

발간등록번호

11-1541000-001236-01

최 종 보 고 서

골다공증 치료 및 예방용 고효율 흑삼 제품 개발
(Development of high potency ginseng products for
therapeutic prevention of osteoporosis)

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “골다공증 치료 및 예방용 고효율 흑삼 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 3월 02일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김보연

연 구 원 : 안종석

연 구 원 : 이상구

연 구 원 : 김종평

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 : 배재대학교

협동연구책임자 : 이준원

참 여 기 업 : 천년금산홍삼

참여기업 대표 : 신현중

요 약 문

I. 제 목

골다공증 치료 및 예방용 고효율 흑삼 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 골다공증은 연령이 많아지게 됨에 따라 자연적으로 나타나지만, 특히 여성의 경우 폐경기 등 호르몬 분비의 이상에 의해서도 매우 심화됨
- 남성의 경우도 여성보다는 덜하나 노화와 함께 대부분 골다공이 생기게 되며 질병이나 면역계통의 약화를 통하여도 젊은 층에서도 나타나는 경우가 있어, 골다공증 치료제 개발에 관한 연구는 국내뿐만 아니라 전 세계적으로도 아무리 강조해도 지나치지 않음
- 흑삼은 우리나라에서 강점을 지니는 정통식품이며, 흑삼이 가지고 있는 생리활성 물질의 활성화와 섭취시 장내 흡수율을 높이며 신체의 생리기능을 높이고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으나 흑삼 가공식품을 이용한 생리적 기능과 생리물질에 대한 연구는 미흡한 상태이다
- 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 인삼 성분의 효과를 분석하여 이를 토대로 하여 골다공 치료용 고기능 인삼제품의 개별인증화 및 해외수출이 절실히 필요함

III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 흑삼의 골다공증 저해효과 생리활성 물질의 분리 및 구조분석
 - Creatine kinase assay법 확립 및 저해물질 탐색
 - Cell-based TRAP 염색법과 in vitro TRAP 탐색법 수립
 - 골다공증 저해활성의 흑삼성분 구조분석

(2) 파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구

- Salubrinal을 이용한 ER-stress와 골다공증 조절관계 규명
- Tunicamycin을 이용한 파골세포 성장 저해활성 규명
- Ginsenoside 화합물의 파골세포 분화 저해활성 규명

(3) 마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 정제 물질의 특성 연구

- 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델의 확립
- 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2의 효과 분석
- 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 salubrinal의 효과 분석

IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

(1) Creatine kinase assay법 확립 및 저해물질 탐색

In vitro에서 creatine kinase inhibitor screening system을 확립하여 흑삼을 fraction 별로 효소활성을 측정하였음

(2) Cell-based TRAP 염색법과 in vitro TRAP 탐색법 수립

쥐 골수세포인 bone marrow cell을 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하고 분화시켜 TRAP staining을 하여 multinuclear 파골세포 (osteoclast)를 조사하였음

(3) 골다공증 저해활성의 흑삼성분 구조분석

흑삼 분획물을 TRAP를 이용하여 골다공증 저해활성을 분석한 결과 13개의 활성물질을 분리하였고 이 중에서 3개종이 사포닌 계열인 Rg2, Rh1, Rd와 분자량이 일치하였고 나머지 10개종은 비 사포닌 계열 물질일 가능성도 있음

(4) Salubrinal을 이용한 ER-stress와 골다공증 조절관계 규명

ER-stress를 통하여 CHOP 발현을 유도하고 그 결과 NFATc1과 Mitf의 발현이 줄어 골다공증이 저해됨을 확인

(5) Tunicamycin을 이용한 파골세포 성장 저해활성 규명

ER-stress 유도물질인 tunicamycin은 파골세포 사멸을 유도함으로써 골다공증 치료제로 사용

될 수 있는 가능성을 제시함

(6) Ginsenoside 화합물의 파골세포 분화 저해활성 규명

Rg1과는 별도로, 인삼의 Rh2 성분이 골다공증을 저해함을 파골세포 분화과정의 단백질 발현 등을 통해 규명하였음

(7) 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델의 확립

마우스 자궁에서 난소를 적출하여 골다공증 유발된 OVX 쥐를 제작하는데 성공하였음

(8) RANKL을 주입한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2의 효과 분석

골다공증 쥐의 BMD(골밀도)를 측정한 결과 RANKL에 의해 현저히 감소된 골밀도가 Rh2에 의해 다시 매우 회복됨을 확인하였음

(9) RANKL을 주입한 골다공증 동물모델에서 salubrinal의 효과 분석

골다공증 쥐의 BMD(골밀도)를 측정한 결과 RANKL에 의해 현저히 감소된 골밀도가 salubrinal에 의해 다시 매우 회복됨을 확인하였음. 또한 CT로 뼈의 단면을 촬영하여 BMD가 salubrinal에 의해 다시 증가됨이 확인되었음

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

-국외논문 4편이 게재되었고, 1편의 논문이 Bone에 투고 중에 있음

-3건의 국내특허 출원

-특허출원에 이어 흑삼의 개별인증화를 받을 계획임

-참여기업인 금산천년홍삼에서 기술이전을 받아 향후 5년 이내에 사업화 목표

SUMMARY

I. Title

Development of high potency black ginseng products for therapeutic prevention of osteoporosis

II. Objective and importance of research

○ Osteoporosis is naturally occurring with age, particularly by hormonal imbalance after menopause in women

○ Although less than in women cases, osteoporosis could be easily found in men with age and also in young people when disrupted by diseases and immunological disorders. Thus, R&D for anti-osteoporosis therapeutics should be increased all over the world

○ Black ginseng could be a representative medicinal food in Korea but investigation on its biophysical function and components is not progressively going on compared to its enormous value for human health

○ 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) Structural identification of black ginseng components having anti-antiosteoporosis activity

- Establishment of creatine kinase assay and inhibitor screening
- Establishment of cell-based TRAP and in vitro assay systems
- Structural identification of anti-osteoporosis black ginseng components

(2) Anti-osteoporosis effect of compounds

- Effect of salubrinal on osteoporosis in relation with ER-stress
- Effect of tunicamycin on osteoclast differentiation
- Effect of ginsenoside on osteoclast differentiation

(3) Characterization of black ginseng components using OVX mouse model

- Establishment of ovary-depleted mouse model (OVX) for osteoporosis
- Analysis of ginsenoside Rh2 in RANKL-induced mouse model
- Analysis of salubrinal in -RANKL-induced mouse model

IV. Results

(1) Establishment of creatine kinase assay and inhibitor screening

- Established in vitro creatine kinase assay system and measured the inhibitory activity of black ginseng extracts fractionated

(2) Establishment of cell-based TRAP and in vitro assay systems

- Isolated mouse bone marrow cells to be treated with M-CSF and RANKL for their differentiation into multinuclear osteoclasts detectable by TRAP staining

(3) Structural identification of anti-osteoporosis black ginseng components

- TRAP screening of the black ginseng components identified 13 active compounds, amongst them three were co-incident with Rg2, Rh1, Rd in their molecular weight

and the rest 10 expected to be different from saponins

(4) Effect of salubrinal on osteoporosis in relation with ER-stress

-Salubrinal was found to induce ER-stress and the subsequent CHOP expression, leading to the NFATc1 and Mitf expression and intervention of osteoporosis

(5) Effect of tunicamycin on osteoclast differentiation

-Tunicamycin, as an ER-stress inducer, could be utilized as anti-osteoporosis therapeutics by inducing osteoclast cell death

(6) Effect of ginsenoside on osteoclast differentiation

-Apart from Rg1, ginsenoside Rg2 inhibited expression of proteins concerned with osteoclast differentiation, leading to the down-regulation of osteoporosis

(7) Establishment of ovary-depleted mouse model (OVX) for osteoporosis

-Constructed OVX mouse depleted of ovary

(8) Analysis of ginsenoside Rh2 in RANKL-induced mouse model

-Rh2 recovered the BMD level in osteoporotic mouse treated with RANKL

(9) Analysis of salubrinal in RANKL-induced mouse model

-Salubrinal was found to recover the BMD level in osteoporotic mouse treated with RANKL and evidence by micro-CT analysis

V. Accomplishment and its application Plan

-Four SCI(E) publications abroad, 1 under revision in Bone

-Three patents

-Black ginseng certification

-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 of the 1st year
2. Results of the 1st year
3. Research contents and methods of the 2nd year
4. Results of the 2nd year
5. Research contents and methods of the 3rd year
6. Results of the 3rd year

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 제1차년도 연구수행 내용 및 방법

제2절 제1차년도 연구내용 및 결과

제3절 제2차년도 연구수행 내용 및 방법

제4절 제2차년도 연구내용 및 결과

제5절 제3차년도 연구수행 내용 및 방법

제6절 제3차년도 연구내용 및 결과

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

1. 골다공증 치료효과에 대한 흑삼연구의 필요성

- ◆ 인삼은 우리나라를 종주국으로 하는 대표적인 의용식물로서, 삼국시대부터 1500여년 동안 우리나라의 손꼽히는 수출품이었으며, 고려, 조선시대에 이르러는 중국과 일본 등지에 가장 큰 비중의 무역상품으로 각광을 받아왔다.
- ◆ 1990년을 정점으로 우리나라 인삼은 과거 30%에서 최근 1%도 안되는 해외시장율을 나타내고 있어 인삼 종주국이라는 말이 무색할 정도이다.
- ◆ 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 필수적이다.
- ◆ 흑삼은 기존의 인삼(홍삼)을 열처리로 변형하여 골다공증 어제에 더욱 우수한 활성을 나타냄을 확인되었고, 이 흑삼의 구성성분들에 대한 과학적 연구를 통해 흑삼의 해외시장 진출을 이루어 다시한번 인삼 종주국으로서 한국의 위상을 높이고자 한다.
- ◆ 인삼의 효능은 다양한 분야에서 익히 잘 알려져 있는데, 산후에 몸이 허약할 때, 소아 발육 부전증, 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.
- ◆ 아직까지도 국내외적으로 흑삼을 이용한 연구는 전무하여, 본 연구를 통하여 국내 농가소득 증대의 큰 기여를 할 것으로 예상된다.

2. 골다공증 저해제 개발의 필요성의 아무리 강조해도 지나치지 않는다

골다공증은 연령이 많아지게 됨에 따라 자연적으로 나타나지만, 특히 여성의 경우 폐경기 등 호르몬 분비의 이상에 의해서도 매우 심화된다. 남성의 경우도 여성보다는 덜하나 노화와 함께 대부분 골다공이 생기게 되며 질병이나 면역체계의 약화를 통하여도 젊은층에서도 나타나는 경우가 있다. 따라서, 골다공증 치료제 개발에 관한 연구는 국내 뿐만 아니라 전 세계적으로도 아무리 강조해도 지나치지 않다.

3. 골소실 질환이란

◆ 우리 몸의 골격계를 유지하는 가장 단단한 조직인 뼈는 중요한 장기를 보호하며, 조혈모세포를 저장하여 혈액세포들을 공급하는 신체 내 면역체계의 중요한 조직이다. 뼈는 신체내에서 계속해서 remodeling이 이루어지는 매우 동적인 상태를 유지하고 있는데, 뼈를 만드는 조골세포 (osteoblast)와 뼈를 흡수하는 파골세포 (osteoclast)의 균형 속에서 이루어진다. 그러나 이들 사이의 균형이 깨지면 골질환을 유발하게 되는데, 특히 파골세포의 활성화는 뼈를 약화시키며 이는 많은 골질환과 밀접한 관계가 있다.

◆ 대표적인 골소실 질환 중의 하나인 골다공증 (osteoporosis) 은 폐경 및 노화에 따른 성호르몬의 변화로 파골세포의 활성이 높아져 정상적인 뼈의 리모델링 과정이 깨지게 되어 발병하게 되며, 특히 폐경기 이후 여성들에게서 빈발한다. 이외에도 갑상선 기능 항진, 부갑상선 기능 항진, 만성 신부전, 장기간 부신피질 호르몬 투여 등의 다양한 요인에 의하여 발생한다. 이외에도 파골세포의 활성화에 의해 유발되는 골질환들로는 관절염, 치주질환, 골전이암 등이 있다.

4. 골소실 질환 보조식품 및 치료용 소재로서 흑삼 소재의 중요성

◆ 흑삼은 우리나라에서 강점을 지니는 정통식품이며, 흑삼이 가지고 있는 생리활성 물질의 활성과 섭취시 장내 흡수율을 높이며 신체의 생리기능을 높이고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으나 흑삼 가공식품을 이용한 생리적 기능과 생리물질에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

◆ 세계 각국은 이미 천연물로부터 활성물질을 추출, 정제하여 천연물 신약 및 천연물유래 의 약품을 개발하는 연구를 하고 있으며, 천연물을 바탕으로 한 신약 및 건강기능성 제품의 개발은 미래 바이오산업으로서 중요한 위치를 차지하고 있는 실정이다. 그러나 아직까지 흑삼 가공식품을 이용한 국내외의 연구가 미흡하며 흑삼 발효산물 유래 신약 연구에 있어서 국제시장을 선도하고 발 빠르게 선점할 필요성이 인정된다.

5. 활성 타겟으로서 골질환의 중요성과 필요성

◆ 파골세포는 myeloid lineage의 hematopoietic precursors로부터 분화되어 골흡수를 담당하는 중요한 골세포이다. 파골세포의 분화는 조골세포에서 제공되는 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)와 tumor necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine (TRANCE/RANKL)에 의해 유도되며 이 물질은 파골세포의 분화에 있어서 필수적이므로 신호전달체계에 대한 연구는 매우 중요하다고 여겨지고 있다. TRANCE/RANKL는 그 수용체인 RANK (또는 TRANCE receptor)에 결합하여 파골세포의 분화에 필요한 신호를 전달하는데, 이에 여러 중요한 전사인자들이 작용 함이 밝혀졌다. M-CSF와 TRANCE/RANKL의 중요성은 *in vitro* 뿐만이 아니라 *in vivo* 에서도 밝혀졌는데, 이들의 자연발생적 돌연변이 또는 knockout 생쥐는 파골세포 분화가 억제됨으로 인한 심한 골화석증을 보여주고 있다.

◆ TRANCE/RANKL는 NF-kB, JNK, ERK, p38 MAPK 등을 activation시킴으로써, 파골세포의 분화 및 그 세포의 활성화와 survival에도 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. 파골세포 분화에는 M-CSF와 TRANCE/RANKL외에도 PU.1, p50/p52, c-fos, Mitf 등의 전사인자들이 중요성이 자연발생적 돌연변이 또는 knockout 생쥐들에 의해 밝혀졌다.

◆ 미국의 경우 이미 7-8백만 명이 골다공증에 이미 걸려있고 1,700만 명이 낮은 골량으로 골다공증에 걸릴 위험뿐만 그로 인한 골절이 개인적, 사회적인 문제점이 커지고 있다. 골다공증 등의 파골세포에 의한 골 대사질환에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있으며 연구에 의한 치료제 개발로 인한 시장은 실로 막대하다고 여겨진다. 본 연구에서는 파골세포 분화에 있어서 필수적인 물질인 TRANCE/RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 분화를 억제하는 천연물 유래 저해제의 개발에 있다. 이러한 활성 타겟을 중심으로 하는 연구를 함으로서 파골세포에 의한 골대사질환 치료제의 개발에 일조를 하고자 한다. 본 연구주체는 전 세계적으

로도 지금까지 전혀 연구되지 않았던 흑삼 발효 중에 생기는 새로운 천연물 소재를 발굴해내는 연구로 본 연구의 성공적인 수행 시 파생되는 산업적, 학문적인 가치가 매우 높으리라 사료된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 해외 인삼 기술개발 현황

◆ 파골세포의 활성화에 따른 골다공증 같은 골질환의 치료제를 개발하기 위하여 파골세포의 분화를 억제 시키거나 이들의 활성도를 떨어뜨려주는 방법들이 많이 연구 보고 되고 있다. 현재 TNF- α 에 대한 항체를 이용한 방법, TRANCE/RANKL의 작용을 조절하는 RANK-Fc나 OPG 같은 물질을 이용한 방법, 호르몬제제 및 활성화를 억제하는 bisphosphonate 계열의 물질들에 대한 많은 연구와 치료법들이 개발 또는 실용화를 위한 연구들이 진행 중이다. 그러나 아직도 이들에 의한 치료법에는 상당한 문제점들이 있어서 보다 효과적인 치료법을 개발하기 위하여서는 다양한 각도에서의 연구들을 필요로 하고 있다.

◆ 에스트로젠은 단핵세포로부터 IL-1의 생성과 조골세포로부터 IL-6의 생성을 억제하여 파골세포의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으나 10년 이상 치료군에서 유방암과 자궁내막암의 위험이 있는 문제점이 발견되었다. bisphosphonate 계열의 물질들은 흡수율이 1-5%로 낮으며, 소화기계 부작용을 나타내는 부작용이 발견되고 있다. 이와 같이 현재 개발, 판매되고 있는 골질환 치료약물의 경우 정도의 차이는 있으나 대부분 부작용을 갖고 있다. 동양은 역사적으로 한약재를 기반으로 한 전통 치료기법이 서양보다 앞서 있으므로 최근 이러한 기술을 이용하여 천연물을 기반으로 한 의약품 개발에 장점을 갖고 있다.

◆ 현재 골다공증의 세계시장 규모는 2012년에는 370억불에 이를 것으로 전망하고 있다 (표 1). 그 외에 관절염, 치주질환, 골전이암 등에 관련된 치료제 시장을 합친다면 골질환 관련 세계시장 규모는 갈수록 그 규모가 커지고 있는 상황이라고 볼 수 있다.

제2절 국내 인삼 기술개발 현황

1. 국내 인삼 개발의 연구현황

◆ 국내의 소수 의과대학과 치과대학에서는 파골세포의 분화 과정에 대한 연구, 골형성 과정연구, 그리고 프로테오믹스 활용 기술을 도입하고 있는 실정이다. 지난 몇 해 동안 동아제약, 유

<표 1> 골다공증 관련제품 세계시장 규모 (단위: 억달러)

분 류	1999년	2000년	2003년	2006년	2012년
골다공증 치료제	60	69	105	160	370

[근거: 평균성장율을 골다공증 15%로 계산하여 예측된 결과임. 한국산업기술재단, Technology Roadmap 생리활성정밀화학 (2002년)]

한양행, 동화약품 등 국내제약업체와 한국한의학 연구원 등이 새로운 골다공증 치료제 개발을 해오고 있다. 한국화학연구원, (주)오스코텍의 연구진들이 합성 chemical library로부터 골다공증 유효 후보 물질 검색을 진행하고 있으나 아직은 괄목할 만한 화합물을 제시하지 않고 있다. 특히 국내의 경우, 천연물 의약품 위주로 신약을 개발하고 있으며, 참여 기업들이 다수인만큼 머지않아 천연물 의약품 시장이 형성될 것으로 전망된다. 그러나 국내에서 흑삼을 이용한 골질 환 개선 식품과 치료제의 연구는 전혀 이루어 지지 않고 있다.

◆ 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 신체기

능 조절에 다양한 효과를 미치는 것으로 밝혀졌음. 즉, Ginsenoside-Rb₁는 진통, cJlous, 정신 안정등 중추 신경계를 억제하며 Ginsenoside-Rb₂는 평형장애 개선작용, 콜레스테롤 저하작용, DNA RNA 합성촉진작용, 항산화 활성 물질생성 촉진작용, 부신피질 호르몬분비 촉진작용, 암 독소 홀몬에 대한 길항작용, 중앙 혈관신생 억제작용, Plasmin 활성화에 작용하는 것으로 알려져 있음. Ginsenoside-Rc는 중추억제작용을 비롯하여, RNA 합성억제작용, 혈청 단백질합성 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

2. 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% 이었으나 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 개발못함
- ◆ 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

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 1차년도 연구수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>흑삼 활성물질의 정제 및 구조 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 파골세포의 분화를 저해하는 생리활성 물질의 탐색, 파골세포의 TRAP 활성 측정 	<ul style="list-style-type: none"> • TRAP assay -Cell staining -In vitro assay • Creatin kinase assay 확립 및 저해활성 흑삼분획 탐색: Bone resorption 저해 측정
	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 활성물질의 순수 분리 정제 	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼의 부탄올층에서 활성 확인 → 페탄올추출 → BG-3-13 활성 탁월 → LC mass, HPLC, NMR 등 이용한 구조분석
	<ul style="list-style-type: none"> • 순수 정제 물질의 특성 조사와 구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • BG-3-13-H2는 ginsenoside Rg1과 구조 매우 유사하나 이중결합 하나가 추가된 신규물질로 추정됨 • BG-3-13-H2는 비만/당뇨 및 항암 타겟인 AMPK 인산화 유도활성 부위와 겹쳐 골다공증 저해가 이들 활성과 관계있을 것으로 예상됨
<p>흑삼 활성물질의 정제물의 활성 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌 조사 및 예비 실험 	<ul style="list-style-type: none"> • 인삼, 흑삼, 장뇌삼의 비교분석 확인 : 3종 모두 활성 있으나 흑삼, 장뇌삼이 더 우수한 것으로 보임 • TRAP assay를 통해 반복실험 및 확인
	<ul style="list-style-type: none"> • MTT assay에 의한 파골세포의 증식 측정 	<p>각 분획에 포함된 물질이 실제로 파골세포에 독성이 없고 분화만을 저해하는지를 검증하기 위해 MTT assay를 수행</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 희석한 농도를 가지는 물질 분획을 이용한 저해 활성 재검증 	<ul style="list-style-type: none"> • 2차년도 이후에 실시할 “난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델의 확립”을 1차년도에 이미 성공함 • TRAP 결과를 Creatine kinase assay를 통해 2차 확인: Creatine kinase assay 는 bone resorption과 관계가 있으나 반드시 파골세포형성과는 관계가 있다고 보기 어려움을 본 연구를 통해 확인됨 • Salubrinal을 이용하여 ER-stress와 골다공증과의 관계 규명: 세계 최초 규명

제2절 1차년도 연구결과

1. Enzyme based osteoclast inhibitor screening (creatine kinase assay)

◆Osteoclast(파골세포)는 골다공증이나 cancer cell metastasis 의 주요원인으로 잘 알려져 있다. Osteoclast를 억제하는 방법으로 일반적으로 osteoclast 로 분화되거나 이에 의한 뼈 세포 침식을 막는 두가지 방법이 사용된다. 또한 최근 RhoA GTPase 의 vacuolar ATPase 활성을 조절하고 actin-ring을 형성함에 있어서 creatine kinase 가 중요한 역할을 한다고 알려져 있고 실제로 creatine kinase inhibitor 가 중요한 osteoclast inhibitor 가 될것임을 제시했다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 in vitro에서 creatine kinase inhibitor screening system을 확립했고 흑삼을 fraction 별로 효소활성을 측정하였다 (그림 1). 이 결과를 바탕으로 TRAP assay를 통한 결과와 비교하여 상호 일치성이 어느 정도 있는지 검토하고 있다.

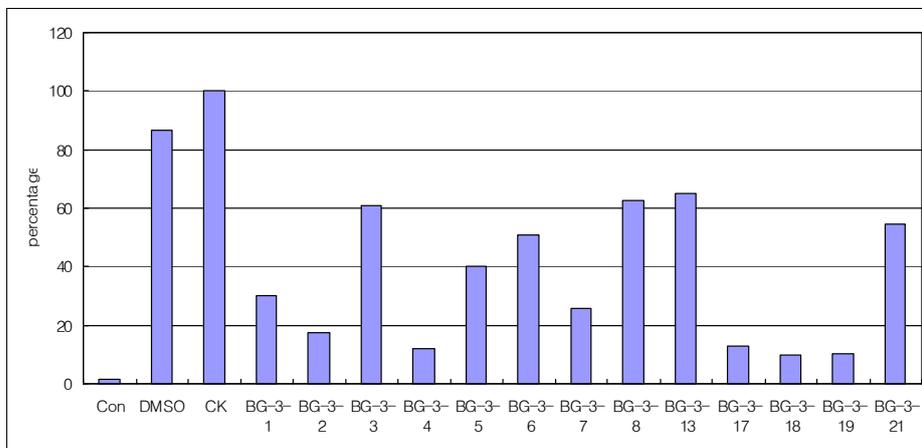
2. Cell-based TRAP staining and in vitro TRAP assay

◆쥐 골수세포인 bone marrow cell을 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하고 분화시켜 TRAP staining을 하여 multinuclear 파골세포 (osteoclast)를 조사하였다 (그림 2). 그림에서처럼(화살표) 파골세포로 분화할 때 거대 핵 세포가 형성됨을 확인할 수 있었다.

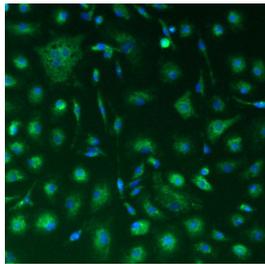
3. 골다공증 저해활성의 흑삼성분 구조분석

◆흑삼 농축액을 hexan층, 부탄올층, 에틸아세테이트층으로 분리하여 5ug/ml의 농도로 DMSO 로 희석하여 TRAP 활성을 측정하였다 (그림 3). 그 결과 부탄올층에서 TRAP 활성 저해가 나타나므로 메탄올로 분획(BG3)을 나누고 정제를 시도하였다.

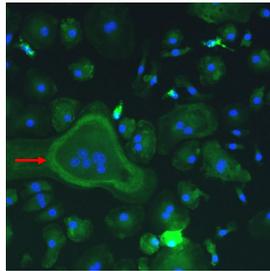
◆<표1>에서처럼 TRAP staining과 동시에 TRAP assay를 수행하여 흑삼과 다른 약물들의 효과를 비교하였다. 흑삼을 시기별로 구입하여 유기용매로 추출하여 골다공증 저해도를 측정하였다. 또한 비교로 amentoflavone과 심장병에 효과적이라고 알려진 resveratrol, ER-stress 조절물질인 honokiol, magnolol을 처리하여 그 효과를 비교하여보았다 (표 1).



<그림 1> 흑삼 성분의 Creatine kinase assay 결과

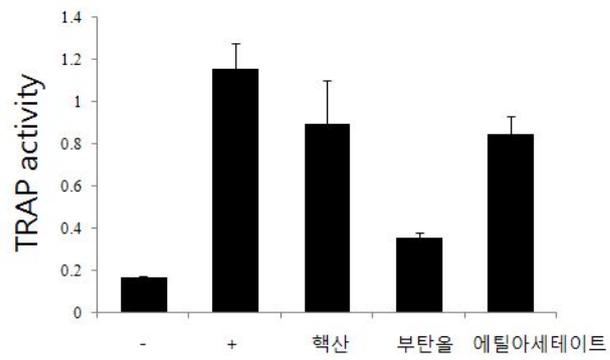


Negative control



positive

<그림 2> 쥐 골수세포의 TRAP staining



<그림 3> 흑삼 분획물의 골다공증 저해효과 (TRAP assay)

<표 1> 흑삼 분획물과 천연 약물시료의 골다공증 저해활성 비교 (TRAP assay)

이 름	Fraction (5 ug/ml)	① 저해도(%)
흑삼 #3	EtOAc	65
	Hexane	76
	EtOAc + DW	68
Amentoflavone		55
Resveratrol		25
Honokiol		0
Magnolol		0

표에서 보는 보와 같이 흑삼은 각 층에서 고루 골다공증 저해효과를 보이고 있으며 amentoflavone 도 어느정도 좋은 효과를 나타내고 있다. 반면에 resveratrol이나 honokiol, magnolol에서는 거의 효과가 없는 것으로 보이고 있다.

◆ 흑삼 유래 분획으로부터(BG3) 얻어진 각 물질이 가지는 TRAP 활성을 측정하였는데, BG3-12, 13, 22의 분획에서 파골세포의 TRAP 활성을 저해하는 효과를 보였다 (그림 4).

◆ 각 분획에 포함된 물질이 실제로 파골세포에 독성이 없고 분화만을 저해하는지를 검증하기 위해 MTT assay를 수행하였다 (그림 5). BG3-12, 13은 독성이 나타나지 않았으나, 22의 분획물은 독성효과를 나타냈으므로 12,13으로부터 파골세포의 분화를 저해하는 물질을 탐색하기 위하여 아래와 같이 HPLC를 사용하고 TLC로 정제하였다.

◆ 현재 세포독성을 보이지 않는 흑삼 BG-3 물질에 대한 이차 검증 실시

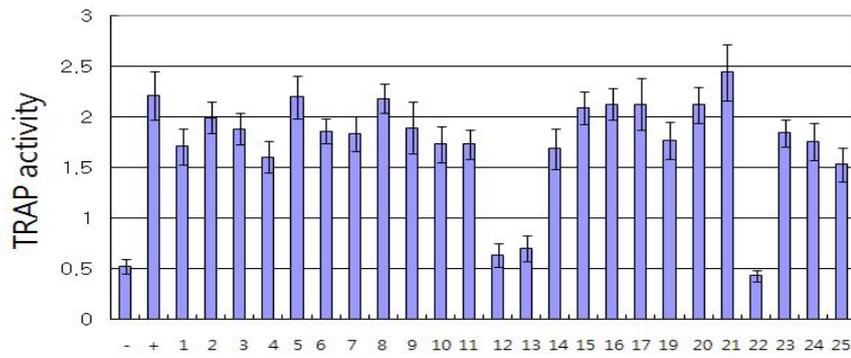
흑삼으로부터 활성 물질을 분리하기위해 흑삼농축액을 따뜻한 물에 용해시켜 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올로 추출하였다. 추출한 부탄올층을 감압농축한 후 부탄올 추출물 9.7g 을 RP18 column chromatography를 실시하여 활성 fraction을 얻었다. 이 부분들을 TLC로 전개하여 ginsenoside Rg1 과 Rg3의 대조군과 비교하였고 (그림 6, 7), 이는 Rg1과 유사물질로 추정되었다. 따라서 활성 fraction F-13 으로부터 gradient aqueous acetonitrile 이동상으로 ODS-AM HPLC column을 실시하여 순수한 활성물질 1종을 분리하고 기기분석을 수행하였는데, 기기 분석 결과, BG-3는 ESI-MS결과, 분자량은 803 이었으며, 기존에 존재하는 Ginsenoside Rg1의 새로운 유도체로 확인되었다 (그림 8, 10, 11). 또한 fraction F-12도 Osteoclast differentiation 저해하는 활성이 있음을 확인하여 계속 구조분석 중에 있다 (그림 7).

4. AMPK 인산화 증진효과를 나타내는 성분 구조분석

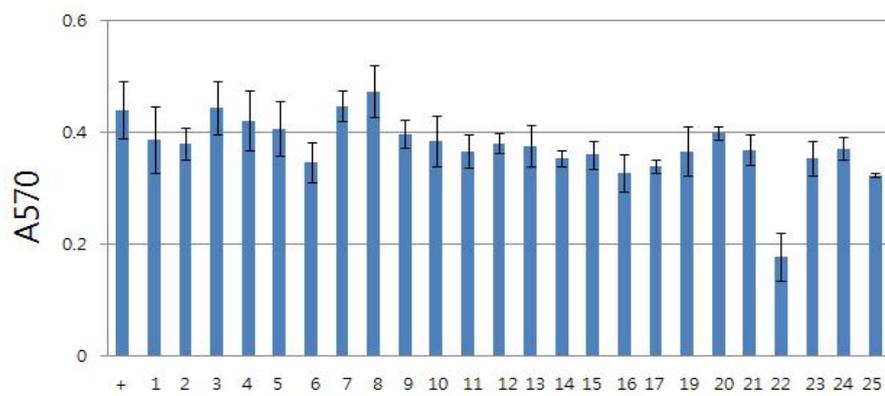
◆ 흑삼의 성분 중 골다공증 저해활성을 나타내는 F-13 중에서 BG-3-13은 AMPK 인산화 활성도 가지고 있음이 확인되어 비슷한 혹은 동일 물질로 추정되고 있다. 흑삼을 추출하여 HPLC와 LC-Mass를 거쳐 그 구성성분과 구조를 최종 확인하였다 (그림 10, 11).

BG-3-13 중에서도 골다공증을 저해하는 한 종류의 물질은 지방산인 것으로 나타나 더 이상 진행을 시키지 않았으나 다른 한 종류는 비사포닌계열의 물질로 추정되고 있는데, 일반적으로 인삼에서는 사포닌이 생리활성을 나타낸다고 알려져 있기 때문에 이 새로운 성분의 구조분석을 현재 진행하고 있으며 따라서 이의 활성 및 구조가 매우 기대되고 있다.

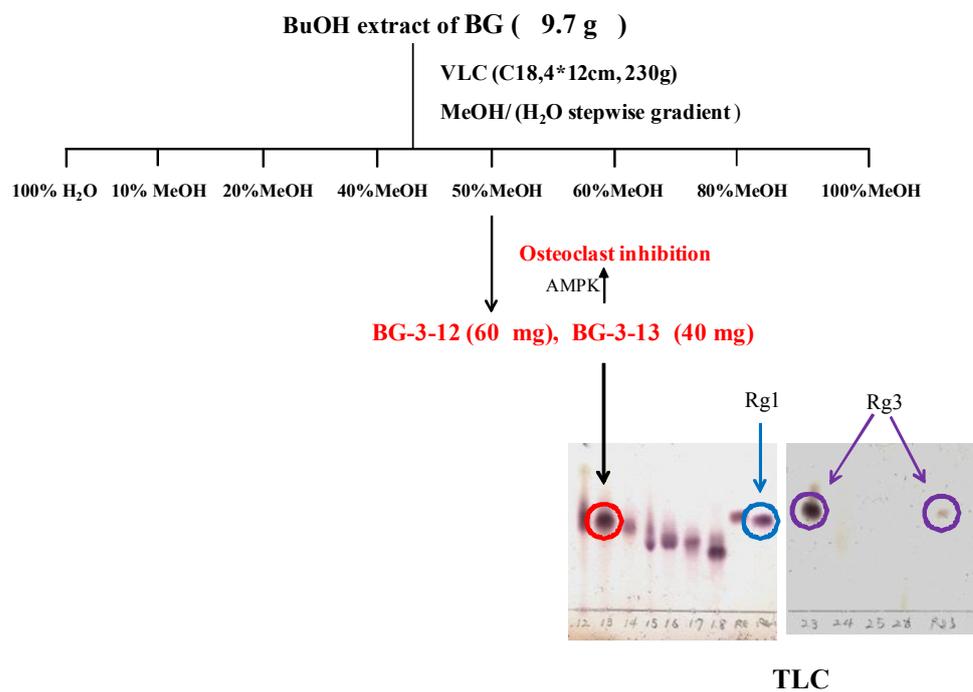
흑삼추출물의 main peak(BG-3-13)을 LC-Mass로 분석한 결과 Rg1과 분자량이 비슷한 것으로 나타나 조사를 한 결과 흑삼의 main 지표물질은 분자량이 803의 물질로서 Rg1에서 이중결합 하나가 떨어져 나간 유도체인 것으로 분석되고 있으며 이는 아직까지 학계에 보고 되지 않은 신규물질로 추정되고 있다.



<그림 4> 흑삼 분획물의 골다공증 저해활성 분석 (TRAP assay)

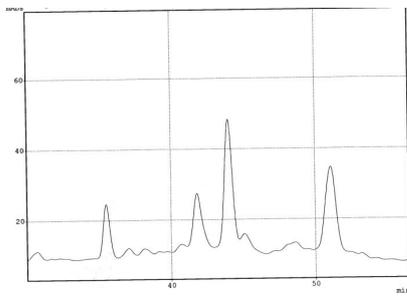
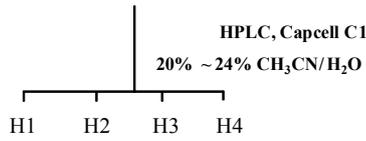


<그림 5> 흑삼 분획물의 세포독성 분석 (MTT assay)

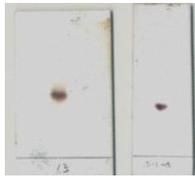
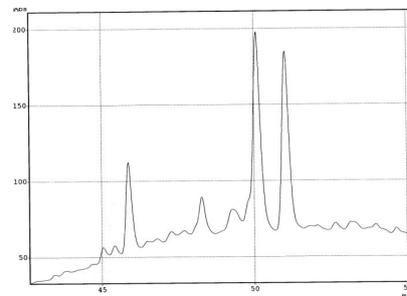
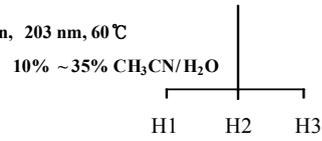


<그림 6> 골다공 저해활성 흑삼 구성성분의 구조분석 과정

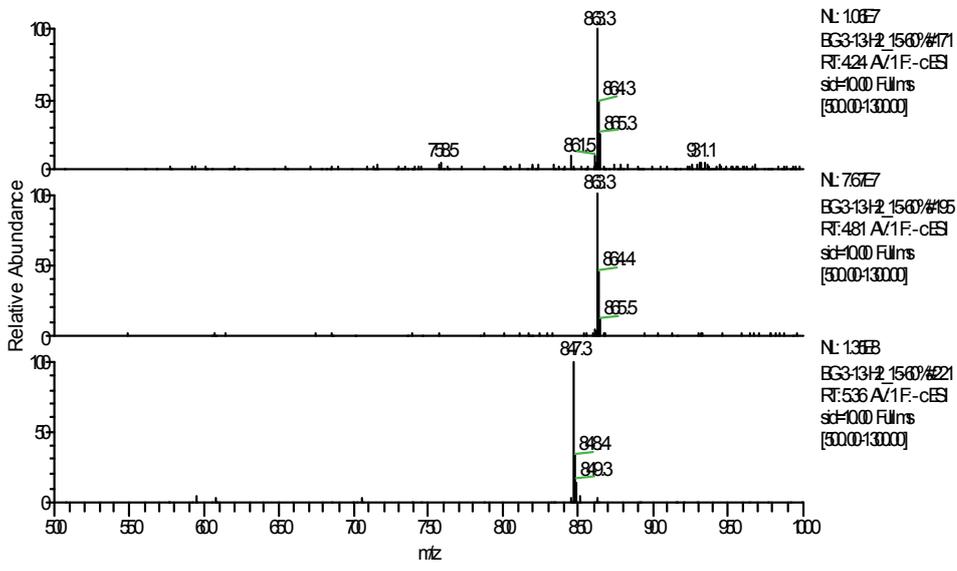
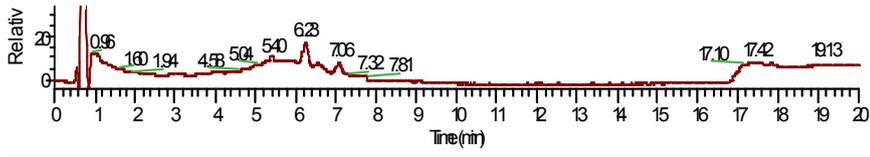
BG-3-13 (40 mg)



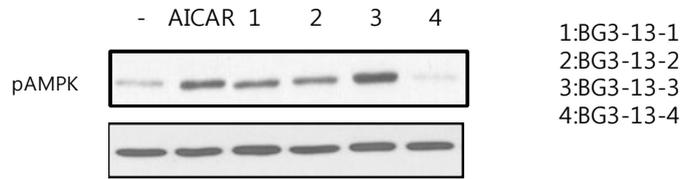
BG-3-12 (60 mg)



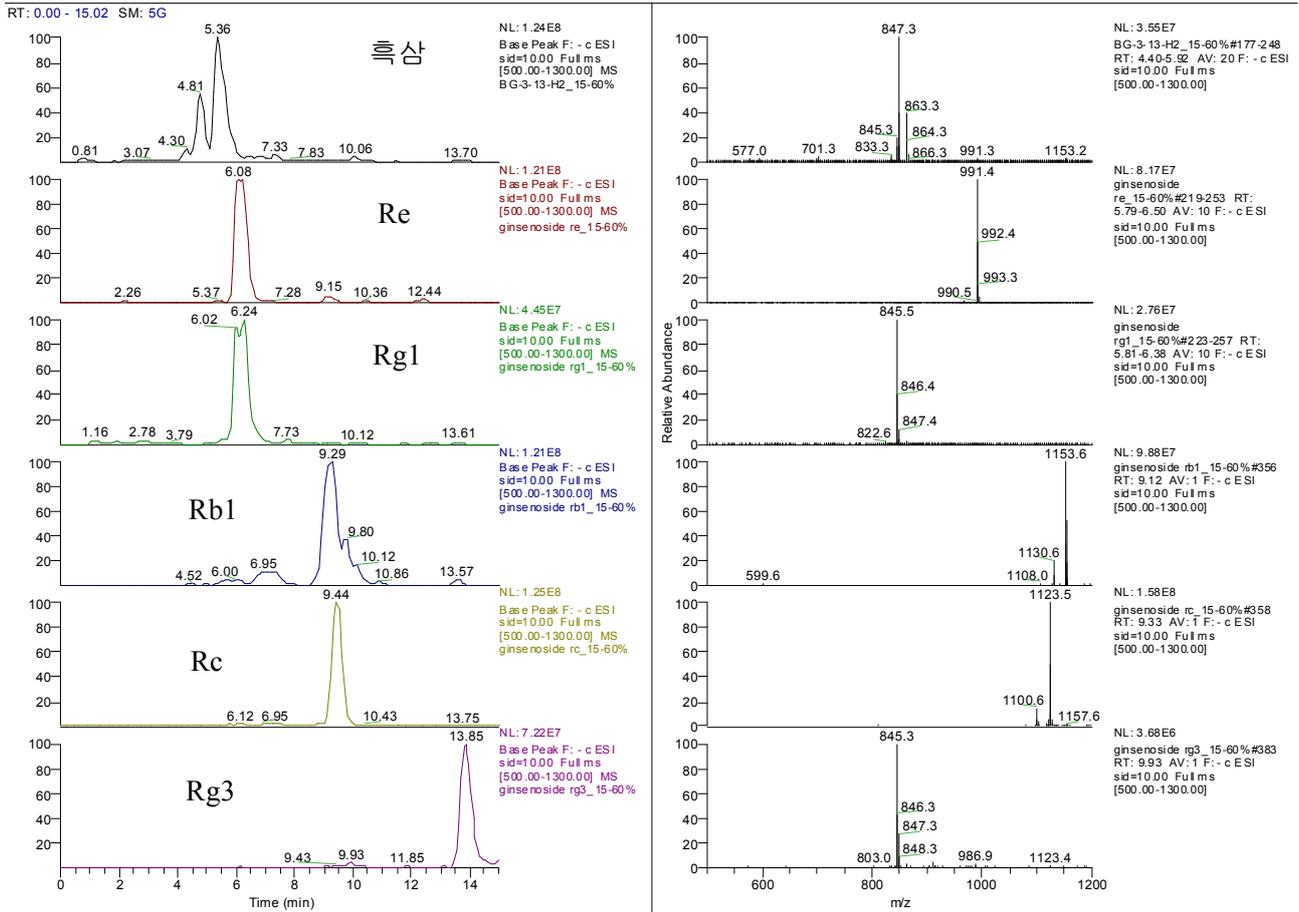
<그림 7> BG-3-12와 BG-3-13의 구조분석



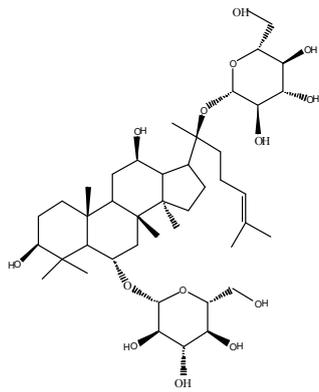
<그림 8> LC Mass에 의한 흑삼 골다공증 저해활성 성분 분석



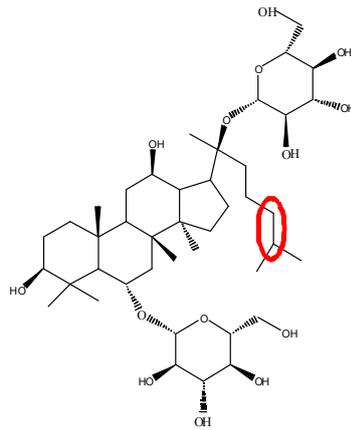
<그림 9> BG-3-13 성분들의 AMPK 인산화 유도활성



<그림 10> 흑삼 구성성분의 골다공증 저해 및 AMPK 인산화 유도활성
분획의 LC-Mass 결과



Ginsenoside Rg1
(MW 801)



BG-3-13-H2
(MW 803)

<그림 11> AMPK 인산화 유도 및 골다공증 저해효과를 가지는 흑삼
BG-3-13 구성성분의 분자구조 및 Rg1의 구조 비교

5. Salubrinal을 이용한 ER-stress와 골다공증 조절관계 규명

◆UPR protein CHOP negatively regulates osteoclastogenesis

소포체스트레스(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)-related unfolded protein response(UPR)는 많은 질병과 cellular signal 에 관여하는 것으로 알려져 있다. 하지만 osteoclast 의 형성과 작용에 있어서의 UPR protein 들의 역할은 거의 알려져 있지 않고 있다. 본 연구에서는 대표적인 UPR protein 인 CHOP를 초점에 두고 이 protein 이 osteoclast 의 형성에 주는 역할에 대해서 중점적으로 연구를 수행한 결과 CHOP protein 이 transcription factor 들의 조절을 통해 osteoclast 형성을 저해 한다는 결론을 얻었고 아울러 eIF2 alpha-CHOP signal 의 inducer 인 salubrinal 이 osteoclast 의 형성을 억제함을 규명함으로써 CHOP이 osteoclast inhibitor 치료제개발의 새로운 타겟임을 최초로 입증하였다.

(그림 12)에서와 같이 293T cell에서 oscar promoter assay를 통해서 osteoclast 의 형성에 있어서의 주요한 전사인자인 NFATc1 과 Mitf 의 활성이 chop를 발현시킴으로 인해서 줄어든다는 사실을 확인했다.

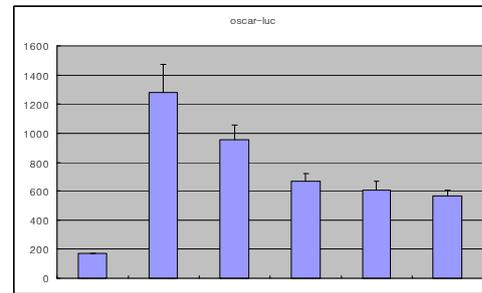
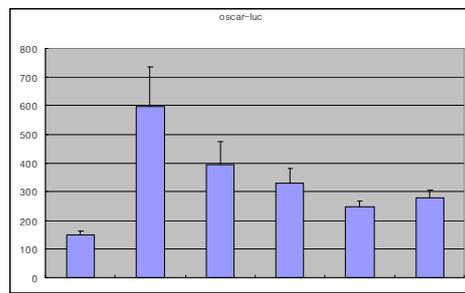
또한 (그림 13)에서는 실제로 eIF2 alpha-chop inducer 인 salubrinal을 처리했을 때 mRNA level에서 CHOP 발현이 증가되었고 multi-nuclei osteoclast 가 농도별로 줄어든다는 것을 확인 하였다. 이는 ER stress 가 osteoclast 형성과 연관된다는 사실을 처음으로 밝혀냄과 동시에 CHOP protein 이 osteoclast 저해제를 찾음에 있어서 새로운 타겟이 될수있다는 것을 밝혀냄으로써의 중요한 의미가 있다.

6. 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델의 확립

◆각 4마리의 쥐를 사용하여 난자를 제거하기 전에 몸무게를 측정하고 마취제는 ketamine 80-100mg/kg/ xylazine 5-10mg/kg 을 IP로 쥐에 주사하였다. 마취된 쥐의 정중선을 절개하여, 복부 지방 밑에 위치한 자궁에서 Y자로 나누어진 수란관을 따라 그 끝에 위치한 분홍색의 난소를 적출 제거하였다. 6주후에 쥐를 sacrifice시켜 난자 제거를 확인하였다. 아래 그림과 같이 수란관의 무게와 크기가 난자를 제거한 OVX 쥐(negative control)에서 현저하게 낮아짐을 확인할 수 있었다 (그림 14).

◆쥐의 뒷다리 종아리 부위를 절개하고 살을 제거한 후에 난자를 제거한 쥐와(OVX) Sham (control)쥐의 trabecular bone에 대하여 microCT를 이용하여 측정하였다. BMD 측정 프로

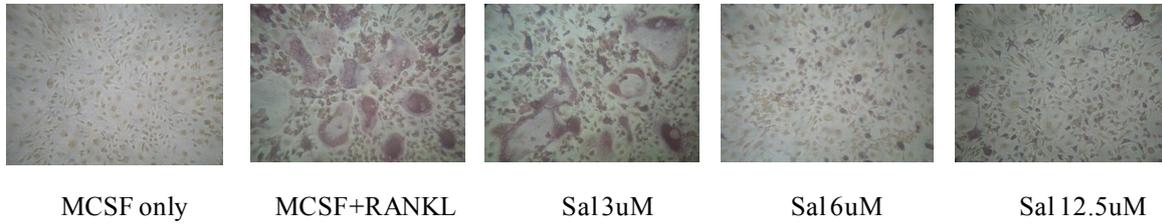
그림에서 뼈의 top과 bottom을 기준으로 잡고 그 범위 내에 존재하는 뼈의 범위와 trabecular bone의 두께와 bone사이의 공간 넓이 그리고 개수를 측정하였다. MicroCT 촬영 결과 아래의 그림과 같이 coronal 부위의 BV (bone volume), 두께, 개수가 난자를 제거한 쥐에서 현저하게 감소했다 (그림 15). 따라서, 골다공증 모델의 확립하고 TRAP 저해 활성을 나타내는 흑삼 순수 정제물질의 동물 실험에 대한 예비 실험을 2차년도에서 수행할 계획이다.



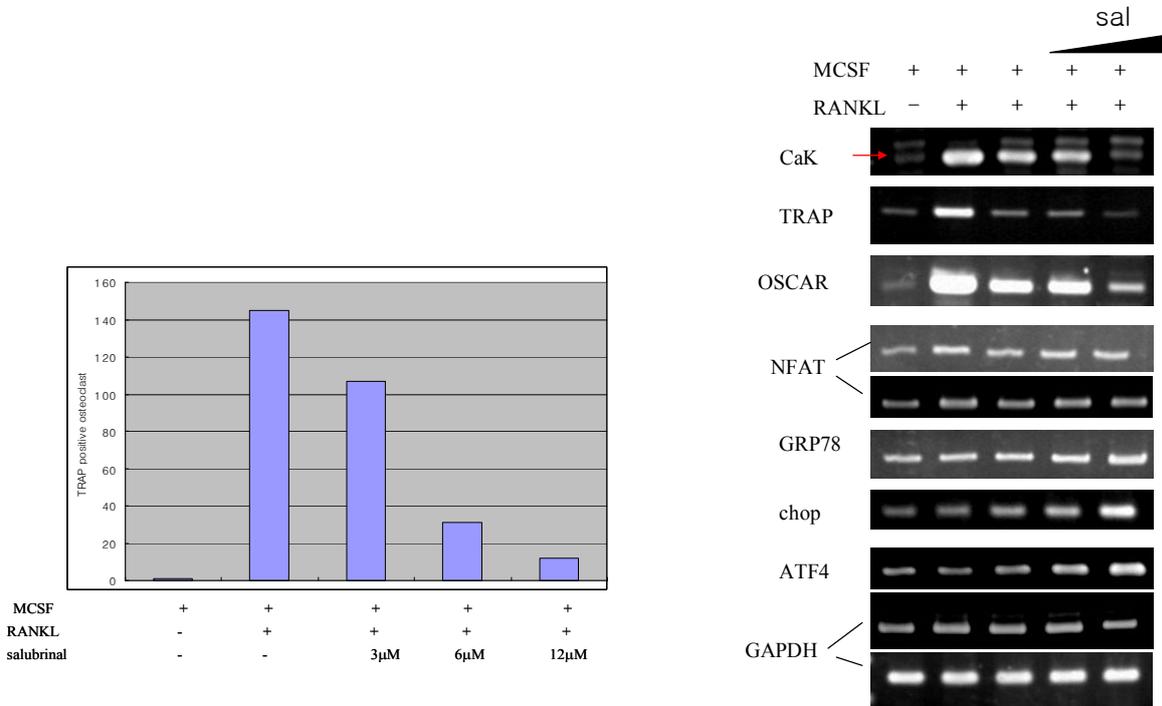
NFATc1 - + + + + +
 Chop(ng) - - 300 600 900 1200

Mitf - + + + + +
 Chop(ng) - - 300 600 900 1200

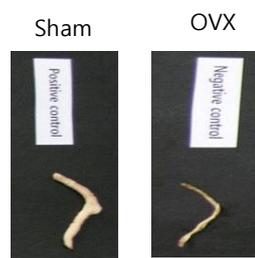
<그림 12> CHOP에 의한 NFAT와 MTF 발현의 저해활성



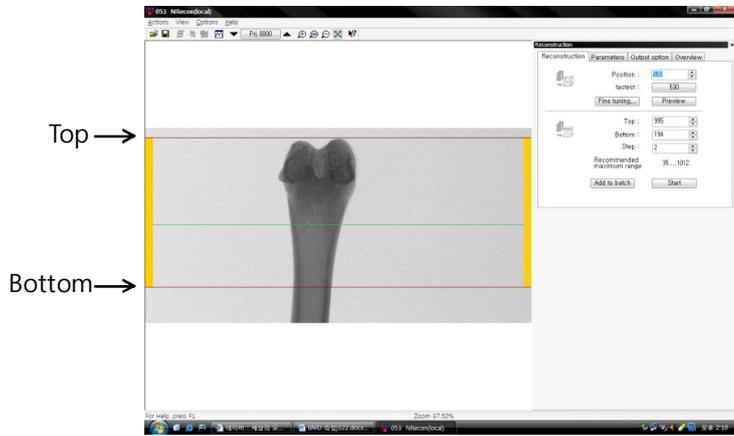
MCSF only MCSF+RANKL Sal3uM Sal6uM Sal12.5uM



<그림 13> Salubrinal을 이용한 ER-stress와 골다공증 조절관계 규명



<그림 14> OVX 마우스와 정상 마우스에서의 난자 크기 비교



	Sham	OVX
BV(bone volume)/TV	16.52%	9.63 %
Tb.Th (trabecular thickness)	45.6um	32.6 um
Tb.Sp (trabecular separation)	242.7um	332.4um
Tb. N (trabecular number)	3.6 um	2.5um

<그림 15> OVX 마우스와 정상 마우스에서의 trabecular bone의 비교

제3절 2차년도 연구수행 내용 및 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
활성물질의 골다공증 저해기전 연구	<ul style="list-style-type: none"> ER-stress 유발하는 Tunicamycin을 이용한 파골세포 성장 저해 활성 연구 	<ul style="list-style-type: none"> Tunicamycin은 파골세포의 성장을 저해하는 것으로 보임 단백질 전사조절 인자인 EIF2a가 ER-stress에 의한 골다공증에 주 요인임이 확인됨 TRAP assay를 통해 반복실험 및 확인 마우스를 이용하여 1차 확인, 현재 2차 반복 중
	<ul style="list-style-type: none"> Ginsenoside 화합물의 파골세포와 조골세포 분화 영향 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 9 종류의 Ginsenoside 화합물이 파골세포의 분화에 미치는 영향을 TRAP assay로 조사 ginsenoside Rh2®는 파골세포의 독성 없이 분화만 저해함을 확인
	<ul style="list-style-type: none"> Salubrinal의 ER-stress 관련 파골세포 분화 저해 기전 규명 	<ul style="list-style-type: none"> ER-stress의 key factor인 EIF2a 조절물질인 salubrinal이 파골세포 분화를 억제함을 규명함
파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구	<ul style="list-style-type: none"> 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 3차년도 이후에 실시할 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과를 2차년도에 시작함 난소를 제거한 동물실험에서 난소관이 ginsenoside Rh2®를 처리한 동물에서 정상 수준으로 돌아옴을 확인, 차후 실험에서 긍정적인 연구 결과를 확인 함

제4절 2차년도 연구결과

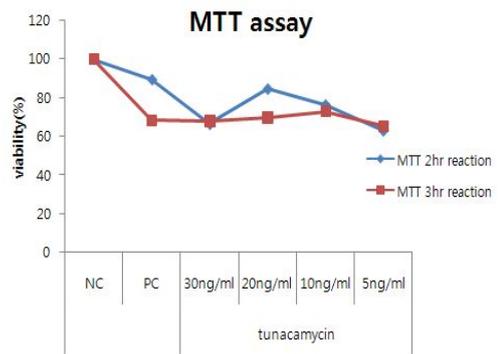
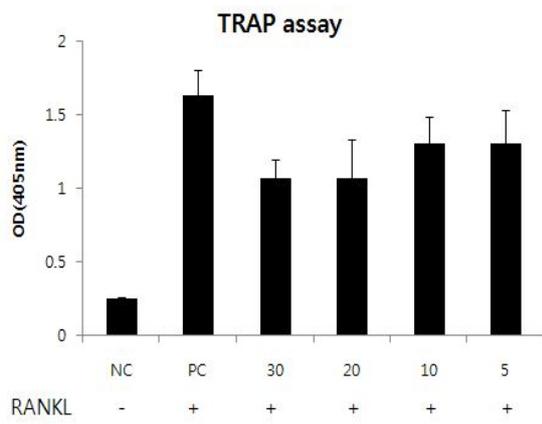
1. Tunicamycin을 이용한 파골세포 성장 저해 활성 규명

소포체 스트레스(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)-related unfolded protein response(UPR)는 ER에 unfolded protein이 과량 축적되었을 때 ER chaperone의 발현 증

가, 새로운 단백질의 생성 억제, misfolded protein의 제거 등을 통한 protein quality control 을 담당하며 많은 질병과 cellular signal 에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나 UPR이 ER stress에 대응하는 세포의 항상성 조절에 실패하였을 경우에는 세포사멸이 유도된다. HEK293 cell에서 tunicamycin 등을 처리하여 지속적인 ER stress를 유발시킨 후 세 종류 UPR 센서의 활성 지속 시간을 관찰 한 결과, IRE1의 활성은 8시간 내에 감소하고 ATF6의 활성은 20시간 정도만 지속된 반면, PERK의 활성은 30시간 이후에도 지속되는 차이를 나타내었다. 이는 지속적인 ER stress 상황에서 IRE1 활성의 감소가 세포의 사멸과 관련이 있음을 보여주고 있다. (IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response, *Science*, 9, November 2007: 944-949) 하지만 osteoclast의 형성과 작용에 있어서의 Tunicamycin과 UPR protein 들의 역할은 거의 알려져 있지 않고 있다. 본 연구에서는 Tunicamycin을 파골세포에 처리하여 파골세포의 사멸을 유도한다는 결론을 얻었다. 그림 1에서와 같이 파골세포 분화 저해활성을 측정하였다. 그 결과 Tunicamycin 농도에 따라 TRAP 활성이 감소함을 확인하였으며, 이 결과는 파골세포의 사멸에 따른 성장저해임을 MTT assay에 의해 확인하였다. 골다공증에서 파골세포의 분화저해를 통한 치료 방법 뿐만 아니라 세포사멸을 유도하여 치료하는 방법도 유효함으로 차후에 Tunicamycin에 의한 파골세포 사멸에 미치는 분자신호 전달체계 연구와 동물실험을 통해 새로운 치료제로서의 가능성을 밝혀냄으로써 중요한 의미가 있다.

2. Ginsenoside 화합물의 파골세포 분화 저해 활성 규명

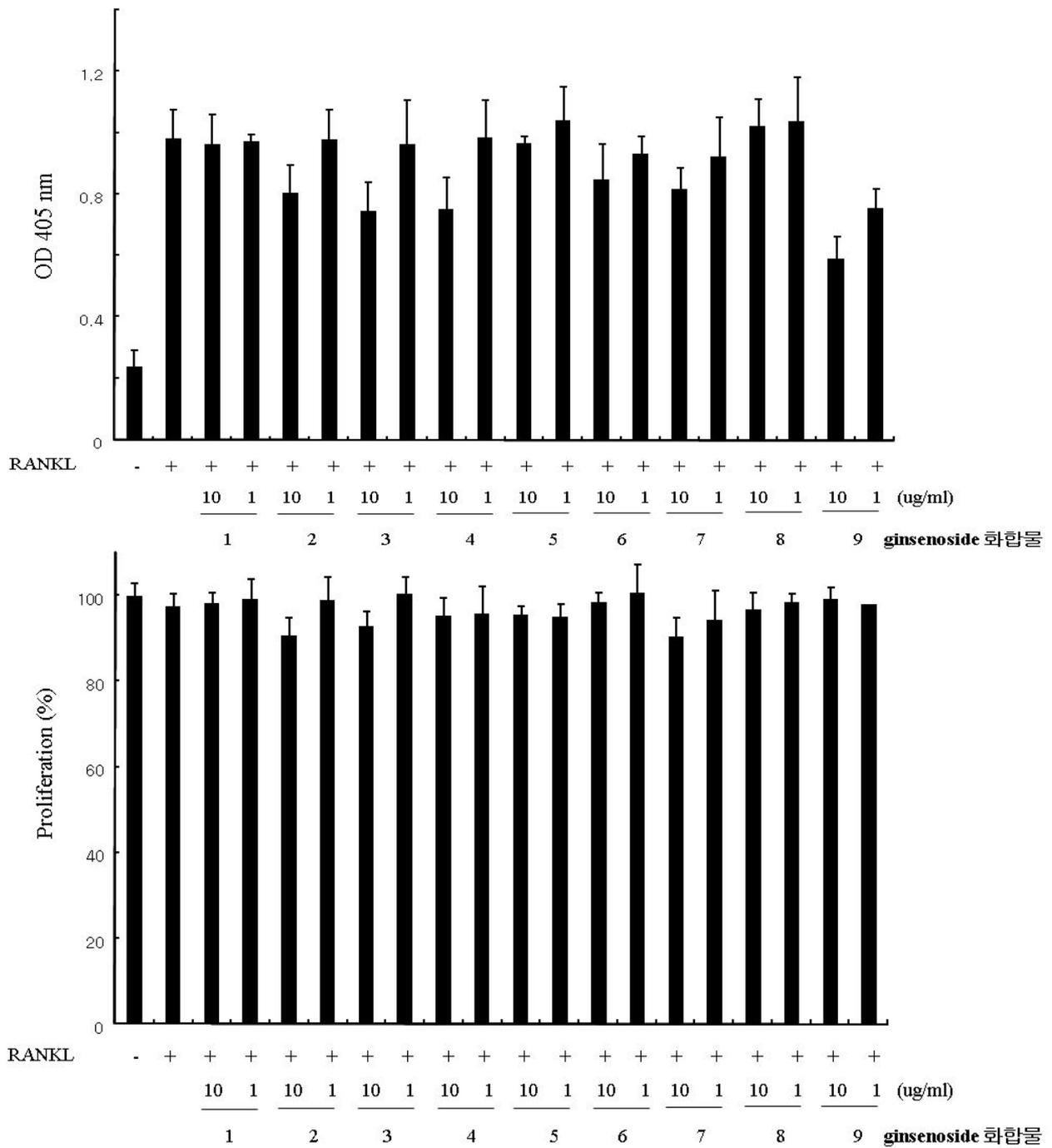
Ginsenoside 화합물은 인삼의 생리학적 혹은 약리학적 유효성분으로 널리 알려져 있으며, Ginsenoside Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg2, Rg3, F1 등이 있다. 현재 Ginsenoside 화합물은 중추신경 억제 작용, 단백질 합성 촉진 작용, 부신피질 호르몬 분비 촉진 작용, 형소판 응집 억제 작용, 면역 증강 작용 등의 다양한 효능을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 흑삼 또는 삼에 존재하는 Ginsenoside 화합물이 가지는 골다공증 억제제의 효능을 검사하기 위하여 상기 화합물에 대한 TRAP 저해 활성을 측정하고 MTT assay를 수행하였다.



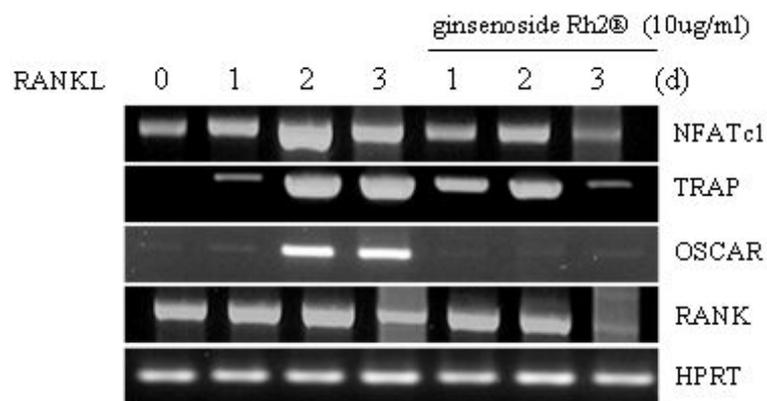
(그림 1) Tunicamycin에 의한 파골세포 분화 저해와 세포사멸

(표1) ginsenoside 화합물

1	ginsenoside F1
2	ginsenoside Rg1
3	ginsenoside Rh2
4	ginsenoside Rd
5	ginsenoside Rh1
6	ginsenoside Rg2
7	ginsenoside Rb2
8	ginsenoside Rb3
9	ginsenoside Rh2®



(그림 2) Ginsenoside 화합물의 파골세포 분화 저해 활성과 세포성장



(그림 3) ginsenoside Rh2®의 파골세포 분화에 있어서 RNA 발현 영향 조사

(그림 2)와 같이 모든 ginsenoside 화합물은 파골세포에서 세포사멸을 나타내지 않았으며, ginsenoside Rh2 10 ug/ml에서 약 50%의 파골세포 분화 저해 활성을 보여주고 있다.

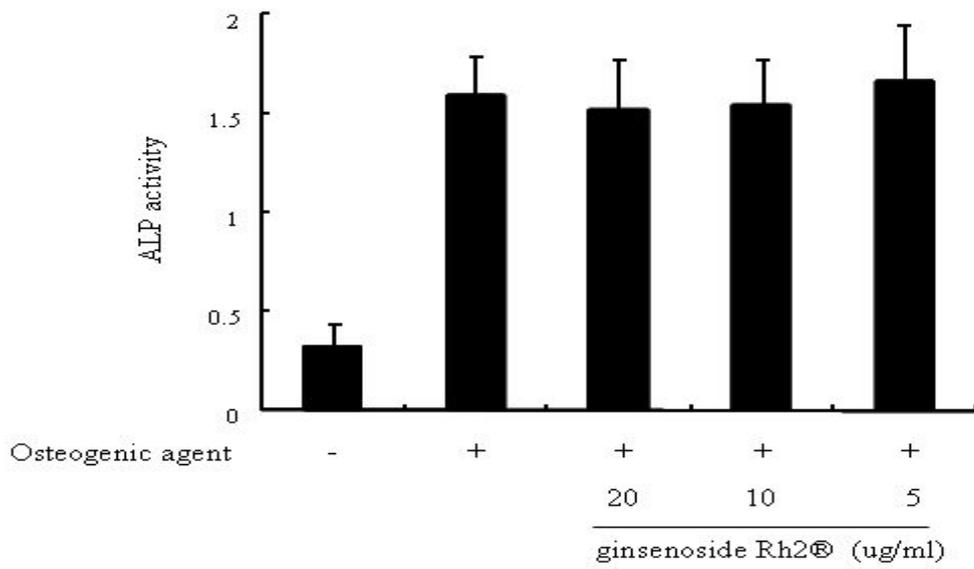
골세포는 M-CSF와 RANKL 두 가지 중요한 사이토카인에 의해 조혈모세포에서 파골세포로 분화된다. 조골세포에서 분비되는 RANKL은 Mitf, PU.1 그리고 NFATc1과 같은 전사인자들의 발현과 활성을 유도하여 파골세포의 분화를 촉진시킨다고 알려져 있다.

파골세포 분화의 중요 전사인자인 NFATc1과 OSCAR의 발현에 작용하는 신호전달계 조사를 위해 RT-PCR 방법을 이용하여 조사하였다. RANKL은 RANK에 결합하고 NFATc1의 발현을 증가시키고 뒤이어 TRAP와 OSCAR의 발현이 뒤 따른다. ginsenoside Rh2®은 RANKL만을 처리한 파골세포와 비교하였을 때 NFATc1, OSCAR, TRAP 그리고 RANK의 발현을 감소시킨다. (그림3)

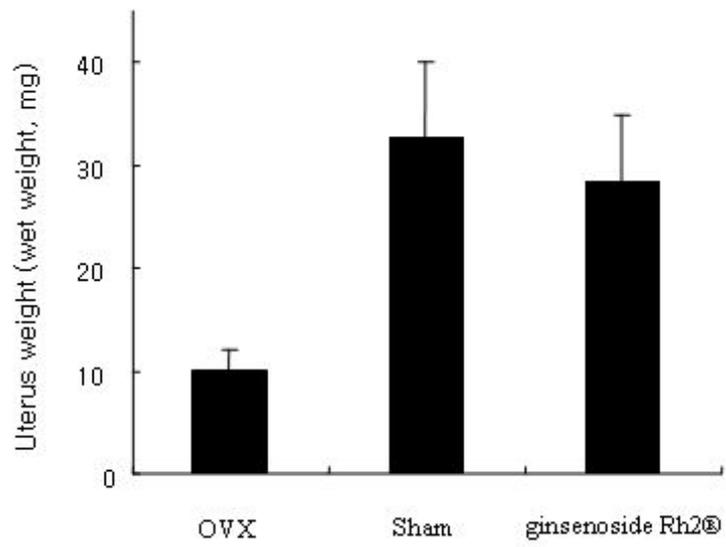
조골세포가 분비하는 TRANCE에 의해 파골세포의 분화가 촉진된다고 보고된 바 있다. 생리활성 물질이 TRANCE의 파골세포 분화 촉진 작용을 저해하는 중요도를 측정할 수 있는 하나의 지표를 제시할 수 있다. 또한, 실제로 사람의 인체 내에서는 조골세포와 파골세포의 균형 있는 분화과정이 중요하므로 상기와 같은 최적합 *in vitro* 모델은 천연물 유래 저해제의 항 골 질환에 적합한 모델이다. 추후에 동물 모델을 이용한 연구에 있어서도 적합한 동물모델을 선택하는데 중요한 지표를 제공한다. 따라서, ginsenoside Rh2®가 조골세포의 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 그림 4에서와 같이 ginsenoside Rh2®는 조골세포의 분화에 영향을 주지 않았고 파골세포의 분화에만 영향을 준다. 파골세포의 분화에 영향을 주는 골다공증 치료제의 가능성을 확인하였다.

3. 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과

이미 1차년도에서 동물 모델을 확립하였고, 2차년도에서는 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 골다공증 저해 효과를 검증하기 시작하였고 3차년도에는 마무리 할 계획이다. 각 6마리의 쥐를 사용하여 난자를 제거하기 전에 몸무게를 측정하고 마취제는 ketamine 80-100mg/kg/ xylazine 5-10mg/kg 을 IP로 쥐에 주사하였다. 마취된 쥐의 정중선을 절개하여, 복부 지방 밑에 위치한 자궁에서 Y자로 나누어진 수란관을 따라 그 끝에 위치한 분홍색의 난소를 적출 제거하였다. 6주후에 쥐를 sacrifice시켜 난자 제거를 확인하였다.



(그림 4) 조골세포 분화에서 ginsenoside Rh2®의 효과



(그림 5) 난소 절제 쥐, sham 쥐 그리고 ginsenoside Rh2® 투입한 쥐의 수란관의 무게

<그림5>와 같이 수란관의 무게와 크기가 난자를 제거한 OVX 쥐(negative control)에서 현저하게 낮아짐을 확인할 수 있었다. 또한 ginsenoside Rh2® 시료를 주입한 골다공증 모델 쥐의 수란관의 쥐에서 정상쥐 (Sham)의 수란관과 비슷한 크기로 재생되었음을 확인하였다. 쥐의 뒷다리 종아리 부위를 절개하고 살을 제거한 후에 난자를 제거한 쥐와(OVX) Sham 쥐의 trabecular bone에 대하여 microCT를 이용하여 BV (bone volume), 두께, 개수를 측정할 계획이다.

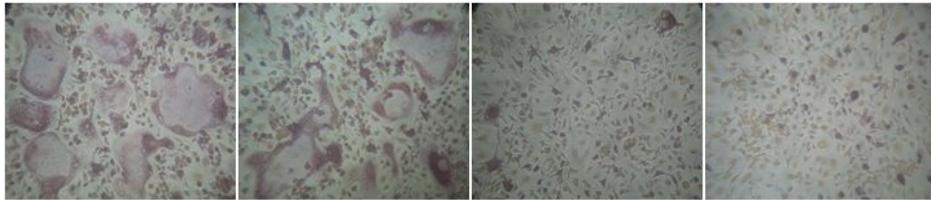
4. salubrinal을 이용한 파골세포 성장 저해 활성 규명

Salubrinal 은 ER stress 억제제로서 eIF2 α 의 탈인산화를 막아줌으로써 protein translation 을 조절해주는 작용으로 그 메카니즘이 잘 알려져 있다. ER stress 는 노화나 여러 가지 대사증후군에 많이 관여되어있고 새로운 치료타겟으로 많이 부상하고있다. 우리는 이러한 signal 에 관여하는 salubrinal 이 골대사증에 관여를 하는지 알아보기위해 상기 화합물에 대한 TRAP staining 을 통해서 osteoclast formation을 counting 했고 MTT assay 를 통해서 세포독성을 확인하였다. <그림6>에서 보여주듯이 5 μ M 에서부터 osteoclast 분화를 효율적으로 억제하는것을 발견하였다. 또한 세포독성을 체크해본결과 20 μ M까지 농도를 높였어도 세포독성은 보여지지 않았다. 이는 salubrinal 이 세포독성이 아닌 specific 하게 osteoclast 의 분화를 억제한다는 것을 증명해준다.

이러한 salubrinal 이 과연 어떤 메카니즘으로 작용을 하는지 알아보기 위해 RANKL signal 에 대한 연구를 진행하였다. RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand), 또는 TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) 로도 알려져 있는데 TNF- α superfamily 에 속한다. 이 signal 이 자극을 받으면 MAPK signal 을 포함한 다양한 cellular signal 을 통해 전사인자인 c-fos의 상향조절을 유도하고 이는 그 하위전사조절인자인 NFATc1 의 발현을 유도한다. NFATc1 은 골대사관련한 가장 중요한 조절인자로서 Osteoclast 분화와 활성화에 관여한 여러 가지 factor (OSCAR, TRAP... 등)의 발현을 조절함으로써 골대사증후군 치료제의 중요한 타겟으로 거론되고 있다.

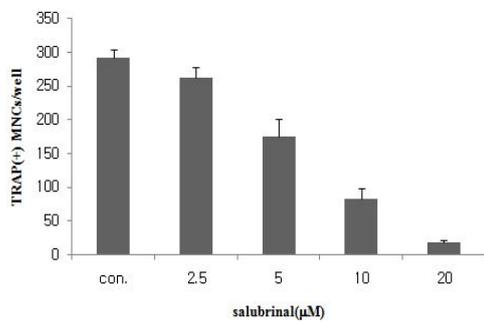
우리는 우선 salubrinal 이 어떤 경로를 차단하는지 알아보기 위해 PCR 을 통해서 관련 유전자의 발현정도를 측정하였다. <그림7>에서 보여주듯이 osteoclastogenesis 의 주요 인자인 OSCAR 와 TRAP은 RANKL 처리 후 time-dependent 하게 증가하는 양상을 보여줬고 이는 salubrinal 의 처리로 인해서 significant 하게 감소되는 양상을 확인하였다.

A

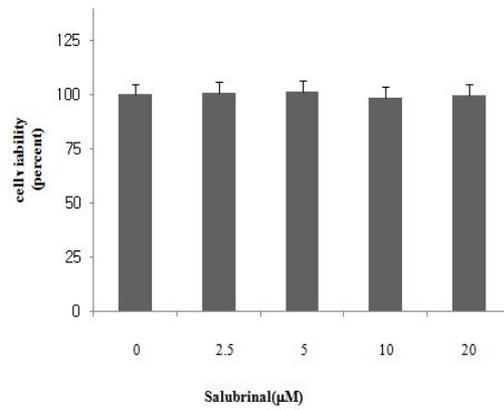


RANKL	+	+	+	+
salubrinal(μ M)	-	2.5	5	10

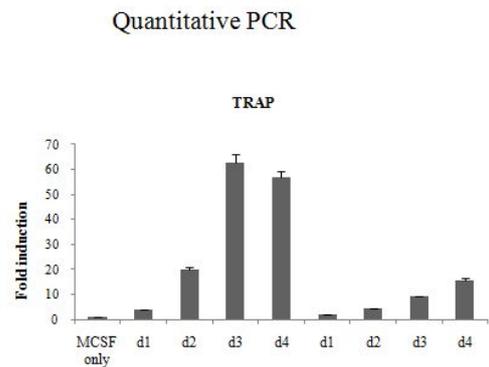
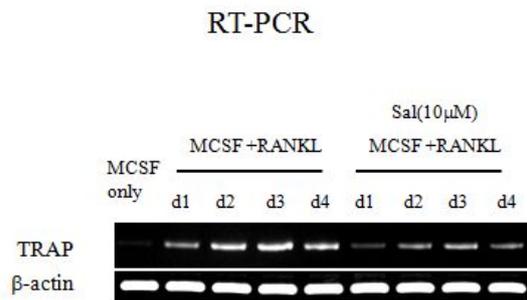
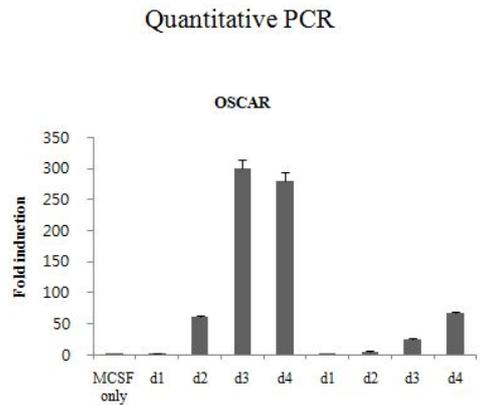
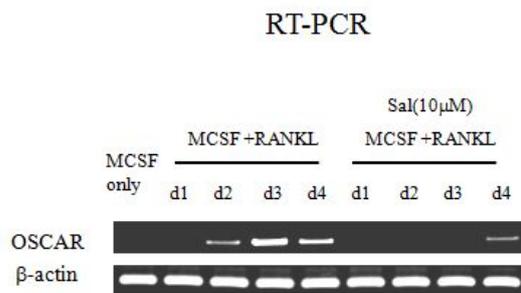
B



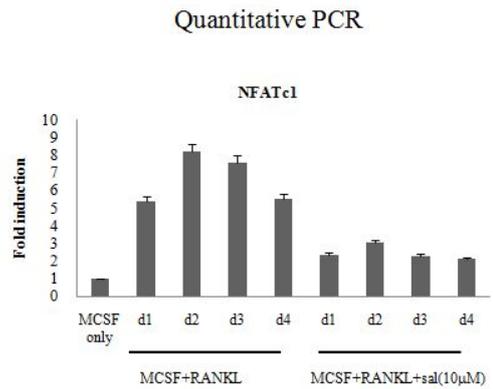
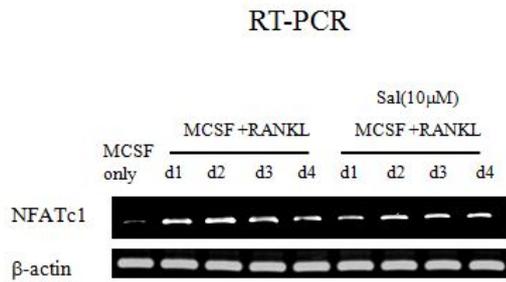
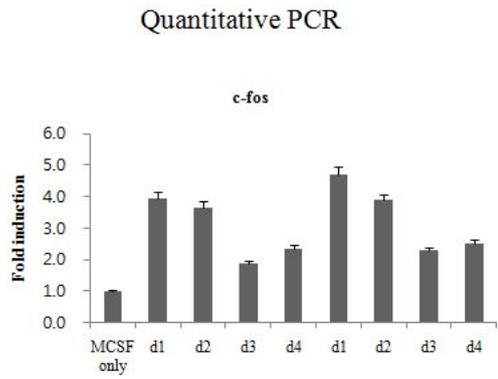
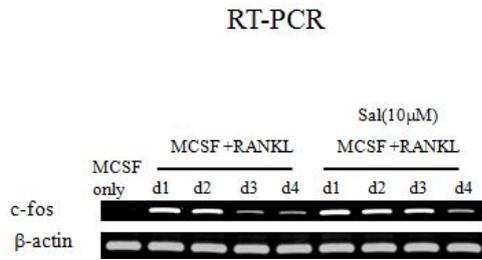
C



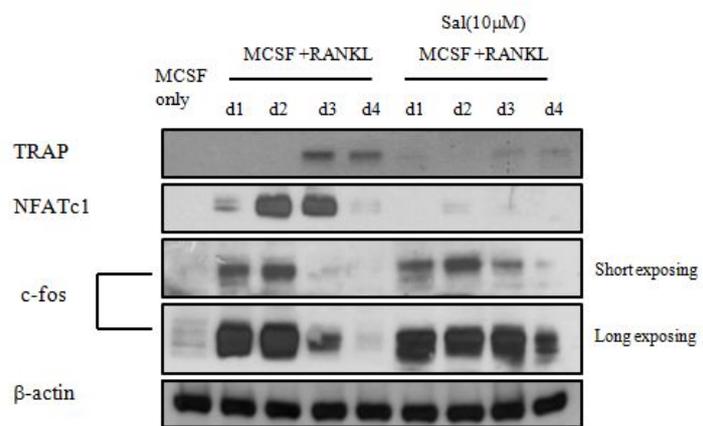
<그림 6> Salubrinal에 의한 파골세포 분화 저해 및 세포독성에의 영향



<그림 7> Salubrian1에 의한 OSCAR와 TRAP 발현



<그림 8> Salubrinal에 의한 c-랜와 NFATc1 발현



<그림 9> Salubrinal에 의한 단백질 발현 저해활성

OSCAR 와 TRAP 은 모두 Osteoclast 분화에 중요한 역할을 하는 단백질로서 이들 모두 transcription level에서 NFATc1 의 조절을 받는다. 그러므로 salubrinal이 이러한 OSCAR, TRAP의 상위 조절인자인 NFATc1 과 c-fos 의 발현을 관측하였다. <그림8>에서 보여주듯이 transcription level 에서의 NFATc1 유전자의 발현은 RANKL 에 의해서 증가되고 역시 salubrinal에 의해서 감소되는 것을 확인했지만 RANKL stimulation에 의해서 증가된 c-fos 유전자는 salubrinal에 의해서 영향을 받지 않는다는 것을 확인 하였다.

다음 protein level에서 위의 현상을 확인하기 위해 western blotting analysis 를 수행하였다. 결과에서 보여주듯이 TRAP, NFATc1 의 expression level 은 salubrinal 에 의해서 time-dependent 하게 감소되지만 그 상위조절인자인 c-fos 은 큰 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다(그림9). 이는 salubrinal 이 RANKL branch 에서 c-fos 의 down-stream 에 작용한다는 결론을 말해준다.

Salubrinal 은 eIF2 α 를 phosphorylation 시키는 메카니즘으로 잘 알려져있다. 또한 eIF2 α 가 phosphorylation 이 되면 global 한 protein translation 에 관여한다. 아울러 salubrinal 이 eIF2 α 를 통한 NFATc1 의 protein translation 에 영향을 주는게 아닌지 하는 가설을 염두에 두고 추가 실험 진행중이다.

뿐만 아니라 c-fos 는 발현이된후 phosphorylation 을 거쳐서 c-jun 이나 다른 partner 랑 complex 를 형성해야지만 활성을 잘 발휘한다. 또한 NFATc1 도 phosphorylation 을 통해서 nucleus translocation 여부가 결정이 된다. protein phosphatase inhibitor 로서 salubrinal 이 이러한 modification 을 통해서 위와같은 패턴을 유도할 가능성도 배제하지 못한다. Salubrinal 의 확실한 mechanism 을 밝혀내기위한 실험은 계속 진행중이다.

제5절 3차년도 연구수행 내용 및 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
활성물질 구조 최종 및 파골세포 분화 억제 규명	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼 추출물에서 분리된 13종의 물질에 대해 구조분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 3종의 사포닌 계열 물질이 각각 Rg2, Gh1, Rd로 추정되고 있으나 나머지 물질들은 지금까지의 사포닌 계열과는 다른 구조를 가질 가능성이 있음 • 약 1개월 정도 내에 모든 구조분석이 완료될 것으로 예상됨
	<ul style="list-style-type: none"> • Ginsenoside Rh2의 파골세포 분화 억제 기전 규명 	<ul style="list-style-type: none"> • Rh2가 TRAP assay에서 RANKL에 의한 파골세포 분화를 저해하였음 • ginsenoside Rh2는 파골세포의 독성 없이 분화만 저해함을 확인 • Rh2는 골다공증의 마커인 TRAP, OSCAR, NFATc1, c-fos의 발현을 감소시켰음 • Rh2는 MAPK 단백질 중에서 ERK 인산화를 선택적으로 억제하였고, NF-κB 활성화 경로도 영향을 주어 ERK-NF-κB 체계에 저해활성을 보이고 있음
	<ul style="list-style-type: none"> • RANKL을 주입한 쥐 동물모델에서 salubrinal의 효과 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • RANKL 처리에 의해 골밀도가 낮아지나 salubrinal은 이를 억제하여 골밀도가 다시 증가하였음 • Salubrinal의 연구결과를 J. Immunology에 투고 준비 중
파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • RANKL을 주입한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과를 입증함 • 난소를 제거한 동물실험에서 ginsenoside Rh2®를 처리한 경우 골밀도가 정상 수준으로 돌아옴을 확인

제6절 3차년도 연구결과

1. 흑삼 성분 구조분석을 위한 재료 및 방법

① 실험재료

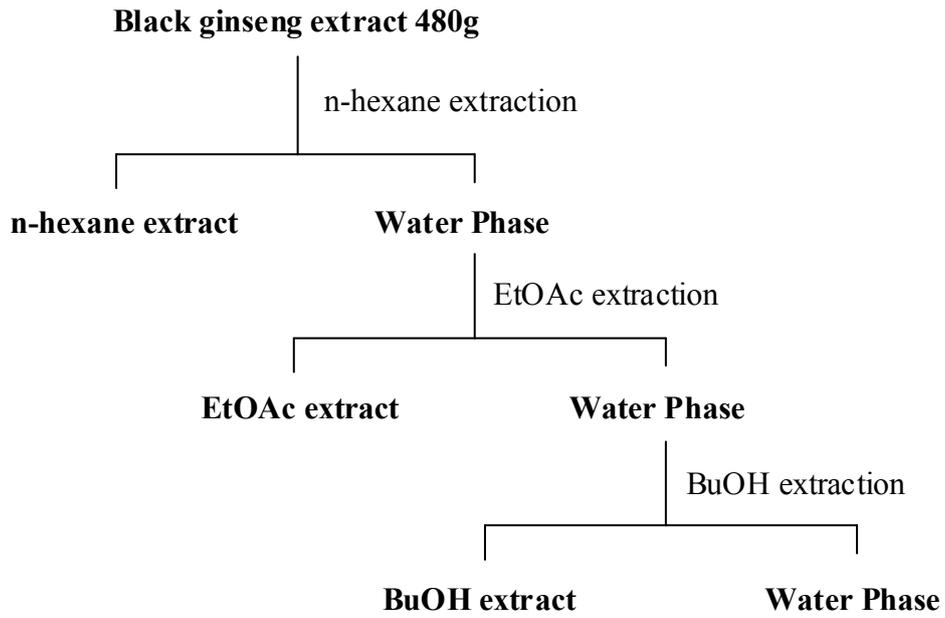
흑삼으로부터 골다공증 억제활성 물질을 분리 정제하기 위한 시료는 (주)흑삼코리아로부터 제공받은 구증구포 고려흑장삼정 제품 480g을 사용하였다.

② 시료 추출물 조제

액상형태의 고려흑장삼정 (이후 흑삼이라 표기) 480g을 약 40℃의 미지근한 증류수에 녹인 다음 이것을 분액 깔때기를 이용하여 그림1과 같은 과정을 통해 극성이 다른 유기용매를 사용하여 각각의 용매분획추출물을 제조하였다. 즉, 물에 녹인 흑삼용액을 분액추출에 사용할 용매 중 극성이 가장 낮은 n-hexane부터 차례로 추출하였다. 먼저 흑삼에 포함된 지방산과 같은 가장 극성이 낮은 물질을 추출해내기 위하여 n-hexane과 물로 분액 추출하여 n-hexane 추출물을 제조하고, 남은 물층에 에틸아세테이트(EtOAc)를 가하여 3회 추출하여 상층의 에틸아세테이트 추출분획을 얻었다. 하층의 물분획을 다시 부탄올(BuOH)을 첨가하여 같은 방법으로 추출하여 부탄올 추출분획을 제조하였다. 제조된 용매추출분획에 대하여 마우스 파골세포 분화 억제활성 측정하였으며 (그림 1, 표 1), 이들 중 강한 활성을 나타내는 EtOAc 추출물, BuOH 추출물 및 물 추출분획 중 수삼으로부터 구증구포의 흑삼의 제조과정 중에서 주로 극성물질이 비극성 물질로 전환되는 특성을 고려하여 이들 분획 중 인삼으로부터 흑삼의 제조과정에서 새로 생성되었을 가능성이 높은 가장 비극성 부분인 EtOAc 추출물에 대한 활성물질의 분리 정제를 실시하였다.

③ 파골세포 분화억제활성 물질의 분리

흑삼의 EtOAc 추출물로부터 활성물질의 분리 및 정제는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피, 역상 칼럼 크로마토그래피, 순상 TLC, 역상 TLC 및 HPLC 등을 이용하여 순수 분리 정제하였다. 이때 각 분리 정제 단계마다 얻어진 분획들에 대하여 마우스 파골세포 분화억제 활성을 측정하여 활성분획을 확인하는 과정을 거치는 activity-guided fractionation에 따라 분리 정제를 수행하였다



<그림 1> 흑삼 추출물로부터 각각의 용매추출분획의 제조.

<표 1> 흑삼의 유기용매 추출물의 마우스 파골세포 분화억제활성

	n-hexane 추출물	EtOAc 추출물	BuOH 추출물	물층
활성도	-	++	+++	+

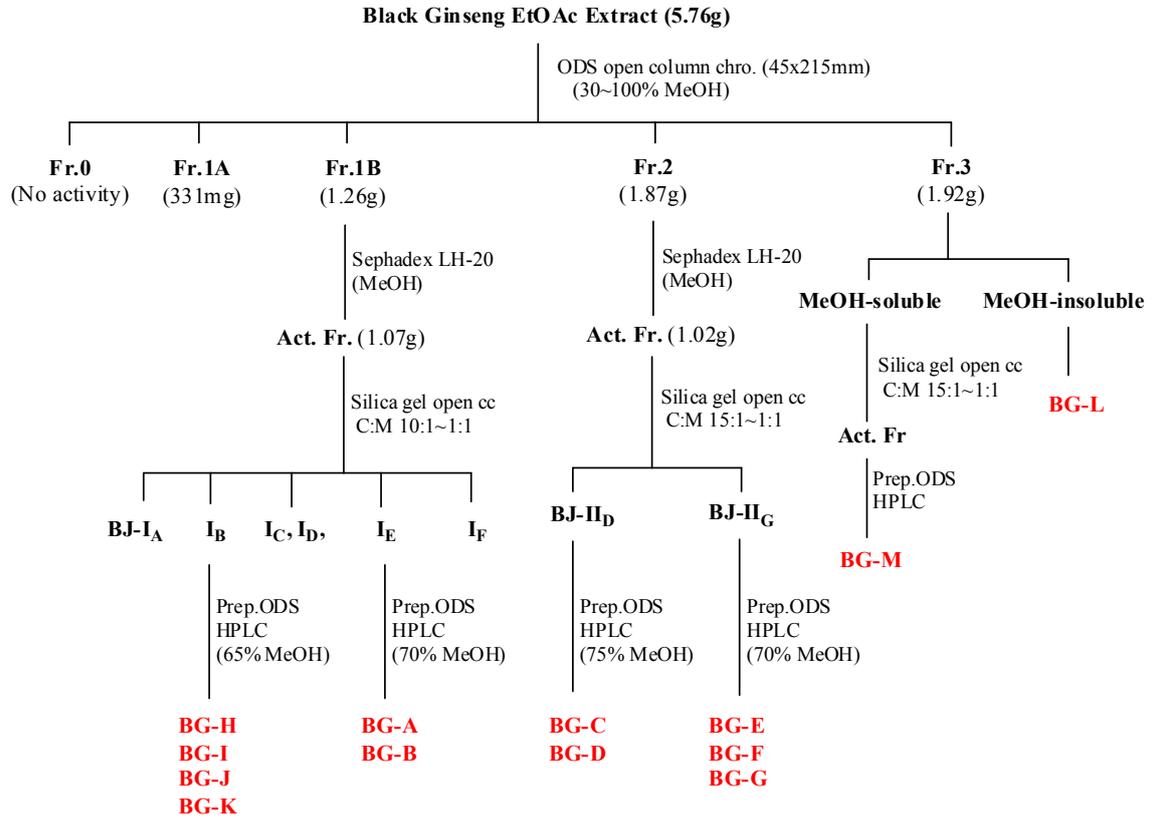
2. 파골세포 분화 실험 방법

- ① mouse 뒤다리중 tibia 와 femur 부분을 잘라내고 근육조직을 발라낸뒤 1ml 주사기로 골수를 채취한다.
- ② 5ml red-blood cell rising buffer 로 세포를 잘 섞은뒤 상온에서 10분간 방치한다.
- ③ 1000rpm에서 5분 돌린후 MCSF 30ng/ml 들어있는 MEM 배지에 넣고 petri-dish 에서 3일간 배양한다.
- ④ 3일뒤 바닥에 붙어있는 세포들만 cell dissociation solution으로 모아서 1000rpm에서 5분동안 원심분리기에서 돌린후 분화 유도를 시작한다.
- ⑤ MCSF 30ng/ml, RANKL 25ng/ml 넣고 다시 3일동안 incubator에서 키운다.
- ⑥ 3~4일 지나 배지를 버리고 TRAP staining 을 진행하고 분화된 osteoclast를 counting

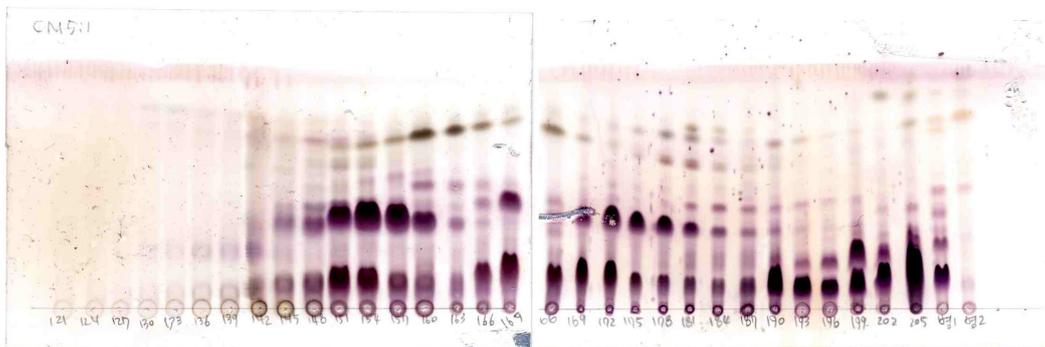
3. 흑삼의 EtOAC 추출물로부터 마우스 파골세포 분화억제활성 물질의 분리

흑삼 EtOAC 추출물로부터 마우스 파골세포 분화억제활성 물질의 분리는 (그림2)와 같은 과정을 통하여 실시하였다. 먼저 EtOAC 추출물 5.76g을 소량의 메탄올에 용해한 다음 이것을 30% 메탄올을 용매로 한역상의 ODS resin이 충전된 open 칼럼 (45mm I.d. x 215mm)에 로딩한 다음 30% 메탄올부터 100% 메탄올까지 점진적으로 메탄올 함량을 높인 용매로 용출하는 역상 ODS 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과 얻어진 각 분획들을 실리카겔 TLC (클로로포름:메탄올 = 5:1)를 실시한 후 황산발색을 하여 확인하였으며 (그림3), 아울러 이들 분획들의 마우스 파골세포 분화억제 활성을 측정하여 활성분획을 확인하였다 (그림4, 그림5).

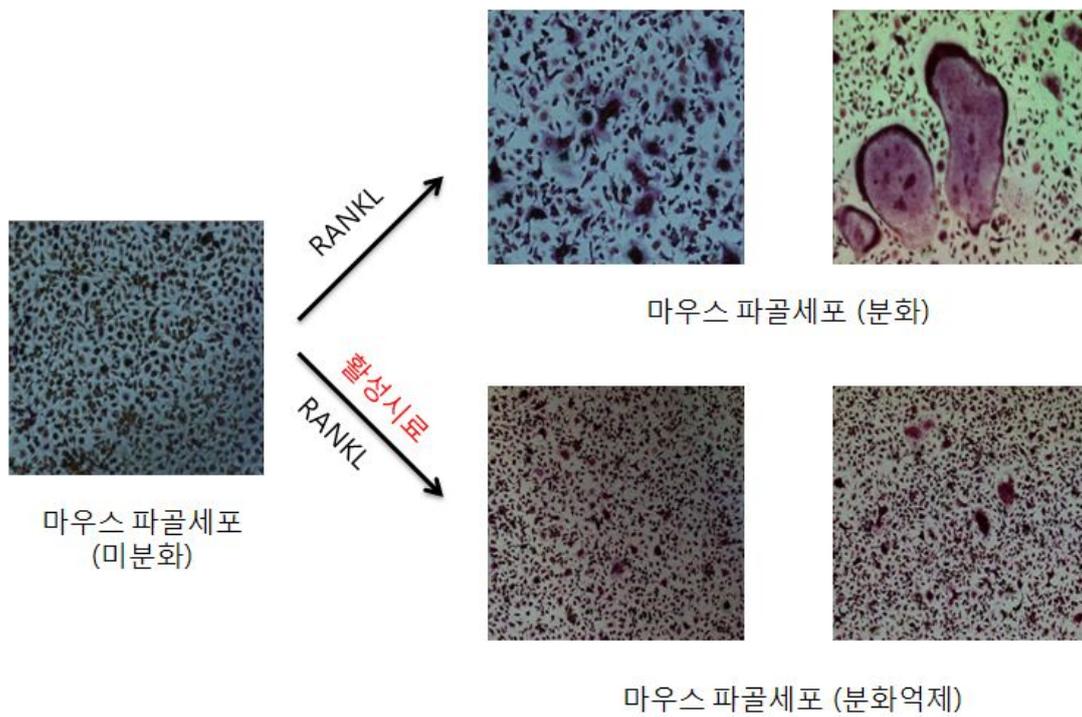
그 결과 TLC 상에서 분리되어 나타나는 물질들은 UV lamp 하에서는 물질의 스팟이 전혀 보이지 않았으나, 황산발색에 의해서는 확연하게 나타나 보였다. 이로 미루어 이들 활성물질들은 발색단이 없는 물질로서 인삼의 주성분인 ginsenoside 중 비극성 화합물일 가능성이 있는 것으로 추정되었다. 따라서 이후 분리 정제과정에서 TLC분석에 의한 활성물질의 확인은 황산 발색을 통해 확인하였다. 또한 각 분획에 대한 파골세포 분화억제 활성을 측정한 결과 역상 칼럼 크로마토그래피의 결과 앞부분의 분획 (Fr. 0)에서는 활성이 전혀 나타나지 않았으며, 활성을 나타내는 분획들은 주로 뒷부분의 분획들이었다. 활성평가 결과 및 TLC 결과를 토대로 활성분획들을 크게 4개의 분획 (Fr. 1A, Fr. 1B, Fr. 2, Fr. 3)으로 나누었으며, 이들 분획들에 대하여 그림 2와 같은 과정을 통해 흑삼으로부터 마우스파골세포 분화억제 활성물질들을 분리 정제하였다.



<그림 2> 흑삼 에틸아세테이트 추출물로부터 마우스 파골세포분화억제 활성물질의 분리과정.



<그림 3> 흑삼 EtOAc 추출물 분획의 ODS open 칼럼 크로마토그래피 실시 후 얻은 분획들의 실리카겔 TLC 결과. (전개용매; 클로로포름:메탄올 5:1, 황산 5% 발색)



<그림 4> 마우스 파골세포 분화억제 활성 평가

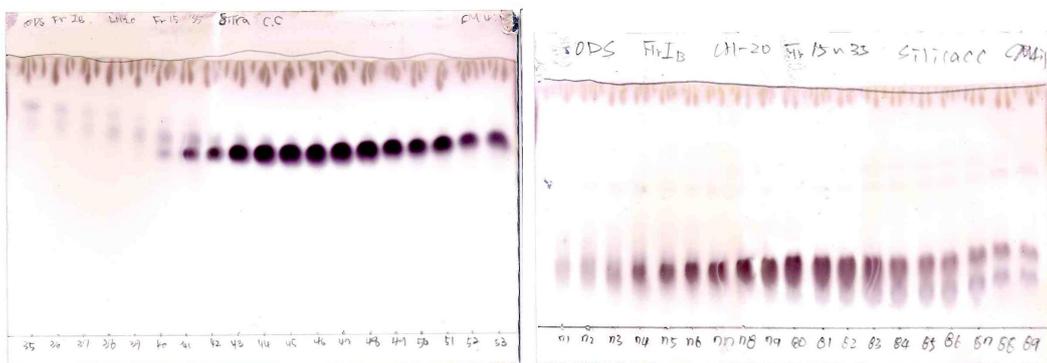


<그림 5> 흑삼 EtOAc 추출물 분획의 ODS open 칼럼 크로마토그래피 실시 후 얻은 분획들의 마우스 파골세포 분화억제 활성 평가결과.

먼저 Fr. 1B 분획 1.26g을 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 활성분획 1.07g을 모았다. 활성분획의 실리카겔 TLC를 실시하여 활성물질들의 프로파일을 확인 후 클로로포름:메탄올(C:M) 10:1에서 1:1까지 용매의 극성을 올리면서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이렇게 하여 얻어진 각 분획들에 대하여 실리카겔 TLC (C:M 5:1)를 하여 TLC 결과(그림 6)를 토대로 BG-I_A부터 BG-I_F까지 6개의 분획으로 나누어 각각 모았다. 이들 중 활성이 우수한 BG-IB와 BG-I_E 분획에 대하여 ODS-HPLC 분석을 실시하여 이들 분획의 HPLC 프로파일을 확인하였다. 이때 HPLC 분석조건은 표 2와 같으며, 향후 활성물질의 분리 정제과정에서 실시한 모든 HPLC 분석실험은 표2와 같은 조건에서 실시하여 각 활성물질들간의 retention time (RT)을 비교하였다. 이들 HPLC 분석결과를 바탕으로 각 분획들에 대하여 분취용 HPLC 칼럼(Cosmosil 5C18 MS-II, 20x250mm)을 사용하여 HPLC 분취를 수행하였다.

BG-I_E 분획에 대하여 HPLC 분석결과 (그림 7)를 바탕으로 70% 메탄올을 용매로 하여 ODS-HPLC 분취 (칼럼; Cosmosil 20x150mm, 5 μ , Flow rate; 7.0 ml/min, UV 210nm)를 수행하였다. 이로부터 RT 16.4분에서 순수하게 분리된 활성화합물 BG-A (123mg)과 RT 19.14분에서 BG-B (152mg)을 각각 얻었다. BG-IB 분획에 대해서 HPLC 분석결과 (그림 8)를 참고로 65% 메탄올을 용매로 하는 ODS-HPLC 분취를 수행하여 순수하게 분리된 4개의 화합물 BG-H (65mg, RT 53.55min), BG-I (3mg, RT 42.99min), BG-J (3mg, RT 27.60min), BG-K (8mg, RT 40.24min)를 얻었다.

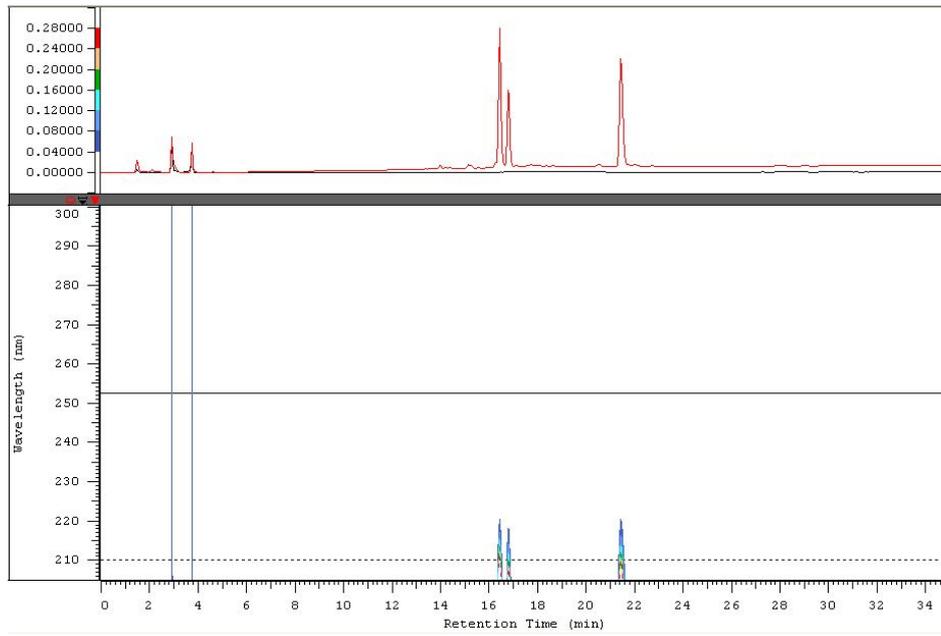
분획 Fr.2 (1.87g)을 메탄올을 용출용매로 하여 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 활성분획 1.02g을 모았다. 활성분획의 실리카겔 TLC를 실시하여 활성물질들의 TLC 프로파일을 확인하였으며(그림 9), 분획물을 다시 클로로포름:메탄올(C:M) 15:1에서 1:1까지 용매의 극성을 올리면서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 칼럼 크로마토그래피 후 얻어진 각 분획들에 대하여 실리카겔 TLC (C:M 5:1)를 하여 그 결과로부터 각 분획들을 나누었으며, 이들 중BG-II_D와 BG-II_G 두 개의 활성분획에 대하여 .ODS-HPLC 분석을 실시하였다 (그림 11). BG-II_D 분획을 ODS-HPLC 분취 (용매; 75% 메탄올, 유속; 7.0 ml/min)를 행하여 활성화합물 BG-C (23mg)와 BG-D (76mg)을 각각 분리하였다. BG-II_G 분획으로부터는 ODS-HPLC 분취 (용매; 70% 메탄올, 유속; 7.0 ml/min)를 행하여 활성화합물 BG-E (15mg), BG-F (11mg) 및 BG-G (30mg) 세 개의 화합물을 순수 분리하였다.



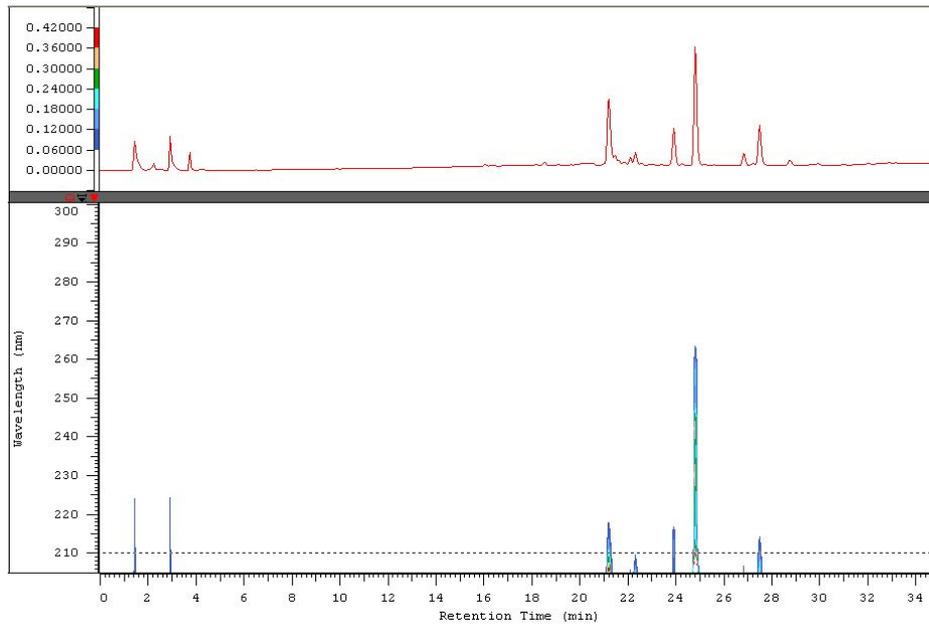
<그림 6> 흑삼 Fr. 1B 분획의 Sephadex LH-20 칼럼 크로마토그래피 후 얻은 활성 분획물의 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 실시 후의 실리카겔 TLC 결과. (전개용매; 클로로포름:메탄을 4:1, 황산 5% 발색)

<표 2> HPLC 분석 조건

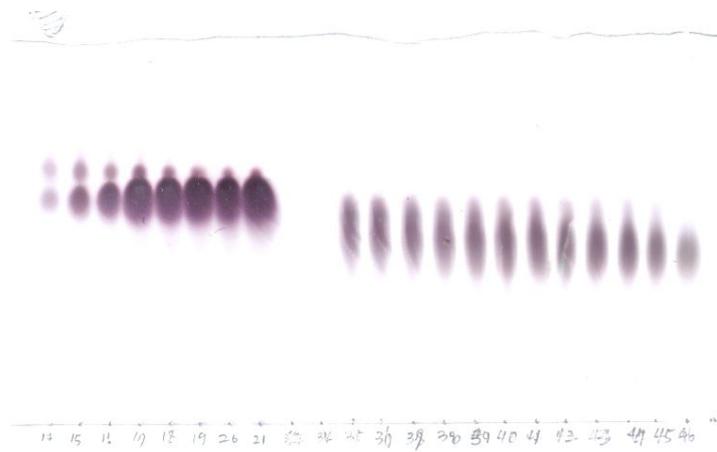
Column	YMC 5C18-AR-II (4.6 x 250mm)		
Mobile phase	Gradient		
	Time (min)	Acetonitrile (%)	H ₂ O (%)
	0	20	80
	30	80	20
	35	100	0
Flow rate	1.0ml/min		
Detector	Photodiode Array Detector and UV 210nm		
Injection volume	10 μ l		



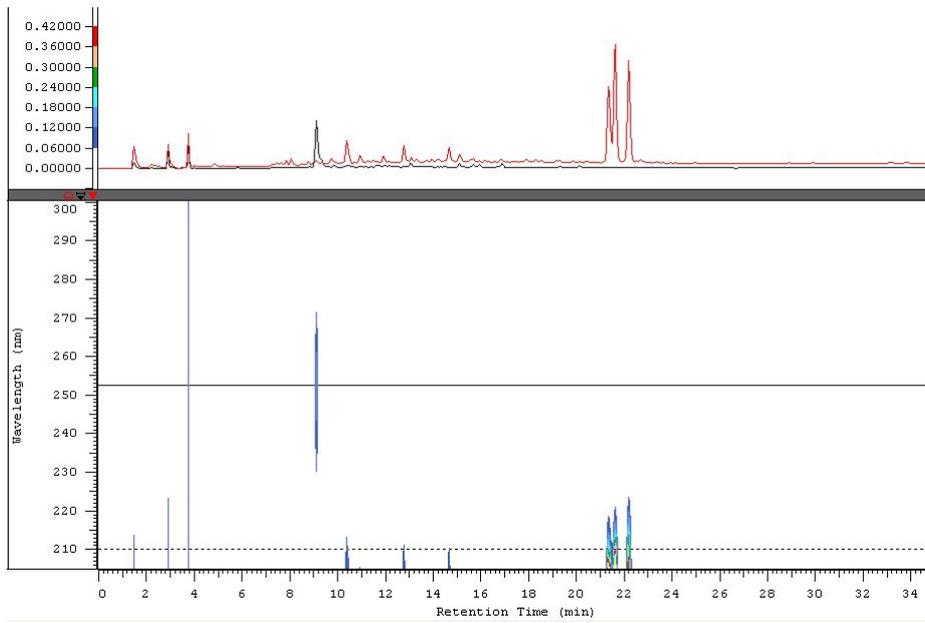
<그림 7> BG-I_E 분획의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).



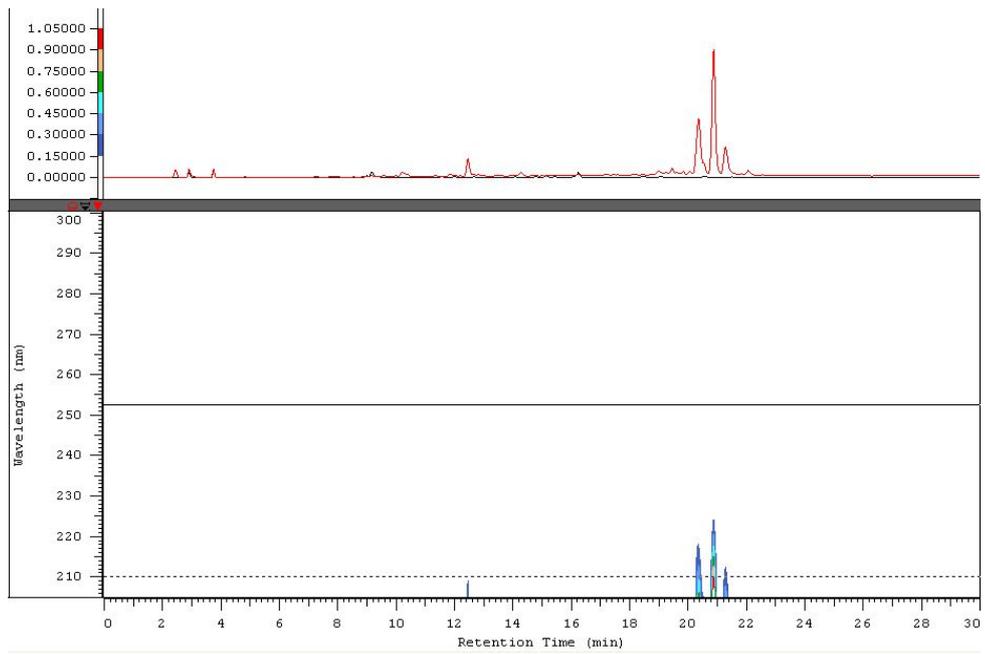
<그림 8> BG-IE 분획의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).



<그림 9> 흑삼 BG-II_D 분획의 실리카겔 TLC 분석결과. (전개용매; 클로로포름:메탄올 4:1, 황산 5% 발색)



<그림 10> BG-II_D 분석의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).



<그림 11> BG-II_G 분석의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).

흑삼 EtOAc 추출물의 역상 칼럼 크로마토그래피 분획물 중 가장 비극성 분획인 Fr.3 (1.92g)을 메탄올에 녹는 부분과 녹지 않는 부분으로 나누었다. 메탄올에 용해되지 않는 부분 중 일부를 HPLC 분석을 실시한 결과 (그림 12) 순도 95% 이상임을 확인하였으며, 따라서 더 이상의 정제를 하지 않고 구조분석을 위한 NMR 및 Mass 분석 시료로 사용하였다.

메탄올에 녹는 부분을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 메탄올-클로로포름 15:1부터 1:1 용매로 용출한 후 활성분획을 모아 HPLC 분석을 실시한 후 (그림 13) HPLC로 분취하여 활성 화합물 BG-M (8.3 mg)을 분리하였다.

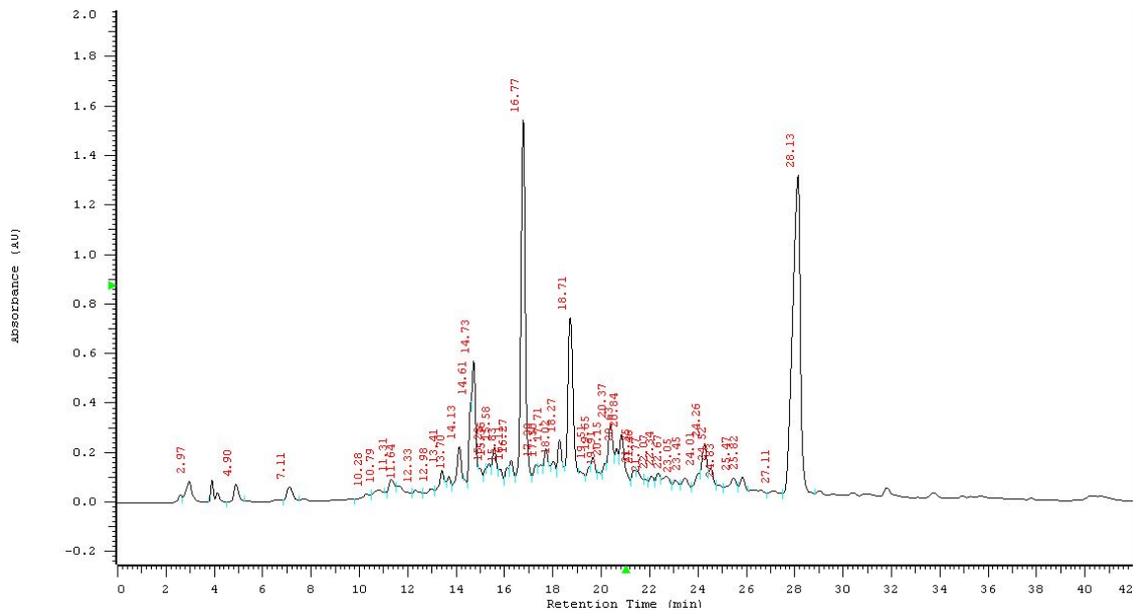
4. 마우스 파골세포 분화억제 활성물질의 규명

흑삼의 EtOAc 추출물로부터 순수 분리 정제된 13종의 활성화합물들에 대한 규명을 위하여 NMR 및 Mass spectrometer를 이용한 기기분석을 실시하였다. 먼저 ^1H 및 ^{13}C NMR 분석결과 이들 화합물은 ginsenoside 화합물들인 것으로 추정되었다. 따라서 NMR 및 Mass 분석과 함께 인삼의 ginsenoside 표준물질의 HPLC 분석을 실시하여 흑삼에서 분리한 활성 화합물들의 HPLC 분석결과와 비교분석 하였다.

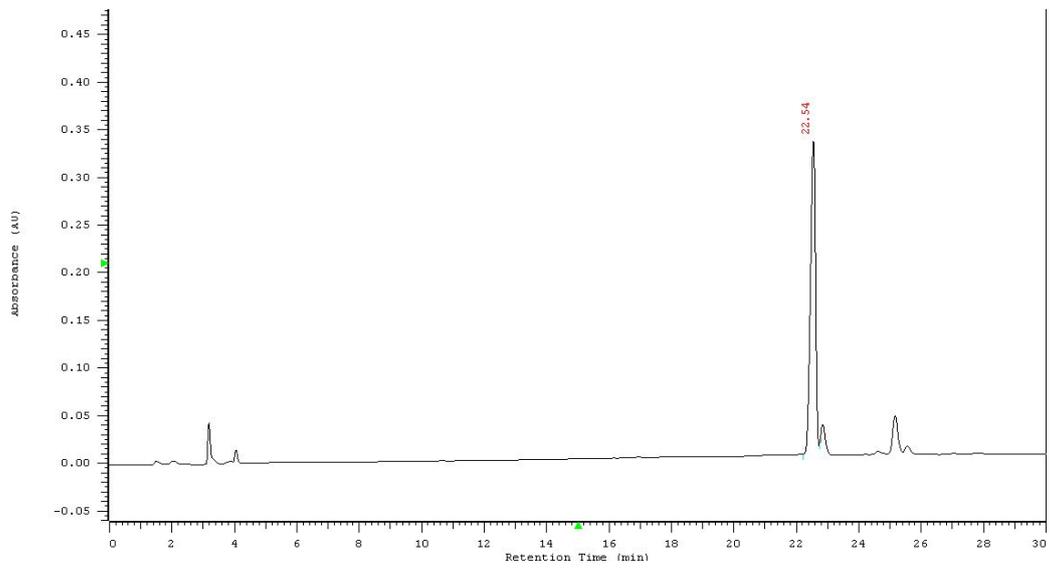
먼저 각 화합물들은 흰색의 분말 형태로서 UV-Visible 스펙트럼에서 특이한 광흡수 파장을 나타내지 않았으며 표준 화합물과 대조한 후 상이한 화합물에 대한 자세한 구조분석은 다양한 1-D 및 2-D NMR 분석과 Mass 분석 및 물리화학적 성질의 규명을 통해 이루어졌다.

Ginsenoside 표준화합물 Rg1, Rg2, Rb2, Rb3, Rg1, Rg2, Rd, Ck, F1, 및 protopanaxadiol 등 10종의 화합물에 대한 역상 ODS HPLC 분석(분석조건은 표 2 참조)을 실시하여 그림 14와 같은 HPLC 프로파일을 얻었다. 흑삼으로부터 분리한 활성화합물 13종에 대한 HPLC 프로파일 또한 표준화합물과 같은 조건에서 HPLC를 실시하여 그림 15와 같은 HPLC 프로파일을 얻었다.

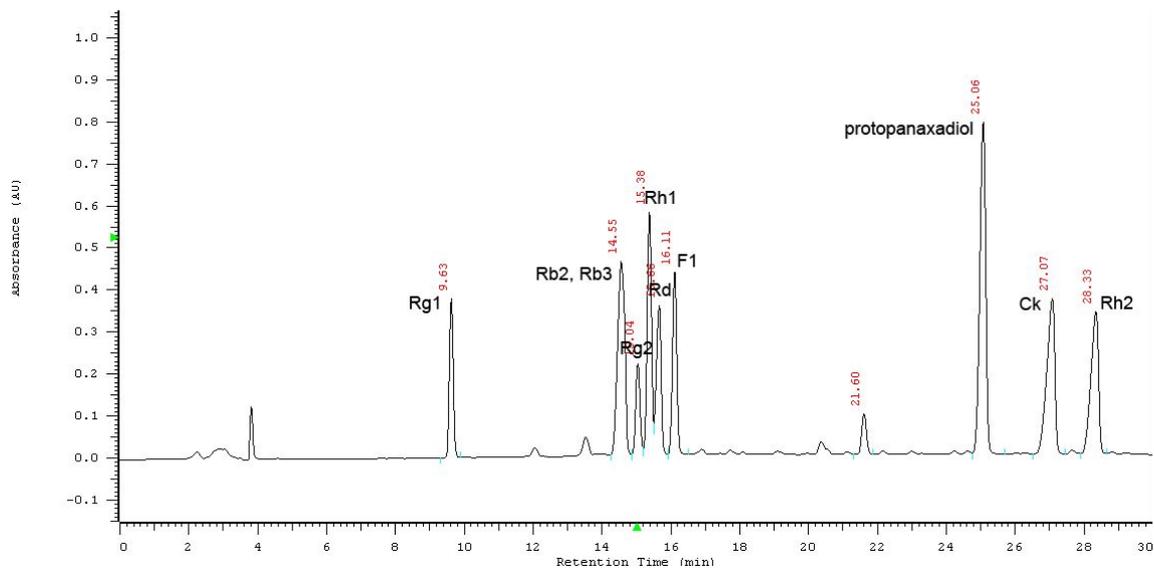
Ginsenoside 표준물질과 흑삼으로부터 분리된 화합물들의 HPLC 분석 프로파일을 비교한 결과를 (표3)에 나타내었다. 분리된 13종의 화합물 중 표준물질과 매우 유사한 HPLC retention time(RT)을 나타내는 화합물은 BG-A, BG-B 및 BG-M 세 화합물이었다. 즉, BG-A의 RT는 15.03분으로 ginsenoside Rg2의 15.04분과, BG-B 화합물의 RT는 15.67분으로서 ginsenoside Rd의 15.66분과 거의 일치하였다. BG-M 화합물의 RT 15.39분 역시 ginsenoside Rh1의 15.38분과 같아, HPLC 분석결과 13종의 화합물 중 이들 세 화합물 이외에는 RT에서 큰 차이를 보여 대표적인 ginsenoside와는 다른 종류의 화합물로 추정되었다.



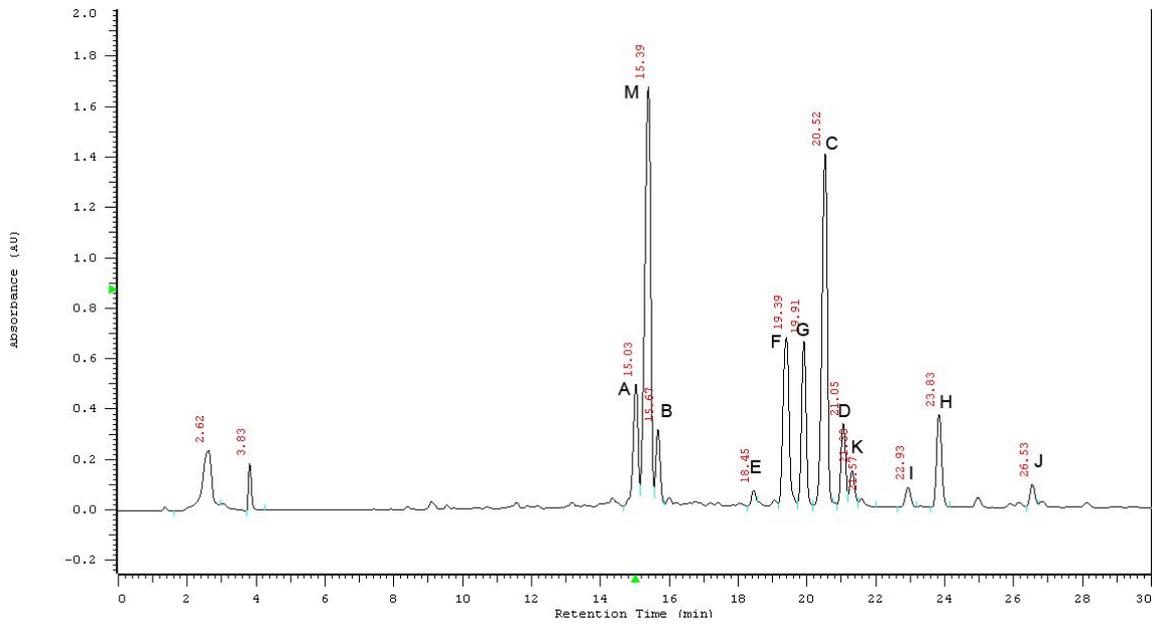
<그림 12> Fr.3의 메탄올 가용성분획의 ODS-HPLC 분석프로파일.



<그림 13> Fr.3의 메탄올 불용성분획의 ODS-HPLC 분석프로파일.



<그림 14> Ginsenoside 표준화합물의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).



<그림 15> 분리된 화합물의 ODS-HPLC 분석 프로파일 (분석조건 표2 참조).

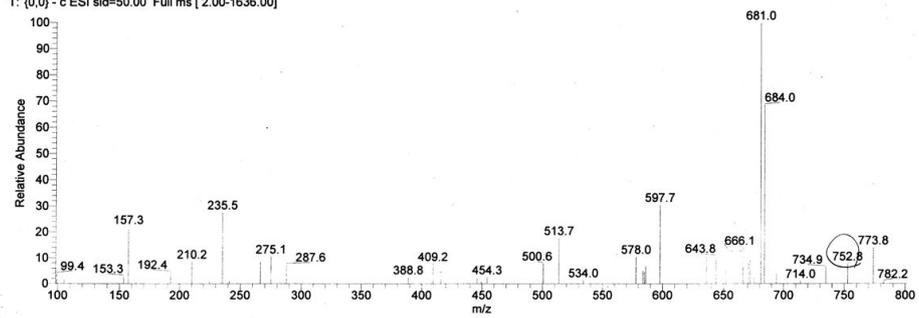
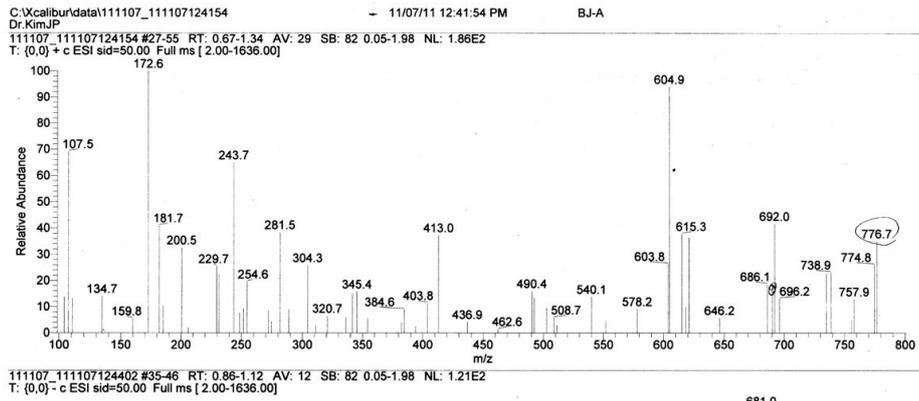
<표 3> Ginsenoside 표준 화합물 및 흑삼으로부터 분리된 화합물들의 HPLC 분석결과

R.T(min)	Reference compounds	isolated compounds
9.63	Rg1	
14.55	Rb2, Rb3	
15.03	Rg2	BG-A
15.39	Rh1	BG-M
15.67	Rd	BG-B
16.11	F1	
18.45		BG-E
19.39		BG-F
19.91		BG-G
21.30		BG-K
22.93		BG-I
23.83		BG-H
25.06	protopanaxadiol	
26.53		BG-J
27.07	Ck	
28.33	Rh2	

흑삼의 EtOAc 추출물로부터 순수 분리 정제된 활성 화합물들에 대한 화학구조 규명을 위하여 NMR 및 Mass spectrometer를 이용한 기기분석을 실시하였다.

BG-A 화합물은 흰색의 분말로 얻어졌으며, UV 스펙트럼에서는 특정한 파장의 흡수를 나타내지 않고 203nm에서만 end absorption을 나타냄으로써 ginsenoside 화합물과 같이 UV-Vis. 영역의 빛을 흡수할 수 있는 발색단을 갖지 않는 화합물임을 알 수 있었다. 본 화합물의 ESI-MS 분석결과 (그림 16, 표 4) $[M+Na]^+$ ion peak가 m/z 776.7에서, $[M-H]^-$ ion peak가 m/z 752.8에서 관측되어 본 화합물의 분자량은 754로 추정되었다. 이는 HPLC 분석결과 동일한 RT를 나타낸 ginsenoside Rg2 ($C_{42}H_{72}O_{13}$, 분자량 785)와는 분자량이 다르게 나타나서 서로 다른 화합물인 것으로 확인 되었다. 특히, BG-A 화합물의 1H (그림 17) 및 ^{13}C -NMR (그림 18) 스펙트럼은 전형적인 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 보였다. 1H -NMR 스펙트럼에서는 δ_H 4.34에서 1개의 당에서 유래한 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 8개의 methyl proton이 δ_H 0.93~1.67에서 각각 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼을 분석한 결과 δ_C 16.1, 17.0, 17.6, 17.7, 17.9, 25.9, 26.5, 34.4에서 8개의 methyl 탄소, δ_C 105.4에서 당분자 1개에서 유래한 anomeric carbon이 관측됨으로써 본 화합물은 1개의 당분자를 포함한 화합물임을 알 수 있었으며, DEPT 스펙트럼 (그림 19) 분석결과 8개의 CH_3 , 9개의 CH_2 , 13개의 CH 및 6개의 4급 탄소를 포함하는 36개의 탄소로 구성된 ginsenoside임을 알 수 있었다. 본 화합물의 정확한 구조분석을 위하여 COSY, TOCSY 및 HMBC 등 다양한 2D NMR 분석을 실시하여 분석 중에 있다.

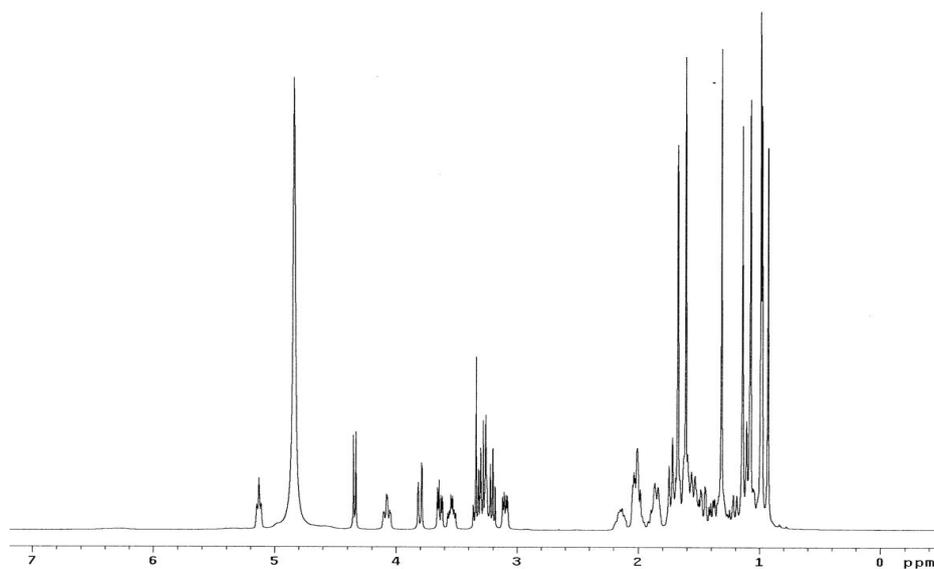
BG-B 화합물도 흰색의 분말로 얻어졌으며, UV 스펙트럼에서는 특정한 파장의 흡수를 나타내지 않고 203 nm에서만 end absorption을 나타냄으로써 BG-A 화합물과 유사한 성질을 나타내는 ginsenoside 화합물임을 알 수 있었다. 본 화합물의 ESI-MS 분석결과 (그림 20, 표 4) m/z 662.9에서 $[M+Na]^+$ ion peak가, m/z 639.0에서 $[M-H]^-$ ion peak가 각각 관측되어 본 화합물의 분자량은 640으로 추정되었다. 이는 HPLC 분석결과 동일한 RT를 나타낸 ginsenoside Rd ($C_{48}H_{82}O_{18}$, 분자량 947)와는 분자량이 크게 다르게 나타남으로써 서로 상이한 화합물인 것으로 확인 되었다. BG-A 화합물의 1H (그림 21) 및 ^{13}C -NMR (그림 22) 스펙트럼은 BG-A 화합물의 그것들과 매우 유사한 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 보였다.



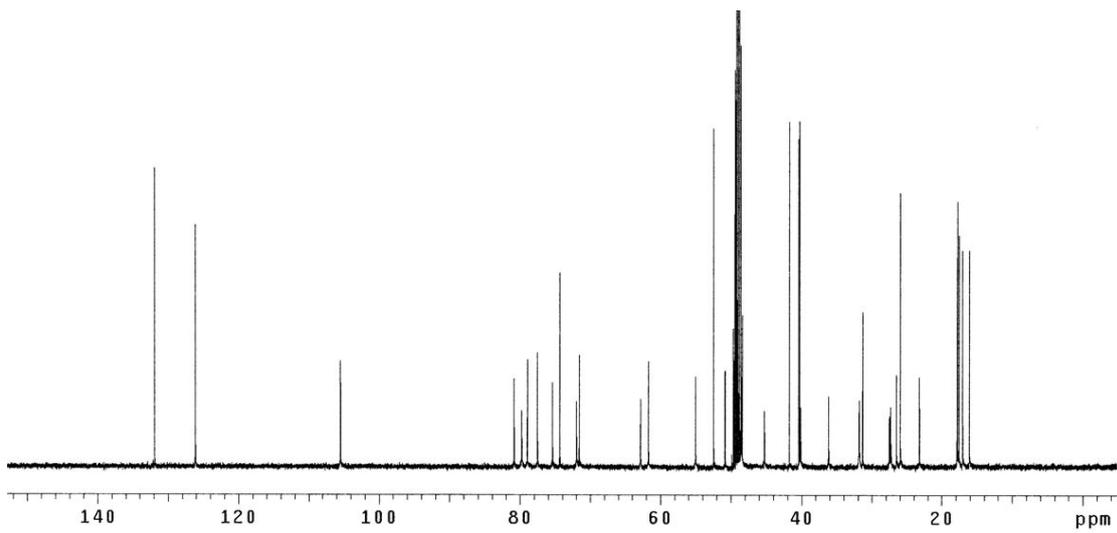
<그림 16> BG-A 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.

<표 4> 흑삼으로부터 분리한 마우스 파골세포 분화억제 활성 화합물의 ESI-MS 분석결과

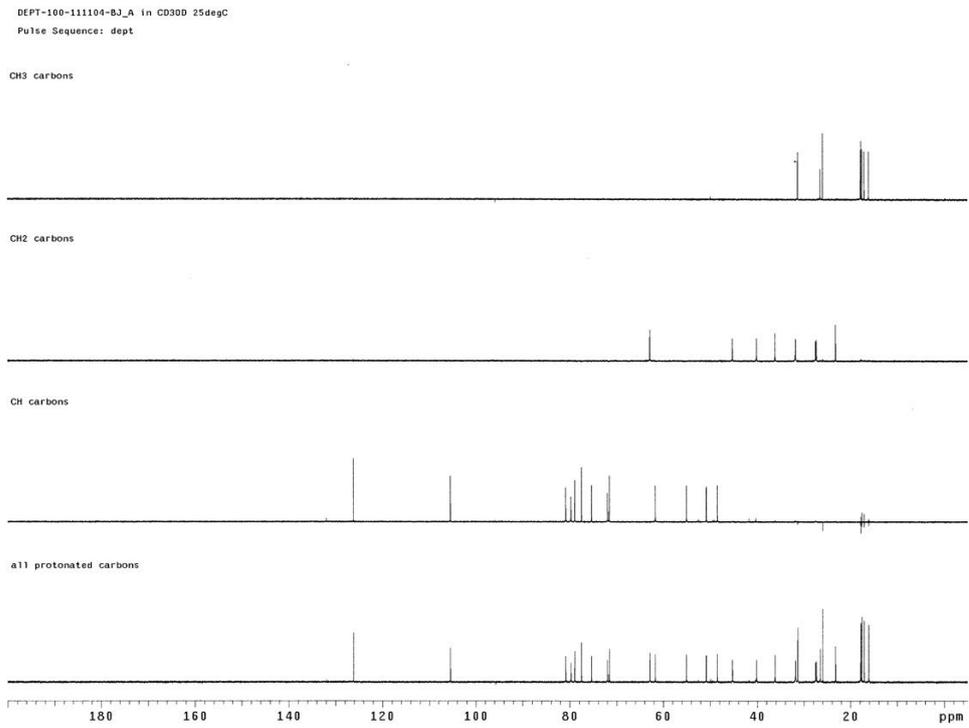
Compound	MS [M + Na] ⁺ , m/z	MS [M - H] ⁻ , m/z	분자량
A	776.7	752.8	754
B	662.9	639.0	640
C	644.9	620.9	622
D	643.8	619.9	621
E	791.8	767.9	769
F	823.8	799.9	801
G	791.8	767.9	769
K	770.3	746.0	747
M	823.6	799.7	801



<그림 17> BG-A 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



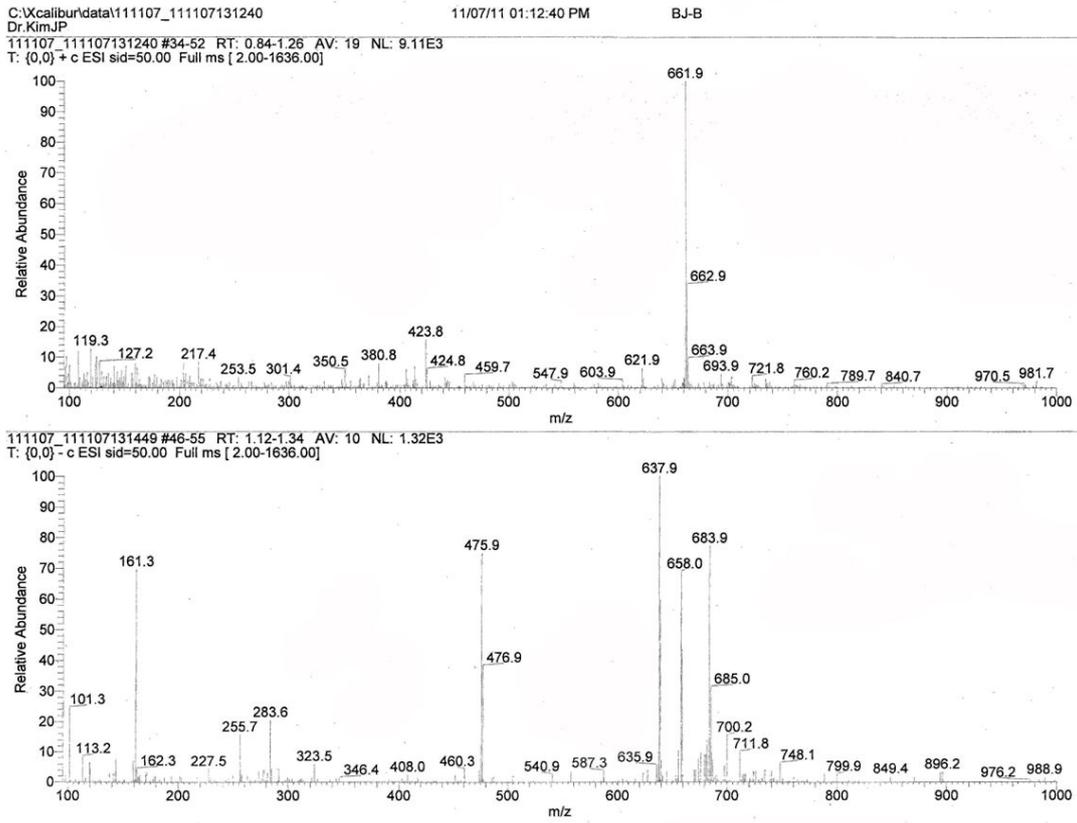
<그림 18> BG-A 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).



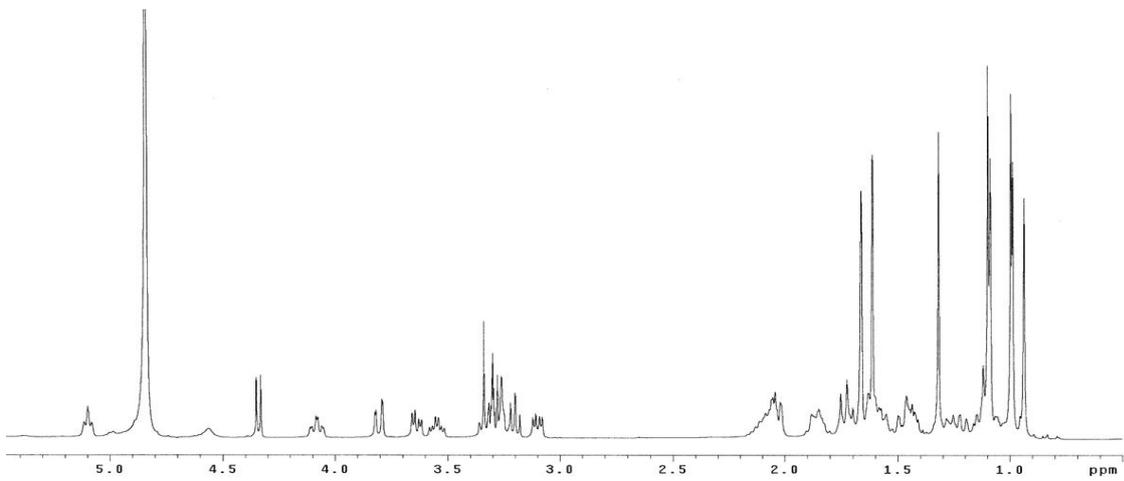
<그림 19> BG-A 화합물의 DEPT스펙트럼(CD₃OD).

^1H -NMR 스펙트럼에서는 BG-A와 마찬가지로 δ_{H} 4.34에서 1개의 glucose로 추정되는 당에서 유래한 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 8개의 methyl proton이 δ_{H} 0.94~1.66에서 각각 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼을 분석한 결과 δ_{C} 16.6, 17.8, 18.1, 18.2, 18.4, 22.8, 26.4 및 31.9에서 8개의 methyl 탄소, δ_{C} 106.0에서 1개의 anomeric carbon이 관측됨으로써 본 화합물은 glucose로 추정되는 1개의 당분자를 포함하는 화합물임을 알 수 있었으며, DEPT 스펙트럼 분석결과 8개의 CH_3 , 8개의 CH_2 , 13개의 CH 및 5개의 4급 탄소를 포함하는 총 34개의 탄소를 구성된 ginsenoside임을 알 수 있었다. COSY, HMQC, TOCSY 및 HMBC 등 다양한 2D NMR 분석을 실시하여 정확한 화학구조를 분석BG-C 화합물도 역시 흰색의 분말로 얻어졌으며, UV 스펙트럼에서도 203 nm에서만 end absorption을 나타냄으로써 BG-A 및 BG-B 화합물과 매우 유사한 성질을 나타내는 ginsenoside 화합물임을 알 수 있었다. 본 화합물의 ESI-MS 분석결과 (그림 23, 표 4) m/z 645에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak가, m/z 621에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak가 각각 관측되어 그 분자량은 622로 추정되었다. BG-C 화합물의 ^1H (그림 24) 및 ^{13}C -NMR (그림 25) 스펙트럼은 BG-A 및 BG-B 화합물과 매우 유사한 1개의 당을 지닌 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 보였다. ^1H -NMR 스펙트럼에서는 BG-A 및 BG-B에서와 같이 δ_{H} 4.34에서 glucose로 추정되는 당에서 유래한 1개의 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 7개의 methyl proton이 δ_{H} 0.93, 0.98, 0.99, 1.12, 1.32, 1.61 및 1.67에서 각각 관측되었다. BG-C 화합물은 BG-A 화합물과 비교하였을 때 methyl기가 1개 적은 반면, δ_{H} 2.56 (1H, m) 및 4.68 (1H, s)에서 methine 탄소가 새롭게 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼에서는 δ_{C} 16.1, 17.0, 17.5, 17.8, 18.0, 25.9, 및 31.4에서 7개의 methyl 탄소가 관측되었고, δ_{C} 105.6에서 1개의 anomeric carbon이 관측되었다. 따라서 BG-C 화합물은 glucose로 추정되는 1개의 당분자를 포함하는 총 35개의 탄소를 구성된 ginsenoside임을 알 수 있었다.

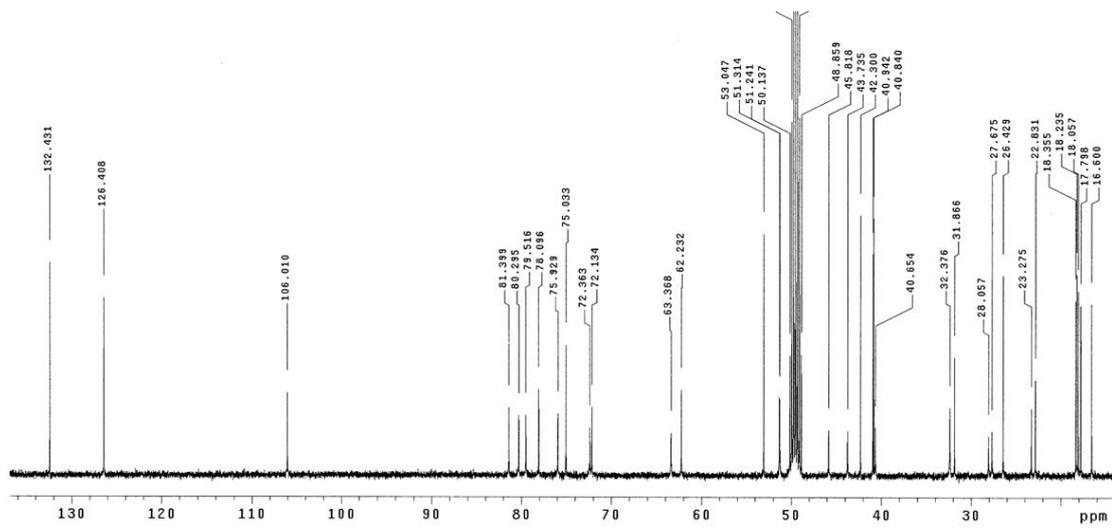
BG-D 화합물 또한 흰색의 분말로 얻어졌으며 203 nm에서만 UV end absorption을 나타내는 특성을 나타내었다. ESI-MS 분석결과 (그림 23, 표 4) BJ-D 화합물은 m/z 643.8에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak가, m/z 619.9에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak가 각각 나타내어 그 분자량은 621임을 알 수 있었다. ^1H (그림 27) 및 ^{13}C -NMR (그림 28) 스펙트럼은 BG-A 및 BG-B 화합물과 매우 유사한 1개의 당을 지닌 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 보였다. ^1H -NMR 스펙트럼에서는 δ_{H} 4.34에서 1개의 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, δ_{H} 0.93에서 1.66 사이에서 9개의 methyl proton이 각각 관측되었다.



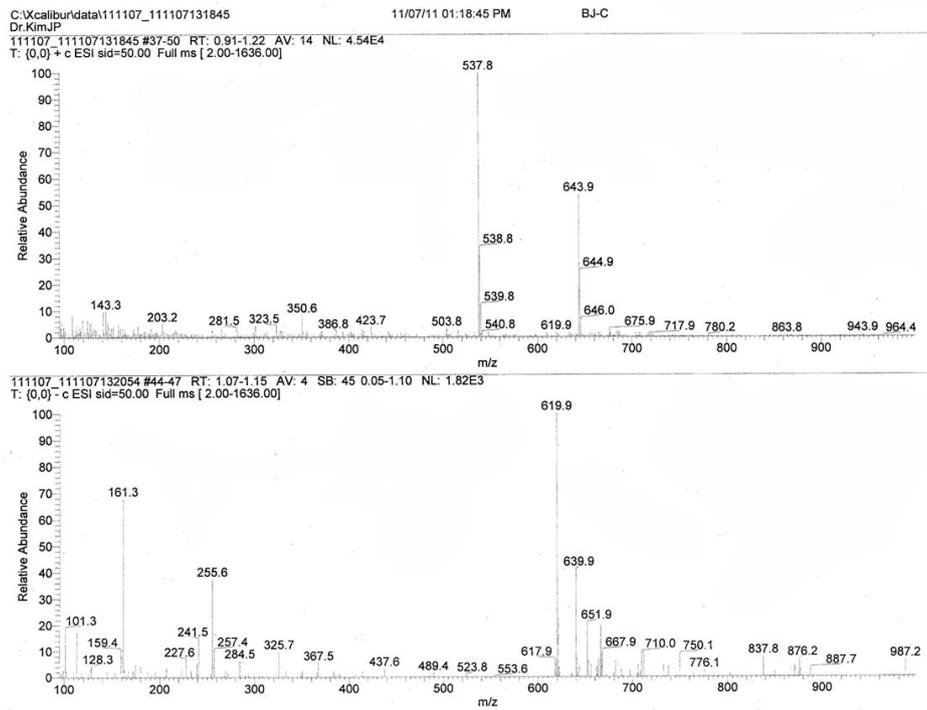
<그림 20> BG-B 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



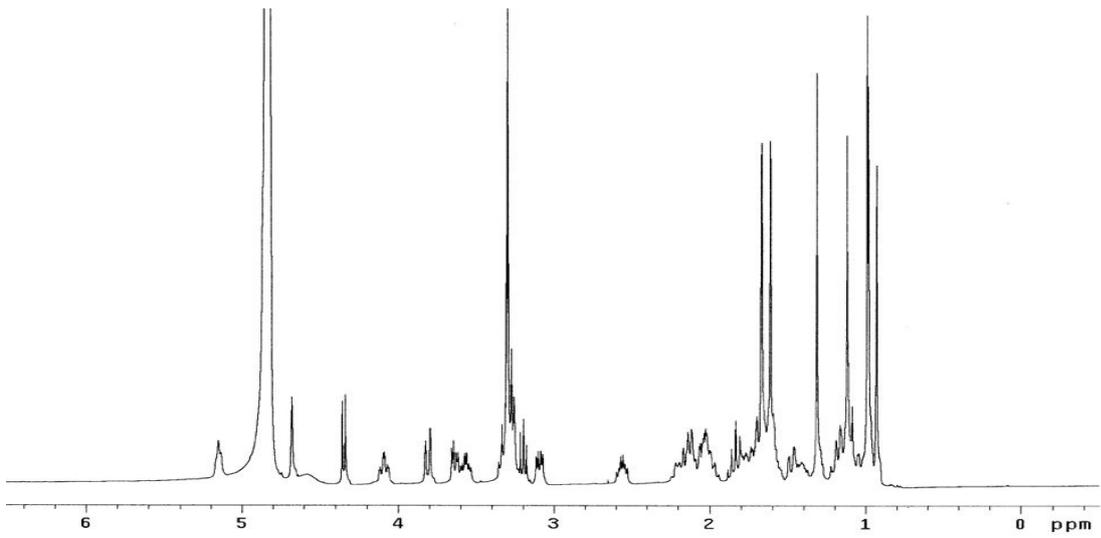
<그림 21> BG-B 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



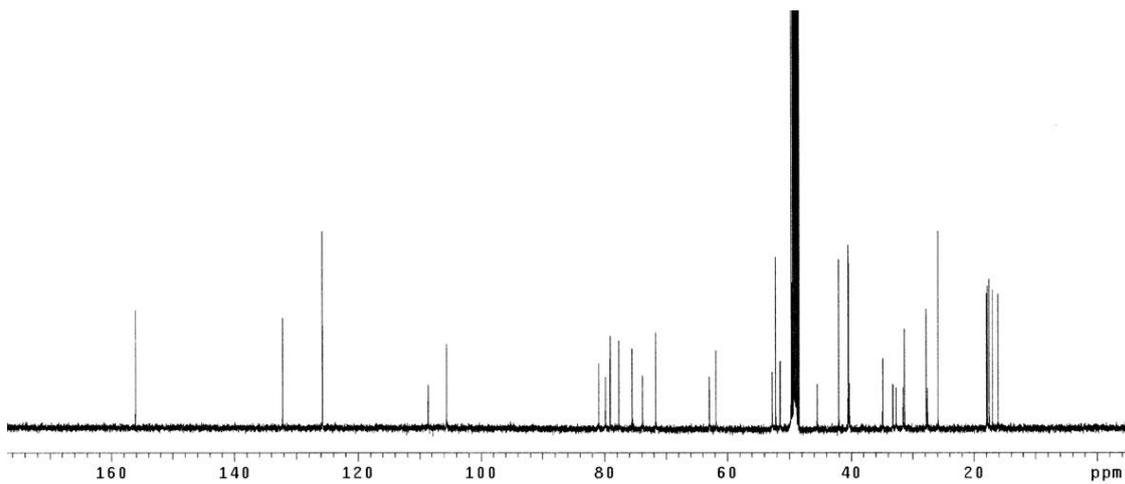
<그림 22> BG-B 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).



<그림 23> BG-C 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



<그림 24> BG-C 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



<그림 25> BG-C 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).

BJ-A와 비교하였을 때 BJ-D의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ_{H} 2.58, 2.66 및 5.07에서 각각 1개의 씩 3개의 methine proton 시그널이 새롭게 관측되었고 1개의 methyl 시그널이 더 관측된 반면, BJ-A에서 관측되었던 δ_{H} 3.54의 methine signal이 관측되지 않았다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서도 9개의 methyl 탄소가 δ_{C} 12.9, 16.1, 17.0, 17.5, 17.8, 17.9, 25.8, 27.9 및 31.4에서 관측되었다. 또한 1개의 anomeric carbon 시그널이 δ_{C} 105.5에서 관측되었다. 이로부터 BG-D 화합물은 1개의 당 분자를 포함하고 있는 총 30개의 탄소로 구성된 분자량 621의 ginsenoside임을 알 수 있었다.

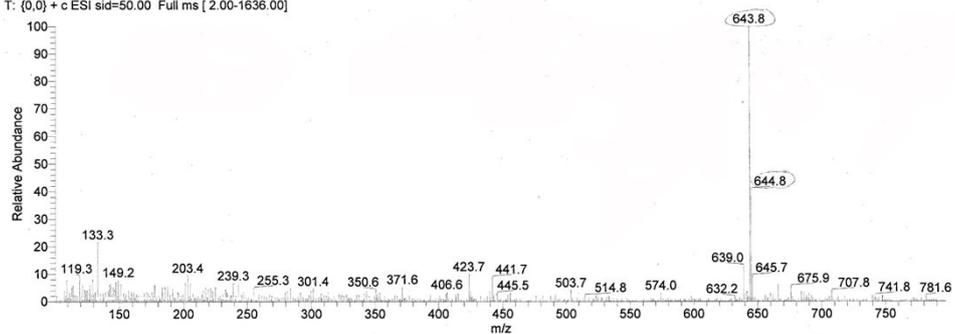
BG-E 화합물도 역시 흰색의 분말의 성상을 나타내었으며, 203 nm에서만 end absorption을 나타내는 UV 스펙트럼을 보였다. BG-E 화합물의 ESI-MS 분석결과 (그림 29, 표 4) m/z 791.8에서 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak가, m/z 767.9에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak가 각각 관측되어 그 분자량은 769로 추정되었다. BG-E 화합물의 ^1H (그림 30) 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (그림 31) 스펙트럼 역시 1개의 당을 지닌 ginsenoside의 특징적인 NMR 스펙트럼을 보였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ_{H} 4.63에서 1개의 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 9개의 methyl proton이 δ_{H} 0.92에서 1.67 사이에서 관측되었다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ_{C} 17.1, 17.3, 17.33, 17.8, 18.0, 25.9, 27.8, 31.9 및 34.9에서 총 9개의 methyl 탄소가 관측되었고, δ_{C} 101.6에서 anomeric carbon이 관측되었다. 이로부터 BG-E 화합물은 1개의 당분자를 포함하는 총 37개의 탄소로 구성된 분자량 769인 ginsenoside임을 알 수 있었다.

BG-F 화합물도 흰색 분말의 성상으로서 203 nm의 end absorption만을 나타내는 UV 스펙트럼을 보였으며, ESI-MS 분석결과 (그림 32, 표 4) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ion peak가 m/z 823.8에서, $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peak가 m/z 799.9에서 각각 관측되어 분자량이 801임을 알 수 있었다. BG-F 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ (그림 33) 스펙트럼은 역시 1개의 당을 지닌 ginsenoside의 특징적인 NMR 스펙트럼을 보였으며, BG-E와 매우 유사하였다. 즉, $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 δ_{H} 4.63에서 1개의 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 8개의 methyl proton이 δ_{H} 0.92에서 1.69 사이에서 관측되었다. BG-E 화합물은 1개의 당분자를 포함하는 분자량 801인 ginsenoside임을 알 수 있었다.

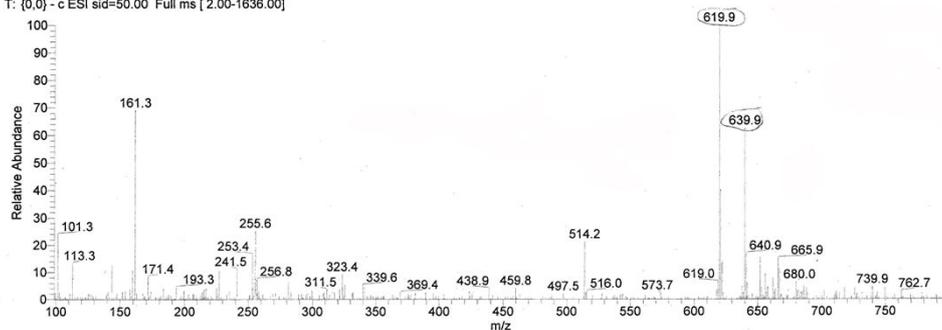
C:\Xcalibur\data\111109_111109172252
Dr.KimJP
111109 #39-45 RT: 0.95-1.10 AV: 7 NL: 2.74E4
T: (0,0) + c ESI sid=50.00 Full ms [2.00-1636.00]

11/09/11 05:22:52 PM

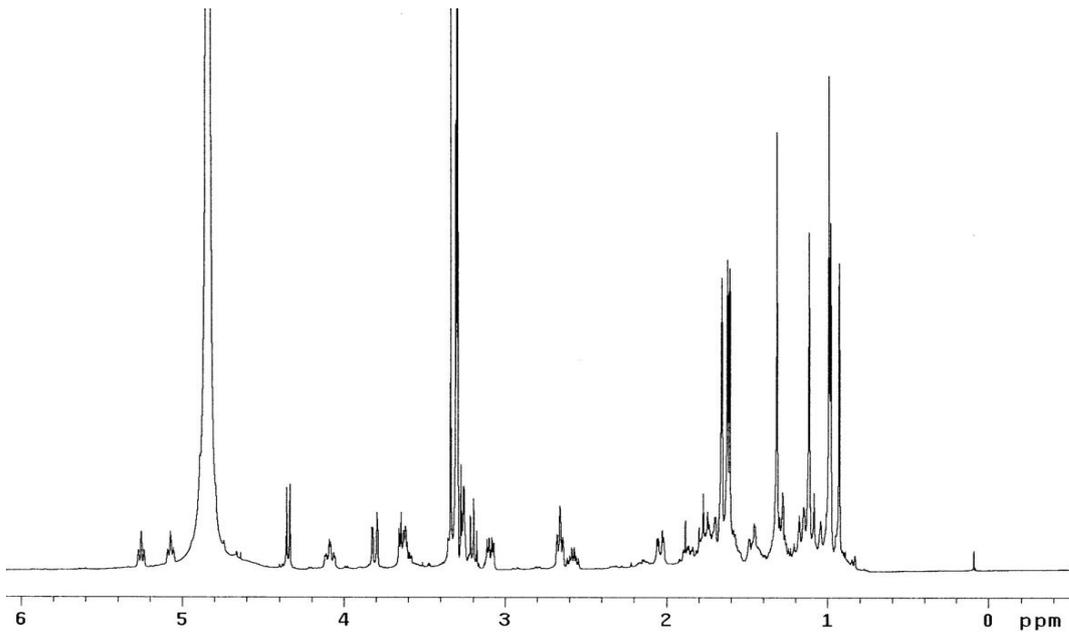
BJ-D



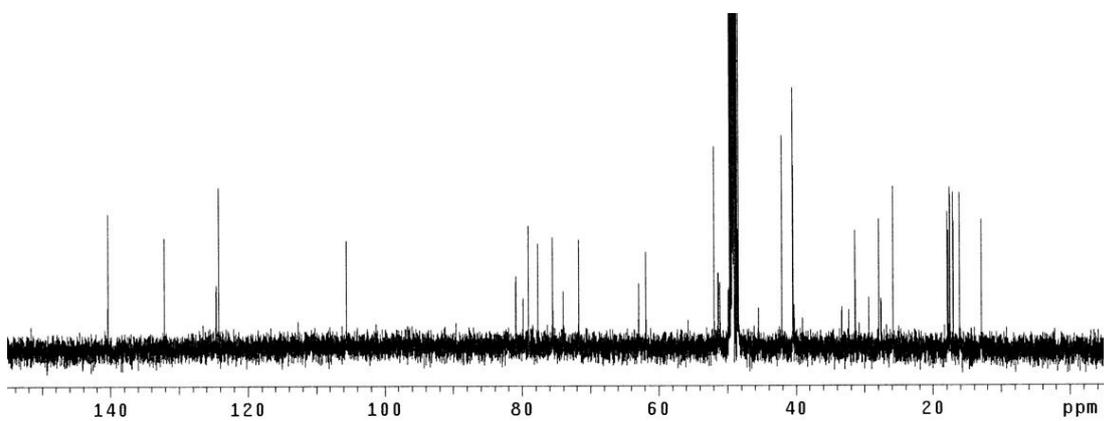
111109_111109172252 #35-46 RT: 0.86-1.12 AV: 12 NL: 2.02E3
T: (0,0) - c ESI sid=50.00 Full ms [2.00-1636.00]



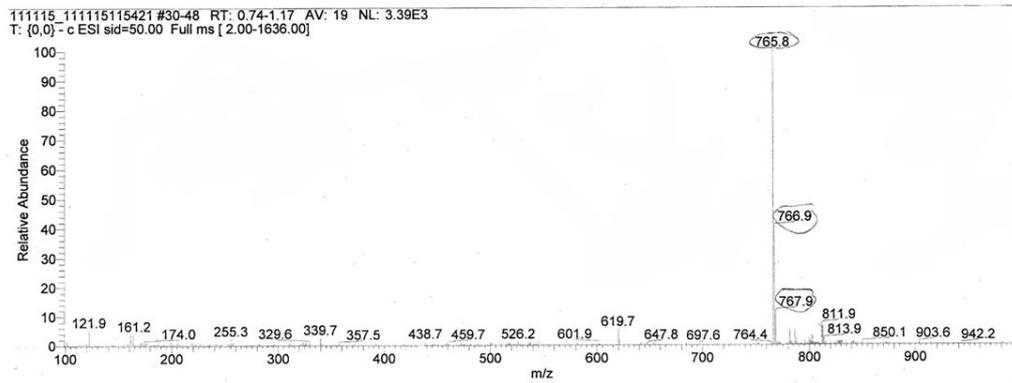
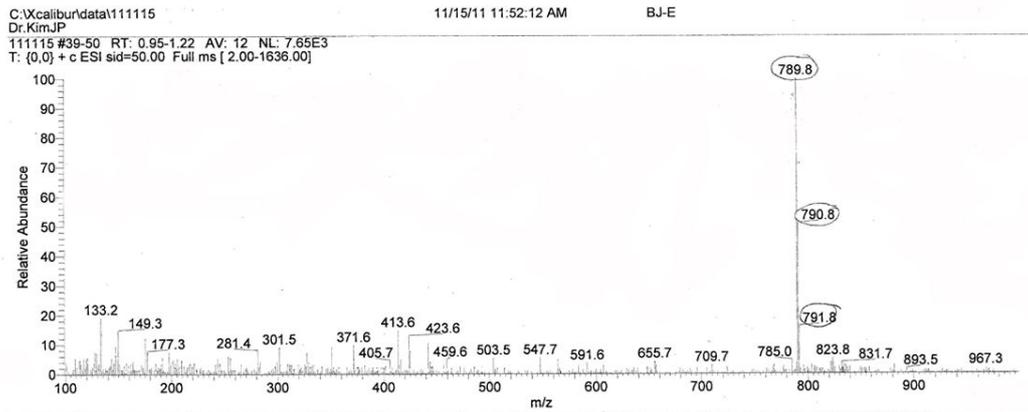
<그림 26> BG-D 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



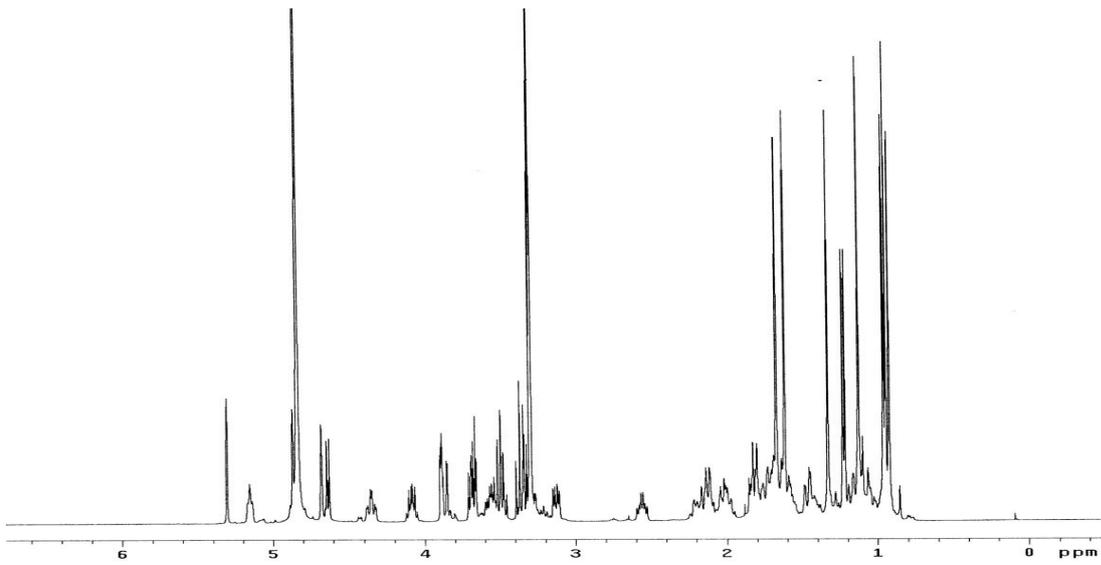
<그림 27> BG-D 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



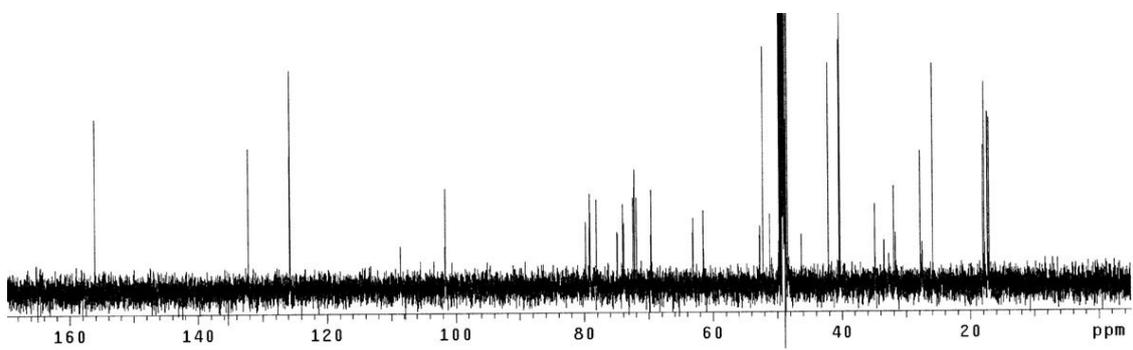
<그림 28> BG-D 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).



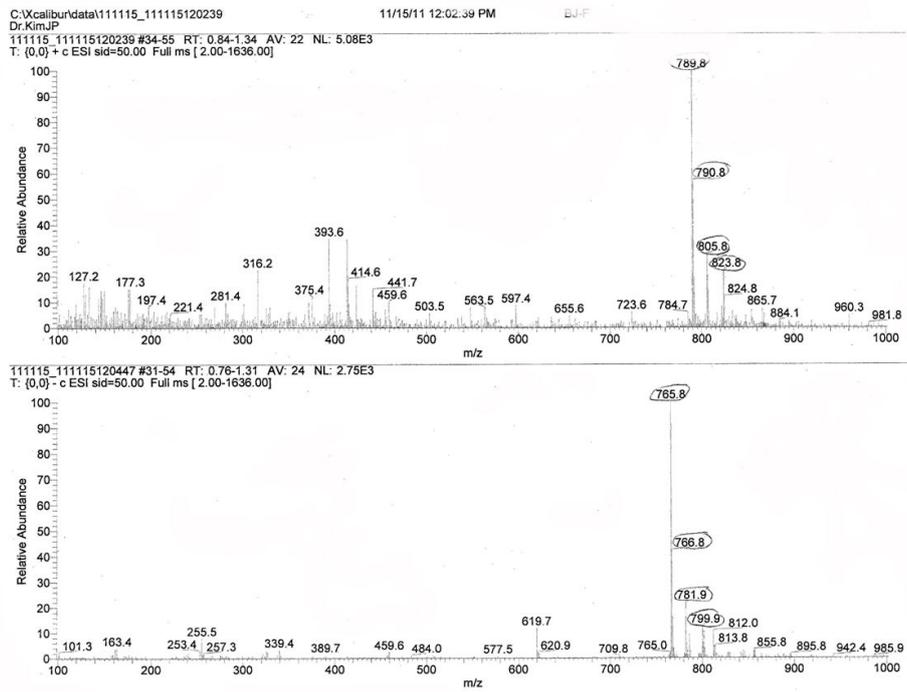
<그림 29> BG-E 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



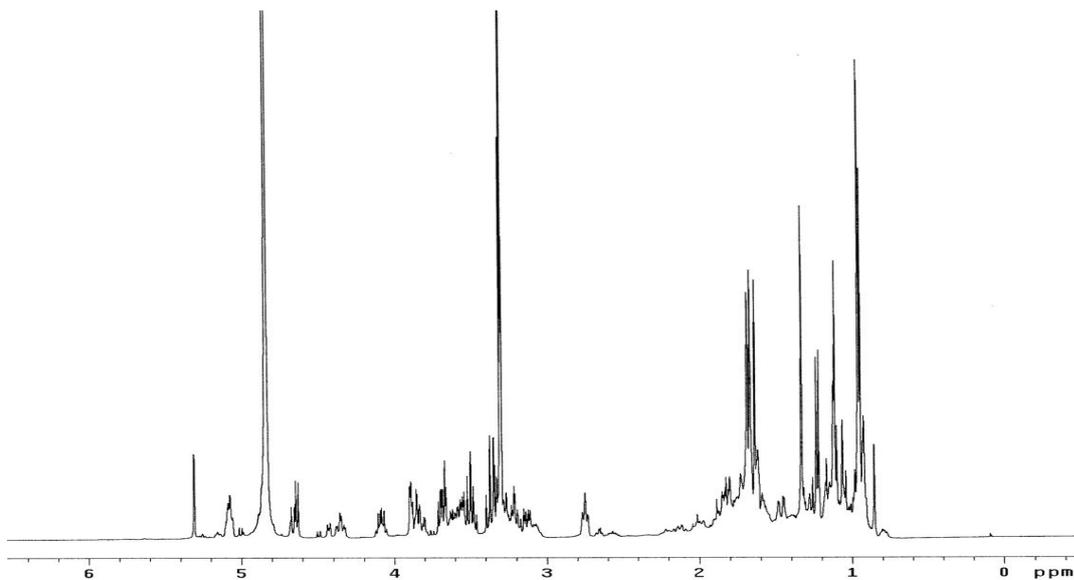
<그림 30> BG-E 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



<그림 31> BG-E 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).



<그림 32> BG-F 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



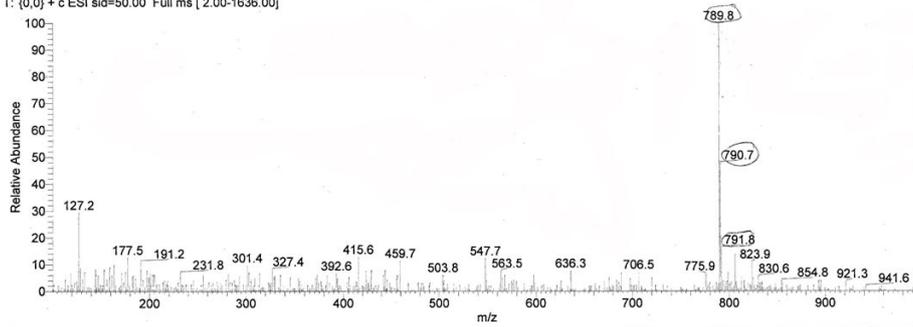
<그림 33> BG-F 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz)

BG-G 화합물은 흰색의 분말로 얻어졌으며, UV 스펙트럼 역시 203 nm에서만 end absorption을 나타내었다. BG-G의 ESI-MS 스펙트럼 분석결과 (그림 32, 표 4) $[M+Na]^+$ ion peak가 m/z 791.8에서, $[M-H]^-$ ion peak가 m/z 767.9에서 관측되어 본 화합물의 분자량은 769로서 BG-E와 같았다. BG-A 화합물의 1H (그림 33) 및 ^{13}C -NMR (그림 34) 스펙트럼은 BG-E 및 BG-F 화합물과 매우 유사한 양상을 보이는 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 나타내었다. 1H -NMR 스펙트럼에서는 δ_H 4.63에서 1개의 당에서 유래한 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, 9개의 methyl proton이 δ_H 0.92~1.66에서 각각 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼 및 DEPT 스펙트럼 (그림 35) 분석결과에서는 δ_C 12.9, 17.1, 17.3, 17.3, 17.8, 17.8, 18.0, 25.8 및 31.9에서 9개의 methyl 탄소, δ_C 27.5, 27.9, 29.4, 32.3, 33.5, 40.3, 46.3 및 63.1에서 총 8개의 CH_2 탄소, δ_C 51.0, 51.2, 61.4, 69.6, 71.9, 72.2, 72.4, 74.0, 74.9, 78.1, 79.1, 79.1, 79.7, 101.6, 101.6, 124.2 및 124.6에서 총 16개의 CH 탄소가 관측되었으며, 사급탄소는 6개가 관측되어 총 39개 탄소 시그널이 관측되었다. 한편, δ_C 101.6에서 2개의 anomeric carbon이 관측되어 BG-G 화합물은 2개의 당 분자를 함유한 분자량 769의 ginsenoside임을 알 수 있었다.

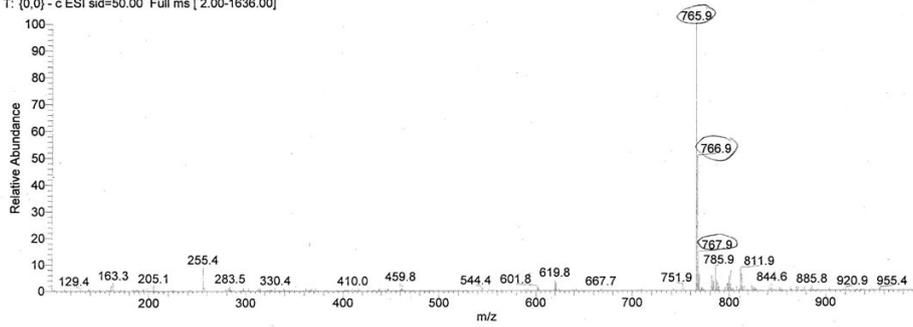
흰색의 분말로 얻어진 BG-L 화합물 역시 UV 스펙트럼 역시 203 nm에서만 end absorption을 나타내었다. BG-L 화합물의 1H (그림 35) 및 ^{13}C -NMR (그림 36) 스펙트럼 역시 전형적인 ginsenoside의 NMR 스펙트럼을 나타내었다. 1H -NMR 스펙트럼에서는 δ_H 4.42 (1H, d) 및 4.66 (1H, d)에서 2개의 anomeric proton 시그널이 관측되었으며, δ_H 0.85~1.68에서 8개의 methyl proton이 관측되었다. ^{13}C -NMR 스펙트럼 및 DEPT 스펙트럼 (그림 37) 분석결과에서도 8개의 methyl 탄소, 10개의 CH_2 탄소, 17개의 CH 탄소, 사급탄소는 7개가 관측되어 총 42개 탄소 시그널이 관측되었다. 한편, δ_C 104.5 와 105.4에서 2개의 anomeric carbon이 관측되어 BG-L 화합물은 2개의 당 분자를 함유한 ginsenoside임을 알 수 있었다.

현재까지 구조가 규명된 BG-A, BG-L, BG-C의 구조는 (그림 38)에 나타내었다.

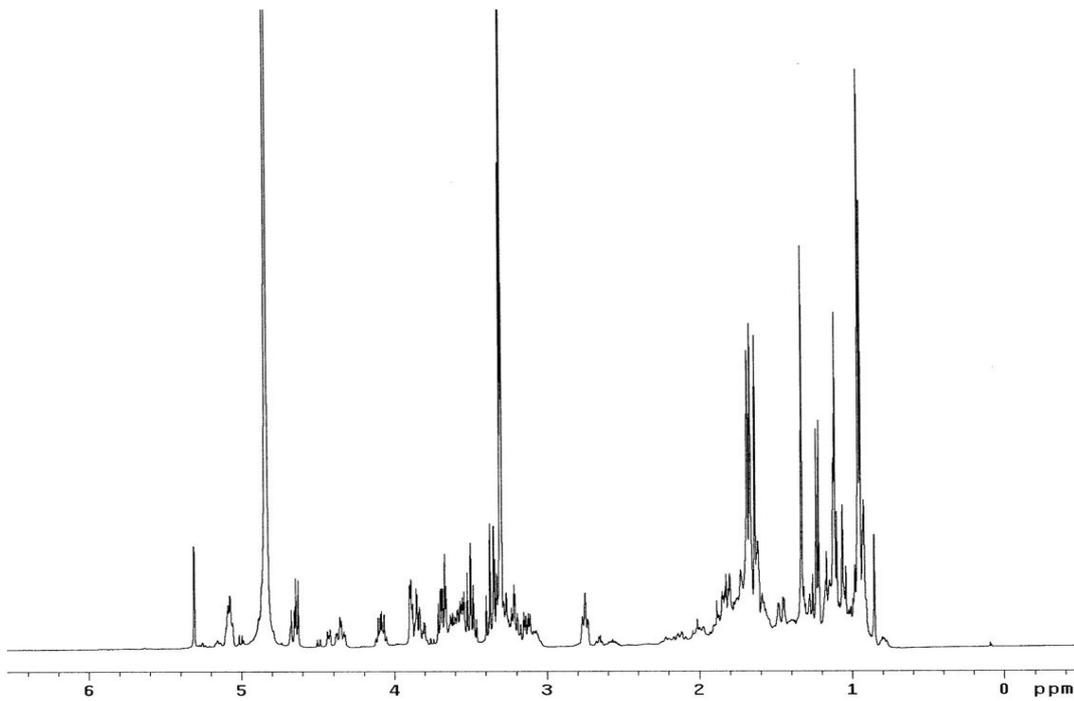
C:\Xcalibur\data\111115_111115122134 11/15/11 12:21:34 PM BJ-G
Dr. Kim,JP
111115_111115122134 #41-47 RT: 1.00-1.15 AV: 7 NL: 4.35E3
T: (0,0) + c ESI sid=50.00 Full ms [2.00-1636.00]



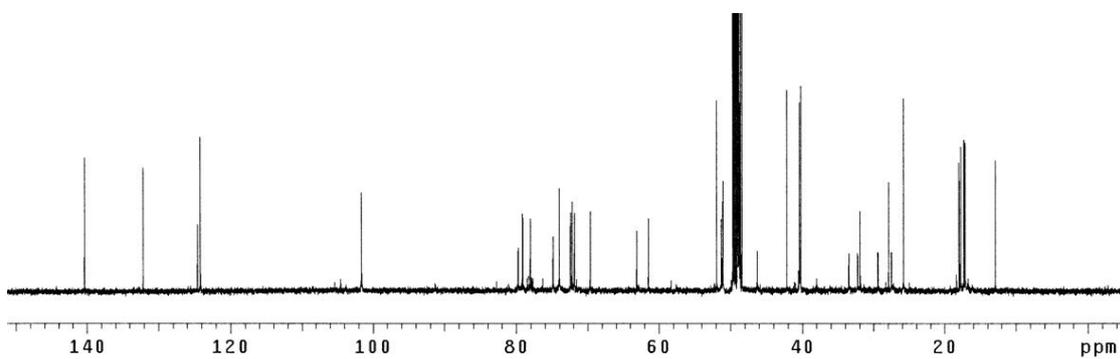
111115_111115122343 #65-77 RT: 1.57-1.86 AV: 13 NL: 2.66E3
T: (0,0) - c ESI sid=50.00 Full ms [2.00-1636.00]



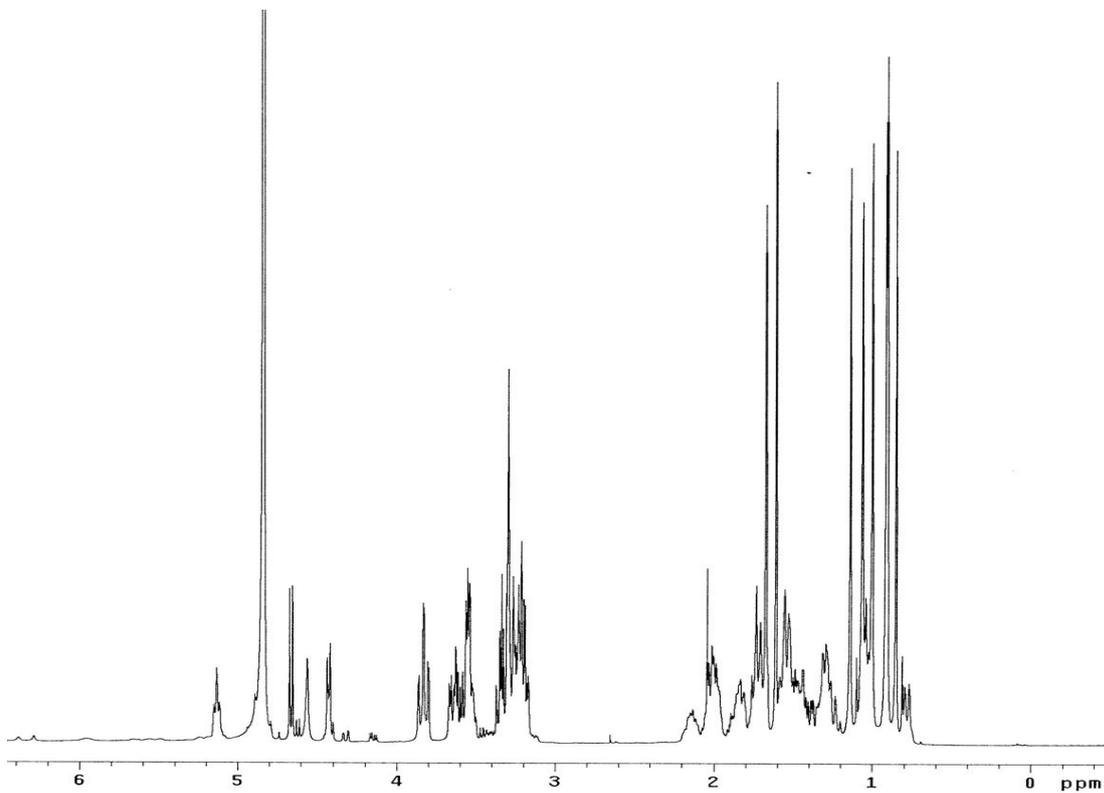
<그림 32> BG-G 화합물의 ESI-MS 스펙트럼.



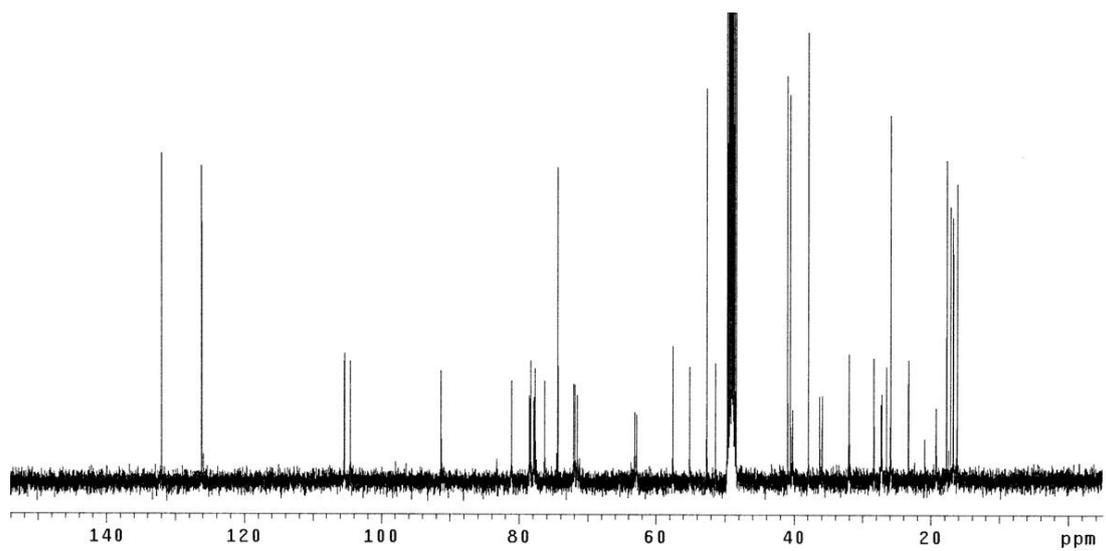
<그림 33> BG-G 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



<그림 34> BG-G 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).



<그림 35> BG-L 화합물의 ^1H -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 400 MHz).



<그림 36> BG-L 화합물의 ^{13}C -NMR 스펙트럼(CD_3OD , 100 MHz).

DEPT-100-111118-BJ_197 in CD3OD 25degC
Pulse Sequence: dept

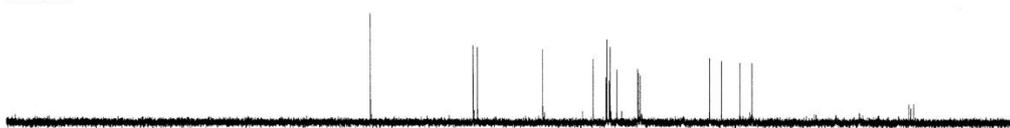
CH3 carbons



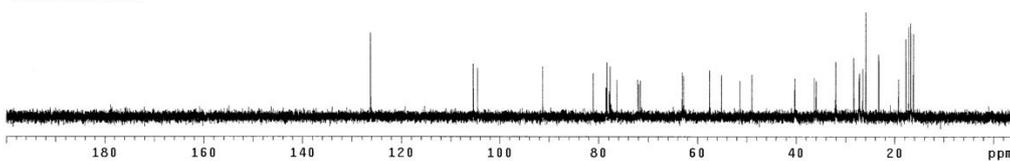
CH2 carbons



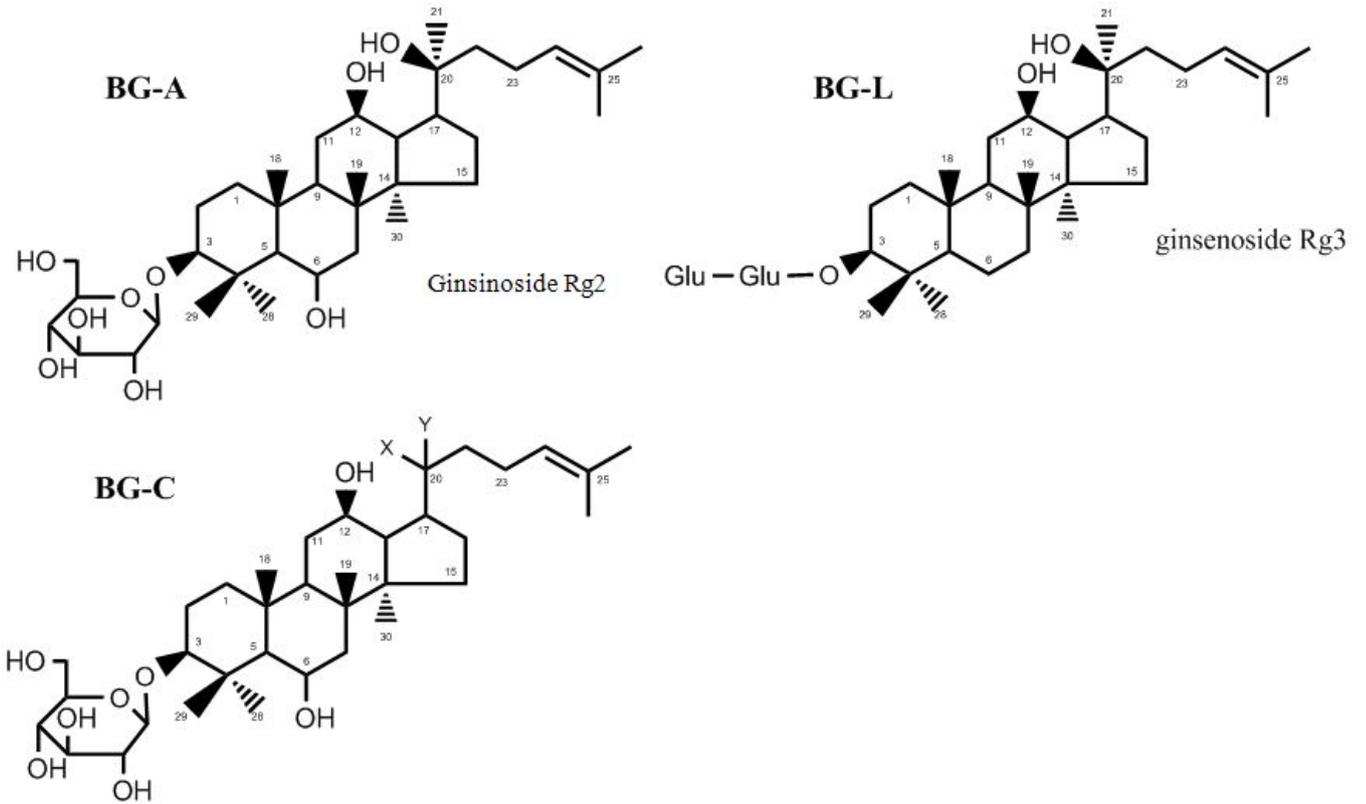
CH carbons



all protonated carbons



<그림 37> BG-L 화합물의 DEPT 스펙트럼(CD₃OD)



<그림 38> BG-A, L, C 화합물의 구조

5. 흑삼성분 ginsenoside Rh2의 파골세포 분화 저해 기전 규명

osteoclastogenesis 는 여러 가지 질병을 유발한다. 류마티즘 관절염, bone metastasis, Paget's disease 그리고 골다공증 등은 모두 지나친 osteoclastogenesis 의 진행으로 인해 발병하게 된다. 이러한 osteoclastogenesis 는주요하게 RANKL signal 에 의해서 조절되고 그로 인해서 RANKL signal 을 타겟으로 하는 물질들은 상술한 질병에 효과적으로 썩일수 있을거라 주목받고 있다.

따라서 본 연구의 취지는 osteoclastogenesis 을 타겟으로 하는 small molecule을 흑삼이라는 약용식물에서 찾아내서 그 메카니즘을 밝혀내려는데 있다. ginsenoside Rh2 는 대표적인 ginseng 의 주요 약효성분이다. 이번 연구에서 우리는 ginsenoside Rh2 가 osteoclast 의 분화를 효과적으로 억제 하는것을 관찰할 수 있었다(그림1).

Bone marrow 세포에서 MCSF 와 RANKL 을 처리하여서 파골세포 분화를 유도하였고 ginsenoside Rh2 를 농도의존적으로 처리하였더니 파골세포의 분화가 효과적으로 억제되는것을 확인하였다.

이러한 ginsenoside Rh2 의 파골세포 분화 억제효과가 cell cytotoxicity 를 동반하는것인지 알아보기 위해 cell viability assay 를 진행하였다(그림 2).

그림에서 확인할수 있는바와 같이 ginsenoside Rh2 는 osteoclast 분화 과정중 비교적 높은 농도에서까지도 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다. 이는 ginsenoside Rh2 가 으로 세포독성이 아닌 osteoclast 의 분화를 특이적으로 억제한다는 사실을 입증하여준다.

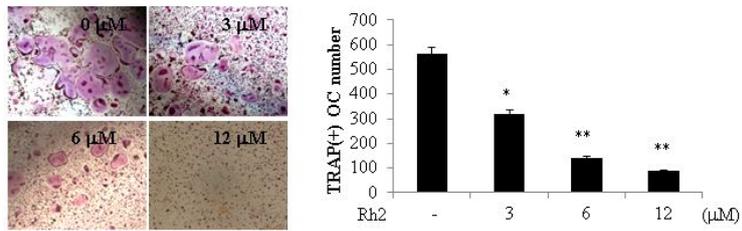
뿐만 아니라 osteoclast 의 두가지 마커인 OSCAR 와 TRAP 도 ginsenoside Rh2 에 의해 transcriptional level 에서 time-dependent 하게 감소된다는 사실을 확인할수 있었다(그림 3).

이러한 결과들은 ginsenoside Rh2가 RANKL 에 의한 osteoclast 의 분화를 time-dependent 하게 효과적으로 억제한다는것을 보여주었다.

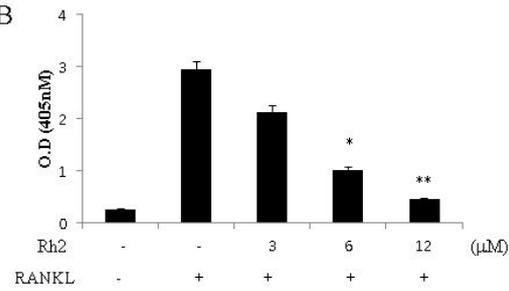
다음 osteoclast 분화와 관련된 여러 가지 전사인자와 marker 들의 발현상황을 알아보았다. osteoclast 분화에서 결정적인 영향을 주는 전사인자 NFATc1 과 c-fos 의 발현이 transcriptional level 에서 효과적으로 억제되는것을 realtime-PCR 을 통해서 확인할수 있었다(그림 4).

다음 western 을 통해서 단백질 발현정도를 검측해본 결과 역시 단백질 발현도 ginsenoside Rh2 에 의해서 time- dose- dependent 하게 억제 된다는 사실을 확인할수 있었다(그림 5).

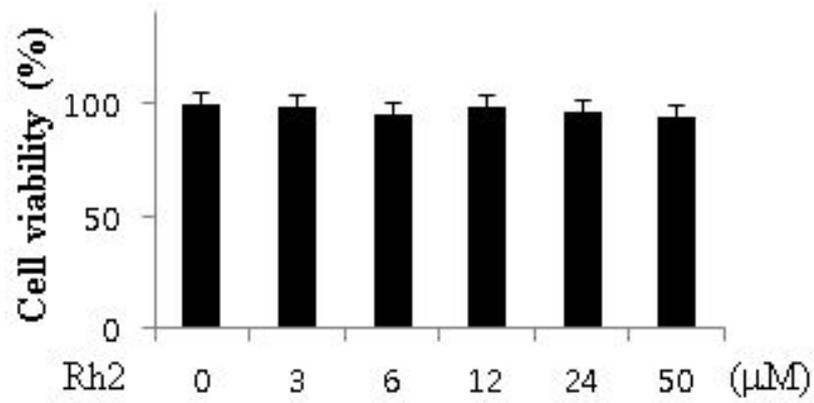
A



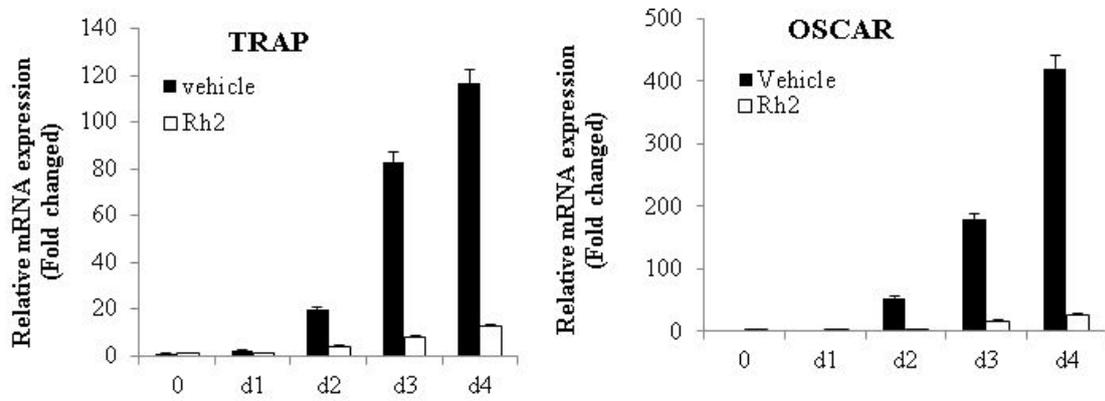
B



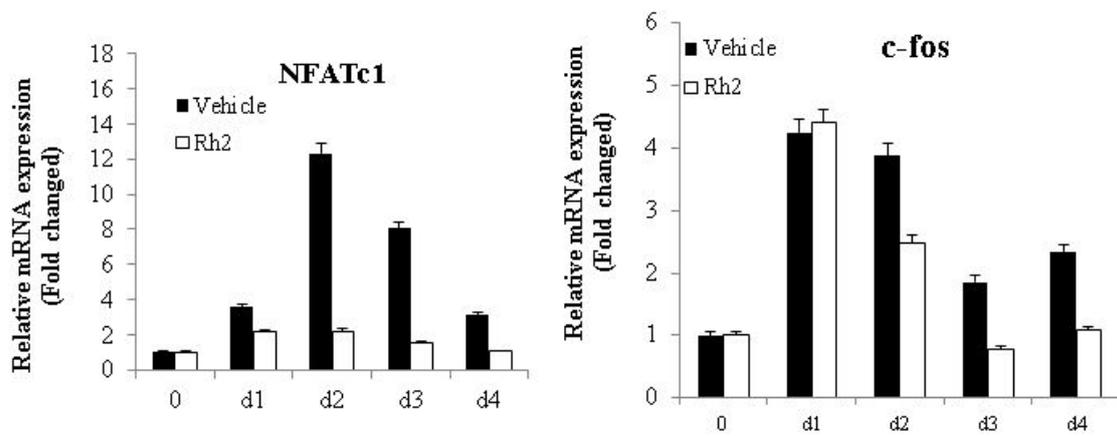
<그림 1> Ginsenoside Rh2의 파골세포 저해효과



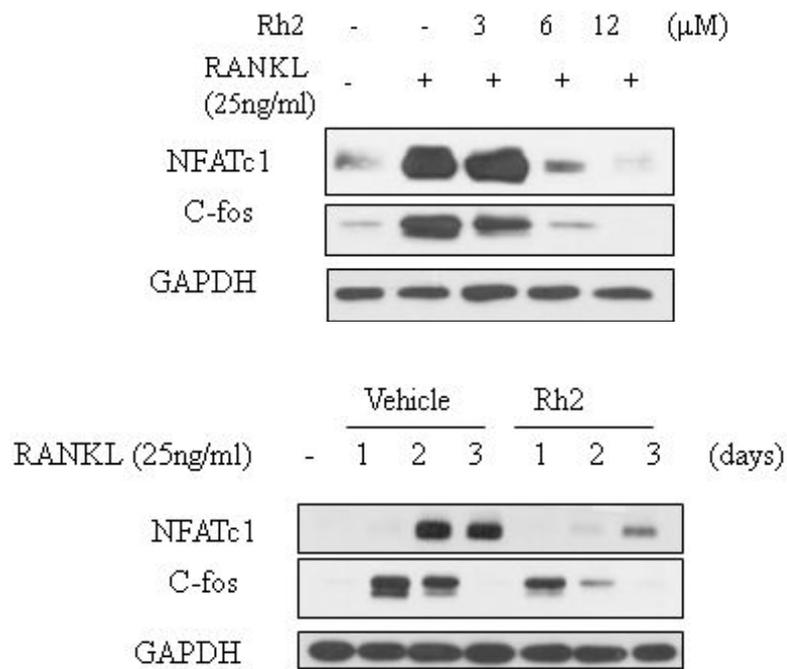
<그림 2> Rh2의 세포독성에 미치는 영향



<그림 3> Effect of Rh2 on TRAP and OSCAR expression



<그림 4> Effect of Rh2 on NFATc1 and c-Fos expression



<그림 5> Effect of Rh2 on protein level related with osteoporosis

다음 ginsenoside Rh2 에 의해서 RANKL signal 이 억제되는 메카니즘이 어떤 경로를 통한 것인지 알아보기 위해 MAPK pathway를 체크 해보았다(그림 6).

(그림6)에서 확인 할수 있듯이 ginsenoside Rh2 는 specific 하게 ERK 의 인산화 레벨에만 변화를 주었을 뿐 다른 MAPK 맴버인 p38, JNK 의 인산화에는 아무런 영향도 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

NF-kappa B 는 잘 알려진바와 같이 osteoclast의 분화에 굉장히 중요한 역할을 한다. Ginsenoside Rh2가 RANKL 에 의한 NF-kappa B 경로에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 먼저 I kappa B alpha 의 phosphorylation을 확인 해보았다(그림 7). 그림에서 확인할 수 있듯이 I kappa B alpha 의 인산화가 ginsenoside Rh2에 의해 부분적으로 억제가 되고 I kappa B 의 단백질량은 어느정도 recover 가 된다는 사실을 확인 할수 있었다.

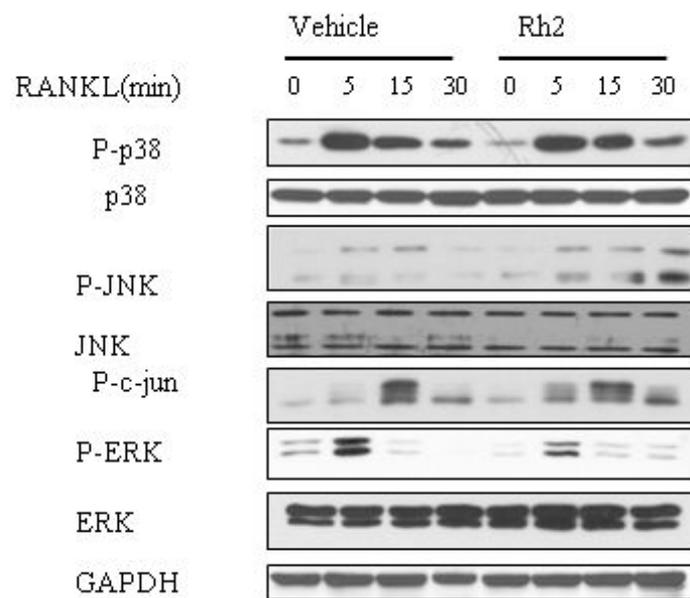
다음 실제로 NF- kappa B의 DNA binding activity 가 영향을 받았는지 알아보기 위해 EMSA analysis 를 진행하였다(그림 8). 그림에서 확인 할수 있듯이 NF kappa B 의 DNA binding activity 가 ginsenoside Rh2 에 의해서 억제 된다는 것을 증명할 수 있었다.

다음 확인을 위해 NF kappa 의 실질적인 타겟 gene들의 발현양을 확인 해보았다(그림 9-10). 예상했던바와 같이 NF kappa B 의 두 타겟인 TNF-alpha와 ICAM-1 모두가 ginsenoside Rh2에 의해서 영향을 받는다는 것을 확인 할수 있었다.

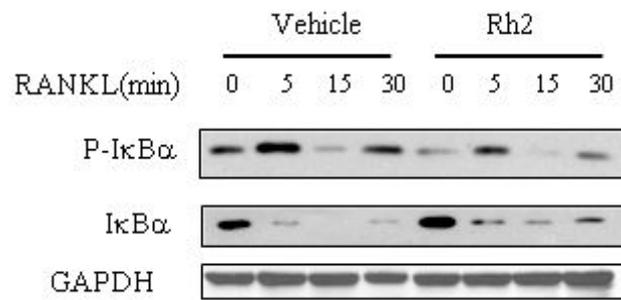
이러한 모든 결과들은 ginsenoside Rh2가 사실은 ERK의 phosphorylation과 NF kappa 의 활성화를 억제하는 메카니즘을 통해 osteoclast의 분화를 억제한다는 사실을 확인할 수 있게 해주었다.

다음 in vivo에서 ginsenoside Rh2 의 효과를 확인하기 위해 mouse bone loss 모델에 ginsenoside Rh2를 처리하고 결과를 PET를 통해서 확인 해보았다(그림 11). RANKL에 의해서 감소되었던 뼈 밀도가 ginsenoside Rh2를 처리함으로 인해서 recover 된다는 사실을 확인할 수 있었다.

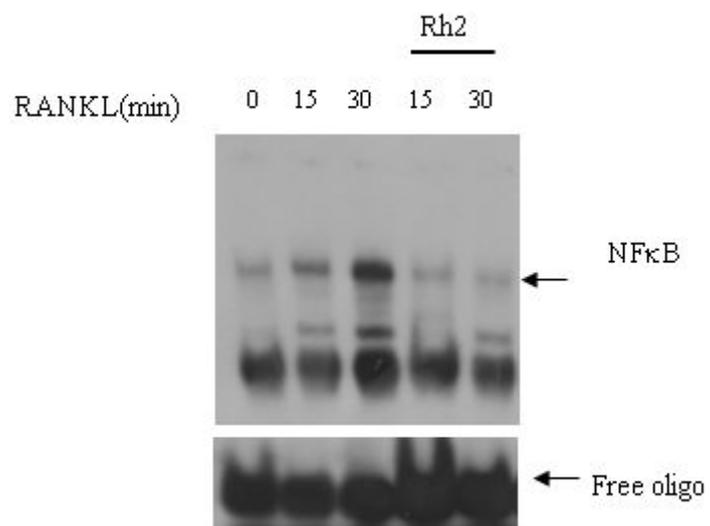
다음 더욱 정밀한 분석을 하기위해 마이크로 CT 분석을 진행하였다(그림 12). 그림에서 확인할 수 있듯이 ginsenoside Rh2는 RANKL에 의한 bone loss를 significant 하게 회복시켰다. 이러한 모든 결과로부터 우리는 홍삼의 주요 약효성분인 ginsenoside Rh2 가 ERK 와 NF kappa B signal 경로를 통해 osteoclast 의 분화를 억제하고 그 효과는 동물 모델에서도 유효하다는 사실을 확인 할수 있었고 ginsenoside Rh2 를 강력한 osteoporosis 의 치료제 후보라고 주장할수 있게 되었다.



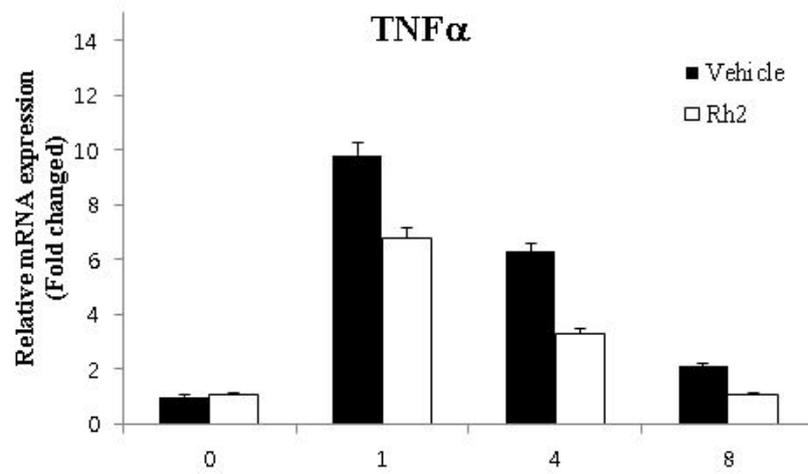
<그림 6> Effect of Rh2 on MAPK signaling



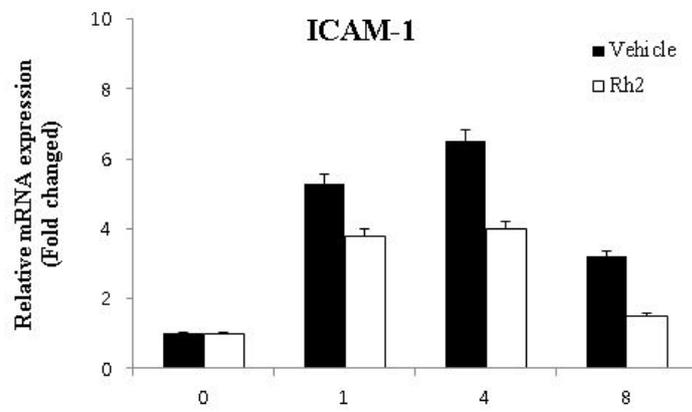
<그림 7> Effect of Rh2 on I κ B α phosphorylation and degradation



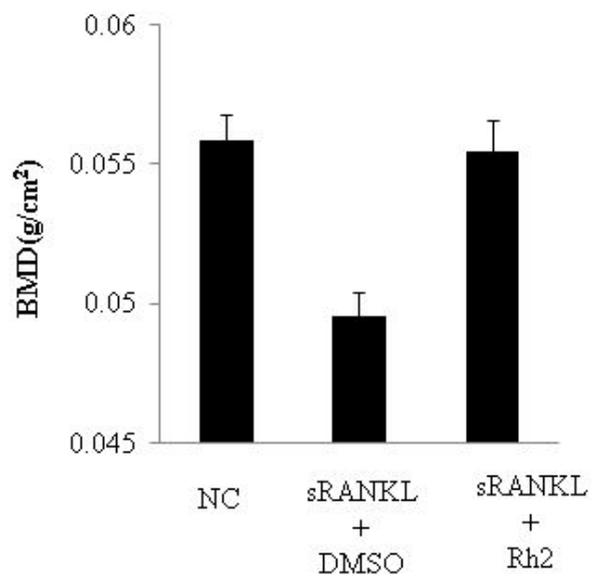
<그림 8> EMSA analysis for Rh2 effect on NF-κB



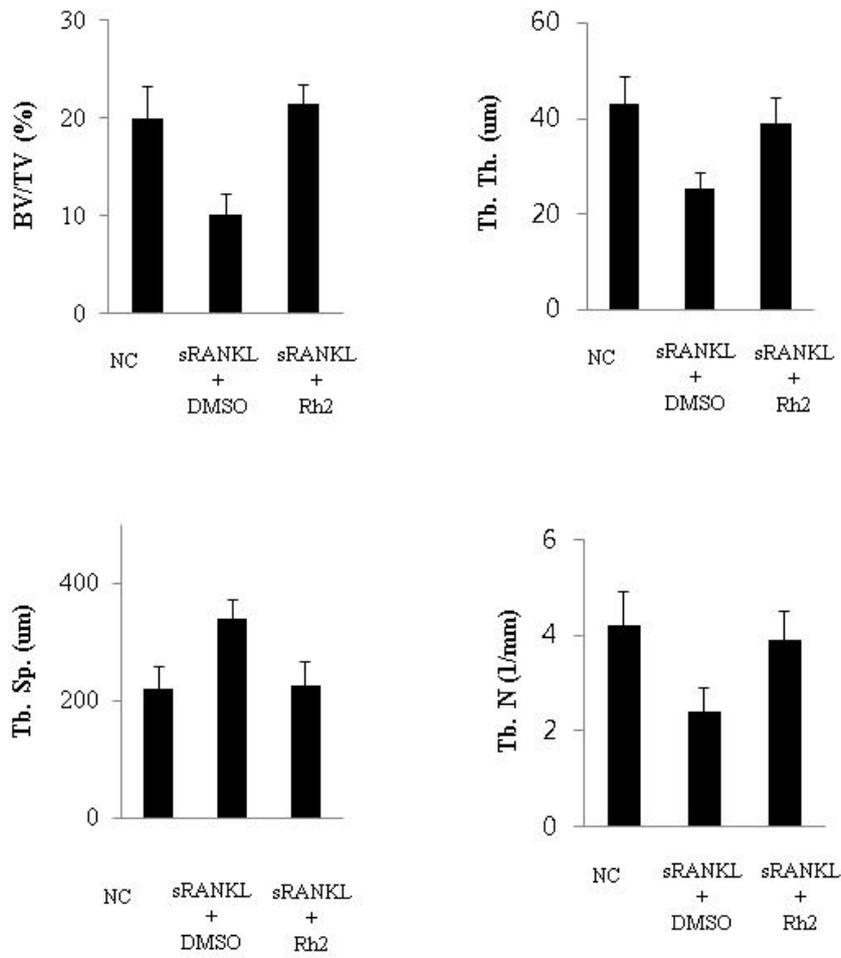
<그림 9> Effect of Rh2 on TNF α expression



<그림 10> Effect of Rh2 on ICAM-1 expression



<그림 11> Effect of Rh2 on bone density



<그림 12> Effect of Rh2 on trabecular form

<표 1> OVX 마우스에서의 Rh2의 trabecular form에 미치는 효과

	Sham	OVX	OVX/ Bg3-12	OVX/ Bg3-12
BV(bone volume)/TV(%)	16.92	9.59	15.23	15.88
Tb.Th (trabecular thickness, um)	45.5	31.5	42.8	43.1
Tb.Sp (trabecular separation,um)	212.57	301.3	242.4	252.6
Tb. N (trabecular number)	3.12	2.46	3.01	2.85

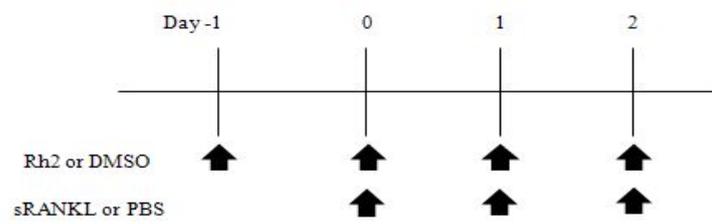
6. 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 흑삼 분획의 효과

1차년도에 이미 흑삼 농축액을 핵산층, 부탄올층, 에틸아세테이트층으로 분리하여 5ug/ml의 농도로 DMSO로 희석하여 TRAP 활성을 측정하였다. 그 결과 부탄올층에서 TRAP 활성 저해가 나타나므로 메탄올로 분획(BG3)을 나누고 정제를 시도하였다. 그 결과 BG3-12, 13, 22의 분획에서 파골세포의 TRAP 활성을 저해하는 효과를 보였다.

3차년도에는 각 분획에 포함된 물질이 실제로 파골세포에 독성이 없고 분화만을 저해하는지를 검증하기 위해 MTT assay를 수행하였으며 그 결과 BG-22 분획만이 독성이 나타났다. BG3-12, 13 분획에 대하여 난소를 제거한 골다공증 모델에서 그 효과를 검증하였다. 각 4마리의 쥐를 사용하여 난자를 제거하기 전에 몸무게를 측정하고 마취제는 ketamine 80-100mg/kg/ xylazine 5-10mg/kg 을 IP로 쥐에 주사하였다. 마취된 쥐의 정중선을 절개하여, 복부 지방 밑에 위치한 자궁에서 Y자로 나누어진 수란관을 따라 그 끝에 위치한 분홍색의 난소를 적출 제거하였다. 6주후에 쥐를 sacrifice시켜 난자 제거를 확인하였다. 쥐의 뒷다리 종아리 부위를 절개하고 살을 제거한 후에 난자를 제거한 쥐와(OVX) Sham (control)쥐의 trabecular bone에 대하여 microCT를 이용하여 측정하였다. BMD 측정 프로그램에서 뼈의 top과 bottom을 기준으로 잡고 그 범위 내에 존재하는 뼈의 범위와 trabecular bone의 두께와 bone사이의 공간 넓이 그리고 개수를 측정하였다. MicroCT 촬영 결과 아래의 그림과 같이 coronal 부위의 BV (bone volume), 두께, 개수가 난자를 제거한 쥐에서 현저하게 감소하였으나 BG3-12과 13의 분획을 주입한 동물 모델에서는 sham control 쥐의 BMD로 돌아옴을 확인하였다. 따라서 난소절제한 동물 모델에서 흑삼의 분획이 골다공증 예방과 치료에 효과가 있음을 입증하였다.

7. RANKL을 주입한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과

RANKL을 주입한 동물모델은 난소를 제거한 동물 모델을 이용하는 경우와 달리 짧은 기간에 효능물의 항골다공증 효과를 확인할 수 있으며, 파골세포의 분화를 활성화시키는데 중요한 물질인 RANKL에 대하여 특이적인 저해활성을 직접 확인할 수 있는 방법이다. 아래 (그림 1)과 같이 각 6마리의 쥐를 사용하여 RANKL을 복강에 주입하고 동시에 ginsenoside Rh2® 시료를 주입하였다.



<그림 1> 동물모델에서의 Rh2 처리 스케줄

쥐의 뒷다리 종아리 부위를 절개하고 살을 제거한 후에 pDEXA를 이용하여 BMD를 측정한 결과 RANKL 단독으로 주입한 쥐의 BMD는 현저하게 감소하였으나 RANKL과 Rh2동시에 주입한 쥐의 BMD는 RANKL을 주입하지 않은 control 쥐의 BMD 수준으로 복귀하였다. 이 결과를 다시 확인하기 위하여 같은 시료를 uCT로 BMD를 측정하고 뼈의 단면을 사진 촬영하였다. 그 결과 pDEXA와 같은 결과를 얻을 수 있었다(그림 2).

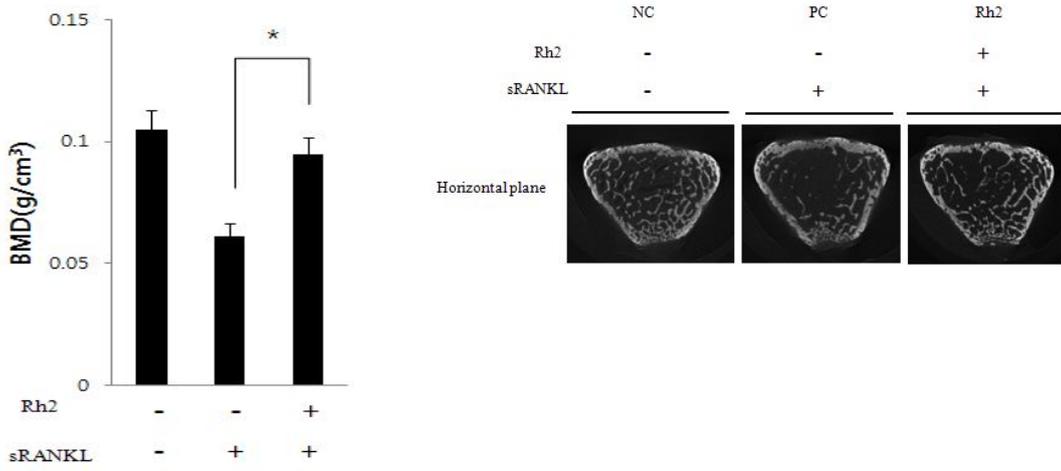
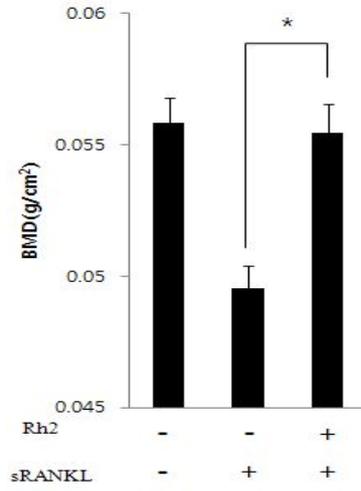
8. RANKL을 주입한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 salubrinal의 효과

Salubrinal 은 ER-stress 억제제로서 eIF2 α 의 탈인산화를 막아줌으로써 protein translation 을 조절해주는 작용으로 그 메커니즘이 잘 알려져 있다. ER-stress 는 노화나 여러 가지 대사증후군에 많이 관여되어있고 새로운 치료타겟으로 많이 부상하고 있다.

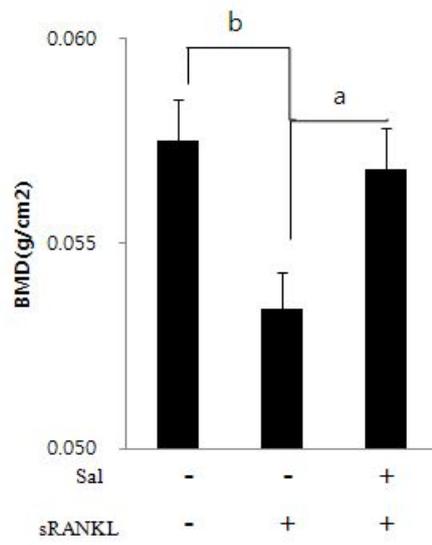
2차년도에서의 연구 결과 transcription level에서의 NFATc1 유전자의 발현은 RANKL에 의해서 증가되고 역시 salubrinal에 의해서 감소되는 것을 확인했지만 RANKL stimulation에 의해서 증가된 c-fos 유전자는 salubrinal에 의해서 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다.

Ginsenoside Rh2의 실험과 동일하게 각 6마리의 쥐를 사용하여 RANKL을 복강에 주입하고 동시에 salubrinal 시료를 주입하였다. 쥐의 뒷다리 종아리 부위를 절개하고 살을 제거한 후에 pDEXA를 이용하여 BMD를 측정한 결과 RANKL 단독으로 주입한 쥐의 BMD는 현저하게 감소하였으나 RANKL과 Rh2동시에 주입한 쥐의 BMD는 RANKL을 주입하지 않은 control 쥐의 BMD 수준으로 복귀하였다(그림 3).

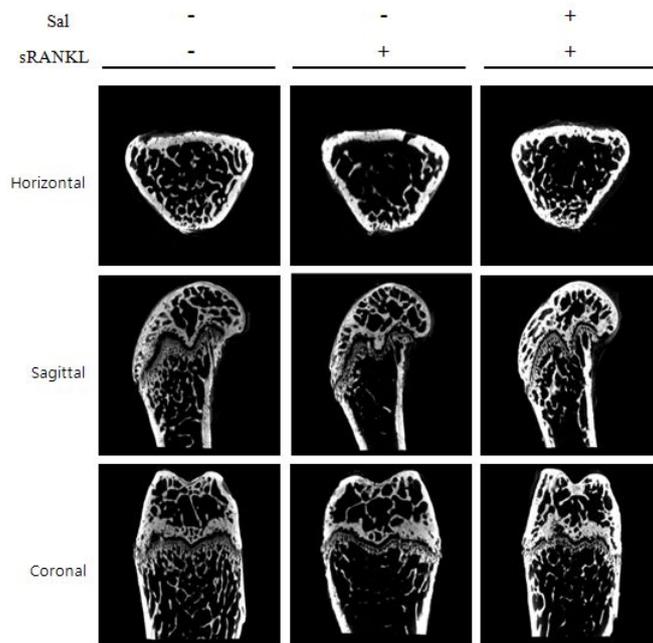
이 결과를 다시 확인하기 위하여 같은 시료를 uCT로 BMD를 측정하고 뼈의 단면을 사진 촬영하였다. 그 결과 pDEXA와 같은 결과를 얻을 수 있었다(그림 4).



<그림 2> 마우스 동물모델에서 Rh2의 골다공증 저해효과 분석



<그림 3> Rh2의 RANKL에 의한 골밀도에 미치는 영향



<그림 4> Rh2의 골다공증 치료 및 회복에 미치는 영향

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발의 최종목표

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

본 연구는 항 골질환 신소재 관련 제품을 개발하는 것을 목표로, 흑삼 추출물에서 얻어지는 새로운 파골세포 저해제의 개발로 새로운 고부가 골대사질환 개선 가공식품과 치료제의 개발을 하고자 한다.

- ◆ 흑삼 추출물로부터 유래한 순수정제 생리활성 물질을 *in vitro*상에서 파골세포 저해 효과들을 검증
- ◆ 파골세포의 발현 양상과 신호전달계 조사
- ◆ 파골세포와 조골세포의 동시 배양에서 중요 생리활성 물질들의 영향 조사
- ◆ 마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 발효 정제 물질의 특성 조사

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

-제1협동과제

- ◆ 흑삼의 골 다공증 저해효과 생리활성 물질의 분리 및 구조분석
- ◆ 유효 지표물질의 유도체 합성에 의한 효능 증진 및 대량 합성
- ◆ 흑삼 가공식품의 골다공증 저해효과 개별인증화를 위한 과학적 효능 확립

-제2협동과제

- ◆ 파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구
- ◆ 마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 정제 물질의 특성 연구

제2절 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2009	흑삼 활성물질의 정제 및 구조 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 파골세포의 분화를 저해하는 생리활성 물질의 탐색, 파골세포의 TRAP 활성 측정 • 흑삼 활성물질의 순수 분리 정제 • 순수 정제 물질의 특성 조사와 구조 분석
		흑삼 활성물질의 정제물의 활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> • 문헌 조사 및 예비 실험 • MTT assay에 의한 파골세포의 증식 측정 • 희석한 농도를 가지는 물질 분획을 이용한 저해 활성 재검증
2차년도	2010	활성물질의 혼합에 의한 생리활성 증진 모델 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 발굴된 중요 생리활성 물질들의 특이적 저해 양상 검증 • 파골세포 분화능을 증진시키는 천연물과의 배합에 의한 골다공증 저해모델 확립 • 세포주를 이용한 중요 생리활성 물질들의 역할 규명
		파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 발굴된 중요 생리활성 물질들이 파골세포의 신호전달계 영향 검증 • 발굴된 중요 생리활성 물질들이 파골세포와 조골세포의 동시 배양에 영향을 주는 특이적 저해 양상 조사 • 중요 생리활성 물질들이 미치는 조골세포 중요인자의 발현조사
3차년도	2011	골다공증 저해 생리활성 흑삼물질의 대량 생산 및 독성연구	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼으로부터 순수 분리 정제한 생리활성 물질의 대량생산 • 마우스를 이용한 흑삼 생리활성 물질의 독성 연구
		마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 정제 물질의 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> • 난자 제거 마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 발효산물 순수정제 물질의 특성 조사 • 마우스 모델로부터 얻어진 파골세포를 이용한 생리활성 물질의 특성 조사

제3절 연구목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	골다공증 치료용 고효율 흑삼 유효물질 발굴 및 가공제품 개발	흑삼 활성물질의 정제 및 구조 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> • Creatin kinase assay • TRAP assay -Cell staining -In vitro assay • 활성물질 구조분석 -LC mass, HPLC, NMR 등 이용한 구조분석 -부탄올층 활성→메탄올 분획 -타 약물과의 비교→흑삼탁월 -BG-3-13-H2 구조규명 (신규 물질로 추정, AMPK 인산화 활성부위와 일치)
	파골세포 분화를 저해하는 흑삼 유효성분 기능 규명	흑삼 활성물질의 정제물의 활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> • 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델의 확립 • BG-3-13의 세포독성 확인 • ER-stress와 골다공증과의 관계 규명
2차 연도 (2010)	골다공증 치료용 고효율 흑삼 유효물질 발굴 및 가공제품 개발	활성물질의 혼합에 의한 생리활성 증진 모델 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> • ER-stress 유발하는 Tunicamycin을 이용한 파골세포 성장 저해 활성 규명 • Ginsenoside 화합물의 파골세포와 조골세포 분화 저해 활성 규명
	파골세포 분화를 저해하는 흑삼 유효성분 기능 규명	파골세포의 발현 양상과 신호전달계 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> • 난자를 제거한 쥐를 이용한 골다공증 동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과
3차 연도 (2011)	골다공증 치료용 고효율 흑삼 유효물질 발굴 및 가공제품 개발	골다공증 저해 신규 흑삼물질의 분리 및 기전연구	100	<ul style="list-style-type: none"> • 흑삼으로부터 순수 분리 정제한 생리활성 물질 13종 분리: Rg2, Rh1, Rd 및 비사포닌 계열 10개 • 마우스를 이용한 흑삼 생리활성 물질의 독성 연구
	파골세포 분화를 저해하는 흑삼 유효성분 기능	마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 정제 물질의 특성 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> • RANKL을 이용해 골다공증을 유발한 쥐를 이용한 골다공증

	규명		동물모델에서 ginsenoside Rh2®의 효과 • 남자 제거 마우스 골소실 모델을 이용한 흑삼 발효산물 정제 물질의 특성 조사 • 파골세포를 이용한 생리활성 물질의 특성 조사
--	----	--	---

제4절 관련분야의 기술발전예의 기여도

◆골대사에 있어서의 골흡수를 담당하고 있는 파골세포는 중요한 역할을 하고 있다. 이들의 분화 및 활성화에 대한 연구는 최근 수년간 많은 연구들이 되어 왔으나 아직도 연구되어야 할 분야가 많은 것이 사실이다. 특히 이들에 대한 연구는 골질환 치료와도 밀접한 관계가 있어서 이에 대한 연구는 이 분야에 대한 관심이 날로 고조되고 있다.

◆폐경기의 중년 여성을 대상으로 하고 있는 골다공증 치료제는 노령화 진전으로 중장년층이 증가하면서 그 시장 규모가 급속하게 확대되고 있어 국내 골다공증 치료제 시장은 2002년 800억원 규모로 매년 30% 이상의 성장률을 기록하며 거대 치료제 시장으로 부상하고 있다. 그러나 대부분 머크나 일라이 릴리 같은 다국적 제약회사의 제품을 수입 하여 사용하고 있어 수입 대체 제품의 개발이 시급하다. 또한 파골세포 특이적인 골다공증 식품 및 치료제 개발 시, 이 제품을 다시 역수출하는 효과도 볼 수 있으며 국내 특이작물 생산 농가는 이 경우 막대한 수익을 얻을 것이다.

◆90년 이래 꾸준히 늘고 있는 건강기능식품의 1인당 소비량 및 소비인구의 증대 경향을 감안해 볼 때, 본 연구 결과를 토대로 건강기능식품을 개발한다면 국민 보건향상에 이바지할 수 있다.

◆파골세포의 분화 및 활성화에 있어서 흑삼 유효 산물 및 천연물로부터 유래하는 물질들에 대한 연구는 골대사와 내분비계 사이의 밀접한 관계를 보여줄 수 있으며 이로 인해 얻어지는 학문적 효과와 산업적효과는 아주 클 것으로 사료된다. 본 연구는 아직까지 파골세포에서의 그 역할이 제대로 밝혀지지 않은 저해제의 세포내에서의 분화 작용기전을 밝히는데 기여할 것으로 사료된다.

◆본연구의 수행 시 향후 새로운 형태의 골다공증 개선 식품 및 치료제의 개발에도 중요한 학문적 연구 자료를 제공해 줄 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 논문 계획

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI(E)	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						2		
	달성	1						1	1	
2차년도	목표	2						2		
	달성	0						1		
3차년도	목표	2	2					2		
	달성	2						1		
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	5	2					6		
	달성	3						3	1	

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress	하룡	김보연	김선옥 외 6인	FEBS Let.	583(5)	국외	SCI
2009	Inhibitory Activity of Medicinal Plants against Differentiation of Osteoclasts	이준원	이준원		생약학회지	40(2)	국내	
2010	Modulation of E-cadherin expression by K-Ras; involvement of DNA methyltransferase-3b	권오송	김보연	정숙정 외 6인	Carcinogenesis	31(7)	국외	SCI
2011	Inhibitory effect of ursane-type triterpenoids from	배영주	이준원	김낙성 외 4인	Journal of Medicinal Plants	5(6)	국외	SCI E

	<i>Weigela subsessilis</i> on RANKL-induced osteoclast differentiation				Research			
2012	Ginsenoside Rh2 inhibits osteoclastogenesis through NF-κB regulation of NFATc1 and c-Fos expression	하룡	김보연	이준원 외 7인	Bone	Submitted	국외	SCI

2. 지식재산권 확보계획

발표연도	발명 명칭	발명자	국내외 구분
2009	Rg3 및 Rh2의 함량이 증가된 흑삼 및 그의 제조방법	김보연, 이상구, 신현중	국내
2011	흑삼 건조 분말 또는 이의 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 및 예방용 조성물	심인섭, 김보연, 박현정, 심현수, 신현중, 이상구, 유영춘	국내
2011년	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	대진	기타지역
7	3	4			3	4		7	

4. 활용계획

- ◆ 물질특허에 의한 기술료 획득 및 식품과 의약품 수출산업에 활용
- ◆ 국내 가공식품 제조기술 향상에 활용
- ◆ 흑삼 활성물질 탐색 및 분석기술에 활용
- ◆ 질환동물모델 개발에 활용
- ◆ 골질환 관련 질병의 예방·치료를 위한 생리학적 연구에 활용

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 1-2 억불의 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.

국내외 제품생산 및 시장 현황

- ◆국내 제품생산은 벤처회사들을 비롯한 여러 기업에서 점차로 확대되고 있지만 과학적 입증이 부족한 연구상태이다. 또한 한국인삼의 국내외 총 수출액은 5,600만불이나 200억달러의 세계 인삼시장에 비할 때 매우 저조한 상황이며 1980년대초 30-40%의 세계시장 점유율이 현재는 10% 이하에 머물고 있는 상황이며 더욱이 최소시장접근(MMA)이 허용된 현 상태로서는 인삼시장 수입 개방을 하여야 하므로 국내 인삼농가들에게 더욱 커다란 경제적 손실이 초래될 것으로 보인다.
- ◆일반적으로 인삼 재배지역은 북위 33도~43도의 아세아 극동지역에서 제한적으로 재배되고 있으며 우리나라는 36도~38도 지역에서 주로 재배되고 있다.
- ◆인삼 주산지는 충북 음성·괴산, 충남 부여·금산, 전북 진안, 경북 풍기, 경기 포천·김포·강화지

역이며, 채굴시기는 9월-10월임.

◆인삼 생산은 90년대 중반까지 재배농가와 재배면적이 감소하였으나 '96년 홍삼전매제 폐지 이후 재배면적 증가와 함께 다시 증가하기 시작하여 '95년 12천톤에서 '02년 17천톤으로 생산량이 크게 증가하였음.

◆인삼 생산량 증가에도 불구하고 내수확대로 원료삼 가격은 최근 상승추세를 보이고 있어 수출품의 대외 경쟁력이 갈수록 약화되는 추세에 있음.

◆국외에서는 현재 200억달러의 세계 인삼시장이 형성되어 있고, 스위스의 진사나, 미국과 캐나다의 화기삼, 중국의 삼칠삼 등 개발된 인삼제품들이 MMA로 인하여 국내로 점차 많은 양이 수입되고 있는 실정이다.

개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

- ◆골다공증 예방/치료 효과의 고기능성 흑삼 제품 개발 및 개별인증 획득
- ◆국내 자생 농수산물에 대한 연구영역 확대

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				2,000	5,000	7,000
경제적 파급효과				5,000	10,000	15,000
부가가치 창출액				10,000	30,000	40,000
합계	0	0	0	17,000	45,000	62,000

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 7 장 참고문헌

1. Liu J, Shiono J, Shimizu K, Yu H, Zhang C, Jin F, Kondo R. (2009). 20(R)-ginsenoside Rh2, not 20(S), is a selective osteoclastogenesis inhibitor without any cytotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(12), 3320-3323.
2. 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.
3. 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.
4. Beatrix Roemheld-Hamm¹, Naomi V. Dahl² (2002). Herbs, menopause, and dialysis. *Semin Dial*, 15(1), 53-59.
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. Hill D A, Hill S R. (2010). Counseling Patients About Hormone Therapy and Alternatives for Menopausal Symptoms. *Am Fam Physician*, 82(7), 801-807.
8. 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.
9. Kim HR, Cui Y, Hong SJ, Shin SJ, Kim DS, Kim NM, So SH, Lee SK, Kim EC, Chae SW, Chae HJ. (2008). Effect of ginseng mixture on osteoporosis in ovariectomized rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 30(2), 333-345.
10. 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.

11. 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.
12. Everitt AV, Hilmer SN, Brand-Miller JC, Jamieson HA, Truswell AS, Sharma AP, Mason RS, Morris BJ, Le Couteur DG. (2006). Dietary approaches that delay age-related diseases. *Clin Interv Aging*. 2006;1(1):11-31.
13. Kropotov AV, Kolodnyak OL, Koldaev VM. (2002). Effects of Siberian ginseng extract and ipriflavone on the development of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bull Exp Biol Med*. 2002 Mar;133(3):252-4.
14. Lucero MA, McCloskey WW. (1997). Alternatives to estrogen for the treatment of hot flashes. *Ann Pharmacother*. 1997 Jul-Aug;31(7-8):915-7.
15. 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.

주 의

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