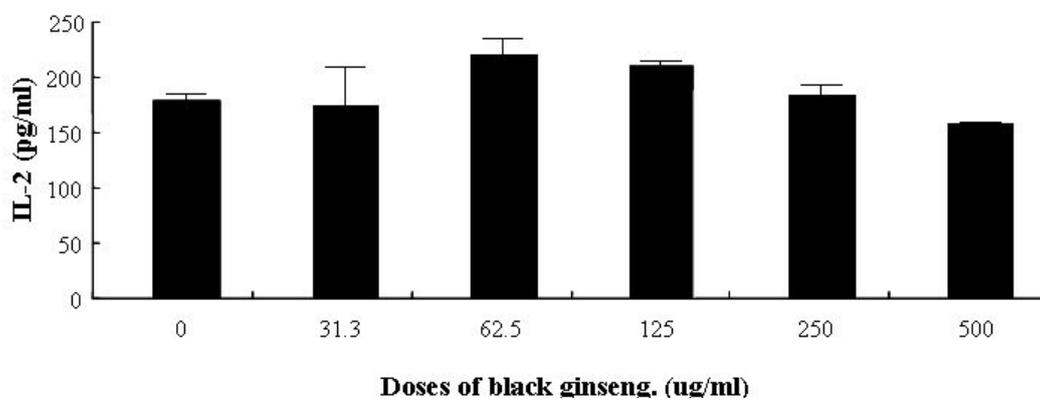
흑삼 추출물을 경구투여한 마우스의 비장세포에 ConA를 처리하여 T세포를 자극한 후, T세포로부터 IL-2가 유도되는 작용을 측정한 결과, 증식반응과는 달리 T세포로부터의 IL-2분비유도 활성화의 증가는 관찰되지 않았다 (Fig. 27).

흑삼 추출물을 경구 투여하는 경우, 림프구의 양적 혹은 기능적 변화가 일어나는가를 측정하기 위하여, 흑삼 추출물을 5 혹은 3 mg/mouse의 양으로 마우스에 경구투여한 후, 1일, 3일 및 5일 후에 비장세포를 회수하여, T세포의 CD4+ 및 CD8+ T세포의 변화와 활성화 T세포의 유도를 FACS분석법을 통해 조사하였다. 그 결과 흑삼 추출물을 경구투여 한 경우, T림프구의 CD4+/CD8+ T세포의 비율의 변화 (Fig. 28)나 활성화 T세포의 유도 (Fig. 29)는 관찰되지 않았다.

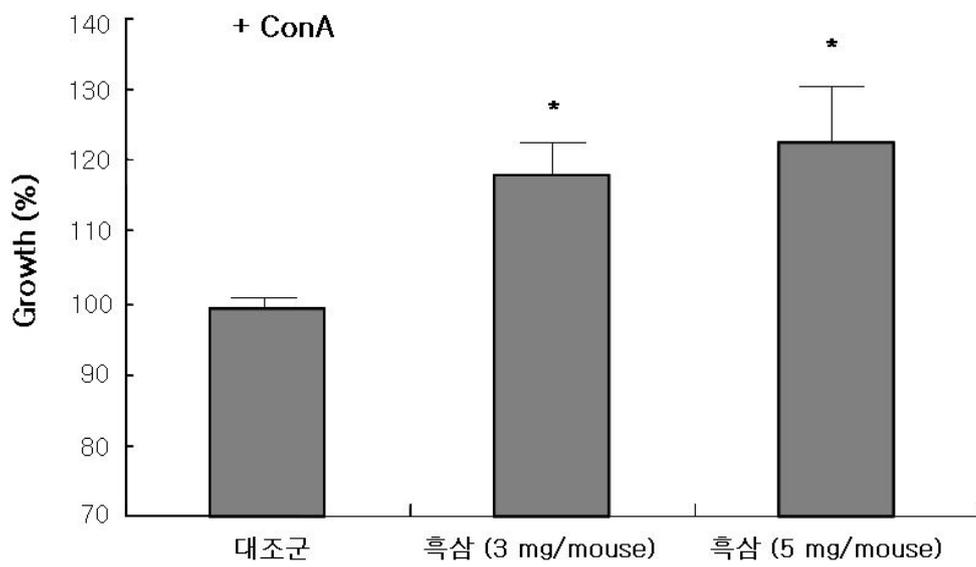
이상의 결과로부터 흑삼 추출물은 T림프구와 B림프구에 대해 증식반응을 상승시키는 약간의 활성은 지닌 것으로 사료되나, 림프구의 형태학적 변화나 강한 활성화에 의한 사이토카인의 분비유도 등에는 그다지 강한 활성을 나타내지는 않는 것으로 확인되었다.



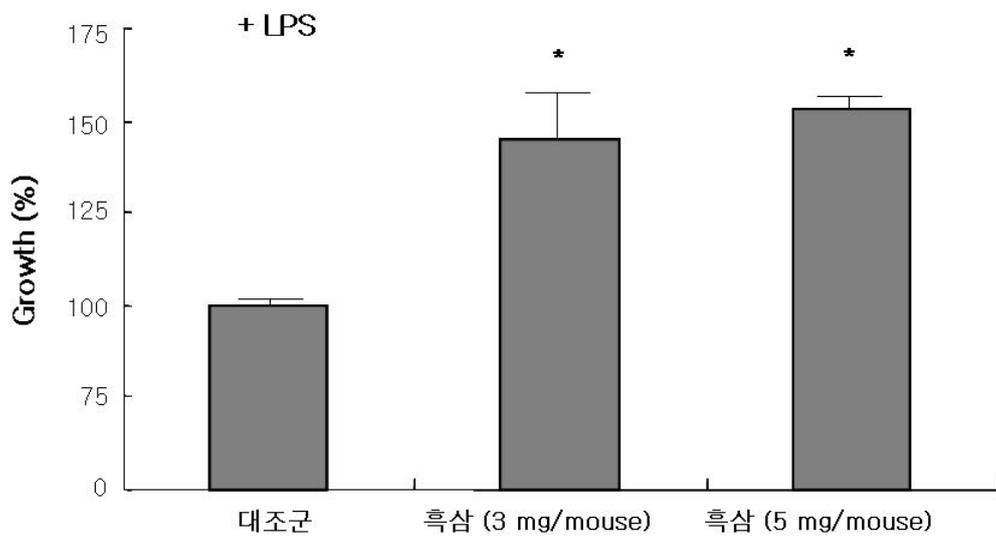
<Fig. 22> 흑삼 추출물의 비장세포 증식에 미치는 영향



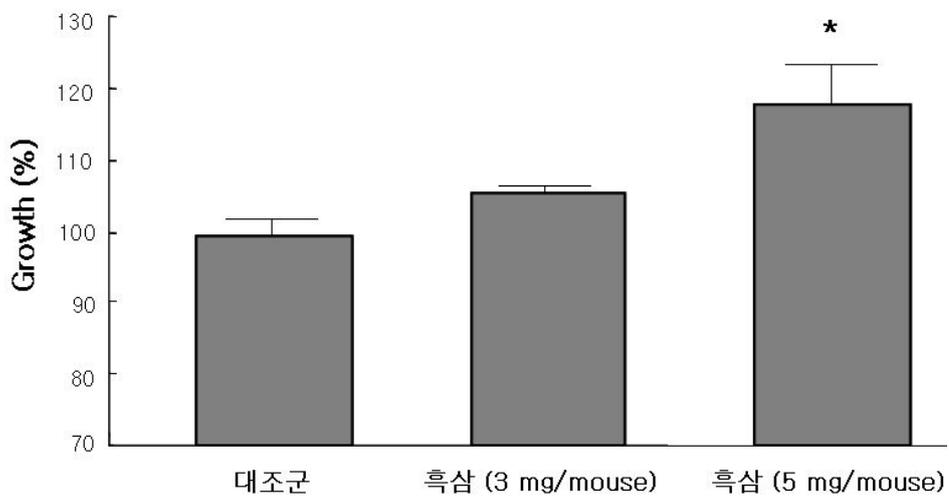
<Fig. 23> ConA처리 비장세포에서 IL-2분비에 미치는 흑삼 추출물의 영향



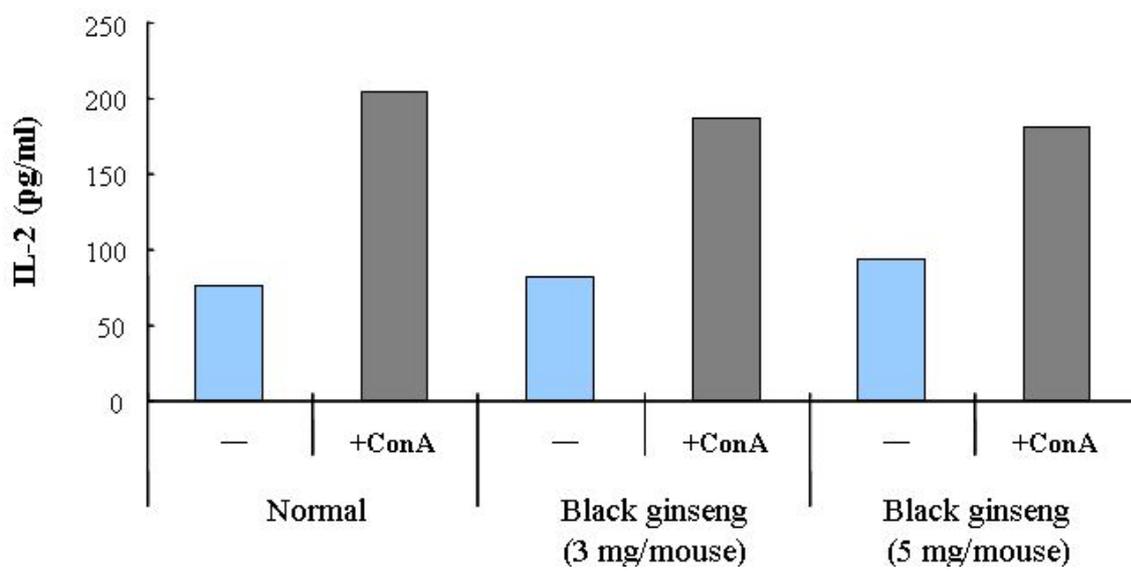
<Fig. 24> 흑삼 추출물 투여 마우스 T세포의 mitogen에 대한 감수성 변화



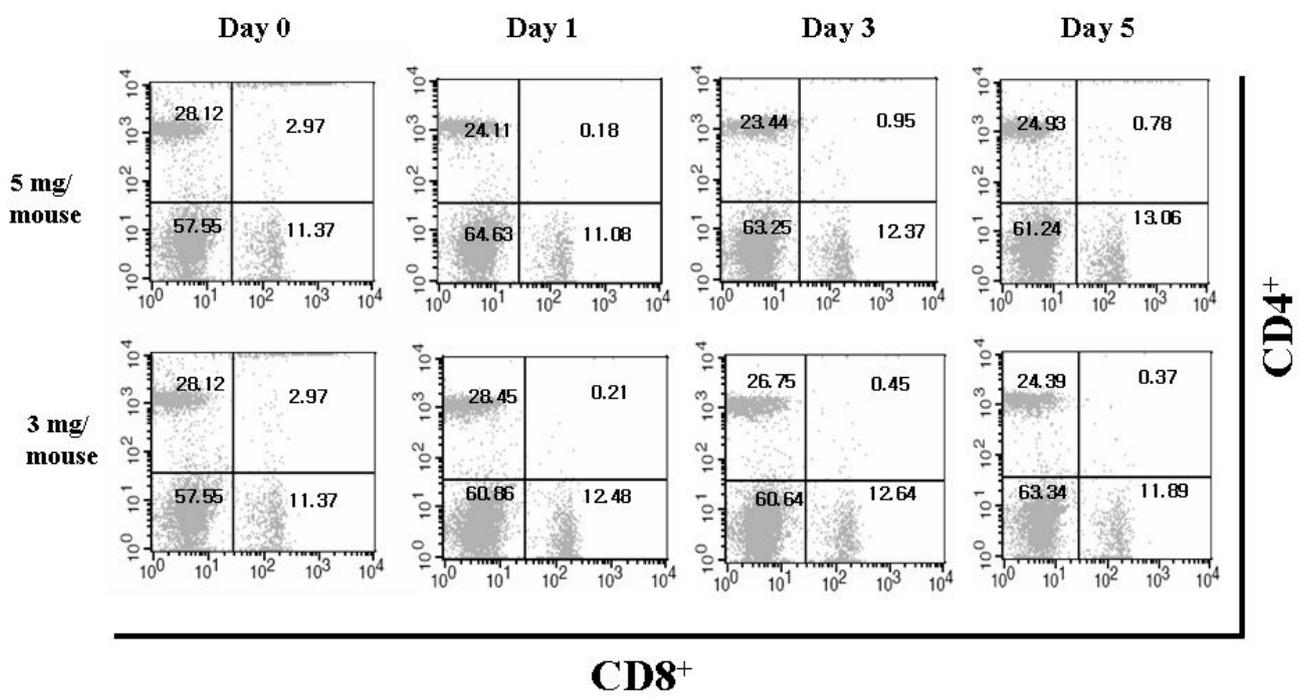
<Fig. 25> 흑삼 추출물 투여 마우스 B세포의 mitogen에 대한 감수성 변화



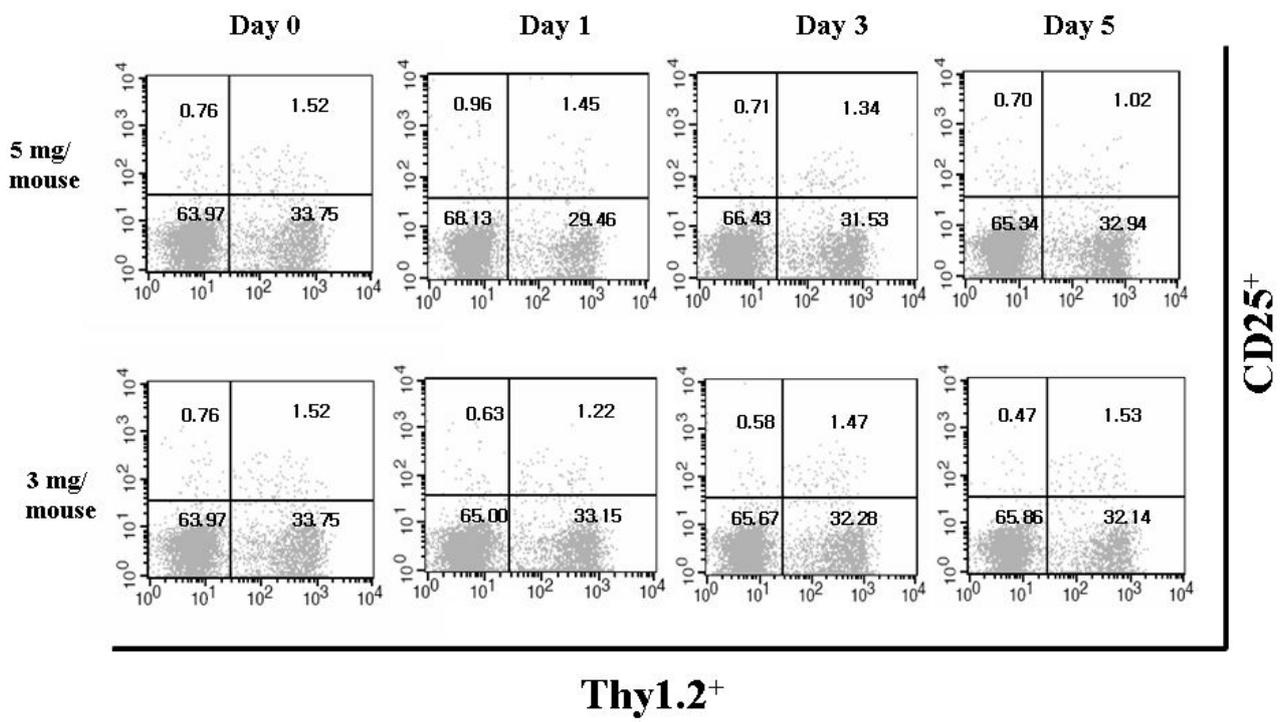
< Fig. 26> 흑삼 추출물 투여 마우스 비장세포의 증식반응



<Fig. 27> 흑삼 추출물 투여 마우스 T세포의 IL-2분비유도 활성화



<Fig. 28> 흑삼 추출물 투여 마우스에서 CD4⁺/CD8⁺ T세포의 비율



<Fig. 29> 흑삼 추출물 투여 마우스에서 활성화 T세포의 유도

(2) 대식세포의 활성화에 미치는 영향

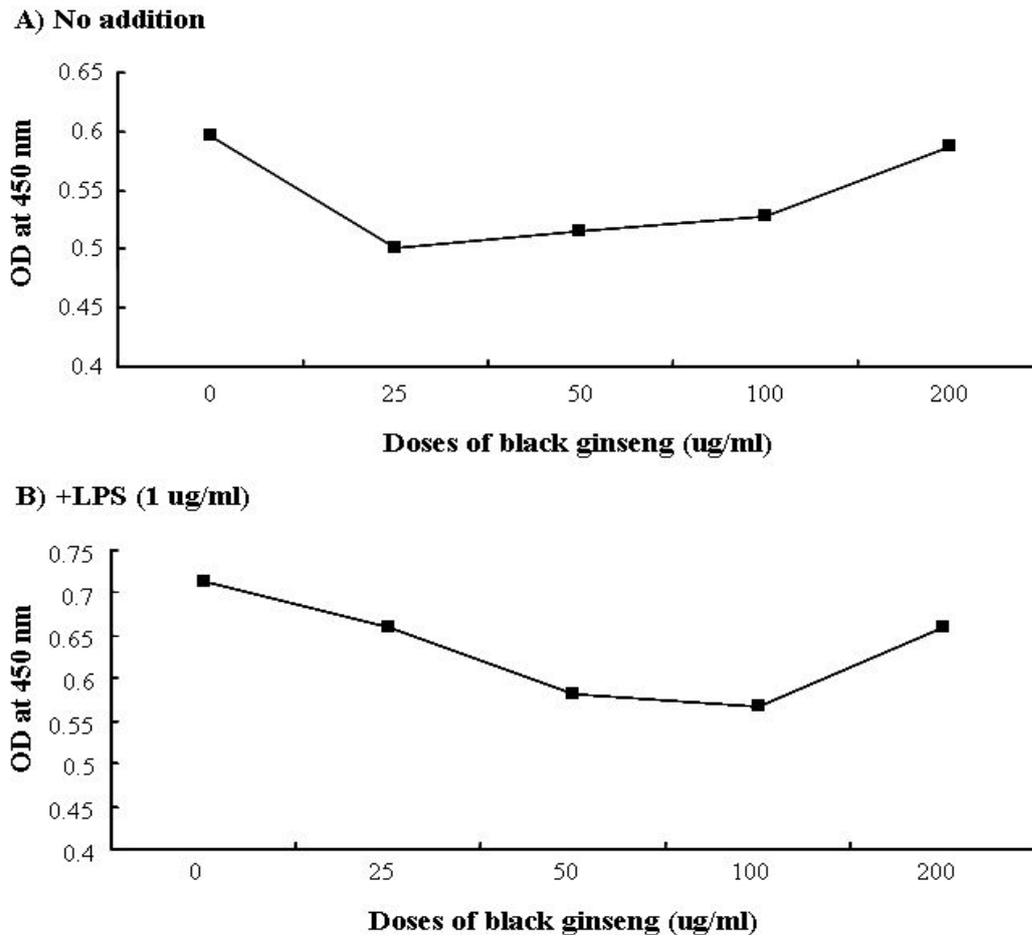
한편, 림프구와는 다른 면역세포인 대식세포(macrophage)에 대한 흑삼 추출물의 활성화 작용을 조사하기 위하여 RAW 264.7 macrophage세포를 이용하여, 증식반응과 사이토카인 분비 등의 관점에서 흑삼 추출물의 효과를 검토하였다. RAW 264.7세포에 이 세포의 mitogen인 LPS(1 ug/ml)를 첨가하는 경우와 첨가하지 않는 경우로 나누어, 각각 여러 농도의 흑삼 추출물을 첨가하여 대식세포의 활성화 및 사이토카인 분비유도에 미치는 흑삼 추출물의 영향을 측정하였다. 흑삼 추출물을 단독으로 처리하는 경우, 대식세포의 증식작용이 다소 억제되었으며 (Fig. 30), 또한 LPS를 첨가하는 경우에도 단독처리와 동일한 결과가 관찰되었다.

대식세포에 대해 염증작용을 유발하는 LPS를 대식세포에 처리하기 전에, 흑삼 추출물을 8시간 전처리하는 실험모델을 통해 대식세포의 염증반응에 대한 흑삼 추출물의 억제효과를 조사하였다. 대식세포 염증반응의 지표로서는 RAW 264.7세포로부터 분비되는 nitric oxide(NO), TNF-a 및 IL-6 사이토카인을 설정하여, 세포배양액 중에 분비된 이들 사이토카인의 양을 비교하였다. 그 결과, 흑삼 추출물을 전처리함으로써 LPS에 의한 대식세포의 염증반응유도가 농도에 의존하여 억제되는 것으로 확인되었다(Fig. 31-33). 특히 NO와 TNF-a에서는 강한 억제활성이 관찰되었으나, IL-6의 분비억제는 다소 약한 것으로 확인되었다.

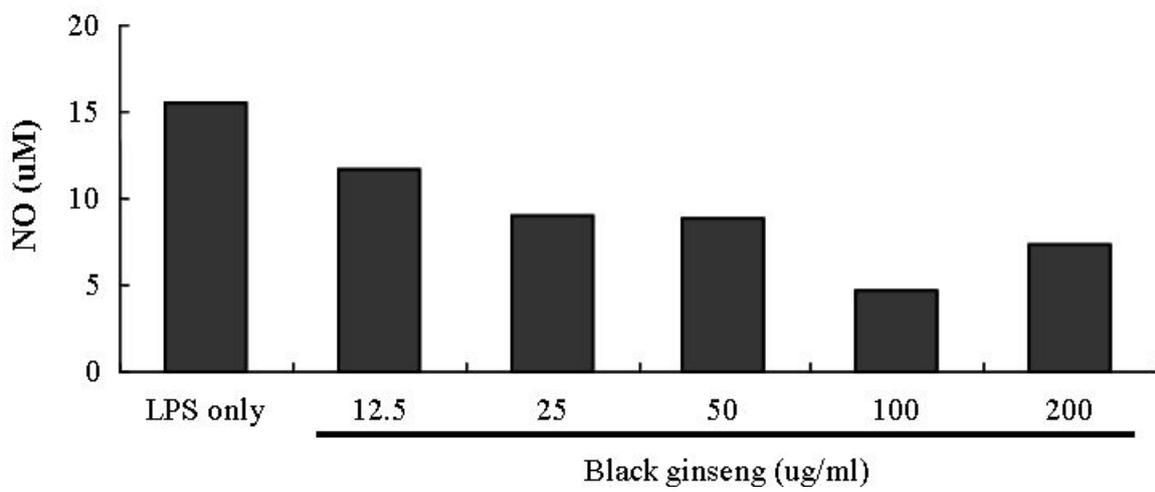
(3) 흑삼 추출물의 항알러지 효과

흑삼 추출물이 알려진 항원에 대한 알러지 유도에 미치는 영향을 조사하사 위하여, (Fig. 34)에 기술한 방법에 의해 ovalbumin(OVA)을 알러젠으로 하는 마우스 알러지 모델에서 항알러지 활성을 측정하였다.

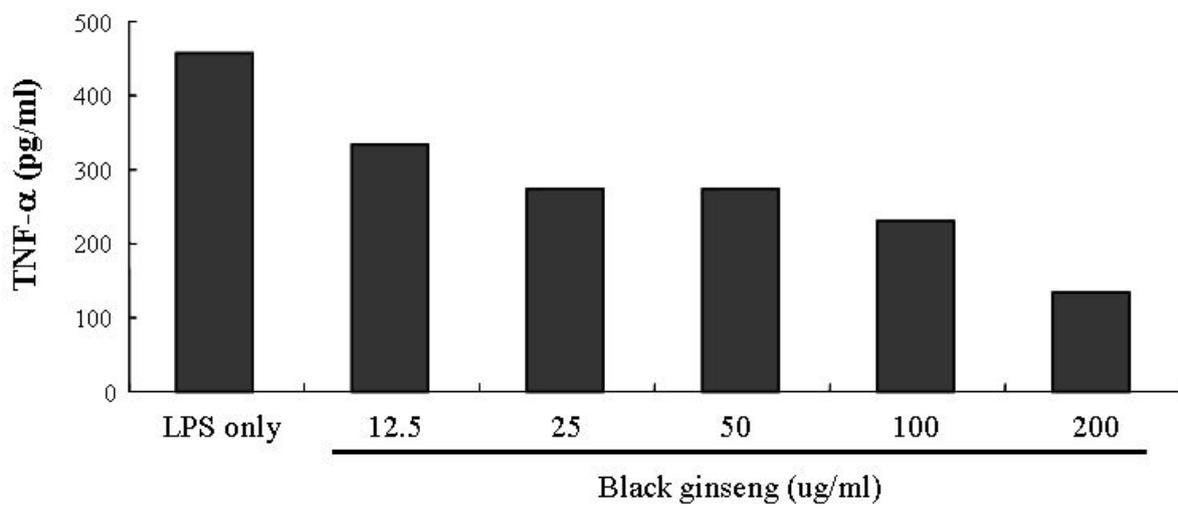
흑삼 추출물을 OVA투여 전, 투여 시, 그리고 투여 후에 각각 5 mg/mouse의 양으로 Fig.13과 같이 투여한 결과, 알러지 증상의 원인이되며 알러지 활성의 측정지표가 되는 IgE에 있어서, total IgE의 농도에는 별다른 영향을 미치지 않은(Fig. 35), OVA특이적인 IgE의 생성은 다소 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 36). 이 결과로부터 흑삼 추출물은 강한 활성은 아닐지라도 알러지 유도에 있어서 억제적으로 작용하는 활성이 있는 것으로 추정되었다. 향후 흑삼 추출물의 투여방법과 투여량 등의 최적화를 통해 보다 높은 항알러지 활성의 관찰이 가능한 것으로 기대된다.



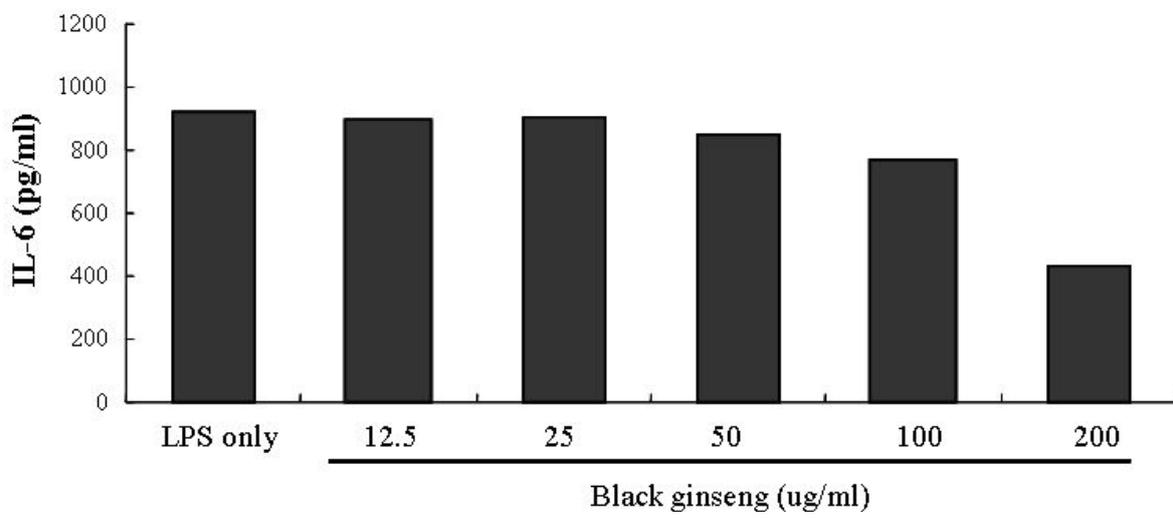
<Fig. 30> RAW 264.7세포의 증식에 대한 흑삼 추출물의 영향



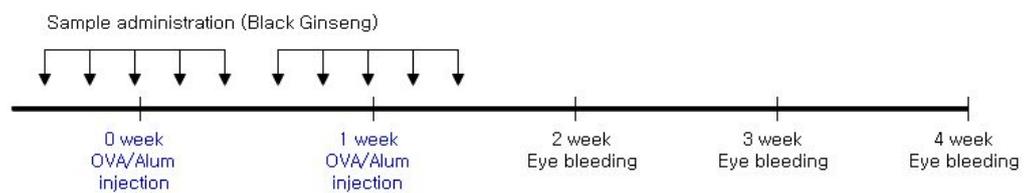
<Fig. 31> LPS처리 RAW 264.7세포의 NO생산에 미치는 흑삼 추출물의 영향



<Fig. 32> LPS처리 RAW 264.7세포의 TNF- α 생산에 미치는 흑삼 추출물의 영향



<Fig. 33> LPS처리 RAW 264.7세포의 IL-6생산에 미치는 흑삼 추출물의 영향



➤ **Allergy Induction**

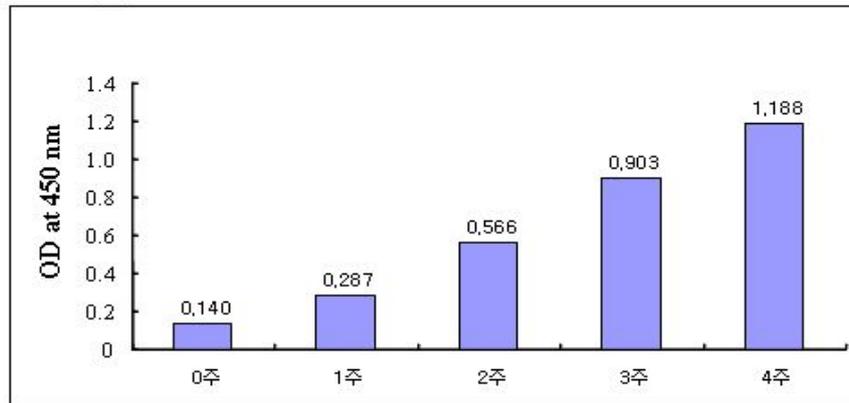
OVA 20 ug/head in 2.34 mg Aluminium hydroxide gel
 Induction at intervals of 1 week

➤ **Ginseng Treatment**

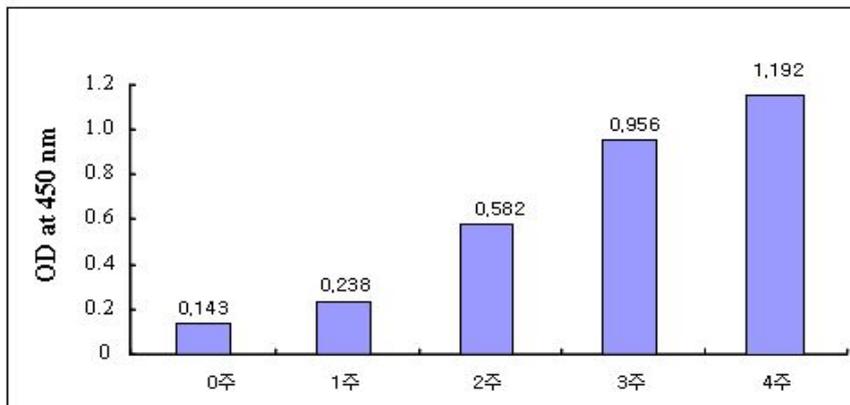
Treatment : 3 mg/head orally for 5 consecutive days

<Fig. 34> 항알러지 활성 실험 프로토콜

A) Allergy control

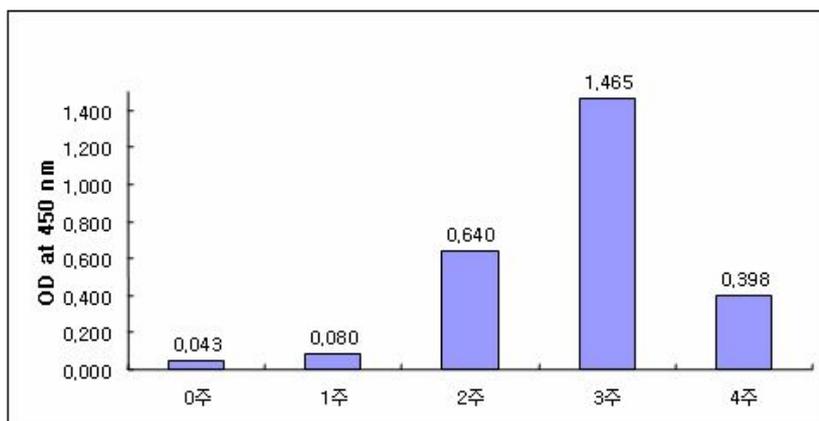


B) Black ginseng-treated

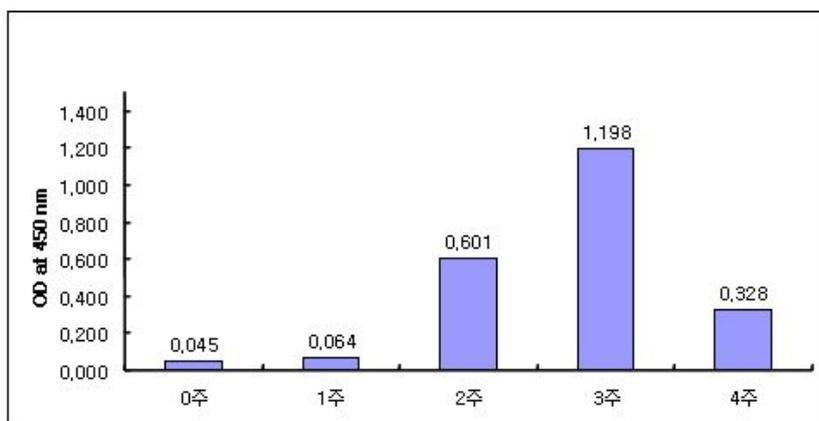


<Fig. 35> 알러지 유도 마우스 혈청중의 total IgE 측정

A) Allergy control



B) Black ginseng-treated



<Fig. 36> 알러지 유도 마우스 혈청중의 OVA특이적인 IgE 측정

(4) 흑삼 추출물의 항암활성

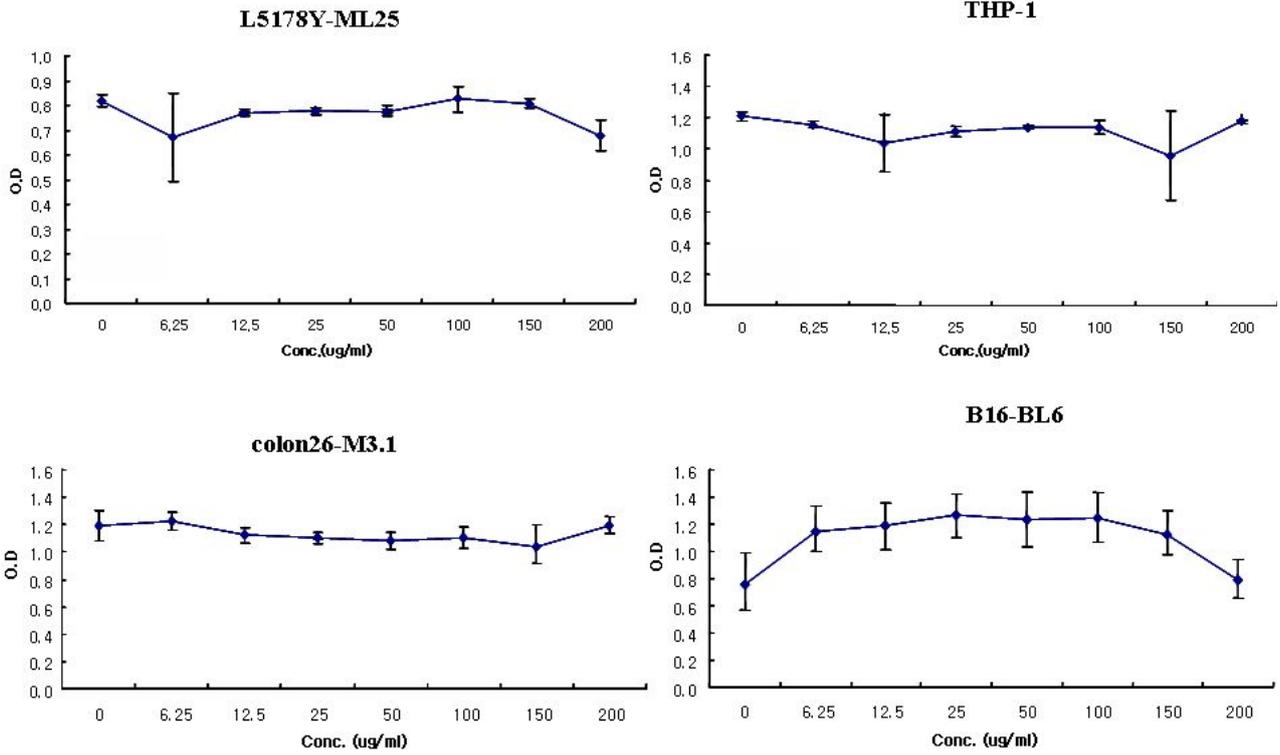
흑삼 추출물의 항암활성은 *in vitro*에서 암세포에 대한 직접상해활성과 *in vivo*전이모델에서의 암전이 억제 효과를 통해 조사하였다. *In vitro*실험계에서 여러 종류의 암세포에 대해 200 ug/ml까지의 농도로 흑삼 추출물을 암세포에 처리한 후 24시간 배양하여 생존율을 측정한 결과, leukemia(L5178Y-ML25, THP-1)와 대장암 세포(colon 26-M3.1) 그리고 흑색종 암세포(B16-BL6)에 있어서 direct toxicity는 거의 없는 것으로 나타났다 (Fig. 37). 또한 점막조직의 상피세포인 human intestinal epithelial cell인 HT-29세포에 대해서도 유의한 직접독성은 없는 것으로 나타났다 (Fig. 38).

한편 흑삼 추출물에 의한 암전이 억제활성을 측정하기 위하여, colon 26-M3.1 암세포를 이용한 실험적 폐전이모델에서 흑삼 추출물을 암세포의 미정맥 내 이식 전 혹은 후에 1일 1회씩 각각 5일간 경구투여하여, 암전이에 대한 예방적 또는 치료적 효과를 측정하였다. 그 결과 흑삼 추출물은 암세포 이식 전에 투여하는 예방적 효과보다도, 암세포를 이식한 후에 투여하는 치료적 효과에 있어서 보다 효과적으로 암세포의 폐전이를 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 39, 40). 이상의 결과는 흑삼 추출물은 항암활성을 지니며, 이 효과는 직접독성에 의한 것이 아니고 생체의 면역계 등을 통한 작용인 것으로 사료된다.

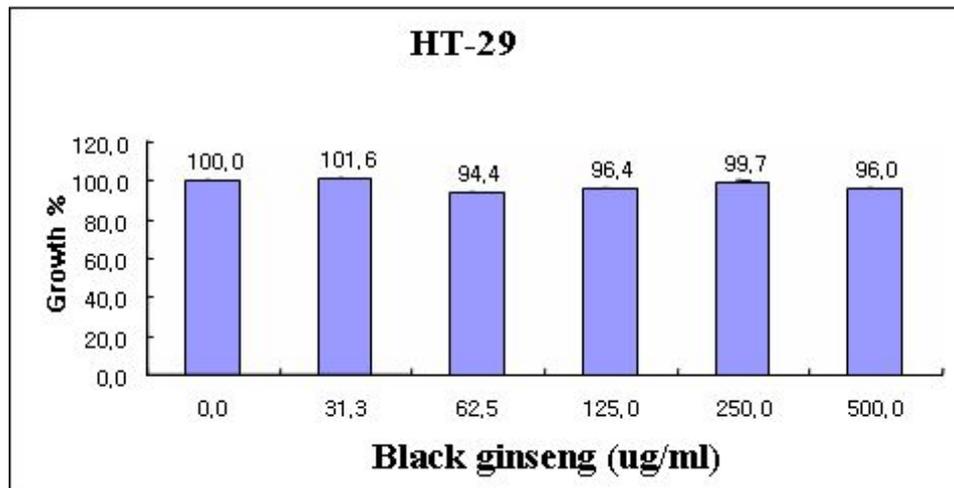
(5) 수지상 세포에 대한 흑삼 추출물의 활성화 유도작용

비특이 면역세포의 하나인 수지상 세포에 대한 흑삼 추출물(BG)의 활성화 유도작용을 조사하기 위하여 마우스 골수세포를 이용하여 CD11c+ 세포를 분리하여 GM-CSF와 IL-4를 첨가한 배지에서 수지상 세포의 분화를 유도하고, (Fig. 41)과 같은 프로토콜에 의해 흑삼 추출물을 처리한 후 증식에 미치는 영향과 사이토카인 및 케모카인 분비에 대한 효과를 측정하였다.

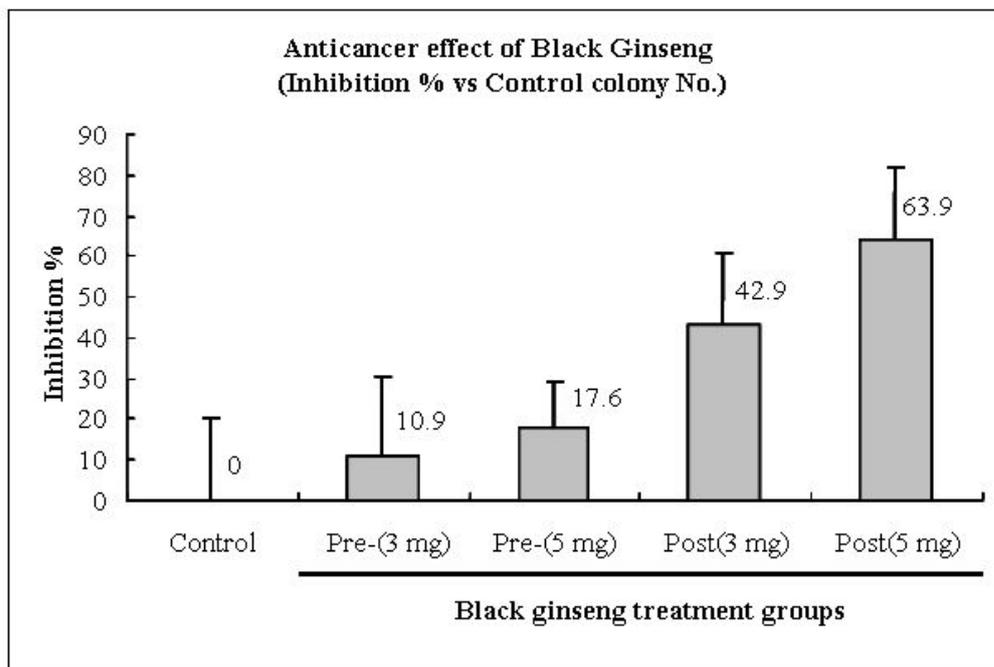
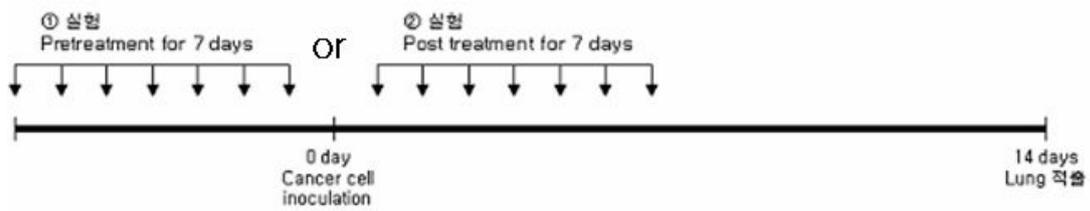
수지상 세포에 대해 흑삼 추출물(200 ug/ml)을 처리한 결과, positive control인 LPS보다는 낮지만 대조군보다는 증식반응을 높이는 것으로 나타났다 (Fig. 42). 또한 nitric oxide(NO), IL-12, IL-6 및 TNF-alpha의 분비에 미치는 효과에 있어서는, NO와 IL-12의 분비를 촉진하였으나 IL-6와 TNF-alpha에 대해서는 별다른 효과가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 43). 한편 케모카인 분비유도에 대해서도 RANTES와 MIP-1a의 분비유도에는 활성을 나타내지 않았다 (Fig. 44).



<Fig. 37> 각종 암세포에 대한 흑삼 추출물의 독성효과



<Fig. 38> 점막상피세포에 대한 흑삼 추출물의 상해활성 측정



<Fig. 39> 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암전이 억제활성

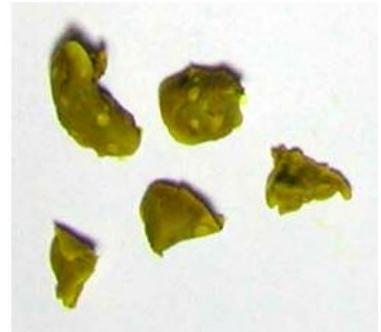
Control



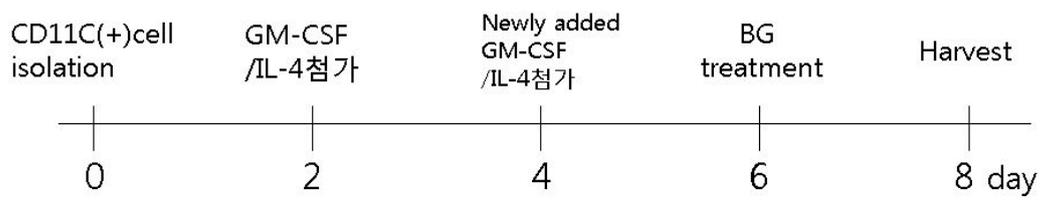
Pretreatment



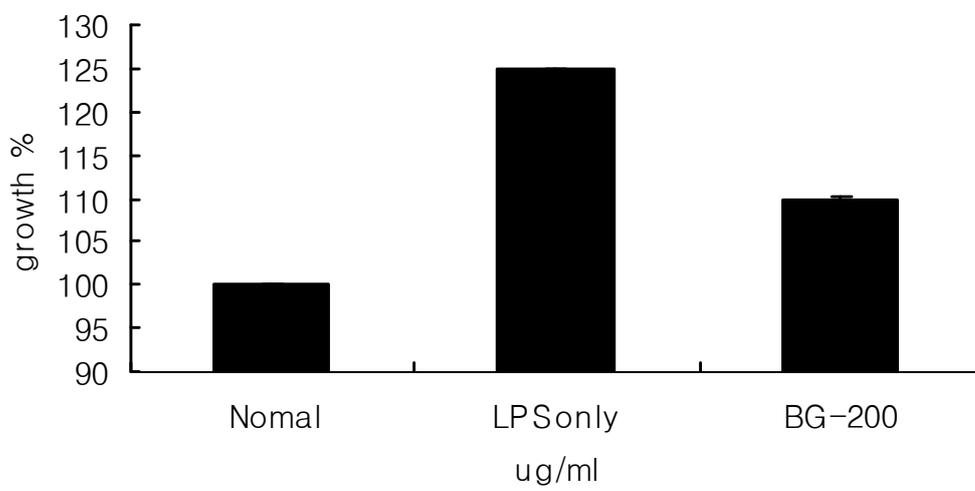
Post treatment



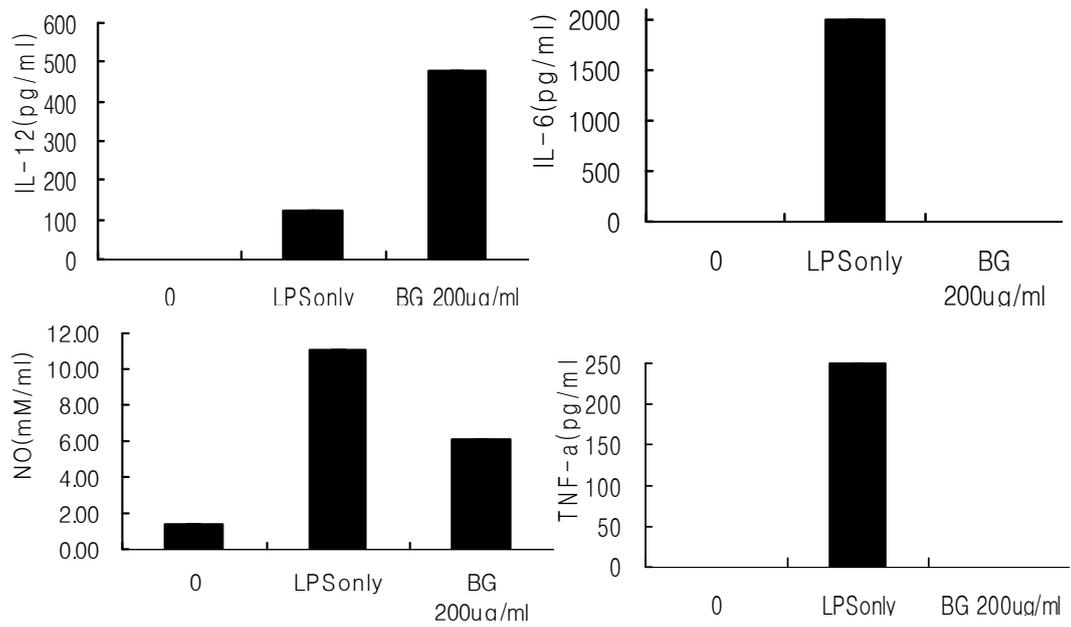
<Fig. 40> 흑삼 추출물의 치료적 암전이 억제에 의한 폐전이 사진



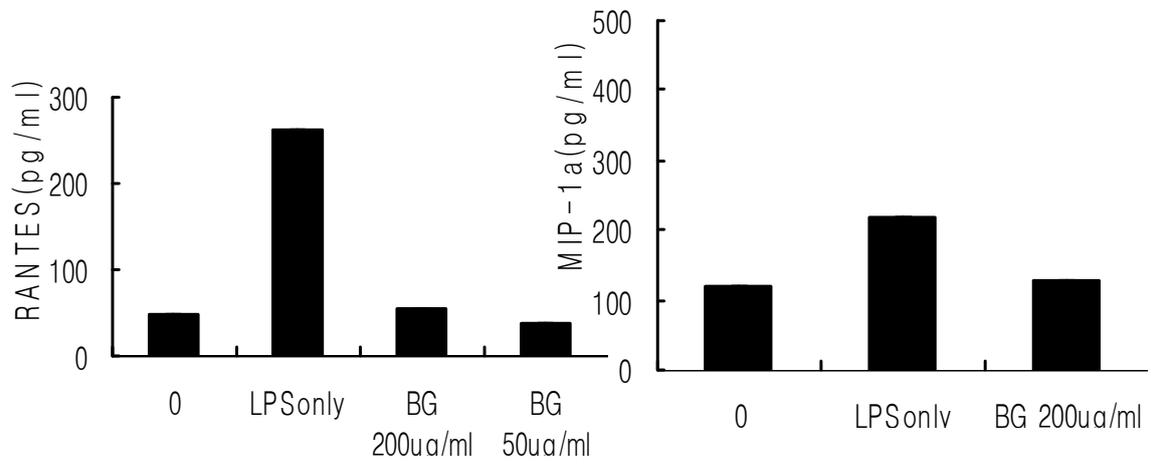
<Fig. 41> 수지상 세포의 분리 및 흑삼 추출물 처리 실험 프로토콜



<Fig. 42> 수지상 세포의 증식반응에 미치는 흑삼 추출물의 효과



<Fig. 43> 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 흑삼 추출물의 효과



<Fig. 44> 수지상 세포의 케모카인 분비에 미치는 흑삼 추출물의 효과

(6) 흑삼성분에 의한 항염증 및 면역억제 활성화

◆ LPS유도 대식세포 염증반응에 대한 흑삼성분의 억제활성

1차 년도의 연구에서 흑삼 추출물을 LPS자극 대식세포에 처리하였을 때 대식세포의 증식 작용과 염증성 사이토카인 분비를 억제하는 항염증 작용이 있음을 시사하는 결과를 얻었다. 이러한 항염증 효과를 확인하기 위하여 LPS로 자극된 대식세포에 흑삼 추출물을 여러 농도로 처리한 후 증식반응과 사이토카인 분비에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 흑삼 추출물은 LPS자극 대식세포의 증식반응에는 별다른 영향을 미치지 않았으나 (Fig. 45), 염증성 사이토카인의 분비(IL-6 및 TNF-a)를 유의하게 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 46).

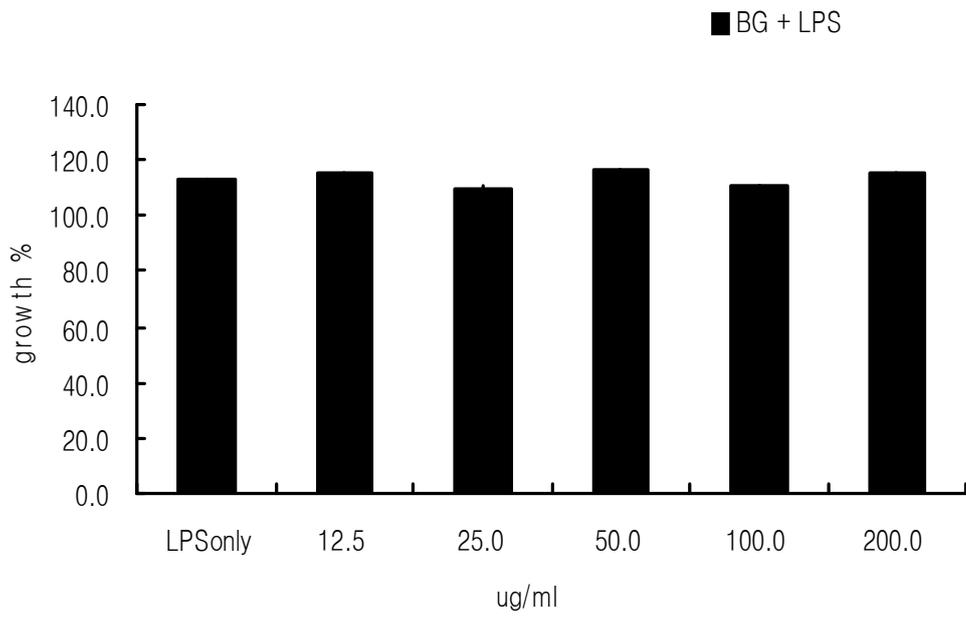
(7) 활성화 T세포에 대한 흑삼 추출물의 면역억제 작용

활성화 T세포에 대한 흑삼 추출물의 억제활성을 측정하기 위하여, 비장세포에 ConA를 첨가하여 T세포의 활성화를 유도하는 모델을 이용하여 실험을 행하였다. ConA로 자극한 T세포에 흑삼 추출물을 처리함으로써 농도에 의존한 약한 증식 억제효과가 관찰되었다 (Fig. 47). 또한 이들 활성화 T세포로부터 분비되는 사이토카인에 있어서는 흑삼성분 처리에 의해 현저한 억제활성이 관찰되었다 (Fig. 48).

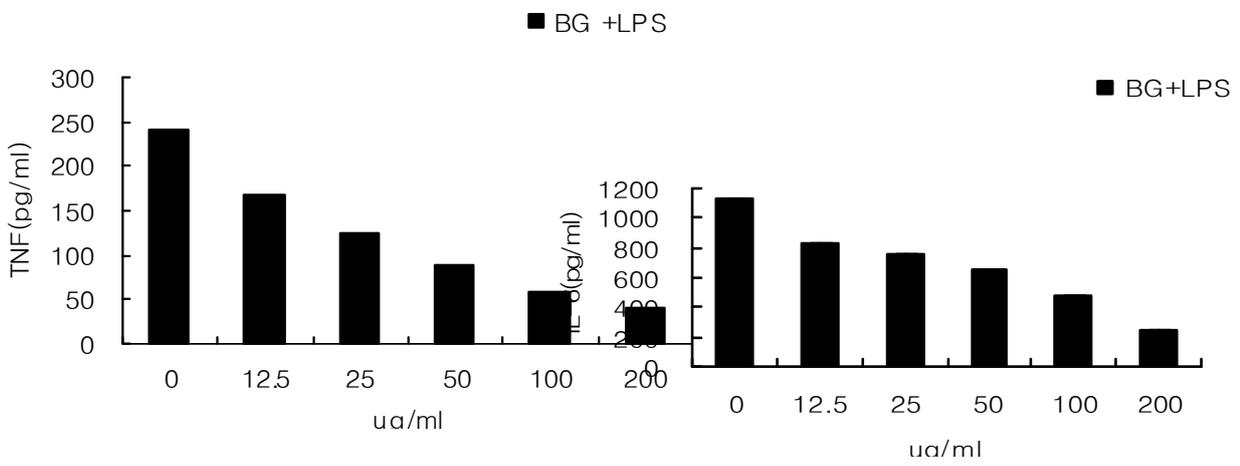
이들 결과는 흑삼 추출물은 LPS로 자극된 개식세포의 염증작용을 억제하는 것은 물론, 활성화 T세포에 대해서도 면역억제 효과를 지니는 것으로 추정되었다.

나. 흑삼 추출물의 암세포에 대한 직접독성 조사

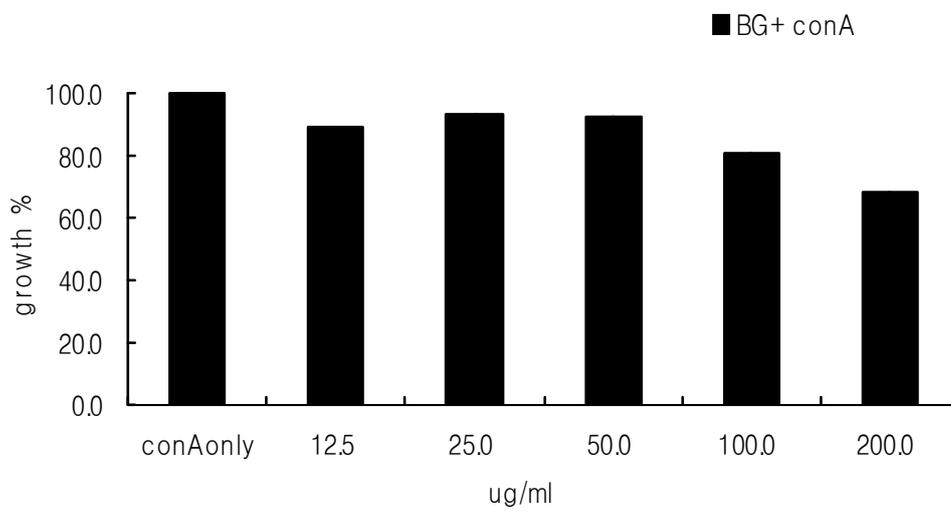
흑삼 추출물의 항암활성을 검토하기 위하여, 먼저 암세포에 대한 세포독성 효과를 조사하였다. 2종류의 마우스 암세포(B16-BL6 melanoma, colon 26 carcinoma)와 2종류의 사람 암세포 (MCF-7 epithelial cancer, MDA-231 breast cancer)에 여러 농도의 흑삼 추출물(0-500 ug/ml)을 24시간 배양한 후 MTT법에 의해 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, 흑삼 추출물은 500 ug/ml의 농도까지 B16-BL6, colon 26, MCF-7 세포에 대해 전혀 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 49). 단지 MDA-231세포에 있어서는 125 ug/ml 이상의 농도에서부터 세포의 생존율을 저하시키는 세포독성이 있는 것으로 확인되었다.



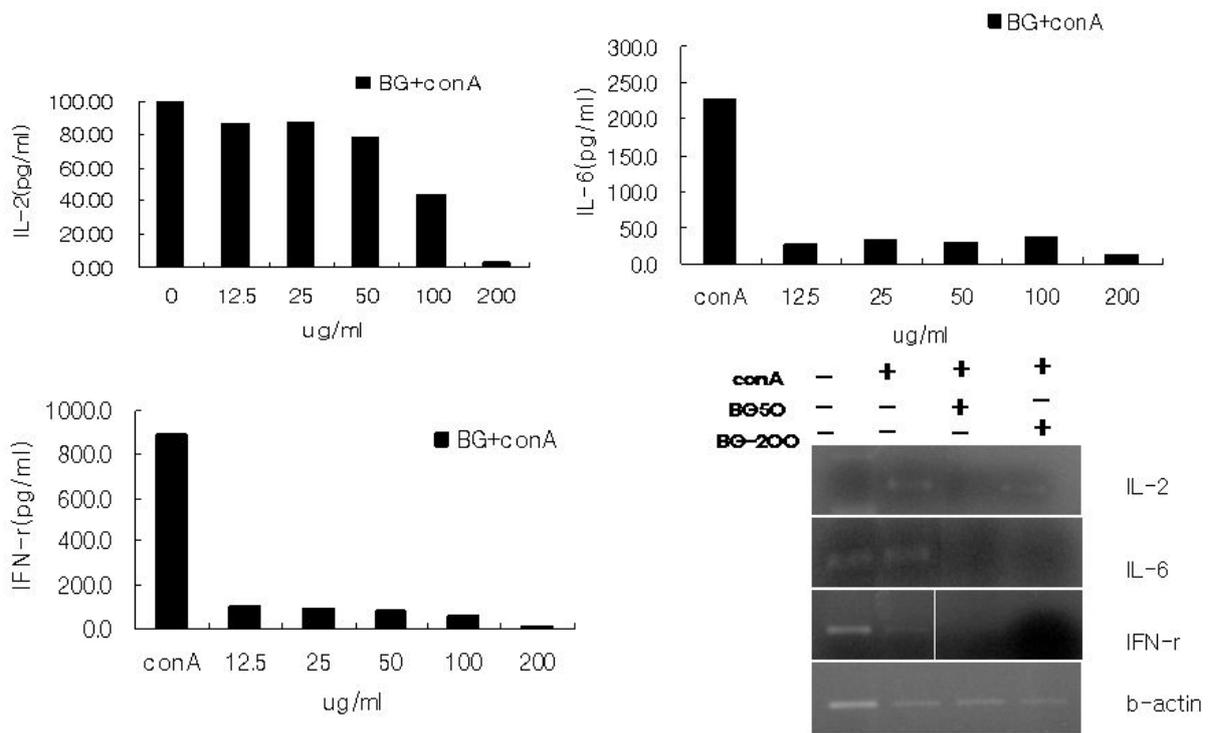
<Fig. 45> LPS 자극 대식세포의 증식반응에 대한 흑삼 추출물의 영향



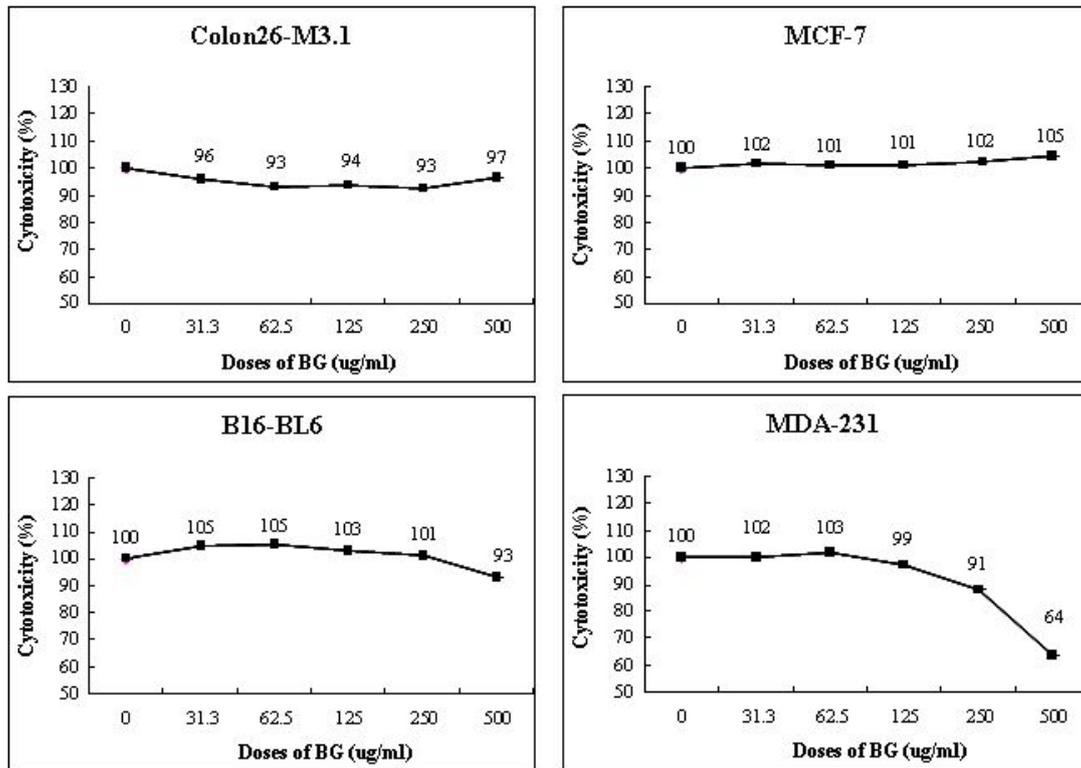
<Fig. 46> 대식세포의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 흑삼 추출물의 영향



<Fig. 47> 활성화 T세포에 대한 흑삼 추출물의 증식억제



<Fig. 48> 활성화 T세포의 사이토카인 분비에 대한 흑삼 추출물의 억제



<Fig. 49> 암세포에 대한 흑삼 추출물의 세포독성 시험

다. 흑삼 추출물에 의한 암세포의 증식, 전이 및 혈관신생 억제 효과

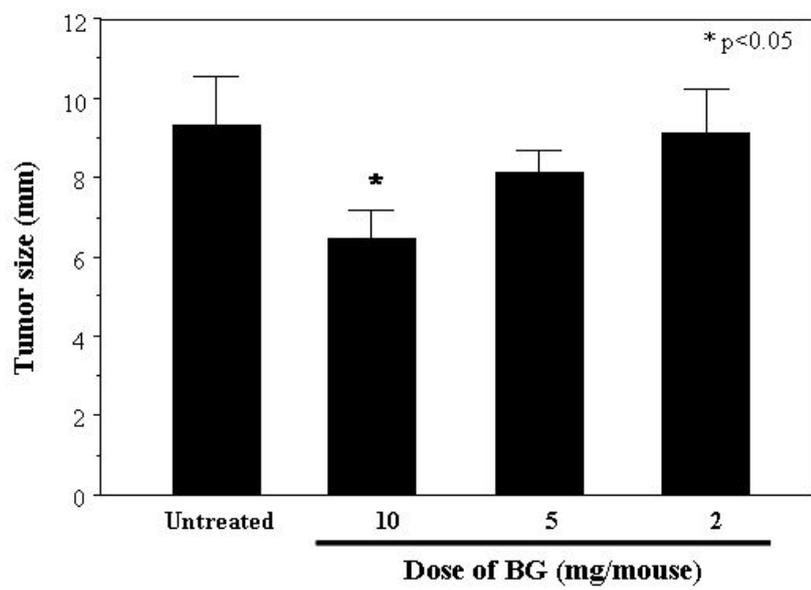
In vivo 실험계에서 흑삼 추출물의 항암활성을 조사하기 위하여, 암세포를 동계(syngeneic) 마우스에 이식하는 모델을 이용하여 암세포의 증식, 암세포의 전이, 그리고 암세포에 의한 혈관신생의 억제효과를 측정하였다.

먼저 in vivo 모델에서 흑삼 추출물에 의한 암세포의 증식억제 활성을 조사하였다. 흑삼 추출물을 마우스 당 2 mg, 5 mg, 혹은 10 mg씩 1일 1회씩 연속 3일간 경구투여한 후 암세포 (5×10^5 /site)를 마우스의 등에 이식하고 9일째에 암세포 증식억제의 예방적 효과를 관찰한 결과, 10 mg/mouse로 투여한 그룹에서 유의한 암세포 증식억제 활성이 관찰되었다 (Fig. 50). 하지만 5 mg/mouse과 2 mg/mouse의 투여량에서는 아무런 효과도 관찰되지 않았다.

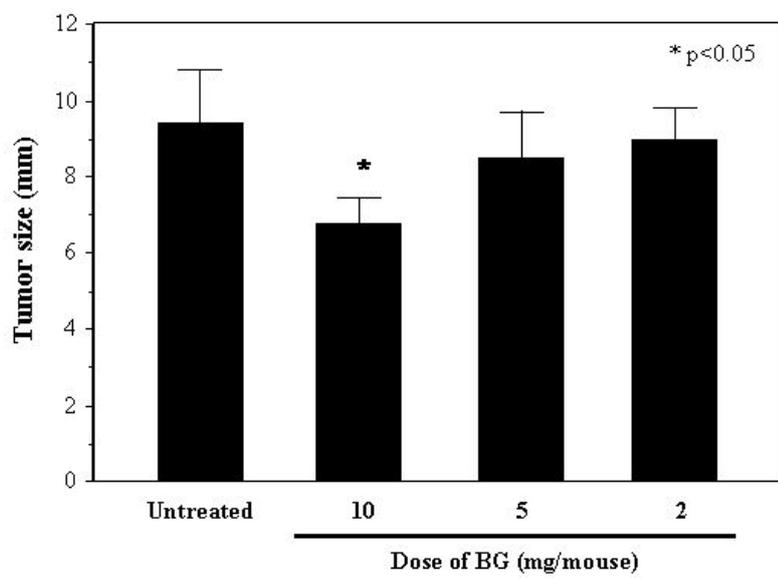
한편 동일한 실험모델에서 암세포를 먼저 이식한 후, 흑삼 추출물을 경구투여한 실험에서도 암세포 증식억제에 대한 예방적 효과와 거의 동일하게 10 mg/mouse로 투여한 그룹에서만 암세포 증식억제 효과가 관찰되었다 (Fig. 51). 이들 결과로부터 흑삼추출물(10 mg/mouse)의 경구투여는 암세포의 증식에 대해 예방적 혹은 치료적으로 유의한 억제효과를 나타내는 것으로 추정되었다.

흑삼 추출물의 연속 경구투여가 암세포의 증식억제에 유효한 것으로 확인되었으므로, 다음으로 3종류의 암전이 모델을 이용하여, 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 암전이 억제효과를 검토하였다. 실험적 전이모델로서, B16-BL6 melanoma, colon 26 carcinoma, 그리고 L5178Y-ML25 lymphoma 암세포를 각각 마우스 당 4×10^4 씩 미정맥을 통해 이식하고 14일 후에 각 암세포의 표적장기인 폐(B16-BL6 및 colon 26) 또는 비장 및 간(L5178Y-ML25)에 형성된 암세포의 전이를 계측하는 방법을 이용하였다. 이 실험모델에서 흑삼 추출물을 투여한 후에 암세포를 이식하여 암전이에 대한 예방적 효과를 검토하였다.

먼저 B16-BL6 melanoma 암세포의 실험적 폐전이에 대한 흑삼 추출물 경구투여의 암전이 억제활성을 조사하기 위하여, 흑삼 추출물을 2 mg, 5 mg 혹은 10 mg/mouse의 투여량으로 암세포를 이식하기 1일, 2일 및 3일 전에 경구투여하는 방법(예방적 효과)과, 혹은 암세포를 이식한 후 다음 날부터 1일, 2일 및 3일 후에 흑삼 추출물을 경구투여하는 방법(치료적 효과)으로 처리하였다. 암전이 억제효과는 암세포 이식 14일째에 마우스의 폐에 전이된 암세포 colony를 계측하여 판정하였다. 그 결과, 흑삼 추출물에 의한 예방적 전이억제 효과는 5 mg과 10 mg씩 투여한 그룹에서, 치료적 효과는 10 mg씩 투여한 그룹에서 관찰되었다 (표2).



<Fig. 50> 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암세포 증식억제의 예방적 효과



<Fig. 51> 흑삼 추출물 경구투여에 의한 암세포 증식억제의 치료적 효과

<표2> Effect of oral administration of BG extract on experimental lung metastasis produced by iv inoculation of B16-BL6 melanoma cells

Treatment	Number of lung metastasis	
	Mean \pm SD (% inhibition)	Range
Untreated (tumor control)	104 \pm 11	(93 - 115)
Pre-treatment		
BG (2 mg/mouse)	93 \pm 14	(79 - 107)
BG (5 mg/mouse)	74 \pm 21 (28.8) *	(53 - 95)
BG (10 mg/mouse)	56 \pm 16 (46.2) **	(40 - 72)
Post-treatment		
BG (2 mg/mouse)	97 \pm 18	(79 - 115)
BG (5 mg/mouse)	81 \pm 19 (22.1)	(62 - 100)
BG (10 mg/mouse)	47 \pm 21 (54.8) **	(26 - 68)

Groups of five C57BL/6 mice were inoculated *i.v.* with 4×10^4 B16-BL6 melanoma cells, and given oral administration of the indicated dosages of BG 1, 2 and 3 days before or after tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with untreated control (by Student's two-tailed t test)

<ㄷ3> Effect of oral administration of BG extract on experimental lung metastasis produced by iv inoculation of colon 26 carcinoma cells

Treatment	Number of lung metastasis	
	Mean \pm SD (% inhibition)	Range
Untreated (tumor control)	74 \pm 18	(56 - 92)
Pre-treatment		
BG (2 mg/mouse)	69 \pm 11	(58 - 80)
BG (5 mg/mouse)	51 \pm 10 (31.1)	(41 - 61)
BG (10 mg/mouse)	38 \pm 12 (48.6) *	(26 - 50)
Post-treatment		
BG (2 mg/mouse)	71 \pm 9	(62 - 80)
BG (5 mg/mouse)	59 \pm 13 (20.3)	(46 - 72)
BG (10 mg/mouse)	36 \pm 8 (51.4) *	(28 - 45)

Groups of five Balb/c mice were inoculated i.v. with 4×10^4 colon 26 carcinoma cells, and given oral administration of the indicated dosages of BG 1, 2 and 3 days before or after tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

* $p < 0.05$, compared with untreated control (by Student's two-tailed t test)

또한 colon 26 암세포의 폐전이 모델에 있어서도 B16-BL6 melanoma 암세포의 경우와 유사하게 5 mg 및 10 mg의 투여량으로 연속 3회 경구투여한 그룹에서 실험적 폐전이의 억제효과가 확인되었다 (표3).

한편 L5178Y-ML25 T lymphoma 암세포를 이용한 간 및 비장 전이모델에서도 B16-BL6와 colon 26 암세포의 폐전이와 동일한 프로토콜로 흑삼 추출물을 경구투여한 후 암전이 억제효과를 측정하였다. 그 결과, L5178Y-ML25 암세포에 있어서 5 mg/mouse의 투여량부터 유의한 암전이 억제효과가 관찰되었으며, 그 암전이 억제활성은 예방적 및 치료적으로 모두 유의한 것으로 확인되었다 (표4). 이들 결과를 종합해 보면, 흑삼 추출물은 경구적으로 1일 1회씩 3일간 연속투여할 경우, 암세포에 의한 실험적 폐전이는 물론 백혈병 암세포(leukemia, L5178Y-ML25)에 의한 간 및 비장 전이를 예방적 혹은 치료적으로 억제할 수 있는 것으로 나타났다. 하지만 투여량에 있어서는 마우스 당 10 mg 정도의 투여량이 안정적인 효과를 거둘 수 있는 것으로 확인되었다.

위의 결과에서 실험적 전이에 대한 흑삼 추출물(특히 10 mg/mouse의 투여량)의 암전이 억제효과에 유효한 것으로 확인되었으므로, 다음으로 B16-BL6 melanoma를 이용한 자연적 폐전이 모델에서 10 mg/mouse의 투여량에서 흑삼 추출물의 항암활성을 측정하였다. 자연적 폐전이 모델에서는 B16-BL6 암세포를 마우스의 footpad에 피하주사로 이식하고, 21일째에 암세포 이식부위를 외과적으로 제거(surgical amputation)한 후, 암조직 제거 14일째에 마우스의 폐에 자연전이된 암세포 colony의 수를 계측하였다. 흑삼 추출물은 암세포 이식 후 암조직을 제거하기 전까지 5, 8, 11, 14, 17일째에 경구투여하는 조건과, 암조직 제거 후 다음 날부터 3일 간격으로 총 5회 경구투여하는 조건(22, 25, 28, 31, 34일째)으로 각각 경구투여하여 암전이 억제활성을 조사하였다. 그 결과, 암조직 제거 전에 흑삼 추출물을 투여한 그룹에서 암조직의 유의한 증식억제와 전이억제가 관찰되었다 (표5). 하지만 암조직을 제거한 후에 흑삼 추출물을 경구투여한 그룹에서는 암세포의 폐전이 colony의 감소는 관찰되었으나 통계학적인 유의차는 인정되지 않았다. 즉 흑삼 추출물(10 mg/mouse)의 경구투여에 의한 자연적 폐전이 억제효과는 암조직의 제거 전에 투여하는 것이 암전이의 치료적 효과를 유도하는 것으로 판단되었다.

Fig. 50과 51 그리고 표5의 실험결과에서, 흑삼 추출물의 경구투여에 의해 in vivo에서의 암세포의 증식이 유의하게 억제되는 것으로 나타났으므로, 이번에는 B16-BL6 melanoma 암세포를 이용한 in vivo 혈관신생 실험모델에서 흑삼 추출물의 혈관신생 억제효과를 조사하였다.

<표4> Effect of oral administration of BG extract on liver and spleen metastasis produced by iv inoculation of L5178Y-ML25 lymphoma cells

Treatment	Mean weight (g) ± SD, (% inhibition)	
	Liver	Spleen
Normal	1.05 ± 0.1	0.09 ± 0.02
Untreated (tumor control)	3.45 ± 0.52	0.22 ± 0.04
Pre-treatment		
BG (2 mg/mouse)	3.33 ± 0.45	0.20 ± 0.02
BG (5 mg/mouse)	2.24 ± 0.38 (35.1) *	0.15 ± 0.04 (31.8) *
BG (10/mouse)	2.10 ± 0.32 (39.1) *	0.14 ± 0.03 (36.4) *
Post-treatment		
BG (2 mg/mouse)	3.42 ± 0.22	0.21 ± 0.01
BG (5 mg/mouse)	2.32 ± 0.18 (32.8) *	0.16 ± 0.02 (27.3) *
BG (10/mouse)	2.14 ± 0.16 (38.0) *	0.13 ± 0.02 (40.9) *

Groups of five CDF1 mice were inoculated *i.v.* with 5×10^4 L5178Y-ML25 lymphoma cells, and given oral administration of the indicated doses of BG 1, 2, 3 days before or after tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

* $p < 0.01$, compared with untreated control (by Student's two-tailed t test)

<表5> Effect of oral administration of BG extract on spontaneous lung metastasis produced by iv inoculation of B16-BL6 melanoma cells

Treatment (on day)	Primary tumor volume (mm ³)		No. of lung metastasis (% inhibition)	
	Mean ± SD	(% inhibition)	Mean ± SD	Range
Untreated	974 ± 217		54 ± 16	(38-70)
5,8,11,14,17	527 ± 139	(45.9) *	28 ± 9	(48.1) ^a (19-37)
22,25,28,31,34			35 ± 12	(35.2) (23-47)

Groups of seven C57BL/6 mice were administered orally with BG (10 mg/mouse) on the indicated days after footpad inoculation of B16-BL6 cells (5X10⁵/site). The primary tumors were amputated surgically 21 days after tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation.

* p<0.01, compared with the untreated group (by Student's two-tailed t test)

암세포(5×10^5 /site)를 마우스의 등에 피하주사하여 이식한 후, 9-10일째에 종양조직 주변에 형성된 혈관의 수를 계측하는 방식으로 실험을 수행하였다. 이때 흑삼 추출물(10 mg/mouse)은 암세포 이식 전 혹은 후에 1일1회씩 총 3회 경구투여하였다. 그 결과 흑삼 추출물을 암세포 이식 전에 투여한 경우나 이식 후에 투여한 경우 모두에서 유의한 혈관신생 억제효과가 인정되었다 (Fig. 52).

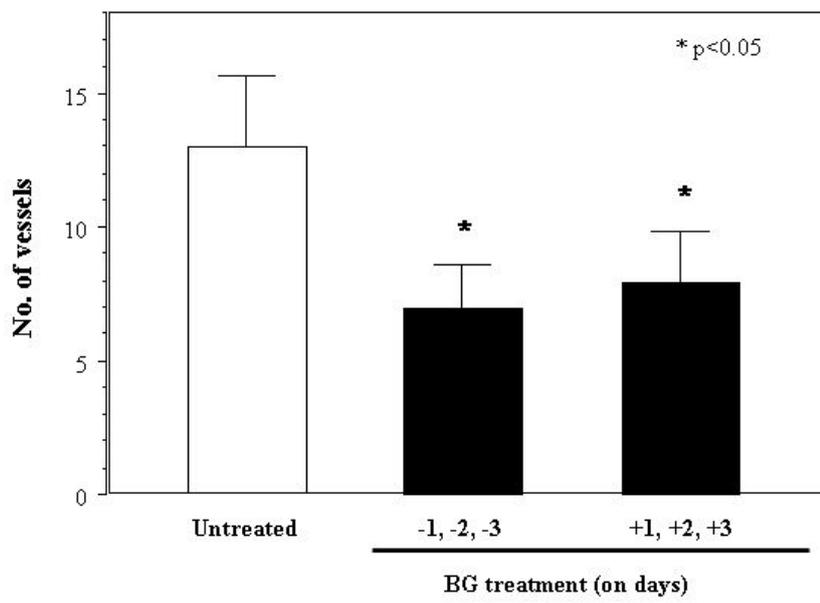
이상의 결과를 종합해 보면, 흑삼 추출물은 암세포에 대한 직접독성은 없으나, 연속적 경구투여에 의해 암세포의 증식과 혈관신생을 저해하고 암의 전이를 유의하게 억제하는 활성을 지닌 것으로 확인되었다. 단지 흑삼 추출물의 경구투여에 의해 안정적인 항암활성을 유도하기 위해서는 비교적 높은 투여량인 10 mg/mouse이 요구되는 것으로 나타났다.

라. 항암활성 관련 면역학적 작용기전의 해석

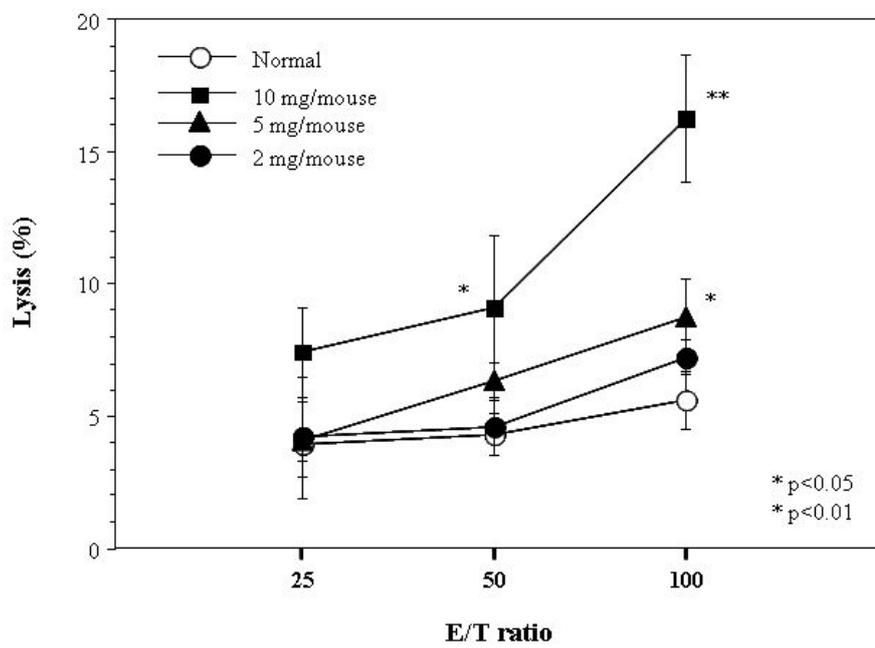
흑삼 추출물의 암세포 증식, 암전이 및 혈관신생 등의 억제활성에 관련된 작용기전 해석의 일환으로 면역학적 관점에서 검토를 행하였다. 이전의 연구결과(1년차 및 2년차)에서 보면, 흑삼 추출물을 면역세포에 직접 처리할 경우 비장세포에 대해서는 세포 증식반응을 다소 높이는 효과가 있는 것으로 나타났으며, 대식세포(macrophage)에 대해서는 세포증식과 LPS에 대한 반응성을 억제하는 것으로 확인되었다. 한편 수지상 세포에 흑삼 추출물을 직접 처리한 경우에는 수지상 세포의 증식반응을 높이며, nitric oxide와 TNF- α 의 분비를 촉진하는 효과가 있는 것으로 관찰되었다.

종양에 대한 면역학적 반응은 대식세포와 수지상 세포 이 외에도 NK세포가 중요한 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 NK세포에 대한 흑삼 추출물의 활성화 유도효과를 조사하였다.

흑삼 추출물을 2 mg, 5 mg 혹은 10 mg/mouse의 투여량으로 1일1회 연속 3일간 경구투여한 후, 비장세포를 분리하여 NK세포에 대한 sensitive cell인 Yac-1세포와 여러 가지 E/T ratio(Effector vs. target ratio)로 혼합하고 8시간 배양한 후에 Yac-1 target cell의 살해활성을 Non-isotope Cell Lysis Assay Kit (Promega사)으로 분석하여, NK세포에 의한 암세포 살해활성을 계측하였다. 그 결과 10 mg의 흑삼 추출물을 투여한 그룹에서 가장 안정된 NK 세포살해활성이 관찰되었으며, 5 mg을 투여한 그룹에서도 E/T ratio 100에서는 유의한 활성이 관찰되었다 (Fig. 53).



<Fig. 52> 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 암세포 혈관신생 억제효과



<Fig. 53> 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 NK 세포살해활성 유도 효과

Fig. 53의 결과에서 보여진 NK세포의 활성화가 흑삼 추출물에 의한 항암활성과 관련있는 것인가를 확인하기 위하여 생체 내에서 NK세포를 제거한 후 흑삼 추출물을 투여하는 경우에 항암효과가 어떠한 영향을 받는가를 조사하였다. C57BL/6 마우스 체내에서 NK세포를 제거하기 위하여, 50배 희석한 rabbit anti-asialo GM1 serum (Wako chemicals)을 500 ul씩 복강주사를 통해 암세포 이식 1일 및 3일전에 투여하였다. 흑삼 추출물은 B16-BL6 melanoma 암세포에 의한 실험적 폐전이의 실험조건과 동일하게 암세포 이식 전에 1일1회 총 3회에 걸쳐 10 mg/mouse의 투여량으로 경구투여하였다. 암세포 이식 14일째에 암전이 억제효과를 측정한 결과, 흑삼 추출물의 투여에 의해 나타났던 암전이 억제효과가 NK세포를 in vivo에서 제거한 마우스에서는 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 54). 즉 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 암전이 억제효과는 NK세포의 활성화에 의한 기전이 매우 중요한 것으로 확인되었다.

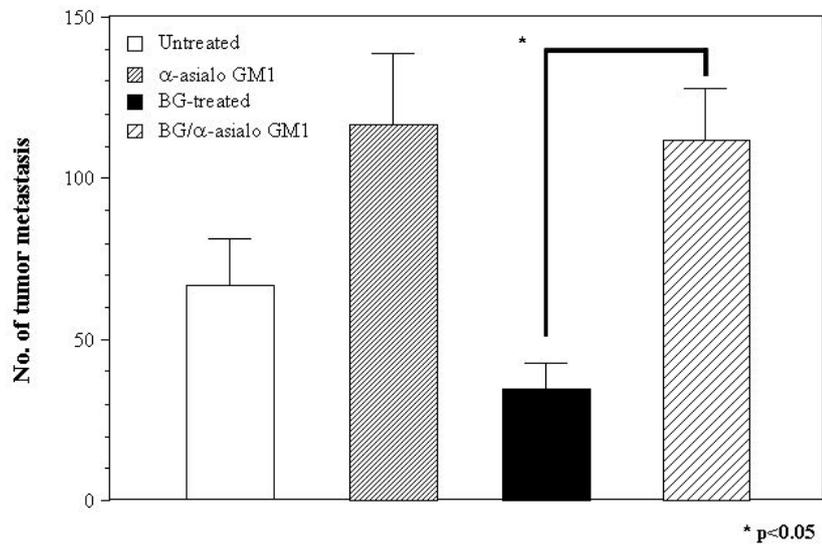
한편 흑삼 추출물의 경구투여에 의해 림프구(특히 T세포)의 활성화에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위하여 흑삼 추출물(10 mg/mouse)을 1일1회씩 총 3회 연속 경구투여한 후에, 최종 투여 1일, 3일 및 5일 후에 마우스의 비장세포를 회수하여 림프구의 mitogen에 대한 반응성과 T세포로부터의 사이토카인 분비에 대해 조사하였다.

비장세포의 세포증식반응에 있어서, 흑삼 추출물을 투여한 마우스는 투여 종료 1일째에 가장 높은 증식반응을 보였으며, ConA 및 LPS와 같은 mitogen에 대한 반응성도 가장 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 55).

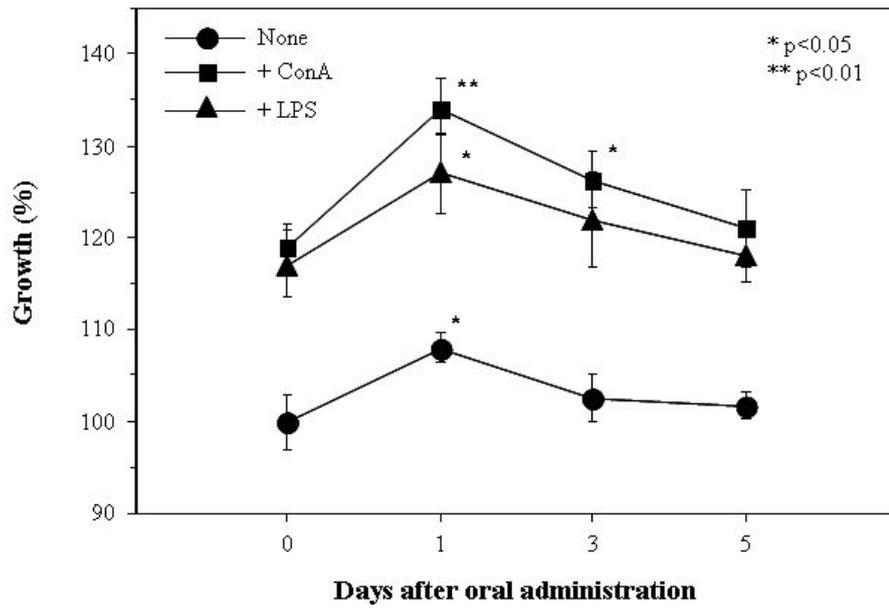
또한 T세포의 활성화를 자극하는 mitogen인 ConA를 처리한 세포의 배양상청을 이용하여 ELISA법에 의해 사이토카인을 정량한 결과, 경구투여 종료 후 3일째까지 TNF-a와 IL-6의 분비가 상승한 것으로 나타났다 (Fig. 56). 하지만 T세포로부터 분비되는 다른 사이토카인(IL-2, IFN-g, IL-4 등)에는 별다른 변화가 관찰되지 않았다 (data not shown).

이상의 결과를 종합해 보면, 흑삼 추출물은 암세포에 대한 직접독성에 의해 종양을 억제하는 효과는 거의 없으나, 림프구 및 수지상 세포의 활성화를 유도하는 작용과 경구투여에 의해 NK세포의 암세포 살해활성을 상승시키는 작용을 통해 암세포의 증식을 억제하고, 혈관신생을 저지하며, 나아가 암세포의 전이를 억제하는 효과를 지니는 것으로 추정된다.

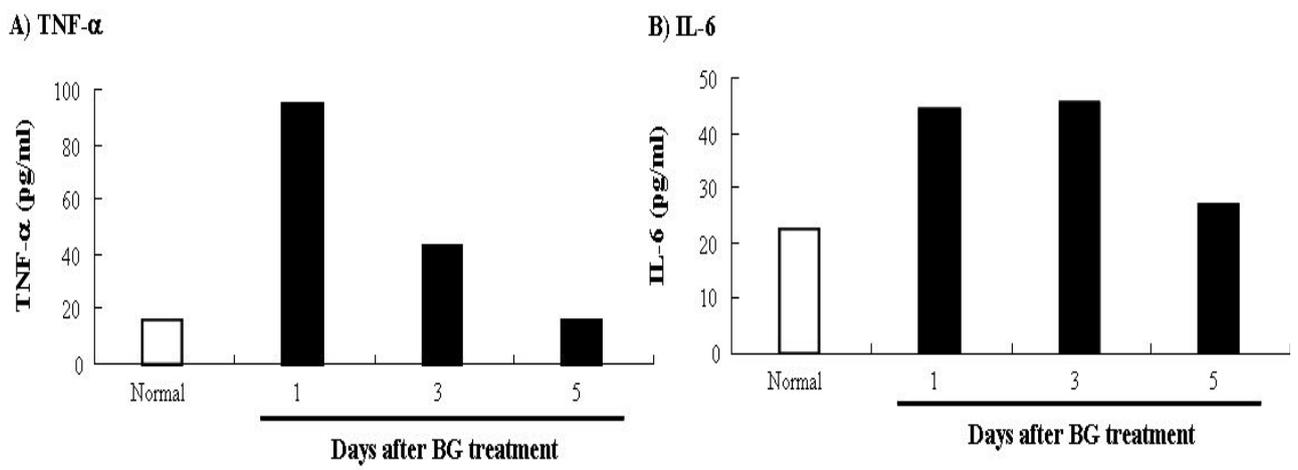
향후 iv vivo모델에서의 항암활성에 대한 보다 구체적인 검토가 필요하며, 암의 전이와 증식억제에 관련된 면역학적 기전 이외의 요인에 대해서도 집중적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.



<Fig. 54> NK세포를 제거한 마우스에서 흑삼 추출물의 항암활성 변화



<Fig. 55> 흑삼 추출물의 경구투여에 의한 마우스 림프구 증식반응의 상승효과



<Fig. 56> 흑삼 추출물 투여에 의한 T세포로부터 사이토카인 분비 증가활성

3. 뇌졸중 및 치매 예방과 치료효과 증진용 고효능 가공인삼에 관한 연구

가. 뇌허혈 동물 모델에서의 흑삼의 효과

(1) 실험동물

실험에 사용하는 흰쥐는 Sprague-Dawley계로 생후 8주령(체중 $280 \pm 10\text{g}$)의 수컷(샘타코, 한국)을 구입하여 동물실험실 내 사육실에서 7일간의 적응기간을 갖도록 한다. 사육실의 온도는 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$ 의 환경을 유지하면서 08:00부터 20:00까지 12시간 간격으로 명암을 조절하고, 고형사료(삼양사료, 경기도)와 물은 무제한 공급한다.

해마로 투사하는 acetylcholine성 신경세포의 주 입력구조물인 medial septum, nucleus basalis 등에 ibotenic acid (a glutamate analogue) 국소 주입에 의한 손상 또는 Medial septum, nucleus basalis 부위에 192 IgG-saporin (a highly specific immunotoxin against cholinergic neurons) 국소 주입에 의한 손상모델을 이용한다.

(2) 전뇌 허혈성 동물모델의 확립

SD rat을 70% N_2 /30% O_2 와 혼합된 30% isoflurane으로 흡입마취시킨 후, 경부를 절개하여 흉골허근과 흉골저작근 사이에 총경동맥을 노출한 후 5분동안 양쪽 총경동맥을 동맥지혈 폐색시키고, 뇌동맥을 결찰시키고 probe를 넣어 2시간 동안 혈관을 폐쇄시킨다. 절개된 부위를 봉합한 후 2시간 후 probe를 빼고 마취에서 회복시킨다. 수술 및 마취 회복동안 온도 조절 장치를 이용하여 직장내 온도를 37° 로 유지시킨다.

(3) 고기능성 흑삼의 뇌허혈 모델에서 기억증진치료 효능에 관한 연구

흑삼 (100mg/kg, 400mg/kg) 을 백서에 투여 후, in vivo에서 기억증진 변화와 뇌세포의 발현 변화에 대해 조사하였다.

(4) 조직염색법을 통한 전뇌허혈성 및 치매 조직의 손상 확인

중풍 및 치매 유발 부위의 확인을 위하여 우선 조직 염색 이전, 고정을 위해 몇가지 buffer를 준비한다. formaiin beffer는 100ml formalin(37%),900ml 증류수, 6.5g Na_2HP_4 (dibasic) 4g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{HCl}$ (monobasic)을 mixing하여 만들고, 생리식염수 9g의 NaCl을 증류수 1ℓ에 녹여서 준비한다. 다음으로 Pre-stain solution 으로 증류수, 70% alcohol, 95%alcohol, 100%

alcohol, xylene 용액을 갖추고, 끝으로 염색용 solution인 cresyl violet solution(cresyl violet acetate 0.5g)을 제조한다. Buffer를 모두 준비한 뒤, 본격적인 조직 검사에 들어가기 앞서서 고정을 위한 생리식염수와 formalin buffer를 각각 4ℓ Wkfl 증류수 통에 넣어 peristaltic pump(Ismates ISM22IC)에 연결하여 tube를 통해 관류할 수 있도록 한 뒤 모래쥐 위 복부에 sodium pentobarbital을 80mg/kg을 주사하여 마취시킨 뒤 수술대에 고정하여 흉곽을 열고 descending aorta를 결찰시켰다. 심첨 부위에 침자하여 먼저 생리식염수를 300ml/min의 유속으로 흘려서 혈액을 씻어낸 뒤, 처음에는 formalin buffer를 300ml/min의 유속으로 충분히 관류한 뒤 130ml/min의 유속으로 흘린다. 두개골로부터 뇌를 분리하여 formalin buffer에 2시간동안 고정해 두었다가 20% sucrose에 넣어서 4℃에서 overnight해 둔다. Microtome을 이용하여 뇌로부터 30μm의 뇌절편을 만들어 뇌를 염색하기 이전 증류수(5min), 70% alcohol(5min) 100% alcohol(5min), 95% alcohol(5min), 70% alcohol(5min), 증류수(5min)순으로 담구어서 탈지, 탈수를 시킨 뒤, cresyl violet buffer로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경으로 관찰한다. Paxinos와 Watson의 Atlas에서 주어진 coordinate를 참고하여 뇌손상 부위를 확인하였으며 중풍 유발부위를 검증한다. 위와 동일한 방법으로 흑홍삼과 그 유효성분들의 신경세포 보호효과를 조직 염색법을 이용하여 평가한다.

(5) 허혈성 동물 모델에서의 신경 화학적 변화에 관한 연구

◆ Choline acetyltransferase(ChAT) immunohistochemistry

-Hippocampus 부위에서 ChAT(choline Acetyltransferase) 면역화학조직염색을 통한 acetylcholine성 신경세포 관찰: 모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital(100mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 고정액(fixative) 900ml로 심장을 통해 관류한다. 처음 고정액 200ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml은 25분간 천천히 관류한다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 인산완충액(PBS)에 넣어 4℃에서 하루동안 보관한다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 microtome(Leica, CM1850, Germany)을 이용하여 뇌 조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, 내측 중격 부위에서 30μm의 두께로 자른 다음 PBS로 조직을 몇 차례 씻은 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용한다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1%

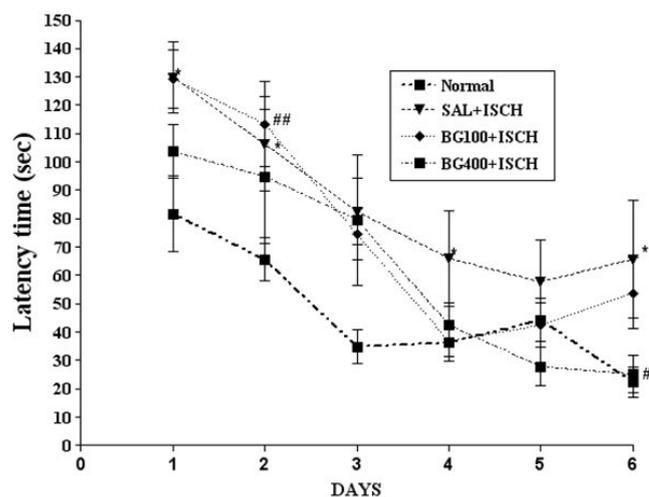
sodium azid(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양한다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine(DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정한다.

◆ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) histochemistry 0.05 M PBS containing 0.3% Triton X-100, 0.1mg/ml nitroblue tetrazolium (Sigma, MO, USA) and 0.1 mg/ml β -NADPH (Sigma)를 섞어서 조직을 담귀 37도 오븐에서 30분간 incubation 시킨후 0.3% PBST 에 washing 하여 슬라이드 글라스에 붙여 준다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정한다.

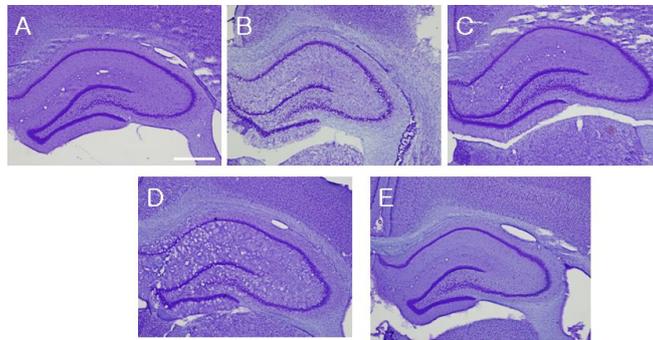
(6) 2VO 전뇌허혈 중풍 모델에서 Morris water maze를 이용한 공간지각능력의 변화 측정결과 획득시행의 1,2,4,6일째 Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 도피대를 찾는데 걸리는 시간이 유의하게 증가됨을 알 수 있다 ($P<0.05$). 하지만, 마지막 6일째 PG400군은 SAL군에 비해 도피대를 찾는 시간이 유의하게 감소함을 알 수 있다 ($P<0.05$) (Fig. 57).

(7) 2VO 전뇌허혈 중풍 모델에서 Cresyl violet를 이용한 brain tissue damage 변화 Normal과 Sham군에 비해 뇌허혈 유발 대조군인 SAL+ISCH군에서 눈에 띄게 피질의 손상이 발생함을 관찰할 수 있다. 하지만, BG의 투여 군에서는 SAL+ISCH에서 보이는 피질의 손상이 감소되는 것으로 보아, BG의 투여는 뇌조직의 보호 효과가 분명하게 있음을 알 수 있다 (Fig. 58).



<Fig. 57> Comparison of acquisition performance on the Morris water maze test among the five groups of the rats.

Naïve normal rats, n=8; Normal group, Ischemia and saline treated rats, n=8; SAL+ISCH, Ischemia and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100+ISCH group, Ischemia and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400+ISCH group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. (*, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of Normal group. #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH group).



<Fig.58> Representative microphotographs of coronal sections showing cresyl violet in the hippocampus of Normal (A), Sham(B), SAL+ISCH(C), BG100+ISCH(D), BG400+ISCH(E).

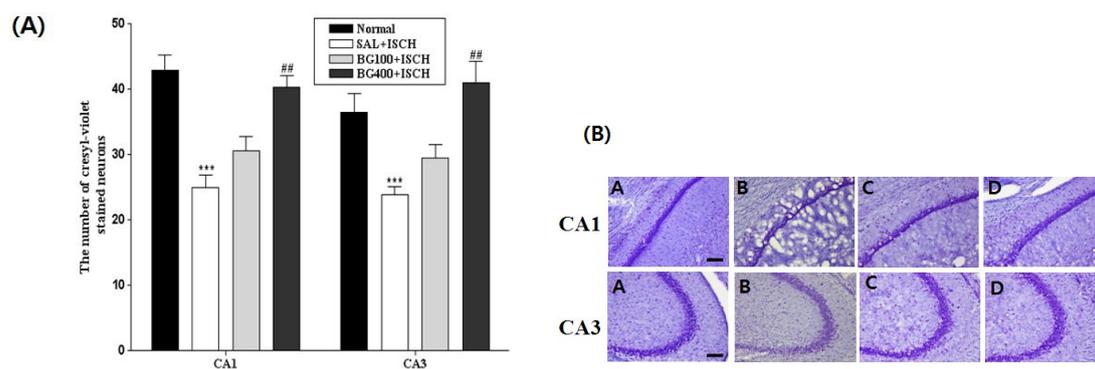
Scale bar

(8) 2VO 전뇌허혈 중풍 모델에서 Cresyl violet를 해마내의 신경세포 발현의 변화

Cresyl violet염색을 이용한, 뇌조직의 분석결과는 해마의 CA1부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 42.88 ± 2.26 , 24.91 ± 1.98 , 30.60 ± 2.10 , 40.33 ± 1.73 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.001$) (Fig. 59). 하지만, BG400+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 160%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 뇌손상 보호효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.01$). 또한, 해마의 CA3부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 36.38 ± 2.90 , 23.82 ± 1.29 , 29.40 ± 2.06 , 41.00 ± 3.27 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.001$). 하지만, BG400+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 170%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 뇌손상 보호효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.001$).

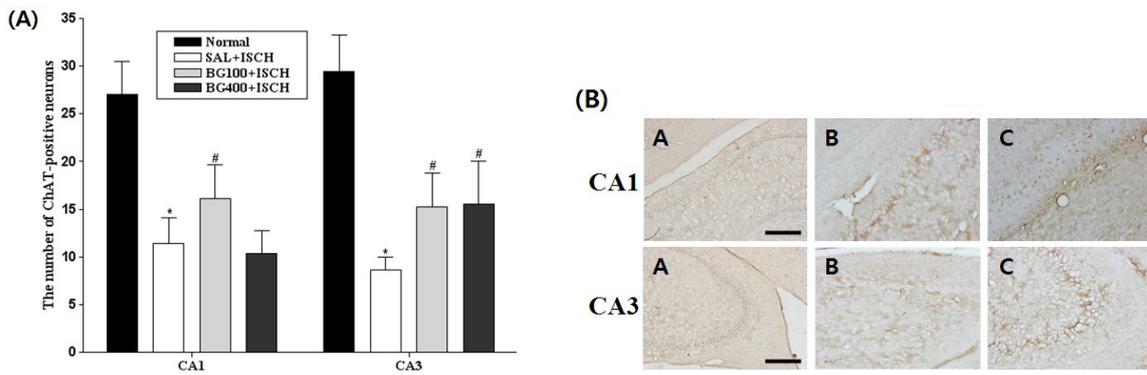
(9) 2VO 전뇌허혈 중풍 모델에서 Choline Acetyltransferase (ChAT)를 해마내의 신경세포 발현의 변화

ChAT염색을 이용한, 뇌조직의 분석결과는 해마의 CA1부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 27.0 ± 3.5 , 11.4 ± 2.7 , 16.1 ± 3.6 , 10.4 ± 2.4 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$) (Fig. 60). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 150%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 뇌손상 보호효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.001$). 또한, 해마의 CA3부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 7 ± 0.8 , 1.8 ± 0.4 , 5.2 ± 0.7 , 3.2 ± 0.5 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$). 하지만, BG 투여군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 170%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 허혈성신경손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.05$).



<Fig. 59> The number of cresyl violet-stained sections in the different hippocampal formation areas are shown.

Naïve normal rats, n=8; Normal group, Ischemia and saline treated rats, n=8; SAL+ISCH, Ischemia and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100+ISCH group, Ischemia and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400+ISCH group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. (*, $P < 0.05$ as compared with the corresponding data of Normal group. ##, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of SAL+ISCH group).



<Fig. 60> (A) The number of choline acetyltransferase (ChAT) immunostained nuclei in the different hippocampal CA1 and CA3 areas of the experimental groups. Each value represents the mean \pm S.E.M. (B) Photographs showing the distribution of ChAT-immunoreactive cells in the hippocampus of the Normal (A), SAL+ISCH (B) and BG100+ISCH (C).

Naïve normal rats, n=8; Normal group, Ischemia and saline treated rats, n=8; SAL+ISCH, Ischemia and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100+ISCH group, Ischemia and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400+ISCH group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. (*, P<0.05 as compared with the corresponding data of Normal group. #, P<0.05 as compared with the corresponding data of SAL+ISCH group).

(10) 2VO 전뇌허혈 중풍 모델에서 해마내의 NADPH-d의 신경세포 발현의 변화

NADPH-d 염색을 이용한, 뇌조직의 분석결과는 해마의 CA1부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 12.0 ± 0.8 , 5.4 ± 0.6 , 6.4 ± 1.8 , 8.6 ± 0.7 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.001$) (Fig. 61). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 110%정도 증가하는 것으로 보아, BG100+ISCH의 투여는 뇌손상 보호효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.05$). 또한, 해마의 CA3부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 7.0 ± 0.8 , 1.8 ± 0.4 , 5.2 ± 0.7 , 3.2 ± 0.5 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.001$). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 170%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 허혈성신경손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.05$). 해마의 DG부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 8.0 ± 1.9 , 3.4 ± 0.5 , 11.8 ± 1.2 , 6.2 ± 1.3 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 200%정도 증가하는 것으로 보아, BG의 투여는 허혈성신경손상을 보호하는 효과가 있는 것으로 보인다 ($P < 0.05$).

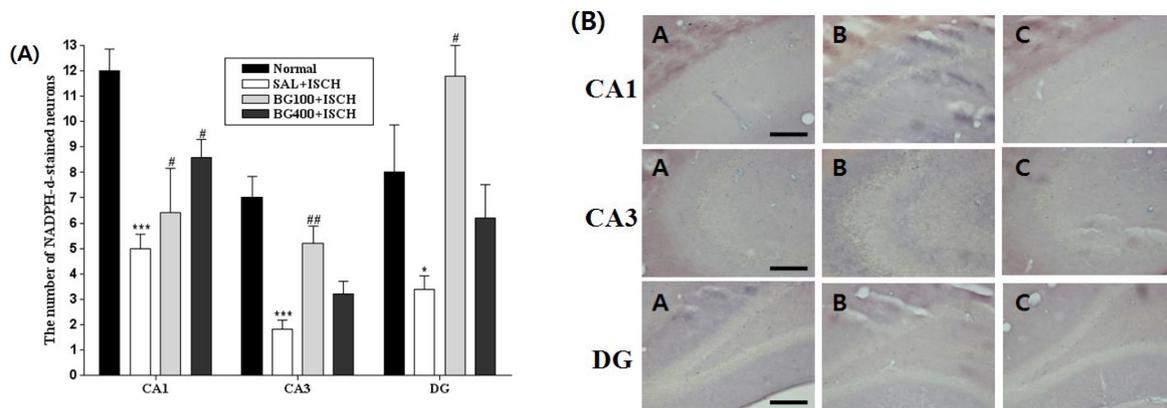
나. 뇌허혈 동물 모델에서의 흑삼의 효과

(1) 치매 동물모델의 확립

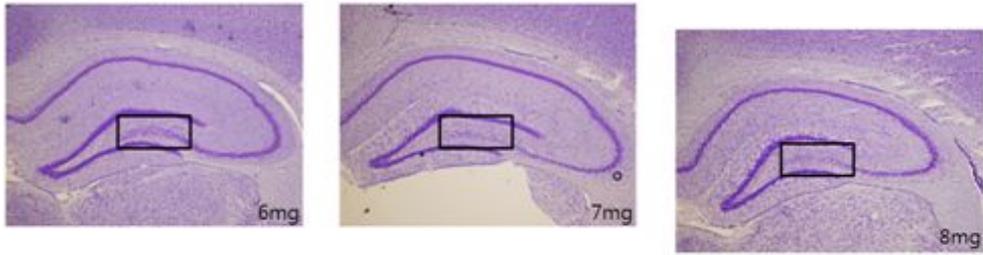
TMT를 saline에 녹여 6, 7, 8mg/kg으로 쥐에 복강내 투여 하였다. 2주 후, cresyl violet staining을 이용하여 hippocampus 내의 cell의 감소정도를 비교하였다. 8mg/kg 투여 군에서, hippocampus내 DG부분에서 유의하게 cell의 감소가 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 8mg/kg을 투여 후 기억 행동의 변화가 클 것으로 사료된다.

(2) 고기능성 흑삼의 치매 모델에서 기억증진치료 효능에 관한 연구

흑삼 (100mg/kg, 400mg/kg) 을 백서에 투여 후, in vivo에서 기억증진 변화와 뇌세포의 발현 변화에 대해 조사하였다 (Fig. 62).



<Fig. 61> (A) The number of NADPH-d stained nuclei in the different hippocampal CA1 and CA3 areas of the experimental groups. Each value represents the mean \pm S.E.M. (B) Photographs showing the distribution of NADPH-d reactive cells in the hippocampus of the Normal (A), SAL+ISCH (B) and BG100+ISCH (C). Sections were cut coronally at 30 μ m and the scale bar represents 200 μ m.



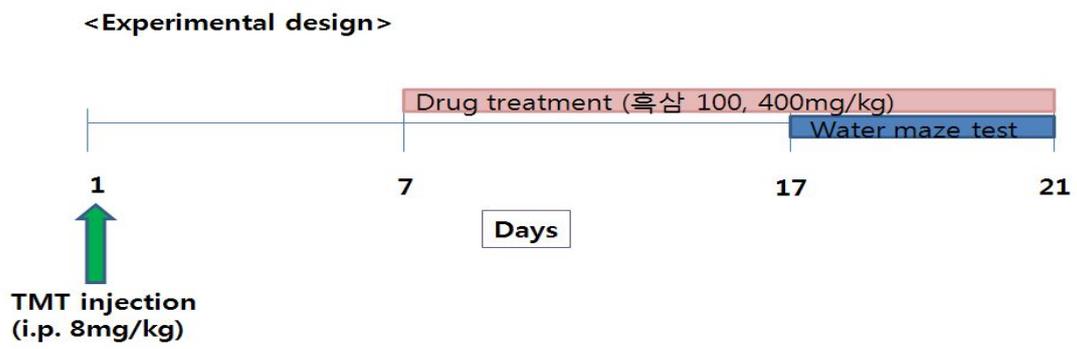
<Fig. 62> TMT 투여로 인한 hippocampus내 cell damage

(3) 기억장애 치매모델에서 흑삼의효과

본 연구는 TMT neurotoxn을 이용하여 치매모델을 확립 후, 흑삼 (100mg/kg, 400mg/kg)을 백서에 투여 후, in vivo에서 기억증진 및 운동능력의 변화와 뇌세포의 발현 변화에 대해 조사하였다 (Fig. 63).

(4) 조직염색법을 통한 전뇌허혈성 및 치매 조직의 손상 확인

중풍 및 치매 유발 부위의 확인을 위하여 우선 조직 염색 이전, 고정을 위해 몇가지 buffer를 준비한다. formaiin beffer는 100ml formalin(37%),900ml증류수, 6.5g Na2HP4(dibasic) 4g NaH2PO4·HCl(monobasic)을 mixing하여 만들고, 생리식염수 9g의 NaCl을 증류수 1ℓ에 녹여서 준비한다. 다음으로 Pre-stain solution 으로 증류수, 70% alcohol, 95%alcohol, 100% alcohol, xylene 용액을 갖추고, 끝으로 염색용 solution인 cresyl violet solution(cresyl violet acetate 0.5g)을 제조한다. Buffer을 모두 준비한 뒤, 본격적인 조직 검사에 들어가기 앞서서 고정을 위한 생리식염수와 formalin buffer를 각각 4ℓ Wkfl 증류수 통에 넣어 peristaltic pump(Ismates ISM22IC)에 연결하여 tube를 통해 관류할 수 있도록 한 뒤 모래쥐위 복부에 sodium pentobarbital을 80mg/kg을 주사하여 마취시킨 뒤 수술대에 고정하여 흉곽을 열고 descending aorta를 결찰시켰다. 심첨 부위에 첩자하여 먼저 생리식염수를 300ml/min의 유속으로 흘려서 혈액을 씻어낸 뒤, 처음에는 formalin buffer를 300ml/min의 유속으로 충분히 관류한 뒤 130ml/min의 유속으로 흘린다. 두개골로부터 뇌를 분리하여 formalin buffer에 2시간동안 고정해 두었다가 20% surose에 넣어서 4℃에서 overnight해 둔다. Microtone을 이용하여 뇌로부터 30μm의 뇌절편을 만들어 뇌를 염색하기 이전 증류수(5min), 70% alcohol(5min) 100% alcohol(5min), 95%a alcohol(5min), 70% alcohol(5min), 증류수(5min)순으로 담구어서 탈지, 탈수를 시킨 뒤, cresyl violet buffer로 염색을 하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경으로 관찰한다. Paxinos와 Watson의 Atlas에서 주어진 coordinate를 참고하여 뇌손상 부위를 확인하였으며 중풍 유발부위를 검증한다. 위와 동일한 방법으로 흑홍삼과 그 유효성분들의 신경세포 보호효과를 조직 염색법을 이용하여 평가한다.



<Fig. 63> Experimental design

(5) 치매 동물 모델에서의 신경 화학적 변화에 관한 연구

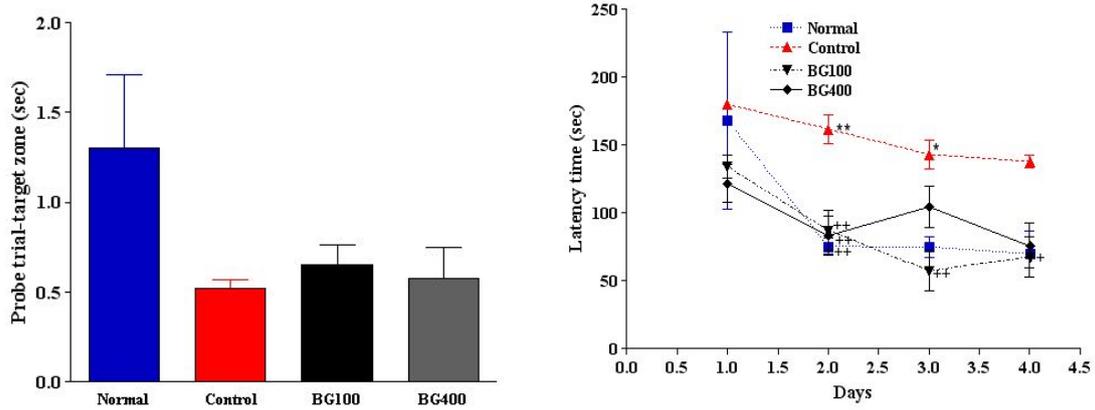
◆ Medial septum, hippocampus 부위에서 ChAT(choline Acetyltransferase) 면역화학조직염색을 통한 acetylcholine성 신경세포 관찰: 모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital(100mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 고정액(fixative) 900ml로 심장을 통해 관류한다. 처음 고정액 200ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700ml은 25분간 천천히 관류한다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3시간동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 인산완충액(PBS)에 넣어 4°C에서 하루동안 보관한다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 microtome(Leica, CM1850, Germany)을 이용하여 뇌 조직을 배측(dorsal)과 복측(ventral)의 해마, 내측 중격 부위에서 30 μ m의 두께로 자른 다음 PBS로 조직을 몇 차례 씻은 후 ChAT 유전자 발현 연구에 가장 널리 사용되고 있는 primary sheep polyclonal ChAT antibody(Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE, USA)를 사용한다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% 토끼 혈청과 0.1% sodium azid(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 2000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72시간동안 지속적으로 흔들며 주면서 배양한다. 그 후 3번 이상 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간동안 실온에서 2% 토끼 혈청을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 반응시켰다. PBST로 3번 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent(Vector)에 담구었다. PBS로 몇 번 헹군 다음 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제로서 diaminobenzadine(DAB)을 사용하여 발현시켰다.

모든 처리를 거친 뇌 조직을 gelatine-coated slide에 고정하고 공기를 제거하면서 커버글라스를 덮은 후 현미경으로 관찰하였다. 200 \times 200 μ m 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 200배로 확대하여 내측 중격과 해마에서 ChAT-immunoreactive 신경세포의 수를 측정한다.

(6) 기억장애 치매모델에서 Morris water maze를 이용한 공간지각능력의 변화 측정결과

획득시행의 2일, 4일째 Normal군에 비해 TMT 투여군은 도피대를 찾는데 걸리는 시간이 유의하게 증가됨을 알 수 있다 (Fig. 64). 또한, 후삼 투여군에서 2일째(P<0.01) TMT 투여군에 비해 도피대를 찾아가는 시간이 유의하게 줄어들음을 알 수 있다. 3일(후삼 100; p<0.01), 4일

째 ($p < 0.01$)로 흑삼 투여군에서 TMT투여군보다 유의하게 도피대를 찾는 시간이 줄어들었음을



<Fig. 64> Comparison of acquisition performance on the Morris water maze test among the five groups of the rats.

Naïve normal rats, n=8; Normal group, TMT injection and saline treated rats, n=8; Control, TMT injection and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100 group, TMT injection and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400 group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. (*, $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of Normal group. +, $P < 0.05$, ++, $P < 0.01$ as compared with the corresponding data of Control group).

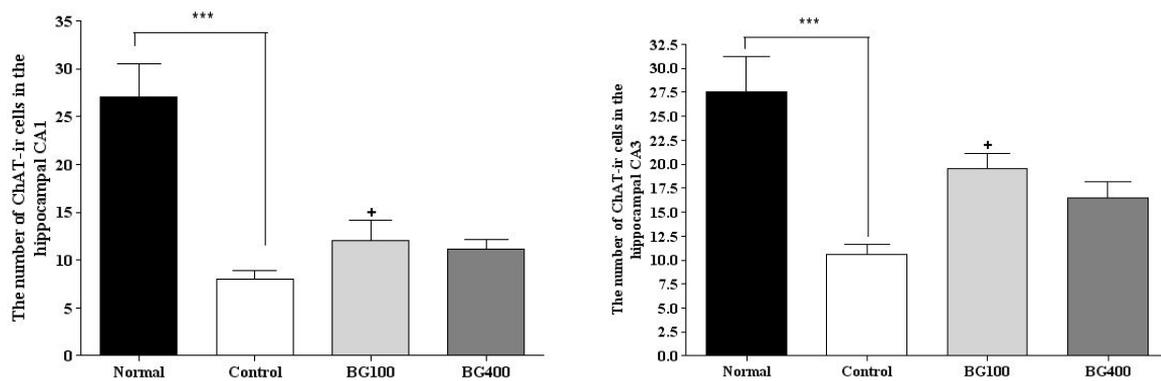
알 수 있다. 이는 흑삼투여가 TMT 투여로 인한 기억장애 모델에서 기억보호 및 기억증진 효과가 있음을 시사한다.

(7) 치매 동물모델에서 Choline Acetyltransferase (ChAT)를 해마내의 신경세포 발현의 변화

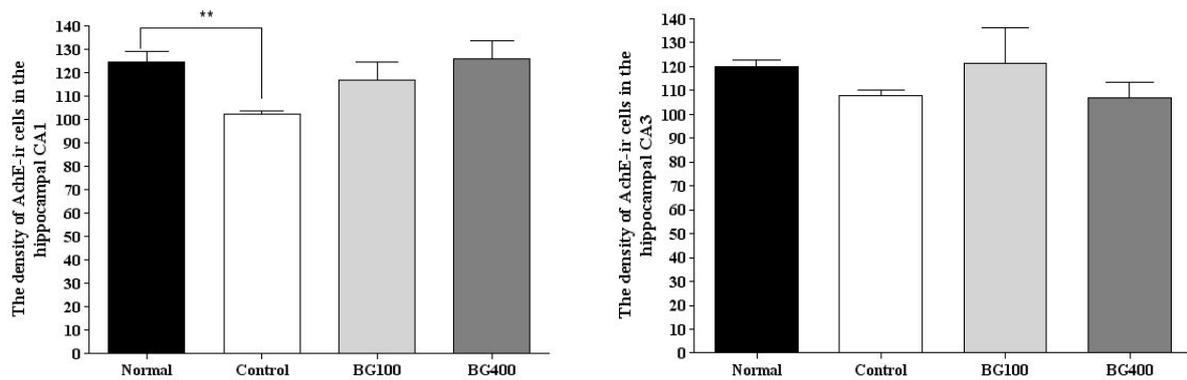
ChAT염색을 이용한, 뇌조직의 분석결과는 해마의 CA1부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 27.0 ± 3.5 , 8.0 ± 0.9 , 12 ± 2.2 , 11.1 ± 1.1 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$) (Fig. 65). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 120%정도 증가하였지만, 통계적인 차이는 보이지 않았다. 또한, 해마의 CA3부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 27.5 ± 3.7 , 10.6 ± 1.1 , 19.5 ± 1.6 , 16.5 ± 1.7 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$). 하지만, BG 투여군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 170%~200% 증가하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

(8) 치매 동물모델에서 Acetylcholinesterase (AChE)의 해마내의 신경세포 발현의 변화

AChE염색을 이용한, 뇌조직의 분석결과는 해마의 CA1부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 124.4 ± 4.6 , 102.4 ± 1.5 , 116.8 ± 7.9 , $125.9.1 \pm 7.6$ 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 AChE의 해마내 density가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$) (Fig. 66). 하지만, BG100+ISCH군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 120%정도 증가하였지만, 통계적인 차이는 보이지 않았다. 또한, 해마의 CA3부위에서는 Normal, SAL+ISCH, BG100+ISCH, BG400+ISCH군이 각각 27.5 ± 3.7 , 10.6 ± 1.1 , 19.5 ± 1.6 , 16.5 ± 1.7 개로, Normal군에 비해 SAL+ISCH군은 유의하게 신경세포의 개수가 줄어들었음을 알 수 있다 ($P < 0.05$). 하지만, BG 투여군에서는 SAL+ISCH에 비해, 신경세포의 개수가 약 170%~200% 증가하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.



<Fig. 65> Number of choline acetyltransferase (ChAT) immunostained nuclei in the different hippocampal areas of the experimental groups after behavior test. Naïve normal rats, n=8; normal group, TMT injection and saline treated rats, n=8; Control, TMT-injection and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100 group, TMT-injection and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400 group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. (***)P<0.001 as compared with the corresponding data of Normal group. +, P<0.05 as compared with the corresponding data of Control group).



<Fig. 66> Density of acetylcholinesterase(AchE) immunostained nuclei in the different hippocampal areas of the experimental groups after behavior test. Naïve normal rats, n=8; normal group, TMT injection and saline treated rats, n=8; Control, TMT-injection and black ginseng(100mg/kg) treated rats, n=8; BG100 group, TMT-injection and black ginseng(400mg/kg) treated rats, n=8; BG400 group. Measures of one-way ANOVA and followed by LSD test. **P<0.01 as compared with the corresponding data of Normal group).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발의 최종목표

- ◆ 비만/당뇨 예방 및 치료용 고기능, 고효능 가공인삼 제품개발
- ◆ 면역증강에 의한 암 예방 및 치료용 고기능, 고효능 가공인삼 제품개발
- ◆ 뇌허혈증/치매 예방 및 치료용 고기능, 고효능 가공인삼 제품개발
- ◆ 유효지표물질의 유도체 합성에 의한 효능 증진 및 대량합성
- ◆ 인삼 가공법 변화에 따른 인삼 지표물질 변화의 분석 및 성분 효능 현실화
- ◆ 고기능 인삼의 개별인증화를 위한 지표물질의 과학적 효능 확립

제2절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> •인삼의 가공방법의 변화에 따른 구성성분의 변화 분석 •인삼 구성성분의 세포내 비만 및 당뇨 억제활성 분석-I 	<ul style="list-style-type: none"> •인삼 구성성분의 분리 및 구조 분석 •인삼구성성분의 조합 •인삼 구성성분의 조합 변화에 따른 세포내 Akt, AMPK, ACC 인산화 유도 측정 •비만세포의 glucose uptake 유도활성 측정 	<p>화학적 분석 및 세포내 기작 분석</p>
	<ul style="list-style-type: none"> •면역학적 유용성 해석에 필요한 실험법의 확립 •면역증강 혹은 면역 억제활성 유무의 판정 •Cytokine-inducer로서의 응용 가능성 탐색 •비특이적 면역에 대한 면역증강효과의 검증 (macro-phage 및 natural killer cell) •암세포 운동성의 억제 활성 규명 •암세포의 부착 (adhesion), 이동에 대한 억제활성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> •시료의 확보 및 투여량 결정 •in vitro/in vivo 실험법 확립 •면역세포의 기능조절에 대한 유효성 해석 •면역조절 활성별 유효성 판정 (기능, cytokine 등) •Screening에 사용할 면역세포의 확보 •면역세포의 활성화에 기여하는 성분의 선별 (T세포, macrophage, NK세포 등) •T세포/macrophage로부터 cytokine분비를 유도하는 물질의 선별 	<p>In vivo 및 in vitro 실험계에서의 활성 확인</p>
	<ul style="list-style-type: none"> •전뇌허혈 동물 모델 확립 및 	<ul style="list-style-type: none"> •2VO 전뇌허혈 중풍 모델 확립 	<p>동물모델</p>

	가공인삼의 기억및 운동증진 효능검증	<ul style="list-style-type: none"> •4VO 전뇌허혈 중풍 모델확립 •다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의 동물 모델 확립. •신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 •전뇌허혈모델에서 가공인삼의 효능검증 	확립 및 효능검증
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> •인삼 구성성분의 세포내 비만 및 당노 억제활성 분석-II •인삼 우수 지표물질의 유도체 합성 •합성 유도체의 세포내 비만 및 당노 억제활성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> •화학합성에 의한 유도체 대량생산 •유도체 및 인삼 지표물질의 조합 변화에 따른 세포내 Akt, AMPK, ACC 인산화 유도 측정 •유도체 및 인삼 지표물질의 조합 변화에 따른 비만세포의 glucose uptake 유도활성 측정 	화학합성 세포내 기작 분석
	<ul style="list-style-type: none"> •Apoptosis 유도활성 및 작용기전의 해석 •in vivo에 있어서의 종양세포의 증식억제 활성 해석 •암전이억제 활성의 해석 (예방적 효과 및 치료효과) •점막면역에 대한 증강효과의 검토 •면역강화 기능 최적화 시스템의 구축 •면역세포와의 상호작용에 관한 연구 •종양유도성 혈관신생에 대한 억제효과 해석 	<ul style="list-style-type: none"> •Apoptosis연구 실험 개시 •암전이억제 모델의 확립 •암세포의 운동성 억제에 관련하는 세포내 기전해석 •Apoptosis 유도작용의 해석 •항암제와의 활성비교 및 병용투여에 의한 시너지 효과 •암세포의 운동성 억제에 관련하는 생화학적 기전 해석 	기전해석
	<ul style="list-style-type: none"> •치매동물모델에서 가공인삼의 인지개선 효능검증 	<ul style="list-style-type: none"> •MS내 ibotenic acid 및 192-saporin-induced 치매 모델 확립 •다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의 동물 모델 확립. •신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 •치매동물모델에서 가공인삼의 효능검증 	치매 동물모델 확립 및 효능검증
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> •가공인삼의 비만 및 당노 치료효과 동물 실험 •합성 유도체의 비만 및 당노 치료효과 동물 실험 	<ul style="list-style-type: none"> •정상 식이군과 고지방 식이군의 가공인삼과 지표물질, 유도체 처치에 따른 체중의 변화 •정상 식이군과 고지방 식이군의 가공인삼과 지표물질, 유도체 	in vivo mouse 동물모델

		<ul style="list-style-type: none"> 처치에 따른 식이섭취의 변화 정상 식이군과 고지방 식이군의 약물 처치에 따른 부위별 지방량의 변화 정상 식이군과 고지방 식이군의 약물 처치에 따른 각 처치군의 시상하부에서의 NPY, CCK의 발현정도 	
	<ul style="list-style-type: none"> 항암제 개발의 가능성 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 독성시험 - 약리활성의 최적화 기존의 항암제와의 병용투여에 의한 시너지 효과 및 독성 경감효과 (in vitro 및 in vivo실험) 산업적 응용 가능성의 타진 	<ul style="list-style-type: none"> 종양증식 및 전이억제 활성분획의 선별 암전이 억제 성분의 최적투여조건의 확립 일반약리 및 독성 시험 기존 항암제와의 병용 투여시 기존 항암제의 독성경감 효과 각종 종양주에 대한 감수성의 확인 효능의 극대화 방안 검토 	산업적 활용 가능성 타진
	<ul style="list-style-type: none"> 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합체의 in vivo 뇌허혈 및 치매 동물모델에서의 활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> 신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 전뇌허혈모델에서 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합체의 효능검증 치매동물모델에서 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합체의 효능검증 	지표물질 유도체 동물실험

제3절 연구목표 달성도

세부과제명	세부연구목표 및 평가 착안점	달성도 (%)	연구개발 수행내용
비만 및 당뇨 예방 및 치료용 고효율 가공인삼 제품개발에 관한 연구	가공인삼의 지표성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 흑삼의 구성성분을 HPLC, LC-Mass를 통해 확인하였음 각 지표물질의 흑삼 내 존재량을 분석하였음 Rg1 유도물질 1개 발굴 (신규추정) 흑삼에서 비사포닌 계열의 활성물질 확인
	지표성분의 세포내 비만 및 당뇨 억제 활성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 흑삼추출액과 순수분리된 물질을 L6 지방세포에서 Akt, AMPK 단백질 인산화 조절기능 분석

			<ul style="list-style-type: none"> • 32D^{IR} 세포에서 흑삼에 의한 인슐린 수용체의 인산화 분석 • PTP1B와 pancreatic lipase 기능 억제활성 분석 • 당뇨 신호전달의 소포체스트레스 (ER-stress) 조절기능 분석
	흑삼 성분의 비만, 당뇨 치료효과 세포 및 동물 실험	100	<ul style="list-style-type: none"> • 비만 마우스 모델에서의 먹이 섭취 및 혈당 분석 • 흑삼 추출물의 경구투여에 따른 혈당조절 효과 • 흑삼 추출물 경구투여에 의한 당내성 억제활성
	흑삼 성분에 의한 대사성 증후군 개선 효과	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 성분의 체력증강 및 대사량 증강 활성 측정
고기능성 가공인삼의 면역기능 치료 효과 증진에 관한 연구	흑삼성분에 의한 면역증강 활성의 유무 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 투여에 의한 비특이적 면역증강효과 측정 • 흑삼투여 마우스 비장세포의 활성화 해석 • in vitro실험계에서 macrophage 및 비장세포에 대한 증식반응 유도활성 측정
	흑삼성분의 항암활성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> • in vitro에서의 종양세포에 대한 항암활성 측정 • in vivo모델에서 암전이 억제활성 측정
	면역조절에 의한 알러지 억제 활성의 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> • OVA알러지 모델에서 OVA에 대한 IgE유도 억제효과 측정
	흑삼 추출물에 의한 수지상세포 활성화 유도활성	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 추출물의 수지상세포 활성화 유도효과 측정 (증식유도, 사이토카인 및 케모카인의 분비 측정)
	흑삼성분에 의한 항염증 및 면역억제 활성	100	<ul style="list-style-type: none"> • 대식세포의 염증반응에 대한 항염증 활성 분석 (사이토카인 분비 측정) • T세포 활성화에 대한 면역 억제 활성 측정 (증식반응, 사이토카인 측정)
	흑삼 추출물의 항암 활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> • In vitro실험계에서 암세포에 대한 직접독성 조사 • In vivo모델에서 종양증식 및 혈관신생 억제효과 측정

			<ul style="list-style-type: none"> • In vivo 전이모델에서 암전이억제 효과 검토
	항암활성 관련 면역학적 기전해석	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 추출물에 의한 NK세포의 암세포 살해 활성 증가 조사 • 경구투여에 의한 면역세포 활성화 조사
뇌졸중 및 치매 예방과 치료효과 증진용 고효능 가공인삼에 관한 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 전뇌허혈 동물 모델 확립 및 가공인삼의 기억및 운동증진 효능검증 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 4VO 전뇌허혈 중풍 모델 • 다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의 동물 모델 확립. • 신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 • 전뇌허혈모델에서 가공인삼의 효능검증
	<ul style="list-style-type: none"> • 치매동물모델에서 가공인삼의 인지개선 효능검증 	100	<ul style="list-style-type: none"> • MS내 ibotenic acid 및 192-saporin-induced 치매 모델 확립 • 다양한 행동학적 검사를 통한 학습 및 기억장애의 동물 모델 확립. • 신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 • 치매동물모델에서 가공인삼의 효능검증
	<ul style="list-style-type: none"> • 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합제의 in vivo 뇌허혈 및 치매 동물모델에서의 활성 검증 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 신경 화학적 방법에 의한 뇌세포 염색 • 전뇌허혈모델에서 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합제의 효능검증 • 치매동물모델에서 가공인삼 지표물질 유도체 및 복합제의 효능검증

제4절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 과학·기술적 측면

- ◆ 약효가 강화된 새로운 고기능성 인삼의 제조 방법 확립: 면역증강, 항암, 비만억제, 항당뇨, 항산화, 뇌질환 개선 및 심혈관계 질환 개선 효과
- ◆ 항암, 비만억제, 항당뇨, 항산화, 뇌질환 개선 및 심혈관계 질환 개선 효과를 나타내는 인삼 구성성분 및 이의 유도체의 대량 생산 방법 확립
- ◆ 가공인삼, 가공인삼 유래 ginsenoside 및 복합제들의 대량 생산을 통한 신경세포의 보호효

과 및 기억 증진효능에 대한 과학적이고 체계적인 규명에 따른 치료제 개발과 제조 방법 확립

◆ 신제품 개발에 따른 고기능성 고부가가치 창출로 국내 인삼산업의 활성화 및 농가소득에 커다란 기여를 할 것임

◆ 인삼의 종주국으로서의 위상을 되찾기 위하여 인삼 가공분야에 새로운 방향성을 제시함

◆ 성공적인 연구결과에 대한 특허권 획득 및 산업체에 기술이전

◆ Chemical biology를 이용한 bioprobe로서 난치성질병 유전자/단백질 발굴에의 이용: 인삼의 가공법의 변화에 따라 다른 종류의 구성성분이 생성되게 된다. 따라서, 이들 각 성분중에서도 활성이 뛰어난 물질은 화학합성에 의해 대량생산을 하게될 예정인데, 이들은 최근 일본과 미국 등지에서 생물학에 이용되고 있는 bioprobe로 활용되어 난치성 질병에 관여하는 신규 단백질과 유전자들을 찾아내는데 유용하게 사용될 수 있음

◆ 식품첨가물 혹은 의약품 보조제로도 사용될 수 있다: 기능성식품으로서 약물치료제 개념의 식품으로 사용될 수 있다. 이는 엑소리제가 일반의약품으로서 분류되나 미국에서는 식품으로도 사용되고 있는 경우와 마찬가지로, 본 연구개발품도 전혀 부작용이 없이 식품으로 사용될 수 있을 것이다.

◆ 다른 질병치료제와의 병용요법: 최근들어 단일물질보다는 병용요법에 의한 질병치료 방법이 빈번하게 이루어지고 있으므로, 본 연구개발결과의 기능성식품도 다른 당뇨병 치료제 등과 함께 사용될 경우 매우 낮은 부작용과 함께 훨씬 높은 치료율을 보일 것으로 판단된다.

◆ 제품화시에 젤 타입 혹은 고형화 제제로 다양하게 만들어 연령과 기호에 따라 선택할 수 있도록 변화시킬 수 있다.

◆ 최근 고령인구의 증가와 환경오염 그리고 사회적 스트레스의 증가 등으로 인한 면역저하와 면역교란 등에 의해 암, 알러지, 아토피 등 면역학적 질환이 크게 증가하고 있음. 흑삼과 같이 면역세포의 활성화를 유도하고, 염증작용을 억제하며, 또한 항암활성을 갖는 기능성 소재의 발굴은 이러한 면역학적 질환의 예방과 치료에 크게 기여할 수 있음.

◆ In vivo실험모델을 중심으로 흑삼과 각종 면역세포와의 상호작용과 활성화에 대해 해석하였으며, 또한 경구투여에 의한 항암활성을 제시하였으므로, 향후 면역증강 및 항암 활성을 가지는 의약소재 혹은 기능성 식품소재로서의 개발이 크게 기대됨.

◆ 선천면역세포(수지상 세포, 대식세포, NK세포 등)의 기능조절과 항염증 작용을 조절하는 효과가 있으므로, 선천면역의 기능조절과 염증반응의 제어에 관련한 연구 분야에 적용 가능한 새로운 천연소재로서 활용할 수 있음.

- ◆ 치매로 인한 기억장애모델에서 학습과 기억기전 이해와 더불어 기억증진제 개발을 위한 동물모델 확립이 시급한 시점에서, 이런 문제점 해결을 위해 학습과 기억에 관련된 중요 신경 회로를 규명하고, 이에 근거한 실험적 기억, 학습 연구 동물 모델 확립하였음.
- ◆ 표준화된 동물모델에서의 효과 검증된 천연재료를 이용하여, 기능성 신소재의 응용·제품화 할 수 있는 가능성을 열었음.

2. 산업·경제적 측면

- ◆ 최근 건강에 대한 관심증가와 인삼의 효능·효과 등이 널리 알려지면서 인삼 소비층이 동남아, 유럽 등 전세계로 확대되는 추세이기 때문에 인삼의 수출범위를 중화권 중심에서 미주권, 유럽권, 동남아권 등의 신 시장으로 확대하여 한국인삼의 세계 수출 주력시장 기반 구축이 필요함.
- ◆ 인삼 주요 재배국은 중국, 미국, 캐나다 등이며, 미국·캐나다는 건강음료, 캡슐, 타블렛, 엑기스 등 다양한 제품을 개발 수출하고 있으며, 중국은 전세계 인삼의 65%이상 생산하고 있으나 현재까지는 국내 인삼제품을 모방하는 수준이며 최근 독자적으로 인삼 브랜드 개발 및 백삼·홍삼 및 백삼·홍삼 등 다양한 제품에 박차를 가하고 있음
- ◆ 신제품 개발에 따른 고부가가치 창출로 국내 인삼산업 활성화 및 농가소득 증대: 2005년도 기준 국내 인삼 생산액은 수삼 기준 시 5,800억원 규모이나 가공품을 전망은포함할 경우 1조6,000억원 규모로 부가가치 창출이 용이한 품목으로 신제품 개발 시 수출시장 확대 밝음
- ◆ 비만치료제 의약품의 경우만 해도 향후 2012년경엔 120억불의 세계시장 수요가 예상되고 있고 또한, 각각의 대표적 품목을 볼 때에도 2010년경에는 lipase 저해제인 Orlistat (Xenical)의 경우만 해도 20억불을 차지할 것으로 예상되어 비만치료제 중에서도 매우 큰 비중을 차지함을 알 수 있어, 본 연구팀에 의해 개발되는 가공인삼은 그 효능이 뛰어날 경우 현재의 시장을 잠식할 수 있는 가능성이 매우 높다.
- ◆ 국내의 경우만 해도 의약분업 이후 시장이 갑자기 커지고 있는 비만치료제는 3개사 제품의 매출규모가 발매 1년도 안된 상태에서 약 300억원대에 육박하였으며 2006년엔 약 400억원대를 기록하고 있다. 특히 일반의약품인 엑소리제는 33억원대를 기록하고 있어 향후 비만치료제에 있어서 기능성식품의 잠재력과 무한한 성공 가능성을 내포하고 있어 앞으로 볼륨이 더욱 확대 될 것으로 전망되고 있다.
- ◆ 우리나라의 전통식품인 인삼을 이용하여 면역기능과 항암활성을 높이는 고기능성 흑삼을 효능별로 제품화하여 산업화할 경우 국내는 물론 해외로의 수출도 기대됨.

- ◆ 면역기능의 항상성 유지와 종양에 대한 억제 활성을 가지는 천연 가공소재이므로 기능성 식품으로서는 물론 천연물 신약으로의 개발이 가능하며, 흑삼소재 제품의 보급을 통해 국민보건 향상에 기여할 수 있음.
- ◆ 신경세포 손상약물과 다양한 처치 방법을 통한 기억장애 동물모델 확립과 기억증진 후보물질검증을 하였고, 검증된 후보물질은 통해 고부가가치상품을 창출해 국가경쟁력을 재고할 수 있으며, 국민경제에 이바지하고 삶의 질과 만족도를 향상시킬 수 있음
- ◆ 유효성과 안정성이 확보된 제품의 개발로 국민건강증진에 이바지하여 수출을 통한 스타상품을 개발할 가능성을 열었음

3. 사회·문화적 측면

- ◆ 최근 고령인구의 증가에 따라 면역기능 저하와 면역학적 염증에 관련된 질환이 크게 증가하고 있으나, 흑삼을 통해 이러한 면역학적 질병의 예방과 증상개선이 가능하여 삶의 질을 향상시키는데 기여할 수 있음.
- ◆ 항암활성을 갖는 천연소재이므로, 화학요법과 방사선 치료와 같은 암환자에게 부작용이 수반되는 종양 치료법에 병용요법으로 도입함으로써 암치료의 효율을 높이고 부작용을 최소화하는 새로운 암치료법에 응용할 수 있음.
- ◆ 2015년 우리나라 65세 이상 치매노인은 9.0%으로 늘어날 것으로 전망하여 이로 인한 개인과 환자의 고통과 경제적 생산성의 손실 및 사회문제 또한 매우 심각할 전망
- ◆ 효과적인 기억증진물질을 위하여 국가 및 개인기업 차원의 관심 있는 투자를 늘릴 기회를 창출.
- ◆ 우수한 연구결과를 도출하여 해외 학회지에 발표하고 국내 언론에 홍보함

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문 계획

발표연도	제목	저자	학술지명	국내외 구분
2011	Inhibitory effect of oral administration of Sangwhang mushroom (<i>Phellinus linteus</i>) grown on germinated brown rice on experimental lung metastasis and tumor growth in mice	T Jeon, SG Hwang, YH Jung, HS Yang, NY Sung, J Lee, DK Park, YC Yoo	<i>Food Sci. Biotechnol.</i>	국외 SCIE
2011 (투고중)	Protective effect of ginsenoside-Rb2 on rotavirus infection	A Fukushima, J Lee, SR Park, I Azuma, YC Yoo	<i>Arch. Pharm. Res.</i>	국외 SCIE
2011 (계획)	Anti-diabetic effect of black ginseng extract on alloxan-induced diabetic mice	YH Jung, NY sung, HS Yang, J Lee, SR Park, HJ Shin, YC Yoo	<i>J. Med. Food</i>	국외 SCI
2011 (계획)	Protective effect of black ginseng against transient focal ischemia-induced neuronal damage in rats	박현정, 심현수, 김경수, 심인섭	<i>Korean Journal of physiology and pharmacology</i>	국내
2011 (계획)	Neuroprotective effect of black ginseng against TMT-induced memory deficient rats	박현정, 심현수, 김경수, 심인섭	<i>한국뇌신경과학회</i>	국내
2011 (계획)	Anti-tumor activity of oral administration of black ginseng extract to inhibit tumor growth and metastasis in mice	YH Jung, NY sung, HS Yang, J Lee, SR Park, HJ Shin, YC Yoo	<i>Lab. Anim. Res.</i>	국내
2010	Modulation of E-cadherin expression by K-Ras; involvement of DNA methyltransferase-3b	김선옥, 하룡, 정숙정, 이희구, 장경립, Hiroyuki Osada, Mira Jung, 안종석, 김보연	<i>Carcinogenesis</i>	국외 SCI
2009	ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress	김선옥, 권오송, 정숙정, 김민수, 이희구, Hiroyuki Osada, Mira Jung, 안종석, 김보연	<i>FEBS Lett</i>	국외 SCI
2009	Effect of ginseng total saponin on impairment of learning and memory and the central cholinergic system after cerebral ischemia in the rat.	이보미, 한승무, 김경수, 심인섭	<i>ISAG</i>	국외

2. 지식재산권 확보계획

발표연도	발명 명칭	발명자	국내외 구분
2009	Rg3 및 Rh2의 함량이 증가된 흑삼 및 그의 제조방법	김보연, 이상구, 신현중	국내
2010	항균활성을 갖는 신규한 환형 펩타이드계 화합물 및 이의 용도	김보연 외 7명	국내
2011	흑삼 건조 분말 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방용 조성물	심인섭, 김보연, 이상구, 유영춘, 신현중, 박현정, 심현수	국내
2011년 7월초 출원번호 부여	면역증강 및 항염증 효과를 갖는 흑삼 제조법	유영춘, 심인섭, 김보연, 신현중, 이상구	국내

3. 인력지원

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
7	1	6			2	5	4	3	

4. 활용계획

- 4건의 국내특허 출원하였음. 특허출원에 이어 흑삼의 개별인증화를 받을 계획임
- 참여기업인 금산천년홍삼에서 사업 종료 3년 이내에 기술이전을 받아 향후 5년 이내에 사업화를 목표로 하고 있으며 현재 참여기업이 재배하고 있는 금산의 인삼을 적극 활용할 계획임

5. 산업화를 위한 보완 대책

- 제품 표준화 및 안정성 평가:

흑삼 제조 방법(열처리 시간, 온도 등)에 따른 각 성분의 표준화와 안정성을 검토하여야 하나 본 연구사업 기간 중에는 단지 Rg1 등 몇가지의 물질에 대해서만 조사를 하였음. 따라서 향후 흑삼 성분의 생리학적 기초연구 자료를 더욱 수집하여 후속 연구사업을 통해 표준화와 안정성 평가를 수행하고자 함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

스위스의 파마톤사에서는 과학적으로 임상효과가 입증된 인삼추출물 G115, 항산화 비타민, 미네랄, 셀레늄 등 20가지의 유효성분을 함유한 종합영양제를 생산하고 있다. 세계 시장에서 1-2억불의 높은 매출을 기록하고 있으며, 항상 일정하게 진세노사이드의 유효성분 함량을 4%로 유지하는 품질관리를 실시하고 있다. 이는 전세계 80여개국에서 판매되고 있는 미국 FDA 승인을 받은 유럽에서 판매량 1위로서 현대인의 신체적인 능력을 증가시키고 스트레스로 인한 탈진과 피로를 덜어주기 위해 만들어진 종합영양제 개념이다. 또한 미국, 캐나다, 중국 등지에서도 건강음료, 캡슐, 타블렛, 엑기스, 차 등 다양한 제품들이 개발 중에 있으며, 미국 FDA는 인삼을 GRAS(Generally Recognized As Safty)[일반적으로 안전한 식품]으로 분류하여 일반 식품점에서도 구입할 수 있도록 저가의 상품으로 개발하고 있다. 한편 중국은 1980년대 중반부터 정부의 국가적 지원이 확대되면서 인삼 추출물을 당뇨병과 심장병 치료 주사제로 사용하고, ‘삼일캡슐’이라는 항암제로도 개발하였는데, 이는 인삼 약효 성분을 밝혀내고 성분의 도달 지점을 과학적으로 규명한 결과였다. 이 외에도 동북아권에서 중국, 홍콩, 대만, 일본 등의 국가에서 과학적 접근법으로 인삼의 세계화에 앞장서고 있으며, 멕시코와 칠레 등의 남미권 국가들과 이태리, 프랑스, 독일 등의 유럽권 국가들, 그리고 인도, 이집트, 호주 등의 다양한 나라들에서 인삼 연구를 시작 혹은 성황기에 있어 향후 기능성 식품 혹은 약재로서의 인삼의 개발 가치가 더욱 높아질 것으로 예상되고 있다.

제 7 장 참고문헌

1. Lee SR, Kim MR, Yon JM, Baek IJ, Park CG, Lee BJ, Yun YW, Nam SY. (2009). Black ginseng inhibits ethanol-induced teratogenesis in cultured mouse embryos through its effects on antioxidant activity. *Toxicol In Vitro*, 23(1), 47-52.
2. Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Lee MR, Li Z, Li JJ, Sung CK. (2009). Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50(1), 15-22.
3. Kim YO, Kim HJ, Kim GS, Park HG, Lim SJ, Seong NS, Ham YW, Lee SD, Jang KH, Jung KH, Chung JH, Kang SA. (2009). *Panax ginseng* protects against global ischemia injury in rat hippocampus. *J. Med. Food.* 12(1), 71-76.
4. Song, X, Bao, S, Wu, L. (2009). Ginseng stem-leaf saponins (GSLs) and mineral oil act synergistically to enhance the immune responses to vaccination against foot-and-mouth disease in mice. *Vaccine*, 27(1), 51-55.
5. Quan FS, Compans RW, Cho YK, Kang SM. (2007). Ginseng and *Salviae* herbs play a role as immune activators and modulate immune responses during influenza virus infection. *Vaccine*, 25(2), 272-282.
6. Rivera E, Ekholm Pettersson F, Inganäs M, Paulie S, Grönvik KO. (2005). The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. *Vaccine*, 23(46-47), 5411-5419.
7. Liu J, Wang S, Liu H, Yang L, Nan G. (1995). Stimulatory effect of saponin from *Panax ginseng* on immune function of lymphocytes in the elderly. *Mech Ageing Dev*, 83(1), 43-53.
8. Shah ZA, Gilani RA, Sharma P, Vohora SB. (2005). Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats. *J. Ethnopharmacol.* 101(1-3), 299-307.
9. Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G. (1999). *Panax ginseng* administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med*, 65(7), 614-619.
10. Wen TC, Yoshimura H, Matsuda S, Lim JH, Sakanaka M. (1996). Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 91(1), 15-22.

보완요구사항에 대한 조치

보완 사항	보완 내용
<p>○ 최종보고서의 수정·보완 사항: 주요 효능물질의 기능성 인정 연구의 객관적 규격화 연구보완으로 연구물질의 산업화를 위한 준비의 세 부적 실용화 연구진행이 이루어질 수 있기를 바람.</p> <p>산업화를 위해 선행되어야 할 부분 중 제품 표준화 및 안전성에 대한 평가 등에 대한 보완 요망. 구체적 인 활용 계획 명시 요망. 실험 데이터 표기 부분 확인 수정 요망.(시료 투여량 등)</p>	<p>○ p140에 활용계획과 산업화를 위한 대책에 좀 더 상세히 기술하였음</p> <p>○ 실험데이터 표기는 대부분 잘 기술되었으나 비만, 당뇨 연구결과의 몇 그림에서 부족한 설명이 있어 시료 농도, 처리 시간 등을 보충하여 기술하였음</p>

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.