

[별지 제15호서식]

용역연구사업 연구결과보고서			
관리 번호	06082한약분221		
사업명	한약재의 과학화		
과제명	국문	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 천궁, 음양곽	
	영문	Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 4: <i>Epimedium koreanum</i> Nakai and <i>Cnidium officinale</i> Makino)	
주관연구기관	기관명	소재지	대표
	고려대학교 (산학협력단)	서울시 성북구 안암동 5가 1번지	이관영
주관연구 책임자	성명	소속 및 부서	전공
	박영인	고려대학교 생명과학대학	생물과학
총연구기간	2005년 4월 27일 - 2006년 11월 10일(1년 7개월)		
총연구비	570,000 천원		
연구년차	연구기간	연구비	
1차년도	2005. 4. 27 - 2005. 12. 31	28,000 천원	
2차년도	2006. 2. 10 - 2006. 11. 10	29,000 천원	
총참여연구원	19 명 (책임연구원: 2명, 연구원: 4명, 연구보조원: 13명 보조원: 명)		
<p>2006년도 용역연구개발사업에 의하여 수행중인 연구과제의 연구결과보고서를 붙임과 같이 제출합니다.</p> <p>붙임 : 1. 연구결과보고서 15부(필수배포기관 20부 제외).</p> <p style="text-align: right; margin-right: 50px;">2006 년 11월 일</p> <p style="text-align: right; margin-right: 50px;">주관연구책임자 박 영 인 (인 또는 서명)</p> <p style="text-align: right; margin-right: 50px;">주관연구기관장 고려대학교 산학협력단장 (직인)</p> <p style="margin-top: 20px;">식품의약품안전청장 귀하</p>			

210mm×297mm(일반용지60g/m²(재활용품))

제 출 문

식품의약품안전청장 귀하

이 보고서를 “한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 천궁, 음양곽 (고려대학교/박영인)”과제의 연구결과보고서로 제출합니다.

2006. 11.

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 박 영 인

제 1세부과제명 : 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 분석법 개발
(제1세부연구기관/세부과제책임자): 고려대학교/박영인

제 2세부과제명 : 유전자칩을 활용한 천궁과 음양곽 생리활성 성분의 효능유전자
검증 연구
(제2세부연구기관/세부과제책임자): 고려대학교/동미숙

목 차

I. 연구개발결과 요약문

- (한글) 한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 음양곽, 천궁
(영문) Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 5: *Epimedium koreanum* Nakai and *Cnidium officinale* Makino)

II. 총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표	8
제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	17
제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과	40
제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	127
제5장 총괄연구개발과제의 연구성과	132
제6장 기타 중요변경사항	135
제7장 참고문헌	136
제8장 첨부서류	139

III. 제1세부연구개발과제 연구결과

제1장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표	145
제2장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	150
제3장 제1세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과	149
제4장 제1세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	170
제5장 제1세부연구개발과제의 연구성과	231
제6장 기타 중요변경사항	234
제7장 참고문헌	235
제8장 첨부서류	236

III. 제2세부연구개발과제 연구결과

제1장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표	244
제2장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법	249
제3장 제2세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과	256
제4장 제2세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론	289
제5장 제2세부연구개발과제의 연구성과	338
제6장 기타 중요변경사항	342
제7장 참고문헌	344
제8장 첨부서류	345

연구결과보고서 요약문

연구과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 음양곽, 천궁		
중심단어	음양곽, 천궁, 천연물질 분리, HPLC와 LC/MS 동시 분석법, DNA microarray, 효능 유전자		
주관연구기관	고려대학교	주관연구책임자	박 영 인
연구기간	2006. 4. 27 - 2006. 11. 10		
<p>◦본 과제는 한약재의 과학화를 위한 천궁과 음양곽의 생리활성 성분 분리, 분석법 확립 및 유전자칩을 이용한 효능유전자의 database 구축을 최종목표로 하였다.</p> <p>◦음양곽을 70% methanol로 추출하여 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 등의 용매분획을 한 것으로부터 Icariin, Hyperoside, Chlorogenic acid, Epimedin A, Epimedin B, Epimedin C, Hexandraside E, Epimedeside F, Epimedeside A, 2''-O-Rhamnosylcariside II, icariside II, 및 quercetin 등 12종의 물질을 분리하여 구조 동정하였으며, 추가적으로 3종의 화합물을 분리하여 구조분석중이다.</p> <p>◦천궁은 70% methanol로 추출한 후 용매 분획을 실시하고, column chromatography를 통해 Z-ligustilide, Z-Butylidenephthalide, Neocnidilide, Senkyunolide A, Ferulic acid, Chlorogenic acid, Oleanolic acid, β-Sitosterol, Pregnenolone, Levistolide A 등의 10종의 화합물을 분리 정제하였으며 추가적으로 1종이상의 화합물을 분리, 동정 중이다</p> <p>◦HPLC와 LC/MS/MS를 이용하여 음양곽의 경우, hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin에 대한 동시 분석법을 확립하고 validation을 한 후 실제 음양곽 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하였다. 천궁의 경우 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide에 대한 동시 분석법을 확립하고 validation을 한 후 실제 천궁 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하였다.</p> <p>◦음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 HPLC/UV/MS로 분석한 후 전체 프로파일에 대하여 각 peak의 retention time, m/z 값, UV 흡수 peak 면적, mass intensity에 대한 피크 면적을 정리하여 데이터베이스화하였다. 음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 LC/MS로 분석한 후 얻은 total ion chromatogram에 대하여 retention time, m/z 값, mass intensity를 데이터화하여 주성분 분석을 수행하고 각 시료 간 similarity index(SI)값을 구하여 시료간의 유사성을 관찰하였다.</p> <p>◦음양곽은 남성 성기능과 관련된 효소들의 발현 정도를 실험하여 여러 세포주 중에서 LNCaP 세포주를 선정하였으며, 음양곽의 효능물질로는 nitric oxide 생성 및 성기능과 관련된 효소들의 발현과 함유량 등을 기본으로 icariin과 epimedin B 및 hyperoside 를 선정하였다. 천궁 및 그 분리물질 3종 ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid의 진정작용을 신경독성물질인NMDA에 의한 NO 생성이 저해되는 결과를 바탕으로 천궁의 진정작용을 약리효능으로 DNA chip 실험을 실시하였다.</p> <p>◦DNA microarray 실험은 ABI사의 Full Genome Expression Human Microarray를 사용하였으며, 얻어진 결과는 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 2배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다. 각 물질로부터 선정한 유의 유전자 중 유전자 기능이 알려진 20개 내외의 유전자를 선정하여 realtime PCR로 DNA microarray와 결과를 검증하였다. 산지별로 천궁 5종을 선정하여 DNA microarray를 실시하여 PCA 및 SI 값을 구하여 시료간의 유사성을 관찰하였다.</p> <p>◦음양곽과 천궁의 DNA microarray 결과들은 database 분석팀에 제공하여 효능유전자의 database 구축을 하였다.</p>			

Summary

Title of Project	Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 5: <i>Epimedium koreanum</i> Nakai and <i>Cnidium officinale</i> Makino)		
Key Words	<i>Epimedium koreanum</i> , <i>Cnidium officinale</i> , isolation of natural compounds, HPLC-LC/MS simultaneous analysis, DNA microarray, biological marker gene		
Institute	Korea University	Project Leader	Young In Park
Project Period	2005. 4. 26- 2006. 11. 10		
<ul style="list-style-type: none"> ◦ For the standardization of herbal medicine, the isolation of bioactive compound, the development of HPLC and LC/MS based simultaneous analysis method and identification of biomarker genes from <i>Epimedium koreanum</i> Nakai and <i>Cnidium officinale</i> Makino were carried out in this project. ◦ Fifteen compounds were isolated from the 70% methanol extract of Epimedii herba by column chromatography. Among them, 12 compounds were identified the chemical structures as icariin, hyperoside, chlorogenic acid, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hexandraside E, epimedoside F, epimedoside A, 2''-O-Rhamnosylcariside II, icariside II and quercetin. ◦ Eight compounds, which are Z-ligustilide, Z-Butylidenephthalide, Neocnidilide, Senkyunolide A, Ferulic acid, Chlorogenic acid, Oleanolic acid, β-Sitosterol, Pregnenolone, Levistolide A, were purified from the 70% methanol extract of Cnidii Rhizoma. And one more compound was isolated and is under the elucidation of the chemical structure. ◦ A sensitive and rapid LC/MS/MS and HPLC methods have been developed and validated for the quantitative determination of 5 compounds (hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin) which are main components of 70% ethanol extract of Epimedii herba. 70% ethanol extracts of Epimedii herba which cultivated from several different place, were analyzed their contents. For the chemical fingerprinting of <i>Cnidium officinale</i> Makino, A LC/MS/MS and HPLC based methods has been developed and validated for the simultaneous determination of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, which are major components of Cnidii Rhizoma. 70% ethanol extracts of Cnidii Rhizoma which cultivated from several different place, were determined the contents of these five components. ◦ After the determination of each components of Epimedii herba or Cnidii Rhizoma using HPLC/UV/MS, database were created using the retention time, m/z value and UV absorption area of each peak and the ratio of mass intensity to each peak. Total ion chromatogram which were obtained from the analysis of the 70% ethanol extracts from several batches of Epimedii herba and Cnidii Rhizoma using LC/MS, were applied to the database, analyzed their major components and determined the similarity of each sample by similarity index. ◦ To observe the change of the gene expression profile by Epimedii herba and its components, icariin, epimedin B and hyperoside, LNCaP cell line were selected by the observation of gene expression change of the male sex function related genes. SK-N-SH cell line were 			

Title of Project	Study on the Isolation of Bioactive Components and the Identification of Biomarker Genes from Oriental Herbal Medicines (Project 5: <i>Epimedium koreanum</i> Nakai and <i>Cnidium officinale</i> Makino)		
Key Words	<i>Epimedium koreanum</i> , <i>Cnidium officinale</i> , isolation of natural compounds, HPLC-LC/MS simultaneous analysis, DNA microarray, biological marker gene		
Institute	Korea University	Project Leader	Young In Park
Project Period	2005. 4. 26- 2006. 11. 10		
<p><continue></p> <p>used for the determination of gene expression profile by the Cnidii Rhizoma related to antisedative effect. Cnidii Rhizoma extract and its effective components, ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid, were inhibited the NO production induced by NMDA which is a CNS stimulating toxicant.</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ For the DNA microarray experiments, ABI Full Genome Expression Human Microarray was used and array data was filtered using the criteria of signal/noise ratio > 3 (50% samples), flag < 100 and normalized using Quantile method. Then DEG analysis was carried out to select the significant genes which were significantly changed more than 2 fold the expression by the herbal extract or their components (P<0.05). Significant genes were analyzed using the gene clustering and biological signal pathway. From significant genes, over 20 known genes per each extract or component were selected and validated using realtime PCR. ◦ DNA microarray data from the 70% ethanol extract of Epimedium herba and Cnidii Rhizoma and their components were provided to the database team to create the database for the biomarker genes of herbal medicine. 			

총괄연구개발과제 연구결과

제1장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 총괄연구개발과제의 목표

가. 최종 연구 목표

- 한약재의 과학화를 위하여 음양곽과 천궁을 대상으로 생리활성 성분을 추출, 분리하여 구조를 분석하여 국가표준품을 확립함에 있다. 그리고 음양곽와 천궁의 유효 성분에 대한 동시 분석법을 확립하고 품질 관리 기반 기술을 구축한다.

나. 연구배경 및 목적

- 최근 들어 국민 소득의 지속적인 증가와 노인 인구의 증가 그리고 각종 환경 문제의 대두 등으로 과거에 비해 국민들이 삶의 질적인 측면을 중시하는 사회적 분위기가 조성되고 있다. 이에 비례하여 건강의 중요성에 대한 인식이 한층 높아졌고 이에 따라 각종 건강관련사업들이 폭발적으로 증가하고 있다. 그 중에서도 특히 우리나라의 전통 약물인 한약재에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 한약은 우리가 오랫동안 사용해온 전통 약물 (Traditional Medicine)로서 연구 가치가 매우 높은 천연자원이라 볼 수 있다. 실제로 미국 과학자 쉰스광 박사는 19종의 식물 및 한약재로 ‘기적의 항폐암 식품 SV’를 개발하여 한약재재로는 처음으로 미국 식품의약국 (FDA)의 제 3단계 임상 실험에 진입했다. 따라서 우리나라도 다양한 한약서에 기록되어 있는 기성한약 처방의 약리 작용을 잘 검증하고 한약의 효능 성분을 연구하는 등 전통 약물의 연구를 위하여 보다 과학적인 방법으로 접근할 필요가 있다.
- 이러한 취지에서 보건복지부는 한방제제의 활성화 및 한약재에 대한 규격화를 목적으로 다양한 정책 및 용역 연구를 실시해왔다. ‘한약처방의 우수 경험방 수집 및 활용방안연구’를 910여개의 처방을 수집, 정리한 ‘한약처방조사수록집’을 공개하여 사장, 멸실의 우려가 있는 한약 처방을 기록화하고 고전문헌을 조사하여 활용 방안을 제시함으로써 전통 한약 처방의 임상적 가치를 계승 발전시키고 한약제제 또는 신약 개발에 기여하고자 하였다. 또한 ‘우수한약관리기준’ (GAP, GMP, GSP)을 마련하고 또한 주요 한약 250여 품목에 대해 정품 개념을 도입하여 표준 한약을 만드는 한편 한방 의료기관 등에서 판매되는 한약에 대한 품질 조사를 실시하는 등 우수 한약재 및 한약에 대한 체계적인 관리를 위한 다양한 시도를 하고 있다.
- 그러나 한약재는 생산지, 토양, 채취시기, 재배조건 등에 따라 품질차이가 현저하고, 이를 가열하고 추출하는 과정에서 주요 성분의 함량차이가 있다. 동일 품목이더라도 규격이 떨어진다거나 검증되지 않은 유사기원의 원료를 사용한다면 약효가 없거나 부작용이 발생할 수도 있다. 따라서 한약재들에 대하여 다양한 과학적인 실험을 통하여 규격 및 약효 등을 제시함과 동시에 체계적인 관리가 절실히 요구된다.
- 우리나라는 대한약전과 생약규격집에 의하여 대부분의 한약재들이 관리되고 있다. 한약재들은 주로 각 한약재의 약효를 얻기 위하여 단독으로 혹은 여러 한약재를 섞어서 사용되고 있으나 이들 공정서에는 주로 한약재의 외형상의 이화화학적 특징, 총 회분량이나 한두가지의 지표물질들을 기준으로 하여 생약들을 구분하고 있어, 한약재들의 약리작용 물질과는 관계없이 구분되어 있다. 실제로 본 과제에서 연구하고자 하는 음양곽과 천궁의 경우에 대한약전에 수록된 것을 보면, 음양곽의 경우(글상자 2)에는 삼지구엽초의 지상부를 사용하며, 식물의 성상에 대하여 자세히 설명되었다. 확인을 위한 실험법을 위하여 지표성분인 icariin을 분석하기 위하여 주로 박충크로마토그래프로 정성적으로만

천 궁
(川 芎)
Cnidium Rhizome

Cnidii Rhizoma

이 약은 천궁 *Cnidium officinale* Makino(미나리과 *Umbelliferae*)의 뿌리줄기를 그대로 또는 열탕에 데친 것이다.

성 상 이 약은 불규칙한 덩어리, 때로는 세로로 잘라져 있으며 길이 5 ~ 10 cm, 지름 3 ~ 5 cm이다. 바깥면은 회갈색 ~ 어두운 갈색이고 겹친 결절이 있으며 그 표면에는 흑갈색의 융기가 있다. 종단면의 가장자리는 고르지 않게 갈라지고 안쪽면은 회백색 ~ 회갈색으로 반투명이며 때로는 비어 있기도 하다. 질은 조밀하고 단단하다.

이 약의 횡단면을 현미경으로 볼 때 피부 및 수에는 유도(油道)가 산재한다. 목부는 후막의 목화된 크고 작은 목부 섬유가 무리를 이루고 있다. 전분립은 흔히 호화되어 있으나 드물게는 지름 5 ~ 25 μm 의 전분립이 있고 수산칼슘의 결정은 없다.

이 약은 특이한 냄새가 있고 맛은 약간 쓰다.

회 분 6.0 % 이하.

산불용성회분 1.0 % 이하.

글상자 1. 천궁의 대한약전 규정

확인하도록 되어있어 정량적인 개념이 들어 있지 않다. 특히 천궁의 경우에는 글상자 1에서와 같이 뿌리 줄기에 대한 정상만 수록되어 있을 뿐 지표성분이나 약리작용을 나타내는 성분에 대한 언급이 전혀 되어있지 않다. 이러한 것은 한약재들의 약리작용 물질과는 관계없이 구분되어 있어 한약재들의 사용 시 약리작용이 달리 나타날 수 있을 것이다.

- 한약재의 지표성분은 그 식물에 특이적으로 함유되어 있는 물질을 사용하는 것으로 일반적으로 약리작용을 나타내는 성분과는 다른 개념으로 사용하고 있다. 한약재들은 대부분의 경우 한가지 한약재만 사용하는 것이 아니라 한약제제의 처방에 따라 수종에서 심수중에 이르는 한약재들을 혼합하여 열수추출하여 복용하게 된다. 그러므로 각 한약재들에 함유되어 있는 유효성분 량에 따라 한약재의 약리작용이 달리 나타날 수 있을 것이다. 따라서 한약재의 약리작용을 예측하기 위하여 유효성분 중심의 한약재 관리가 매우 절실하다.
- 양약의 경우에는 약물의 함량을 측정하기 위하여 HPLC나 GC 등을 이용한 기기분석법이 보편적으로 널리 사용되고 있다. 그러나 한약재의 경우에는 대한약전에도 아직 기기분석법이 수재되어 있지 않아 한약재의 과학화를 위하여 한약재들의 유효성분에 대한 기기분석법을 통한 정량 및 정성 분석법에 대한 개발이 절실한 실정이다. 또한 한약재들의 약리작용물질에 대한 분리 및 이들의 다양한 약리작용에 대한 연구를 통하여 한약재에 대한 약리 가이드라인을 제시하는 것이 매우 필요하다.

음 양 광
(淫 羊 藿)
Epimedium Herb

Epimedii Herba

이 약은 삼지구엽초 *Epimedium koreanum* Nakai 또는 기타 동속 근연식물(매자나무과 *Berberidaceae*)의 지상부이다.

성 상 이 약은 줄기와 잎으로 되어 있다. 줄기는 가늘고 원주형이며 표면은 황녹색 혹은 담황색이고 광택이 있다. 줄기에 붙은 잎은 대생이고 2회 3출복엽이다. 작은잎은 난원형으로 길이 3 ~ 13 cm, 너비 2 ~ 7 cm이며 잎끝은 약간 뾰족하고 정생하는 작은잎은 밑부분이 심장형이고 양쪽의 작은잎은 비교적 작으며 심장형에 가깝고 바깥 편은 비교적 크고 이(耳)형을 나타내며 가장자리는 황색으로 자모(刺毛)와 같은 잔 톱니로 되어 있다. 상면 표피는 황록색이고 하면표피는 회록색이며 주맥은 7 ~ 9 줄이고 밑부분에는 드문드문 가늘고 긴 털이 있고 그물맥이 뚜렷하다. 작은 잎자루는 길고 질은 뻣뻣하다.

이 약은 냄새가 없으며 맛은 조금 쓰다.

확인시험 1) 이 약의 가루 0.5 g에 에탄올 10 mL를 넣고 수욕상에서 환류추출한 다음 여과한다. 여액을 증발시키고 잔류물을 에탄올 1 mL에 녹여 검액으로 한다. 따로 박층크로마토그래프용 이카리인 0.5 mg을 에탄올 1 mL에 녹여 표준액으로 한다. 이들 액을 가지고 박층크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액 및 표준액 10 µL씩을 박층크로마토그래프용실리카 겔(형광제 첨가)을 써서 만든 박층판에 점적한다. 다음에 초산에칠·메칠에칠케톤·포름산·물혼합액(10 : 1 : 1 : 1)을 전개용매로 하여 약 10 cm 전개한 다음 박층판을 바람에 말린다. 여기에 자외선(주파장365 nm)을 쬐일 때 검액과 표준액은 같은 위치에 어두운 홍색 반점이 나타난다. 여기에 염화알루미늄시액을 뿌리고 자외선(365 nm)을 쬐이면 이 반점은 등홍색이 된다.

건조감량 13.0 % 이하.

회 분 2.0 % 이하.

산불용성회분 0.1 % 이하.

엑스함량 물엑스 20.0 % 이상, 묽은에탄올엑스 17.0 % 이상.

글상자 2. 음양곽의 대한약전 규정

- 음양곽(Epimedii Herba)(Figure 1)은 삼지구엽초 (*Epimedium koreanum* Nakai) 또는 기타 동속 근연식물(매자나무과 *Berberidaceae*)의 지상부이다. 삼지구엽초는 매자나무과 삼지구엽초속에 속하는 다년생 친근성 초본으로 온대지방에 약 20여종이 분포한다. 우리나라에는 1종만이 보고 되어 있고 경기, 강원 중북부지역을 중심으로 한 대부분의 산지에 분포하고 있다. 현재 우리나라에서 대규모로 재배되고 있는 곳은 없는 실정이고 철원 등 일부지역에서 소규모 면적으로 재배되고 있을 뿐이다.
- 음양곽은 본초강목(本草綱目)에서 ‘중국 사천 북부지방에 양의 일종인 ‘음양’이라는 동물이 하루에 암양과 백희의 교합을 하는 것을 보고 관찰한 바 이 풀(삼지구엽초)을 뜯어먹고 정력을 유지함을 알고 마을의 칠순노인이 이 풀을 먹고 자식을 낳고 청춘을 다시 찾게 되어 음양이 먹는 콩잎(藿)이라 하여 음양곽이라 부르게 되었다’고 한다. 음양곽은 예로부터 약용으로 쓰였는데, 한방과 민간에서 잎과 줄기를 강장, 강정, 이뇨, 음위, 창종, 건망증 등에 약재로 사용하고 있다. 음양곽은 이선탕, 장양



Figure 1. Pictures of *Epimedium koreanum* Nakai, *Epimedium Herba*, *Cnidium officinale* Makino and *Cnidii Rhizoma*

단, 선령비산 등의 한방처방에 사용되고 민간에서는 강장, 거풍강정, 음위, 이뇨 및 신경성 강장제를 목적으로 주로 술을 담그거나 차로 다려서 복용하고 있으나 이에 대한 전반적인 연구가 진행되지 않았다. 따라서 음양곽의 유효성분, 약리효과 및 독성작용에 대한 다양한 연구가 필요하다.

- 음양곽 성분은 Triterpenoids (β -sitosterol, Campesterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside, campesterol-3-O- β -D-glucoside), Flavonoids (Quercetin, Des-O-methylcariin), Flavonoid glycosides (Icariin, Icariside, Epimedesides, Anhydrocariitin-3-O- α -rhamnoside), Alkaloids (Magnoflorine), Lignans ((-)-Olivil, (-)-Olivil-4'- β -D-glucopyranoside, Icariresinol, Icariresinol-4'- β -D-glucopyranoside) 등 외에도 다수의 화합물들이 보고되어 있다.
- 천궁은 중국이 원산이며 재배역사가 4백 수십 년으로 생각되는데, 원래는 芎藭이었으나 四川산의 품질이 우수하여 이것을 川芎으로 부르던 것이 굳어져 천궁이라는 이름이 유래하였다. 동남아시아에서는 日芎(*Cnidium officinale*)으로 통용되고 있다. 농가에서는 천궁(*Cnidium officinale* Makino)을 속칭 일천궁이라 하고 중국에서 재배되고 있는 *Ligusticum chuanxiong* hort 를 속칭 토천궁이라 불리기도 한다. 국내에서는 천궁(*Cnidium officinale* Makino)과 토천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort)이 재배되는데 천궁은 영양, 청송, 포항, 안동, 봉화, 청도, 영주, 울릉도, 거창에서 많이 재배하며, 토천궁은 여름철 기온이 다소 서늘한 평창, 정선, 태백, 삼척, 인제, 충주, 제천, 단양 등지와 같이 산간 고냉지에 주로 재배되고 있다. 대체로 토천궁은 수확량은 많으나 천궁보다 가격이 낮다. 대한약전에는 *Cnidium officinale* Makino의 뿌리를 말린 것을 천궁(*Cnidii Rhizoma*)으로 규정하고 있으며, 본 과제에서는 *Cnidium officinale* Makino의 근경을 천궁시료로 사용하고자 한다.
- 천궁은 근경을 약재로 하는데 천궁은 혈관확장, 진정작용, 진통, 진경작용 및 장관 경련을 억제하는 약리작용이 있는 것으로 알려져 한약처방에 널리 사용되고 있는 한약재 중의 하나이다. 천궁은 가미패독산(加味敗毒散), 육울탕(六鬱湯), 쌍화탕(雙和湯), 십전대보탕(十全大補湯) 외에도 다양한 처방에 이용되고 있으며, 특히 우리나라의 의료보험이 적용되는 한약사 및 한약조제약사에게 적용되는 100처방 중에 29종에 천궁이 첨가되는 등 매우 중요하고 다량으로 사용되고 있는 한약재이다. 그러나 우리나라에서는 토천궁과 구별없이 마구 사용되고 있으며, 대한약전에 지표물질 조차도 없는 한약재로 한약재 과학화를 위하여 천궁에 대한 다양한 약리 및 유효물질 연구 및 분석법 개발을 통하여 품질 기준이 설정되어야 될 한약재이다.
- 천궁의 근경(*Cnidii Rhizoma*)에는 Cnidilide, Isocnidilide, Neocnidilide, Adenosine cnidilide, Butylphalide, butylidenephthalide(Z-form), (3S)-3-Butyl-4,5-dihydrophthalide, Senkyunolide, Ligustilide, Ligustilidiol 등의 다수의 정유성분들이 알려져 있다(難波恒雄. 1993. 和漢藥百科圖鑑). 그 외에도 Phenylpropanoid(Ferulic acid, Chlorogenic acid, Coniferyl ferulate), pregnenolone과 같은 steroid 계 물질, Anthocyanins (Cyanidin-3-O- β -D-Glucoside, Delphinidin-3-O- β -D-Glucoside) 및 polyacetylene 계 물질들(Falcarindiol, Falcarnalone)이 알려져 있다. Ferulic acid는 진통, 진경작

용과 평활근 이완작용이 있어서 장관의 경련이나 임신자궁의 수축, 경련을 억제하고, 정유(精油) 성분이 중추신경계에 작용하여 대뇌의 활동을 억제하여 진정작용이 있으며 카페인의 흥분작용에 길항한다고 알려져 있다. 특히 falcarindiol은 anti-tumor 활성을 갖는 natural product로 미국의 NCI (Molecular Targets Development Program, CCR, NCI)에 등재되어 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

- Post-genome 시대에 들어서 생명체들의 유용한 정보를 이용하는 산업분야는 생명체 기원에 대한 정보를 얻게 하고 나아가 인간을 질병으로부터 해방시킬 수 있는 가장 유력한 방법으로 제시되어지고 있다. DNA chip은 지금까지 알지 못했던 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 실험적 수단으로 최근에 개발된 유전정보를 분석할 수 있는 여러 방법 중 가장 주목받고 있는 방법이다.
- 최근 발달한 DNA chip을 이용한 다양한 연구는 의학학을 포함한 독성학, 생물학의 다양한 분야에서 새로운 지평을 열었다. 특히 질병과 관련된 병인 규명, 신약개발을 위한 target 개발, 염기서열 해석 (Genotyping), 돌연변이 및 다형의 검출 (Detection of mutation/polymorphism), 질병의 진단 (Disease diagnosis) 등의 의학학 분야, 약물에 의한 독성 유발 원인 규명, 및 marker 개발을 통한 독성물질의 독성유발 예측 등의 독성학분야 외에도 친자 확인이나 범인 확인 등을 위한 법의학적 활용, DNA 고고학 등의 다양한 분야에서 DNA chip을 이용한 연구가 진행되고 있다.
- 국제시장에서 herbal medicine에 대한 수요가 급증함에 따라 전통약물의 세계화를 위하여 국내 한약재의 품질 경쟁력 확보가 시급하며, 한약재의 품질을 의약품 수준으로 향상시킬 수 있는 방법인 유효성분 중심의 규격관리가 필요하며, 유효성분 중심의 한약재 관리를 위하여 DNA chip을 이용한 효능 유전자를 찾아 biological finger printing에 적용하는 것이 매우 효과적일 것이다.

1.2 총괄연구개발과제의 목표달성도

가. 음양곽

연구 개발 목표	연구 범위	달성도	관련 연구에의 기여도
음양곽의 생리활성 성분의 분리, 구조분석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립	- 음양곽 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명	100 %	- icariin 대량분리 방법 확립
	- 음양곽 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립	100 %	- 음양곽으로부터 신물질 분리 (Epimedeside F)
	- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation	100 %	- 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공
	- HPLC/MS/MS를 이용한 동시분석법 확립 및 validation	100 %	- 음양곽이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시
	- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting	100 %	- 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시
	- 실제 유통 시료 분석	100 %	- 음양곽의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
음양곽의 생리활성 성분의 효능유전자 검증	- 7종의 세포에서의 음양곽 추출분획 및 활성물질의 세포독성 측정 및 세포주 선정	100 %	- 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공
	- 세포주에 추출분획 처리 및 target preparation	100 %	- 천궁이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시
	- Oligo DNA chip assay	100 %	- 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시
	- Oligo DNA chip data analysis	100 %	- 천궁의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
	- Real Time PCR	100 %	

나. 천궁

연구 개발 목표	연구 범위	달성도	관련 연구에의 기여도
천궁의 생리활성 성분의 분리, 구조분석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립	- 천궁 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공 - 천궁이 함유된 건강 보조식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시 - 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시 - 천궁의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
	- 천궁 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립	100%	
	- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation	100 %	
	- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립	100 %	
	- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting	100 %	
	- 실제 유통 시료 분석	100 %	
	- 패턴인식분석법 적용	100 %	
천궁의 생리활성성분의 효능유전자 검증	- 7종의 세포에서의 음양곽 추출분획 및 활성물질의 세포독성 측정 및 세포주 선정	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공 - 천궁이 함유된 건강 보조식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시 - 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시 - 천궁의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
	- 추출분획 처리 및 target preparation	100%	
	- Oligo DNA chip assay	100 %	
	- Oligo DNA chip data analysis	100 %	
	- Real Time PCR	100 %	
	- 생리활성성분의 효능유전자 data base 구축 및 효능정보 system 구축	100 %	

1.3 국내 · 외 기술개발 현황

- 중국은 풍부한 생약자원 및 사용경험을 바탕으로 화학약품과 구분된 허가제도를 운영하여 다양한 전통중국의약품(Traditional Chinese Medicine)(중약제제) 개발의 제도적 뒷받침과 수출지원 정책에 힘입어 세계시장 점유율을 계속 높이고 있다. 음양곽이나 천궁에 대한 천연물 연구는 많이 되고 있지 않으나 주로 새로운 성분을 분리하여 약리작용을 관찰하는 연구들이 한국, 중국 및 일본학자들을 중심으로 진행되고 있다.

- 한약재에서 DNA microarray 방법이 이용되는 것은 주로 한약재의 효능을 확인하기 위한 한 방법으로 주로 사용되고 있다. 즉, ginkgo biloba (Watanabe *et. al.*, 2001), licorice (Leung *et. al.*, 2003), Scutellaria barbata (Yin *et. al.*, 2004), huanglian (Kang *et. al.*, 2005), Echinacea purpurea (Yang *et. al.*, 2006) 등의 단일 한약재 추출물 뿐 아니라 Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) (Sakaida *et. al.*, 2003) 복합 처방전에 의한 한약재의 효능을 확인하기 위한 생체 또는 세포주에서의 유전자 발현 변화를 관찰하기 위한 방법으로 사용되었다.
- Herbal medicine을 천연물 신약으로 개발하기 위해서는 품질의 표준화가 매우 중요하며, 이를 위하여 HPLC, GC, LC-MS, LS/MS-MS 등의 최신 분석기기를 이용한 다양한 분석법들이 적용되고 있다. 그 중에서 DNA microarray 방법이 한약재의 품질 표준화를 위한 biological response fingerprinting (BioReF) 방법을 이용한 human cell에서 botanical drug product에 biological response를 나타내는 일련의 marker gene을 결정하기 위한 실험법을 최근 발표하였다 (Rong *et. al.*, 2006).
- 음양곽이나 천궁에 대한 천연물에 대한 연구는 상대적으로 많이 되고 있지 않으나 주로 새로운 성분을 분리하여 약리작용을 관찰하는 연구들이 한국, 중국 및 일본학자들을 중심으로 진행되고 있다. 음양곽의 경우 일본의 Chiba 등(2002)은 syringaresinol를 음양곽으로부터 분리하여 PC12 세포에서 저농도에서 dose-dependent neuritogenesis를 나타낸다고 보고하였다. 그리고 중국의 Guo 와 Xiao (2003)은 중국내에 있는 Epimeidum herba Epimeidum sagittatum, E. brevicornu, E. acuminatum, E. koreanum, E. pubescens, E. leptorrhizum and E. wushanense 등 7종에 대하여 중국내의 분포 및 성분, 의학적 특성에 대하여 보고하였으며, Sun 등(2004)은 5S rRNA gene spacer의 염기서열에 의하여 이들을 분류하는 것에 대하여 설명하였다. 그리고 icariin의 HL-60 세포의 differentiation 증가 및 간독성 보호등에 대한 알려진 효능이 아닌 다른 약리작용에 대하여도 관찰하였다. 그리고 오 등 (2004)은 음양곽의 methanol 추출물이 anti-cholinesterase 작용을 갖고 있으며, 기억력과 인식능력의 향상을 나타낼 수 있을 것으로 예상하였다.
- 천궁의 경우에는 주로 우리나라와 일본 학자들이 성분분석 및 효능 시험을 실시하였다. 우리나라의 경우 최근들어 다양한 실험 및 성분분석이 실시되고 있다. 경희대 동서의학대학원의 김교수팀은 ethylacetate 층이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, faltarindiol이 약리작용을 나타내는 물질로 보고하였다. 서울대학교 안교수팀은 천궁의 정유성분인 butylidenephthalide을 분류하여 acaricidal activity를 갖는다고 보고하였다. 원광대의 추영국교수팀은 천궁의 추출물이 antiangiogenic activity를 갖고 있다고 보고하였다. 일본과 한국의 공동연구(2003)에 의하여 1,3-selenazol-4-one derivatives (Sz-A, B, C, D and E)이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, 천궁의 정유성분을 분석하였다(2002). beta-heteroglucan인 cnidirhan SIIA이 anticomplement 효과를 나타낸다고 Tomoda등(1994)이 보고하는 등 천궁과 음양곽의 다양한 물질들을 분리하여 효능을 관찰하고 있다.
- 최근들어 국내자생식물이나 한약재들에 대한 개발에 대한 관심이 증대되면서 다양한 한약재들로부터 물질분리 및 효능검색에 대한 연구가 국내에서 활발히 진행되고 있다. 음양곽의 경우는 서울대학교 김영중 교수팀(1995)과 강삼식 교수팀(1988)이 flavonoid glycoside 계통을 분리하였으며, icarisid II는 간독성보호 작용을 나타내는 것으로 보고하였다. 특히 강삼식 교수팀(1990)은 음양곽의 지하부도 물질분리를 실시하여 β -sitosterol 계통의 물질들의 구조를 밝힌 바 있다. 충남대 김충렬 교수팀(1992)과 경희대 박병림 교수팀(1997)이 음양곽 methanol 추출물과 열수추출물이 강력한 항산화작용을 나타냄을 보고하였고, 경희대 김호철 교수팀(1997)은 음양곽이 미약하나마 혈압하강작용을 나타낸다 하였다. 충북대의 임흥빈 교수팀(2001)은 음양곽의 장기투여에 의하여 노화에 따라 감소하는 간의 약물대사효소들의 활성도를 더욱 감소시킴을 보고하면서 노년기의 이물질대사에 부담을 줄 수 있을 것을 예견하였다.

- 천궁에 대하여는 좀 더 다양한 연구가 진행되고 있다. 우리나라의 경우 경희대 동서의학대학원의 김교수팀은 ethylacetate 층이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, falcariindiol이 약리작용을 나타내는 물질로 보고하였다. 서울대학교 안교수팀은 천궁의 정유성분인 butylidenephthalide을 분류하여 acaricidal activity를 갖는다고 보고하였다. 원광대의 추영국교수팀은 천궁의 추출물이 antiangiogenic activity를 갖고 있다고 보고하였다. 일본과 한국의 공동연구(2003)에 의하여 1,3-selenazol-4-one derivatives (Sz-A, B, C, D and E)이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, 천궁의 정유성분을 분석하였다(2002). 서울여대의 노봉수 교수팀(2003)은 수입산과 국내산 천궁의 향기의 pattern을 GC를 이용하여 분석하였을 때 그 향들의 함량차이가 뚜렷이 나므로 구분이 가능하다고 보고하였다. 동국대 박용기 교수팀(1998)은 토천궁과 천궁을 비교하였을 때 아미노산 함량은 토천궁이 많으나, 총질소량은 천궁이 더 많이 함유하고 있으며, 둘 다 항산화작용을 갖고 있으나 특히 천궁이 더욱 강력하였다고 보고하였다. 대구대 강선태, 이태호 교수팀(1989)은 천궁이 혈전증 및 고점도혈증에 효과가 있음을 보고하였다.
- 아직 음양곽이나 천궁에 대한 DNA microarray를 이용한 실험 결과는 전혀 보고된 바가 없다.
- 음양곽과 천궁의 유효성분 분석법 개발에 대한 현황 및 본 연구팀의 연구결과를 표로 정리하면 아래와 같다.

연구 과제	국내 현황	국의 현황	본 과제의 연구결과
음양곽의 유효성분 분석법 개발	-음양곽의 flavonoid 성분 연구 (강삼식 et al., 1988) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin 정량 (신국현 et al., 1989) -GC/MS에 의한 삼지구엽초의 지하부 성분 연구 (강삼식 et al., 1990) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin과 epimedin A 함량의 계절적 변동 연구 (강삼식 et al., 1991) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin의 함량 분석 (김호경 et al., 2001)	-HPLC에 의한 icariin의 함량 분석 (Sha et al., 1997) -Micellar electrokinetic capillary chromatography를 이용한 flavonoid 성분 분석 (Wang et al., 2003) -IR을 이용한 삼지구엽초의 판별법 (Jin et al., 2006)	-기존의 HPLC 분석법은 주로 icariin만을 대상으로 하였으나 본 연구에서는 icariin을 포함한 5종의 flavonoid glycoside에 대한 동시 분석법 확립함 -HPLC/MS/MS를 이용한 음양곽의 분석법을 처음 확립 -음양곽의 품질 관리를 위한 패턴분석법의 적용을 처음 시도함
천궁의 유효성분 분석법 개발	-HPLC에 의한 토천궁과 일천궁의 phthalide 성분 비교 (이숙연 et al., 1990)	-천궁의 acidic polysaccharide 연구 (Tomoda et al., 1992) -천궁의 glucan 성분 연구 (Tomoda et al., 1994) -천궁의 alkylphthalide 유도체 성분 연구 (Tsukamoto et al., 2005)	-기존의 연구는 주로 천궁에서 약리활성을 나타내는 성분을 규명한 연구가 대부분이며 유효 성분에 대한 동시 분석법은 확립되어 있지 않음. -본 연구에서는 HPLC와 LC/MS/MS를 이용한 천궁 유효 성분의 분석법을 최초로 확립 -천궁의 품질 관리와 판별을 위한 패턴분석법의 적용을 처음 시도함

제2장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 음양곽의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구

가. 연구개발 내용

- 음양곽으로부터 생리활성 성분 분리, 구조분석
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- 실제 유통되는 음양곽 시료 분석
- 음양곽의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용
- 음양곽의 성기능 향상관련 세포주 선정
- DNA microarray 실험, 분석 및 결과 검증

나. 방법

<분리팀>

(1) 음양곽의 구입 및 인증

- 2005년 5월 강원도 철원 재배지에 방문하여 (Figure 2), 건조한 음양곽 잎 12 kg을 직접 구입하였으며, 그 중 1kg과 재배하고 있는 삼지구엽초 1본을 경희대 이재현 교수님께 보내어 감정, 인증 받았으며, 추가 실험을 위해 2005년 11월 같은 곳에서 18 kg을 더 구입하였다.



Figure 2. Pictures of *E. koreanum* Nakai used in this experiment (Chulwon, Kangwondo, Korea, 2005. 5).

(2) 시약 및 기구

- ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR은 Bruker CXP-300 spectrophotometer를 사용하였고, TMS를 internal standard로 사용하였다. FAB-MS는 JMS 700 spectrometer를 사용하였다. Column chromatography의 packing material은 Kieselgel 60(70-230 mesh, Art. 7734, 230-400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)와 Sephadex LH-20(Bead size 25-100 μm , Pharmacia, Sweden), 그리고 Cosmosil 75C18-PREP(nacalai tesque)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.25 mm, 20x20 cm, Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F₂₅₄ S plate(layer thickness, 0.25 mm, 20x20 cm, Art. 15423, Merck)를 사용하였으며, 발색시약으로는 10%

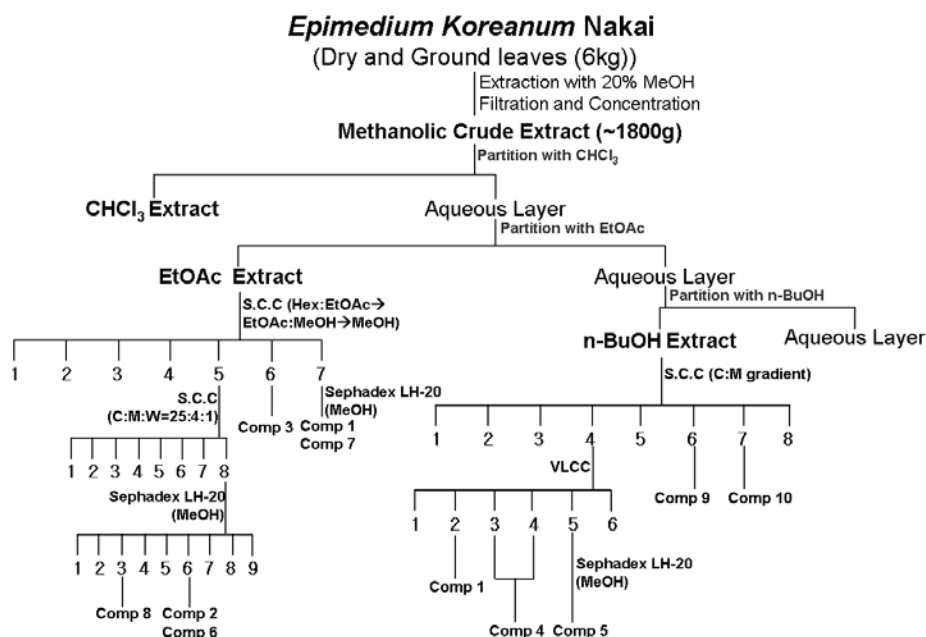
H₂SO₄ 및 FeCl₃를 사용하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 특급 및 EP급 용매를 사용하였다.

(3) 음양곽 70% ethanol 추출물제조

- Oligo DNA Chip 및 HPLC/MS/MS 실험을 위해 산지에서 직접 구입한 것과 경동시장에서 구입한 국산 및 중국산 음양곽을 건조 세절하여 분말로 만들고 이를 water-bath상에서 70% EtOH로 가열 추출, 감압 농축한 후 동결 건조하여 LC/MS/MS 및 Oligo DNA Chip 분석팀에 전달했다.

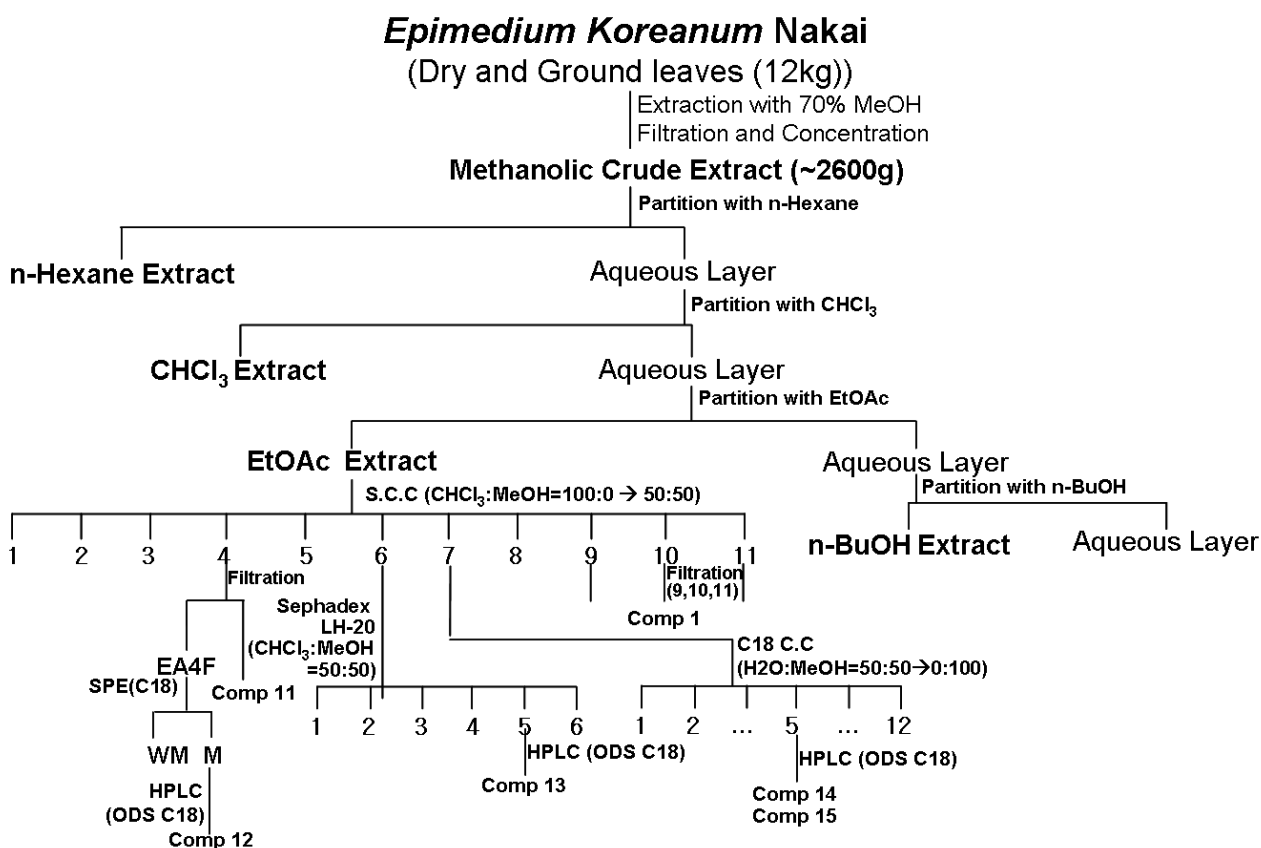
(4) 음양곽의 생리활성 성분의 분리 및 동정

- 음양곽의 생리활성 화합물의 분리 및 화학구조 결정을 위해 건조 음양곽 분말 총 6kg을 20% MeOH로 가열추출을 3회 반복한 후 감압농축하여 얻은 MeOH extract (1800g)를 n-Hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH로 계통 분획하였다(Scheme 1).
- EtOAc 분획물 (120.3g)을 silica gel column chromatography (Hexane → Hexane:EtOAc → EtOAc:MeOH → MeOH)를 이용하여 7개의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중 No. 7로부터 compound 1 과 compound 7 을 얻었다. 다시 No. 5 분획을 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH:H₂O = 25:4:1)를 실시하여 8개의 분획을 얻었으며, 그 중 No. 8 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 실시하여 No. 6 소분획으로부터 compound 6 을 얻었으며, 동일 분획물을 다시 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH:H₂O = 25:4:1)를 반복 수행하여 No. 3 소분획에서 compound 8, No. 6 소분획에서 compound 2를 얻었다.
- BuOH 분획물(320.4g)에 대한 silica gel column chromatography (Hexane:EtOAc→EtOAc:MeOH → MeOH)를 실시하여 8개의 소분획을 얻었으며 그중 No. 4 분획으로 vacuum liquid column chromatography를 통해 다시 6개의 소분획을 얻었으며 그 중 No. 3, No. 4 분획으로부터 compound 4, No. 5 분획으로부터 sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 통해 compound 5 를 얻었다. No. 6, No. 7 분획으로부터 각각 preparative HPLC를 통해 compound 9, compound 10을 분리하였다.



Scheme 1. First isolation of bioactive compounds from *E. koreanum* Nakai.

- 그러나, 분리된 화합물들의 양이 사업단의 요구량에 비해 작고, 순도가 기준에 부합하지 못하는 것들이 있어서, 일부 화합물의 대량 분리 정제 및 추가적인 화합물의 분리를 위해 2005년 11월 구입한 음양곽 건조 분말 중 12 kg을 70% MeOH로 가열추출을 3회 반복하고 감압 농축하여 얻은 MeOH extract (2600g)를 n-Hexane, CHCl₃, Ethyl acetate, n-BuOH로 계통분획하고 감압 농축하여 각각의 extract를 확보하였다 (Scheme 2).
- 그 중 Ethyl acetate 분획물 중 100g으로 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH = 98:2→50:50)를 통해 11개의 소분획을 얻었으며, No. 4 소분획에서 filtration을 통해 compound 11을 분리하였으며. 분리후의 여과액으로 C18 resin을 이용한 solid-phase extraction (50% MeOH→100% MeOH)을 통해 얻은 100% MeOH 분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통하여 compound 12를 분리하였다. No. 6 소분획은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH = 1:1)를 통해 다시 6개의 소분획으로 분리하고, 그중 No. 5 소분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통하여 compound 13을 분리하였다. No. 7 소분획을 cosmosil 75C18 resin을 이용한 reverse phase column chromatography (50% MeOH→100% MeOH)를 통해 12개의 소분획으로 나누고 그 중 No. 5 소분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통해 compound 14, 15를 분리하여 현재 구조 분석 중이며, 나머지의 분획 및 CHCl₃ 분획물로부터 화합물을 분리하고자 실험을 진행 중이다.



Scheme 2. second isolation of bioactive compounds from *E. koreanum* Nakai.

< 분석팀 >

(1) 실험재료

- 본 실험에서는 산지가 다른 7종의 음양곽 시료부터 얻어진 70% 에탄올 추출물 21종, 타 식물로부터 유래한 70% 에탄올추출물인 Ext-PR, Ext-GT, Ext-CT을 사용하였다. Icarin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside는 음양곽으로부터 추출된 표준품을 사용하였고, 내부표준물질로 사용한 digoxin, α -naphthoflavone은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. 각 시료의 산지, 구입처, 수득량은 다음과 같다.

시료번호	산지	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)	추출물 시료번호
K-1	한국산	청풍약초	40	8.50	EK-K1-I
				8.48	EK-K1-II
				8.71	EK-K1-III
K-2	한국산	신금강약국 (철원)	40	8.46	EK-K2-I
				8.21	EK-K2-II
				8.16	EK-K2-III
K-3	한국산	지리산 한약나라 (인제)	40	7.18	EK-K3-I
				7.21	EK-K3-II
				6.99	EK-K3-III
K-4	한국산	철원 재배지	80	7.76	Ext-1
				8.01	Ext-2
				8.53	Ext-3
C-1	중국산	제기당물산	40	7.20	EK-C1-I
				6.98	EK-C1-II
				7.35	EK-C1-III
C-2	중국산	부영약업사	40	7.69	EK-C2-I
				7.99	EK-C2-II
				8.06	EK-C2-III
C-3	중국산	신초당약국	40	7.23	EK-C3-I
				7.44	EK-C3-II
				7.16	EK-C3-III

(2) 시약 및 기구

- HPLC용 용매는 J. T. Baker (USA) 제품을 사용하였으며, 그 외 분석용 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Compound profiling을 위한 실험에는 Agilent 1100 series LC/MSD trap을 사용하였으며 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)을 사용하였다. HPLC/UV를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shiseido Nanospace SI-1을, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)을 사용하였다. LC/MS/MS를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shimadzu HPLC system LC-10A series를 mass detector로 API2000 triple-quadrupole mass spectrometry를, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)을 사용하였다.

(3) 표준액의 조제

- 표준품 icariin, epimedin A, epimedin A, epimedin A, digoxin, α -naphthoflavone을 메탄올에 녹여

1mg/mL의 농도가 되도록 조제하여 표준 원액으로 사용하였다.

(4) 검액의 조제

- 각각의 추출물을 2 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹여 검액으로 사용하였다.

(5) LC/UV/MS를 이용한 음양곽 추출물의 compound profiling

- 3종의 음양곽 추출물 용액을 LC/UV/MS에 주입하여 각각에 대한 UV와 MS profile을 얻었으며 HPLC와 MS 조건은 다음과 같다.

(가) HPLC-UV condition

- HPLC-UV-MS system: Agilent 1100 series LC/MSD trap
- Column: Capcellpak C18 (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase: (A) 90% ACN in 0.1% formic acid, (B) 0.1% formic acid
- Flow rate: 1 mL/min (split ratio 1/5), Injection vol.: 20 µL
- UV detector: 320 nm
- Sample concentration: 2 mg/mL
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	30	70
10	70	30
20	70	30
21	30	70

(나) Mass spectrometric parameter

- Polarity: Positive
- Compound stability: 50%
- Nebulizer pressure: 35 psi
- Dry gas flow: 8 L/min
- Dry temperature: 350°C

(6) LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC/MS 조건: 음양곽 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC와 mass spectrometer의 조건은 다음과 같다.

◦ HPLC condition

- HPLC system: Shimadzu HPLC system LC-10A series (Kyoto, Japan)
- Column: Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	65	35
4	35	65
5	65	35
7	65	35

- Flow rate: 0.2 mL/min
- Injection vol.: 10 µL
- Column oven temperature: 35°C

Mass spectrometric parameter

- MS spectrometer: API2000 triple-quadrupole mass spectrometry
- Polarity: Positive
- Dry temperature: 350°C
- Nebulizing, turbo, curtain gas: 40, 80, 40

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
Icariin	677	369	47
Epimedin A	839	369	57
Epimedin B	809	369	51
Epimedin C	823	369	61
Hyperoside	465	303	33
Digoxin (IS)	781	97	61

-Multiple reaction monitoring parameters:

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin B, quercetin)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 mass spectrum으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin B, quercetin)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 0.5, 1, 2, 10 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL씩 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 mass spectrum으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 5일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값과 이론값을 비교하여 백분율로 표시하였다.

(라) 완전성

- 2 µg/mL의 QC시료에 대하여 용매의 pH(3, 4, 5), 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, YMC C₁₈), 컬럼 오븐 온도(30, 40, 50°C), gradient 조건을 변화시켜서 3회 반복 분석을 통하여 분석법의 완전성을 시험하였다. 완전성의 시험을 위한 gradient 조건은 다음과 같다.

◦ Gradient-1

Time (min)	%A	%B
0	65	35
4	35	65
5	65	35
7	65	35

◦ Gradient-2

Time (min)	%A	%B
0	70	30
4	30	70
5	70	30
7	70	30

(마) 음양곽 시료 중 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 함량 분석

- 산지가 각기 다른 7종의 음양곽으로부터 추출된 총 21개의 음양곽 추출물 시료를 각각 메탄올에 녹여 2 mg/mL의 농도로 조제한 후 100 µL를 취해서 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL를 첨가하여 시료 용액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 분석한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(7) HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC 조건: 음양곽 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC의 조건은 다음과 같다

- HPLC system: Shiseido Nanospace SI-1
- Column: Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	75	25
12	50	50
15	15	85
20	15	85
22	75	25
30	75	25

- Flow rate: 1 mL/min, Injection vol.: 10 µL
- Detection: 260 nm
- Column oven temperature: 35°C

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 2, 5, 10, 25, 50 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이

와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 2, 10, 50 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 5일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값을 이론값에 대한 백분율로 표시하였다.

(라) 완전성

- 25 µg/mL의 QC시료에 대하여 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, Beckman C₁₈)를 바꾸어 3회 반복 분석하여 본 분석법의 완전성을 시험하였다.

(마) 음양곽 시료 중 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 함량 분석

- 산지가 각기 다른 7종의 음양곽으로부터 추출된 총 21개의 추출물 시료를 메탄올에 녹여 2 mg/mL의 농도로 조제한 후 100 µL를 취해서 α-naphthoflavone 용액(100 µg/mL)을 10 µL를 첨가하여 시료 용액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 10 µL를 HPLC에 주입하여 분석한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(8) 생약의 품질 관리를 위한 패턴분석

- 7종의 음양곽 추출물 이외에 3종의 식물추출물 NP-1, NP-2, NP-3를 위와 같은 방법으로 LC/MS에 주입하여 각각에 대한 total ion chromatogram (TIC)을 얻었다. 총 7종의 추출물의 TIC 데이터를 바탕으로 retention time, m/z value, peak intensity를 데이터화하여 SAS 8.02 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 통계처리 하였다. 다변량 패턴인식분석을 위하여 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하였으며, Bray-Curtis식을 이용하여 각 추출물 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다. Bray-Curtis식은 다음과 같다.

$$SI = \frac{2 \sum_{i=1}^s \min(x_{ij}, x_{ik})}{\sum_{i=1}^s (x_{ij} + x_{ik})}$$

<바이오칩팀>

(1) Cell culture 및 음양곽, 그 분리물질들의 세포 독성 측정

- 세포주 LNCaP (prostate), MCF-7(Breast), A549 (Lung), ACHN (Kidney) 및 CCF-STTG1 (brain, astrocyte) 등 6종의 세포주는 10% FBS를 함유하는 DMEM이나 RPMI1640 media를 사용하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.
- 세포주에 동결건조한 음양곽 70% ethanol 추출물이나 단일물질들은 약 5단계 정도의 농도로 처리한 후 72 시간 경과 후 MTS assay (Promega, USA) 방법으로 세포독성을 측정하여 IC₅₀ 값

은 계산하였다.

(2) RT-PCR을 이용한 세포주 선정을 위한 실험

- A549 세포와 LNCaP 세포에 음양곽 추출물 및 그 분리물질들의 여러 농도로 24시간 동안 처리한 후 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 이용하여 PDE5나 남성호르몬 합성 및 작용 관련 효소들의 발현을 관찰하여 처리 농도 및 세포주를 선정하였으며, 선정된 농도를 선정된 세포에 0, 3, 6, 24, 48 처리하여 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다.
- 분리한 total RNA는 reverse transcriptase와 dNTP를 이용하여 cRNA를 합성하였으며, 이를 다시 PDE5, AR, 3 β -HSD, aromatase, CYP17, β -actin 등의 sense, antisense primer를 이용하여 PCR을 하여 β -actin의 량과 비교하여 각 단백질의 mRNA 발현변화를 관찰하였다. 이때 음양곽 추출물에 의한 발현 변화가 큰 세포를 DNA microarray를 위한 세포주로 선정하였다.

(3) 음양곽 및 음양곽 분리물질이 NO 생성에 미치는 영향 관찰

- 배양된 세포주 LNCaP (전립선 암세포주)는 chamber slide에 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 부착하였다. 이 세포주에 동결 건조한 음양곽의 70% ethanol 추출물을 100 ug/ml, 200 ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였고, 음양곽의 단일물질인 icariin을 10 uM, 20 uM, 200 uM 의 농도로 24 시간 동안 처리하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터의 NO 발생은 DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)로 염색하여 확인 하였다. 즉, 각 sample들이 처리된 세포에 DAF-FM diacetate를 5 uM의 농도로 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 형광 현미경 (Ex. 490, Em. 515)으로 NO생성을 측정하였다.

(4) DNA microarray 실험

- 세포주 LNCaP (전립선 암세포주)는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 세포주에 동결 건조한 음양곽의 70% ethanol 추출물을 10 ug/ml 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 100 ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, 음양곽의 단일물질인 icariin을 1 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 10 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 또 다른 음양곽의 단일물질인 epimedin B 역시 1 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 20 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, hyperoside는 10 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 50 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 또한 Quercetin은 2 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터 total RNA는 RNeasy Mini Kit (Quagene사, USA)의 protocol에 따라 분리하였다. 그 후 RNA를 ΔA 260/280 ratio를 측정하여 1.8 이상이 되는 것과 formaldehyde gel을 이용하여 전기 영동한 후 그 band를 확인 및 정량하여 28S, 18S의 ratio가 1.8-2.3 범위에 있는 RNA를 실험에 사용하였다.
- cDNA 합성, cRNA labeling, sample hybridization 및 detection은 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 cRNA 제조 및 hybridization등의 과정을 진행하였다. 즉, 5 ug의 Total RNA로부터 RT-IVT Labeling Kit v 1.0을 사용하여 labeling된 cRNA를 만들었으며, 만들어진 labeling cRNA 10 ug을 1700 Full Genome Expression Human Microarray에 roading하여 55 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 hybridization시켰다.

Hybridization 시킨 Microarray는 세척 및 antibody binding과정을 거친 후 Chemiluminescence Detection Kit를 사용하여 detection을 하였고, image 분석은 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer 을 사용하였다.

(5) DNA chip data analysis

- DNA chip data는 Avadis Explorer 3.3과 GenPlex 2.0 (Istech, Korea)를 이용하여 분석하였다. Microarray의 이미지를 스캔하여 얻은 데이터를 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2 배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.

(6) Real-time PCR을 이용한 효능유전자 검증

- 먼저 cDNA를 합성하기 위하여 oligo dT 2µl와 5µg에 해당하는 분리한 RNA를 섞어서 70°C에서 10분 동안 incubation시킨 후 ice에 넣는다. 2µl transcriptase RT enzyme, RNase inhibitor 2µl, 10 µl 5X RT buffer, 10µl dNTP와 DEPC를 넣어 50µl로 맞추고 42°C에서 1시간 동안 reverse transcription 시킨 후 95°C에서 5분 동안 reverse transcriptase를 불활성화 시킨다.
- 합성된 cDNA를 1/10 희석시켜서 1µl cDNA, iQTM SYBR Green Supermix 25µl, primer 2µl와 DEPC를 넣고 50µl로 맞추었다. PCR조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 2분 동안 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 45초로 40cycle을 Mini Opticon(Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다. 각 cDNA sample은 triplicate로 수행하였고, β-actin cDNA의 real-time PCR data를 통해 normalization되었다.
- PCR quantitation data와 melting curve는 Opticon Monitor software를 통해 얻었으며, 그 결과는 $2^{-((\text{sample Ct} - \beta\text{-actin Ct}) - (\text{sample control Avg. Ct} - \beta\text{-actin control Avg. Ct}))}$ 를 통해 계산하였다.

2.2 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분 에 대한 분석법 연구

가. 연구개발 내용

- 천궁으로부터 생리활성 성분 분리, 구조분석
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립
- 실제 유통되는 천궁 시료 분석
- 천궁의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용
- 천궁의 진정작용 관련 세포주 선정
- DNA microarray 실험, 분석 및 결과 검증

나. 방법

< 분리팀 >

(1) 천궁의 구입 및 인증

- 천궁(Cnidii Rhizoma)은 천궁 (*Cnidium officinale* Makino)를 재배지인 강원도 정선군 정선읍 애산리에서 직접 구입하여 경희대학교 이재현 교수의 감정을 거쳐 진품을 확인하고 한약재 과학화 사업단에 정품으로 제출하고 실험에 사용하였다.

(2) 추출

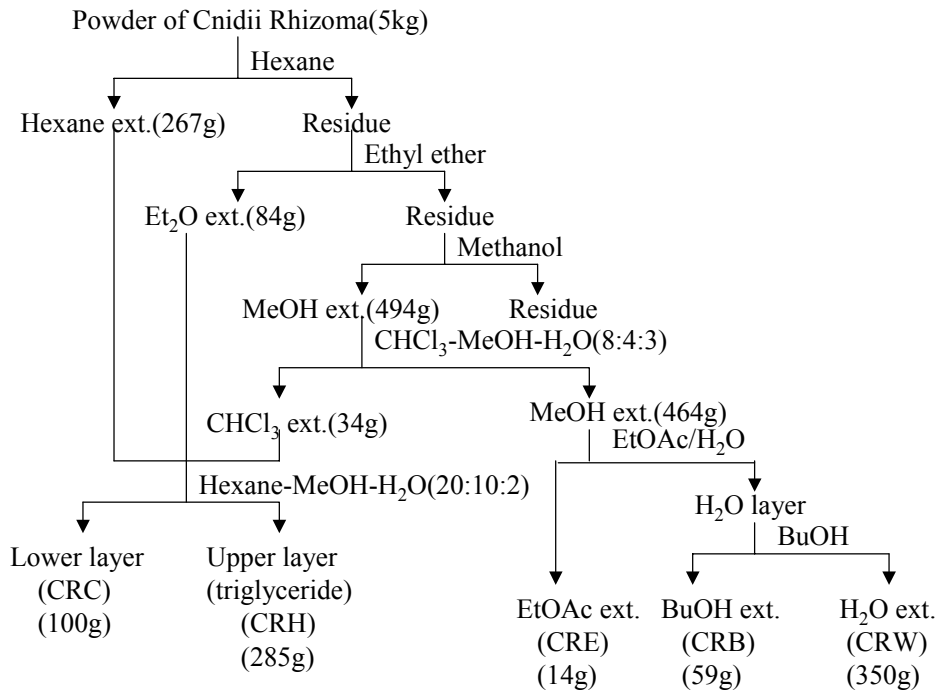
- 천궁은 정유 성분을 유효성분으로 하고 있는 생약임으로 다른 생약에 적용하는 추출법과는 다른 추출법을 사용해야하므로 아래의 Scheme에 따라 추출하였다. 즉, 재료로부터 직접 용매를 분획 추출하는 방법을 택하였으며, 따로 70% ethanol 추출물을 얻었다.

(가) 70% EtOH extract의 제조

- 천궁 분말(2.5kg)을 70% ethanol로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 ethanol을 vacuum rotary evaporator를 이용하여 날려 보낸 다음 동결건조에 의하여 70% ethanol ext.를 제조하였다.

(나) 분획 추출

- Scheme 3에 따라 천궁 분말(5 kg)을 먼저 hexane으로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 vacuum rotary evaporator를 이용하여 증발 농축하여 hexane ext.를 얻었다. 다음으로 분말의 hexane을 상온에서 증발시킨 다음 ether로 온침(reflux, 3시간, 3회)하고 ether를 증발 농축하여 ether ext.를 얻었다.



Scheme 3. Solvent fractionation of *Cnidii Rhizoma*

- 다음으로 분말의 ether를 상온에서 증발시킨 다음 methanol로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 methanol ext.를 얻었다. 이 methanol ext.에 함유되어 있는 저극성 물질과 극성 물질을 분리하기 위하여 chloroform-methanol-H₂O (8:4:3)으로 분획하였다.
- Chloroform ext.와 앞에서 얻은 hexane ext. 및 ether ext.를 합하여 극성 물질과 비극성 물질을 나누기 위하여 hexane-MeOH-H₂O (20:10:2)로 분획하여 hexane ext.와 methanol ext.를 얻었다.
- 위에서 얻은 methanol ext.를 물에 현탁시키고 ethyl acetate로 분획하여 ethyl acetate ext.를 얻었다. 최종적으로 물 fraction을 butanol로 분획하여 butanol ext.와 물 ext.를 얻었다.

(3) 물질 분리

- 천궁의 물질 분리는 2차대사산물이 집중되어 있는 모든 용매 분획(Fr. CRH, CRC, CRE, CRB)으로 행하였다. 그 중에서도 Fr. CRC 분획을 중심으로 행하여졌다. 이것은 분석팀이 확인한 70% ethanol ext.의 HPLC 분석 data(Figure 3)로부터 판단하여 볼 때 main으로 얻어지는 물질이 이 분획에 집중되어 있고, 분획의 량으로부터도 1차대사산물 분획인 Fr. CRH, CRW를 제외하고 가장 많은 분획이고, 천궁의 유효성분으로 인정되고 있는 alkylphthalide가 주로 포함되어 있는 분획이기 때문에 이 분획에서 천궁의 지표물질이 분리되어야 하기 때문이었다.

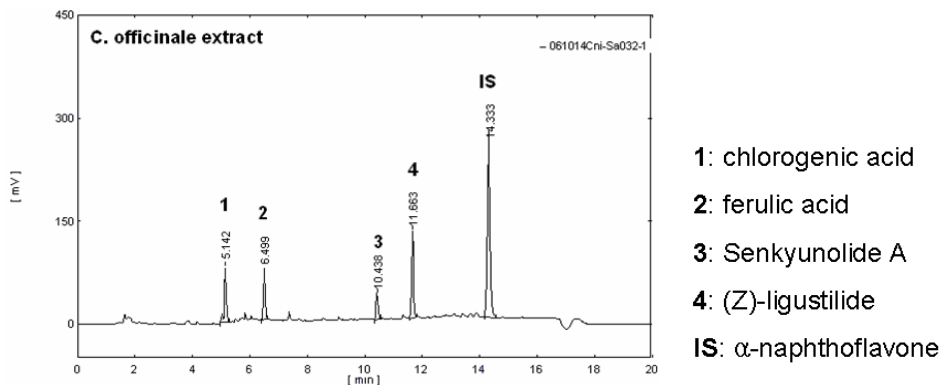
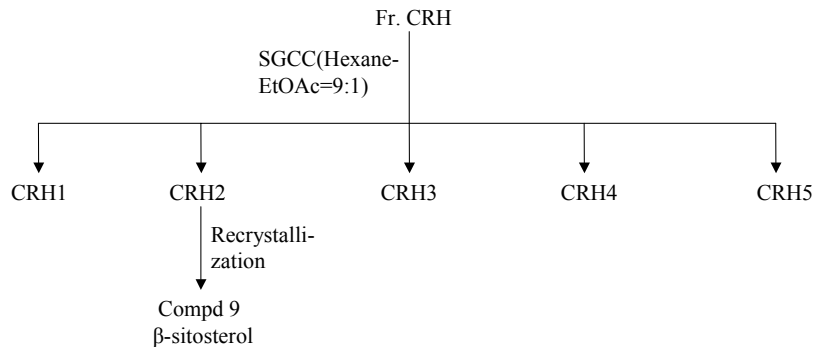


Figure 3. HPLC chromatogram of 70% EtOH ext.

(가) Fr. CRH 분획의 물질 분리

- Fr. CRH 10g을 silica gel 60(70-230 mesh) 1kg, 용매로서는 hexane-EtOAc(9:1)을 이용하여 column chromatography(SGCC)를 실시하였다. 모두 5개의 분획을 얻고 각 분획의 물질을 재차 정제하였다.



Scheme 4. Isolation of compounds from Fr. CRH

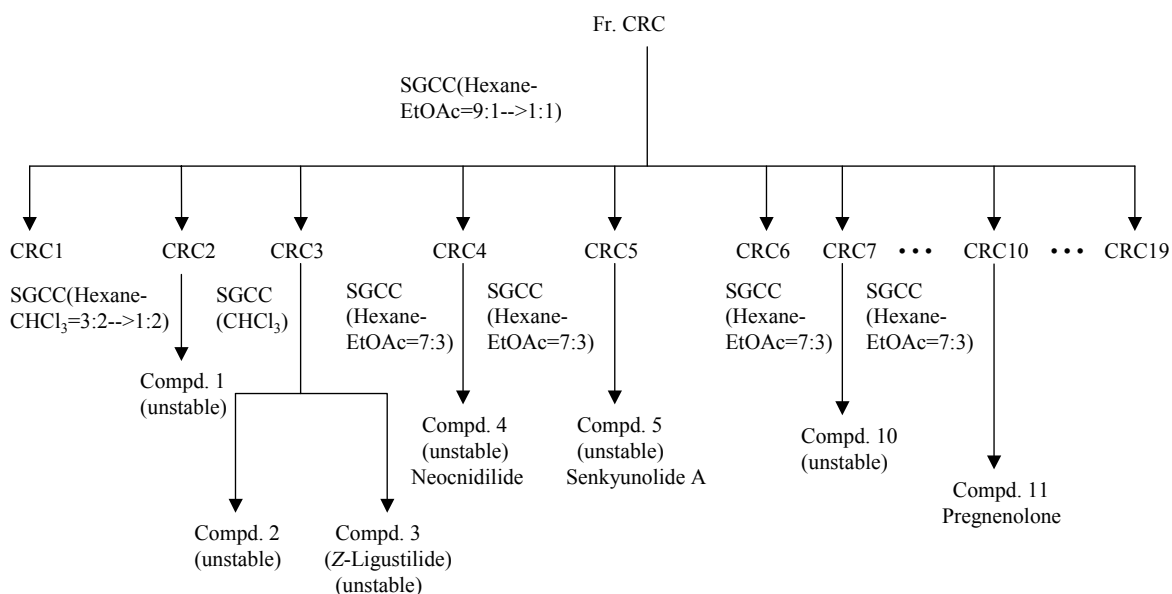
Fr. CRH2를 MeOH로 재결정하여 Compd 9을 분리하였다.

Compd. 9: 무색 결정으로 Liebermann-Burchard 반응에서 양성을 나타내었다.

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 5.35(1H, m, H-6), 3.52(1H, m, H-3), 1.01(3H, s, H-19),
 1.01(3H, s, H-19), 0.92(1H, d, J=6.4, H-21), 0.83(3H, d, J=6.8 Hz, H-26),
 0.81(3H, d, J=6.9, H-27), 0.85(3H, t, J=7.8 Hz, H-29), 0.69(3H, s, H-18);
 $^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): δ 37.3(C-1), 31.6(C-2), 71.7(C-3), 42.2(C-4), 140.7(C-5),
 121.6(C-6), 32.0(C-7), 31.8(C-8), 51.1(C-9), 36.4(C-10), 21.1(C-11),
 39.8(C-12), 42.4(C-13), 56.8(C-14), 24.2(C-15), 28.3(C-16), 56.0(C-17),
 11.8(C-18), 19.5(C-19), 36.1(C-20), 18.7(C-21), 34.0(C-22), 26.1(C-23),
 45.8(C-24), 29.2(C-25), 19.8(C-26), 19.2(C-27), 23.1(C-28), 11.0(C-29)

(나) CRC 분획의 물질 분리

- CRC 50g을 silica gel 60(70-230 mesh) 3kg, 용매로서는 hexane-EtOAc(9:1) → (1:1)을 이용하여 column chromatography(SGCC)를 실시하였다. 모두 19개의 분획으로 나누고 각 분획의 물질을 재차 정제하였다. 물질의 확인은 TLC(silica gel 60F254, solvent: hexane-EtOAc=7:3) spot의 확인은 UV(254nm, 366nm) 및 황산 발색으로 확인하였다.



Scheme 5. Isolation of compounds from Fr. CRC

- Compd. 1: CRC2의 main spot으로 황산에 의하여서만 보라색으로 발색이 되는 물질이었다. UV 254nm에서 갈색으로 보이는 물질이 섞여 있었기 때문에 2차 SGCC(silica gel 60, solv.: chloroform-hexane=3:2→1:2)를 실시하여 단일한 물질로 분리하였다. 현재 이 물질은 구조 결정 중에 있다.
- Compd. 2: CRC3으로부터 chloroform을 이용하는 2차 SGCC로 Compd. 3보다 먼저 분리되는 물질로 UV 254nm에서만 확인이 되고 UV 366nm에서는 형광을 나타내지 않는 물질이다.

Colorless oil

UV(MeOH): λ_{max} 262, 312 nm

ESI-MS: m/z 189(100) [M+H]⁺, 171, 153

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 8.79(1H, d, $J=8.0$, H-7), 7.64-7.69(2H, m, H-4, 5), 7.50(1H, ddd, $J=11.0, 7.5, 1$ Hz, H-6), 5.64(1H, t, $J=7.5$, H-8), 2.46(2H, td, $J=7.5, 7.5$ Hz, H-9), 1.56(2H, tq, $J=7.5, 7.5$ Hz, H-10), 0.99(3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 167.2(C-1), 145.7(C-3a), 139.6(C-3), 134.2(C-5), 129.3(C-6), 125.2(C-7), 124.4(C-7a), 119.6(C-4), 109.4(C-8), 27.8(C-9), 22.5(C-10), 13.8(C-11)

- Compd 3: CRC3으로부터 얻어지는 물질로 거의 단일 spot으로 UV 254nm에서 갈색으로 보이고 UV 366nm에서 청색 형광을 나타낸다. 황산 발색에서도 옅은 갈색을 나타내었다. 그러나 이 spot은 단일 물질이 아니고 chloroform을 전개용제로 한 TLC에서 2개의 spot으로 나누어지는 혼합물이었다. Chloroform을 용매로 사용하는 2차 SGCC를 실시하여 UV 366nm에서 형광을 나타내는 물질만을 순수 분리하였다. 이 화합물은 Figure 1의 t_R 13.8분의 미지의 물질과 일치함을 확인하였다. 이 화합물은 극히 불안정한 물질로 공기 중에 잠시라도 노출이 되면 변화해 버리는 물질로 순수 분리 후부터는 질소 기류 하에서 모든 조작을 행하였다.

Colorless oil

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 6.29(1H, dt, $J = 9.5, 2.0$ Hz, H-7), 6.00(1H, dt, $J = 10, 4.0$ Hz, H-6), 5.22(1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 2.60(2H, t, $J = 9.5$ Hz, H-4), 2.44-2.49(2H, m, H-5), 2.38(2H, dt, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H-9), 1.51(1H, tq, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H-10), 0.96(3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 167.6(C-1), 148.6(C-3a), 147.0(C-3), 129.9(C-6), 124.0(C-7a), 117.2(C-7), 112.9(C-8), 28.1(C-9), 22.4(C-5, 10), 18.5(C-4), 13.8(C-11)

ESI-MS: m/z 191[M+H]⁺, 173(100), 145

- Compd. 4: Compd. 4와 5가 섞여 있는 CRC4 분획을 2차 SGCC(용매: hexane-EtOAc=7:3)으로 분리, 정제를 하여 얻었다.

Colorless oil

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 6.75(1H, dt, $J = 3.5, 3.5$ Hz, H-7), 3.97(1H, ddd, $J = 8.6, 7.0, 6.0$ Hz, H-3), 2.48-2.53(1H, m, H-3a), 2.35(1H, dddddd, $J = 20.3, 6.8, 3.5, 3.7, 1.2$ Hz, H-6), 2.16-2.25(1H, m, H-6), 2.05-2.10(1H, m, H-4), 1.94(1H, dddd, $J = 13.9, 6.8, 3.3, 3.2$ Hz, H-5), 1.73-1.81(2H, m, H-8), 1.48-1.60(2H, m, H-5, H-9), 1.34-1.47(2H, m, H-9, H-10), 1.14-1.22, 1H, m, H-4), 0.92(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 169.8(C-1), 134.8(C-7), 130.9(C-7a), 85.0(C-3), 42.8(C-3a), 34.0(C-8), 27.2(C-9), 25.1(C-4), 24.7(C-6), 22.2(C-10), 20.5(C-5), 13.6(C-11)

ESI-MS: m/z 217 [M+Na]⁺, 195[M+H]⁺, 177, 149(100)

- Compd. 5: Compd. 5가 main이고 Compd. 4가 극미량 섞여 있는 CRC5 분획을 2차 SGCC(용매: hexane-EtOAc=7:3)으로 분리, 정제를 하여 얻었다.

Colorless oil

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 6.21(1H, dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-7), 5.91(1H, dt, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-6), 4.93(1H, dd, $J = 8.0, 3.5$ Hz, H-3), 2.47(4H, m, H-4, H-5), 1.87(1H, m, H-8a), 1.54(1H, m, H-8b), 1.33-1.45(4H, m, H-9, H-10), 0.91(3H, t, $J = 7.0$, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 171.2(C-1), 161.4(C-3a), 128.3(C-6), 124.5(C-7a), 116.9(C-7), 82.59(C-3), 31.9, 26.7, 22.4, 22.3(C-10), 20.8(C-5), 13.8(C-11)

ESI-MS: m/z 215 [M+Na]⁺, 193[M+H]⁺, 175, 147(100)

- Compd. 10: Fr. CRC7을 hexane-EtOAc(7:3)로 2차 SGCC로 정제하여 얻어진 무색 oil 상태의 물질로 366 nm UV에서 약한 형광을 발하는 물질

Colorless oil

UV(MeOH): λ_{\max} 232, 278 nm

ESI-MS: m/z 381(100)[M+H]⁺, 191

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.35(1H, d, J=7.0 Hz, H-7'), 5.07(1H, t, J=8 Hz, H-8), 5.00(1H, t, J=7 Hz, H-8'), 3.25(1H, d, J=9 Hz, H-7), 2.99(1H, m, J=6.5, 2.5, 2.5, 2.5 Hz, H-6'), 2.55(1H, dd, J=9, 6.5 Hz, H-6), 2.29(2H, m, J=8, 7.5 Hz, H-9), 2.20(1H, m, H-4), 2.18(2H, m, J=7.5, 7.5 Hz, H-9'), 2.06(1H, dd, J=17, 5 Hz, H-4), 1.95(1H, dd, J=13, 3 Hz, H-4'), 1.87(2H, m, H-5, 5'), 1.56(1H, d, J=13, H-4'), 1.53(1H, m, H-5), 1.45(4H, m, J=7.5, H-10, 10'), 0.92(3H, t, J=7.5 Hz, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 168.1(C-1), 155(C-3a), 148.1(C-3), 126.6(C-7a), 112.1(C-8), 38.4(C-6), 41.6(C-7), 29.0(C-5), 28.0(C-9), 22.3(C-10), 19.8(C-4), 13.9(C-11)

- Compd. 11: Fr. CRC10으로부터 hexane-EtOAc(7:3)로 2차 SGCC로 정제하여 얻어진 무색 결정성 물질로 Liebermann-Buchard 반응에 양성이고 현재 TLC co-spotting 소견으로 pregnenolone로 추정된다.

Colorless powder

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 5.35(1H, t, C-6), 3.53(1H, m, H-3), 2.13(3H, s, C-21), 1.01(3H, s, H-19), 0.64(3H, s, H-18)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 209.6(C-20), 140.8(C-5), 121.4(C-6), 71.7(C-3), 63.7(C-17), 56.9(C-14), 50.0(C-9), 44.0(C-13), 42.2(C-4), 38.8(C-12), 37.2(C-1), 36.5(C-10), 31.8(C-8), 31.7(C-7), 31.6(C-2), 31.5(C-21), 24.5(C-15), 22.8(C-16), 21.1(C-11), 19.4(C-19), 13.2(C-18),

(다) CRE 분획의 물질 분리

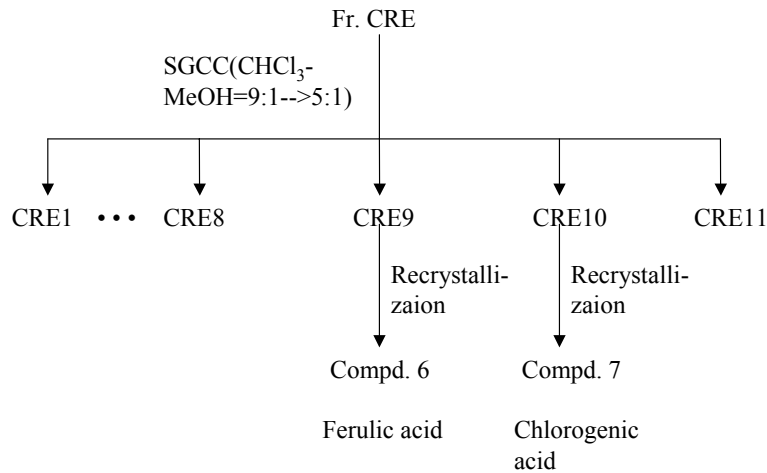
- CRE를 chloroform-MeOH(9:1→5:1)로 SGCC를 행하여 11개 분획으로 나누고 각 분획에서 물질을 분리, 정제하였다.

- Compd. 6: CRE10 분획을 2차 SGCC(용매: chloroform-MeOH=5:1)로 정제를 하여 얻어진 물질임.

Yellow powder

¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆): δ 7.60(1H, d, J = 16 Hz, H-7), 7.17(1H, d, J = 2 Hz, H-2), 7.06(1H, dd, J = 8.5, 1.5 Hz, H-6), 6.81(1H, d, J = 8 Hz, H-5), 6.31(1H, d, J = 16 Hz, H-8), 3.89(3H, s, -OCH₃)

¹³C-NMR(125MHz, DMSO-d₆): δ 171.2(C-9), 150.6(C-3), 149.5(C-7), 147.0(C-4), 127.9(C-1), 124.1(C-6), 116.6(C-5), 116.1(C-8), 111.9(C-2), 56.6(-OCH₃)



Scheme 6. Isolation of compounds from Fr. CRE

- Compd. 7: CRE11 분획을 2차 SGCC(용매: chloroform-MeOH=5:1)로 정제를 하여 얻어진 물질임.

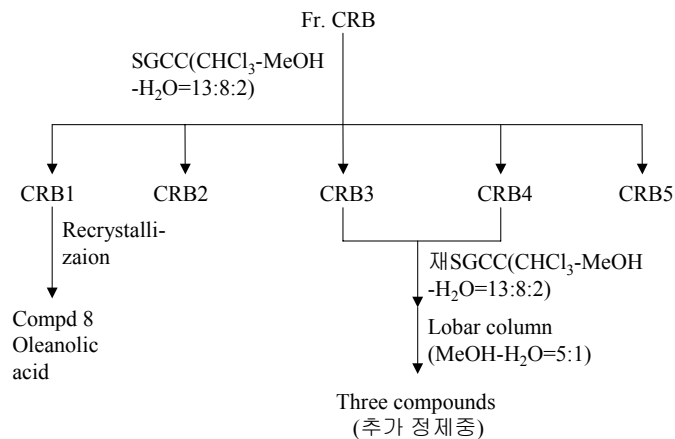
Yellow powder

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6): δ 7.56(1H, d, $J = 16$ Hz, H-3'), 7.05(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5'), 6.95(1H, dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, H-9'), 6.78(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8'), 6.263(1H, d, $J = 16$ Hz, H-2'), 5.32(1H, td, $J = 8.7, 4.5$ Hz, H-5), 4.17(1H, m, H-3), 3.72(1H, dd, $J = 8.7, 3$ Hz, H-4), 2.03-2.24(4H, double AMX, H-6e, H-2a, H-6a, H-2e)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO- d_6): δ 177.2(-COOH), 168.8(C-1'), 149.7(C-3'), 147.2(C-6'), 146.9(C-7'), 128.0(C-4'), 123.1(C-2'), 116.6(C-8'), 115.4(C-9'), 115.3(C-5'), 76.3(C-1), 73.6(C-4), 72.1(C-5), 71.5(C-3), 38.9(C-2), 38.3(C-6)

(라) CRB 분획의 물질 분리

- CRB 분획을 chloroform-MeOH-H₂O(13:8:2)의 용매를 사용하여 SGCC를 실시하여 5개의 분획으로 나누었다. Fr. 1을 MeOH로 재결정을 반복하여 compound 8을 얻었다. 이 물질은 Liebermann-Burchard 반응에 양성이고 TLC co-spotting의 소견으로 oleanolic acid로 추정된다. Fr. 3 및 Fr. 4을 chloroform-MeOH-H₂O(13:8:2)으로 재 column, MeOH-H₂O(5:1)의 용매 조건으로 Lobar column으로 3종의 물질을 확인하고 추가 정제 중에 있음.



Scheme 7. Isolation of compounds from Fr. CRB

Compd 8: 최종으로 methanol로 재결정하였다.

Colorless powder

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 0.75, 0.77, 0.90, 0.91, 0.93, 0.99, 1.13(3H each, s, 7 CH₃), 2.82(1H, dd, J=4.3, 13.8 Hz, H-18), 3.22(1H, dd, J=4.5, 11.0 Hz, H-3), 5.28(1H, t, J=3.5 Hz, H-3)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 183.4(C-28), 143.6(C-13), 122.6(C-12), 79.0(C-3), 55.2(C-5), 47.6(C-9), 46.5(C-17), 45.9(C-19), 41.6(C-14), 41.0(C-18), 39.3(C-8), 38.7(C-4), 38.4(C-1), 37.1(C-10), 33.8(C-21), 33.0(C-7), 32.4(C-22), 30.7(C-20), 28.1(C-23), 27.7(C-15), 27.2(C-2), 25.9(C-27), 32.6(C-29), 23.6(C-30), 23.5(C-16), 22.9(C-11), 18.3(C-6), 17.1(C-26), 15.5(C-24), 15.3(C-25)

< 분석팀 >

(1) 실험재료

- 본 실험에서는 산지가 각기 다른 천궁 70% 에탄올 추출물 15종을 사용하였다. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide는 천궁으로부터 추출된 표준품을 사용하였고, 내부표준 물질로 사용한 digoxin, α-naphthoflavone은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. 천궁의 시료 분석에 사용된 각 천궁 시료의 산지, 구입처, 실험에 쓰인 생약의 무게와 70% 에탄올로 추출 후 얻어진 추출물의 무게는 다음과 같다.

시료 번호	산지	통용명	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)
K-1	한국산	토천궁	안동	40	11.11
K-2	한국산	일천궁	경북 영천	40	8.66
K-3	한국산	일천궁	경북 영양	40	11.73
K-4	한국산	일천궁	경북 달성	40	8.71
K-5	한국산	토천궁	영천	40	10.02
K-6	한국산	일천궁	영양	40	11.65
K-7	한국산	일천궁	영천	20	7.00
K-8	한국산	일천궁	서울 제기동	20	6.29
K-9	한국산	일천궁	김포시장	20	6.90
K-10	한국산	일천궁	서울 제기동	20	6.96
C-1	중국산	중국산 천궁	중국, 농림	20	3.96
C-2	중국산	중국약전품	중국, 장사시장	20	6.80
C-3	중국산	중국약전품	중국, 난주시장	20	6.50
C-4	중국산	중국약전품	중국, 곤명시장	20	7.94
C-5	중국산	중국산 천궁	중국, 안국시장	20	5.09

(2) 시약 및 기구

- HPLC용 용매는 J. T. Baker (USA)제품을 사용하였으며, 그 외 분석용 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Compound profiling을 위한 실험에는 Agilent 1100 series LC/MSD trap을 사용하였으며

분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm) 을 사용하였다. HPLC/UV를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shiseido Nanospace SI-1을, 분석용 컬럼은 Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm, Waters)을 사용하였다. LC/MS/MS를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shimadzu HPLC system LC-10A series를 mass detector로 API2000 triple-quadrupole mass spectrometry를, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)을 사용하였다.

(3) 표준액의 조제

- 표준품 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin, α-naphthoflavone을 메탄올에 녹여 1mg/mL의 농도가 되도록 조제하여 표준 원액으로 사용하였다.

(4) 검액의 조제

- 각각의 천궁 추출물을 2 mg/mL의 농도로 70% EtOH에 녹여 검액으로 사용하였다.

(5) LC/UV/MS를 이용한 천궁 추출물의 compound profiling

- 천궁 추출물 용액을 LC/UV/MS에 주입하여 각각에 대한 UV와 MS profile을 얻었으며 HPLC와 MS 조건은 다음과 같다.

(가) HPLC-UV condition

- HPLC/UV/MS system: Agilent 1100 series LC/MSD trap
- Column: Capcellpak C₁₈ (4.6 X 250 mm)
- Mobile phase: (A) 90% ACN in 0.1% formic acid,
(B) 0.1% formic acid
- Flow rate: 1 mL/min (split ratio 1/5),
- Injection vol.: 20 µL
- UV detector: 280 nm
- Sample concentration: 5 mg/mL in MeOH
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	30	70
10	70	30
20	70	30
21	30	70
30	30	70

(나) Mass spectrometric parameter

- Polarity: Positive
- Scan range: 100-500 m/z
- Compound stability: 80%
- Nebulizer pressure: 35 psi,
- Dry gas flow: 8 L/min,
- Dry temperature: 350°C

(6) LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립

(가) HPLC/MS 조건

- 천궁 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC와 mass spectrometer의 조건은 다음과 같다.

HPLC condition

- HPLC system: Shimadzu HPLC system LC-10A series (Kyoto, Japan)
- Column: Capcellpak C18 (2.0 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:
- Flow rate: 0.2 ml/min
- Injection vol.: 5 µL

Time (min)	%A	%B
0	90	10
0.5	40	60
4	5	95
5	90	10
7	90	10

Mass spectrometric parameter

- MS spectrometer: API2000 triple-quadrupole mass spectrometry
- Polarity: Positive
- Dry temperature: 350°C
- Nebulizing, turbo, curtain gas: 40, 80, 40

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
Chlorogenic acid	355	163	27
Ferulic acid	195	177	17
Senkyunolide A	193	91	33
(Z)-ligustilide	191	91	47
Digoxin (IS)	781	97	53

-Multiple reaction monitoring parameters:

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 chlorogenic acid의 경우, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/mL, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/mL, ferulic acid의 경우 1, 2, 5, 20, 100 µg/mL의 농도가 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 10 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 MRM mode로 분석 후 extracted ion chromatogram으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복한 후 피크면적비에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 천궁 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량 분석

- 산지 또는 기원이 서로 다른 15종의 천궁 추출물을 50 µg/mL의 농도가 되도록 70% EtOH에 녹인 후, 100 µL를 취하여 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 10 µL 첨가하여 시료액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 각 시료액 10 µL를 LC/MS에 주입하여 MRM mode로 분석 후 extracted ion chromatogram으로부터 각 peak 면적비를 구한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(7) HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC 조건

- 천궁 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC의 조건은 다음과 같다
- HPLC system: Shiseido Nanospace SI-1
- Column: Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% acetic acid, (B) 95% MeOH in 0.1% acetic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
4	45	55
10	15	85
14	15	85
15	80	20
20	80	20

- Flow rate: 1 mL/min
- Injection vol.: 5 µL
- Detection: 280 nm
- Column oven temperature: 35°C

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 5 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적비에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(나) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 2, 20, 100 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 5 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적비를 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 4일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값을 이론값에 대한 백분율로 표시하였다.

(다) 완전성

- 50 µg/mL의 QC시료에 대하여 컬럼 종류(Atlantis C₁₈, Capcellpak C₁₈), column oven temperature (30, 35, 40°C), 이동상의 acetic acid 농도(0.05%, 0.1%, 0.2%)를 변화시켜 각각 3회 반복 분석하여 본 분석법의 완전성을 시험하였다. 분석 후 얻어진 크로마토그램에 대하여 이론단수 (NTP), peak 너비 (W), retention factor (K), tailing factor (AS) 등의 값을 계산하여 분석 조건의 변화에 따른 완전성을 나타내었다.

(라) 천궁 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량 분석

- 산지 또는 기원이 서로 다른 15종의 천궁 추출물을 2.5 mg/mL의 농도가 되도록 70% EtOH에 녹인 후, 100 μ L 취하여 내부표준액인 α -naphthofalvone 용액(100 μ g/mL)을 10 μ L 첨가하여 시료액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 각 시료액 5 μ L를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 내부표준물질에 대한 피크 면적비를 구한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(9) 천궁의 품질 관리를 위한 패턴분석의 응용

- 15종의 천궁 추출물 용액을 HPLC에 주입하여 각각에 대한 UV 크로마토그램을 얻은 후, 이를 바탕으로 UV 크로마토그램 상에 발견되는 각 peak의 retention time, peak area를 데이터화하여 SAS 8.02 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 패턴인식분석을 수행하였다. 다변량 패턴인식분석을 위하여 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하였으며, Bray-Curtis식을 이용하여 각 추출물 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다. Bray-Curtis식은 다음과 같다.

$$SI = \frac{2 \sum_{i=1}^s \min(x_{ij}, x_{ik})}{\sum_{i=1}^s (x_{ij} + x_{ik})}$$

<바이오칩팀>

(1) Cell culture 및 천궁, 그 분리물질들의 세포 독성 측정

- Neuroblastoma 세포주인 SH-SY5Y, SK-N-MC, SK-N-SH, Prostate cell line인 22RV1, PC3, LNCaP, 폐암세포주 A549와 유방암 세포주 MCF7 cell line 등 8종의 세포주는 10% FBS를 함유하는 DMEM이나 RPMI1640 media를 사용하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.
- 세포주에 동결건조한 천궁 70% ethanol 추출물이나 단일물질들은 약 5단계 정도의 농도로 처리한 후 24 시간 경과 후 MTS assay (Promega, USA) 방법으로 세포독성을 측정하여 IC50 값을 계산하였다.

(2) 세포주 선정을 위한 독성물질에 의한 NO 생성량 증가 및 천궁에 의한 NO 생성에 대한 실험

- 배양된 세포주 SK-N-SH (신경아세포종주)는 chamber slide에 10% FBS를 함유하는 α -MEM배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 부착하였다. 여기에 동결 건조한 천궁의 70% ethanol 추출물을 10, 20, 100, 200 μ g/ml 농도로 4 시간, 24 시간 동안 처리하였고, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 100 μ M 를 천궁과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리하였다. 천궁의 단일 물질인 Ferulic acid (100 μ M)와 Z-Ligustilide (50 μ M), Senkyunolide A (100 μ g/ml)도 24 시간 동안 처리 하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터의 NO 발생은 DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)로 염색하여 확인 하였다. 즉, 각 sample들이 처리된 세포에 DAF-FM diacetate를 5 μ M의 농도로 37°C에서 1 시간 동안 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 형광 현미경 (Ex. 490, Em. 515)으로 NO 생성을 측정하였다.

(3) DNA microarray 실험

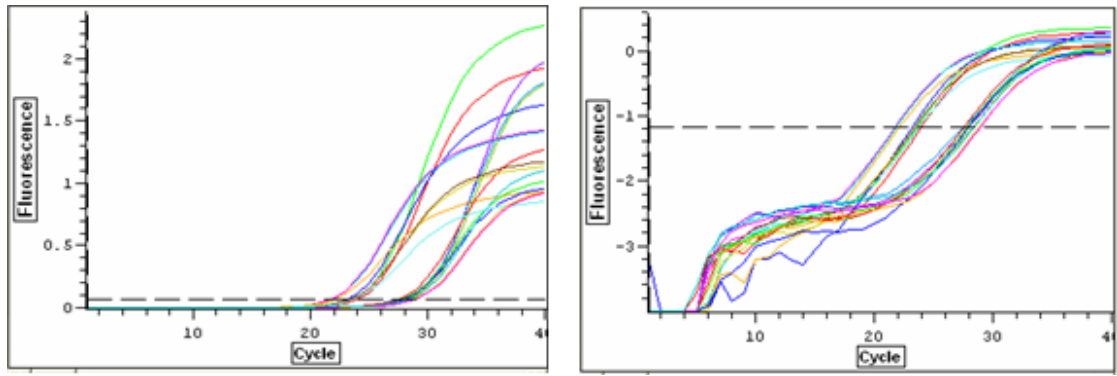
- 세포주 SK-N-SH (신경아세포종주)는 10% FBS를 함유하는 α -MEM배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 세포주에 동결 건조한 천궁의 70% ethanol 추출물을 20, 200 ug/ml 농도로 4 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 100 uM 를 천궁과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리하였으며, 천궁의 단일 물질인 Ferulic acid (100 uM) 와 Z-Ligustilide(50 uM)도 NMDA 100 uM과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리 하였다. 또한 산지별 천궁 추출물인 C1, C3, K4, K7, K8을 200ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터 total RNA는 RNeasy Mini Kit (Quagene사, USA)의 protocol 에 따라 분리하였다. 그 후 RNA를 ΔA 260/280 ratio를 측정하여 1.8 이상이 되는 것과 formaldehyde gel을 이용하여 전기 영동한 후 그 band를 확인 및 정량하여 28S, 18S의 ratio가 1.8-2.3 범위에 있는 RNA를 실험에 사용하였다.
- cDNA 합성, cRNA labeling, sample hybridization 및 detection은 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 cRNA 제조 및 hybridization등의 과정을 진행하였다. 즉, 5 ug의 Total RNA로부터 RT-IVT Labeling Kit v 1.0 을 사용하여 labeling된 cRNA를 만들었으며, 만들어진 labeling cRNA 10 ug을1700 Full Genome Expression Human Microarray에 roading하여 55°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. Hybridization 시킨 Microarray는 세척 및 antibody binding과정을 거친 후 Chemiluminescence Detection Kit를 사용하여 detection을 하였고, image 분석은 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer 을 사용하였다.

(4) DNA chip data analysis

- DNA chip data는 Avadis Explorer 3.3과 GenPlex 2.0 (Istech, Korea)를 이용하여 분석하였다. Microarray의 이미지를 스캔하여 얻은 데이터를 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2 배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.

(5) Real-time PCR을 이용한 효능유전자 검증

- 먼저 cDNA를 합성하기 위하여 oligo dT 2 μ l와 5 μ g에 해당하는 분리한 RNA를 섞어서 70°C에서 10분 동안 incubation시킨 후 ice에 넣는다. 2 μ l transcriptase RT enzyme, RNase inhibitor 2 μ l, 10 μ l 5X RT buffer, 10 μ l dNTP와 DEPC를 넣어 50 μ l로 맞추고 42°C에서 1시간 동안 reverse transcription 시킨 후 95°C에서 5분 동안 reverse transcriptase를 불활성화 시킨다.
- 합성된 cDNA를 1/10 희석시켜서 1 μ l cDNA, iQTM SYBR Green Supermix 25 μ l, primer 2 μ l와 DEPC를 넣고 50 μ l로 맞추었다. PCR조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 2분 동안 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 50°C에서30초, 72°C에서 45초로 40cycle을 Mini Opticon(Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다. 각 cDNA sample은 triplicate로 수행하였고, β -actin cDNA의 real-time PCR data를 통해 normalization되었다.
- PCR quantitation data와 melting curve는 Opticon Monitor software를 통해 얻어졌고, $2^{-((\text{sample Ct} - \beta\text{-actin Ct}) - (\text{sample control Avg. Ct} - \beta\text{-actin control Avg. Ct}))}$ 를 통해 표현하였다.



Real-Time PCR의 cycle spectrum

제3장 총괄연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 음양곽의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구

가. 음양곽 70% Ethanol 추출물 제공

- 산지가 다른 7종의 음양곽 시료로부터 각 40g의 건조분말을 70% Ethanol로 가열 추출을 3회 반복하여 감압농축한 후 동결건조하여 Ethanol 추출물을 확보하였는데, 각 시료당 3 set의 추출물을 제조하여 분석팀에 제공하였다. 각 시료의 산지, 구입처, 수득량은 다음과 같다.

시료번호	산지	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)
K-1	한국산	청풍약초	40	8.50
				8.48
				8.71
K-2	한국산	신금강약국 (철원)	40	8.46
				8.21
				8.16
K-3	한국산	지리산 한약나라 (인제)	40	7.18
				7.21
				6.99
K-4	한국산	철원 재배지	80	7.76
				8.01
				8.53
C-1	중국산	제기당물산	40	7.20
				6.98
				7.35
C-2	중국산	부영약업사	40	7.69
				7.99
				8.06
C-3	중국산	신초당약국	40	7.23
				7.44
				7.16

나. 음양곽으로부터 생리활성 성분의 분리 및 동정

- Compd. 1 : 화학식은 C₃₃H₄₀O₁₅, LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 676이며, spectral data를 문헌과 비교해본 결과 Icarin임을 확인하였으며 (figure 4), 화합물의 순도는 92.7% 이다.

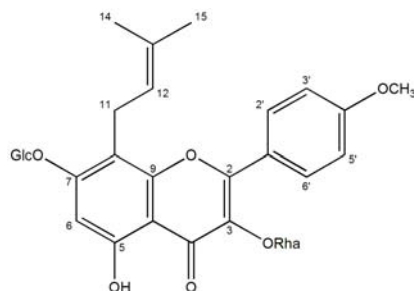


Figure 4. Chemical structure of Icarin

- Compd. 2 : 화학식은 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 이며, LC/MS 및 FABMS로 측정된 분자량은 464이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Hyperoside임을 확인하였으며(figure 5), 순도는 98.6%이다.

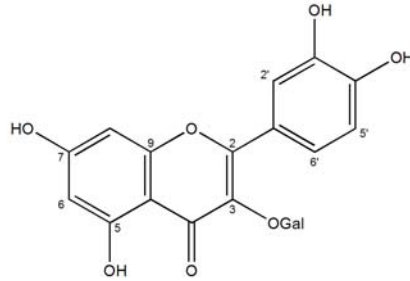


Figure 5. Chemical structure of Hyperoside

- Compd. 3 : 화학식은 $C_{16}H_8O_9$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 354이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Chlorogenic acid로 확인되었으며(figure 6), 순도는 100%이다.

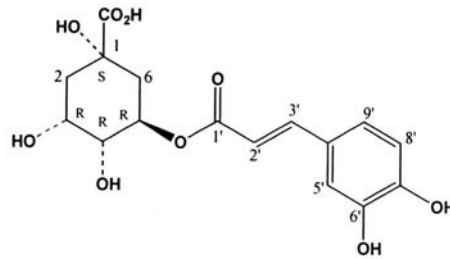


Figure 6. Chemical structure of Chlorogenic acid

- Compd. 4 : 화학식은 $C_{39}H_{50}O_{20}$ 이며 LC/MS와 FABMS에 의해 측정된 분자량은 838이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin A로 확인되었으며(figure 7), 순도는 94.1%이다.

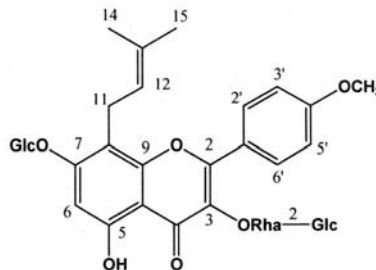


Figure 7. Chemical structure of Epimedin A

- Compd. 5: 화학식은 $C_{38}H_{48}O_{19}$ 이며 LC/MS로 측정된 분자량은 808이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin B로 확인되었으며(figure 8), 순도는 85%이다.

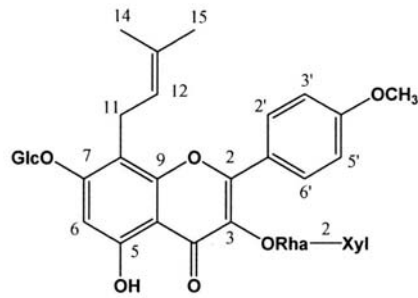


Figure 8. Chemical structure of Epimedin B

- Compd. 6: 화학식은 $C_{39}H_{50}O_{19}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 822이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin C로 확인되었으며(figure 9), 순도는 69.6% 이다.

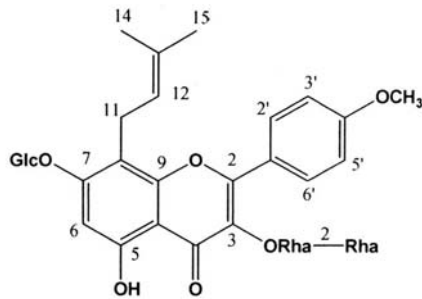


Figure 9. Chemical structure of Epimedin C

- Compd. 7 : 화학식은 $C_{32}H_{38}O_{16}$ 이며 LC/MS와 FABMS에 의해 측정된 분자량은 678이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Hexandraside E로 확인되었으며(figure 10), 순도는 87.4% 이다.

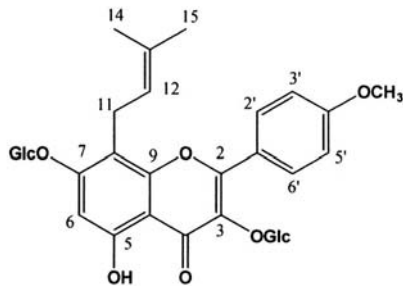


Figure 10. Chemical structure of Hexandraside E.

- Compd. 8: 화학식은 $C_{32}H_{38}O_{16}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 678이다. spectral data를 조사해본 결과 이 화합물은 아직까지 밝혀지지 않았던 새로운 화합물임을 알아내었으며 화합물명을 Epimedoside F라 명명하였으며(figure 11), 순도는 82.2% 이다.

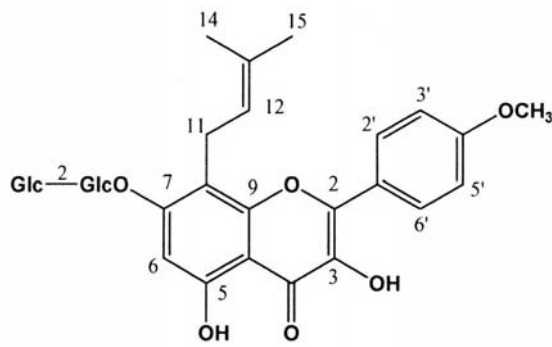


Figure 11. Chemical structure of Epimedeside F

- Compd. 9: 화학식은 $C_{32}H_{38}O_{15}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 662이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedeside A로 확인되었으며 (figure 12), 순도는 70.2%이다.

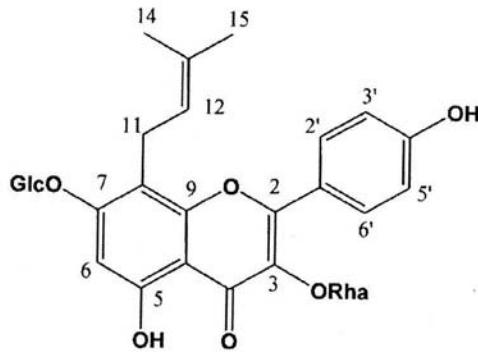


Figure 12. Chemical structure of Epimedeside A

- Compd. 10: 화학식은 $C_{33}H_{40}O_{14}$ 이고 LC/MS에 의해 측정된 분자량은 660이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 2''-O-Rhamnosylcariside II로 확인되었고 (figure 13), 순도는 96.3%이다.

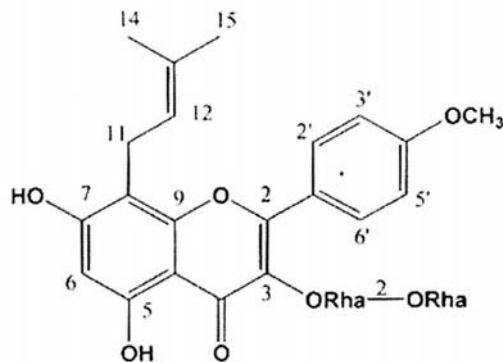


Figure 13. Chemical structure of 2''-O-Rhamnosylcariside II

- Compd. 11 : 백색의 powder이며, UV 254nm, 365nm에서는 발색이 되지 않음. 10% 황산발색에서 보라색으로 발색되는 것으로 미루어 terpenoid 계열일 것으로 추정되며 현재 구조분석 진행 중임
- Compd. 12 : yellow powder이며, 10% 황산발색에서 노란색으로 발색됨. LC/MS에 의해 측정된 분자량은 514.2 이며, spectral data를 문헌과 비교해본 결과 icariside II 임을 확인하였으며 (figure 14), 화학식은 $C_{27}H_{30}O_{10}$ 이다. HPLC로 확인해 본 결과 95.6%의 순도를 나타내었다.

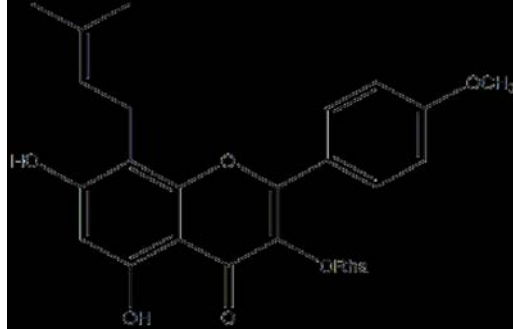


Figure 14. Chemical structure of icariside II

- Compd. 13 : 약간의 녹색빛을 띠는 yellow powder이며, 황산발색시 노란색으로 발색됨. LC/MS에 의해 측정된 분자량은 302이며 spectral data를 문헌과 비교해본 결과 Flavonol 계열의 Quercetin임을 확인하였다 (figure 15). 화학식은 $C_{15}H_{10}O_7$ 이며 HPLC 분석결과 98%의 순도를 나타내었다.

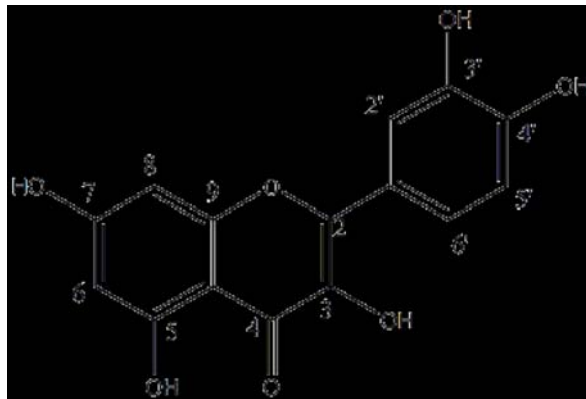


Figure 15. Chemical structure of Quercetin

- Compd. 14, 15 : yellow powder이며 10% 황산 발색시 노란색으로 발색되어 flavonoid 계열의 화합물로 추정되며. HPLC 분석결과 각각 94.5%, 93.6%의 순도를 나타냄. 현재 구조분석 진행 중임.
- 음양곽에서 분리한 compound에 대한 정보를 아래의 table 1과 2에 정리하였다.

Table 1. Name of purified compounds from *E.koreanum* Nakai

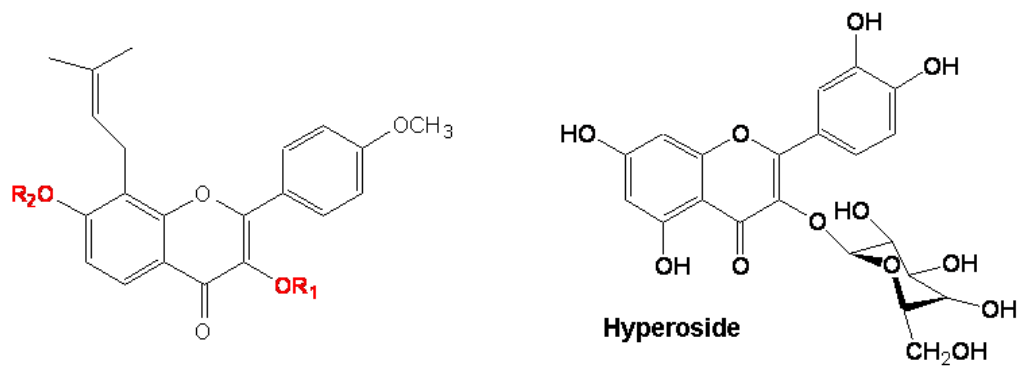
Comp No.	Name	Synonym	IUPAC name
1	Icariin	Ieariline	4H-1-Benzopyran-4-one,3-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
2	Hyperoside	Hyperin, Quercetin-3-b-D-galactoside	4H-1-Benzopyran-4-one,2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-(β -D-galactopyranosyloxy)-5,7-dihydroxy-(9CI)
3	Chlorogenic acid	3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)quinic acid, 3-Caffeoylquinic acid	Cyclohexanecarboxylic acid,3-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1S,3R,4R,5R)- (9CI)
4	Epimedin A		4H-1-Benzopyran-4-one,3-[(6-deoxy-2-O-b-D-glucopyranosyl- α -L-mannopyranosyl)oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
5	Epimedin B		4H-1-Benzopyran-4-one,3-[(6-deoxy-2-O-b-D-xylopyranosyl- α -L-mannopyranosyl)oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
6	Epimedin C	Baohuoside VI	4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[[6-deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
7	Hexandraside E		4H-1-Benzopyran-4-one, 3,7-bis(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
8	Epimedeside F		3,4',5-Trihydroxy-8-prenylflavone 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside]
9	Epimedeside A	Epimediside A	4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
10	2''-O-Rhamnosyl icariside II		4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[[6-deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
12	Icariside II	Baohuoside 1, Baohuoside I Baohuside I, Icariin II, Icariside II	4H-1-Benzopyran-4-one, 3-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
13	Quercetin	3',4',5,7-Tetrahydroxyflavonol, Sophoretin, Meletin, Quercetol, Quertin, Ericin	4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-(9CI)

Table 2. Purified compounds from *E.koreanum* Nakai

Comp No.	Name	M.W.	amount (mg)	Purity(%)	제출량 (mg)
1	Icariin	676.2	12500	92.7	3,000
2	Hyperoside	464.3	1670	98.6	1,000
3	Chlorogenic acid	354.3	67	100	50
4	Epimedin A	838.7	15	94.1	3
5	Epimedin B	808.7	175	85.0	10
6	Epimedin C	822.8	64	69.6	10
7	Hexandraside E	678	38	87.4	2
8	Epimedoside F	678	34	70.2	5
9	Epimedoside A	662	20	70.2	3
10	2''-O-Rhamnosylcariside II	660	57	96.3	
11	compound 11 (구조분석중)		49		
12	icariside II	514.2	1080	95.6	500
13	Quercetin	302	17	98.7	5
14	compound 14 (구조분석중)		29	94.5	
15	compound 15 (구조분석중)		30	93.1	

다. LC/MS/MS를 이용한 음양곽 유효성분의 분석법 개발 및 validation

- 음양곽 추출물 시료에서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside (Figure 16)의 5개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하기 위하여 LC/MS/MS의 multi reaction monitoring (MRM) mode를 이용한 분석법을 연구하였다.
- Positive ion mode에서 분석하였을 때 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, digoxin(I.S.)은 m/z 465, 839, 809, 823, 677, 781에서 각각 protonated된 molecular ion peak를 나타내었으며 각 화합물의 molecular ion peak을 precursor로 하여 MS/MS 분석을 수행한 결과 flavonoid glycoside의 구조로부터 당이 순차적으로 탈락된 fragment peak을 확인할 수 있었다 (Figure 17). 각 화합물에 대하여 MS/MS spectrum 상에서 가장 큰 강도를 나타내는 fragment peak을 선택하여 parent



Compound	R1	R2	MW
Icariin	Rhamnose	Glucose	676.67
Epimedin A	Rhamnose-Glucose	Glucose	838.81
Epimedin B	Rhamnose-Xylose	Glucose	808.79
Epimedin C	Rhamnose-Rhamnose	Glucose	822.81
Hyperoside			464.38

Figure 16. Chemical structures of five flavonoid glycosides from *Epimedium koreanum*

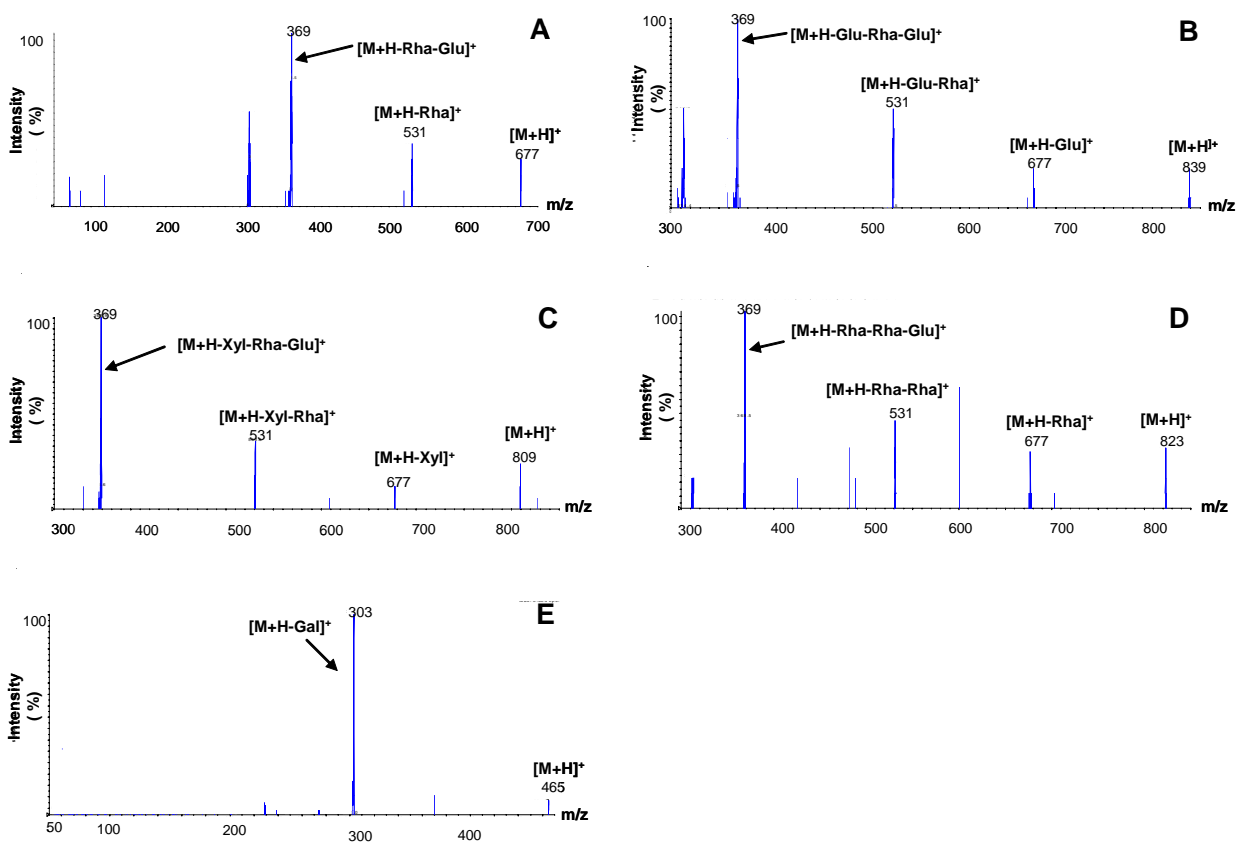


Figure 17. Icariin(A), epimedin A(B), epimedin B(C), epimedin C(D), hyperoside(E)의 MS/MS spectrum (MS/MS spectrum of icariin(A), epimedin A(B), epimedin B(C), epimedin C(D), hyperoside(E))

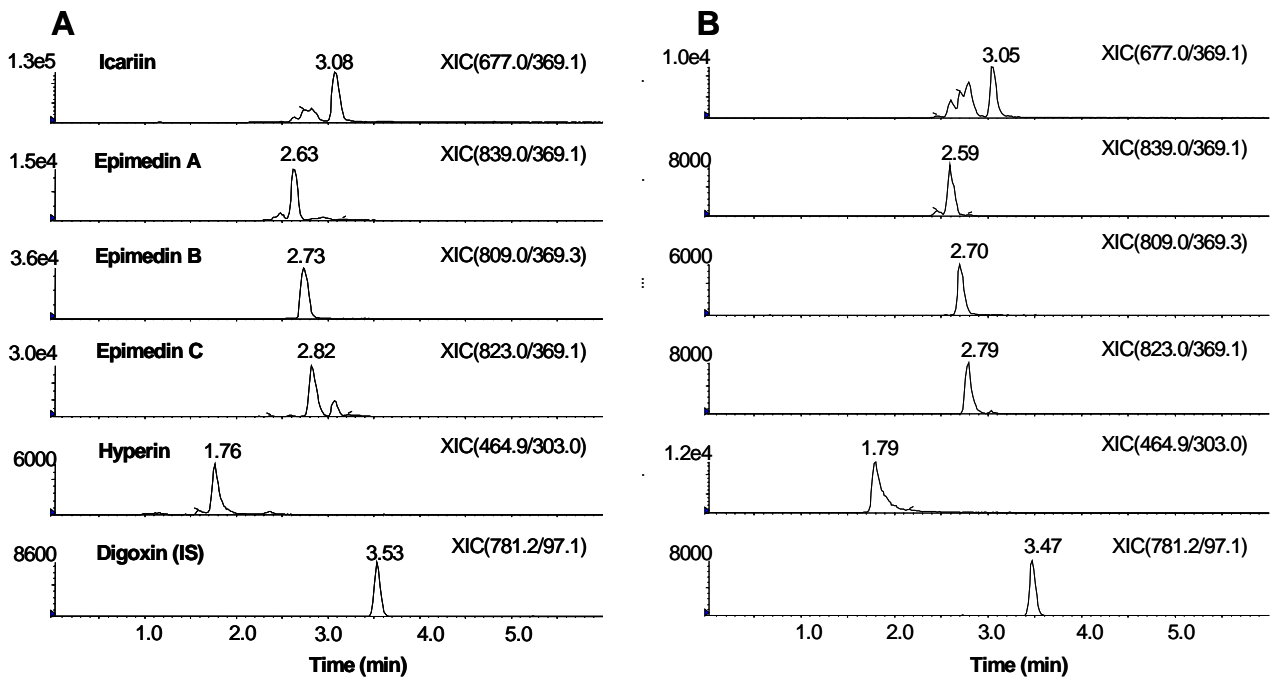


Figure 18. Extraction ion chromatograms of icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside, and digoxin (IS) in MRM mode: (A) Standard mixture, (B) *E. koreanum* extract.

peak과 함께 MRM을 위한 precursor, product ion pair로 사용하였다. 이와 같이 설정된 MRM 조건을 바탕으로 LC/MS/MS 분석을 수행한 결과 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, digoxin (I.S.)는 각각 2.6, 3.6, 3.8, 3.9, 4.2, 4.7 분경에 검출되었으며 모든 분석물질에 대해 양호한 peak shape와 intensity를 보였다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다(Figure 18).

- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 표준액의 농도 0.5–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위에서 상관계수 (r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었으며, 따라서 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최저정량한계로 설정하였다 (Figure 19). 네 농도(0.5, 1, 2, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였다.

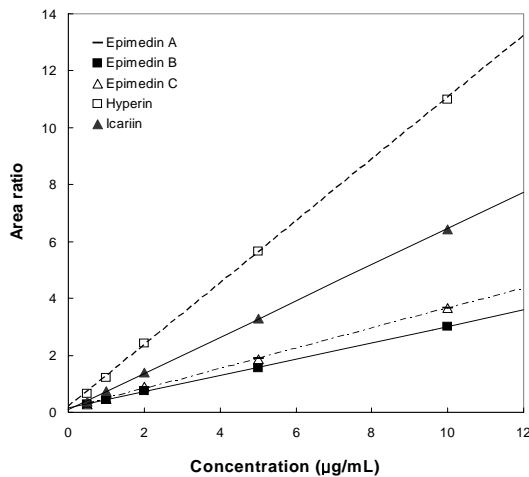


Figure 19. Calibration curves for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside

일내 정확성은 이론치 대비 90.08-110.6%, %RSD는 0.39-6.51%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 92.28-111.0%, %RSD는 1.07-7.78%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.

- 본 분석법의 완건성(Robustness)을 검토하고자 2 µg/mL의 QC시료에 대하여 용매의 pH(3, 4, 5), 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, YMC C₁₈), 컬럼 오븐 온도(30, 40, 50°C), gradient 조건을 변화시켜서 분석하였다. 각 조건의 변화에 따라 피크너비 또는 이론단수의 변화가 나타났다. 그러나 피크 면적을 가지고 각 성분을 정량 분석했을 때는 column의 종류나 column oven 온도에 따른 큰 차이는 보이지 않았으며, gradient elution 조건의 기울기를 변화하였을 때도 분석 결과의 큰 차이는 나타나지 않았다. 그러나 용매의 pH를 4에서 3 또는 5로 변화시켰을 때 정확도에 있어 70% 이상의 큰 변화를 보여 LC/MS/MS를 이용한 음양곽의 유효 성분 분석시 pH 조건이 매우 중요함을 시사하였다.

라. HPLC/UV를 이용한 음양곽 유효성분의 분석법 개발 및 validation

- 의약품 또는 천연물 분석시 보편적으로 사용되고 있는 HPLC/UV를 이용하여 음양곽 추출물 시료에서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 5개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하였다. 5개의 flavonoid glycoside에 대하여 대체적으로 UV 흡수가 크게 나타나는 파장인 260 nm을 검출 파장으로 설정하여 분석한 결과, hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, α-naphthoflavone(I.S.)은 각각 약 4.7, 8.7, 8.9, 9.2, 9.8, 19.0 분에서 검출되었으며, 양호한 peak shape를 나타내었다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다 (Figure 20).

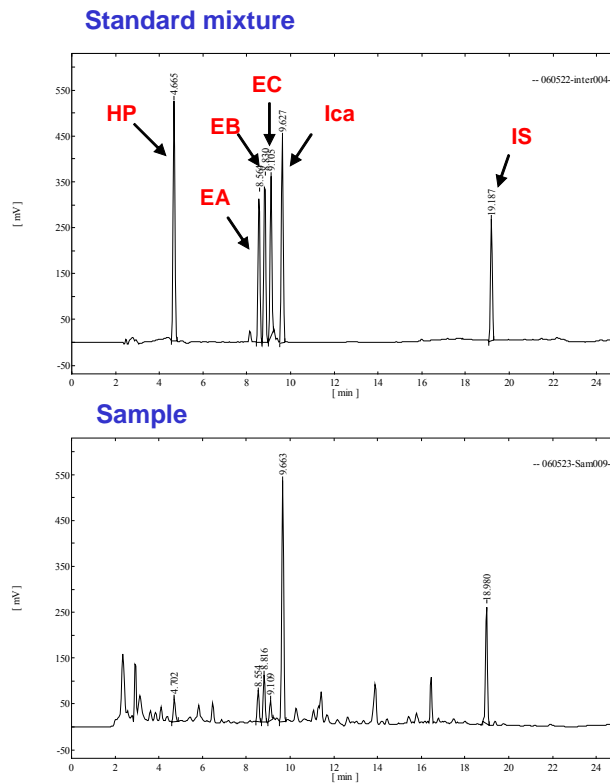


Figure 20. UV chromatograms for standard mixture and extract sample of *Epimedium koreanum*. HP: hyperoside, EA: epimedin A, EB: epimedin B, EC: epimedin C, Ica: icariin.

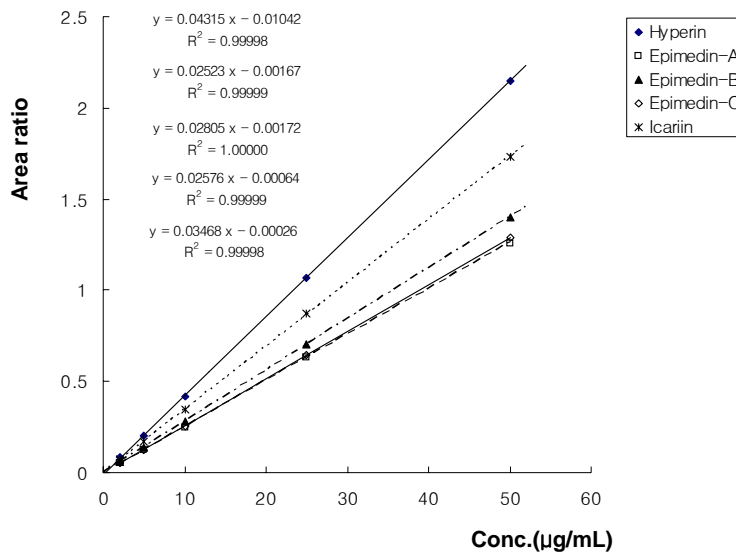


Figure 21. Calibration curves for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside based on HPLC/UV method

- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 표준액의 농도 2-50 µg/mL의 범위에서 상관계수(r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었으며, 따라서 2 µg/mL을 최저정량한계로 설정하였다 (Figure 21). 세 농도(2, 10, 50 µg/mL)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였다. 일내 정확성은 이론치 대비 95.88-103.5%, %RSD는 0.19-3.33%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 95.12-104.9%, %RSD는 0.46-4.38%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.
- 본 분석법의 완전성(Robustness)를 검토하고자 25 µg/mL의 QC시료에 대하여 컬럼의 종류 (Capcellpak C₁₈, Beckmann C₁₈)를 변화시켜 분석하였다. Capcellpak C₁₈, Beckmann C₁₈의 두가지 컬럼을 가지고 분석을 수행한 결과 대체적으로 Beckmann C₁₈을 이용하여 분석시, retention time이 짧아지고 이론단수가 감소하였다. Epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 경우는 측정치에는 큰 차이를 보이지 않았으나, hyperoside의 경우 Beckmann 컬럼으로 분석시 측정치가 이론치의 약 77%로 나타나 매우 큰 차이를 나타내었다. 이는 컬럼의 종류에 따라 물질이 검출되는 정도가 크게 달라질 수 있음을 나타낸다. 따라서 한약재의 품질 관리에 있어 일정하고 정확한 유효 성분 분석이 이루어지기 위해서는 동일한 컬럼을 사용한 분석이 이루어져야 할 것이다.

다. 음양곽 추출물 시료 중 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 함량 분석

- 위와 같이 개발된 동시 분석법을 이용하여 산지가 다른 7종의 음양곽 시료(한국산 4종, 중국산 3종)로부터 만들어진 21개의 추출물 시료(각 시료 당 batch가 다른 3가지 추출물)에 대하여 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 함량을 분석하였다. LC/MS/MS법을 이용하여 분석한 결과는 Table 3과 같으며, HPLC/UV를 이용한 결과는 Table 4, 5과 같다. 각 시료에서의 flavonoid glycoside의 함량 분석 결과를 보면 음양곽 시료의 산지에 따라 유효 성분의 함량 분포에 차이가 나는 것을 알 수 있다. hyperoside의 경우 3종의 시료에서는 검출되지 않았으며 EK-K-1 시료의 경우 분석 대상인 5개의 flavonoid glycoside가 전부 검출되지 않았다.
- LC/MS/MS법에 의한 함량 분석 결과와 HPLC/UV에 의한 함량 분석 결과는 EK-K-1 시료를 제외한 6종의 음양곽 시료는 대체적으로 비슷하게 나타났다.
- 추가 15종의 음양곽 시료를 분석한 결과, 위품인 K4 시료의 경우 hyperoside이외의 성분은 모두 검출되지 않았다, 중국산 중 C2 시료의 경우 epimedin C이외의 성분은 검출되지 않았으며 특히 epimedin C의 함량이 다른 시료에 비해 10배 이상 높았다. 중국산 시료의 경우는 epimedin C의 함량이 높은 경우가 많았다.

Table 3. Contents of flavonoid glycosides, hyperoside (HP), epimedin A (EA), epimedin A (EA), epimedin A (EA), icariin (IC) in *E. koreanum* plant based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Flavonoids content (% of dried extract)_LC/MS/MS				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	1.86	0.45	0.76	1.01	ND
EK-K-2-II	1.94	0.34	0.63	0.85	ND
EK-K-2-III	3.12	0.35	0.58	0.43	ND
EK-K-3-I	2.92	0.47	0.68	0.25	0.21
EK-K-3-II	1.88	0.44	0.66	0.29	0.31
EK-K-3-III	2.15	0.33	0.59	0.24	0.30
EK-C-1-I	3.22	0.65	1.11	0.50	0.28
EK-C-1-II	2.46	0.55	0.75	0.37	0.32
EK-C-1-III	2.16	0.58	0.81	0.44	0.25
EK-C-2-I	4.53	0.83	3.26	1.44	ND
EK-C-2-II	4.75	0.69	3.35	1.47	ND
EK-C-2-III	4.83	0.82	3.44	1.53	ND
EK-C-3-I	3.09	0.52	0.86	0.34	0.28
EK-C-3-II	2.78	0.58	1.03	0.39	0.40
EK-C-3-III	1.95	0.48	0.72	0.43	0.31
Ext-1	2.91	0.86	1.21	0.88	0.73
Ext-2	2.04	0.59	0.89	0.63	0.59
Ext-3	2.30	0.73	1.07	0.87	0.66

Table 4. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* plant based on the results of HPLC/UV analysis

Sample No.	Flavonoids content (% of dried extract)_LC/UV				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	1.92	0.48	0.68	1.07	ND
EK-K-2-II	2.17	0.39	0.56	0.85	ND
EK-K-2-III	2.88	0.43	0.62	0.47	ND
EK-K-3-I	2.94	0.55	0.70	0.25	0.24
EK-K-3-II	2.11	0.43	0.60	0.19	0.25
EK-K-3-III	1.79	0.44	0.59	0.17	0.26
EK-C-1-I	3.00	0.65	0.87	0.41	0.29
EK-C-1-II	2.29	0.59	0.76	0.47	0.31
EK-C-1-III	2.14	0.52	0.75	0.64	0.24
EK-C-2-I	4.91	0.99	4.08	1.58	ND
EK-C-2-II	4.87	0.88	3.59	1.34	ND
EK-C-2-III	5.83	1.37	4.76	1.82	ND
EK-C-3-I	3.16	0.55	0.74	0.40	0.29
EK-C-3-II	2.66	0.64	0.89	0.50	0.42
EK-C-3-III	2.10	0.53	0.70	0.41	0.31
Ext-1	2.84	0.80	1.03	0.93	0.25
Ext-2	2.43	0.69	0.93	0.66	0.58
Ext-3	2.40	0.88	0.92	0.62	0.55

Table 5. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* plant based on the results of HPLC/UV analysis (추가 15종)

Sample No.	산지	구입처	Flavonoids content (% of dried extract)_LC/UV				
			Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	Hyperoside
EK-K-1	한국산	전남생약	3.18	1.47	2.07	1.81	0.21
EK-K-2	한국산	정도약업사	6.13	2.39	2.95	2.33	0.58
EK-K-3	한국산	제기동시장	1.44	0.73	1.05	0.50	0.26
EK-K-4	한국산(위품)	농협	0.00	0.00	0.00	0.00	0.51
EK-C-1	중국산	난주시장	2.91	0.82	1.32	0.65	0.69
EK-C-2	중국산	안국시장	0.00	0.00	0.00	32.41	0.00
EK-C-3	중국산	운장무역	2.97	0.80	1.35	0.55	0.74
EK-C-4	중국산	창달중약	2.13	0.78	1.26	0.78	0.85
EK-C-5	중국산	귀양시장	1.68	1.14	1.55	14.93	0.61
EK-C-6	중국산	곤명시장	1.23	0.55	0.69	6.20	0.00
EK-C-7	중국산	제기동시장	2.18	0.71	1.12	0.45	0.73
EK-C-8	중국산	안국시장	10.44	1.70	3.54	7.60	0.00
EK-C-9	중국산	시상판나시장	3.70	0.82	1.14	14.38	0.00
EK-C-10	중국산	제기동시장	1.57	0.49	0.72	0.70	0.35
EK-C-11	중국산	장사시장	0.94	0.52	0.64	5.57	0.00

바. HPLC/UV/MS를 이용한 음양곽 추출물의 chemical profiling

◦ 음양곽 추출물 성분의 chemical fingerprinting 방법의 확립을 위하여 HPLC/UV/MS를 이용하여 chemical profiling을 하였다. 플라보노이드 계열의 물질이 대체적으로 320 nm에서 특징적인 UV 흡수를 보임으로 320 nm에서 UV 흡수를 검출하고 동시에 mass detector를 이용하여 각 피크에 대한 m/z 값을 확인하였다. 대표적인 음양곽 추출물의 UV chromatogram은 Figure 22에 나타내었다. UV 크로마토그램을 통하여 음양곽의 약리 작용을 나타내는 주성분인 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside 등의 peak를 확인할 수 있었으며, 이들 성분을 포함하여 음양곽 추출물의 UV크로마토그램 상의 총 22개의 peak에 대하여 chemical profiling을 수행하였다. 배치가 다른 음양곽 추출물 I, II, III에 대하여 UV 크로마토그램 상의 각 peak에 대한 retention time, m/z 값을 표시하였고 UV 흡수와 mass intensity를 바탕으로 하여 각 peak의 면적을 계산하여 표시하였다 (Table 6). 3가지의 음양곽 추출물 시료는 UV와 mass data에 의거한 chemical profiling에 있어 유사한 패턴을 보였다.

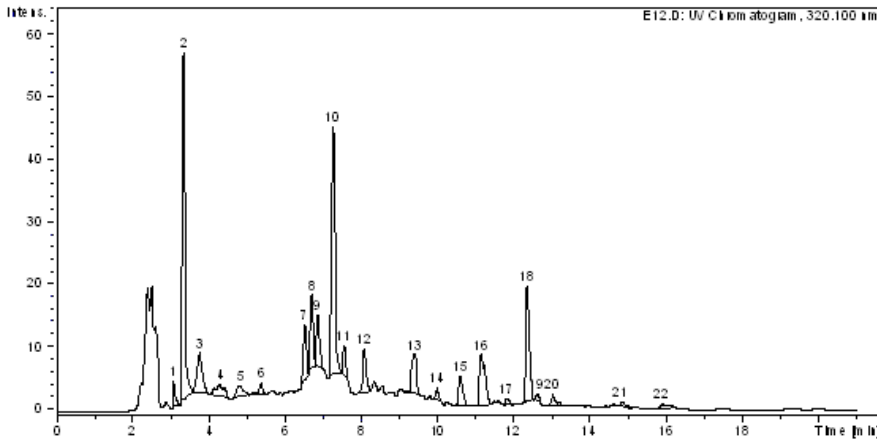


Figure 20.
UV chromatogram for *E. koreanum* extract

Table 6. Chemical profiling *E. koreanum* extract with HPLC/UV/MS

Peak No.	RT (min)	m/z	UV (% area)			Mass (% area)		
			Ext-I	Ext-II	Ext-III	Ext-I	Ext-II	Ext-III
1	3.1	342	1.4	1.9	1.7	1.9	2.0	0.7
2	3.3	297	21.4	25.3	24.1	5.7	5.6	26.7
3	3.7	319	4.8	4.7	4.7	1.4	1.2	1.1
4	4.3	303	2.4	2.3	2.5	22.3	26.0	21.1
5	4.8	370	1.7	1.6	1.7	10.8	10.7	8.9
6	5.3	517	1.2	0.9	1.0	8.8	7.1	5.0
7	6.5	839	3.4	3.0	3.3	5.1	5.1	3.1
8	6.7	809	4.6	3.9	4.1	5.1	4.7	3.7
9	6.8	823	4.4	3.5	3.9	5.8	6.5	5.1
10	7.2	677	19.4	18.0	16.2	16.5	15.5	10.9
11	7.5	821	2.2	2.1	3.3	7.4	6.5	6.4
12	8.1	617	3.6	3.4	3.6	1.1	0.9	0.5
13	9.4	719	4.4	4.4	4.3	0.3	0.2	0.1
14	10.0	355	0.9	0.8	1.0	1.9	1.8	1.7
15	10.6	699	2.4	2.4	2.6	0.2	0.2	0.2
16	11.1	669	6.8	6.9	7.2	1.7	0.08	0.1
17	11.8	746	0.5	0.4	0.4	0.01	0.06	0.03
18	12.3	369	10.3	10.4	9.8	4.3	4.4	3.5
19	12.6	659	0.5	0.6	1.1	0.09	0.06	0.1
20	13.0	783	1.1	1.2	1.1	0.2	0.2	0.3
21	14.8	825	0.5	0.5	0.5	0.06	0.1	0.1
22	15.9	331	1.1	0.8	0.8	0.1	0.1	0.1

바. 음양곽의 품질 관리를 위한 패턴 인식 분석법의 적용

- 음양곽의 유효 성분으로 여겨지는 몇 가지 flavonoid glycoside계 물질 뿐 아니라 음양곽에 포함되어 있는 전체 성분에 대한 정보를 반영한 품질 관리법을 확립하기 위하여, 음양곽 추출물 시료를 LC/MS로 분석한 뒤 얻어진 total ion chromatography(TIC)에 대하여 패턴 인식 분석을 수행하였다.
- 우선, 패턴 인식 분석법으로서 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석법 (Principle component analysis, PCA)을 적용하여 얻어진 PC score plot을 통하여 음양곽 추출물 시료간의 화학적 성분 패턴에 따른 분포를 관찰하였다. Score plot (Figure 21)을 살펴보면, PC1에 대해서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside이 모두 검출되지 않았던 K1 시료를 제외한 모든 음양곽 시료는 전체적으로 일정한 값을 나타내었으며 음양곽이 아닌 다른 한약재 시료 (NP)와 확연한 차이를 나타내었다. PC2에 의해서는 각 시료의 산지에 따른 미세한 구분이 가능하였으며, PC3에 의해서는 대부분의 음양곽 시료와 확연한 차이를 보이는 NP와 K1 시료 이외에 C2 시료가 다른 시료들과 구분되어 cluster를 형성하였다. C2 시료의 경우 hyperoside이 검출되지 않았으며 icariin, epimedin A, B, C의 함량이 다른 추출물 시료에 비해 현저하게 높은 것이 다른 시료와 구분된 cluster를 형성한 원인으로 사료된다. 결론적으로 PC1의 한 가지 factor만으로도 타 한약재와의 구분이 가능하였으며, PC2, PC3를 추가적으로 적용하였을 때 산지 또는 기원식물 등에 의한 차이를 구분할 수 있었다.
- 패턴 분석을 이용한 한약재의 품질 관리 기준의 마련하고자, 각 음양곽 추출물 시료에 대한 분석 결과에 Similarity Index (SI)를 적용하여 패턴 분석 결과를 수치화하였다 (Table 7). 각 시료 간 SI값을 살펴보면, 성분 패턴이 확연히 다른 NP와 K1 시료의 경우 타 시료와의 SI값이 0.2-0.4 정도로 매우 낮은 값을 보였으며 이들 시료를 제외한 경우 0.6-0.8사이의 SI 값을 보였다. 같은 음양곽 시료에 대하여 추출한 batch가 다른 시료간의 SI값은 0.8-1 사이의 높은 값을 나타냈으나, 같은 시료를 가지고 추출한 경우라도 그 batch에 따라 성분 프로파일의 차이가 나타남을 알 수 있었다.

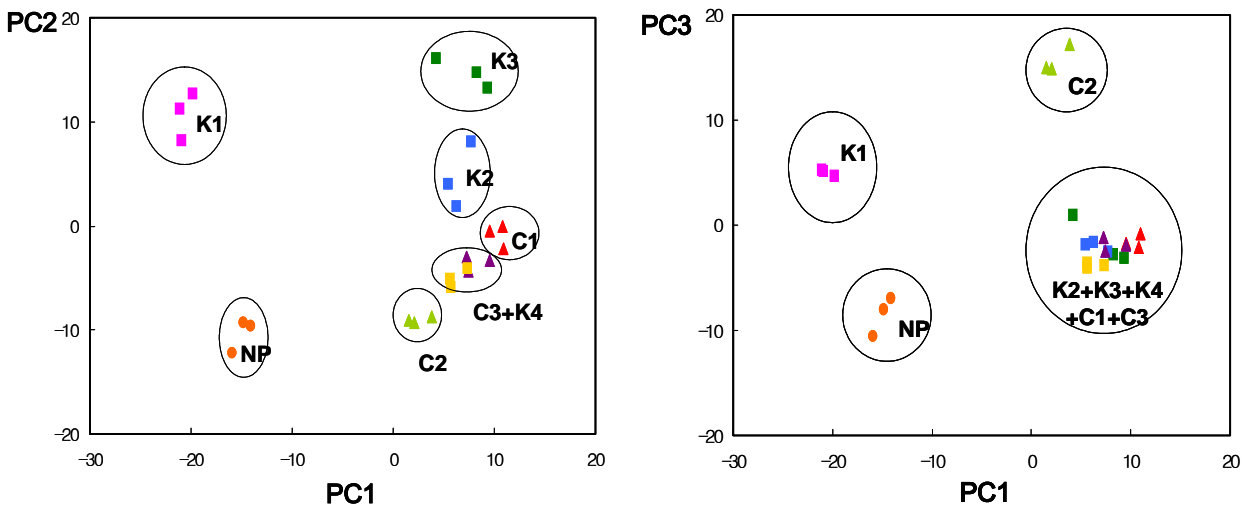


Figure 23. PC score plots for *E. koreanum* extract sample

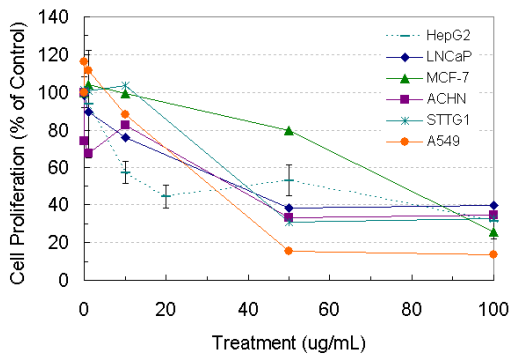
Table 7. Similarity index for *E. koreanum* extract sample

	K1-1	K1-2	K1-3	K2-1	K2-2	K2-3	K3-1	K3-2	K3-3	K4-1	K4-2	K4-3	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C3-1	C3-2	C3-3	NP-1	NP-2	NP-3
K1-1	1.00	0.88	0.86	0.40	0.43	0.40	0.45	0.38	0.40	0.34	0.35	0.34	0.33	0.32	0.30	0.37	0.40	0.39	0.36	0.32	0.30	0.31	0.33	0.36
K1-2		1.00	0.90	0.42	0.44	0.41	0.48	0.40	0.43	0.33	0.35	0.33	0.32	0.30	0.37	0.39	0.37	0.34	0.30	0.30	0.29	0.30	0.35	0.37
K1-3			1.00	0.47	0.47	0.43	0.53	0.45	0.46	0.35	0.35	0.33	0.34	0.32	0.38	0.40	0.39	0.36	0.32	0.31	0.29	0.34	0.38	
K2-1				1.00	0.87	0.86	0.79	0.81	0.85	0.74	0.73	0.69	0.80	0.81	0.77	0.62	0.61	0.64	0.81	0.79	0.74	0.23	0.26	0.27
K2-2					1.00	0.88	0.75	0.76	0.79	0.74	0.72	0.71	0.81	0.80	0.80	0.64	0.64	0.65	0.82	0.80	0.80	0.24	0.26	0.29
K2-3						1.00	0.72	0.74	0.78	0.77	0.75	0.73	0.83	0.83	0.80	0.66	0.65	0.65	0.82	0.79	0.78	0.25	0.29	0.30
K3-1							1.00	0.85	0.81	0.68	0.68	0.65	0.69	0.72	0.68	0.61	0.59	0.59	0.71	0.70	0.68	0.22	0.24	0.26
K3-2								1.00	0.86	0.68	0.67	0.64	0.74	0.77	0.74	0.58	0.55	0.55	0.73	0.73	0.71	0.20	0.23	0.25
K3-3									1.00	0.70	0.72	0.68	0.77	0.79	0.76	0.60	0.58	0.58	0.76	0.76	0.71	0.21	0.23	0.24
K4-1										1.00	0.88	0.90	0.75	0.75	0.74	0.66	0.65	0.65	0.79	0.81	0.78	0.28	0.29	0.32
K4-2											1.00	0.93	0.75	0.73	0.74	0.64	0.64	0.64	0.76	0.78	0.76	0.25	0.29	0.28
K4-3												1.00	0.73	0.71	0.72	0.63	0.63	0.63	0.74	0.75	0.75	0.24	0.26	0.26
C1-1													1.00	0.92	0.92	0.68	0.65	0.65	0.83	0.82	0.81	0.22	0.25	0.25
C1-2														1.00	0.93	0.68	0.64	0.64	0.84	0.84	0.81	0.24	0.27	0.27
C1-3															1.00	0.69	0.66	0.65	0.81	0.83	0.83	0.22	0.24	0.25
C2-1																1.00	0.90	0.89	0.69	0.67	0.66	0.22	0.26	0.26
C2-2																	1.00	0.93	0.69	0.66	0.66	0.26	0.28	0.29
C2-3																		1.00	0.71	0.69	0.66	0.27	0.30	0.29
C3-1																			1.00	0.91	0.87	0.27	0.30	0.30
C3-2																				1.00	0.90	0.25	0.28	0.29
C3-3																					1.00	0.25	0.28	0.29
NP-1																						1.00	0.61	0.61
NP-2																							1.00	0.69
NP-3																								1.00

<바이오칩>

가. DNA chip 실험을 위한 세포주와 처리조건 설정

- 제2세부 DNA chip 과제에서는 한약재 과학화를 위하여 음양곽과 그 주성분인 icariin, epimedin B 외 1종의 분리물질이 유전자 발현 profile에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적합한 세포주를 선정한 후 DNA microarray 실험을 실시하였다.
- DNA microarray 실험을 위한 세포주를 선정하기 위하여 음양곽 70% ethanol 추출물을 LNCaP (prostate), MCF-7(Breast), A549 (Lung), ACHN (Kidney) 및 CCF-STTG1 (brain, astrocyte) 등 6가지 여러 장기 유래 암세포주에 여러 농도로 72시간 동안 처리한 후 세포증식 저해 정도를 MTS assay를 실시하였다. 먼저 serum free 배지를 사용하였을 때 그림2에서와 같이 70% ethanol 추출물 처리에 의하여 농도 의존적으로 세포증식이 저해되었으며, 그중에서 세포증식 저해 정도가 MCF-7에서 IC50값이 81 ug/ml로 상대적으로 높게 나타났고, A549세포에서는 23.5 ug/ml로 저해가 크게 나타났다.
- 음양곽은 민간에서 주로 남성의 성기능향상 작용을 위하여 사용하고 있는 생약으로 음양곽의 주성분인 icariin이 phosphoesterase 5 (PDE5)를 저해하여 성기능향상 작용을 나타낸다는 보고를 바탕으로 세포주에서 PDE5가 발현되는 것으로 알려진 A549세포와 성기능 작용과 관련된 prostate cancer cell line인 LNCaP 세포에서 음양곽 70% ethanol 추출물에 의한 세포 증식저해정도를 serum을 넣은 배지(serum media)와 넣지 않은 배지(serum free media)에서 관찰하였을 때 serum



	HepG2	LNCaP	MCF-7	ACHN	CCF-S TTG1	A549
IC50(μg/mL)	36.4	34.5	81	36.1	43.1	23.5

Figure 24. Effect of 70% ethanol extracts of Epimedii herba on the cell proliferation and IC50 values in various cancer cell lines

media에서는 세포증식 저해가 매우 낮게 나타난 반면 serum free media에서는 세포증식이 크게 저해되었다 (Figure 24). 일반적으로 생체내의 세포는 serum이 있는 조건에 있기 때문에 이후의 실험에는 10% serum을 함유하는 배지를 사용하였다.

- 본 연구에서는 남성호르몬과 관계된 androgen receptor와 aromatase, 기질적인 작용을 나타내는 데 관여하는 PDE5를 선정하여 음양곽 추출물 및 icariin에 의하여 용량 및 시간에 따른 유전자 발현변화 양상을 관찰하였다. Figure 23에서와 같이 음양곽 추출물에 의하여 LNCaP 세포에서 이들 유전자의 발현 변화가 나타났으나, A549세포에서는 PDE5의 발현 변화가 크지 않았고 AR이나 aromatase의 발현이 잘 되지 않았다. 따라서 DNA chip을 이용하여 음양곽 추출물 및 그 분리화합물에 의한 유전자 발현 변화 양상을 관찰하기 위하여 LNCaP 세포주를 선정하였다.
- 음양곽 처리 농도와 시간을 정하기 위하여 음양곽 추출물을 1과 50 μg/ml 농도로 0, 3, 6, 12, 24, 48h 동안 처리한 후 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 mRNA 발현변화를 RT-PCR을 통해 관찰하였을 때, Figure 25에서와 같이 PDE5는 저농도의 음양곽 추출물에 의하여는 변화가 없었으나 고농도로 처리하였을 때는 처리시간이 길어짐에 따라 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 androgen receptor (AR)의 경우에는 저농도 처리에 의하여 시간이 증가할수록 발현이 증가되었으나 고농도에서는 AR 발현이 잘 나타나지 않았다. 그러나 전체적으로 관찰하였을 때 유전자 발현은 좀 더 고농도에서 변화가 많을 것으로 사료되어 음양곽 추출물은 10, 100ug/ml로 처리할 것을 결정하였다.

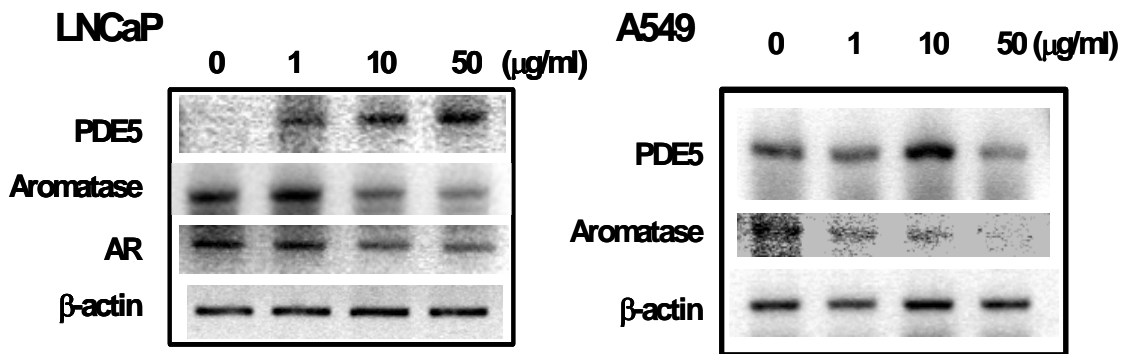


Figure 25. Effect of 70% ethanol extracts of Epimedii herba on the gene expression in LNCaP and A549 cells.

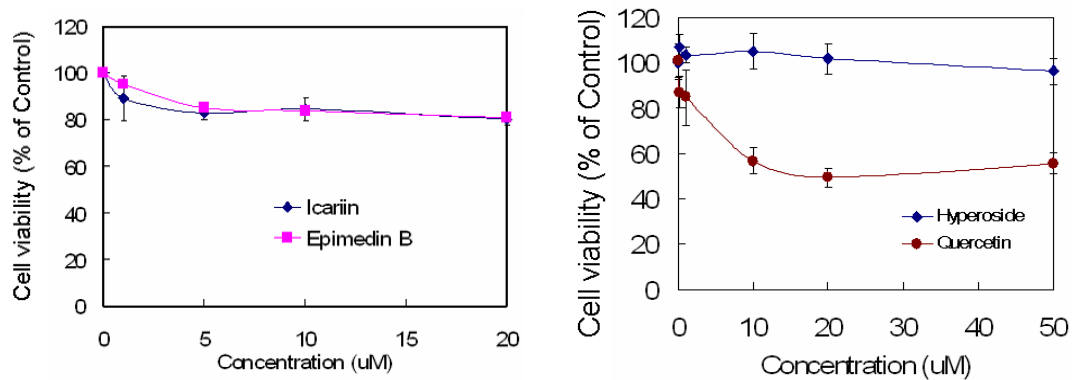


Figure 26. Effect of Epimedi herba components on the proliferation of LNCaP cells.

- 음양곽 70% ethanol 추출물의 주성분은 1세부 분석팀에서 분석한 결과 icariin이 가장 많이 함유되어 있으며, hyperoside와 epimedin B가 다음으로 많이 존재하였다. 음양곽에는 주로 flavonoid glycoside 가 많이 존재하고 있으며, 특히 prenylflavonoid 모핵에 당이 다른 것이 많이 존재하고 있다. 따라서 본 과제에서는 함량이 많이 있으며, 같은 prenylflavonoid 모핵을 갖고 있으나 구성 당이 다른 icariin과 epimedin B를 또한 quercetin의 7 위치에 galactose가 붙어있는 hyperoside를 효능 분석 물질로 선정하여 효능 분석 및 DNA microarray 실험을 실시하였다.
- Icariin, epimedin B 및 hyperoside에 대한 용량 결정을 위하여 먼저 LNCaP 세포에 여러 농도의 분리물질들을 24시간동안 처리한 후 세포독성을 측정하였을 때 icariin, epimedin B 및 hyperoside 등의 glycoflavonoids는 세포독성이 거의 나타나지 않았으나 hyperoside의 aglycon인 quercetin은 상대적으로 세포독성이 크게 나타났다 (Figure 26).
- 음양곽의 주성분인 icariin의 실험조건을 잡기 위하여 1uM과 10uM을 0, 3, 6, 24, 48시간 동안 처리한 후 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 mRNA 발현변화를 RT-PCR을 통해 관찰하였을 때 Figure 27과 같이 나타났다. 1uM icariin 처리에 의하여 AR의 발현이 처리 시간이 길어질수록 크게 증가되었다. 그러나 10 uM 농도에서는 저농도 (1uM) 처리에 의한 유전자 발현과는 달리 나타났다.

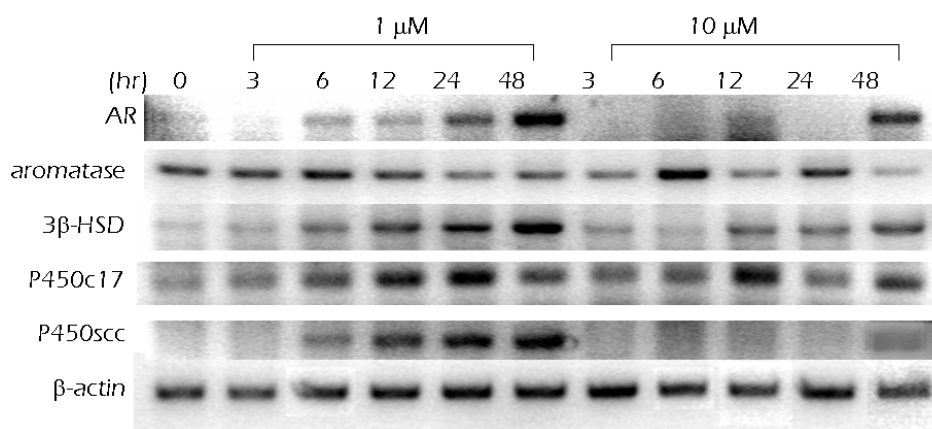


Figure 27. Time- and dose-dependent effect of icariin on the gene expression in LNCaP cells.

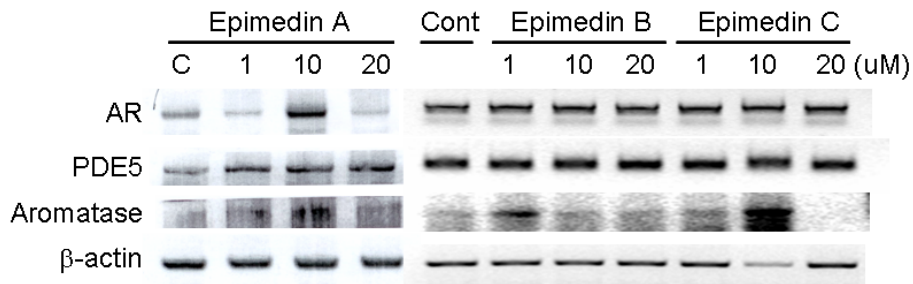


Figure 28. Dose-dependent effect of epimedin on the gene expression in LNCaP cells.

- Epimedin A, B 및 C에 의한 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 LNCaP 세포에 분리물질들의 농도를 달리하여 24시간동안 처리하였다. 이때 관찰하였을 때 epimedin A, B 나 C에서 유전자 발현변화는 크게 나타나지 않았다. 따라서 음양곽에는 epimedin B가 가장 많이 존재하므로 DNA microarray 실험을 위하여 epimedin B를 선정하였다 (Figure 28).
- Hyperoside에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 hyperoside와 그 aglycon이 quercetin을 여러 농도로 24시간 동안 LNCaP 세포에 처리한 후 RT-PCR을 하였다. 그 때 quercetin은 aromatase 발현이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나 aglycon은 전혀 변화가 나타나지 않았으나 (Figure 29), quercetin은 음양곽에는 거의 hyperoside 형태로 존재하므로 hyperoside를 선정하였다.

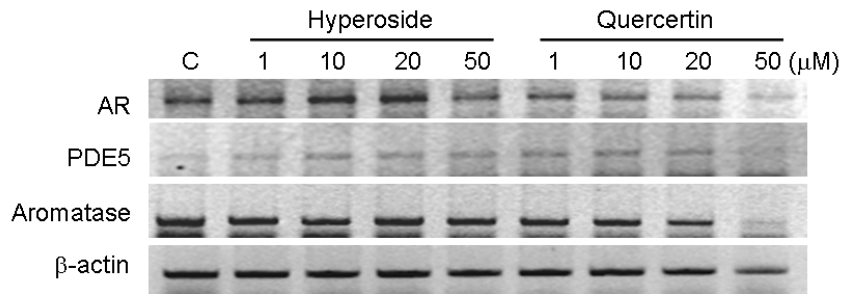


Figure 29. Dose-dependent effect of hyperoside and quercetin on the gene expression in LNCaP cells.

- DNA chip 실험을 위한 분리물질은 이상의 세포독성 및 성기능관련 효소들의 발현을 기준으로 하여 본 과제에서는 icariin, epimedin B 및 hyperoside 등의 3종을 선정하였다 (Figure 30)

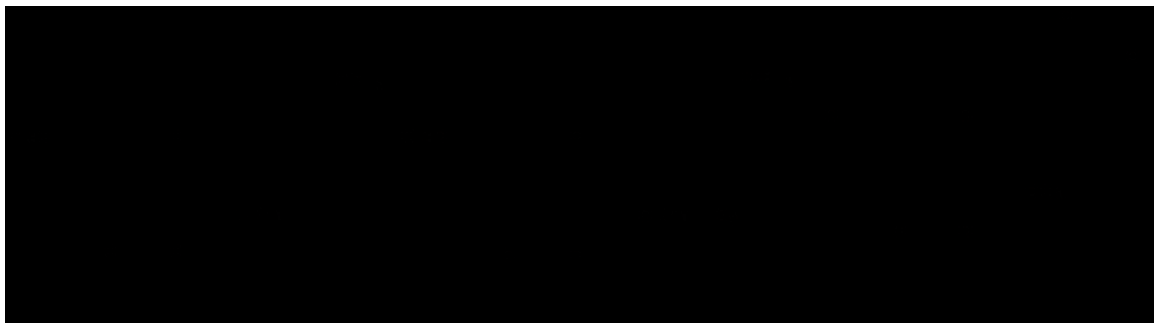


Figure 30. Chemical structures of three compounds isolated from Epimedium koreanum for DNA microarray experiment.

- 이상의 LNCaP 세포에서 testosterone 합성 관련 효소들의 발현을 관찰한 외에도 음양곽이 성기능 향상 작용을 하는 데 관여하는 것은 음양곽 추출물이나 icariin 등에 의한 PDE5 저해에 따른 L-arginine/NO/cGMP pathway의 활성화에 따라 nitric oxide 생성량이 증가되어 penis 내의 동맥 혈관 확장에 의하여 발기작용이 오랜시간 동안 유지될 수 있다. 음양곽 추출물과 그 주성분인 icariin 이 nitric oxide 생성과 세포독성에 미치는 영향에 대하여 Raw264.7 세포주와 HUVEC 세포에서 실험하였다.
- Raw264.7 세포주에 여러 농도의 음양곽 추출물이나 icariin을 처리한 후 세포독성, nitric oxide 생성량 및 immunoblot을 이용하여 iNOS 발현을 실험하였을 때 figure 31에서와 같이 음양곽 추출물 800ug/mL 농도까지 세포독성이 거의 나타나지 않았으나, nitrite 생성량은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때 농도의존적으로 증가된 양상이 나타났다. 그러나 iNOS inducer인 LPS와 함께 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 농도-의존적으로 nitrite 생성량이 감소되었다. iNOS은 음양곽 추출물을 단독으로 처리하였을 때는 발현량의 변화를 관찰할 수 없었으나 LPS에 의한 iNOS induction을 천궁 추출물 처리에 의하여 농도-의존적으로 저해되었다. 음양곽 추출물에 의한 iNOS 관련 nitric oxide 결과와는 대조적으로 icariin은 200uM 이상에서는 세포독성이 용량 의존적으로 증가되었다. LPS에 의한 nitric oxide 생성량 증가 및 발현량 증가에 대해서 icariin이 용량 의존적으로 저해하였으나 그 저해정도는 음양곽 보다 약하게 나타났다.
- Huvec 세포에서 음양곽 추출물 및 icariin에 의한 nitric oxide 생성을 관찰하였다. Figure 32에서와 같이 음양곽 추출물 처리에 의하여 세포독성이 전혀 나타나지 않는 400ug/mL에서 nitric oxide 생성량이 크게 증가되었으며, 양성대조군으로 사용한 PMA 보다도 약 1.4배 정도 증가되었다. Icariin에 의한 nitric oxide 생성량 역시 크게 증가되었으나 음양곽에 비하여 약하게 증가되었으며, 거의 PMA 수준과 유사하였다. 이러한 Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의하여 nitric oxide 생성량이 증가하는 것은 NO에 의한 혈관 확장 작용에 의하여 발기능을 향상시켜 성기능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

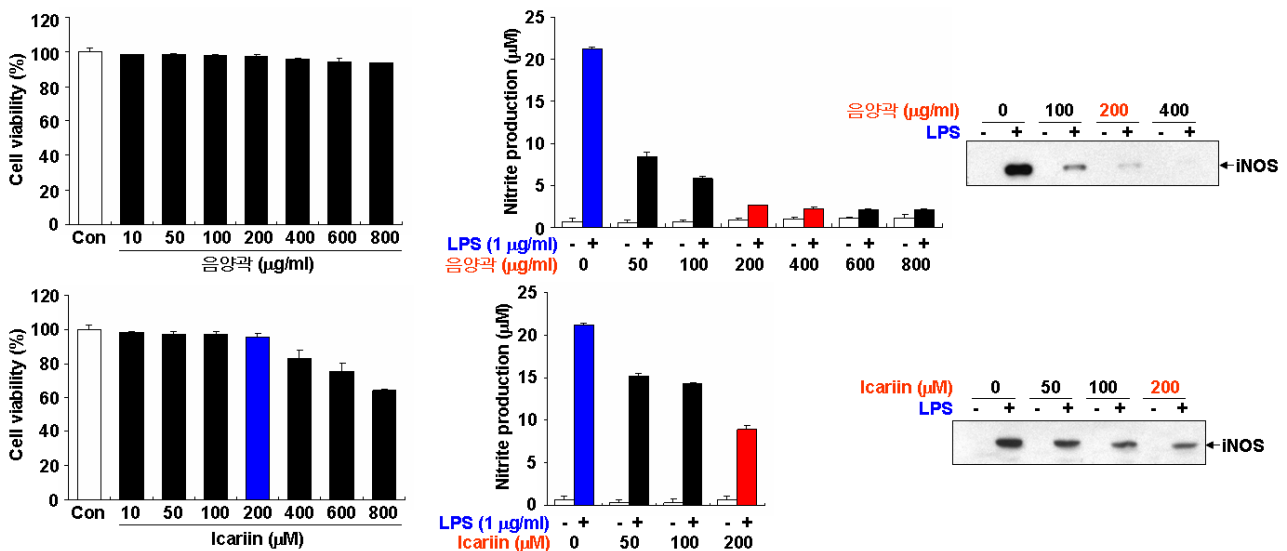


Figure 31. Effect of Epimeii herba extract and icariin on the cytotoxicity, the production of nitric oxide and expression of iNOS in Raw264.7 cells.

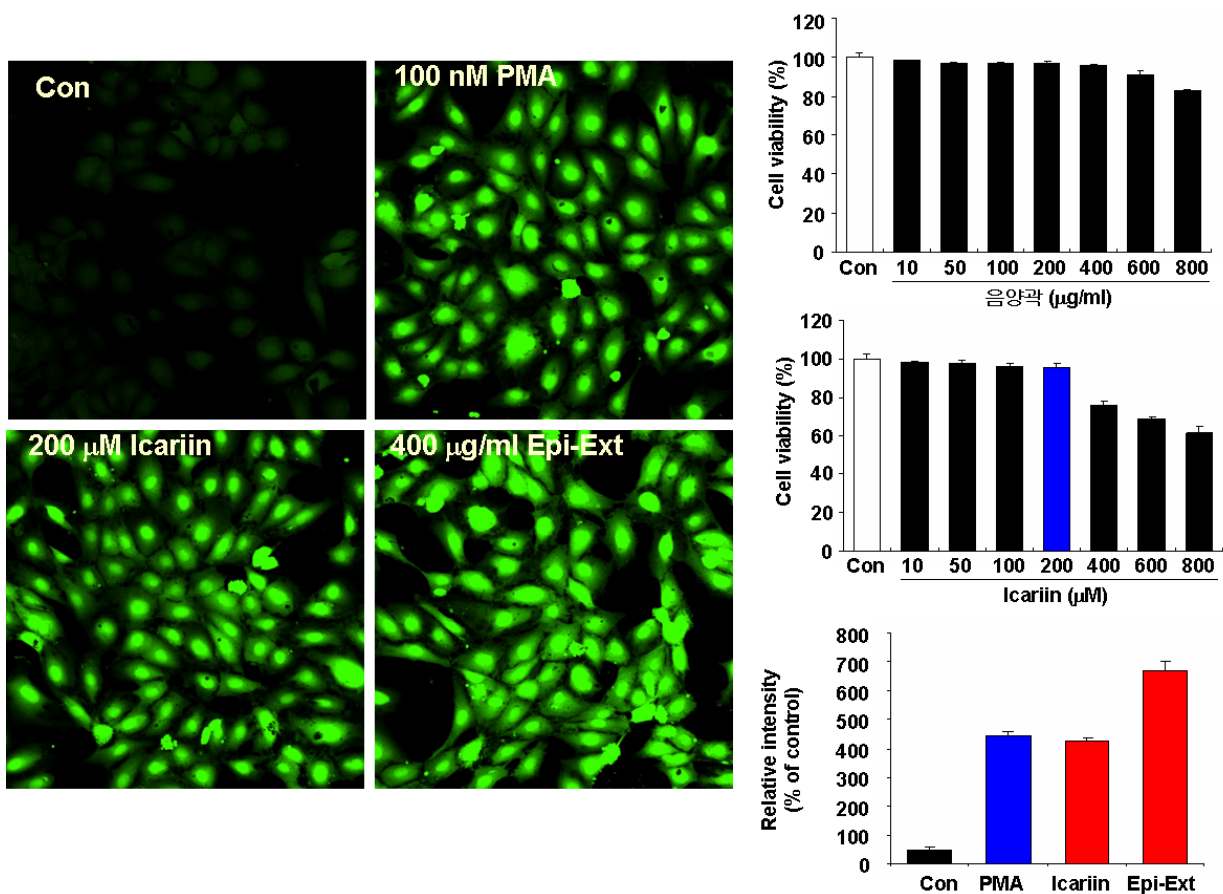
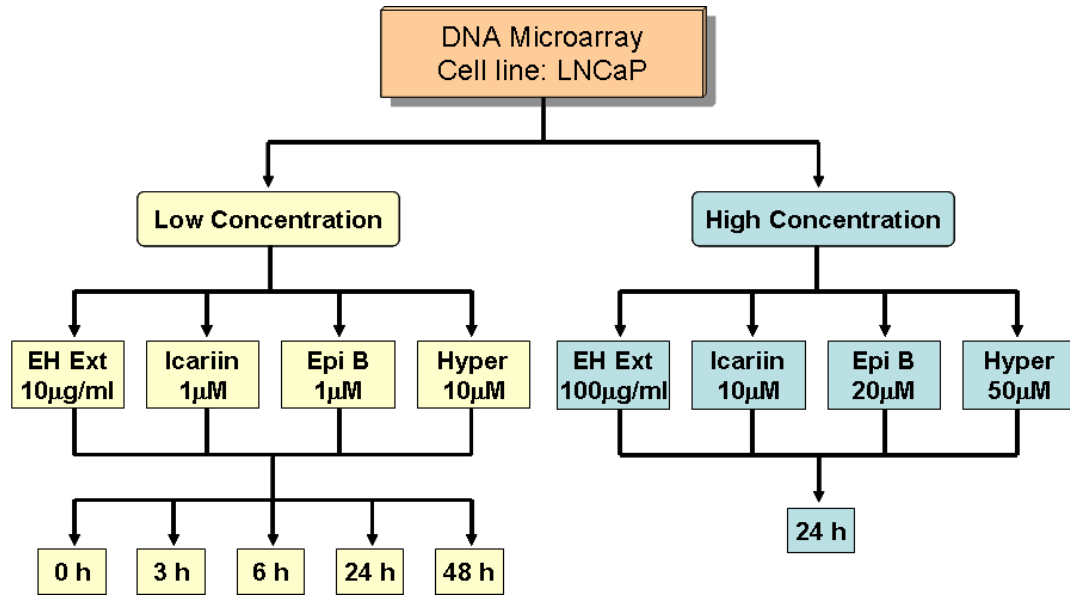


Figure 32. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity and the production of nitric oxide in HUVEC cells.

- 그러나 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람의 것이며 구입하기 쉬운 것으로 선정하고자 음양곽 추출물에 의하여 testosterone 합성 관련 효소들이나 PDE5의 유전자 발현변화를 관찰했던 LNCaP 세포를 성기능 향상과 관련지어 실험하였다.

나. DNA microarray analysis

- 음양곽 70% EtOH 추출물과 icariin, epimedin B 및 hyperoside의 농도 및 시간에 따른 유전자 발현을 관찰하기 위하여 음양곽 추출물을 LNCaP 세포에 Scheme 8에서와 같은 조건으로 처리하여 실험을 실시하였다. DNA microarray 분석조건을 요약하였을 때 Table 6과 같았다.
- DNA microarray 데이터를 분석조건에 따라 filtering 한 후 normalization 한 후 box plotting과 MA plotting을 filtering 하기 전의 것과 비교하여 normalization이 적절히 수행되었음을 확인하였다.



Scheme 8. Design of the DNA microarray experiment for the selection of biomarker genes in the 70% EtOH extract of Epimedium herba, its major components, icariin, epimedin B and hyperoside.

Table 8. Experimental and analysis conditions of DNA microarray for Epimedium herba extracts, icariin, epimedin B and hyperoside in LNCaP cells

		Experimental condition				
Epimedium herba	Time (4 conditions)	3hr (10µg)	6hr (10µg)	24hr (10µg)	48hr (10µg)	
	Dose (4 conditions)	1µg(24h)	10µg(24h)	50µg(24h)	100µg(24h)	
Icariin	Time (4 conditions)	3hr (0µM)	6hr (0µM)	24hr (0µM)	48hr (0µM)	
	Dose (2 conditions)	x	1µM(24h)	x	10µM(24h)	
Epimedin B	Time (4 conditions)	3hr (1µM)	6hr (1µM)	24hr (1µM)	48hr (1µM)	
	Dose (2 conditions)	x	30µM(24h)	x	30µM(24h)	
Hyperoside	Time (4 conditions)	3hr (10µM)	6hr (10µM)	24hr (10µM)	48hr (10µM)	
	Dose (2 conditions)	x	50µM(24h)	x	50µM(24h)	

- ◆ Array Type: ABi human chip
- ◆ Number of Total spots: 36179
- ◆ Data pre-processing
 - ◆ Quantile normalization
 - ◆ Data filtering: Signal to Noise ratio 3 미만의 spot이 전체 조건에서 30% 이상을 차지하는 spot과 Flag 100이상 제거
- ◆ Hierarchical clustering with complete linkage and similarity measure by Euclidean distance

◦ Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y

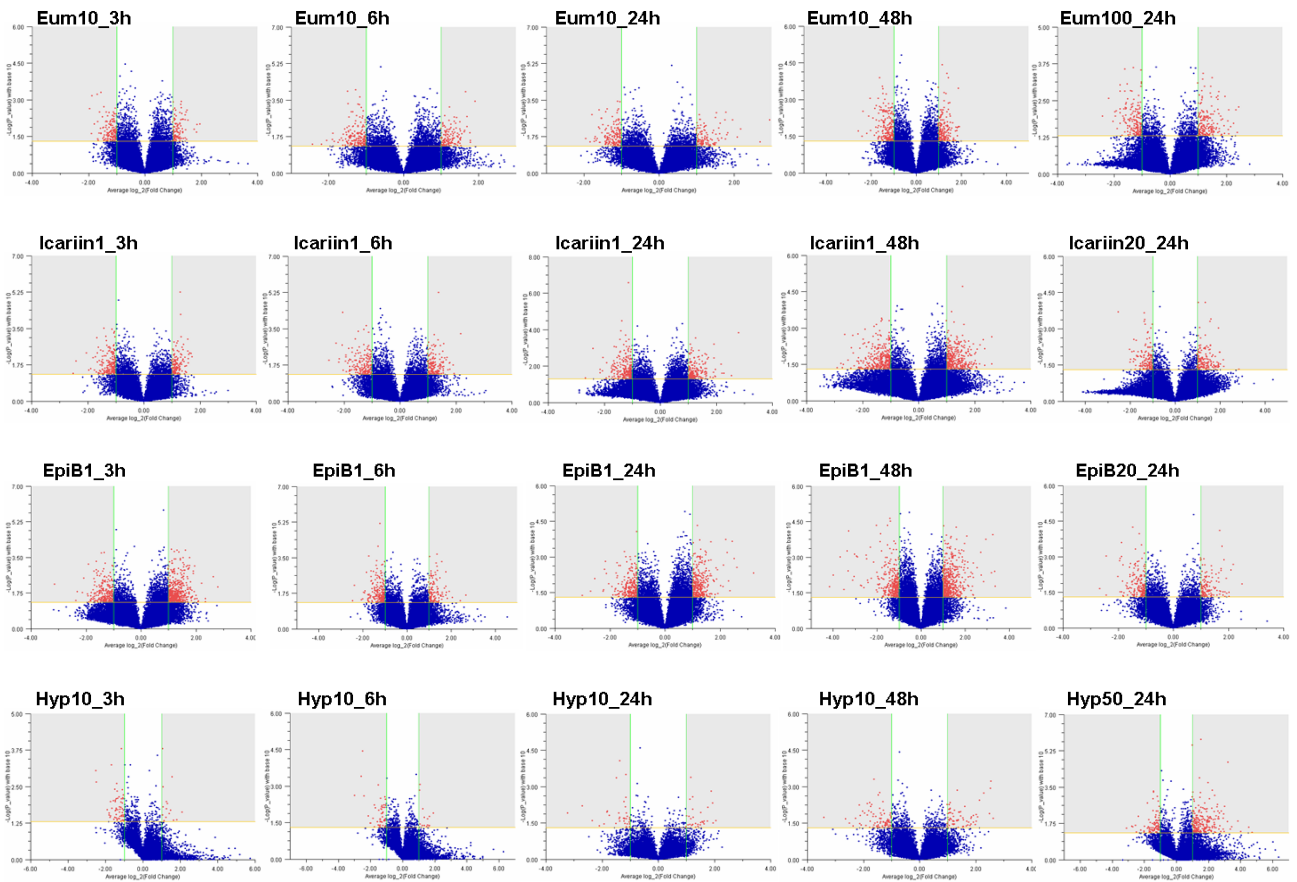


Figure 33. Volcano plots compared control to experiments for the selection of biomarker genes in *Epimedium herba* and its major components.

축은 Welch's T-test 결과를 나타냄)을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test $P > 0.05$ 의 유의성을 나타내는 유전자를 검색하였다(Figure 33, Table 9).

- Figure 33의 Volcano plot으로부터 각 실험군의 처리시간 및 농도에 따른 유의 유전자를 계산하였을 때 table 9에서와 같이 처리시간이 길어질수록 유의 유전자 수가 증가하였다. 모든 처리군에서 3시간동안 처리했을 때 발현이 올라간 유전자보다는 감소한 것이 많았으며, 처리시간이 증가할수록 발현이 올라간 유전자 수가 상대적으로 많이 증가되었다. 그리고 예상외로 icariin이나 epimedin B의 고농도 처리에 의해 발현이 변화된 유전자 수가 저농도에서 변화된 유전자 수 보다 적은 것으로 나타났다. 그러나 hyperoside의 경우에는 10uM 처리에 의하여 유의적으로 변화된 유전자수가 icariin이나 epimedin B보다 적었으나 50uM에서 변화된 유전자수가 10uM에서 변화된 유전자 수보다 매우 크게 나타났다.
- 음양곽 추출물 및 그 분리물질들에 의하여 시간 및 용량에 따른 유의 유전자수를 모두 더하였을 때 음양곽 추출물은 757개 이었으며 icariin, epimedin B 및 hyperoside는 각각 1004, 1373 및 598개 이었다. 이들의 biological pathway를 관찰하기 위하여 gene annotation을 하였을 때 음양곽 추출물은 98개 (12.9%), icariin과 epimedin B는 각각 981 (97.7%)과 1345 (97.8%)개 그리고 hyperoside는 585 (98.0%)개의 유전자 기능을 알 수 있었다.

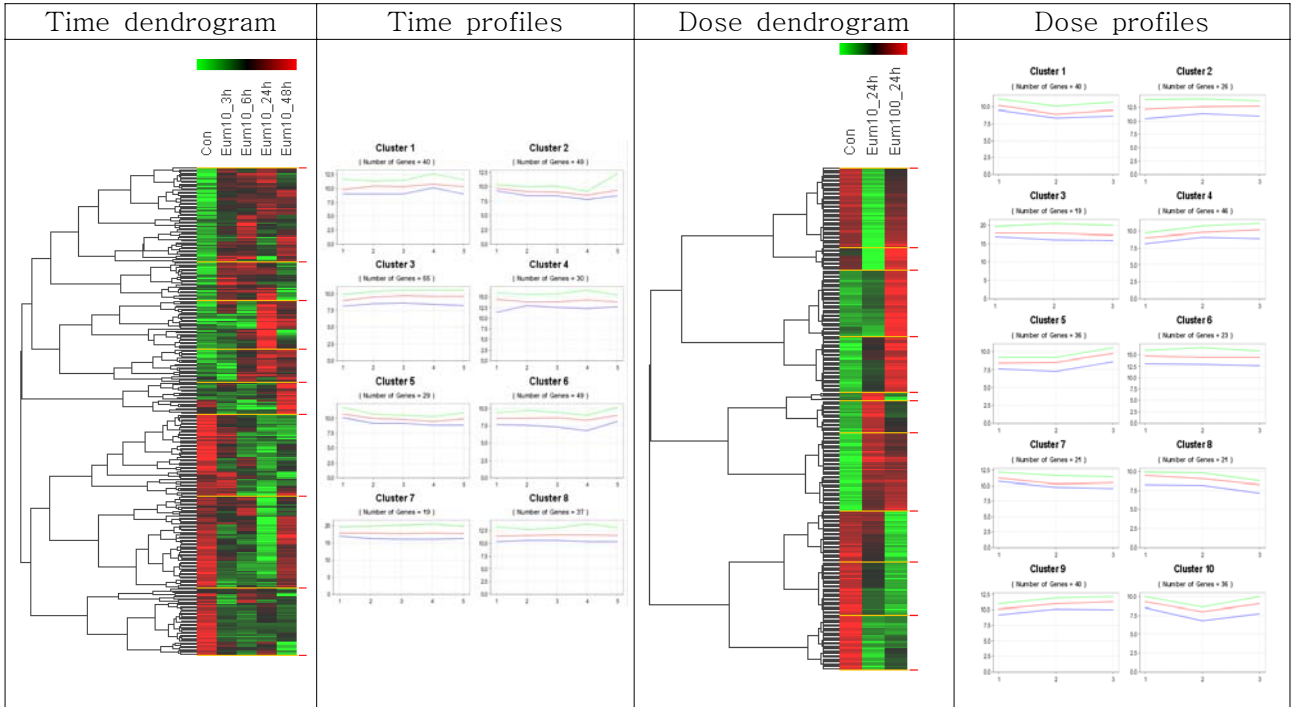
Table 9. Gene numbers satisfied the conditions; $0.5 < \text{expression changes} > 2$ and $P < 0.05$ from Volcano plots which were compared control to experimental groups.

	Exp Name	Gene Number				
		Up	Down	Common	Total	Annotation
Eum_Ext	Eum10_3h	52	64			
	Eum10_6h	92	127			
	Eum10_24h	61	95	1	757	98
	Eum10_48h	119	107			
	Eum100_24h	103	67			
Icariin	Icariin1_3h	32	129			
	Icariin1_6h	92	83			
	Icariin1_24h	136	130	0	1004	981
	Icariin1_48h	237	190			
	Icariin20_24h	71	36			
Epimedin B	EpiB1_3h	396	104			
	EpiB1_6h	70	67			
	EpiB1_24h	163	154	3	1373	1345
	EpiB1_48h	312	292			
	EpiB20_24h	61	99			
Hyperoside	Hyp10_3h	16	59			
	Hyp10_6h	15	55			
	Hyp10_24h	41	41	0	598	585
	Hyp10_48h	76	88			
	Hyp50_24h	217	90			

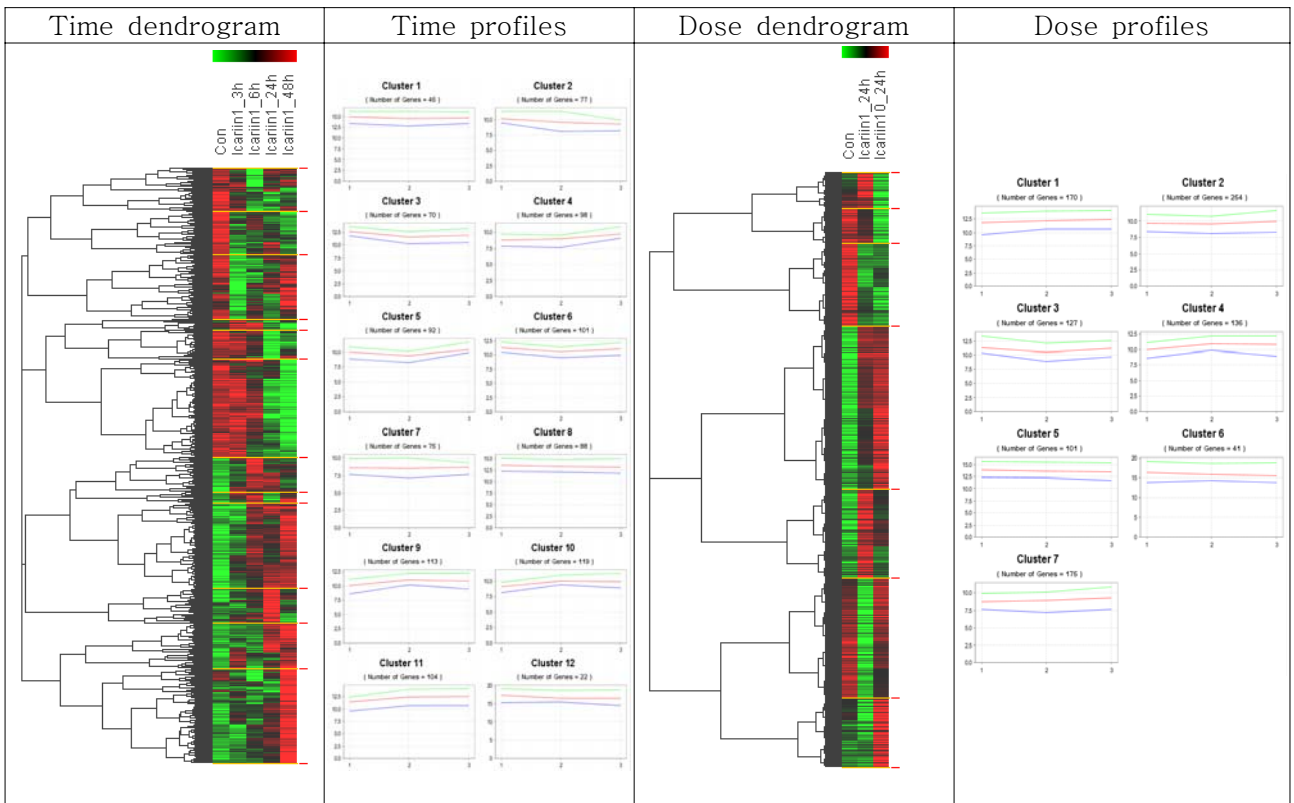
- 각 물질들의 처리에 의하여 얻어진 각각의 유의 유전자들을 처리시간과 처리 농도에 따라 나누어 합하여 처리 물질의 그룹별로 유전자 발현 변화를 관찰하였다 (Figure 34).
- 음양곽의 EtOH 추출물의 경우 처리시간 및 처리용량에 따른 유의 유전자의 합은 757개로 Figure 34-a 에서와 같이 7개의 cluster로 나누었을 때 3시간부터 유전자발현이 증가한 후 24시간에는 발현이 감소되는 유전자수가 가장 많았으며, 그 다음은 3시간부터 유전자 발현이 유도되기 시작하여 48시간 동안 지속적으로 증가되는 유전자수가 그 뒤를 이었다. 처리농도에 따른 유전자 변화는 농도 의존적으로 증가하는 유전자 수가 가장 많았으며, 그 뒤로 저농도에서는 유전자 발현이 감소하고 고농도에서 증가하는 것이 다음으로 많았다.
- Icariin의 경우에는 처리시간 및 처리용량에 따른 발현 변화를 유의 유전자 1004개로 관찰하였다. 처리시간에 따른 유전자는 3시간부터 지속적으로 증가되는 유전자 수가 가장 많았으며, 다음에는 48시간동안 계속 감소되는 발현 양상을 나타내는 유전자 수가 그 다음을 이뤘다. 처리용량에 따른 발현 변화는 Figure 34-b에서와 같이 1uM에서 발현이 증가하지 않다가 20uM에서 20uM 으로 발현이 증가하는 유전자 수가 가장 많았다.
- Epimedin B는 유의 유전자 1373개로 처리시간 및 처리용량에 따른 발현 변화를 관찰하였다. 유전자 발현 양상을 처리시간 및 처리 용량에 따라 각각 10종으로 나누었을 때 Figure 34-c와 같았다. Epimedin B는 유의유전자 숫자가 다른 물질들 보다 많았으며, 특히 처리시간에 따른 유의 유전자는 1302종 이었으나 농도에 따른 유의 유전자는 421종 이었다.

Figure 34. Cluster analysis of time- and dose-dependent expression data in LNCaP cells treated with 70% ethanol extract of *Epimedii herba*, icariin, epimedin B and hyperoside.

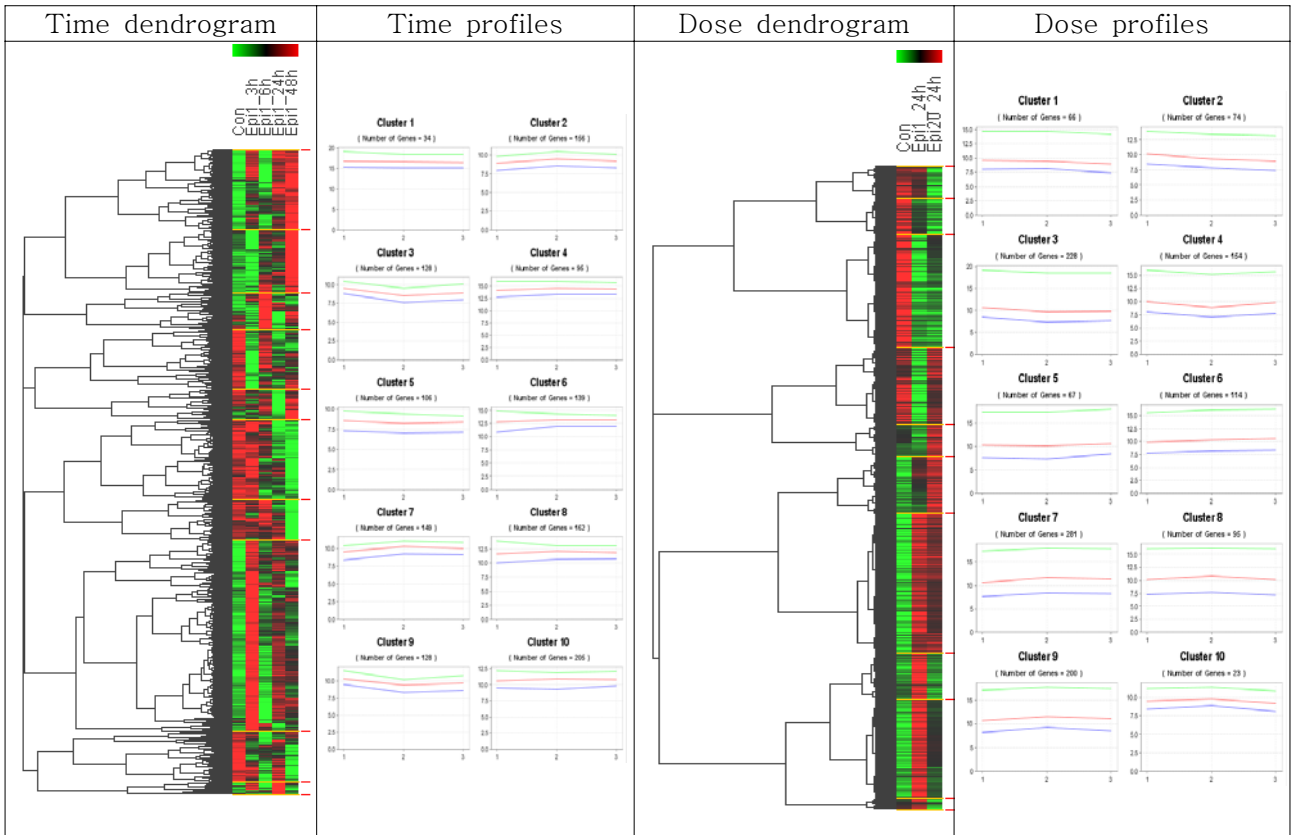
a. 70% ethanol extract of *Epimedii herba*



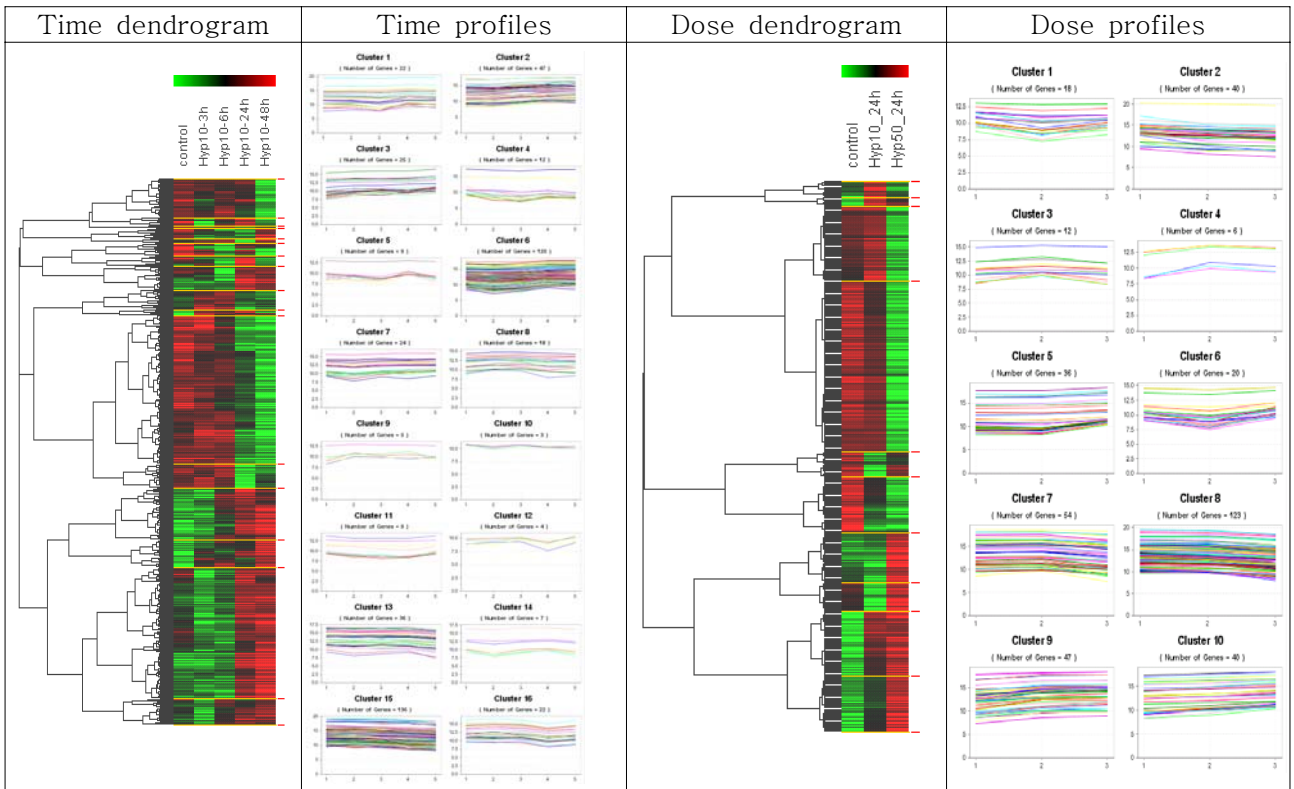
b. Icariin



c. Epimedin B



d. Hyperoside



- Hyperoside는 유전자 발현변화를 유의 유전자 598개로 관찰하였을 때 Figure 34-d와 같이 처리시간 및 처리용량에 따라 각각 16 가지와 8가지로 발현 양상으로 나누었다. 발현양상이 초기에는 감소하였다가 시간이 지날수록 증가하는 양상을 나타내는 유전자가 가장 많았고, 그 다음에는 초기에는 증가하였다가 시간이 지날수록 감소하는 양상을 나타내는 유전자가 많았다.
- Volcano plot에서 선별된 유전자 총 757에 대한 음양극 추출물에 대한 biological pathway을 관찰하였을 때 12.9%에 해당하는 98개의 유전자만이 유전자 기능이 알려진 것으로 그 중에서 상위 11종의 biological signal pathway는 Table 10과 같았다.

Table 10. Major biological pathways of significant genes selected from Volcano plot of Epimedium herba, icariin, epimedium B and hyperoside.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

KEGG Pathway	Gene Counts
Wnt signaling pathway	8
T cell receptor signaling pathway	7
Insulin signaling pathway	7
GnRH signaling pathway	7
Purine metabolism	6
Neuroactive ligand-receptor interaction	6
MAPK signaling pathway	6
Gap junction	6
Focal adhesion	6
Calcium signaling pathway	6
Adherens junction	6

b. Icariin

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	15
Wnt signaling pathway	11
Regulation of actin cytoskeleton	10
Insulin signaling pathway	10
Cell cycle	10
Axon guidance	10
Purine metabolism	9
Calcium signaling pathway	8
Pyrimidine metabolism	7
Natural killer cell mediated cytotoxicity	7
Gap junction	7
Cytokine-cytokine receptor interaction	7

c. Epimedin B

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	19
Regulation of actin cytoskeleton	16
Focal adhesion	13
Cell Communication	12
Calcium signaling pathway	12
Neuroactive ligand-receptor interaction	11
Glycan structures - biosynthesis 1	11
Cytokine-cytokine receptor interaction	10
Insulin signaling pathway	9
GnRH signaling pathway	8
Gap junction	8
Cell cycle	8

d. Hyperoside

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	12
Starch and sucrose metabolism	9
Androgen and estrogen metabolism	8
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6
Tight junction	5
Regulation of actin cytoskeleton	5
Porphyrin and chlorophyll metabolism	5
Pentose and glucuronate interconversions	5
Oxidative phosphorylation	5
Insulin signaling pathway	5
Wnt signaling pathway	4

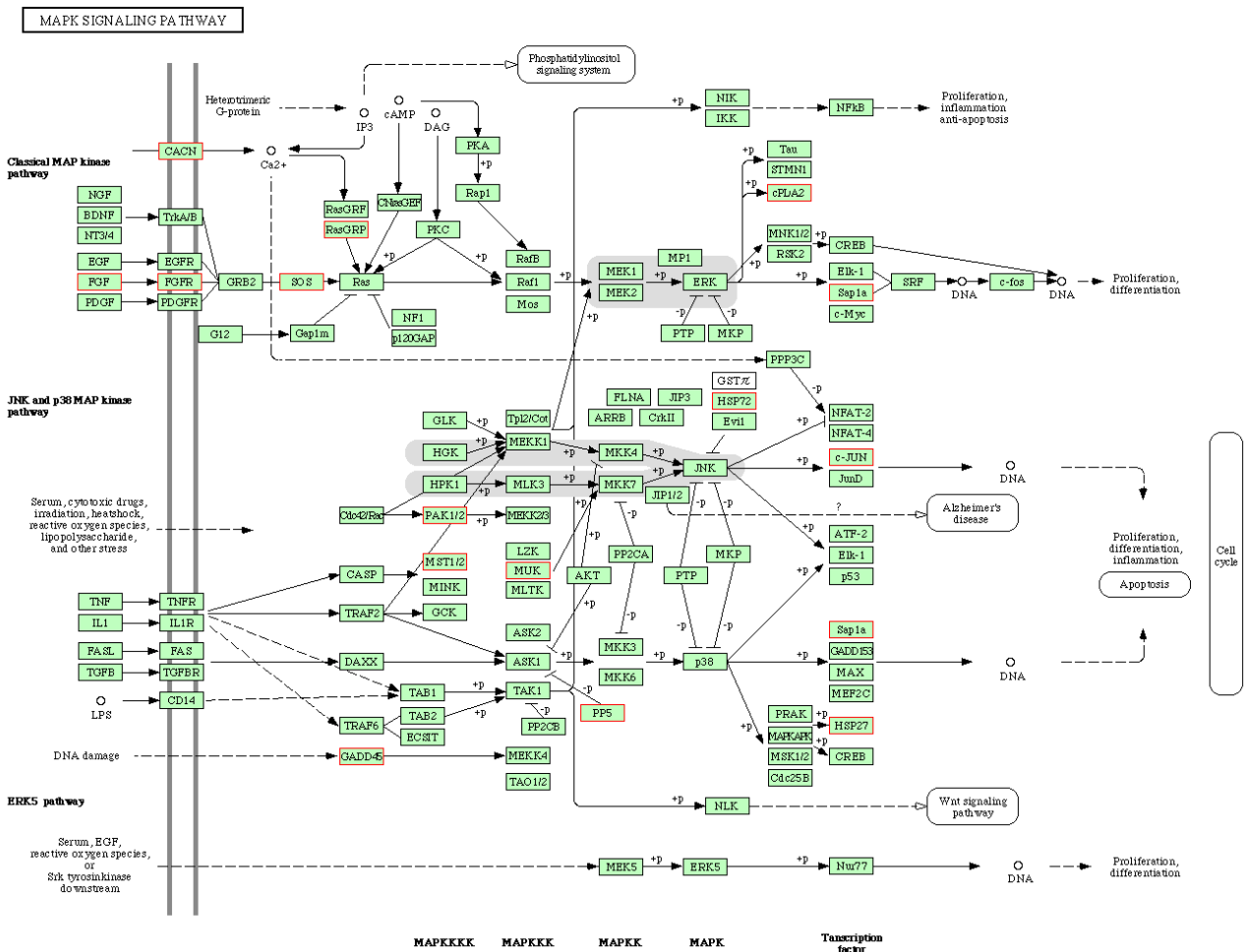


Figure 35. Significant genes selected by treating the 70% extract of Epimedium herba in MAPK signal pathway

- 음양곽 추출물에 의하여 유전자 발현변화가 가장 많이 있는 것은 암전이와 관련된 Wnt 경로이며, T cell receptor signaling pathway, Insulin signaling pathway, GnRH signaling pathway 등이 그 뒤를 이었다.
- 음양곽 70% EtOH 추출물의 주 성분인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 의하여 발현이 변화된 유전자의 기능 중 공통적으로 MAPK signaling pathway가 가장 크게 변화되었다. 그러나 음양곽 추출물에 의하여 변화된 유전자 기능에서 MAPK signal pathway (Figure 35)에 관련된 유전자 수는 대표적 구성 성분에 의한 것 보다는 숫자가 작았다.
- 음양곽 추출물 및 그 주성분에 의한 성기능 관련 유전자들의 변화는 본 실험디자인에서는 관찰할 수가 없었으며, 특히 음양곽 추출물과 icariin에 의한 PDE5에 의한 NO 증가에 의한 성기능 향상에 관련된 pathway는 나타나지 않았으나, hyperoside에 의하여 estrogen과 androgen metabolism에 관여하는 유전자의 발현과 음양곽 추출물에서 GnRH 경로에 관여하는 유전자들의 발현이 변화되었다.
- DNA microarray 실험결과 음양곽 추출물에서 가장 많은 유전자에 영향을 미칠 수 있는 biological pathway는 Wnt pathway로 8종의 단백질이 이에 영향을 미치고 있으며, icariin이나 epimedin B 역시 각각 11종과 6종의 단백질이 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Table 11). 이들을 비교하였을 때 음양곽 추출물에 의하여는 Wnt 경로 중 DVL2와 PRKY와 발현이 증가되고 NFAT5, FZD9, PLCB3,

Table 11. Effect of Epimedium herba extract, icariin and epimedin B on the Wnt pathway in LNCaP cells.

Probe ID	Gene Symbol	Con	Eum10_3h	Eum10_6h	Eum10_24h	Eum10_48h	Eum100_24h
111052	DVL2	1.16	4.02	3.12	3.07	3.10	3.94
126969	NFAT5	1.29	0.49	0.45	0.49	0.47	0.46
145949	NFAT5	1.10	1.12	0.41	0.70	1.13	0.78
148434	FZD9	1.02	0.64	0.49	0.87	0.90	1.01
175969	PLCB3	1.11	0.97	1.34	1.27	0.49	0.96
181860	PRKY	1.04	4.02	3.12	3.07	3.10	3.94
196110	CSNK1E	1.05	0.73	0.54	0.82	0.42	0.48
212217	NFATC1	1.06	0.77	0.49	0.73	0.84	0.47

Probe ID	Gene Symbol	Con	Icariin1_3h	Icariin1_6h	Icariin1_24h	Icariin1_48h	Icariin10_24h
126969	NFAT5	0.82	0.27	0.62	0.60	0.52	0.85
145919	MMP7	1.58	2.52	2.54	3.87	2.94	2.05
145949	NFAT5	0.90	0.54	0.62	0.75	0.58	0.65
164611	WNT7A	1.21	1.58	2.45	2.43	2.27	2.28
181860	PRKY	0.95	0.69	0.59	0.50	0.79	0.83
196110	CSNK1E	0.96	0.53	0.40	0.54	0.76	0.26
200152	CAMK2B	0.91	0.61	0.28	0.47	0.62	0.37
201970	DKK2	1.44	0.33	0.82	0.63	1.39	3.11
212217	NFATC1	0.98	0.70	0.78	1.36	1.13	0.34
212244	PRKCG	1.27	2.29	2.34	1.41	2.18	3.72
227829	CAMK2B	0.95	0.58	0.41	0.46	0.57	0.28

Probe ID	Gene Symbol	Con	Epi1_3h	Epi1_6h	Epi1_24h	Epi1_48h	Epi20_24h
118274	FZD3	1.05	2.56	1.62	2.63	2.43	2.17
123273	JUN	1.69	0.49	0.89	0.21	0.75	0.55
139494	WNT5A	1.09	2.22	1.80	3.23	2.04	1.56
164611	WNT7A	1.15	2.30	1.17	1.63	1.96	1.57
165348	VANGL2	1.02	2.60	0.97	1.62	2.47	1.08
175969	PLCB3	1.11	0.45	1.34	0.64	1.07	0.86

CSNK1E, NFATC1 등은 발현이 감소되어 총체적으로 발현이 증가되는 것 보다는 발현 감소가 더욱 우세하였다. 반면에 icariin의 경우에는 MMP7, Wnt7A, 및 PRKCG의 발현량이 증가하였으며, epimedin B의 경우에는 JUN 및 PLCB3 만이 감소되었고 FZD3, WNT5A, WNT7A, VANGL2는 증가하였다. NEAT5는 icariin과 음양곽 추출물에서 발현이 크게 감소하였고, NFATC1 역시 두 종의 약물에서 감소되었다. 그러나 음양곽 추출물이나 icariin 과는 달리 epimedin B의 경우 Wnt pathway가 더욱 활성화될 것으로 예상되었다. 이러한 결과는 음양곽의 주성분인 icariin이 Wnt 경로에 영향을 미쳐서 음양곽 추출물 역시 Wnt 경로에 영향을 미칠 것으로 사료되었으며, icariin과 epimedin B는 모핵은 prenylflavonoid로 같으나 붙어있는 당이 1개가 차이가 있는 물질로 in vitro 실험에서는 당 부분 역시 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

◦DNA microarray 실험결과로부터 음양곽 70% EtOH 추출물과 주성분인 icariin, epimedin B 및

hyperoside에 의하여 발현이 변화된 약리 효능 유전자들을 선정하기 위하여 각 물질 군 중에서 처리 농도별 유의 유전자를 중심으로 하여 Welch's T-test에서 $P < 0.05$ 이고, $0.5 < \text{fold induction} > 2$ 인 유전자를 선정하여 그 중에서 유전자명이 있는 유전자를 약리효능 선정하였다 (Table 11).

◦ 음양곽 70% EtOH 추출물 처리군은 42개의 유의 유전자가 선정되었으나 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 24개이었으며 (Table 12-a), 이들 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.

Table 12. Pharmacological active genes selected from the groups of Epimedium herba, icariin, epimedium B and hyperoside.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

ID	10_3h	10_6h	10_24h	10_48h	100_24h	Gene_Name
187003	0.46	0.73	0.60	0.51	0.27	type I hair keratin KA35
152190	0.62	0.59	0.65	0.33	0.36	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12
197857	0.78	0.75	0.85	0.43	0.45	acid-inducible phosphoprotein; cisplatin resistance-associated overexpressed protein
107304	0.82	1.10	0.89	0.37	0.48	chromosome 18 open reading frame 24
204547	0.50	0.53	0.72	0.51	0.49	chromosome 22 open reading frame 8
141522	0.70	0.53	0.64	0.41	0.49	hypothetical protein LOC51252
160171	1.76	2.00	1.55	2.20	2.09	hypothetical protein FLJ20534
192781	1.57	1.61	1.26	1.92	2.11	suppressor of cytokine signaling 6
156541	1.52	0.73	0.76	0.78	2.15	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 14
138964	1.06	1.18	2.40	1.62	2.16	phosphoglycerate kinase 1
127002	1.70	1.61	0.96	2.88	2.16	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
132554	0.96	1.34	2.07	1.93	2.18	insulin induced gene 2
141890	1.18	0.96	0.82	1.44	2.19	WAP four-disulfide core domain 8
109165	0.94	1.05	1.87	1.41	2.24	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
169650	1.65	1.47	0.94	1.33	2.34	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1
125119	2.47	2.70	2.34	3.65	2.80	RALBP1 associated Eps domain containing 2
199871	1.03	0.63	1.55	2.52	3.13	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1
131512	1.83	1.91	1.67	2.11	3.35	hypothetical protein MGC10744
218420	1.33	0.84	0.86	1.07	3.38	hypothetical protein MGC26989
176082	0.69	0.77	4.27	1.98	3.56	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2
178866	1.21	0.57	0.43	1.08	3.74	leucine rich repeat containing 19
105946	1.12	1.18	2.18	1.33	4.82	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A
227204	1.88	1.09	1.08	1.32	5.08	hypothetical protein LOC90768
109421	0.96	1.36	7.71	3.38	5.44	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12

b. Icariin

ID	1_3h	1_6h	1_24h	1_48h	10_24h	Gene_Name
120417	1.56	1.19	1.01	1.32	0.29	hypothetical protein FLJ23825
151336	0.92	0.98	0.31	0.19	0.49	Fanconi anemia, complementation group D2
122793	0.57	1.17	2.39	1.73	0.82	hypothetical protein DKFZp434G0625
112997	1.45	0.94	0.46	0.43	1.13	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
208509	0.52	0.46	0.45	0.35	1.57	aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T);nicotin 1
177096	0.87	1.51	2.18	4.09	1.70	hypothetical protein MGC26989
117336	0.89	0.54	0.50	0.96	1.85	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1
212750	1.07	0.65	0.78	0.80	2.02	hypothetical protein FLJ90231
217622	0.64	0.57	0.62	0.59	2.19	mannan-binding lectin serine protease 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)
705413	1.76	0.75	1.69	0.95	3.46	FLJ35767 protein
168970	1.34	0.70	0.45	0.59	3.85	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N
120350	1.70	0.56	1.52	2.18	4.07	zinc finger protein 537
231889	0.83	0.96	1.06	0.86	4.09	calcium channel, voltage-dependent, alpha 11 subunit
135605	0.84	0.91	1.16	0.75	4.98	tweety homolog 1 (Drosophila)
124914	1.35	1.50	1.05	1.48	5.65	laminin, beta 4

c. Epimedin B

ID	1_3h	1_6h	1_24h	1_48h	20_24h	Gene_Name
174706	0.11	1.01	0.22	0.18	0.19	sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) A
158378	0.81	0.54	0.30	0.20	0.35	transmembrane, prostate androgen induced RNA
130316	0.28	0.61	0.31	0.37	0.45	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6
135086	0.52	6.43	0.32	0.49	0.16	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
113737	0.35	0.43	0.38	0.39	0.36	tribbles homolog 3 (Drosophila)
201259	0.62	0.74	0.41	0.28	0.54	progastricsin (pepsinogen C)
169853	0.52	0.65	0.42	0.35	0.42	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)
117183	0.47	0.47	0.43	0.29	0.38	FK506 binding protein 5
162911	0.38	0.85	0.44	0.37	0.28	thrombospondin 1
115926	0.45	0.80	0.47	0.45	0.46	24-dehydrocholesterol reductase
213519	2.94	1.81	2.65	2.69	2.06	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
118274	2.51	1.56	2.76	2.37	2.06	frizzled homolog 3 (Drosophila)
114422	3.04	1.54	2.76	2.75	2.00	collectin sub-family member 12
183458	2.10	1.04	2.77	3.10	1.82	mannosidase, endo-alpha
111748	1.37	1.70	2.82	4.00	3.33	protease, serine, 11 (IGF binding)
216999	2.74	0.92	2.93	3.47	1.42	chromosome 20 open reading frame 100
147316	1.33	0.77	3.10	3.06	1.51	POU domain, class 2, transcription factor 3
203726	3.63	1.36	3.20	2.29	1.63	poly(A) binding protein, cytoplasmic 5
101592	2.23	1.92	3.37	3.95	1.82	ARP10 protein
167316	4.62	1.12	3.44	4.52	2.18	matrilin 2
125526	3.14	0.88	3.61	2.85	1.24	tripartite motif-containing 2
151904	2.55	0.69	4.05	7.73	2.91	ceramide kinase
116915	3.63	1.41	4.35	3.91	2.94	leucine rich repeat neuronal 1
108283	0.86	0.79	4.64	3.32	0.92	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
123436	3.76	1.00	4.81	3.65	2.03	BMX non-receptor tyrosine kinase
140953	4.28	0.90	5.43	9.71	3.81	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
154434	6.23	2.97	6.12	5.10	3.50	amphoterin induced gene 2
122174	7.00	4.20	9.29	9.18	5.67	cerebellin 2 precursor

d. Hyperoside

Probe ID	Hyp10_3h	Hyp10_6h	Hyp10_24h	Hyp10_48h	Gene _Name
204743	0.15	0.12	0.12	0.11	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
101377	0.61	0.46	0.27	0.21	cell death-inducing DFFA-like effector b
169853	0.65	0.52	0.28	0.22	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)
173876	1.03	0.89	0.36	0.33	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2
194271	0.84	0.62	0.38	0.46	transmembrane protease, serine 2
117183	1.15	0.81	0.42	0.29	FK506 binding protein 5
169984	0.78	0.74	0.44	0.38	selenoprotein P, plasma, 1
702618	0.78	0.69	0.46	0.26	FLJ44715 gene product
114304	1.46	1.37	2.01	2.32	homeobox C13
168773	1.07	1.16	2.12	2.24	homeobox C9
188051	1.18	1.17	2.29	2.65	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
122174	1.24	2.11	2.35	2.14	cerebellin 2 precursor
116915	0.88	0.94	2.36	2.82	leucine rich repeat neuronal 1
171247	0.50	0.77	2.39	3.11	tetraspanin 7
167743	1.15	1.16	2.43	2.96	chromosome 20 open reading frame 102
116423	1.49	1.52	2.61	3.41	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 3
182844	1.03	1.46	3.01	3.97	golgi phosphoprotein 3-like
111620	1.16	1.98	3.29	4.36	deiodinase, iodothyronine, type I
209603	1.09	1.01	3.45	5.77	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
140953	0.81	0.87	3.71	5.89	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
192802	1.17	0.74	3.99	6.62	hypothetical protein DKFZp566J091

◦Icariin 처리군의 경우에는 유의 유전자 수가 35개로 다른 그룹에 비하여 적게 선정되었으며, 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 15개이었으나 (Table 12-b), 이들 역시 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.

◦Epimedin B 처리군의 경우에는 유의 유전자수가 53개 이었으며, 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 28개이었으며 (Table 12-c), 이들 역시 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.

◦Hyperoside 처리군의 경우에는 유의유전자 선정을 음양곽 추출물이나 icariin 및 epimedin B와 달리 처리시간에 따른 유전자 발현을 중심으로 하였다. Hyperoside 10uM로 24시간과 48시간동안 처리하였을 때 Welch's T-test에서 $P < 0.05$ 이고, $0.5 < \text{fold induction} > 2$ 인 유전자들을 중 공통적인 유의 유전자를 선정하였다. 선정된 유의 유전자 중 유전자명이 있으며, 그 signal 값이 전체적으로 2⁸개 이상인 것을 유전자를 약리효능 유전자로 선정하였다. 선정된 유의 유전자는 총 27개로 그 중 24개가 gene name이 있었으나 그 중 3개가 signal 값이 너무 작아 탈락되어 Table 12-d와 같이 21개의 유전자를 약리효능 유전자로 선정하였다.

다. DNA microarray 결과 검증

◦ 음양곽 및 그 추출물질 3종에 대해 선정했던 약리효능 유전자를 cyber green dye를 사용하여 realtime PCR을 실시하여 검증하였다. Realtime PCR의 경우 그 PCR product가 DNA microarray의 oligo probe 주변을 중심으로 100-200bp를 갖어야 결과가 잘 도출되므로, PCR primer를 짜는 것도 한계가 있었다. 아울러 유전자 copy 수가 적은 경우에는 fold change가 큰 것도 잘 나타나지 않은 한계를 나타내었다.

- 음양곽 70% EtOH 추출물과 주성분인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 대한 약리효능 유전자에 대한 realtime PCR의 결과는 Table 11에 나타내었다.
- 음양곽 70% EtOH 추출물에 대한 biomarker gene을 검증하기 위하여 primer를 만들기가 힘든 4개의 유전자를 제외한 20종의 primer들을 사용하여 각각의 대응 유전자에 대하여 검증을 하였다. Table 13-a와 같이 20 종 중 13 종이 어느 정도 microchip data와 realtime PCR의 결과와 일치하여 약 65% 정도가 검증되었다.
- Icariin의 biomarker gene 검증은 15개의 유의 유전자 중에서 primer 제작이 힘든 4개를 제외한 11개의 유전자로 realtime PCR을 이용하여 실시하였다. 그 중에서 5개는 DNA microarray 결과와 일치하지 않았으며 약 55%에 해당하는 6개만이 검증되었다(Table 13-b).
- Epimedin B의 경우 28종의 유의 유전자 중 23종을 검증하였으며, 그 중 48%에 해당하는 11개 유전자만이 검증되었다 (Table 13-c).
- Hyperoside의 경우 21종의 유의 유전자 중 19종을 검증하였으며, 그 중 약 73.7%에 해당하는 14종이 검증되었다 (Table 13-d).

Table 13. Validation of selected biomarker genes using real time PCR with cyber green dye.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

ID	Gene_Name	DNA chip		Realtime PCR		Result
		Eum10	Eum100	Eum10	Eum100	
187003	KA35	0.60	0.27	0.50	0.75	O
152190	SLC6A12	0.65	0.36	2.38	3.69	X
197857	CROP	0.85	0.45	0.43	0.68	O
107304	C18orf24	0.89	0.48	0.60	0.43	O
141522	LOC51252	0.64	0.49	1.12	2.30	X
160171	C4orf27	1.55	2.09	0.91	1.25	X
192781	SOCS6	1.26	2.11	4.15	2.32	O
156541	ADAMTS14	0.76	2.15	0.87	2.46	O
138964	PGK1	2.40	2.16	2.77	3.70	O
127002	STK17B	0.96	2.16	0.99	1.32	X
132554	INSIG2	2.07	2.18	0.95	0.69	X
109165	BNIP3	1.87	2.24	2.00	1.38	O
169650	SLC15A1	0.94	2.34	2.18	2.40	O
125119	REPS2	2.34	2.80	3.72	1.60	O
199871	CYP39A1	1.55	3.13	0.85	0.97	X
131512	TMEM107	1.67	3.35	1.69	1.71	O
176082	PLOD2	4.27	3.56	3.77	3.22	O
178866	LRRC19	0.43	3.74	1.65	2.26	X
105946	HTR5A	2.18	4.82	1.28	2.43	O
227204	MGC45800	1.08	5.08	2.13	2.29	O
109421	AKAP12	7.71	5.44	4.99	8.35	O

b. Icarin

ID	Gene_Name	DNA chip		Realtime PCR		Results
		icariin1	icariin10	icariin1	icariin10	
151336	FANCD2	0.31	0.49	0.89	0.74	O
122793	PLXNA4A	2.39	0.82	0.02	0.03	X
112997	CDKN2C	0.46	1.13	2.44	2.07	X
208509	AMT	0.45	1.57	1.19	0.74	X
212750	FLJ90231	0.78	2.02	2.63	1.65	X
217622	MASP1	0.62	2.19	0.91	1.21	O
705413	FLJ35767	1.69	3.46	3.29	4.45	O
168970	PTPRN	0.45	3.85	5.80	6.40	X
120350	ZNF537	1.52	4.07	1.67	1.98	O
231889	CACNA1I	1.06	4.09	9.87	10.29	O
135605	TTYH1	1.16	4.98	15.78	17.40	O

c. Epimedin B

ID	Gene_Symbol	DNA chip		Realtime PCR		Results
		EpiB1	EpiB20	EpiB1	EpiB20	
174706	ST6GALNAC1	0.22	0.19	0.08	0.12	O
158378	TMEPAI	0.30	0.35	0.81	0.64	O
130316	SLC16A6	0.31	0.45	1.59	1.79	X
135086	CYP1A1	0.32	0.16	0.37	0.45	O
201259	PGC	0.41	0.54	0.42	0.35	O
169853	NKX3-1	0.42	0.42	1.02	0.76	X
117183	FKBP5	0.43	0.38	1.06	1.00	X
162911	THBS1	0.44	0.28	1.11	0.69	X
115926	DHCR24	0.47	0.46	30.17	19.70	X
213519	SLC12A2	2.65	2.06	0.67	0.79	X
118274	FZD3	2.76	2.06	4.64	5.16	O
111748	HTRA1	2.82	3.33	1.52	2.21	O
216999	C20orf100	2.93	1.42	3.39	2.66	O
147316	POU2F3	3.10	1.51	0.36	0.59	X
203726	PABPC5	3.20	1.63	1.91	1.86	O
101592	RP4-742C19.3	3.37	1.82	4.99	4.65	O
167316	MATN2	3.44	2.18	0.60	0.95	X
116915	LRRN1	4.35	2.94	4.22	3.24	O
108283	ROR2	4.64	0.92	0.69	0.88	X
123436	BMX	4.81	2.03	1.73	2.08	O
140953	DDC	5.43	3.81	1.36	1.68	X
154434	AMIGO2	6.12	3.50	1.73	1.36	X
122174	CBLN2	9.29	5.67	1.43	1.69	X

D. Hyperoside

Probe ID	Gene Symbol	Fold induction				Result
		DNA Chip		Real-Time PCR		
		hyp10	hyp50	hyp10	hyp50	
204743	ID1	0.118	0.154	0.053	0.123	O
101377	CIDEB	0.270	0.351	0.731	0.999	O
169853	NKX3-1	0.284	0.190	0.544	0.918	O
173876	MBOAT2	0.355	0.303	0.687	1.569	X
194271	TMPRSS2	0.383	0.253	0.372	0.383	O
117183	FKBP5	0.419	0.303	0.420	0.425	O
169984	SEPP1	0.442	0.356	1.291	1.390	X
702618	FLJ44715	0.461	0.400			
114304	HOXC13	2.008	1.173	1.568	2.226	-
168773	HOXC9	2.118	3.272	1.257	2.273	-
188051	CDH3	2.289	1.209	1.331	2.082	-
122174	CBLN2	2.353	1.733	5.182	6.471	O
116915	LRRN1	2.361	2.033	2.730	3.488	O
171247	TSPAN7	2.390	3.247	3.410	1.487	O
167743	C20orf102	2.428	2.049	4.148	5.303	O
116423	GARNL3	2.609	3.620	2.051	1.890	O
182844	GOLPH3L	3.010	4.539	3.372	5.041	O
111620	DIO1	3.290	1.394	5.683	5.150	O
209603	CAMK2N1	3.455	5.995	4.298	3.614	O
140953	DDC	3.706	6.076			
192802	LBH	3.989	2.550	5.527	2.530	O

3.2 천궁의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구

가. 천궁 추출

(1) 70% Ethanol extract

(가) 성분 대량 추출용

- 70% Ethanol ext.를 약 785g 얻었다(yield 31.4%). 이 중 150g(50g×3개)을 한약재과학화 사업단, 제1세부과제 분석팀 및 제2세부과제 BT팀에 제공하였다.

(나) 비교 분석용

- 비교 분석용의 70% ethanol ext.는 20-40g의 시료를 추출하여 3.96-11.65g을 얻었으며, 이들 70% ethanol ext.를 각 1 g씩 분석팀에 제공하였다.

(2) 분획 추출

- Hexane ext., ether ext. 및 chloroform ext.의 hexane-MeOH-H₂O(20:10:2) 분획물 중 상층(hexane 층)은 액체(267 g)로서 triglyceride가 주가 되는 분획(CRH)이었다. 하층(methanol 층)은 비극성 물질 중에서도 극성이 높은 물질을 함유하는 분획(CRC, 액체, 100 g)으로 천궁의 정유 성분이 주로 함유되어 있는 분획이었다. 이어서 ethyl acetate ext.(CRE, 14 g), butanol ext.(CRB, 59 g), 물 ext.(CRW, 350 g)을 얻었다. 전체적으로 볼 때 CRH 분획과 CRW 분획이 대부분을 차지하고 있는데 이 두 분획은 triglyceride 및 당류가 주로 되는 1차대사산물에 해당되는 분획이고 2차대사산물로서는 CRC 분획에 집중되는 것을 알았다.

나. 물질 분리

가. Fr. CRH 분획의 물질 분리

- Compd. 9: TLC co-spotting 소견으로 볼 때 β -sitosterol로 추정되며 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 β -sitosterol임을 확인하였다(Figure 36).

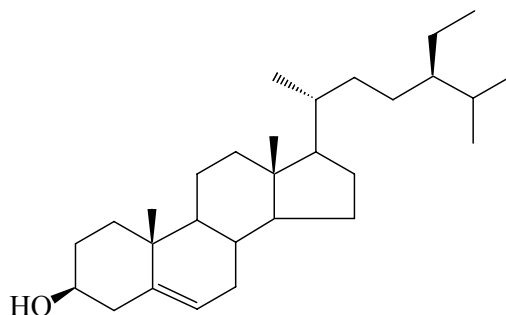


Figure 36. β -Sitosterol의 구조

나. CRC 분석의 물질 분리

- Compd. 1: 황산에 의하여 보라색으로 발색되는 것으로 보아 terpenoid 계열의 물질로 추정됨. 분자량 추정을 위하여 ESI-MS를 측정하였으나 분자량 peak를 얻을 수 없었음은 물론이고 정확한 계열 pattern도 얻을 수 없었으므로 연구 기간 내에 구조 분석이 곤란할 것으로 생각되어 다른 물질의 분리에 힘을 쓰기로 하였다.
- Compd. 2: 이 화합물은 *Z*-ligustilide와 거의 같은 R_f치를 보이나 형광은 없고 UV 흡수가 강한 것으로 보아 같은 계열의 화합물로 추정되며 UV 흡수 pattern으로 보아 benzene환이 있는 것으로 예상되며 H-8의 2중결합의 proton의 존재로 보아 butylienephthalide로 추정된다. MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 butyldenephthalide임을 확인하였다(Figure 37).

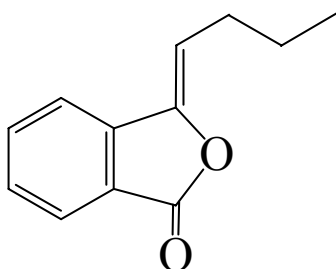


Figure 37. Butyldenephthalide의 구조

- Compd. 3: 이 화합물은 UV 366nm에서 강한 청색 형광을 나타내며 UV에서 320nm의 흡수 극대를 보이는 것으로 보아 천궁, 당귀 등의 정유 성분으로 존재하는 butyl phthalide 계열을 화합물로 추정되어 mass, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 *Z*-ligustilide임을 확인하였다(Figure 38).

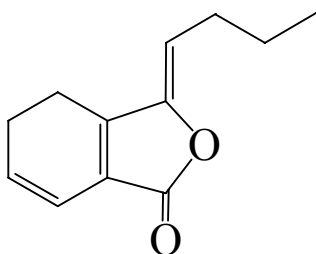


Figure 38. *Z*-Ligustilide의 구조

- Compd. 4: Compd. 3과 마찬가지로 UV 366nm에서 약한 청색의 형광을 나타내며 UV에서 225nm에서 흡수 극대를 보이는 것으로 보아 Compd. 3과는 cyclohexane 고리의 구조가 다른 butyl phthalide일 것을 추정되며 mass, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 neocnidilide임을 확인하였다(Figure 39).

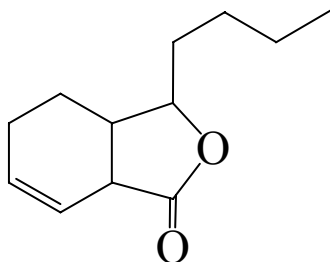


Figure 39. Neocnidilide의 구조

Compd. 5: 천궁의 70% EtOH ext.의 HPLC에서 가장 강한 peak를 나타내는 화합물로 UV 366nm에서 형광을 나타내지 않으며 UV 254nm에서 UV의 강한 흡수를 보인다. UV 225nm의 흡수 극대를 보이는 것으로 보아 Compd. 4와 유사한 골격 구조를 가지는 것으로 추정되며 mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 senkyunolide A임을 확인하였다(Figure 40).

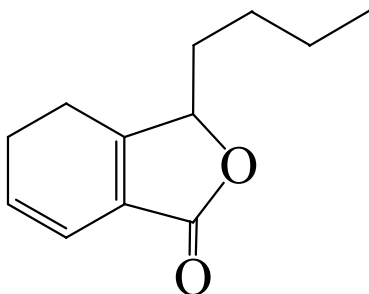


Figure 40. Senkyunolide A의 구조

Compd. 10: $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 탄소의 개수가 24개로 butylphthalide의 2배로 dimer로 예측되었다. LC-ESI-MSdata를 search한 결과 butylphthalide dimer의 하나인 levistolide A로 추정되었다. 이 물질의 UV, MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 을 문헌치와 비교한 결과 정확히 일치하였다(Figure 41).

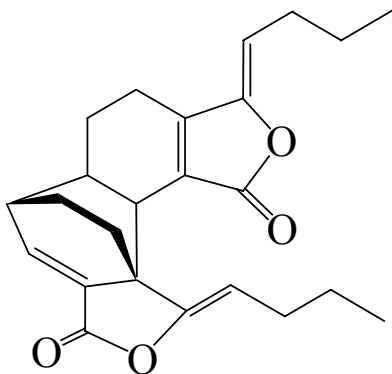


Figure 41. Levistolide A의 구조

Compd. 11: LB test 양성(오록색) 및 TLC co-spotting 소견으로 볼 때 pregnenolon으로 추정되며 Mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 pregnenolon임을 확인하였다 (Figure 42).

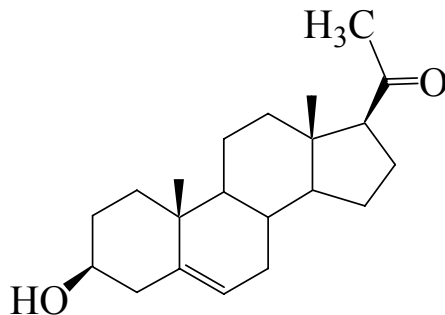


Figure 42. Pregnenolon의 구조

다. CRE 분획의 물질 분리

Compd. 6: Mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 ferulic acid임을 확인하였다 (Figure 43).

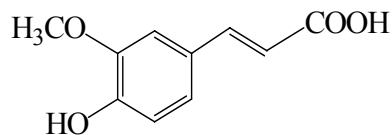


Figure 43. Ferulic acid의 구조

Compd. 7: Mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 chlorogenic acid임을 확인하였다 (Figure 44).

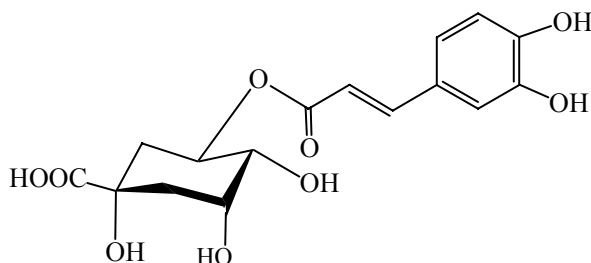


Figure 44. Chlorogenic acid의 구조

라. CRE 분획의 물질 분리

Compd. 8: LB test 양성(violet) 및 TLC co-spotting의 결과 oleanolic acid로 추정되며 Mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 oleanolic acid임을 확인하였다 (Figure 45).

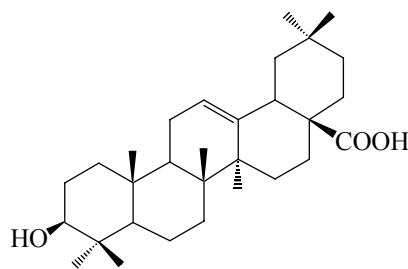


Figure 45. Oleanolic acid의 구조

◦ 현재까지 천궁에서 분리한 단일 물질들에 대한 정보는 Table 14와 15에 요약하였다.

Table 14. Name of purified compounds from *Cnidii Rhizoma*

No. (Compd. No.)	Name	synonym	IUPAC name
1 (2)	<i>Z</i> -Butylidenephthalide	3-Butylidenephthalide	3-Butylidene-1(3 <i>H</i>)-isobenzofuranone, 9CI
2 (3)	<i>Z</i> -Ligustilide		3-Butylidene-4,5-dihydro-1(3 <i>H</i>)-isobenzofuranone, 9CI. 3-Butylidene-4,5-dihydrophthalide, 8CI
3 (4)	Neocnidilide	Sedanolid	3-Butyl-3a,4,5,6-tetrahydro-1(3 <i>H</i>)-isobenzofuranone, 9CI
4 (5)	SenkyunolideA	Sedanenolide Senkyunolide	3-Butyl-4,5-dihydro-1(3 <i>H</i>)-isobenzofuranone 3-Butyl-4,5-dihydrophthalide
5 (6)	Ferulic acid	3-Methoxy-4-hydroxycinnamic acid Caffeic acid 3-methyl ether	3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid
6 (7)	Chlorogenic acid	3-Caffeoylquinic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinic acid	[1 <i>S</i> -(1 <i>α</i> ,3 <i>β</i> ,4 <i>α</i> ,5 <i>α</i>)]-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexane carboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)
7 (8)	Oleanolic acid	Oleanol Caryophyllin	(3 <i>β</i>)-3-Hydroxyolean-12-en-28-oic acid
8 (9)	β -Sitosterol	22:23-Dihydrostigmasteryl α -Dihydrofucosterol	(3 <i>β</i>)-Stigmast-5-en-3-ol
9 (10)	Levistolide A	<i>Z</i> -Levistolide	1 <i>H</i> -5,10c-Ethanophtho[1,2- <i>c</i> :7,8- <i>c'</i>]difuran-3,10-dione, 1,8-dibutylidene-5,5a,6,7,8,10b-hexahydro, (1 <i>Z</i> ,5 <i>S</i> ,5 <i>aS</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>bS</i> ,10 <i>cS</i>)-(9CI)
10 (11)	Pregnenolone	Δ^5 -Pregnen-3 <i>β</i> -ol-20-one	(3 <i>β</i>)-3-Hydroxypregn-5-en-20-one

Table 15. Purified compounds from Cnidii Rhizoma

No. (Compd. No.)	Name	M.W.	Amount (mg)	Purity(%)	제출량 (mg)
1 (2)	<i>Z</i> -Butylidenephthalide	188	60	>95	20
2 (3)	<i>Z</i> -Ligustilide	190	1200	>99	500
3 (4)	Neocnidilide	194	41	>98	20
4 (5)	SenkyunolideA	192	3100	>95	1,000
5 (6)	Ferulic acid	194	60	>93	100
6 (7)	Chlorogenic acid	354	199	>98	100
7 (8)	Oleanolic acid	456	50	>97	200
8 (9)	β -Sitosterol	414	40	>95	200
9 (10)	Levistolide A	380	14	>93	100
10 (11)	Pregnenolone	316	100	>98	30

다. LC/MS/MS를 이용한 천궁 유효성분의 분석법 개발

- 천궁의 70% 에탄올 추출물 시료에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide (Figure 44)의 4개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하기 위하여 LC/MS/MS의 multi reaction monitoring (MRM) mode를 이용하여 분석법을 연구하였다.
- Positive ion mode에서 분석하였을 때 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin(I.S.)은 m/z 355, 195, 193, 191, 781에서 각각 protonated된 molecular ion peak를 나타내었으며 MS/MS 분석을 수행한 결과, 각각 m/z 163, 177, 91, 91에서 major fragment peak을 보였다 (Figure 47).
- 이러한 MS/MS 분석 데이터를 바탕으로 MRM을 위한 precursor, product ion pair를 설정하고 LC/MS/MS 분석을 수행한 결과 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin(I.S.)는 각각 2.41, 2.60, 4.55, 5.19, 2.57 분경에 검출되었으며 모든 분석물질에 대해 양호한 peak shape와 intensity를 보였다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다 (Figure 48).
- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 chlorogenic acid의 경우, 0.05-2 µg/mL, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 0.1-2 µg/mL, ferulic acid의 경우 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다 (Figure 49).

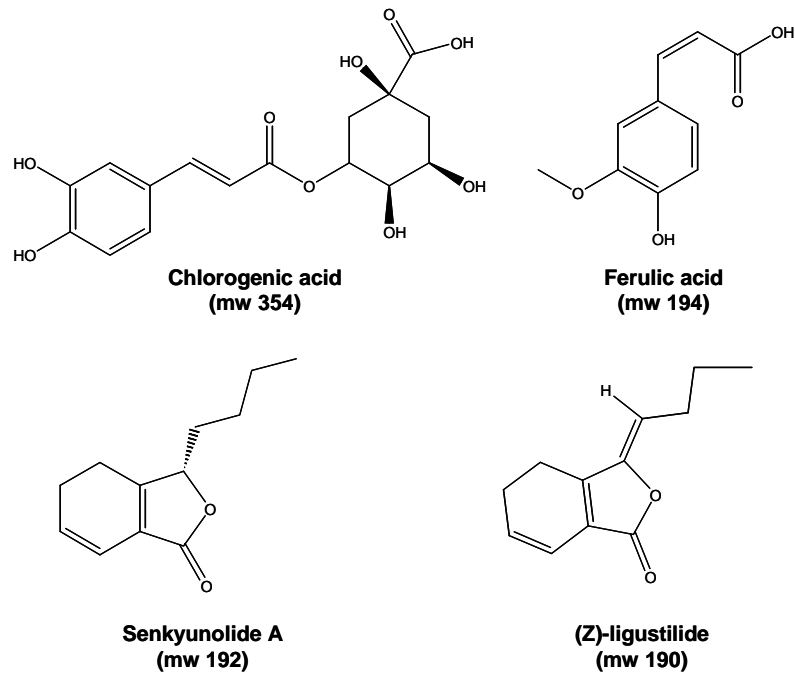


Figure 44. Chemical structures of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide from *C. officinale* extract.

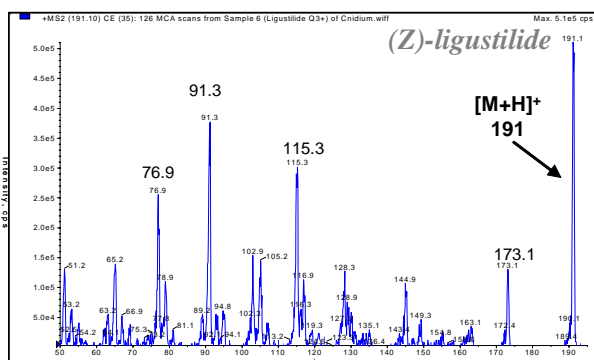
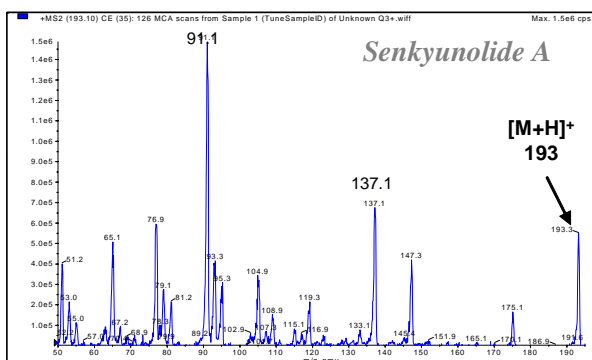
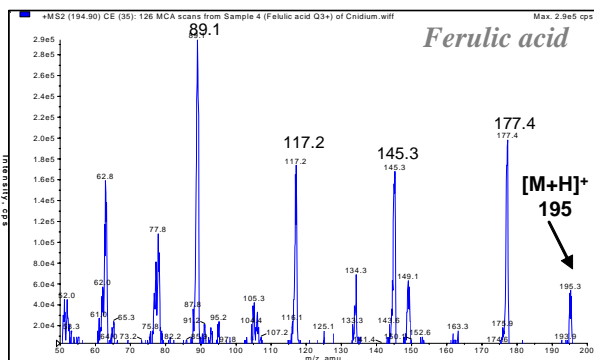
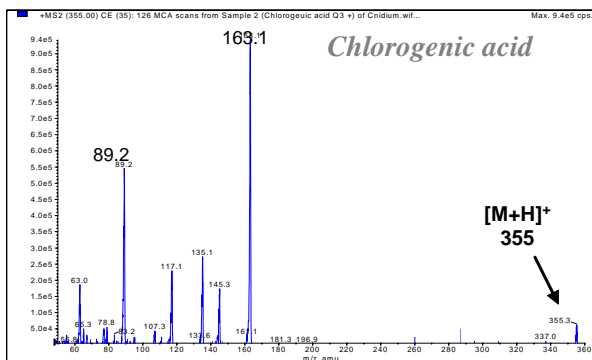


Figure 47. MS/MS spectrum of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide

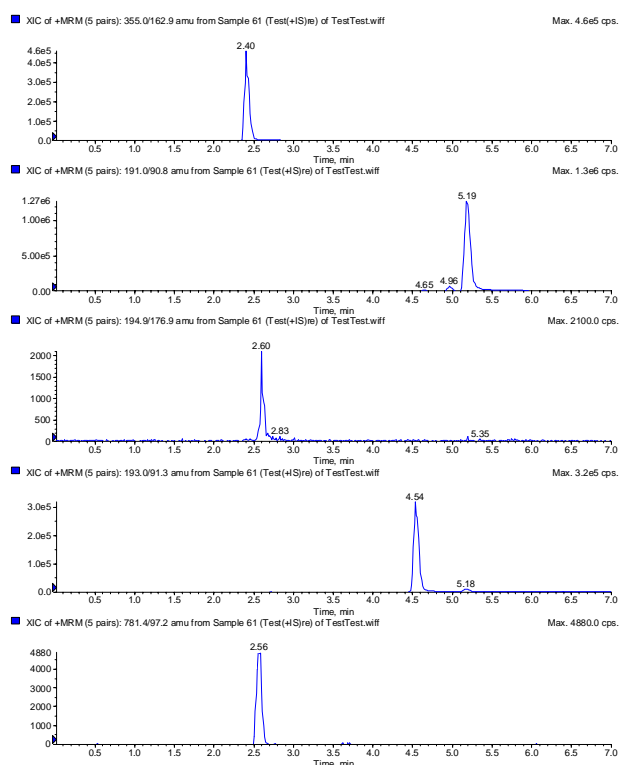
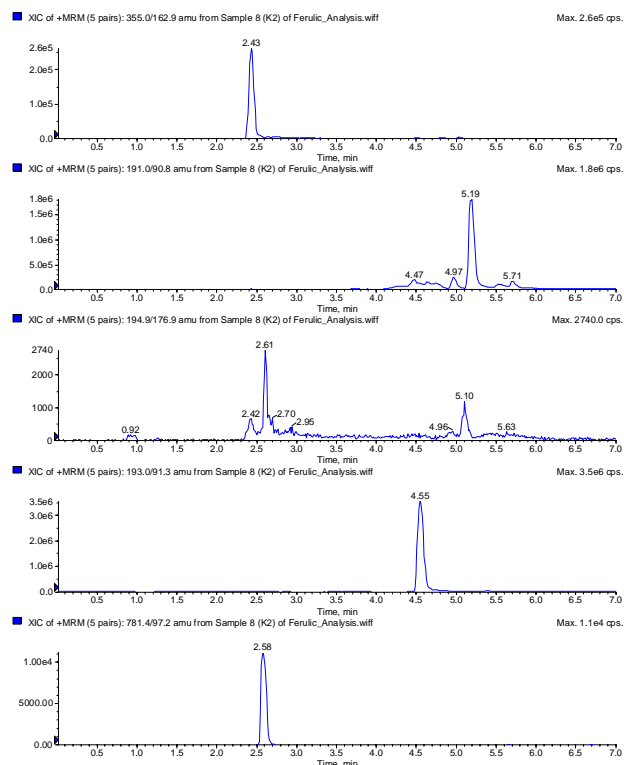


Figure 48. Extracted ion chromatograms (EIC) of standard mixture and *C. officinale* extract

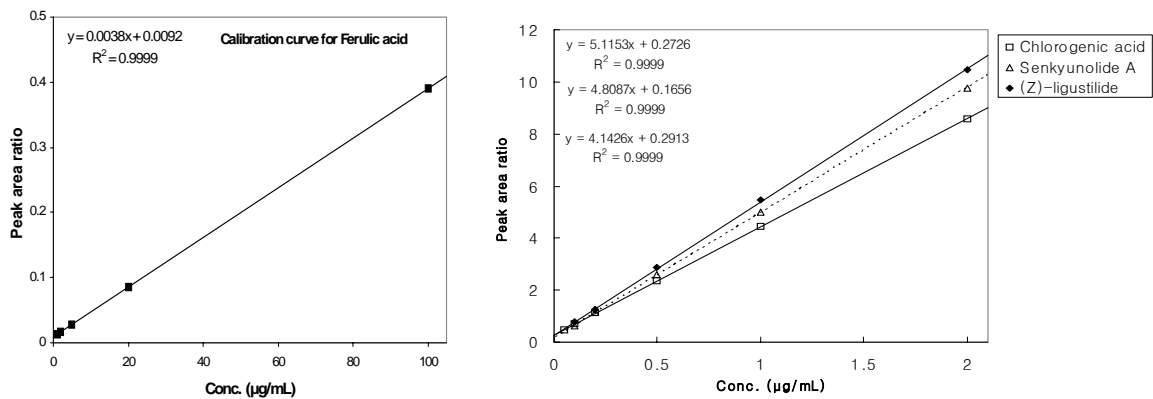


Figure 49. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide에 대한 검량선 (Calibration curves for Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide)

라. HPLC/UV를 이용한 천궁 유효성분의 분석법 개발 및 validation

의약품 또는 천연물 분석시 보편적으로 사용되고 있는 HPLC/UV를 이용하여 천궁 추출물 시료에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하였다. 4개의 화합물에 대하여 대체적으로 UV 흡수가 크게 나타나는 파장인 280 nm을 검출 파장으로 설정하여 분석한 결과, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, α -naphthoflavone(I.S.)은 각각 약 5.1, 6.5, 10.5, 11.7, 14.4분에서 검출되었으며, 각 peak 분리정도와 peak shape는 양호하였다 (Figure 50).

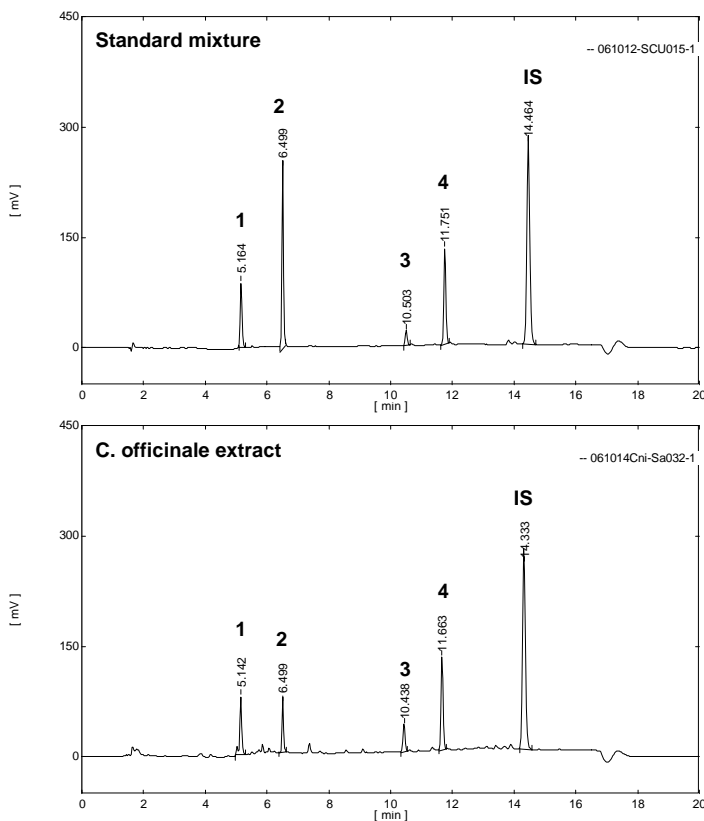


Figure 50. UV chromatograms for standard mixture and extract sample of *Cnidium officinale*. 1: chlorogenic acid, 2: ferulic acid, 3: senkyunolide A, 4: (Z)-liqustilide, IS: α -naphthoflavone.

- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과, 표준액의 농도 2-100 µg/mL의 범위에서 상관계수 (r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다 (Figure 51). 세 농도(2, 20, 100 µg/mL)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였다. 일내 정확성은 이론치 대비 95.88-103.5%, %RSD는 0.19-3.33%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 95.12-104.9%, %RSD는 0.46-4.38%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.
- 본 분석법의 완건성(Robustness)를 검토하고자 50 µg/mL의 QC시료에 대하여 컬럼의 종류(Atlantis C₁₈, Capcellpak C₁₈), 컬럼 오븐 온도 (30, 35, 40°C), 이동상 중 acetic acid의 농도 (0.05, 0.1, 0.2%)를 변화시켜 분석하였다. 컬럼 오븐 온도를 30, 35, 40°C로 변화시켰을 때 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 peak 면적, retention time에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 분리 효율에 있어서 chlorogenic acid의 경우 30°C나 40°C에서는 peak가 broad해지고 이론단수가 현저하게 감소하여 본 분석 조건에 설정된 온도는 35°C가 최적의 조건임을 알 수 있었다. 다른 세 가지 물질의 경우는 분석 효율에 있어 큰 차이를 보이지 않았다.
- 컬럼의 종류를 Atlantis C₁₈에서 Capcellpak C₁₈로 바꾸어 분석하였을 때는 네 화합물의 측정값에는 큰 차이를 보이지 않았으나 Atlantis C₁₈로 분석할 때 보다 더 빨리 elution되고 peak 너비가 넓어졌으며 이론단수가 크게 감소하였다.
- 이동상에 포함된 acetic acid 농도를 0.05, 0.1, 0.2%로 변화시켜 실험하였을 때는 대체적으로 측정값이나 컬럼 효율에 있어서 큰 차이를 보이지 않았으나 phthalide 계열 물질인 senkyunolide A나 ligustilide의 경우 산의 농도가 0.2%일 때 이론단수가 더 증가하여 산성 조건에서 더 분리가 잘 됨을 알 수 있었다.
- 모든 데이터를 종합하였을 때 컬럼 오븐 온도, 컬럼 종류, 산 농도의 변화에 따라 분리능은 약간의 영향을 받았으나, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 정량에는 큰 영향을 주지 않았다.

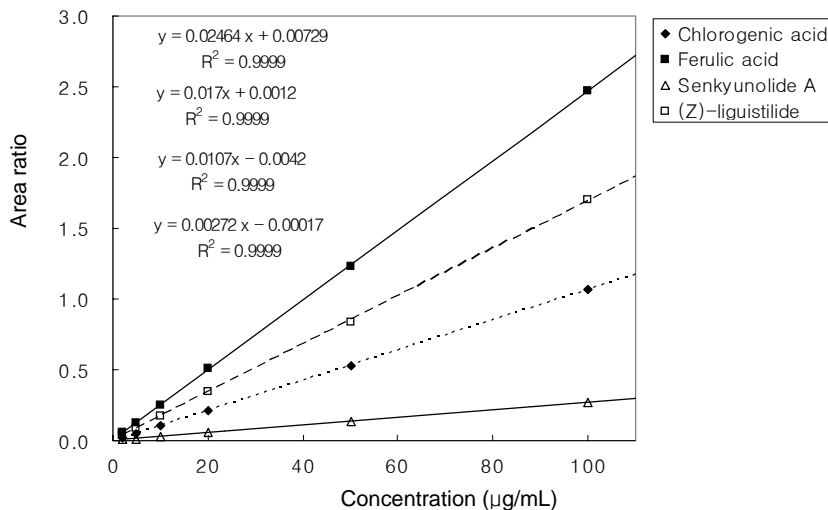


Figure 51. Calibration curves for chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide based on HPLC/UV method

마. 천궁 추출물 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량 분석

- 위와 같이 개발된 LC/MS/MS와 HPLC/UV를 이용한 동시분석법에 의하여 각각 산지가 다른 15종 (한국산 10종, 중국산 5종)의 천궁 추출물 시료에 대하여 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량을 분석하였다. LC/MS/MS법을 이용하여 분석한 결과는 Table 15, 16과 같 으며, HPLC/UV를 이용한 결과는 Table 17, 18과 같다. 천궁 시료의 분석에 쓰인 senkyunolide A 표준품의 경우 순도가 약 77%이었으므로, 이를 참조하여 보정한 후 senkyunolide A의 함량을 계산하 였다.
- HPLC/UV 결과를 바탕으로 분석 결과를 살펴보면, chlorogenic acid의 함량은 0.21~2.70%, ferulic acid는 0.15~0.45%, senkyunolide A는 1.78%~5.16%, (Z)-ligustilide는 0.50~2.72%로 각각의 함량은 천 궁 시료에 따라 조금씩 차이를 보였으나, 이 네 가지의 성분에 대해서는 중국산 천궁과 한국산 천궁, 또는 일천궁과 토천궁 사이에 대체로 유사한 함량 분포를 나타내었다.
- LC/MS/MS로 분석한 결과와 HPLC/UV로 분석한 결과는 약간의 차이는 있으나 대체적으로 유사한 결과를 보여 두 가지 분석법 모두 천궁의 품질 관리를 위한 유효 성분 분석에 적합할 것으로 사료된 다.

Table 15. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* extract based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Relative percentage of extract (%)_LC/MS/MS			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	2.12	0.40	1.96	2.48
C2	0.11	0.33	3.74	2.14
C3	0.17	0.39	3.02	2.66
C4	0.17	0.35	3.58	2.86
C5	1.43	0.36	3.36	2.72
K1	0.40	0.36	1.27	1.31
K2	0.67	0.71	3.26	1.30
K3	0.67	0.23	2.10	0.56
K4	1.11	0.53	2.58	1.28
K5	0.17	0.49	2.16	1.61
K6	0.29	0.36	2.84	1.26
K7	0.67	0.19	1.37	0.94
K8	0.83	0.34	1.49	0.82
K9	0.51	0.49	3.74	1.37
K10	0.57	0.26	1.35	0.99

Table 16. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* plant based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Content in plant (mg/g plant)_LC/MS/MS			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	4.20	0.79	3.88	4.91
C2	0.38	1.13	12.72	7.28
C3	0.54	1.27	9.82	8.65
C4	0.66	1.40	14.21	11.35
C5	3.64	0.93	8.55	6.92
K1	1.11	0.99	3.53	3.63
K2	1.45	1.53	7.06	2.82
K3	1.96	0.67	6.16	1.65
K4	2.41	1.15	5.62	2.79
K5	0.42	1.23	5.41	4.04
K6	0.84	1.04	8.27	3.68
K7	2.35	0.66	4.78	3.30
K8	2.60	1.06	4.71	2.57
K9	1.76	1.69	12.90	4.73
K10	1.98	0.91	4.70	3.45

바. HPLC/UV/MS를 이용한 천궁 추출물의 chemical profiling

- 천궁 추출물 성분의 chemical fingerprinting 방법의 확립을 위하여 HPLC/UV/MS를 이용하여 chemical profiling을 하였다. 270 nm에서 UV 흡수를 검출하고 동시에 mass detector를 이용하여 각 피크에 대한 m/z 값을 확인하였다.
- 천궁 추출물의 대표적인 UV chromatogram과 TIC를 Figure 52, 53에 나타내었으며 각 크로마토그램 상에 나타나는 peak에 대하여 retention time, m/z 값, UV 흡수 강도와 해당 m/z에 대하여 extraction하였을 때 나타나는 mass intensity 등을 정리하였다 (Table 17, 18).
- UV 크로마토그램과 TIC 상에 나타나는 peak의 패턴은 약간 차이가 있었으나 천궁의 주요한 유효 성분으로 여겨지는 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide 등의 peak은 UV 크로마토그램과 TIC에서 모두 확인할 수 있었다. 화합물 중에서는 UV 흡수가 없거나 미미한 경우가 있고 한편, LC/MS와 같이 soft ionization 조건에서 잘 이온화되지 않아 LC/MS 상에서는 잘 검출되지 않는 경우가 존재하므로, 한약재의 chemical profiling을 위하여 UV과 MS 데이터 서로 보완하여 사용하는 것이 유용할 것으로 사료된다.

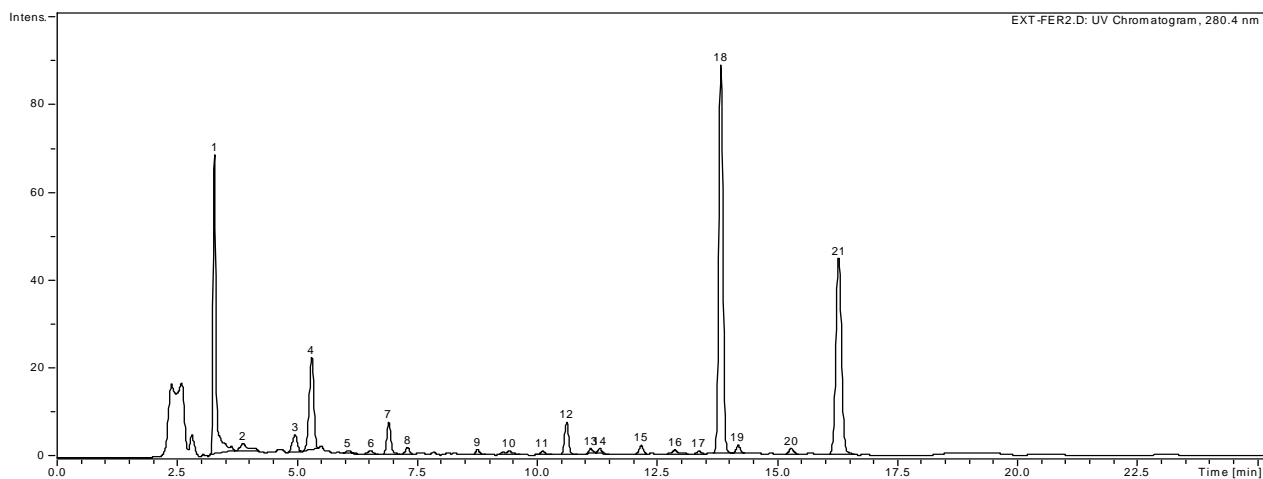


Figure 52. UV chromatogram of *Cnidium officinale* extract

Table 17. Compound profiling of *Cnidium officinale* extract based on UV chromatogram

Peak no.	RT (min)	m/z	Peak area	% Relative	Remark
1	3.3	355	291	18.9	Chlorogenic acid
2	3.9	369	13	0.8	
3	4.9	-	31	2.0	
4	5.3	195	141	9.1	Ferulic acid
5	6.1	211	6	0.4	
6	6.5	-	6	0.4	
7	6.9	207	41	2.7	
8	7.3	-	8	0.5	
9	8.7	-	5	0.3	
10	9.4	177	12	0.8	
11	10.1	-	7	0.5	
12	10.6	-	41	2.7	
13	11.1	-	6	0.4	
14	11.3	-	6	0.4	
15	12.1	439	11	0.7	
16	12.9	149	7	0.5	
17	13.4	-	4	0.3	
18	13.8	193	523	33.9	Senkyunolide A
19	14.2	304	10	0.6	
20	15.3	195	9	0.6	
21	16.3	191	365	23.7	(Z)-ligustilide

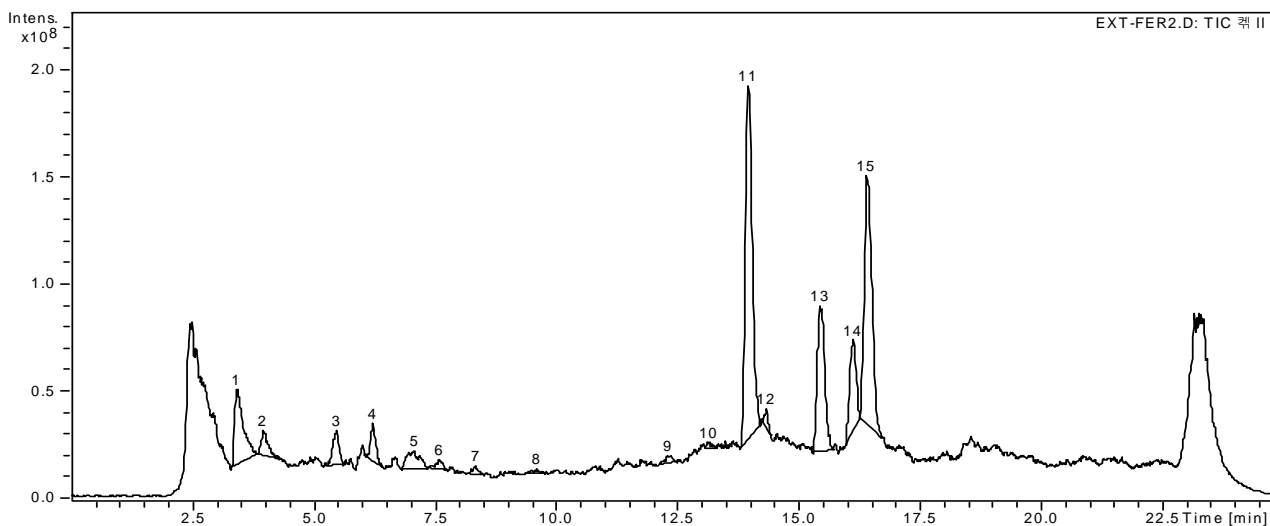


Figure 53. Total ion chromatogram (TIC) of *Cnidium officinale* extract

Table 18. Compound profiling of *Cnidium officinale* extract based on TIC

Peak no.	RT (min)	m/z	Peak area	% Relative	Remark
1	3.4	355	429622298	8.5	Chlorogenic acid
2	3.9	369	109879664	2.2	
3	5.4	195	141582453	2.8	Ferulic acid
4	6.2	211	124098987	2.4	
5	7.1	207	154490955	3.0	
6	7.6	313	41011741	0.8	
7	8.3	432	29824390	0.6	
8	9.6	177	18211291	0.4	
9	12.3	439	31946324	0.6	
10	13.1	149	19348949	0.4	
11	13.9	193	1597931613	31.5	Senkyunolide A
12	14.3	304	41275257	0.8	
13	15.4	195	701823761	13.8	Neocnidilide
14	16.1	217	389534835	7.7	
15	16.4	191	1250168460	24.6	(Z)-ligustilide

사. 천궁의 품질 관리를 위한 패턴 인식 분석법의 적용

- 천궁에 포함되어 있는 전체 성분에 대한 정보를 반영한 품질 관리법을 확립하기 위하여, 천궁 추출물 시료를 HPLC/UV와 LC/MS로 분석한 뒤 얻어진 UV 크로마토그램과 TIC에 대하여 패턴 인식 분석을 수행하였다. 패턴 인식 분석법으로서 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하고, 패턴 분석 결과를 수치화하기 위하여 각 시료 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다 (Figure 54, 55, Table 19).
- 먼저, HPLC/UV로 15종의 천궁 시료를 분석한 후 얻은 UV 크로마토그램 상에서 공통적으로 검출되어지는 10개의 peak를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였으며, 다음으로 15종의 천궁 추출물 시료의 total mass data를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였다.
- Figure 52의 PC score plot을 보면, 중국산 시료와 한국산 시료 사이에 분리된 cluster가 형성됨을 알 수 있다. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 네 가지 성분에 대한 분석 결과에서는 한국산과 중국산 천궁 시료사이에 큰 함량 차이를 보이지 않았으나 패턴 인식 분석 수행 시 한국산과 중국산 시료 간에는 확연한 차이를 나타내었으며, 0.6이하의 SI 값을 보였다. 이는 한국산과 중국산 천궁이 전체적인 성분 프로파일에서는 뚜렷한 차이가 있음을 시사한다. 한편 토천궁 (K2~K4, K6~K10)과 일천궁 (K1, K5) 사이에는 큰 차이를 나타내지 않아 현재 국내에서는 토천궁과 일천궁의 학명이 혼용되어 사용되고 있음을 시사했다. 중국산 천궁의 경우 중국 약전품으로 알려진 C2, C3, C4의 각 point는 PC score plot에서 매우 근접하게 위치하였으며 이들 시료는 0.89~0.96의 높은 SI값을 가져 이들 시료간의 유사성이 매우 높음을 알 수 있었다.
- UV data를 이용한 주성분 분석 결과와 total mass data를 사용한 주성분 분석 결과를 비교할 때 약간의 차이는 있었으나, 비슷한 양상을 띠고 있었으며, 두 경우 모두 한국산 천궁과 중국산 천궁 시료는 확연히 구분되었다.

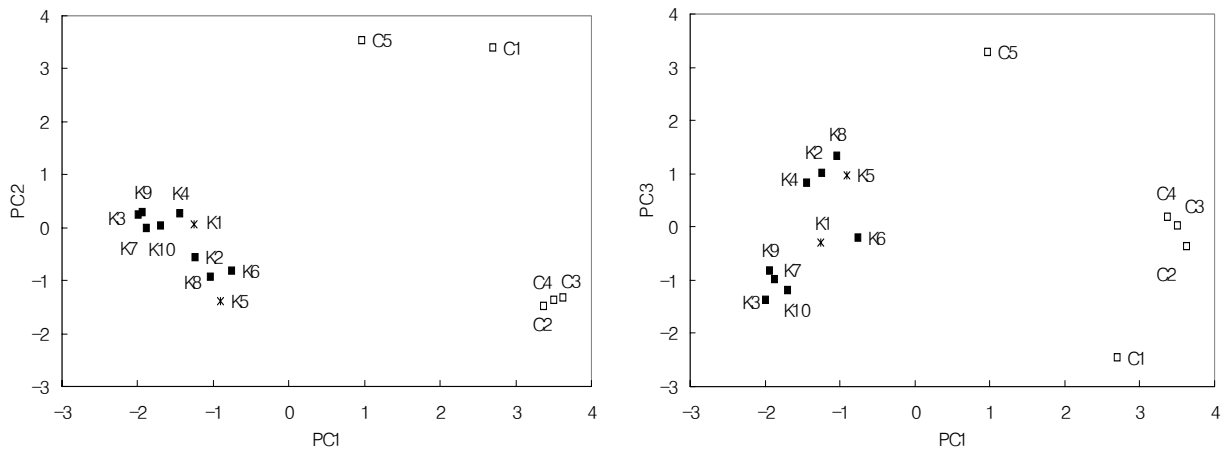


Figure 54. PC score plots for UV data of *Cnidium officinale* extract

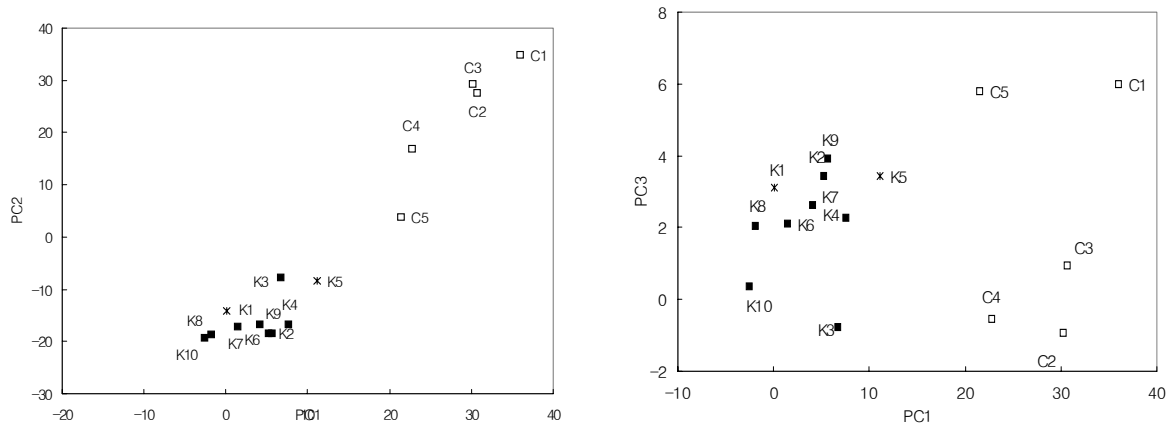


Figure 55. PC score plots for total mass data of *Cnidium officinale* extract

Table 19. Similarity index for *Cnidium officinale* extract

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	C1	C2	C3	C4	C5
K1	1.000	0.841	0.628	0.804	0.803	0.718	0.805	0.826	0.747	0.759	0.605	0.596	0.561	0.573	0.574
K2		1.000	0.713	0.918	0.831	0.787	0.806	0.940	0.794	0.787	0.598	0.630	0.595	0.612	0.645
K3			1.000	0.680	0.610	0.658	0.811	0.687	0.818	0.823	0.543	0.416	0.397	0.402	0.456
K4				1.000	0.786	0.753	0.766	0.868	0.803	0.743	0.667	0.593	0.568	0.575	0.691
K5					1.000	0.750	0.704	0.832	0.665	0.650	0.520	0.683	0.667	0.679	0.608
K6						1.000	0.733	0.800	0.694	0.680	0.690	0.704	0.672	0.682	0.553
K7							1.000	0.794	0.918	0.928	0.589	0.476	0.454	0.460	0.494
K8								1.000	0.752	0.740	0.571	0.648	0.596	0.613	0.642
K9									1.000	0.930	0.615	0.454	0.434	0.440	0.525
K10										1.000	0.591	0.457	0.436	0.442	0.479
C1											1.000	0.669	0.642	0.637	0.603
C2												1.000	0.891	0.921	0.647
C3													1.000	0.962	0.711
C4														1.000	0.696
C5															1.000

<바이오칩팅>

- 천궁은 혈관확장, 진정, 진통, 진경작용 및 장관 경련 억제 등의 주약리 작용이 있는 것으로 알려져 있는 한약재이다. 이러한 작용은 nitric oxide와 관련 있는 작용으로 본 과제에서는 천궁 추출물에 의한 nitric oxide 생성 변화에 따른 유전자 발현변화에 중점을 두어 실험을 실시하였다.

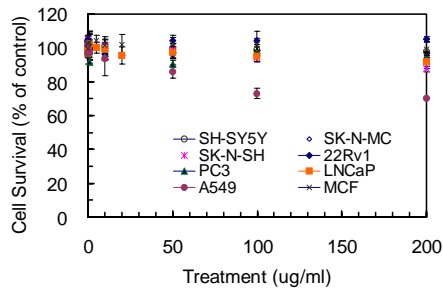


Figure 56. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity of various cancer cell lines.

가. DNA chip 실험을 위한 세포주와 처리조건 설정

- 먼저 세포주에 따른 천궁 추출물의 용량을 선정하기 위하여 여러 장기유래 암세포주에서 천궁 70% ethanol 추출물의 세포독성을 관찰하였다(Figure 56). A549 세포주를 제외한 모든 암세포주에서 200ug/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. A549 세포주에서는 농도의존적으로 세포독성이 나타났으며, 200ug/mL 농도에서 70.2±0.2%의 생존율을 나타내었다.
- 천궁 추출물이 nitric oxide 생성과 세포독성에 미치는 영향에 대하여 Raw264.7 세포주와 HUVEC 세포에서 실험하였다. Raw264.7 세포주에 여러 농도의 천궁 추출물을 처리한 후 세포독성, nitric oxide 생성량 및 immunoblot을 이용하여 iNOS 발현을 실험하였을 때 Figure 57에서와 같이 천궁 추출물 800ug/mL 농도까지 세포독성이 거의 나타나지 않았으나, nitrite 생성량은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때 저농도에서는 감소되었으나 고농도에서는 증가된 양상이 나타났다. 그러나 iNOS inducer인 LPS와 함께 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 농도-의존적으로 nitrite 생성량이 감소되었다. iNOS은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때는 발현량의 변화를 관찰할 수 없었으나 LPS에 의한 iNOS induction을 천궁 추출물 처리에 의하여 농도-의존적으로 저해되었다.
- Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의한 nitric oxide 생성을 관찰하였을 때 Figure 58에서와 같이 세포

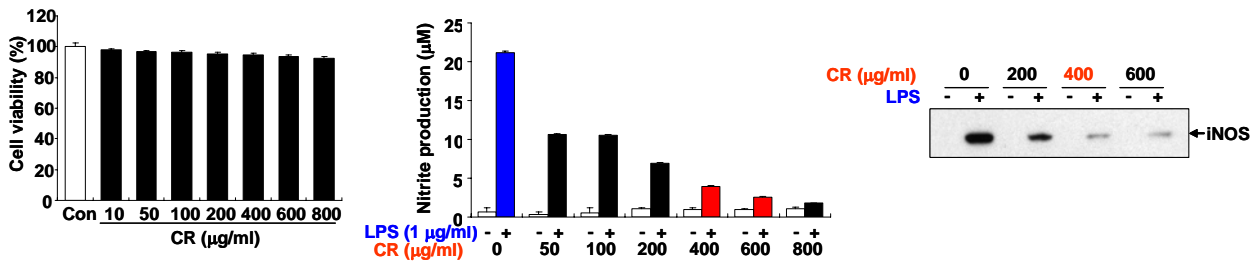


Figure 57. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity, the production of nitric oxide and expression of iNOS in Raw264.7 cells.

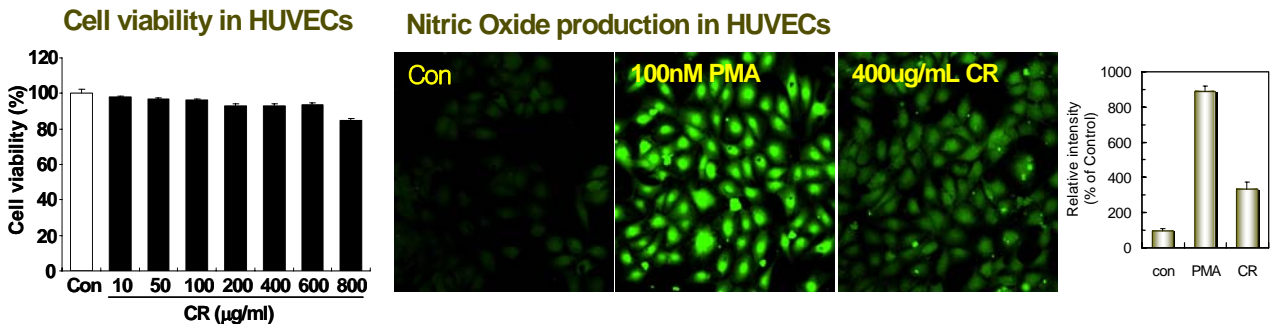


Figure 58. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity and the production of nitric oxide in HUVEC cells.

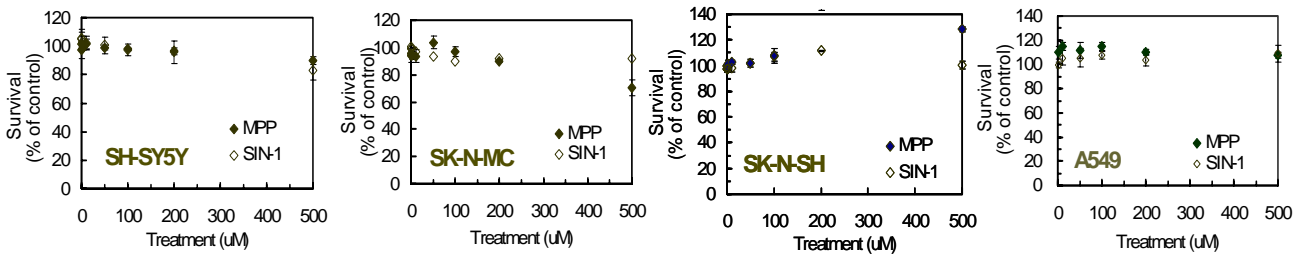


Figure 59. Effect of MPP or SIN-1 on the cytotoxicity of neuroblastoma cell lines and A549 cells.

독성이 전혀 나타나지 않는 400ug/mL에서 nitric oxide 생성량이 크게 증가되었다. Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의하여 nitric oxide 생성량이 증가하는 것은 NO에 의한 혈관 확장 작용에 의하여 혈압강하효과를 나타낼 것으로 예상할 수 있었다.

- 그러나 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람의 것이며 구입하기 쉬운 것으로 선정하고자 천궁 추출물에 의하여 약간의 세포독성이 나타난 A549 세포주와 천궁의 약리작용 중 진정작용을 관찰하기 위한 세포주로서 neuroblastoma 세포주들을 이용하여 nitric oxide 생성과 관련지어 실험하였다.
- 각 세포주에 신경독성물질인 MPP나 SIN-1을 처리한 후 세포독성을 관찰하였을 때 Figure 59에서와 같이 500uM 까지 처리하였을 때 세포독성이 나타나지 않아 이들 독성물질에 의한 뇌세포 보호작용을 세포독성으로 관찰하기 힘들 것으로 사료되었다.
- 따라서 본 과제에서는 사람의 neuroblastoma 세포주들인 SH-SY5Y, SK-N-SH와 SK-N-MC 3종의 세포주에서 NO 관련 유전자들의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. Figure 60에서와 같이 SK-N-SH 세포주에서는 eNOS의 발현을 측정할 수 없었으나 nNOS의 발현이 SH-SY5Y나 SK-N-MC 세포주에서 보다 많은 양이 발현되었으며, iNOS 나 nNOS 발현이 천궁 추출물에 의하여 처리 농도가 높아질수록 발현량이 증가됨을 알 수 있었다. 그리고 SK-N-SH는 다른 두 세포주 보다 증식도 잘되고 다루기도 쉬워서 본 과제에서는 SK-N-SH를 모델 세포주로 선정하였다.
- SK-N-SH 세포에서 천궁 추출물과 그 주 구성성분인 ferulic acid, ligustilide와 Senkyunolide A, 그리고 MPP, NMDA 및 LPS와 같은 여러 독성물질을 처리하기 위한 용량을 선정하기 위하여 이들에 의한 세포독성을 10% serum을 함유하고 있으나 L-glutamine은 첨가하지 않은 배지에서 이들 물질

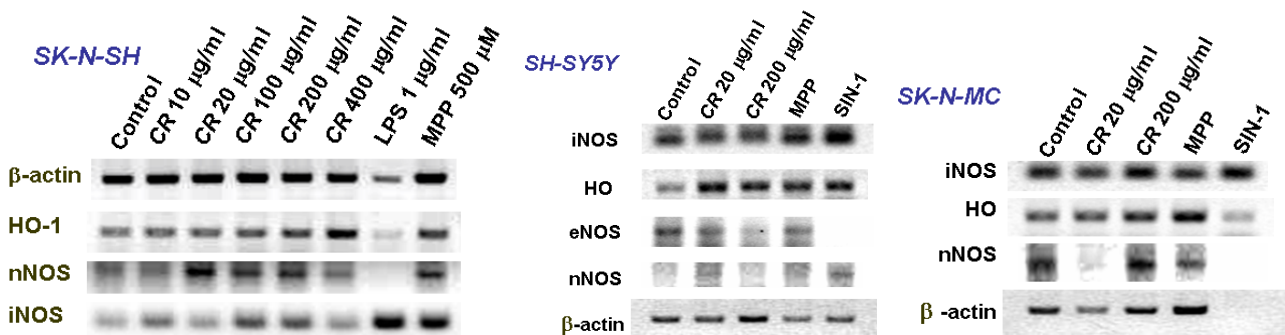


Figure 60. Effect of Cnidii Rhizoma 70% EtOH extracts, LPS, MPP and SIN-1 on the expression of NO related genes in SK-N-SH, SH-SY5Y, and SK-N-MC cell lines.

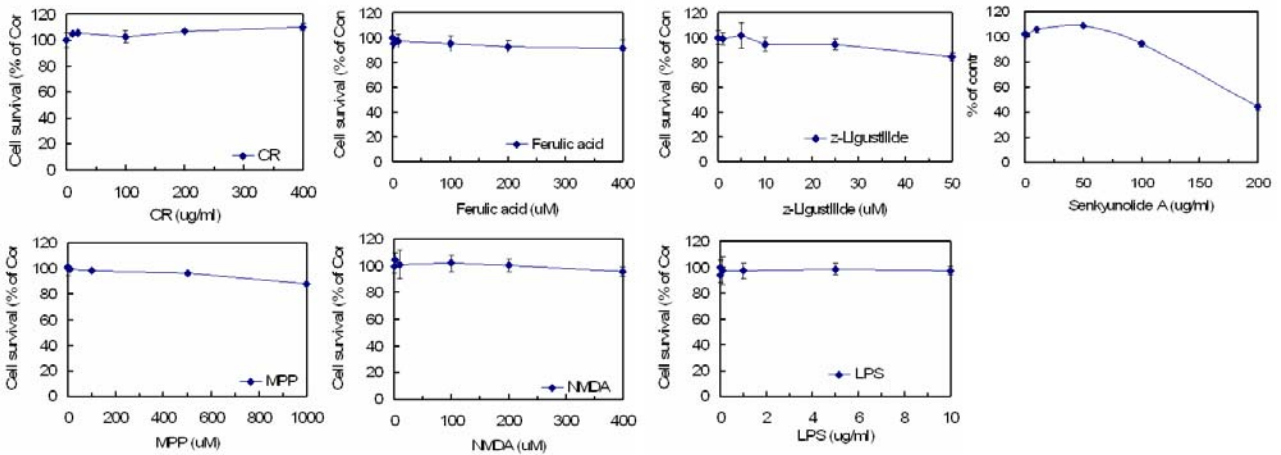


Figure 61. Cytotoxicity of 70% EtOH Cnidii Rhizoma Extract, ferulic acid, ligustilide, senkynolide A and several toxicant in SK-N-SH cells.

에 의한 세포독성을 측정하였다. Figure 61에서와 같이 ligustilide와 senkynolide A가 다른 물질보다 세포독성이 크게 나타나 ligustilide는 50uM 농도에서 $84.4 \pm 2.24\%$ 생존율이 나타났으며, senkynolide A는 IC50 값이 189.6 ug/ml 이었으나 나머지 물질들은 고농도에서도 세포독성이 거의 나타나지 않았다.

- 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 nitric oxide 량에 변화를 관찰하기 위하여 SK-N-SH 세포주에 여러 독성물질을 처리한 후 DAF-FM으로 nitric oxide를 형광 염색하고 confocal microscope으로 관찰하였다. Figure 62에서와 같이 여러 농도의 천궁 추출물을 처리하였을 때 저농도에서 nitric oxide가 대조군보다 적게 생성되었으나 농도가 높아질수록 nitric oxide 생성량이 증가되었으며, 천궁의 주성분인 Z-ligustilide와 ferulic acid를 고농도 처리하였을 때도 모두 nitric oxide 생성량이 크게 증가하였다.
- 중추신경계의 흥분작용을 나타내는 물질로 알려진 N-methyl-D-aspartate (NMDA)와 중추신경계 독성 물질인 MPP 및 iNOS의 대표적인 inducer인 LPS를 처리하여 nitric oxide 생성량의 변화를 관찰하였을 때 모두 nitric oxide 생성량이 증가되었다 (Figure 62).
- 따라서 본 과제에서는 중추신경계의 흥분독으로 널리 알려진 NMDA를 선정하여, 천궁의 약리작용으로 진정작용을 관찰하고자 하였다. NMDA에 의하여 생성되는 nitric oxide를 천궁 추출물이 nitric oxide 생성을 저해시키는가에 대한 실험을 실시하였다. 천궁 추출물이나 NMDA와 4시간동안 동시에 처리하였을 때 Figure 63에서와 같이 nitric oxide 생성량은 증가되었으나, 증가정도는 24시간에서보다 적었다. NMDA와 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 nitric oxide 생성량은 감소되는 경향이 나타났다.
- 이러한 nitric oxide와 관련된 여러 결과로부터 DNA chip 실험을 위한 실험조건은 천궁의 진정작용에 대한 것을 약리작용으로하여 SK-N-SH 세포주를 선정하였으며, 독성물질로는 중추신경 흥분작용을 나타내는 NMDA를 선정하였다. 천궁 70% ethanol 추출물과 ligustilide 및 ferulic acid는 nitric oxide 생성을 저해하는 저농도와 nitric oxide 생성을 증가시키는 고농도를 선정하여 실험하였다.
- 본 과제에서 선정한 천궁 분리물질 및 독성물질인 NMDA의 구조는 Figure 64과 같다.

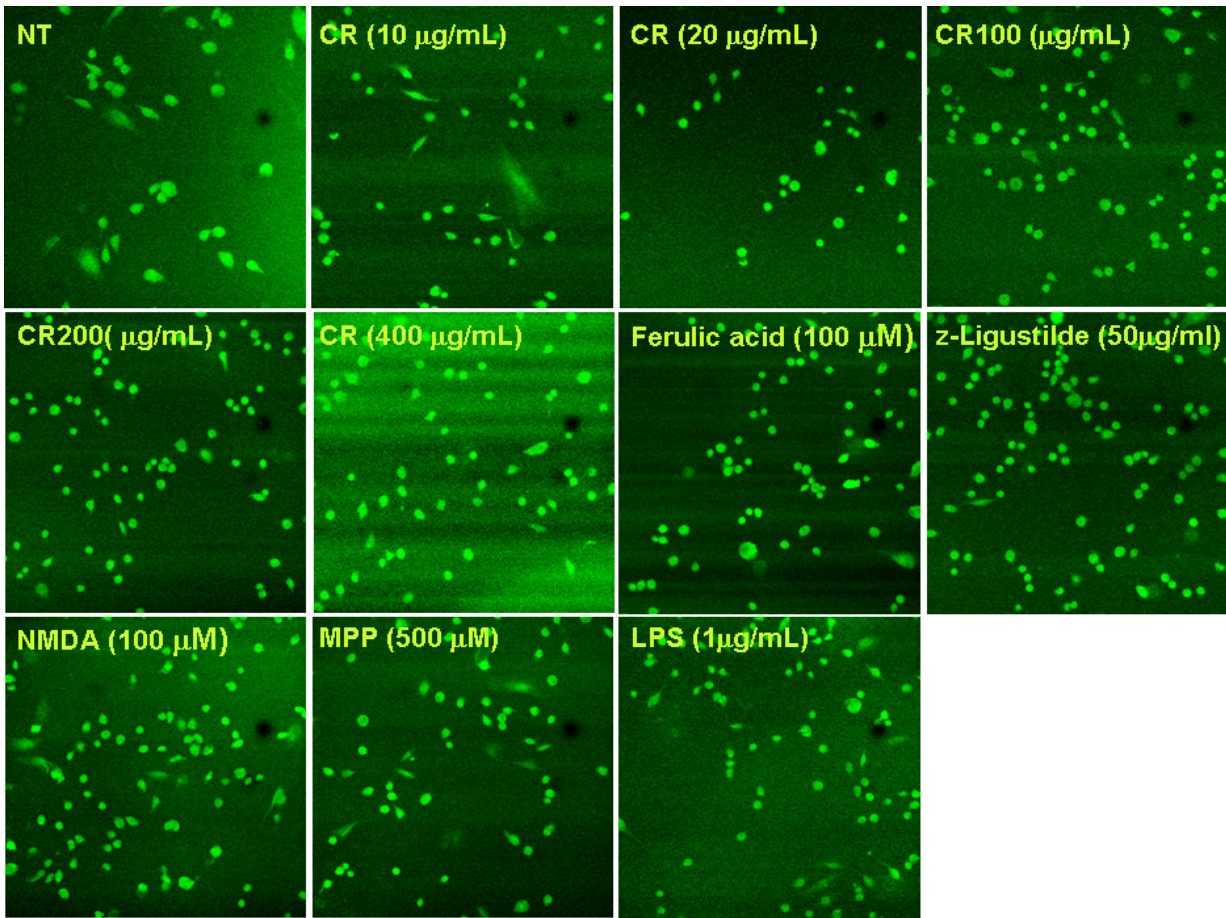


Figure 62. Effect of *C. officinale* extract, ferulic acid, z-ligustilide and various toxicants on the production of nitric oxide in SK-N-SH cells. Cells were treated the extract of Cnidii Rhizoma or the compounds for 24h.

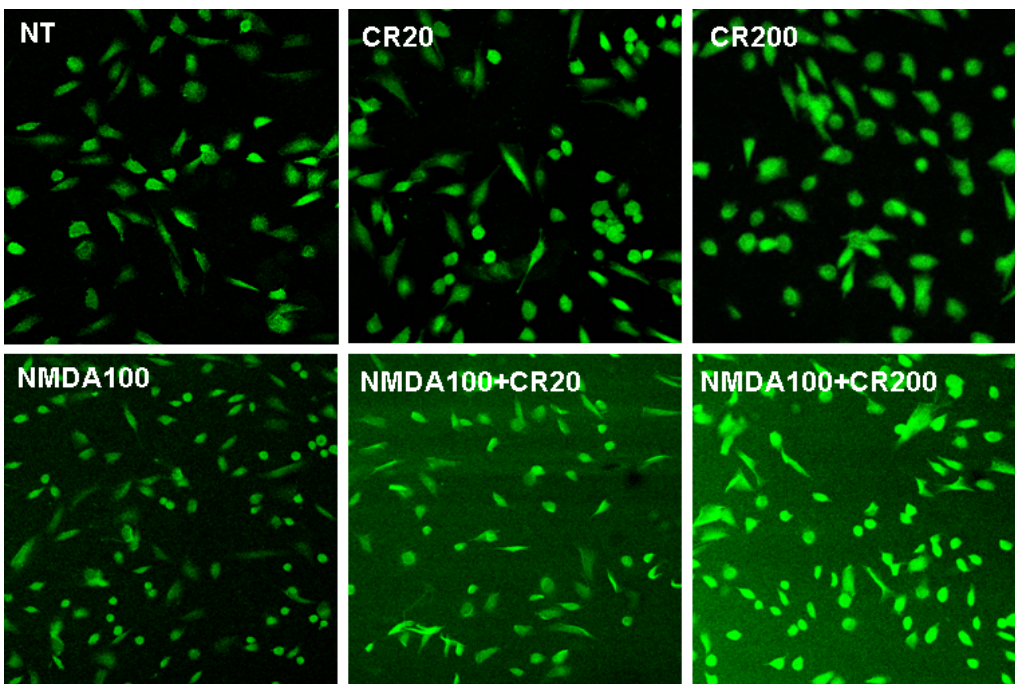


Figure 63. Effect of co-treatment of Cnidii Rhizoma extract and/or NMDA on the production of nitric oxide in SK-N-SH cells. Cells were cotreated the extract of Cnidii Rhizoma and/or NMDA for 4h.



Figure 64. Chemical structures of three compounds isolated from Cnidii Radix and N-methyl-d-aspartate(NMDA) for DNA microarray experiment

나. DNA microarray analysis

- 천궁 70% EtOH 추출물과 흥분독성물질 NMDA를 단독으로 또는 동시에 처리하였을 때 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 표 6에서와 같은 조건으로 실험하였다.
- 천궁 추출물의 주 구성성분으로 천궁에 주로 많이 존재하고 있는 성분인 Ligustilide, Ferulic acid 및 Senkyunolide A가 NMDA에 의한 유전자 발현 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.
- 재배지가 다른 여러 곳의 천궁 추출물의 함유 물질의 profile을 관찰하여 profile이 조금씩 다른 것 중 한국산 3종과 중국산 2종을 선정하여 이들에 의한 유전자 발현변화 양상을 관찰하였다.
- 천궁의 진정작용을 중심으로 약리효능 유전자를 선정하기 위하여 여러 농도의 천궁추출물과 3종의 분리물질을 처리하여 실험을 실시하였다. DNA microarray 실험조건과 분석조건을 요약하였을 때 Table 20과 같았다.

Table 20. Experimental and analysis conditions of DNA microarray for Cnidii Rhizoma extracts, z=ligustilide, ferulic acid and senkyunolide A in SK-N-SH cells.

Samples	Experimental condition	Toxicant (NMDA, 100uM)	
		-	+
Cnidii Rhizoma	Time (3 conditions)	6hr, 24hr, 48hr	6hr, 24hr
	Dose (2 conditions)	20 μ g, 200 μ g	20 μ g, 200 μ g
Ligustilide	Time, dose (1 condition)	50uM, 24h	50uM, 24h
Ferulic acid	Time, dose (1 condition)	100uM, 24h	100uM, 24h
Senkyunolide A	Time, dose (1 condition)	50uM, 24h	50uM, 24h
		200ug, 24h	
Other batches of Cnidii Rhizoma	Time, dose (1 condition)	(Korea: 3 samples, Chinese: 2 samples)	

- ◆ Array Type: ABi human chip
- ◆ Number of Total spots: 36179
- ◆ Data pre-processing
 - ◆ Quantile normalization
 - ◆ Data filtering: Signal to Noise ratio 3 미만의 spot이 전체 조건에서 30% 이상을 차지하는 spot과 Flag 100이상 제거
- ◆ Hierarchical clustering with complete linkage and similarity measure by Euclidean distance

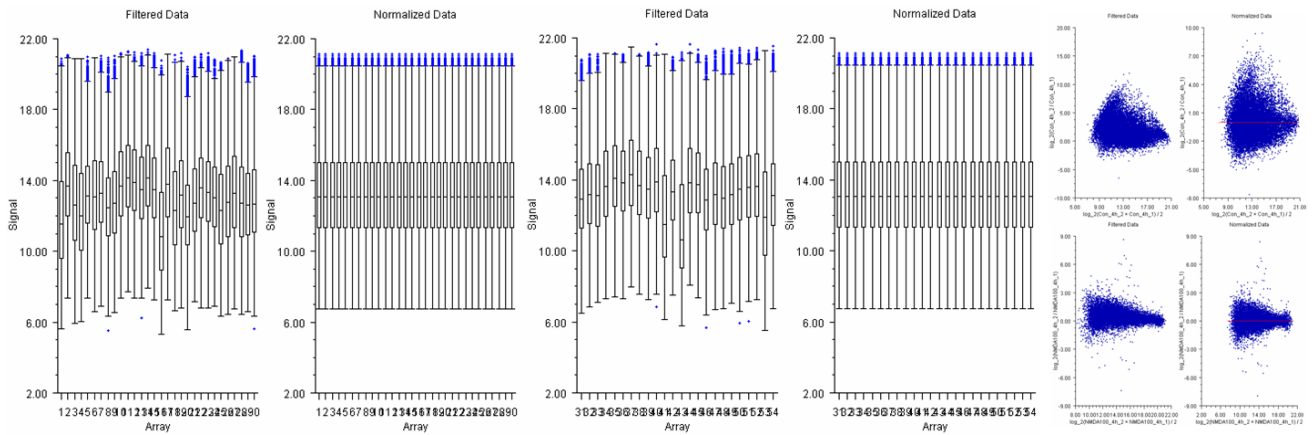


Figure 65. Images of box plot and MA plot in after and before the Normalization of data.

- DNA microarray 데이터를 Table 20의 분석조건에 따라 filtering과 normalization을 한 후 box plotting과 MA plotting을 filtering 하기 전, 후의 것을 비교하여 normalization이 적절히 수행되었음을 확인하였다 (Figure 65).
- Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 전체적 유전자에 대하여 Gene clustering을 실시하였다. 이때 gene clustering은 Hierarchical clustering with Complete Linkage 방법으로 Similarity measure는: Pearson correlation distance를 이용하여 실시하였다. (Figure 66).
- Figure 66의 전반적인 유전자 발현 변화를 관찰하면 DMSO를 시간별로 처리한 대조군에서도 유전자 변화가 매우 크게 나타났으며, 천궁 추출물 20 이나 200ug/mL을 처리하였을 때의 유전자 발현 변화가 대조군 DMSO 처리 후 시간별 유전자 발현 변화가 더욱 크게 나타난 것으로 나타났다.

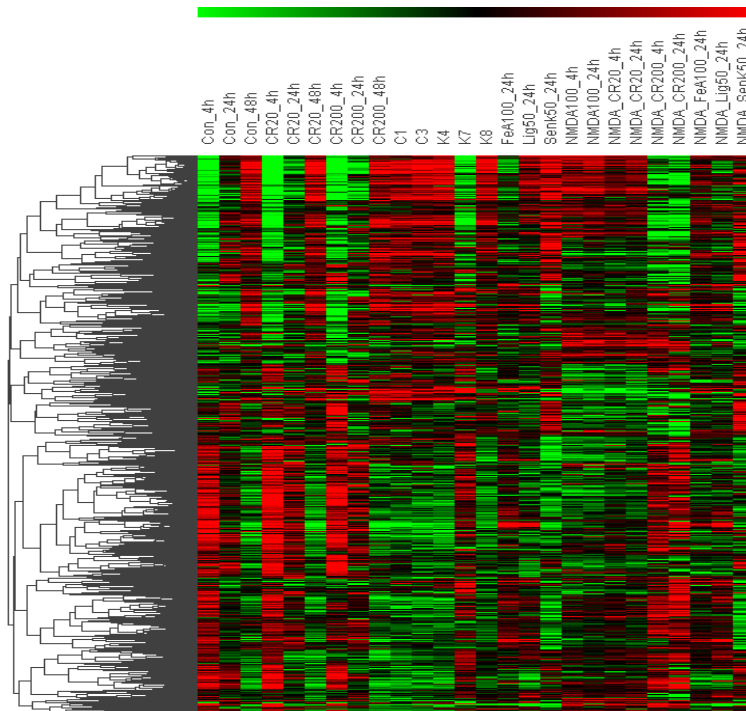


Figure 66. Gene cluster analysis of time- and dose-dependent expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of CR and its major components with or without NMDA.

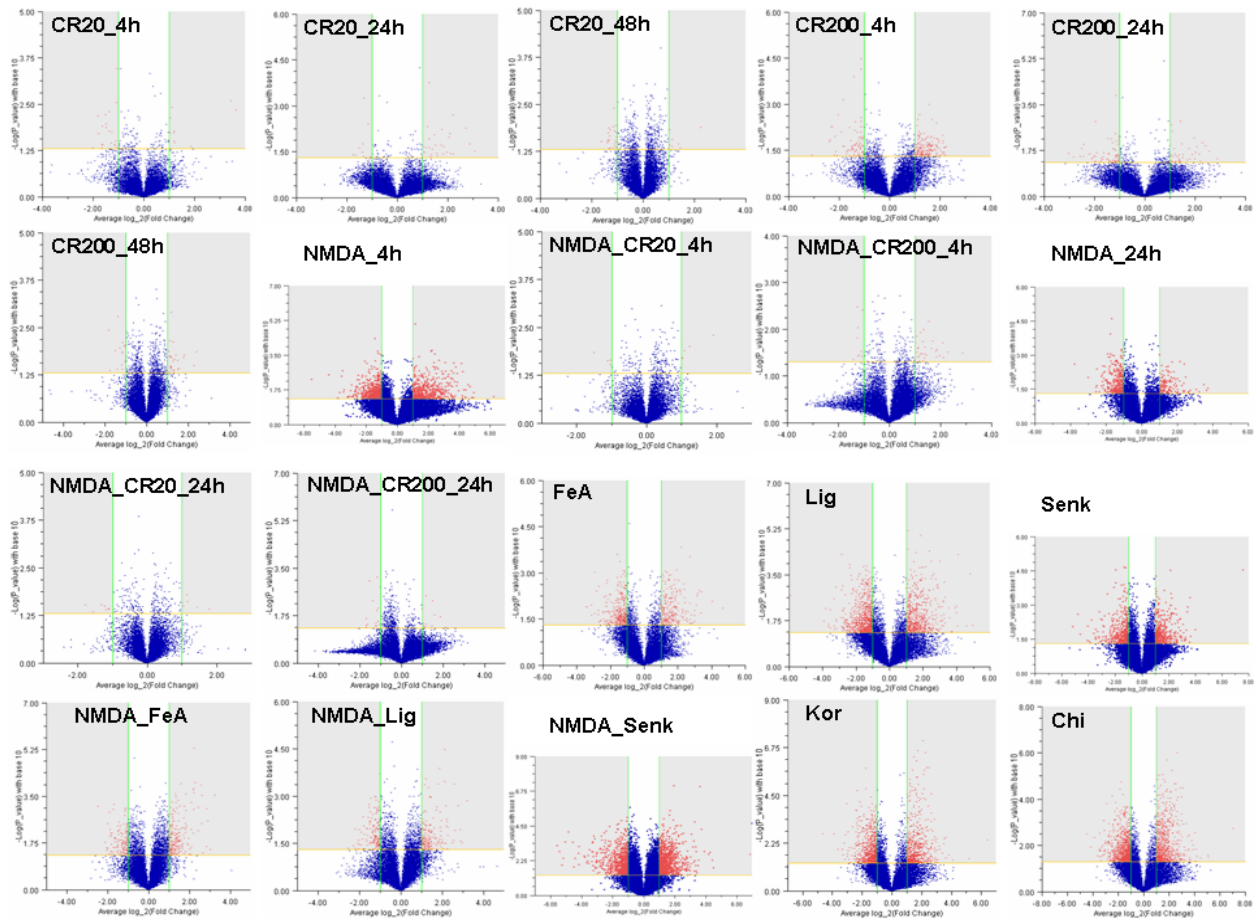


Figure 67. Volcano plots compared control to experiments for the selection of pharmacological biomarker genes in Cnidii Rhizoma and its major components.

- 천궁의 70% ethanol 추출물로 본 실험의 천궁 대표물질로 사용한 CR200_24h 그룹과 한국산 중의 하나인 K7과의 유전자 발현 양상이 매우 유사하게 나타났으나, 중국산 (C1, C3)과 한국산 중 K3와 K8는 유전자 발현이 유사하게 나타났다.
- Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y축은 Welch's T-test 결과를 나타냄)을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test < 0.05의 유의성을 나타내는 유전자를 검색하였다 (Figure 67, Table 21).
- 각 실험별 DEG 조건을 만족하는 유전자 수와 이들의 생물학적 정보를 관찰하였을 때 유전자의 기능이 알려진 유전자 (GO 유전자) 숫자를 Table 21에 표시하였다.
- 천궁 추출물 및 Ferulic acid, ligustilide, senkynolide A에 대한 약리효능 유전자는 NMDA에 의하여 Fold change 2 이상, P<0.05의 조건을 만족하는 유의유전자 중에 천궁 추출물 및 Ferulic acid, ligustilide, senkynolide A를 NMDA와 동시에 24시간 동안 처리하였을 때 다시 대조군과 유사한 수준으로 되돌아가는 유전자를 선정하였다.

Table 21. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number	
			Up (GO gene)	Down (GO gene)
CR_Ext	CR20_4h	Con_4h	19 (9)	19 (13)
	CR20_24h	Con_24h	38 (17)	22 (13)
	CR20_48h	Con_48h	17 (8)	25 (6)
	CR200_4h	Con_4h	192 (120)	69 (37)
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)
	CR200_48h	Con_48h	39 (17)	24 (9)
CR_Ext/ NMDA	NMDA_4h	Con_4h	476 (399)	556 (280)
	NMDA_24h	Con_24h	139 (87)	337 (235)
	CR20_NMDA_4h	NMDA_4h	7 (5)	6 (3)
	CR20_NMDA_24h	NMDA_24h	8 (5)	9 (4)
	CR200_NMDA_4h	NMDA_4h	35 (16)	13 (7)
	CR200_NMDA_24h	NMDA_24h	17 (6)	20 (10)
Ferulic acid	FeA	Con_24h	206 (203)	362 (257)
	FeA_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)
Z-Ligustilide	Lig	Con_24h	206 (203)	365 (257)
	Lig_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)
Senkyunolide A	Senk	Con_24h	323 (320)	698 (490)
	Senk_NMDA	NMDA_24h	225 (134)	230 (225)
산지별	C1	Con_24h	249 (150)	323 (220)
	C3	Con_24h	404 (264)	471 (293)
	K4	Con_24h	545 (373)	498 (329)
	K7	Con_24h	95 (61)	99 (61)
	K8	Con_24h	65 (34)	102 (58)

1) CR extract의 용량별-시간별에 따른 유전자변화 관찰

- Table 21에서 CR_Ext 군에서의 유전자 발현 변화를 volcano plot을 이용하여 각 실험군들, 즉 CR20_4h-Con_4h, CR20_24h-Con_24h, CR20_48h-Con_48h, CR200_4h-Con_4h, CR200_24h-Con_24h, CR200_48h-Con_48h 들에 대한 Fold Change cutoff 2.0, P<0.05를 적용하여 나온 결과를 합집합하여 총 573개의 유전자가 선별되었다. 이것을 이용하여 전체 CR 추출물 처리군에 대하여 전체적으로 clustering 하여 각 실험군별 발현 양상의 변화를 관찰하였으며(Figure 68), 아울러 이들의 biological pathway를 panther site로부터 얻었다.

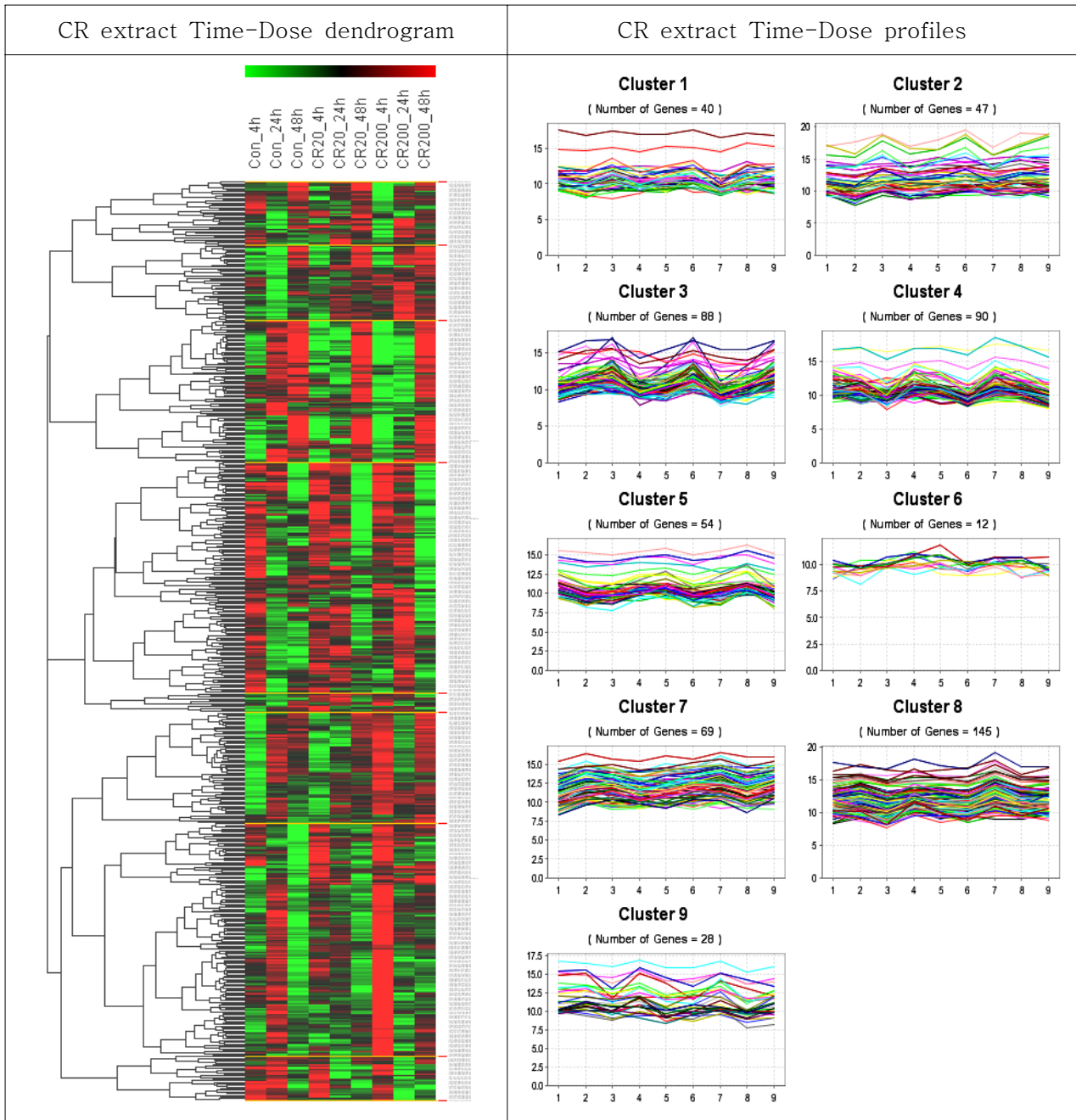


Figure 68. Cluster analysis of time- and dose-dependent gene expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract.

- Figure 68의 Hierarchical clustering dendrogram에서 DMSO만 처리한 대조군(con)들도 시간에 따라서 유전자 변화가 크게 나타났으며, 48시간동안 처리군 (con-48h)의 경우는 4시간 처리한 대조군 (con-4h)에 비하여 유의 유전자가 매우 크게 나타나는 것으로 보아 각 time에 따른 추출물의 효능을 볼 때는 처리 시간에 따른 대조군이 필요함을 나타내었다.
- 이들 유전자 573개 중 GO 유전자는 310개로 이들에 의한 biological pathway를 관찰하였을 때 Table 22에서와 같이 neuroactive ligand-receptor interaction pathway와 focal adhesion pathway에 관여하는 유전자들이 가장 많이 변화를 나타내었다. Neuroactive ligand-receptor interaction에 관여하는 유전자는 BDKRB1, HTR2A, EDNRB, GNRH1, PTGIR와 DEFA6 등이 있으며, Focal adhesion에는 DIAPH1, LAMC3, AKT2, BIRC3, COL1A1 등의 유전자가 있었다.
- 천궁 추출물 처리에 의한 유전자 발현변화를 일정처리시간 즉, 4시간, 24시간 및 48시간에서 처리농도에 따른 발현 별로 유의 유전자 및 biological pathway를 관찰하였다. 각 실험별 DEG 조건을 만족하는 유전자 수와 이들의 생물학적 정보를 관찰하기 위하여 유전자의 기능이 알려진 숫자를 Table 23에 표시하였다.
- Table 23에서 보면 천궁 추출물 처리에 의하여 유의적으로 변화하는 유전자 숫자는 예상 외로 매우 적었으며, 각 시간에서 두 처리 농도에서 공통적으로 변화되는 유전자 숫자는 4, 24 및 48시간 동안에 각각 14, 10과 8개로 나타났다. 이러한 결과는 천궁 추출물에 의한 유전자 발현변화는 주로 짧은 시간에 변화되는 것으로 사료되었다.
- 천궁 추출물을 농도별, 시간별로 처리한 후 Volcano plot을 이용하여 fold change>2, P<0.05이상을 만족하는 유의 유전자를 각각 선정한 것 중 공통적인 유전자는 없었다. Table 23의 각 sample group에서 공통적인 또는 합한 유전자에 대한 biological pathway를 관찰하였을 때 Table 24과 25와 같이 나타났다.
- 유전자들의 발현 조절은 유전자의 종류에 따라 발현이 변화되는 시간이 달라지므로 같은 물질들을 처리하더라도 처리 시간에 따라 유전자 발현 양상이 달라지므로 유의 유전자들이 다른 것을 알 수 있었다.

Table 22. Major biological pathways of significant genes merged the significant genes of each experimental group which was treated the 70% ethanol extract of Cnidii Rhizoma with dose- and time dependant manner in SH-N-SH cells analyzed using Volcano plots.

KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Neuroactive ligand-receptor interaction	6	Tight junction	3
Focal adhesion	6	Phosphatidylinositol signaling system	3
Regulation of actin cytoskeleton	5	Natural killer cell mediated cytotoxicity	3
MAPK signaling pathway	5	Leukocyte transendothelial migration	3
Wnt signaling pathway	4	Fc epsilon RI signaling pathway	3
T cell receptor signaling pathway	4	ECM-receptor interaction	3
Jak-STAT signaling pathway	4	Cell Communication	3
Cell cycle	4	Calcium signaling pathway	3
Apoptosis	4	Axon guidance	3
mTOR signaling pathway	3	Adipocytokine signaling pathway	3
Toll-like receptor signaling pathway	3	ABC transporters - General	3

Table 23. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups in CR_Ext sample groups.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO genes)	Down (GO genes)	Common (GO genes)	Total (GO genes)
CR_Ext	CR20_4h	Con_4h	19 (9)	19 (13)	14(8)	285(171)
	CR200_4h	Con_4h	192 (120)	69 (37)		
	CR20_24h	Con_24h	38 (17)	22 (13)	10(6)	202(110)
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)		
	CR20_48h	Con_48h	17 (8)	25 (6)	8(4)	97(26)
	CR200_48h	Con_48h	39 (17)	24 (9)		

Table 24. Biological pathways of common significant genes of each time CR experimental groups in SH-N-SH cells analyzed.

4h		24h		48h	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Huntington's disease	1	Adherens junction	1	Axon guidance	1
Leukocyte transendothelial migration	1	Calcium signaling pathway	1	Calcium signaling pathway	1
Neurodegenerative Disorders	1	Gap junction	1	Neuroactive ligand-receptor interaction	1
		Hematopoietic cell lineage	1		
		Neuroactive ligand-receptor interaction	1		

Table 25. Major biological pathways of genes merged the significant genes (fold change>2, P<0.05) selected from each time CR experimental groups in SH-N-SH cells using Volcano-plot.

4h		24h		48h	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Regulation of actin cytoskeleton	3	Focal adhesion	4	Neuroactive ligand-receptor interaction	3
Cell cycle	3	Tight junction	3	mTOR signaling pathway	1
Wnt signaling pathway	2	Neuroactive ligand-receptor interaction	3	Urea cycle and metabolism of amino groups	1
Axon guidance	2	MAPK signaling pathway	3	Toll-like receptor signaling pathway	1
Apoptosis	2	ECM-receptor interaction	3	T cell receptor signaling pathway	1
Phosphatidylinositol signaling system	2	Wnt signaling pathway	2	Phosphatidylinositol signaling system	1
Neurodegenerative Disorders	2	Cell Communication	2	Calcium signaling pathway	1
Natural killer cell mediated cytotoxicity	2	Calcium signaling pathway	2	Axon guidance	1
Leukocyte transendothelial migration	2	Apoptosis	2	Natural killer cell mediated cytotoxicity	1
Jak-STAT signaling pathway	2	Regulation of actin cytoskeleton	2	MAPK signaling pathway	1

2) NMDA의 처리에 따른 유전자 발현 변화 및 이에 미치는 천궁 추출물 및 그 분리물질의 약리 효능 유전자 선정

- 천궁 70% ethanol 추출물(CR)과 ligustilide, senkynolide A 및 ferulic acid의 약리효능을 관찰하기 위하여 중추신경 흥분독인 NMDA를 독성물질 선정하여 처리하였을 때 nitric oxide 생성이 증가되었으며, 천궁 추출물을 동시에 처리하면 증가된 nitric oxide 량이 감소함을 관찰하였다. 이를 바탕으로 먼저 100uM NMDA 처리에 의한 유전자 발현 변화를 천궁 물질들을 동시에 처리한 후 유전자 발현을 비교하였다.
- 먼저 NMDA를 100uM로 4시간과 24시간 처리한 후 각각의 대조군과 비교하여 2 fold 이상 변화가 있으며, P<0.05인 유전자들을 선정하여, 공통적인 것과 합한 것에 대한 유전자 발현 양상을 비교를 하였다 (Table 26).
- NMDA를 처리하였을 때 4시간과 24시간에 공통적으로 나타나는 유전자는 총 90개로 GO 유전자는 65개로 나타났다. 그리고 합한 유전자는 총 1478개로 GO 유전자는 876개 이었다. NMDA에 의한 유전자 발현 변화는 4시간이 24시간 보다 크게 나타나 처리 초기에 유전자 발현이 크게 변화됨을 알 수 있었다.
- NMDA에 의해 발현이 변화된 유전자들의 biological pathway를 관찰하였을 때 Table 27에서와 같이 focal adhesion과 actin cytoskeleton pathway에 관여하는 유전자 발현 변화가 가장 크게 나타났다.
- NMDA에 의한 발현이 변화된 유전자 중 focal adhesion pathway에 관여하는 유전자를 관찰하였을 때 Figure 69와 같았다. 각 유전자들의 시간별 발현정도를 관찰하였을 때 Table 28에서와 같이 많은 유전자들이 NMDA 처리에 의하여 발현이 감소되었으며, 관련 유전자 대부분이 4h이나 24h에서 발현 변화가 유사한 양상으로 나타났다.

Table 26. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups treated with or without NMDA.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO 유전자)	Down (GO 유전자)	Common (GO 유전자)	Total (GO 유전자)
NMDA	NMDA_4h	Con_4h	476 (399)	556 (280)	90(65)	1478(876)
	NMDA_24h	Con_24h	139 (87)	337 (235)		
CR_Ext/ NMDA	CR20_NMDA_4h	NMDA_4h	7 (5)	6 (3)	1(0)	60 (31)
	CR200_NMDA_4h	NMDA_4h	8 (5)	9 (4)		
	CR20_NMDA_24h	NMDA_24h	8 (5)	9 (4)	0	65(32)
	CR200_NMDA_24h	NMDA_24h	17 (6)	20 (10)		
Ferulic acid /NMDA	FeA	Con_24h	206 (115)	365 (257)	103(69)	895(573)
	FeA_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)		
Z-Ligustilide /NMDA	Lig	Con_24h	323 (206)	698 (490)	106(74)	1312(850)
	Lig_NMDA	NMDA_24h	228 (108)	169 (120)		
Senkyunolide A /NMDA	Senk	Con_24h	396 (276)	445 (287)	323(223)	2589(1719)
	Senk_NMDA	NMDA_24h	1254 (858)	817 (523)		

Table 27. Major biological pathways of significant genes merged the significant genes of each experimental group which was treated the 100uM NMDA for 4h and 24h in SH-N-SH cells analyzed using Volcano plots.

KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Focal adhesion	26	Adipocytokine signaling pathway	12
Regulation of actin cytoskeleton	23	Phosphatidylinositol signaling system	11
MAPK signaling pathway	17	Natural killer cell mediated cytotoxicity	10
Leukocyte transendothelial migration	17	Jak-STAT signaling pathway	10
Tight junction	15	Gap junction	10
Insulin signaling pathway	13	Cell adhesion molecules (CAMs)	10
TGF-beta signaling pathway	12	Calcium signaling pathway	10
Cell cycle	12	Apoptosis	10
Axon guidance	12		

◦천궁 (CR) 70% ethanol 추출물의 약리효능관련 유전자를 관찰하기 위하여 CR 70% ethanol 추출물을 20ug/ml과 200ug/ml을 100uM NMDA와 동시에 4시간이나 24시간 동안 처리한 후 유전자 발현변화를 관찰하였다.

◦Table 26에서 보면 CR과 NMDA를 동시에 처리하였을 때 유의 유전자 수가 매우 적었으며, CR 농도나 시간에 따른 변화도 크지 않았으나 CR 20ug/ml 농도로 처리한 것 보다는 200ug/ml 농도로 처리한 것에서 유의 유전자수가 크게 나타났다. 이러한 결과는 NMDA를 100uM과 CR 20ug/ml 을 동시에 처리하였을 때 NMDA에 의한 NO 생성량은 감소되었으나 예상외로 유전자 변화에는 영향을 미치지 못한 것으로 사료되었다. 그리고 효능 유전자변화는 CR 200ug/ml 농도 이상으로 처리하면 효능이 더욱 커질 것으로 예상되었다.

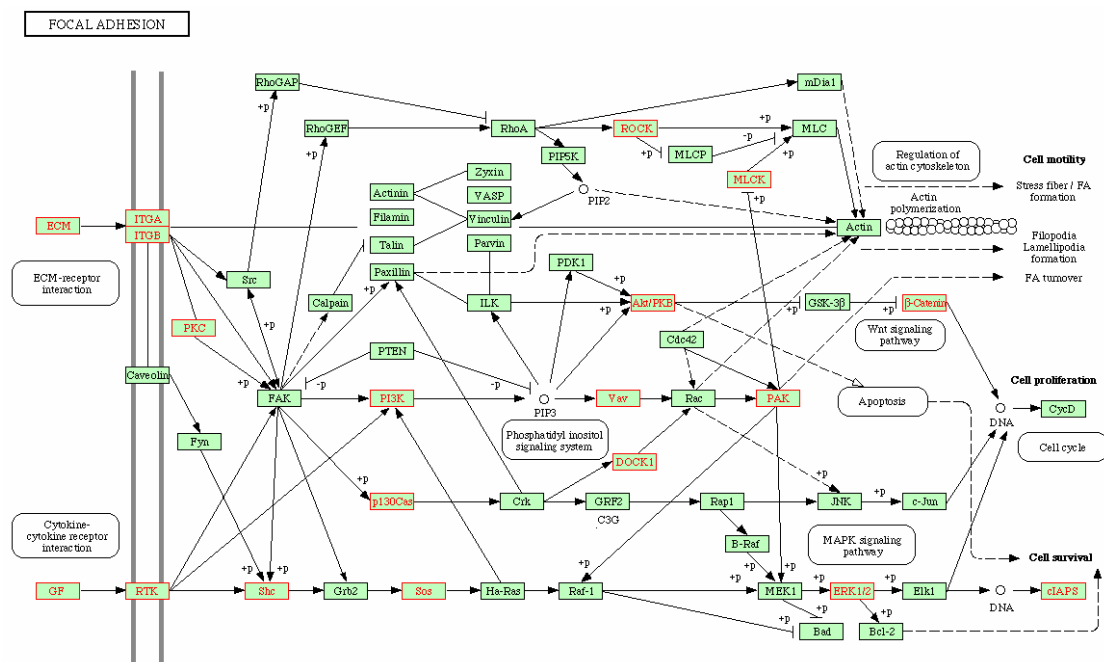


Figure 69. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 100uM NMDA for 4 and 24h in focal adhesion pathway

Table 28. The list of genes related to focal adhesion pathway in NMDA treated SK-N-SH cells.

Selected genes	gene expression level (log2 based)			
	Con_4h	Con_NMDA_4h	Con_24h	Con_NMDA_24h
LAMA4	15.672	12.527	13.889	12.355
VAV1	10.475	9.099	9.409	9.630
ITGAV	15.043	14.198	15.524	14.279
AKT2	9.264	10.087	8.343	10.007
PRKCA	9.480	9.480	11.181	9.122
ITGA6	18.775	17.113	18.531	17.405
FN1	11.150	12.026	10.407	11.543
GDPD3;MAPK3	8.827	11.665	9.102	11.307
PAK4	16.148	14.883	15.614	15.166
SOS1	10.293	9.826	10.958	9.696
BIRC3	11.200	9.876	12.119	9.101
SHC3	12.262	10.754	11.975	11.298
BCAR1	11.290	14.045	12.199	13.931
IGF1R	10.020	8.941	9.949	8.612
THBS1	13.883	15.658	15.334	15.350
DOCK1	12.851	12.508	13.798	12.679
MLCK	12.207	10.455	10.888	10.523
PIK3R1	9.915	8.903	10.394	8.424
ITGB4	10.541	12.752	11.265	12.771
PDGFC	15.390	15.198	16.406	15.320
ROCK1	14.014	12.846	14.023	12.834
LAMA5	11.901	13.271	12.367	13.288
PIK3CB	11.259	10.023	11.722	9.656
CTNNB1	11.008	14.844	13.852	14.907
ROCK2	14.928	13.771	14.591	13.768
ROCK1	14.062	13.040	13.977	12.924

- 천궁 추출물에 대한 약리 효능 유전자는 CR 200ug/ml과 NMDA 100uM 농도로 동시에 24시간 동안 처리한 후 변화된 유전자들을 중심으로 선정하였다. 즉 천궁 EtOH 추출물의 경우 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_CR200_24h 유의 유전자를 합친 527개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 Figure 70에서와 같이 14개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10에 속한 유전자들을 합하여 얻은 164개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_CR200_24h 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 천궁 추출물의 효능 유전자로 선택하였다(Table 29).
- Ferulic acid(FeA)는 천궁 70% ethanol 추출물 중에 약 2.5mg/g 정도 차지하고 있는 물질로 이를 100uM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, P<0.05이상인 유전자를 volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 568개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 460개 이었다 (Table 26). 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 Table 28에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 Regulation of actin cytoskeleton pathway, Focal adhesion pathway 및 MAPK signaling pathway로 각각 12종, 11종과 9종의 유전자가 관련되어 있었다.
- FeA의 약리 효능 유전자는 FeA 100uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, P<0.05인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_FeA 유의 유전자

를 합친 1012개의 유전자를 Hierarchical clustering 하였다. Figure 71에서와 같이 13개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8에 속한 유전자들을 합하여 얻은 584개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_FeA 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Ferulic acid의 효능 유전자로 선택하였다 (Table 31).

- Ligustilide(Lig)는 천궁 추출물 중에 약 6.5mg/g 정도 포함되어 있는 물질로 50uM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, $P < 0.05$ 이상인 유전자를 volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 Table 26에서와 같이 1312개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 850개 이었다. 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 Table 30에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 Cell cycle, Focal adhesion 과 Regulation of actin cytoskeleton 경로들이었으며, 각각 19종, 16종 및 14종의 유전자가 관여하고 있었다.

Figure 70. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with 200ug/ml 70% ethanol extract of Cnidii Rhizoma with or without 100uM NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

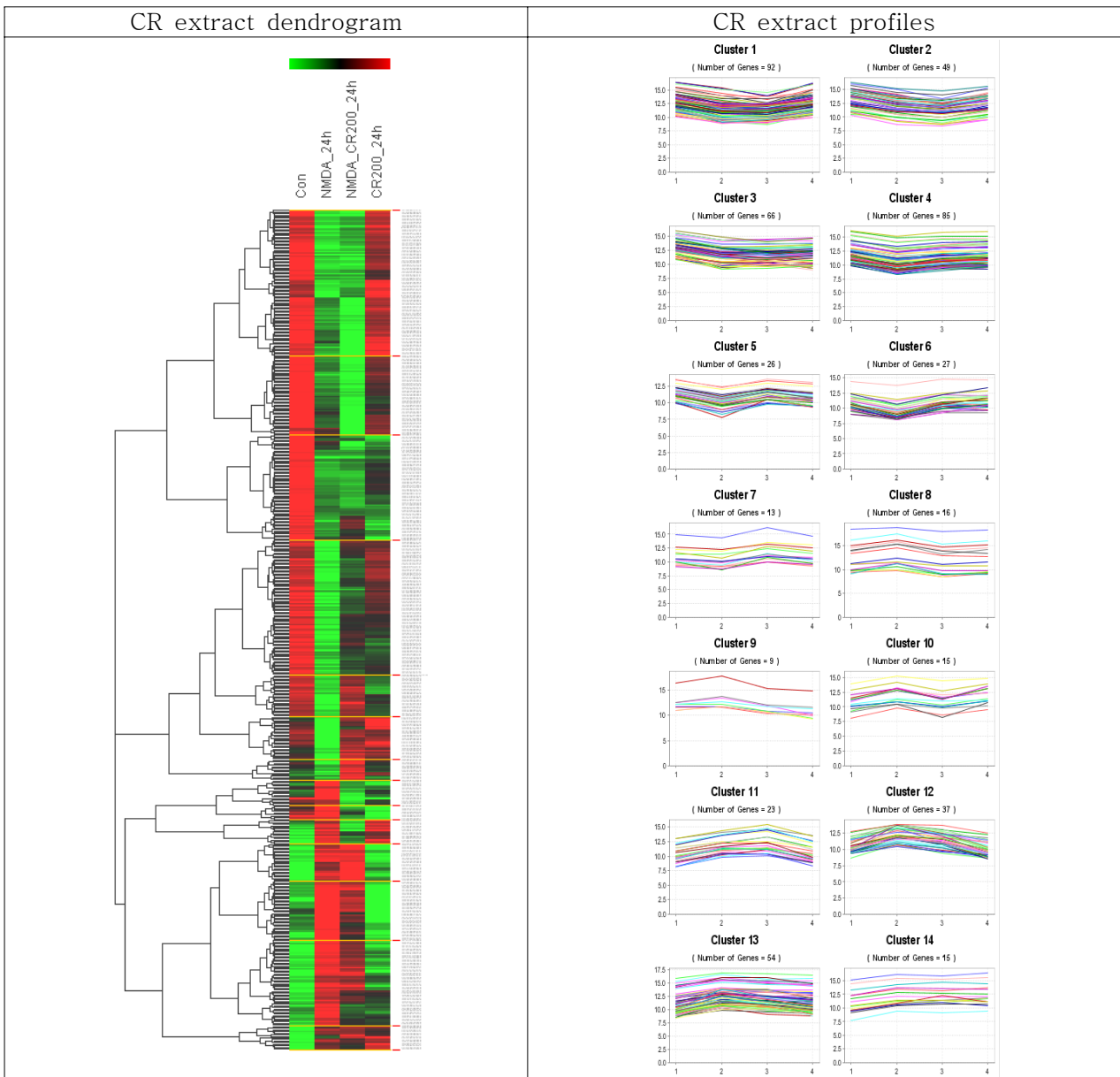


Table 29. Pharmacological active genes selected from the groups treated CR 200ug/ml with or without 100uM NMDA in the SK-N-SH cells for 24h

	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_CR20	NMDA_CR200
1	192466	GSG1	9.213	11.261	10.978	9.218
2	142958	MAFG;SIRT7	8.626	10.777	10.985	9.428
3	213890	NRP1	12.279	8.518	9.026	9.586
4	144588	MFGES	8.948	10.752	10.396	9.746
5	159850	AP1GBP1	10.162	8.703	8.939	10.004
6	100694	PHTF2	11.510	9.004	9.019	10.013
7	213519	SLC12A2	11.358	9.174	9.764	10.306
8	100966	KIAA1641	10.608	8.572	9.544	10.417
9	123450	NR4A2	10.046	7.788	8.844	10.543
10	236580	GPR125	11.489	9.422	9.674	10.654
11	105113	DOCK5	11.600	9.716	9.425	10.742
12	101594	CCDC95	10.098	12.073	11.606	10.789
13	113036	PARD6B	11.028	9.679	10.564	10.831
14	225893	PDE7A	11.123	9.757	9.977	10.838
15	227033	DMXL1	10.915	8.737	9.918	10.927
16	235590	DHX40	12.433	9.881	9.420	10.944
17	207047	HESX1	10.510	9.179	9.777	10.994
18	177512	RAB4B	10.411	12.136	11.975	11.056
19	118400	INTS2	11.150	9.811	9.340	11.071
20	117435	EP400	11.281	10.131	9.974	11.279
21	128717	MTPN	11.478	13.074	12.655	11.413
22	143978	CASK	11.503	10.449	10.397	11.622
23	148950	SCARF2	10.920	13.309	13.056	11.696
24	163861	FGD6	12.024	10.697	10.837	11.924
25	162667	STAG1	12.258	10.882	10.951	11.971
26	227835	PDE4DIP	12.496	11.437	11.736	12.522
27	149339	CUEDC1	12.810	14.114	13.980	12.660
28	150170	SLC25A1	14.542	15.900	15.814	14.001
29	166760	ABL1	15.048	16.120	15.811	14.751
30	172572	TAGLN	16.372	17.808	17.534	15.324
31	125960	CRIP2	16.190	17.450	17.191	15.436

- Ligustilide의 약리 효능 유전자는 Lig 50uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, P<0.05인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_Lig 유의 유전자를 합친 920개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 그림 37에서와 같이 10개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 3, 4, 6, 8에 속한 유전자들을 합하여 얻은 288개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_Lig 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Ligustilide의 효능 유전자로 선택하였다 (Table 31).

Table 30. Major biological pathways of the significant genes (fold change>2, P<0.05) selected from the groups treated with ferulic acid, ligustilide or senkyunolide in SH-N-SH cells.

Ferulic acid		Ligustilide		Senkyunolide A	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Regulation of actin cytoskeleton	12	Cell cycle	19	MAPK signaling pathway	18
Focal adhesion	11	Focal adhesion	16	Cell cycle	15
MAPK signaling pathway	9	Regulation of actin cytoskeleton	14	Tight junction	10
Cell cycle	9	Pyrimidine metabolism	13	Tryptophan metabolism	9
Purine metabolism	8	Purine metabolism	13	Purine metabolism	9
Calcium signaling pathway	7	MAPK signaling pathway	13	Focal adhesion	9
Axon guidance	7	ECM-receptor interaction	10	Insulin signaling pathway	8
Wnt signaling pathway	6	Tight junction	9	Glycan structures - biosynthesis 1	8
Tight junction	6	Axon guidance	9	Axon guidance	8
Jak-STAT signaling pathway	6	Phosphatidylinositol signaling system	8	Regulation of actin cytoskeleton	7
Complement and coagulation cascades	6	Leukocyte transendothelial migration	7	Glutathione metabolism	7
Pyrimidine metabolism	5	Jak-STAT signaling pathway	7	Cytokine-cytokine receptor interaction	7
Cytokine-cytokine receptor interaction	5	Insulin signaling pathway	7	Adipocytokine signaling pathway	7
Phosphatidylinositol signaling system	4	DNA polymerase	7	Wnt signaling pathway	6
Neuroactive ligand-receptor interaction	4	Cell Communication	7	TGF-beta signaling pathway	6
Insulin signaling pathway	4	Calcium signaling pathway	7	Neuroactive ligand-receptor interaction	6
Gap junction	4	ABC transporters - General	7	Calcium signaling pathway	6

- Senkyunolide A(Senk)는 천궁 추출물 중에 약 23.9mg/g 정도 포함되어 있는 물질로 50uM 농도로 24시가 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, P<0.05이상인 유전자를 volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 Table 26에서와 같이 2589개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 1719개 이었다. 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 Table 30에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 MAPK signaling pathway, Cell cycle 및 Tight junction 경로이었으며, 각각 18종, 15종과 10종의 유전자가 관여하고 있었다.
- Senkyunolide A의 약리 효능 유전자는 Senk 50uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, P<0.05인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_Senk 유의 유전자를 합친 2070개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 Figure 72에서와 같이 13개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 1, 2, 3, 4에 속한 유전자들을 합하여 얻은 556개의 유전자 중

Figure 71. Cluster analysis of genes selected from the groups treated 100uM Ferulic acid and 50uM Ligustilide with or without NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

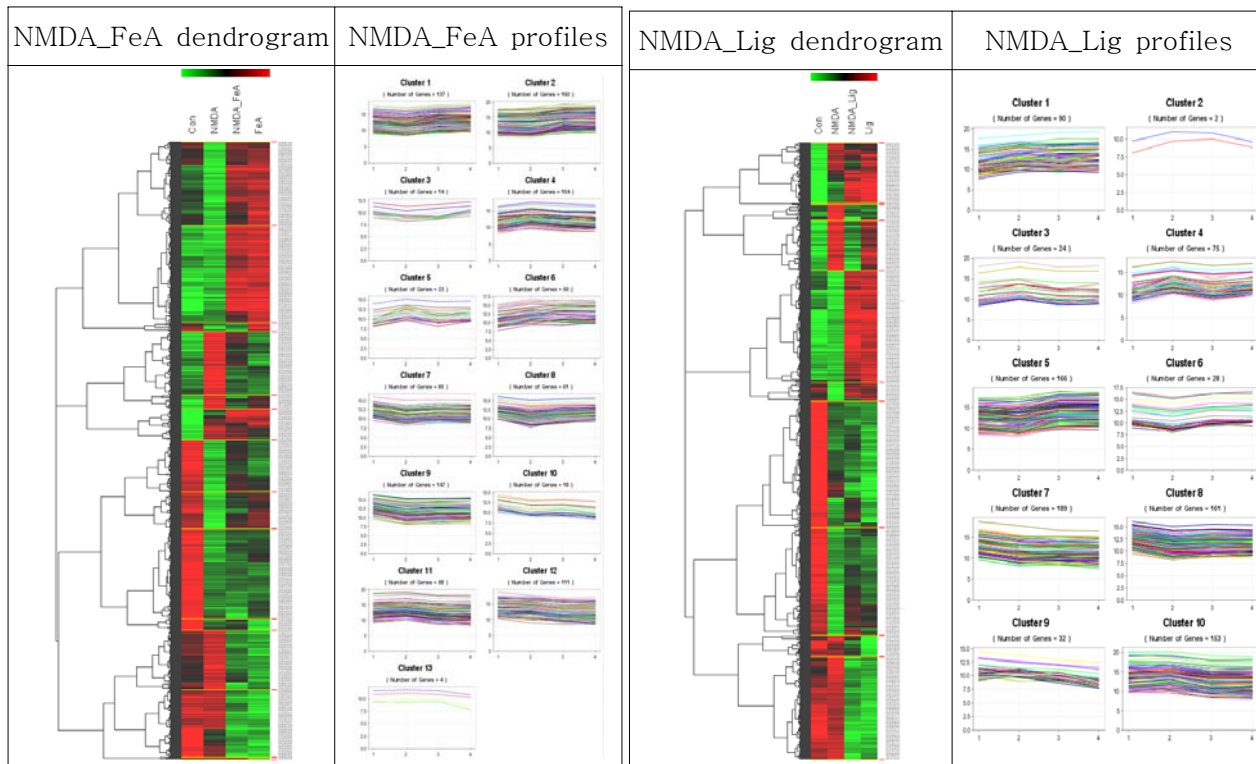
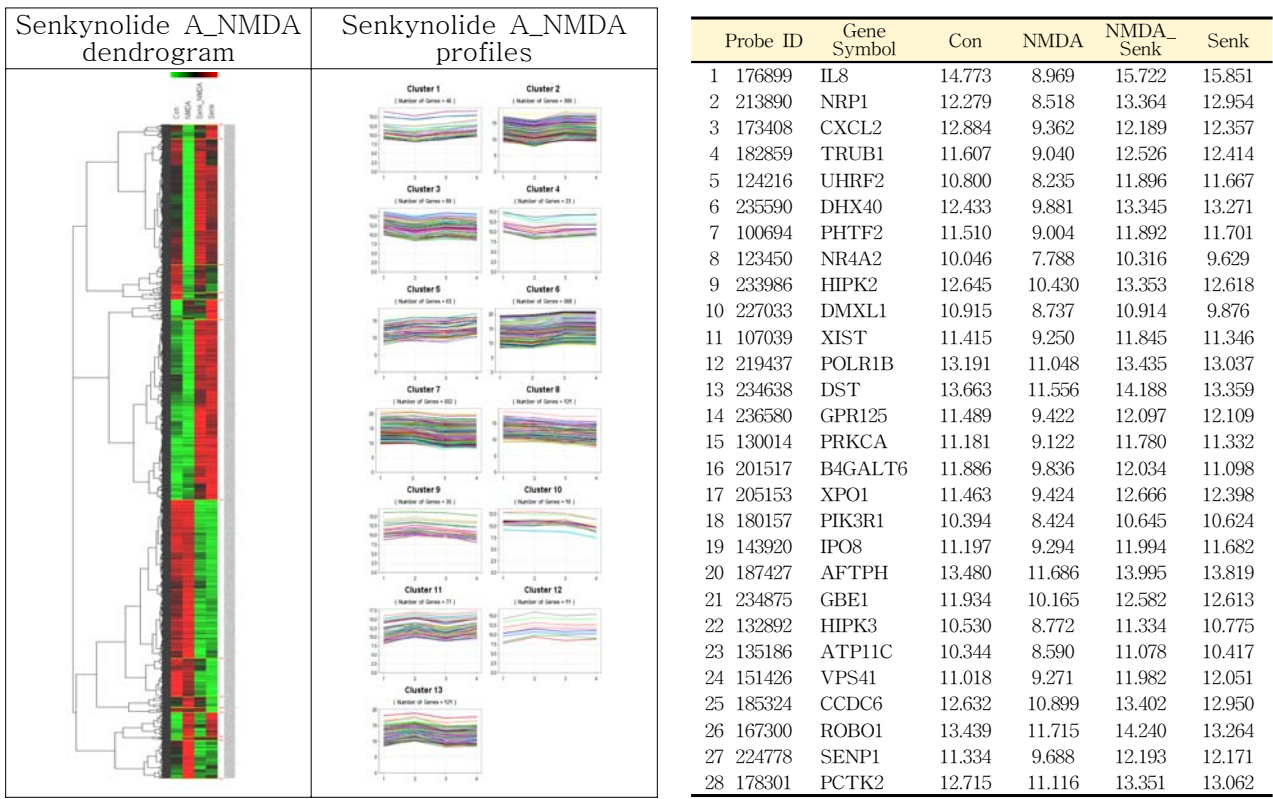


Table 31. Pharmacological active genes selected from the SK-N-SH cells treated A) 100uM Ferulic acid and B) 50uM Ligustilide with or without 100uM NMDA for 24h.

Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_FeA	FeA	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_Lig	Lig		
1	227485	SCOTIN	9.681	11.427	9.181	10.599	1	113036	PARD6B	11.028	9.679	10.942	10.433
2	215361	DAZAP1	9.759	11.121	9.014	10.979	2	167731	MAML2	11.570	10.235	11.462	11.012
3	163073	PSG9	10.761	11.773	9.741	10.075	3	148527	ESCO1	11.972	10.666	11.877	10.861
4	173477	PSG2	12.179	13.281	11.270	11.761	4	214622	FBXL21	13.248	11.935	13.137	13.070
5	137897	TNFRSF12A	14.331	16.436	14.445	13.708	5	167308	CRY1	11.525	9.630	10.822	10.111
6	178131	PCOLN3	10.615	12.238	10.393	10.319	6	148950	SCARF2	10.920	13.309	11.891	12.698
7	165200	UCP2	12.852	14.150	12.329	11.522	7	150170	SLC25A1	14.542	15.900	14.455	15.152
8	160938	TGM1	9.618	10.650	8.968	9.696	8	206444	H2AFX	18.027	19.240	17.786	18.109
9	198888	CRIP1	10.910	11.888	10.343	10.668	9	199976	C10orf54	11.800	13.745	12.291	12.212
10	148242	HSPA1B	13.367	14.272	12.826	13.001	10	125674	PKD2	10.531	11.848	10.279	11.983
11	129361	SLC16A3	15.278	16.442	15.023	14.869	11	181105	DPM2	13.980	15.423	13.845	15.248
12	167575	ABI3	12.858	13.721	12.394	12.426	12	145225	SLC30A7	11.061	12.651	11.065	12.303
13	141668	WISP2	9.742	11.121	9.835	10.237	13	101594	CCDC95	10.098	12.073	10.467	11.249
14	161046	WNT3	11.744	12.690	11.430	11.315	14	177512	RAB4B	10.411	12.136	10.494	11.590
15	234756	TAGLN2	16.391	17.404	16.252	15.957	15	185071	NR2F6	10.219	11.518	9.851	11.341
16	116510	MAGEC3	10.285	11.330	10.181	10.212	16	210222	MGC4618	10.064	11.345	9.519	10.891
17	112112	NUP43	11.680	12.767	11.671	11.957	17	172180	CENPB	10.430	13.069	11.127	12.248
18	117730	SBF2	13.308	11.982	13.097	13.011	18	194434	hCAP-H2	11.210	12.899	10.876	11.792
19	197221	MTHFD2	16.155	15.144	16.305	16.605	19	147144	CSGlcA-T	10.132	12.497	10.378	11.376
20	128967	GARS	16.523	15.520	16.683	16.486	20	134760	FGFRL1	10.767	12.298	10.062	10.828
21	129799	DOCK4	12.221	10.687	11.938	12.004	21	203030	TUBB2B	13.714	14.876	12.486	13.714
22	214622	FBXL21	13.248	11.935	13.299	13.465	22	182241	AGPAT2	10.038	13.278	10.747	12.634
23	167731	MAML2	11.570	10.235	11.614	11.574	23	204042	AP1S1	10.900	13.744	11.194	12.534
24	178884	PCSK5	10.566	8.754	10.182	10.514	24	211134	ARHGDI2	10.122	13.779	11.214	12.956
25	178586	LRP4	13.087	12.085	13.540	13.151	25	105119	TK1	14.277	16.254	13.648	15.077
26	207047	HESX1	10.510	9.179	10.635	10.771	26	216903	REEP4	11.311	13.729	11.115	12.530
27	132892	HIPK3	10.530	8.772	10.330	9.270	27	178131	PCOLN3	10.615	12.238	9.584	11.774
28	123450	NR4A2	10.046	7.788	9.673	9.781	28	165944	PPP5C	10.972	13.723	11.018	12.562
29	222417	STIM1	9.606	8.430	10.417	9.867	29	127877	MAP2K3	10.039	11.513	8.678	9.826

Figure 72. Cluster analysis of genes and pharmacological active genes selected from the groups treated 50uM senkyunolide A with or without NMDA in the SK-N-SH cells for 24h



fold change가 Con_NMDA와 NMDA_FeA 각각에 대하여 3이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Senkyunolide A의 효능 유전자로 선택하였다 (Figure 72).

- 천궁 70% ethanol 추출물과 그 주 구성성분인 FeA, Lig, 및 Senk를 각각 처리한 후 변화된 유전자 중에서 선정된 유의유전자들이 관여하고 있는 biological pathway는 매우 유사한 것으로 나타났으며, 천궁추출물의 주 biological pathway 중 Focal adhesion, Regulation of actin cytoskeleton, MAPK signaling pathway, Tight junction 및 Cell cycle 등은 이들 3종의 물질에 의한 것으로 사료되었다.

3) 천궁의 산지별 효능 유전자 비교

- 천궁의 효능을 산지별로 비교하고자 사업단에서 보내온 시료 15종 한국산(일천궁, *Cnidium officinale* Makino) 3종과 중국산(토천궁, *Ligusticum chuanxiong* Hort) 2종에 대하여 DNA chip 실험을 실시하였다. 시료는 국산 일천궁과 중국산 토천궁 중에서 70% ethanol 추출물의 물질 profile이 조금씩 다른 것을 선정하였다(Figure 72, Table 32).
- 천궁 추출물의 성분을 보았을 때 일천궁이나 토천궁 모두에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-liquistilide 등이 주성분으로 나타나는 것은 같았으나 토천궁에서는 이들 성분 외에 다른 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

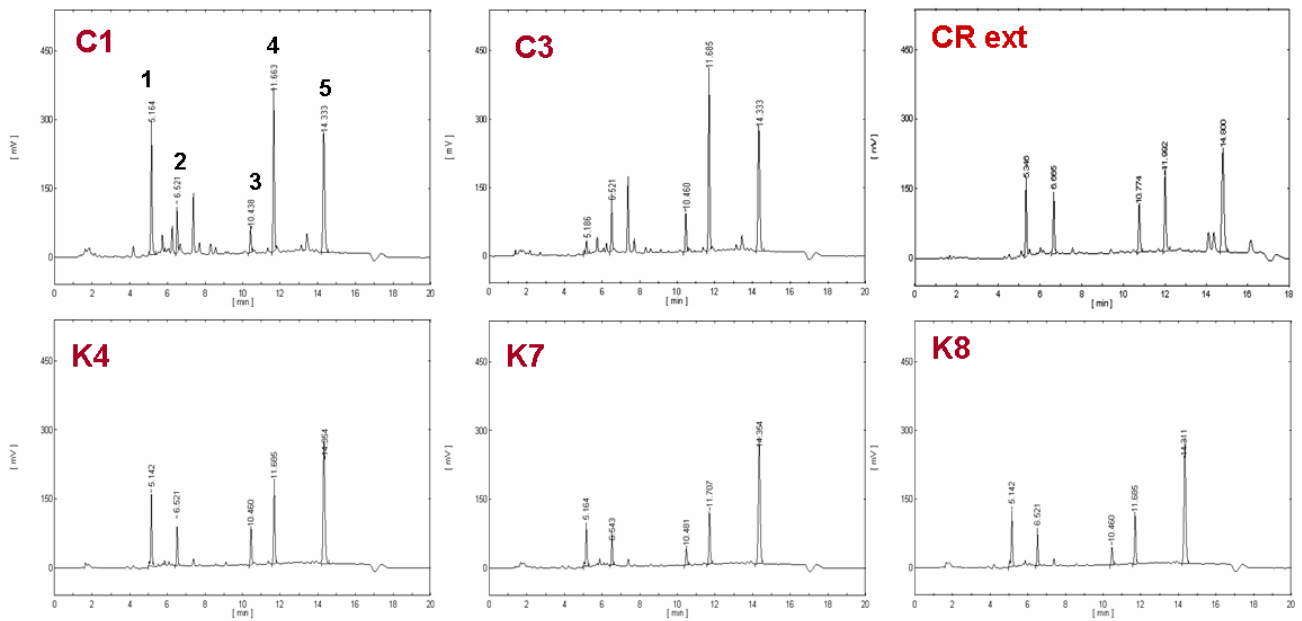


Figure 74. UV chromatograms for the extract samples of *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong*. 1: chlorogenic acid, 2: ferulic acid, 3: senkyunolide A, 4; (Z)-ligustilide, IS: α -naphthoflavone. C1 and C3 were 70% ethanol extract of *Ligusticum chuanxiong* Hort. CR ext, K4, K7 and K8 were 70% ethanol extract of *Cnidium officinale* Makino.

- 각 천궁 추출물에 대한 유의 유전자는 천궁 70% ethanol 추출물을 200ug/mL 농도로 SK-N-SH 세포에 24시간동안 처리한 후 대조군과 비교하여 fold change가 2 이상이고, $P < 0.05$ 로 변화된 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다(Figure 74). 그리고 일천궁 전체 결과와 토천궁 전체 결과에 대한 유의 유전자는 역시 Figure 72에서와 같이 volcano plot을 얻어서 fold change 2 이상이고, $P < 0.05$ 로 변화된 유전자를 구하였다.
- 토천궁과 일천궁 실험 그룹 당 유의유전자 수와 GO 유전자에 대한 정보는 Table 33에 나타내었다.
- 일천궁 전체 결과 Kor를 대조군과 비교하였을 때 442개의 유의 유전자를 얻었으나 토천궁 전체결과 Chi의 경우에는 1019개의 유의 유전자를 얻었으며, 일천궁 추출물에 대한 유의 유전자 수는 토천궁 추출물의 것보다 반 정도로 나타났다.

Table 33. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong* plants based on the results of LC/UV analysis

Sample No.	산지, 구입처	통용명	Content in plant (mg/g plant)			
			Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	중국, 농림	중국산 천궁	4.20	0.79	3.88	4.91
C3	중국, 난주시장	중국약전품	0.54	1.27	9.82	8.65
CR	한국, 강원도 정선	일천궁	2.45	0.79	7.51	2.05
K4	한국, 경북 달성	일천궁	1.96	0.67	6.16	1.65
K7	한국, 경북 영천	일천궁	2.35	0.66	4.78	3.30
K8	한국, 서울 제기동	일천궁	2.60	1.06	4.71	2.57

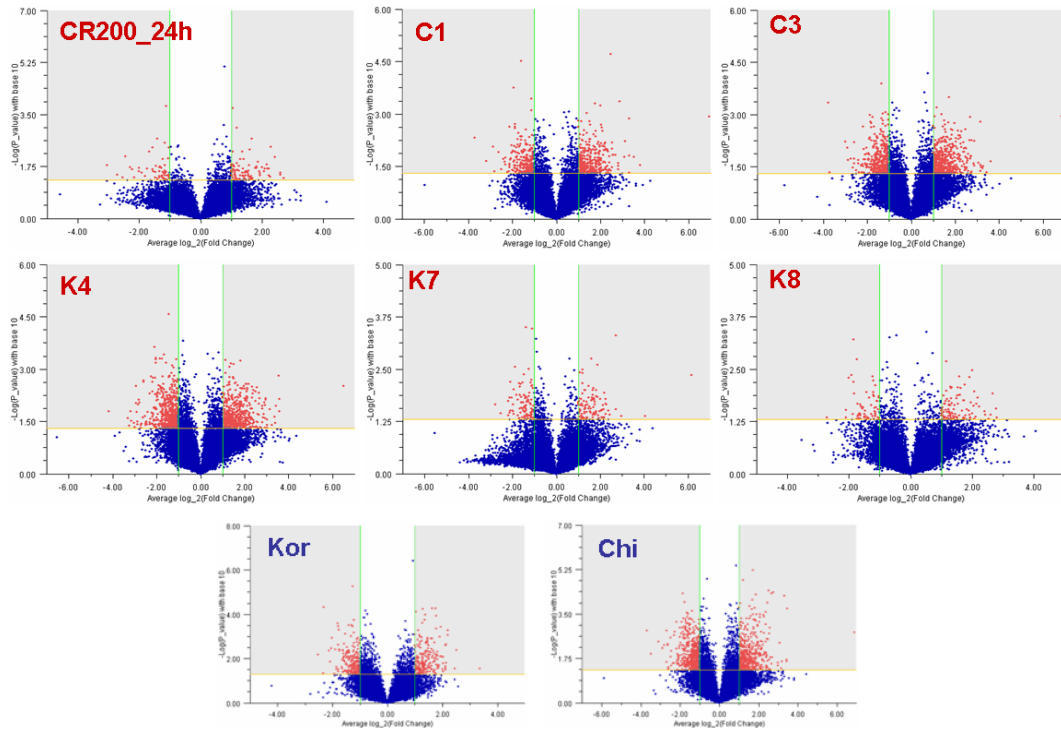


Figure 74. Volcano plots compared the control to the experiments treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location for the selection of biologicalactive genes from in the SK-N-SH cells. Kor were united the results of CR200, K4, K7, and K8. Chi were merged the results of C1 and C3.

- 토천궁과 일천궁의 유의 유전자 중에서 공통적인 유전자를 관찰하였을 때 Figure 75의 Vendiagram 에서와 같이 공통적으로 발현이 증가되는 유전자는 155개, 감소되는 유전자는 176개로 나타났다.

Table 31. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino or those of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO 유전자)	Down (GO 유전자)	Common (GO 유전자)	Total (GO 유전자)
CR_Kor	Kor	Con_24h	210 (118)	232 (138)		
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)		
	K4	Con_24h	545 (373)	498 (329)	3(2)	1301(833)
	K7	Con_24h	95 (61)	99 (61)		
	K8	Con_24h	65 (34)	102 (58)		
LC_Chi	Chi	Con_24h	465 (299)	544 (347)		
	C1	Con_24h	249 (150)	323 (220)	362(248)	1085(679)
	C3	Con_24h	404 (264)	471 (293)		
천궁추출물	Total	Con_24h	131 (78)	164 (114)		

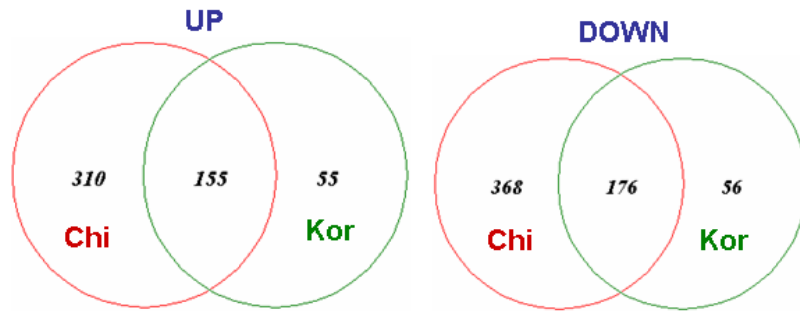


Figure 75. Vendiagram of common genes upregulated or down-regulated by the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (Chi) in SK-N-SH cells.

- 일천궁과 토천궁 추출물에 의하여 발현이 유의적으로 변화된 유전자들을 합하여 Hierarchical clustering하였을 때, Figure 76에서와 같이 6개의 cluster로 나누었으며, 일천궁과 토천궁에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하였을 때 정도 차이는 있었으나 전반적으로 유사한 경향을 나타내었다.

Figure 76. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

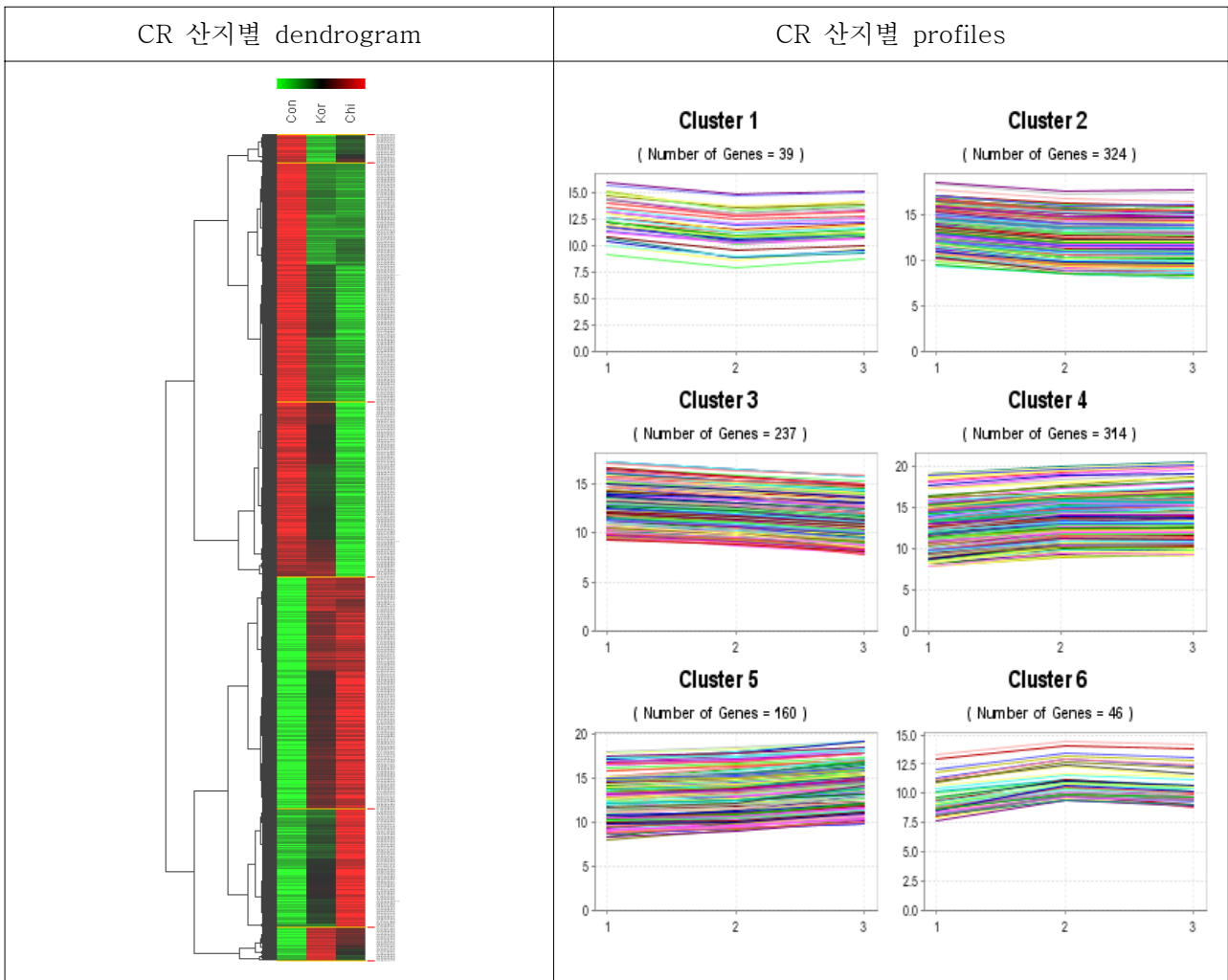


Table 34. Major biological pathways of the significant genes (fold change>2, P<0.05) selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

	Korea		China	
	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
1	Regulation of actin cytoskeleton	9	Cell cycle	21
2	MAPK signaling pathway	9	Purine metabolism	13
3	Cell cycle	9	Pyrimidine metabolism	12
4	Calcium signaling pathway	8	MAPK signaling pathway	12
5	Purine metabolism	6	Regulation of actin cytoskeleton	11
6	Focal adhesion	6	Axon guidance	9
7	Pyrimidine metabolism	5	Focal adhesion	8
8	Jak-STAT signaling pathway	5	Calcium signaling pathway	7
9	Complement and coagulation cascades	5	Tight junction	6
10	Wnt signaling pathway	4	Jak-STAT signaling pathway	6
11	T cell receptor signaling pathway	4	Cytokine-cytokine receptor interaction	6
12	Neuroactive ligand-receptor interaction	4	ABC transporters - General	6
13	ECM-receptor interaction	4	Complement and coagulation cascades	6

- 일천궁과 토천궁 추출물의 유의 유전자들에 대한 biological pathway를 관찰하였을 때 Table 34에서와 같이 Regulation of actin, cytoskeleton, MAPK signaling pathway, Cell cycle, Calcium signaling pathway, Purine metabolism, Focal adhesion, 및 Pyrimidine metabolism pathway에 관련되어 있었으며, 중국산 토천궁에서는 Axon guidance에 관련된 유전자가 국산 일천궁 보다 눈에 띄었다.
- 국산 일천궁과 중국산 토천궁 추출물의 유의 유전자들의 biological pathway 중에서 cell cycle에 대한 것을 비교하였을 때 국산 일천궁에 의해서 9개 단백질이, 중국산 토천궁에 의해서는 21개의 단백질의 발현 변화가 되었으며 이들을 KEGG chart로 나타내었을 때 Figure 77과 같았다. 대부분의 cell cycle 관련 단백질의 발현은 down regulation 되었으며, cell cycle이 저해되는 경향으로 나타날 것으로 예상되었다.
- 이러한 일천궁과 토천궁 추출물에 의한 발현 차이는 주성분은 유사하나 다른 성분들이 토천궁에 많이 함유되어 있어 이들에 의하여 유의 유전자 수가 많아지고 효능이 더욱 강하게 나타날 것으로 사료되었다.
- 국산 일천궁의 경우에 성분 중 전반적으로 senkyunolide A나 Z-ligustilide의 함량이 토천궁 보다 적었으나(1세부 분석됨), chlorogenic acid나 ferulic acid는 차이가 없었다. 특히 토천궁의 경우 senkyunolide A나 Z-ligustilide의 평균 함량은 국산 일천궁에 비하여 약 2배 정도 많이 있었으나 SD값 역시 평균 값 만큼 크게 나타나 산지에 따라 함량 차이가 많이 나는 것을 알 수 있었다.

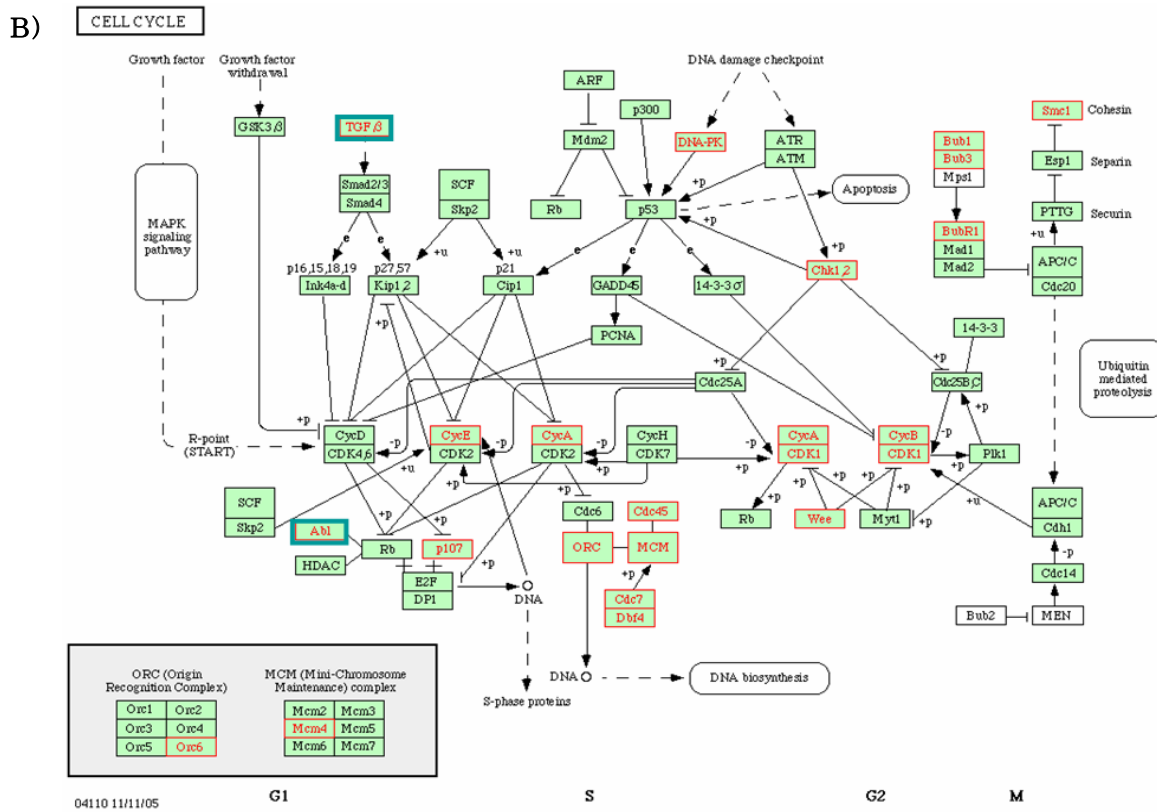
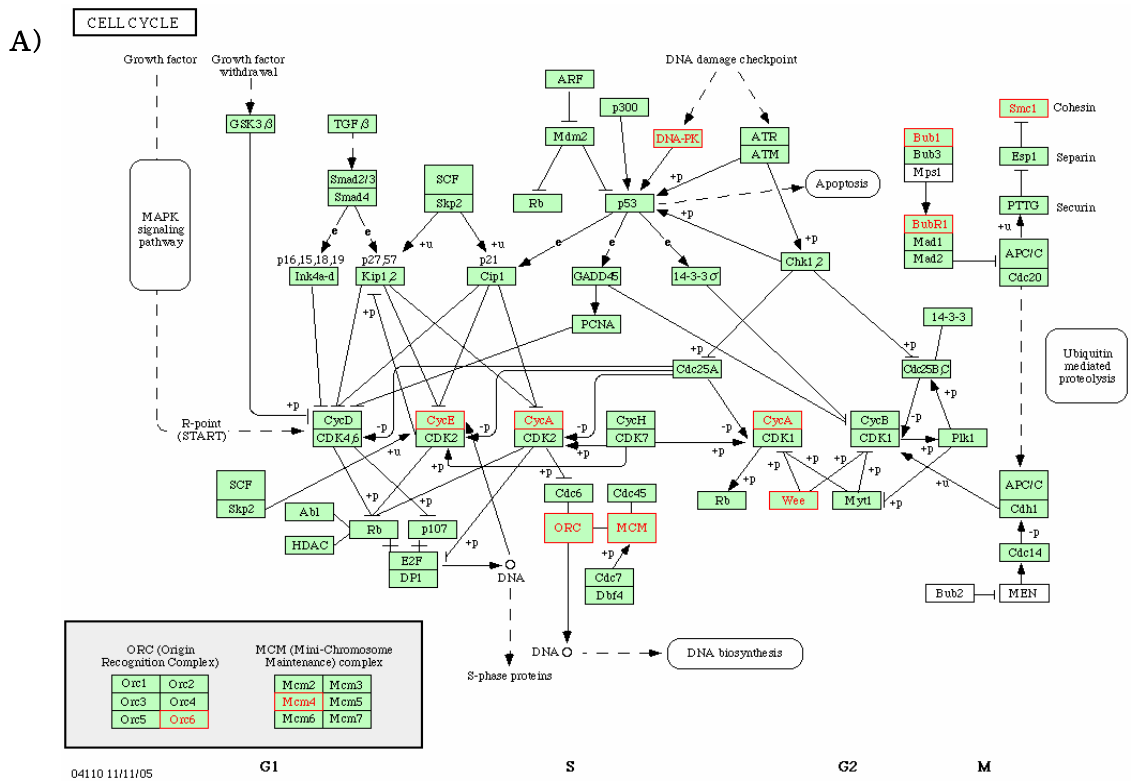
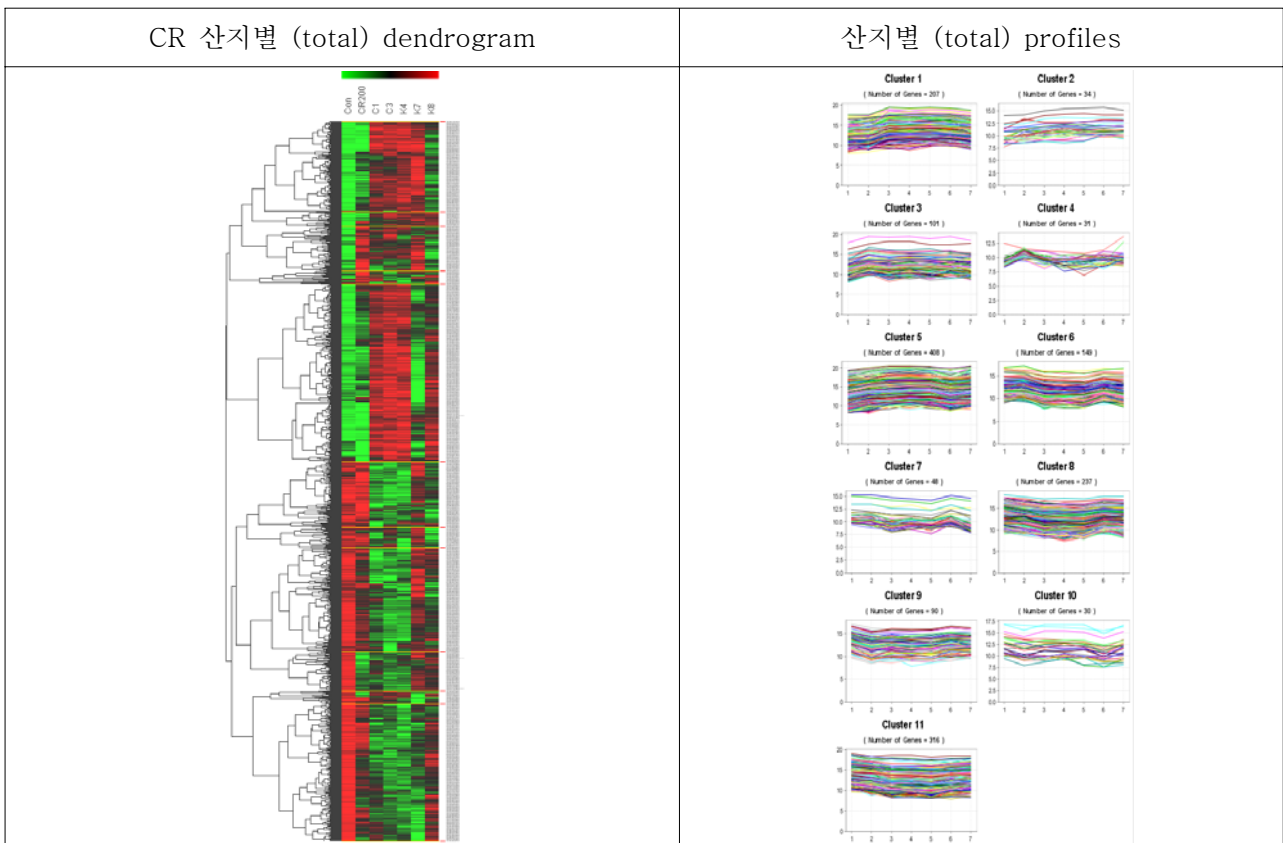


Figure 77. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(B) for 24h in cell cycle pathway. Red and blue lines were indicated the up-regulated and down-regulated genes.

- 다음에는 일천궁과 토천궁을 산지별로 나누어 유의 유전자에 대한 분석을 실시하였다. 산지별 천궁의 Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y축은 Welch's T-test 결과를 나타냄) 을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test < 0.05의 유의성을 나타내는 유전자를 선정하였다 (Figure 74, Table 33).
- 국산 일천궁의 경우 본 과제에서 천궁 sample로 사용한 CR의 경우 유의 유전자수가 발현이 증가되는 것은 94개 이었고 감소되는 것은 58개로 총 154개로 나타났다. K7이나 K8의 경우 유의 유전자가 각각 194, 167개로 나타나 CR과 유사했으나 경북 달성에서 구입한 K4의 경우 유의 유전자수가 총 1043개로 다른 국산 일천궁에 배하여 유의 유전자수가 약 5배 이상 크게 나타났다.
- 일천궁 각각으로부터 얻은 유의 유전자 중 공통적으로 나타난 것은 3개로 그 중 pirin (iron-binding nuclear protein)과 NDRG family member 4 등 2 종만이 GO 유전자이었다.
- 중국산 천궁의 경우 C1에서는 유의 유전자가 572개로 발현이 증가되는 것은 249개 이었고 감소되는 것은 323개 이었다. C3의 경우 중국 약전품으로 875개의 유의 유전자가 선정되었으며, 이 중 발현이 증가되는 것과 감소되는 것은 각각 404종과 471종이 차지하고 있었다. 전체적으로 보았을 때 국산 일천궁과 비교하였을 때 K4를 제외한 국산 일천궁의 유의 유전자 수에 비하여 약 2-3배 정도가 많이 선정되었다.
- Table 33에서와 같이 각 산지별 유의 유전자를 구한 후 일천궁과 중국산 천궁에서 공통적인 유의 유전자는 pirin (iron-binding nuclear protein)한 종류로 천궁추출물에 의하여 5.04 ± 1.08 배가 증가되었다.

Figure 78. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.



- Figure 78에서 total 유의 유전자들의 발현 양상을 보았을 때 C1과 C3 및 K4가 유사한 발현 양상을 나타냈으며, CR, K7 및 K8의 경우에는 그 발현양상에 공통점이 크지 않았다. 이러한 결과는 C1, C3 및 K4는 유효 성분들의 함량이 높아서 유전자 발현변화가 잘 나타났으나 CR, K7 및 K8의 경우에는 유효 성분들의 함량이 적은 편이라 천궁에 의한 전형적인 유전자 발현을 나타내기 위해서는 좀 더 높은 농도가 필요할 것으로 사료되었다.
- 산지별 천궁 추출물에 대한 유의 유전자들을 발현이 증가되는 유전자와 감소되는 유전자로 나누어 관련된 biological pathway를 조사하였다. 발현이 증가되는 유의 유전자는 764개로 이중 GO 유전자는 462개였으나 pathway analysis에 분류되어 있는 유전자는 131개 밖에 되지 않았다(Table 35). 그것을 biological pathway로 분류하였을 때 Table 35에서와 같이 주로 focal adhesion 관련 경로에 가장 많은 9종의 유전자들이 관련되었으며, 다음에는 Wnt signaling으로 8종, MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Axon guidance 관련 유전자가 7종이 있었다.
- 산지별 천궁 추출물에 의하여 up-regulation되는 유의 유전자가 가장 많이 관련되어 있는 focal adhesion pathway를 KEGG chart로 관찰하였을 때 Figure 79와 같이 나타났다. ECM은 주로 laminin들로 laminin γ 3, β 2, β 3와 α 5가 관여되어 있으며, ITGB는 integrin beta 4으로 나타났다. 그리고 GF에는 placenta growth factor가 RTK에는 platelet-derived growth factor receptor alpha와 platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase가 관련되어 있었다. 이러한 결과는 천궁 추출물에 의하여 focal adhesion pathway의 상위 부분에 영향을 미쳐서 전체 관련 경로가 stimulation 될 것으로 사료되었다.
- 산지별 천궁 추출물을 처리하였을 때 발현이 감소된 유의 유전자수는 893개로 증가된 유전자보다 숫자가 많았으며, 그 중 GO 유전자는 565개이고 pathway 관련 유전자는 150개 밖에 되지 않았다. 이것을 관련 biological pathway로 나누어 봤을 때 주로 cell cycle 관련 유전자가 23종으로 가장 많았으며, 다음에 DNA metabolism과 관련된 pyrimidine metabolism 및 purin metabolism에 관련된 유전자

Table 35. Major biological pathways of the up-regulated or down-regulated significant genes (fold change>2, P<0.05) selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

Rank	UP (131/462/764)		DOWN (150/565/893)	
	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
1	Focal adhesion	9	Cell cycle	23
2	Wnt signaling pathway	8	Pyrimidine metabolism	18
3	MAPK signaling pathway	7	Purine metabolism	18
4	Calcium signaling pathway	7	MAPK signaling pathway	13
5	Axon guidance	7	Regulation of actin cytoskeleton	11
6	Regulation of actin cytoskeleton	6	Tight junction	8
7	Porphyrin and chlorophyll metabolism	6	TGF-beta signaling pathway	8
8	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6	Neuroactive ligand-receptor interaction	8
9	Glutathione metabolism	6	Axon guidance	8
10	ECM-receptor interaction	6	Tryptophan metabolism	7

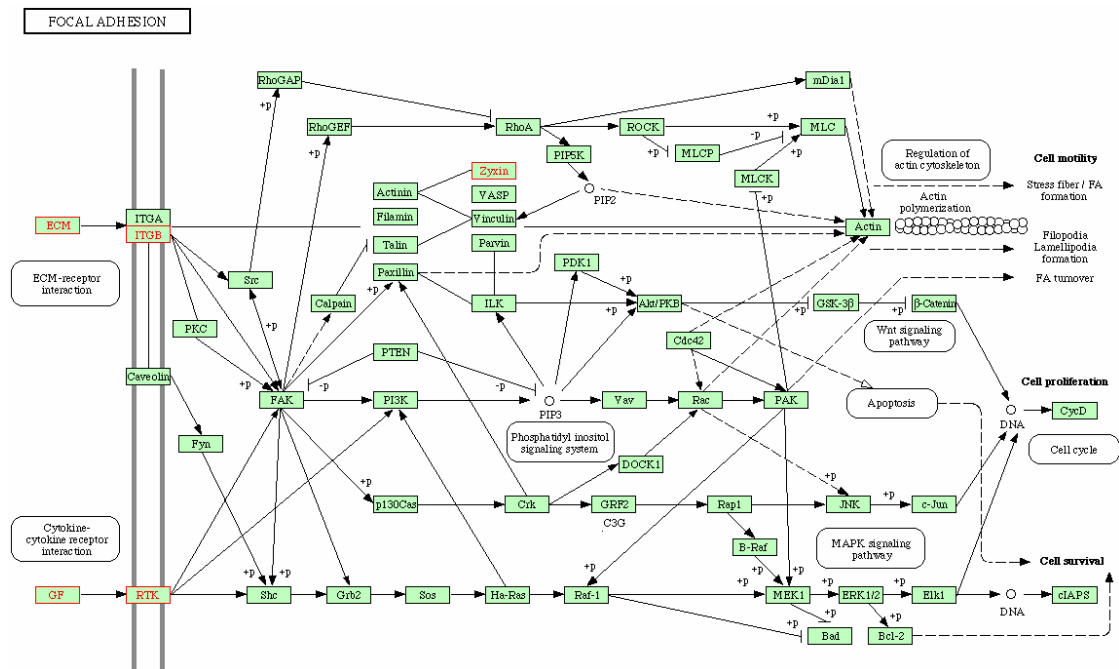


Figure 79. Genes which were obtained from merging the up-regulated significant genes selected by treating the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(B) which were cultivated at different place in focal adhesion pathway.

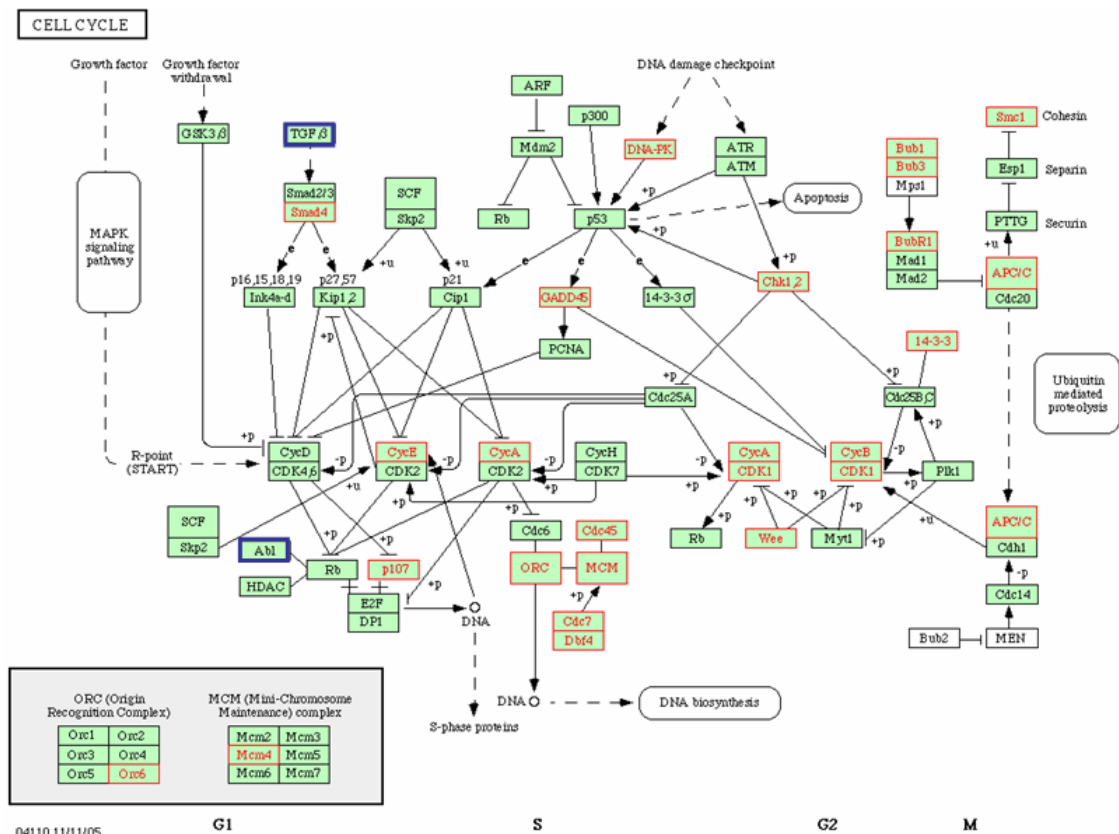


Figure 80. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(B) which were cultivated at different place in cell cycle pathway. Red and blue lines were indicated the up-regulated and down-regulated genes.

들이 각각 18종으로 다음을 차지하였다(Table 35). 그리고 그 다음이 MAPK signaling pathway로 13 종이 차지하고 있었으며, 흥미롭게도 산지별 천궁 추출물에 의하여 MAPK signaling pathway 중 7 종은 증가하기도 하였다.

- 산지별 천궁 추출물을 처리하였을 때 발현이 감소된 유의 유전자수가 가장 많이 관여하는 경로인 cell cycle pathway를 관찰하였을 때 Figure 80에서와 같이 23개의 유전자는 cell cycle 관련 단백질의 발현을 저해시켰으며, 2종 즉 TGFβ와 ab11의 발현을 증가시켰으나 이들은 전반적으로 cell cycle 을 저해하는 쪽으로 관여하고 있음을 알 수 있었다.

4) 천궁의 품질 관리를 위한 biological pattern recognition analysis의 적용

- 천궁에 대한 유의 유전자를 이용한 생물학적 품질 관리법을 확립하기 위하여 산지별 유의 유전자를 모두 합한 1651 종의 유전자를 이용하여 패턴 인식 분석을 수행하였다. 패턴 인식 분석법으로 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하고, 패턴 분석 결과를 수치화하기 위하여 각 시료 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다 (Figure 81-82, Table 36).
- Figure 81-A의 3차원 PCA graph를 보았을 때 대조군(con) 3개의 sample과 천궁 추출물들에 대한 결과가 나뉘는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 국산 일천궁 K7의 한 sample과 본 과제에서 천궁으로 사용한 CR sample 3종은 다른 천궁 sample들 즉 중국산 천궁 C1, C3이나 일천궁 중 K4, K8과 K7의 한 sample과는 다른 위치에 존재함을 알 수 있었다. 이들 각 sample에 대한 Hierarchical clustering과 비교하였을 때 이들 sample의 유전자 발현 pattern은 유사하고 다른 천궁 sample들과는 다른 것을 알 수 있었다(Figure 81-E). 그러니 3차원 그래프를 2차원으로 나누어 관찰하였을 때 XY 축 면에서는 K7 외에도 C1이 차이가 많이 나는 것을 알 수 있었으며(Figure 81-B), 이 역시 Hierarchical clustering에서 두군 간에 차이가 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 전반적인 천궁 추출물과 대조군과는 유사성이 떨어지는 것이 관찰되었다. YZ 축에서는 역시 K7과 C1이 차이가 많이 나는 것이 보였으나, 이때는 대조군의 위치가 중간으로 들어가 천궁과의 차이를 관찰하기가 힘들었다 (Figure 81-C). XZ 축에서는 3차원의 그래프와 유사하게 나타나 K7과 CR이 대조군과 유사하였으며, 나머지 군들은 그룹을 이루고 있었다(Figure 81-D).
- PCA 결과를 similarity index (SI)와 비교하였을 때 (Table 36) 대부분 값이 0.70-0.98 정도를 나타내고 있었으며, 이는 중국산이나 한국산이나 그 값의 차이가 실험오차 안에 있었으며(Figure 82), 처리한 200ug/mL 농도에서 천궁의 약리작용이 그리 크지 않거나 비교 유전자수가 너무 많아서 또는 선정 유전자의 종류에 따라서 대조군과 큰 차이를 나타내지 않을 수도 있을 것으로 사료되었다.
- 유전자 수를 적게 하기 위하여 천궁 추출물 200ug/mL을 24시간 동안 처리한 후 volcano plot으로부터 fold change 2이상, P<0.05인 유의 유전자 152 종을 선정하여 천궁 추출물들 외에 그 구성성분인 ferulic acid, ligustilide, senkyunolide와 NMDA의 결과에 대해서도 함께 PCA를 시행하였다.
- 각 처리군 별로 유전자 발현 값에 대하여 평균값을 구하여 PCA를 실시하였다. Figure 83-A에서와 같이 3D graph로 나타내었을 때 CR20이나 CR200군은 유사하게 나타났으며, 대조군이나 다른 군들과는 차이가 있었다. K4, C1과 C3는 역시 유사한 위치에 존재하였으며, NMDA, Fe나 Lig 군이 함께 유사한 위치에 존재하였으나 대조군이나 CR들과는 다른 위치에 있었으며, Senk 군이 다른 실험군과 가장 멀리 있어 유전자 발현이 차이가 많이 날 것으로 예상되었다. 이러한 PCA 결과를 Hierarchical clustering과 비교하였을 때 Figure 83-B에서와 같이 유전자 발현 변화에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

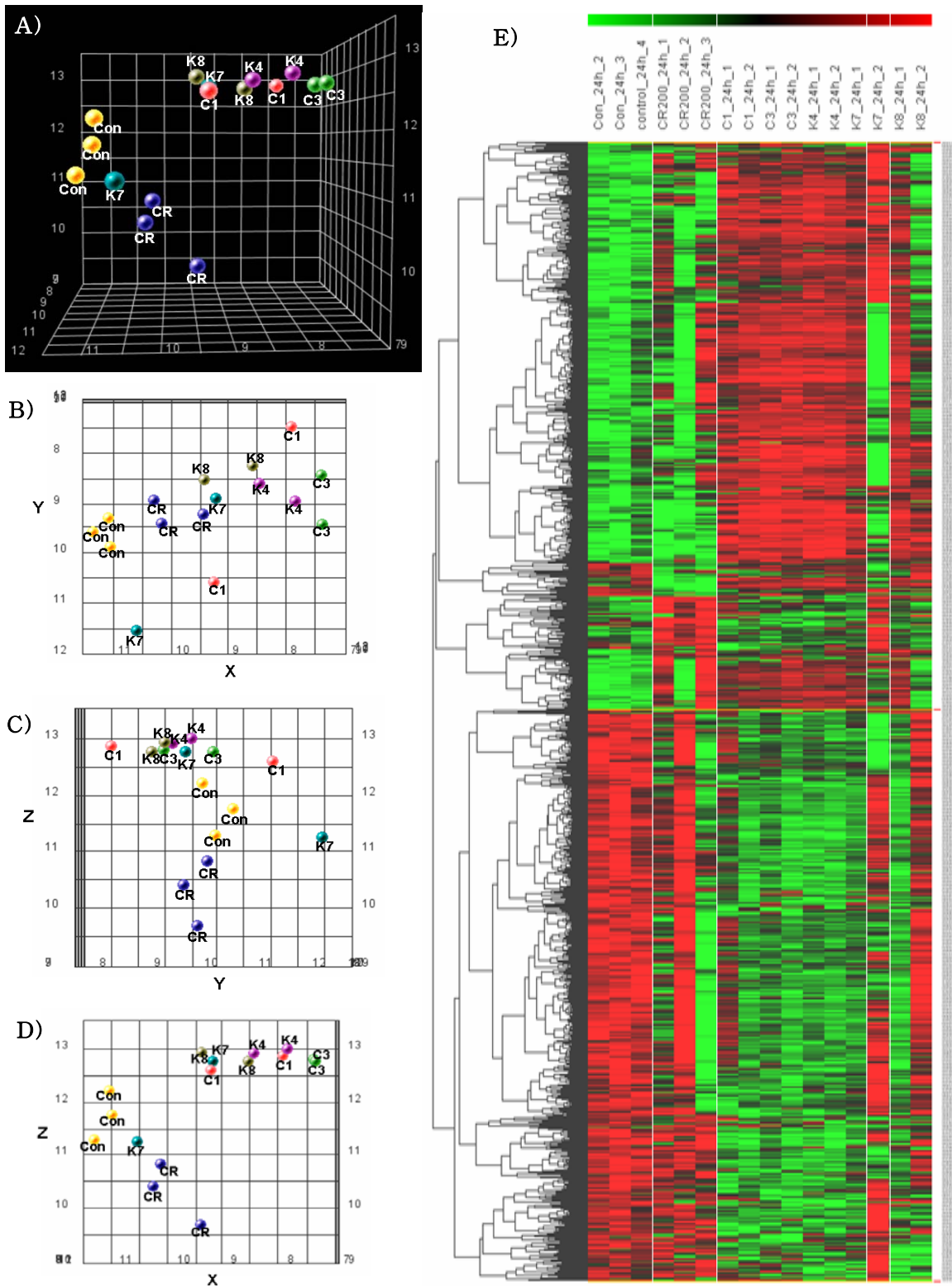


Figure 81. PCA plots and Hierarchical clustering dendrogram for the 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells. A) 3D-PCA graph, B) 2D XY-PCA graph, C) 2D-YZ-PCA graph, D) 2D-XZ-PCA graph and E) Hierarchical clustering dendrogram

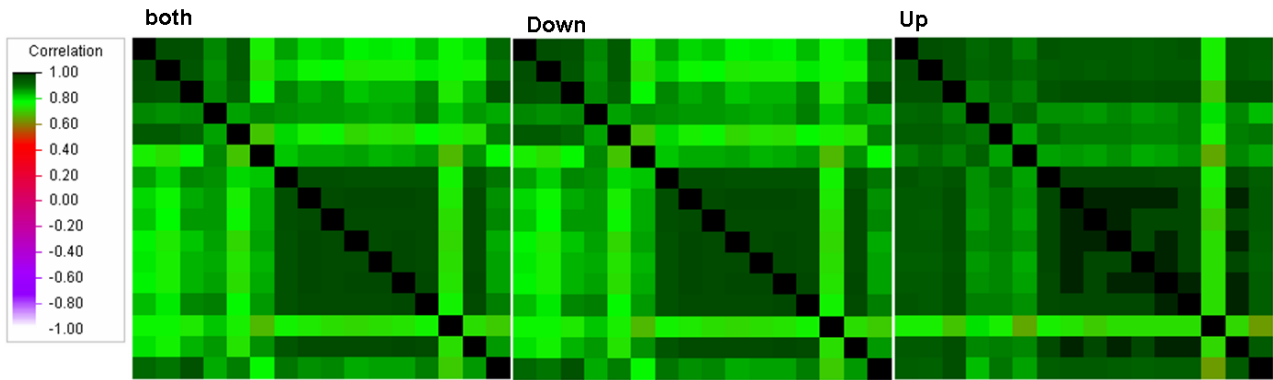
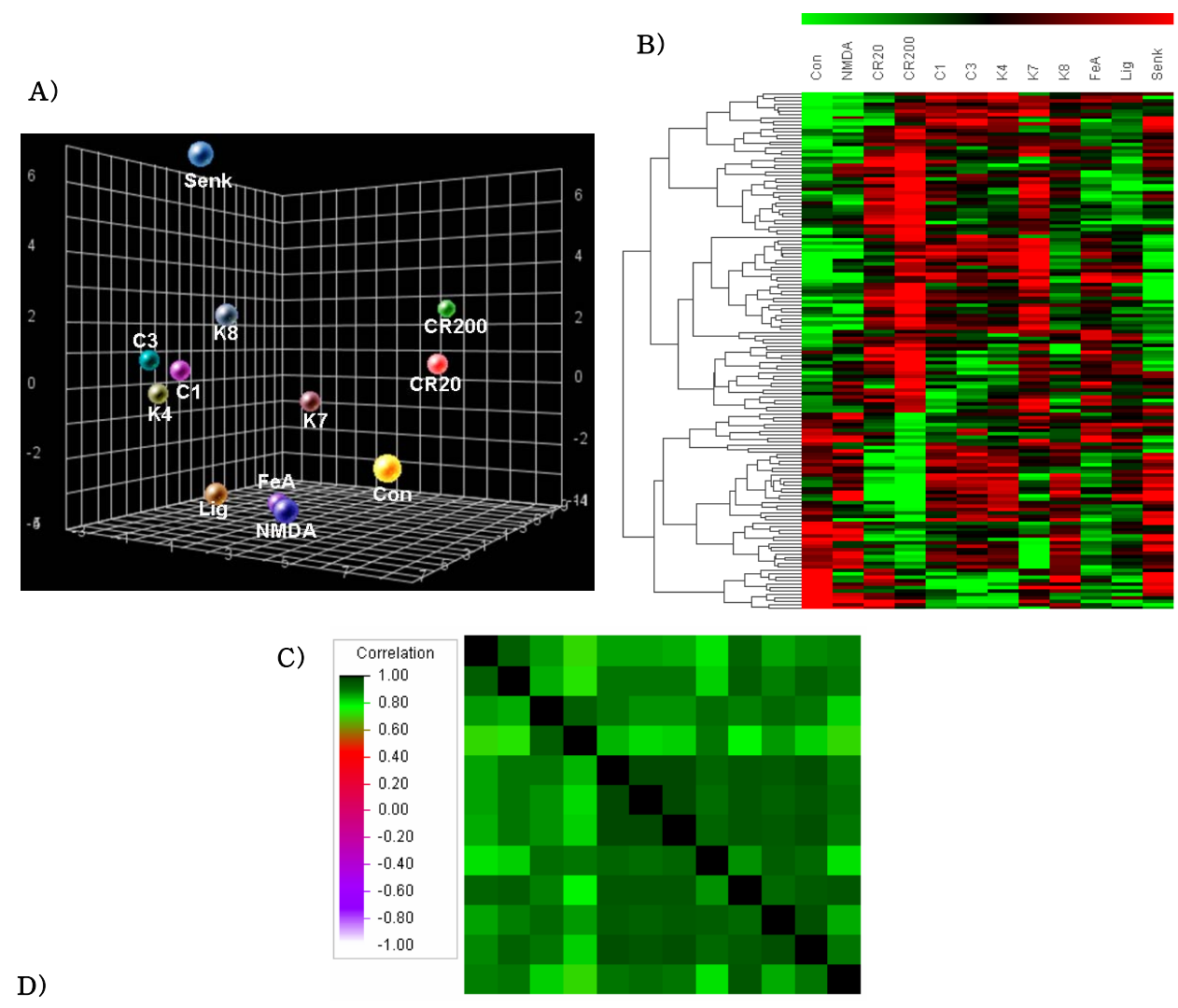


Figure 82. Similarity analysis of 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

Table 36. Similarity index of 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

Sample	Con_1	Con_2	Con_3	CR200_1	CR200_2	CR200_3	C1_1	C1_2	C3_1	C3_2	K4_1	K4_2	K7_1	K7_2	K8_1	K8_2
Con_1	1.000															
Con_2	0.962	1.000														
Con_3	0.959	0.953	1.000													
CR200_1	0.881	0.868	0.878	1.000												
CR200_2	0.938	0.939	0.917	0.852	1.000											
CR200_3	0.746	0.725	0.767	0.882	0.693	1.000										
C1_1	0.853	0.813	0.880	0.874	0.811	0.822	1.000									
C1_2	0.806	0.764	0.848	0.863	0.743	0.850	0.962	1.000								
C3_1	0.822	0.780	0.864	0.863	0.760	0.848	0.963	0.975	1.000							
C3_2	0.781	0.736	0.825	0.856	0.715	0.854	0.956	0.979	0.975	1.000						
K4_1	0.791	0.748	0.838	0.850	0.734	0.839	0.959	0.978	0.972	0.975	1.000					
K4_2	0.787	0.746	0.836	0.854	0.724	0.846	0.957	0.982	0.973	0.980	0.983	1.000				
K7_1	0.835	0.797	0.877	0.887	0.773	0.860	0.959	0.974	0.973	0.971	0.975	0.977	1.000			
K7_2	0.762	0.762	0.735	0.824	0.747	0.679	0.756	0.737	0.724	0.717	0.726	0.727	0.750	1.000		
K8_1	0.798	0.757	0.843	0.867	0.733	0.867	0.950	0.976	0.970	0.975	0.975	0.977	0.976	0.726	1.000	
K8_2	0.911	0.895	0.956	0.845	0.885	0.770	0.897	0.868	0.882	0.846	0.858	0.857	0.885	0.702	0.864	1.000

- 이들 유전자에 대한 correlation plot에서도 색깔이 연두색 이상으로 나타나 유사성이 매우 높을 것이 예상되었으며(Figure 83-C), 실제로 similarity index를 관찰하였을 때 (Figure 83-D), 최대 유사치는 0.981로 C3와 K4가 가장 발현이 유사하게 나타났으며, 최소 유사치는 대조군과 CR200 사이의 0.711로 나타나 이는 유전자 선정을 대조군과 CR200 사이에서 선정했기 때문일 것으로 사료되었다. 그 외의 다른 물질들과의 SI 값은 0.711-0.981사이에 존재했으며, SI 값이 예상한 것보다 매우 높게 나타났다.
- DNA chip 실험결과를 이용한 biological finger printing을 위한 PCA를 위하여 좀더 엄격한 기준을 적용하여 분석을 실시하였다(Figure 85). 천궁 추출물들 즉 일천궁과 토천궁 전체 결과를 합하여 천궁결과로 두고 이를 대조군과 비교하여 4배 이상 증가되며, $P < 0.05$ 인 유전자를 선정하여 33개를 얻었다. 이를 PCA 기준을 잡아 분석을 실시하였다.



Sample	Con	NMDA	CR20	CR200	C1	C3	K4	K7	K8	FeA	Lig	Senk
Con	1.000											
NMDA	0.930	1.000										
CR20	0.861	0.851	1.000									
CR200	0.711	0.727	0.935	1.000								
C1	0.852	0.893	0.893	0.836	1.000							
C3	0.853	0.895	0.874	0.806	0.978	1.000						
K4	0.848	0.898	0.875	0.814	0.978	0.981	1.000					
K7	0.798	0.816	0.904	0.891	0.919	0.902	0.916	1.000				
K8	0.915	0.930	0.885	0.786	0.952	0.950	0.947	0.874	1.000			
FeA	0.853	0.883	0.912	0.865	0.943	0.929	0.940	0.932	0.912	1.000		
Lig	0.875	0.927	0.894	0.817	0.962	0.951	0.963	0.913	0.941	0.968	1.000	
Senk	0.886	0.894	0.820	0.717	0.896	0.902	0.892	0.800	0.946	0.845	0.891	1.000

Figure 83. PCA (A), Hierarchical clustering (B), correlation plot (C) and similarity index of 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location, and their major components and NMDA using the 152 significant genes selected from the CR200 group treated with 200ug of the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino for 24h in the SK-N-SH cells.

- Figure 85-A와 B에서와 같이 PCA pattern에서 대조군을 기준으로 관찰하였을 때, CR의 경우 20과 200ug/mL을 처리하였을 때 대조군과의 거리가 처리 농도에 따라 멀어짐을 알 수 있었다. 그러나 여전히 일천궁 간의 결과들은 매우 많이 다름을 알 수 있었고, C1, C3 및 K4는 유사함을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 similarity index (Figure 85-E)에서도 잘 나타나 있었다. SI 값을 보면 이전의 분석과는 달리 최소값이 0.113이었고 최대는 0.992로 나타났으며, 평균값은 0.658이었다. SI값이 Lig, Senk 및 FeA 등은 천궁과 차이가 낮으나 대조군과의 차이보다는 작았다. 이러한 결과는 이들이 천궁의 구성성분이기 때문일 것으로 사료되었다, NMDA 역시 대조군과 차이가 있었으나 (SI=0.615), 천궁이나 천궁 추출물들과의 차이는 상대적으로 적게 나타났으며, 이러한 결과는 천궁 발현결과를 대조군과 비교하여 얻은 결과를 그 기준으로 삼아, NMDA나 다른 물질들에 의한 변화에는 기준으로는 좋지 않은 것으로 나타났다.
- 이상의 PCA 결과는 DNA chip의 실험 조건을 잘 잡고 실험 간의 variation을 줄이고, 한약재 추출물들에 대한 유의 유전자들에 대한 similarity 및 패턴 인식 분석을 통해서 biological finger printing이 가능할 것이라는 것을 제시하고 있다.

5) DNA microarray 결과 검증

- 천궁 추출물 및 그 함유 물질 3종에 대해 선정했던 약리효능 유전자를 cyber green dye를 사용하여 realtime PCR을 실시하여 검증하였다. Realtime PCR의 경우 그 PCR product가 DNA microarray의 oligo probe 주변을 중심으로 100-200bp를 갖도록 primer를 디자인하여 실험하였다. Realtime PCR 실험 결과를 관찰하였을 때 realtime PCR을 3반복했을 때 각 cycle이 별차이 없는 것을 확인한 후 각 primer 사용에 따른 realtime PCR cycle 결과를 구하여 각 유전자의 mRNA량 변화를 관찰하였다.
- 천궁 70% EtOH 추출물과 주성분인 Ferulic acid (FeA), Ligustilide(Lig) 및 Senkyunolide A (Senk)에 대한 약리효능 유전자에 대한 realtime PCR의 결과 및 사용한 primer는 Table 37에 나타내었다.
- 약리효능 유전자는 천궁 추출물이나 그 주성분들만 각각 처리했을 때 변화된 유전자 발현과는 관계 없이 NMDA 처리시 증가되거나 감소된 것을 이들 물질들과 함께 처리했을 때 원 상태로 돌아가는 것을 중심으로 하여 선정한 것이었다. 천궁 추출물의 경우에는 유의유전자로 선정한 총 31종의 유전자 중에서 2종은 PCR 결과가 잘 나타나왔다. 그리고 PCR 결과를 DNA chip 결과와 비교하여 경향이 일치하였을 때는 o 표로, 어느 정도 경향만 나타냈을 때는 △로, 틀렸을 경우에는 x 표로 나타내었을 때 표 52-a, b, 및 C에서와 같이 일치되는 결과가 별로 없었다. 이러한 결과들은 사용한 천궁의 효능이 크지 않아서 그럴 수도 있겠고, NMDA 처리가 한 요인으로 더 작용하여 나타난 결과일 것으로 사료되었다.

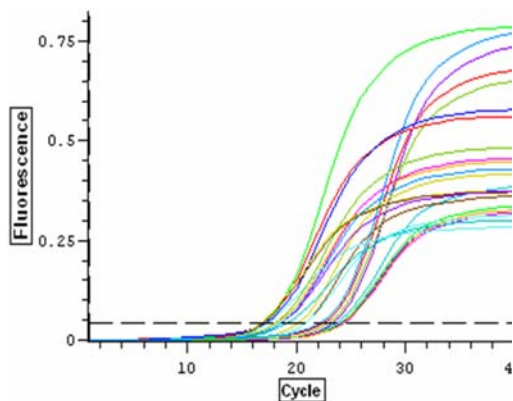
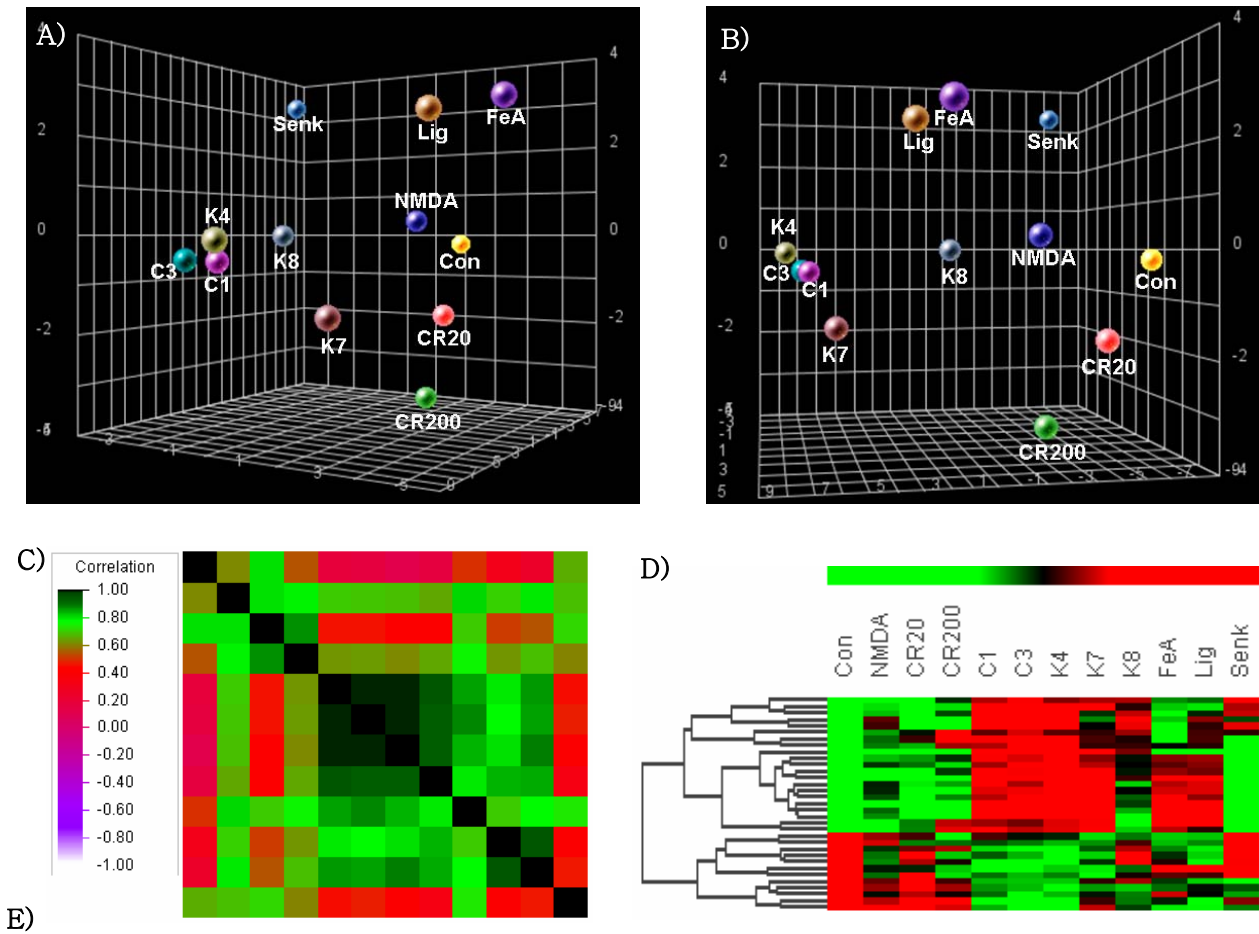


Figure 82. Amplification plots of Realtime PCR cycle



Sample	Con	NMDA	CR20	CR200	C1	C3	K4	K7	K8	FeA	Lig	Senk
Con	1.000											
NMDA	0.615	1.000										
CR20	0.804	0.805	1.000									
CR200	0.543	0.786	0.874	1.000								
C1	0.186	0.696	0.457	0.630	1.000							
C3	0.166	0.694	0.456	0.638	0.992	1.000						
K4	0.113	0.686	0.413	0.612	0.987	0.988	1.000					
K7	0.170	0.652	0.429	0.650	0.950	0.933	0.937	1.000				
K8	0.494	0.812	0.697	0.765	0.859	0.876	0.839	0.789	1.000			
FeA	0.305	0.703	0.514	0.626	0.792	0.775	0.803	0.839	0.701	1.000		
Lig	0.248	0.794	0.541	0.682	0.863	0.856	0.886	0.847	0.777	0.946	1.000	
Senk	0.657	0.685	0.717	0.607	0.449	0.469	0.402	0.336	0.741	0.399	0.465	1.000

Figure 84. PCA (A and B), Hierarchical clustering (C), correlation plot (D) and similarity index (E) of 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location, and their major components and NMDA using the 33 significant genes.

33 significant genes were selected from the criteria, fold induction > 4 and P<0.05, in the merged results treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) in the SK-N-SH cells for 24h.

Table 37. Validation of pharmacological effective genes using real time PCR with cyber green dye.

a. 70% Ethanol extract of *Cnidii Rhizoma*

ID	Gene Symbol	primers (S, AS)	PCR product (bp)	Fold induction						Result
				DNA chip			Realtime PCR			
				NMDA	NMDA+ CR200	CR200	NMDA	NMDA+ CR200	CR200	
192466	GSG1	ACCACCAGCCAAGAGAGAAA GTTCCAGTGAGTAGCAAGT	115	0.183	0.466	0.323				
142958	MAFG	GACGACCCCAATAAAGGAA AGCTGGACGATCTCCTCCTT	153	0.250	1.422	0.950	0.854	5.904	2.468	x
213890	NRP1	CGCACCTCATTCCTACATCA GTTGCTGTACCCGATCTTGA	139	4.244	1.760	0.449	0.282	1.093	1.199	
144588	MFGE8	CCCAGCAGCAATGACGATAA CCAGTTACCCACAAACTCCT	204	0.279	0.680	0.684	3.447	12.849	4.637	x
159850	AP1GBP1	ACTCTGCAGCCGTGAAGAAAT CTCCATGGTCACAGTCTTTG	128	0.404	1.154	0.799	0.473	0.399	0.718	x
100694	PHTF2	GGTTCCTCATTTCCGGTTGA AAGTAGCTGGGCACAACAGA	163	0.461	1.140	0.674				
213519	SLC12A2	CAAGACATACCGGAGATCAG ACTAGACACAGCACCTTTTCG	230	0.397	1.178	1.113	0.457	0.754	0.798	△
100966	KIAA1641	CAACCCACACAGTTCTCCAA CGCTTTCAGATCGGTTAGGT	217	0.215	1.705	0.726	1.000	6.942	1.181	x
123450	NR4A2	GGTGGGCACAAGTATTACAC GTCAAAAGCTGCTGCATGCA	184	2.427	1.023	0.892	0.393	0.952	1.118	x
236580	GPR125	AGCTAGGTGACGTGATGGTT AGGTAGCAATGCGCTGAAGA	129	3.173	1.114	3.697	1.722	3.976	1.191	x
105113	DOCK5	AGCACCAGAACCCGATTTGA GCCTTCATAGGGCTTGCTTT	244	4.740	1.939	1.136	0.614	0.753	0.844	x
101594	CCDC95	CTGAAGCGGAAGCTCAAGTT TCCGCTCGCTGTATCTGA	194	0.483	2.117	0.904	2.884	3.101	3.292	x
113036	PARD6B	GACTCCGCTTTGAAGGATGT GGAAGAACTTCGGTGAATTC	197	3.772	1.953	1.860	0.456	0.293	0.661	x
225893	PDE7A	CCCAGTGGCTGATCATAA CAAGATGGCTGCACAGCATT	144	5.596	2.113	5.979	0.813	1.928	1.086	x
227033	DMXL1	GAATGGGGCCATTCTCAACA GCTTAGGCATGCTTCCAGTA	175	2.530	1.161	2.705	0.385	0.549	0.454	x
235590	DHX40	CAAGCTGTGAGGGACAATTC GGATCCCAAAGTGCAATTTCA	195	2.612	1.270	1.254	1.072	2.159	1.116	x
207047	HESX1	AATCCTCCAGTGGGATTTTC TCGATACCAGGATAGCAGTT	218	0.365	1.219	1.055	0.548	0.521	0.534	x
177512	RAB4B	TGATTGGCAGTGCAGAACT CGTGTCCAAATCTGTAGCT	155	0.390	1.177	0.802	1.095	2.080	1.181	x
118400	INTS2	GGAGAAACCAAGTGGATGGT GTTGGGTATATGCAGCAAAC	200	0.404	1.296	0.757	0.182	0.172	0.323	x
117435	EP400	CCCAGATCCAGGTTGCAAAA CACCTGCTGCTGAATGAGTT	209	2.110	1.214	1.394	1.344	2.729	2.393	x
128717	MTPN	GTGATGTGCGACAAGGAGTT GGATTTCAGCTGCCACAA	154	2.724	1.032	0.410	0.637	0.492	0.939	x
143978	CASK	ATGATCCAGCCAAGGATGAC GAAGGAATGAGACCTGCAGT	154	3.470	1.650	0.623	0.830	2.737	1.452	x
148950	SCARF2	CGCTTAAAGACCGCTCTTA AAGTAGCCCCGGGCTCTATT	169	4.158	1.175	1.066	3.196	2.221	4.815	△
163861	FGD6	AACCC TGAAAACACTTTTGG CGAATGAGCATCCTCTGCTT	206	0.402	3.003	1.928	0.648	2.488	0.671	o
162667	STAG1	GTGGAAGTAGCAGCAGCAAA GCAGTACAGTGGATGTGAGT	174	0.235	0.532	0.569	0.251	1.098	0.157	x
227835	PDE4DIP	GGCATAGGAGAGATGCTTAG TAGCAGGAGAGTCAACAATTC	242	0.079	0.187	1.211	0.157	0.336	0.286	△
149339	CUEDC1	TGGCTGTCGAAAACGACTTT CAGCGACTGATGCTTCAACA	212	0.396	1.099	0.704	0.493	0.571	0.868	△
150170	SLC25A1	CCAGTGCAGTAGTGCCAAAA AACACAGGCACAGGGTTCA	218	0.227	1.191	1.745	0.851	1.622	0.639	△
166760	ABL1	GGCCTTGAAGACAGAGCAAA CTATGCACACGCCACTTAGA	163	0.490	1.528	1.325	0.265	0.322	0.279	△
172572	TAGLN	GCATGTCATTGGCCTTCAGA CTCAGTGCACAGAGCCTCAAA	221	0.200	0.584	0.894	3.238	6.007	1.410	x
125960	CRIP2	TACAGCGGCTCTCATGATGT GCAGACACAGAAGGGATCAT	227	0.249	0.721	0.688	0.650	0.788	1.291	△

b. Ferulic acid (FeA)

ID	Gene_Name	primers (S, AS)	PCR Product (bp)	Fold induction						Result
				DNA chip			Realtime PCR			
				NMDA	NMDA+ FeA	FeA	NMDA	NMDA+ FeA	FeA	
227485	SCOTIN	TCTGCTGTGGTACCTGTGAT GACGACAGACAGCACAAAAGA	227	3.355	0.707	1.890	0.751	0.798	0.973	x
215361	DAZAP1	CACGGAGGTAGTCATGATCT GAGGCTCAGCTCGTTTAACT	155	2.570	0.597	2.330	0.725	2.332	3.371	x
163073	PSG9	TCAGCCACTGGCAAGGAAAT GGCATTTCAGATAGACAGCAA	343	2.016	0.493	0.621	0.591	0.227	5.160	x
173477	PSG2	TGAACAGGCTGATACCTTCA GGCACTCAGATAGAGAGCAA	230	2.147	0.533	0.749	1.862	7.395	3.854	x
137897	TNFRSF12A	CTCGCCCACTCATCATTTCAT ACCAGACACCTTGGAAAGTT	158	4.302	1.083	0.649	0.389	1.191	0.399	x
178131	PCOLN3	CCCTGTTCCAGTTGAAGTTC CCAGTTCACACCTTCGTTCT	176	3.081	0.858	0.815	1.324	0.998	4.258	x
165200	UCP2	AAGGTCCGATTCCAAGCTCA ACATTGGGAGAGGTCCCTTT	128	2.459	0.696	0.398	0.643	0.873	0.591	x
160938	TGM1	GCACCTGAACCATGATTCTG ATGGCCTTCTCCTCCACATA	294	2.045	0.638	1.056	2.825	3.246	10.287	x
198888	CRIP1	GCCATCTGTCTGTCACTGAA TGGTTCTCACGCTCCAGAGT	85	1.970	0.675	0.846	0.484	0.521	0.406	x
148242	HSPA1B	AGCTCTTTGCTGCTTCACTT GTACAGAAGGTGGCAGTGTT	175	1.872	0.687	0.776	1.013	5.851	3.697	x
129361	SLC16A3	GAACCGTGTCAATCCAGAGT GTTTCCAGGTCCTTGAGCAT	129	2.241	0.838	0.753	0.857	1.831	0.881	x
167575	ABI3	GTCCTGGGGAGAGAGAATTT TAGCAGCAGCCTTAGAACTG	216	1.818	0.725	0.741	0.931	2.373	4.195	x
141668	WISP2	TTGGCTGCAGGCAACACTTT AGGAAAGGGGACTAGGTTCT	118	2.600	1.066	1.409	0.309	0.445	1.927	x
161046	WNT3	GACGTGCACACCTGCAAGTA GAGTTGGGTCTGGGTCAATTT	176	1.927	0.804	0.743	1.625	2.080	3.626	x
234756	TAGLN2	GACTGGCCTTGCTTCTACAA ATGTGTGGTGAGCACAGTCA	125	2.018	0.908	0.740	0.317	0.780	0.448	x
116510	MAGEC3	TGGGTGCAGAGAAAAGTACCT GGGCTCTGTCTTCCATATCT	200	2.063	0.930	0.950	1.024	0.951	5.772	x
112112	NUP43	GACCTGAGACCTTAATGACA GCCTCAGCAACAAGAGCAAA	164	2.125	0.994	1.212	0.172	0.270	0.182	x
117730	SBF2	CACCTACTTGGGTCTTCTT ACGGACCATGGAAGCATCTT	221	0.399	0.864	0.814	1.958	1.841	3.484	x
197221	MTHFD2	GGTACCAGACCTTTTGTAGTT CCTCAAAAGGACAGCTTAGG	220	0.496	1.109	1.366	0.778	1.545	0.774	x
128967	GARS	GCTGTTGAACAGGGTGTGAT TCCCAACAGTCACAGGCATA	155	0.499	1.118	0.975	2.080	3.192	3.708	x
129799	DOCK4	CACACATCCGCTTTCGAGTTT GCCCTTGGAAAAGGGAAGTT	203	0.345	0.822	0.860	0.335	0.214	0.337	x
214622	FBXL21	CACCAGTGGATGATCCTTCA TCGCTTGAGAGTGCAAGGAA	196	0.402	1.036	1.162	1.677	3.095	3.797	x
167731	MAML2	CCCAATCAGCTAAGCACACA GCTGTGGTTCAGTTCCCTTGAA	159	0.397	1.031	1.003	0.637	0.802	0.864	x
178884	PCSK5	CAAGGATGCAACGGAAGAGT ATGGCTGCTCAGCCTTGAAA	132	0.285	0.767	0.965	1.298	0.889	33.314	x
178586	LRP4	GGGGAAGAGACCTAGAAAACA GGCTTGCTGTCCACTAACTT	192	0.499	1.369	1.046	1.184	0.732	0.986	x
207047	HESX1	AGCGTGGTGGATCACCCAAT ACCAGGATAGCAGTTTACTC	186	0.397	1.091	1.199	3.777	2.244	16.373	x
132892	HIPK3	GCATTCCAGCAGCAGCATT CTGCTGTGTGATTGGGACTT	166	0.296	0.871	0.418	0.484	0.466	0.527	x
123450	NR4A2	GGTGGGCACAAGTATTACAC GCTGCTGCATGCAAGTTTGTG	177	0.209	0.772	0.832	2.833	6.801	10.385	x

c. Ligustilide (Lig)

ID	Gene_Name	primers (S, AS)	Fold induction						Result
			DNA chip			Realtime PCR			
			NMDA	NMDA+ Lig	Lig	NMDA	NMDA+ Lig	Lig	
113036	PARD6B	GACTCCGCTTTGAAGGATGT GGAAGAACTTCGGTGAATTC	0.392	0.942	0.662	0.503	1.586	0.541	x
167731	MAML2	CCCAATCAGCTAAGCACACA GCTGTGGTCAGTTCCCTTGAA	0.397	0.928	0.679	1.519	6.389	4.561	
148527	ESCO1	CCTGGTGCTGCTCAACATTA GAGTGGGATCTGAGAAAGCA	0.404	0.936	0.463	0.442	0.622	0.328	x
214622	FBXL21	TCGCTTGAGAGTGAAGGAA TTCCTTGCACTCTCAAGCGA	0.402	0.926	0.884				
167308	CRY1	GGCAACTGTTATGGCGTGAA AATCCAACCCCTCTGACGAA	0.269	0.614	0.375	2.840	3.593	8.346	x
148950	SCARF2	CGCTTAAAGACCGCTCTTA AAGTAGCCCCGGGCTCTATT	5.237	1.960	3.429				
150170	SLC25A1	CCAGTGCAGTAGTGCCAAAA AACACAGGCACAGGGTTCA	2.562	0.941	1.526				
206444	H2AFX	GGCAATCCAAGCACCTAGAT CCATCTAAAACCTCCCAATG	2.319	0.847	1.059	0.863	1.882	0.866	x
199976	C10orf54	AAGGGTGCCACACAATGTCT GAATGGCTCTGAAGCGAAGA	3.849	1.405	1.330	0.324	0.076	2.227	x
125674	PDK2	ACATGGCTAAGCTCCTGTGT ACCTTGATGGGTGGGAGAAT	2.492	0.840	2.735	0.406	0.379	0.838	x
181105	DPM2	GCCGTTAGCCTGATCATCTT AAGATGATCAGGCTAACGGC	2.719	0.911	2.407				
145225	SLC30A7	GCTCATGGACATGGACACTT GGGAGGAGTTCTCTGCATTA	3.009	1.003	2.365	0.572	0.962	0.651	x
101594	CCDC95	CTGAAGCGGAAGCTCAAGTT TCCGTCTCGCTGTTATCTGA	3.930	1.291	2.221				
177512	RAB4B	TGATTGGCAGTGCAGGAACT CGTGTCCCAAATCTGTAGCT	3.307	1.060	2.264				
185071	NR2F6	GGCAAGCATTACGGTGTCTT CCCGGAAGCACTTCTTGAGA	2.461	0.775	2.177	1.383	2.088	2.965	x
210222	MGC4618	GGGAAAACAGACGACACT GAATGCGTACCCCAATCA	2.431	0.685	1.774	0.540	1.154	1.492	x
172180	CENPB	CTGGTTCATGTGACCAGGAA GACCAGGGGAAGCATTACTA	6.229	1.621	3.525	2.133	4.073	7.929	x
194434	hCAP-H2	GGACTAACGTGGATCTCAAG CCCTCTGGCTCCAACATGAA	3.225	0.794	1.496	0.893	1.081	0.729	x
147144	CSG1cA-T	GAGCTCCAGACCCATTTCTT CACACGGTGGTAAGGAAGAA	5.152	1.186	2.369	1.108	2.585	2.526	x
134760	FGFRL1	GACACACACATGCACGGATA TGTGTGTCGGACAGCATAT	2.890	0.613	1.043	0.345	0.697	0.373	x
203030	TUBB2B	TGGGAGGTCATCAGTGATGA TGGTCCAGACCTAACC GAAT	2.238	0.427	1.000	2.926	3.070	22.805	x
182241	AGPAT2	ACGGTGGAGAACATGAGCAT ACCTCCATGAGGCCATCAT	9.451	1.634	6.047	0.309	0.651	0.497	x
204042	AP1S1	GGATGATGCGGTTTCATGCTA TCCAGGAAGCTGCACATCTT	7.178	1.226	3.103	2.487	4.310	7.165	x
211134	ARHGDI1A	AGCAGTCGTTTGTGCTGAAG GCCTACCATGTAGTCAGTCT	12.619	2.132	7.132	2.636	3.312	1.313	x
105119	TK1	GGCCGATGTTCTCAGGAAAA CGCAGAACTCCATGATGTCA	3.934	0.646	1.741	1.461	4.228	5.083	x
216903	REEP4	GGCTGTGAAGACCAAGAACA AGCACGAAGGCCATCTTGAT	5.344	0.873	2.328				
178131	PCOLN3	CCAGTTCACACCTTCGTTCT AGAACGAAGGTGTGAACTGG	3.081	0.489	2.234				
165944	PPP5C	TTCGGCTTCAAGCTCCTGTA CACTCGAACACCTCGCTAAA	6.730	1.032	3.010				
127877	MAP2K3	CTTGGTGACCATCTCAGAAC CGTCTCCCTCTCTGAATAGT	2.777	0.389	0.862				

제4장 총괄연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 1차년도 과제: 음양곽의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구

- 본 연구에서 음양곽으로부터 유효 성분을 분리하기 위해 다양한 분리 정제 방법을 사용하여 현재까지 구조분석이 완료된 화합물 10종 및 구조분석이 진행중인 화합물 5종을 분리해냈다. 음양곽의 MeOH 추출물의 Ethyl acetate 분획물의 경우, 황산발색 결과를 보면 대부분의 물질들이 flavonoid 계열임을 확인할 수 있으며, 극성과 분자량의 차이가 크지 않은 flavonoid 계열의 물질들이 다양하게 함유되어 있을 것으로 생각된다. 또한 추출물 내의 icariin 함유량이 높아서 다른 물질을 분리 정제하는데 장애 요인이 되기도 한다. 현재 CHCl₃ 분획물에 대한 분리 정제 작업도 계속 진행 중이므로 보다 많은 유효성분들의 분리가 가능할 것으로 생각되어진다.
- 음양곽의 과학적 품질 관리를 위하여 LC/MS, HPLC를 이용하여 유효 성분의 동시 분석법을 확립하였으며, LC/UV/MS를 통해 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 수행하고 이를 바탕으로 패턴인식분석법을 적용시킨 음양곽의 품질 관리법을 제시하였다.
- 음양곽 유효 성분의 동시 분석법 연구는 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin 등의 5종의 flavonoid glycoside 화합물에 대하여 수행하였다. 이들 화합물은 모두 양호한 UV 흡수성을 보임으로 HPLC/UV법에 의한 분석이 비교적 용이하였다. 또한 MS detector에서도 잘 이온화되어 MRM mode를 이용한 분석도 가능하였다. Epimedin A, epimedin B, epimedin C의 세 화합물의 경우 구조가 상당히 유사함에도 불구하고 본 연구에서 확립된 HPLC 조건에서 비교적 잘 분리되었다. LC/MS/MS로 분석할 경우 HPLC에 비해서 peak shape은 좋지 않았으나, 약 5분 정도의 짧은 시간 안에 5개의 화합물이 모두 검출됨으로써 신속한 분석이 가능하였다. 기존의 음양곽 분석법이 주로 icariin을 포함하는 한두가지의 flavonoid glycoside만을 분석하는데 그쳤으나 본 연구법은 음양곽의 주요 활성 성분인 5가지의 flavonoid glycoside 화합물에 대한 동시 분석이 가능하였으며, 이것은 음양곽의 품질관리를 위한 유효 성분 분석법에 활용될 수 있을 것이라 기대된다.
- LC/UV/MS를 통한 chemical profiling을 통하여 음양곽의 대표적인 약효 물질인 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin을 포함한 전체 성분에 대한 UV흡수 패턴과 mass profile을 분석하였다. 각peak에 대한 identification이 뒤따라야 할 것이나, 이 분석 결과는 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 위한 데이터 베이스로 이용될 수 있을 것이다. 음양곽 추출물에 대한 total ion chromatogram을 이용하여 전체 성분 프로파일에 대하여 패턴인식분석법을 적용하였다. 그 결과 산지나 성분 프로파일에 따라 각 추출물 시료가 구분되었으며 SI 값을 통해 각 시료간의 유사성을 확인할 수 있었다. 주성분 분석 결과나 SI 결과에는 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin 의 유효 성분의 함량 차이도 뚜렷이 나타났다. 본 연구의 결과를 토대로 할 때, 표준 음양곽 시료가 설정된다면, 음양곽 한약재 표준품과의 SI값을 통하여 음양곽의 품질 관리에 이용할 수 있을 것이라 사료된다.
- 음양곽은 본초강목(本草綱目)에서 ‘중국 사천 북부지방에 양의 일종인 ‘음양’이라는 동물이 하루에 암양과 백희의 교합을 하는 것을 보고 관찰한 바 이 풀(삼지구엽초)을 뜯어먹고 정력을 유지함을 알고 마을의 칠순노인이 이 풀을 먹고 자식을 낳고 청춘을 다시 갖게 되어 음양이 먹는 콩잎(藿)이라 하여 음양곽이라 부르게 되었다’고 한다. 음양곽은 예로부터 약용으로 쓰였는데, 한방과 민간에서 잎과 줄기를 강장, 강정, 이뇨, 음위, 창종, 건망증 등에 약재로 사용하고 있다. 음양곽은 이설탕, 장양단, 선령비산 등의 한방처방에 사용되고 민간에서는 강장, 거풍강정, 음위, 이뇨 및 신경성 강장제를

목적으로 주로 술을 담그거나 차로 다려서 복용하고 있다.

- 본 과제에서는 음양곽의 약리효능을 강장, 강정 등의 남성 성기능향상 작용에 초점을 두어 이에 따른 기초적인 실험을 한 후 LNCaP 세포를 선정하여 DNA microarray 실험을 실시하였다. 음양곽에 의한 남성 성기능 향상과 관련된 부분은 체내 testosterone level을 올려주어 전반적인 신체 기능향상에 의한 것과 phosphodiesterase 활성 저해에 의한 nitric oxide 생성량 증가에 따라 남성성기의 혈류 증가에 의한 성기능 향상으로 나누어 이들과 관련된 유전자들의 발현 변화 및 NO 발현량을 관찰하였을 때 음양곽에 의한 성기능 향상작용에 대한 가능성을 타진할 수 있어 이에 대한 유전자들의 발현 변화를 예상하고 실험을 실시하였다.
- 한약의 경우 양약에 비하여 일반적으로 오랜 기간 투여하였을 때 그 효능이 나타나는 것으로 알려져 있어 일반적으로 10일간 이상을 복용한다. 그리고 많은 약물의 경우 초기 발현 유전자와 나중에 발현이 변화되는 것이 있어 처리시간에 따른 유전자 발현 양상이 매우 다를 것으로 사료되었다. 약물 농도 역시 약하고 독하고의 차이는 용량이라 하여 생리학적인 농도와 고농도에의 유전자 발현 양상이 다를 것으로 사료되었다. 따라서 본 과제에서는 DNA microarray 실험을 위하여 약물의 처리시간 및 처리 농도에 대하여 유전자의 발현 변화를 관찰하였으며, 이때 약리효능 유전자와 독성관련 유전자를 선정할 수 있을 것으로 사료되었다.
- DNA microarray 결과 변화된 유전자들을 biological pathway로 구분하였을 음양곽의 성기능 작용과 관련되었다고 할 수 있는 직접적인 pathway는 GhRH pathway가 있었고 나머지는 크게 나타나지는 않았으나 nitric oxid 경로와 관련 IkappaB를 phosphorylation 시킬 수 있는 효소들이 발현이 감소됨을 관찰하였다.
- 음양곽 추출물이 Wnt 관련된 경로에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, icariin이나 epimedin B 역시 Wnt 경로는 영향을 미치는 것으로 나타났으나 음양곽이나 icariin의 경우 Wnt 경로를 저해할 것으로 예상되었으나 epimedin B의 경우에는 향상시킬 것으로 사료되었다. 따라서 같은 경로에 영향을 미친다고 하더라도 상반되는 작용을 하는 것이 함께 존재하고 어느 것이 많이 있는가와 얼마나 강력하게 작용하는가가 추출물에서의 효과를 관찰할 수 있을 것으로 생각되었다.
- DNA microarray 결과를 관찰하였을 때 음양곽 추출물과 주 구성물질인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 의한 유전자 변화를 바탕으로 biological pathway를 상위 10위 내외의 것을 비교하였더니 유사한 것이 많이 있었다(Table 38). 이러한 결과는 시간 의존적인 실험디자인과 주 구성물질들을 약리 주성분으로 예상하여 실험한 것에 기인할 것으로 사료되었다.
- 음양곽에서 분리되는 물질은 거의 모두가 flavonoid glycoside로 이들은 체내에 흡수되면 당이 떨어져 나가고 aglycon으로 존재할 것으로 예상되었다. 그러나 in vitro assay system에서는 당에 의한 영향 역시 클 수 있으므로 같은 prenylflavonoid 모핵을 갖고 있으나 당 구성이 다른 icariin과 epimedin B를 실험함으로써 당에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하였다. 두 물질간의 DNA chip 경로는 유사한 것도 있고 아주 다른 것도 있어서 당에 의한 영향이 나타나는 것으로 사료되었다.
- 음양곽이나 천궁 모두가 nitric oxide 생성에 영향을 미치므로 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포에서 예비실험을 하여 흥미로운 결과를 얻었다. 그러나 이들 세포주는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람 세포가 실험의 재현성 및 효능 검증에 위해서 좋을 것으로 생각되었다.

Table 38. Gene counts of Wnt pathway significantly affected by treatment of Epimedii herba extract, icariin, epimedin B and hyperoside in LNCaP cells

KEGG Pathway	Gene Counts			
	Eum_Ext (98/757)	icariin (981/1004)	epimedin B (1345/1373)	hyperoside (585/598)
Wnt signaling pathway	8	11	6	4
T cell receptor signaling pathway	7	5	7	3
Insulin signaling pathway	7	10	9	5
GnRH signaling pathway	7	5	8	3
Purine metabolism	6	9	6	3
Neuroactive ligand-receptor interaction	6	6	11	1
MAPK signaling pathway	6	15	19	12
Gap junction	6	7	8	-
Focal adhesion	6	6	13	3
Calcium signaling pathway	6	8	12	4
Adherens junction	6	4	-	-
Regulation of actin cytoskeleton	3	10	16	5

- 각 물질들의 처리 후 약리효능 유전자를 선정하기 위한 방법으로는 시간별로 관찰하는 것이 그리 좋은 조건이 아닌 것으로 사료되었다. 처리 시간에 따른 유전자 발현이 각각 달리 나타나 이들에 대한 공통집합으로 하였을 때는 유전자가 1-2개 정도만 선정되었으며 이들 역시 copy 수가 적은 것이었다. 특히 유전자 선정시 독성물질과 같은 특별한 경로를 증가시키지 않은 조건에서 추출물이나 약물을 처리하였을 때 유전자 변화가 크지 않고 변화가 큰 것들은 주로 유전자 copy수가 적은 것이었다. 이들을 realtime PCR로 validation 하였을 때 copy 수가 적은 유전자들은 결과가 DNA chip과 잘 일치하지 않은 것으로 나타났다.

4.2 천궁의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구

- 천궁의 유효성분은 현재까지 butyl phthalide류의 정유성분으로 알려져 있다. 그러나 이들 성분은 정도의 차이는 있더라도 모두 액체로서 공기와 접하게 되면 분해하게 된다. 본 연구과제의 초기 단계에서는 그런 사실을 인식을 못하여 물질 분리에 많은 어려움이 있었다. 물질 분리가 원활하지 못하여 전체적인 연구 진행이 늦어지게 되었다.
- 한편 생약의 지표물질이란 측면에서 보자면 실제로 약물을 복용하기 위하여 전제를 만들 때 오랜 시간 끓이는 것이 일반적인데, 그러면 천궁의 정유성분과 같은 불안정한 화합물은 모두 분해되고 말 것이기 때문에 그러한 물질로 지표물질을 정하는 것은 의미가 없어질 것이다. 따라서 생약의 제제화를 고려한 유효성분의 추적과 그에 따른 지표물질의 선정을 제안코자 한다.
- 천궁의 경우 정유성분은 생약 자체 또는 엑기스 상태로 다른 물질과 섞여 있는 경우는 그 안정성이 확보되거나 순수한 상태로 단독으로 분리가 될 경우는 극히 불안정한 상태로 된다. 따라서 column chromatography의 단계부터는 농축 등 모든 조작을 질소 기류 하에서 행함으로써 공기 중의 분해를

막을 수 있었다. 단일 성분의 보관, 표준 시료의 제공 시에는 물질을 일정한 농도로 용매에 녹인 후 ampule에 밀봉하여 행하였다.

- 현재 butyl phthalide 계열의 정유 성분 5종과 phenylpropanoid 화합물 2종을 분리하였는데 연구 종료가지는 10종 이상의 정유성분을 분리할 수 있을 것으로 본다.
- 본 연구에서는 천궁의 과학적 품질 관리를 위하여 LC/MS, HPLC를 이용하여 유효 성분의 동시 분석법을 확립하였으며, LC/UV/MS를 통해 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 수행하고 이를 바탕으로 패턴인식분석법을 적용시킨 천궁의 품질 관리법을 제시하였다.
- 천궁의 경우 음양곽과는 달리 유효 성분으로 다양한 계열의 화합물을 함유하고 있었다. 따라서 특정 계열의 성분이 아닌 UV 크로마토그램상에서 주성분으로 나타나는 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4종의 성분에 대하여 동시 분석법 연구를 수행하였다. 이들 화합물은 대체로 양호한 UV 흡수성을 보이고 크로마토그래피에서 peak간 분리도 잘 되어 HPLC/UV법에 의한 분석이 비교적 용이하였다. 그러나 MS detector에서는 각 성분에 따라 이온화도와 이동상 완충액의 종류에 따른 mass의 response에 큰 차이를 나타냈다. 특히 ferulic acid의 경우 MS detector에서의 response가 좋지 않아 다른 화합물에 비해 저농도에서의 검출이 어려웠다. Phthalide계 물질인 senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 열에 매우 불안정하였으며, 상대적으로 UV 흡수가 낮았다. 기존의 천궁 분석법은 주로 특정 계열 성분의 한 두가지 물질만을 분석하는데 그쳤으나 본 연구법은 천궁의 주요 약효 성분으로 기대되는 다양한 계열의 성분에 대한 동시 분석이 가능하였으며, 이것은 천궁의 품질관리를 위한 유효 성분 분석법에 활용될 수 있을 것이라 기대된다.
- LC/UV/MS를 통한 chemical profiling을 통하여 천궁의 대표적인 성분인 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide을 포함한 전체 성분에 대한 UV흡수 패턴과 mass profile을 분석하였다. 각 peak에 대한 identification이 뒤따라야 할 것이나, 이 분석 결과는 천궁 성분의 chemical fingerprinting을 위한 데이터 베이스로 이용될 수 있을 것이다. 천궁 추출물에 대한 total ion chromatogram과 UV 크로마토그램을 이용하여 전체 성분 프로파일에 대하여 패턴인식분석법을 적용하였으며 SI 값을 통해 시료 간 유사성을 확인하였다. HPLC 또는 LC/MS를 이용한 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4 가지 성분에 대한 분석 시에는 산지 간의 차이가 거의 나타나지 않았으나, 패턴인식분석법을 적용한 결과 산지 (한국산과 중국산)에 따라 각 추출물 시료가 확연히 구분되었으며 국내산과 중국산 천궁 시료 간의 SI 값은 0.6 이하의 낮은 값을 보였다. 본 연구의 결과를 토대로 할 때, 패턴 분석법의 적용은 유효 성분 분석의 결과를 보완하여 천궁 한약재의 품질 관리에 효과적으로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.
- 본 과제에서는 천궁 추출물의 약리효과를 관찰하기 위하여 다양한 독성물질을 3종의 뇌세포주에 처리하였으나 대부분의 물질은 세포독성을 거의 나타내지 않았다. 그러나 이들 독성물질에 의하여 NO가 많이 증가하는 것을 관찰하였으며, 그 중에서 중추신경계에서 흥분독성물질로 알려진 NMDA를 선정하였다. NMDA는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 활성화는 Ca^{2+} 이 세포내로 들어가는 것을 조절하는 multiple regulatory site를 포괄한다. 이러한 NMDA-유도 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 neuronal NO synthase (nNOS)의 활성화를 통하여 nitric oxide 생성을 증가시키고, 이러한 NO 생성 증가에 의하여 신경세포들이 죽는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 과제에서 사용한 100uM 농도에서는 세포 내 NO 생성량은 크게 증가되었으나 세포독성을 나타낼 수준은 아니었다.
- 천궁 추출물이나 분리물질들인 ferulic acid, ligustilide, Senkyunolide A는 단독 처리에 의하여 NO의 생성을 증가시키나 NMDA와 동시에 처리하면 NMDA에 의한 증가된 NO 생성을 감소시켰으며, 이러한 특성이 저농도에서는 신경 흥분작용을 나타낼 수 있으나 흥분 독성물질인 NMDA와 함께 사용했

을 때에는 진정작용 및 신경세포 독성을 감소할 것으로 사료되었다.

- 천궁 추출물에 의한 DNA microarray 실험 결과에서 cell cycle은 전반적으로 저해되고 local adhesion, MAPK pathway 등이 주로 관여하는 것을 알 수 있었으며, ferulic acid, ligustilide, Senkyunolide A에 의해서도 유사한 biological pathway가 관여하고 있음을 알 수 있었다.
- 한약재 효능을 관찰하기 위하여는 암세포주에 독성물질을 처리하여 인위적인 질병모델 즉 in vitro 질병 모델에 한약재를 처리한 후 유전자 발현 변화를 관찰하였다. 많은 한약재들이 그 효능이 의약품들 보다는 매우 약한 편이어서 용량이 매우 높은 농도에서 효능을 나타내었다. 그리고 용량에 따른 약리효능이 달라지므로 예를 들면, 천궁의 경우 저용량에서는 중추신경 흥분작용을 나타내나 고용량에서는 저해작용을 나타내고 있었으며, 음양곽의 경우에도 단독투여에 의하여 저용량에서는 NO 생성량이 증가되었으나 고용량에서는 감소되는 양상이 나타났다. 이러한 현상은 대부분의 한약재가 나타내고 있는 것으로 한약재의 효능을 찾는 데 용량이 매우 중요할 것으로 사료되었다.
- 많은 독성물질이 암세포에서 독성을 나타내는 것이 거의 mM 단위까지 올라가야 세포독성이 나타나며, 이것도 처리할 때 마다 세포독성이 달리 나타나는 것을 관찰하였다. 이러한 것은 독성물질에 대한 한약재의 효능을 세포독성 저해를 질환 완화의 marker로서 사용하기가 힘들었으며, 실험별 variation이 크게 나타나 biochip을 한번에 하지 않고 나누어 실험했을 때 실험 간의 variation이 나타나는 원인이 될 수 있을 것이다.
- DNA microarray 실험을 한약재에 대한 biological finger printing을 할 수 있을 것이다. 천궁의 biological finger printing을 위하여 다양한 산지의 천궁을 처리하여 처음에 천궁 표준품으로 구입하여 사용한 것과 PCA 방법과 similarity index를 사용하여 비교하였다. 다양한 방법으로 분석하였을 때 천궁에 의하여 발현이 변화되는 유효유전자를 선정하는 것이 매우 중요하며, 유효유전자 숫자보다는 fold induction이 큰 것을 선정하는 것이 매우 중요할 것으로 사료되었다. 즉, 천궁 추출물의 경우 fold induction을 2 fold, $P < 0.05$ 인 것을 152개를 선정하였을 때 그 SI 값이 0.711-0.981정도로 NMDA나 그 구성물질들과 천궁 추출물과의 차이를 관찰할 수 없었다.
- 그러나 일천궁이나 토천궁 전체를 통하여 fold induction을 4 fold, $P < 0.05$ 인 것을 선정하여 SI 값이 최소 0.113이었고 최대는 0.992로 나타났으며, 평균값은 0.658로 biological finger printing을 할 수 있는 SI 범위를 얻을 수 있었다. 이러한 방법을 바탕으로 천궁 표준품과 여러 산지에서 구입한 것을 관찰하였을 때 본 과제에서 사용한 천궁 표준품이 다른 산지의 것과는 매우 차이가 많이 나는 것을 보아 천궁 표준품 선정이 매우 중요할 것으로 사료되었으며, 이는 선정할 때 여러 산지의 한약재로부터 성분 분석 및 효능 검증을 한 후 표준품을 선정하는 것이 중요할 것으로 사료되었다.

제5장 총괄연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

총괄과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 천궁, 음양곽
총괄과제책임자	박영인 / 고려대학교 / 생물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Diarylhepanoid and flavonoid with antioxidant activity from <i>Alnus japonica</i> Steud on DPPH free radical scavenging activity	Hae-Kyoung Han, Sung-Sook Choi, Ye-Rie Kim, Hyun-Jung Kim, Gil-Myung Kang, Mi-Sook Dong, Chun-Sook Na and Ha Sook Chung	<i>J Food Sci Nutr</i>	11(2) 2006년	171-175		국내	SCI
2	Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of five flavonoid glycosides in <i>Herba Epimedii</i>	Nurul M. Islam, 유혜현, 이민우, 동미숙, 박영인, 정하숙, 김동현	<i>Phytochemical analysis</i>	submitted		1.398	국외	SCI

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	LC/MS의 한약재 품질관리 응용	심포지엄 구두 발표	유혜현	한국질량분석학회	2006.8.24	서울	국내
2	High-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of four ingredients, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide from <i>Cnidium officinale</i> extract	포스터 발표	유혜현, Nurul M. Islam, 임선영, 동미숙, 박영인, 정하숙, 김동현	대한약학회	2006. 11.6	서울	국내
3	In vitro estrogenic/ antiestrogenic activity of 70% ethanol extract of <i>Epimedium koreanum</i> Nakai and its major components in MCF/ERE cells	Poster	MJ Song, HJ Kin, HK Kang, DH Kim, YI Park and <u>MS Dong</u>	ASIATOX-IV	2006. 6. 18-21	중국, Zuhai Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology 20(3): 240, 2006	국제
4	Identification of biomarker genes from oriental herbal medicine, <i>Epimedium koreanum</i> Nakai, by oligonucleotide microarray	Poster	김현정, 박윤희, 박영인, 김동현, 정하숙, 동미숙	한국독성학회	2006. 11. 17	서울, 건국대학교	국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

2005년 10월과 2006년 2월 및 2006년 7월 10일 등 3회에 걸쳐 국가 한약재 품질 과학화 연구 사업단의 자체 세미나에 참석하여 발표 하였음.

2006. 8월 16일 국가 한약재 품질 과학화 연구 사업단 바이오칩팀의 미니심포지움을 구성하였음.

5.2 활용계획

- 분석결과들은 음양곽 및 천궁의 약전 분석법에 사용할 수 있을 것임
- 음양곽 및 천궁의 한약재 품질 과학화를 위한 Chemical and biological finger printing에 적용할 수 있을 것임
- 음양곽 및 천궁 추출물 및 각각의 유효 물질들에 의한 유전자 발현 변화에 대한 database 구축 및 이를 활용한 효능처리 시스템 구축

제6장 기타 중요변경사항

- 천궁의 경우 실험디자인을 시간에 따른 유전자 발현 변화만을 관찰하기로 하였으나 1차년도 실험결과 실험디자인이 약리효능 유전자를 선정하기가 힘들어 이를 보정하기 위하여 처리 시간을 주로 24시간으로 하였으며, 독성 물질(NMDA)을 사용하여 이에 의한 유전자 발현 변화를 함께 관찰하였음.
- 천궁 추출물을 중심으로 하여 처리시간 변화를 4 가지 (3, 6, 24, 48시간)에서 3가지 (4, 24, 48시간)로 줄였으며, NMDA를 단독 또는 천궁추출물과 동시에 처리하여 (4, 24시간) 유전자발현을 관찰하였음.
- 흥분독성물질인 NMDA를 함께 처리하여 일정시간에 유전자 발현 보는 것을 첨가하였음.

제7장 참고문헌

- 강삼식, 김주선, 강운정, 한혜경. 음양곽의 성분에 관한 연구 (II). 삼지구엽초의 지하부의 성분. *생약학회지* 21(1), 56-59 (1990)
- 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환. 음양곽의 flavonoid 성분에 관한 연구. *생약학회지* 19(2), 93-96 (1988)
- 강삼식, 김주선. 삼지구엽초 flavonoid glycoside의 계절적 변동. *생약학회지* 22(2), 85-90 (1991)
- 김호경, 이혜원, 황성원, 고병섭. 음양곽으로부터 icariin의 분리 및 함량분석. *생약학회지* 32(1), 43-48 (2001)
- 신국현, 강삼식, 정순간, 조의환. 고속액체크로마토그래피에 의한 음양곽 중 Icariin의 정량. *생약학회지* 20(1), 21-24 (1989)
- 이숙연, 김명진, 임동술, 지형준, 김현수. 토천궁과 일천궁의 Phthalide류 성분비교. *생약학회지* 21(1), 69-73 (1990)
- Jin XJ, Li XP, Liu ZQ, Zhao B. Identification of Epimedium Koreanum Nakai by Fourier transfer infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 26(4), 614-616 (2006)
- Kobayashi, M., Fujita, M. and Mitsuhashi, H.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XV. Constituents of Cnidium officinale: Occurrence of pregnenolone, coniferylferulate and hydroxyphthalides, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35(4), 1427-1433.
- Lu, G.-H., Chan, K., Liang, Y.-Z., Leung, K., Chan, C.-L., Jiang, Z.-H. and Zhao, Z.-Z., *Journal of Chromatography A*, 2005, 1073, 383-392.
- Mitsuhashi, H. and Nagai, U.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants - VII. Structure of ligustilide. 2: *Tetrahedron*, 1963, 19, 1277-1283.
- Mitsuhashi, H., Nagai, U. and Muramatsu, T.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. III. Structure of ligustilide, *Chem. Pharm. Bull.*, 1961, 115-119.
- Mitsuhashi, H., Nagai, U., Muramatsu, T. and Tashiro, H.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. II. Isolation of the active principles of Ligusticum root, *Chem. Pharm. Bull.*, 1960, 243-245.
- Momoda, M., Ohara, N., Gonda, R., Shimizu, N., Takada, K., Satoh, Y. and Shirai, S.: An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of Cnidium officinale, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40(11), 3025-3029.
- Park, Y.-K.: The study on antioxidative effects and quality comparison of Ligusticum chuanxiong and Cnidium officinale(I), *Kor. J. Herbology*, 1998, 12(2), 103-114.
- Sha M, Cao A, Yang S, Xue Y. Determination of icariin in epimedium koreanum nakai by high performance liquid chromatography. *Se Pu* 15(2), 166-167 (1997)
- Tomoda M, Ohara N, Gonda R, Shimizu N, Takada K, Satoh Y, Shirai S. An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of Cnidium officinale. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 40(11), 3025-3029 (1992)

- Tomoda M, Ohara N, Shimizu N, Gonda R. Characterization of a novel heteroglucan from the rhizome of *Cnidium officinale* exhibiting high reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities. *Biol Pharm Bull.* 17(7), 973-976 (1994)
- Tomoda, M., Ohara, N., Shimizu, N. and Gonda, Y.: Characterization of a novel glucan, which exhibits reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities, from the rhizome of *Cnidium officinale*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, 42(3), 630-633.
- Tsukamoto T, Ishikawa Y, Miyazawa M. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem.* 53(14), 5549-5553 (2005)
- Wang S, Wu Y, Ju Y, Chen X, Zheng W, Hu Z. On-line concentration by field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles in micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of flavonoids in *Epimedium brevicornum* Maxim. *J Chromatogr A.* 1017(1-2), 27-34 (2003)
- Yamagishi, T. and Kaneshima, H.: Constituents of *Cnidium officinale* Makino. Structure of senkyunolide and gas chromatography-mass spectrometry of the related phthalides, *Yakugaku Zasshi*, 1977, 97(3), 237-243.
- Yan, R., Li, S.-L., Chung, H.-S., Tam, Y.-K. and Lin, G.: Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, 87-95.
- Yi, T., Leung, K. S.-Y., Lu, G.-H., Chan, K. and Zhang, H.: Simultaneous qualitative and quantitative analyses of the major constituents in the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* using HPLC-DAD-MS, *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, 54(2), 255-259.
- Watanabe CM, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG, Gohil K. (2001) The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(12):6577-80.
- Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K, Kimura T, Terai S, Okita K. (2003) Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol.* 38(6):762-9.
- Leung YK, Ng TB, Ho JW. (2003) Transcriptional regulation of *fosl-1* by licorice in rat Clone 9 cells. *Life Sci.* 73(24):3109-21.
- Yin X, Zhou J, Jie C, Xing D, Zhang Y. (2004) Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci.* 75(18):2233-44.
- Kang JX, Liu J, Wang J, He C, Li FP. (2005) The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon-beta and TNF-alpha in human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 26(11):1934-9.
- Wang CY, Chiao MT, Yen PJ, Huang WC, Hou CC, Chien SC, Yeh KC, Yang WC, Shyur LF, Yang NS. (2006) Modulatory effects of *Echinacea purpurea* extracts on human dendritic cells: A

cell- and gene-based study. *Genomics*. 2006 Sep 28 [Epub ahead of print]

- Jianhui Rong, Jiangang shen, Kwan-Ming Ng, ChangLiu, Paul Kwon-Hwang Tam, and Allan Sik-Yin Lau (2006) Genome-wide biological response fingerprinting (BioReF) enables selection of multiple marker genes as potential quality control of bitanical drug products. Program and abstracts for the fifth meeting of Consortium for globalization of Chinese Medicine cum International forum on chinese medicine, p32.
- Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. (2004) Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine*. 11(6):544-8.
- Sun Y, Fung KP, Leung PC, Shi D, Shaw PC. (2004) Characterization of medicinal *Epimedium* species by 5S rRNA gene spacer sequencing. *Planta Med*. 70(3):287-8.
- Chiba K, Yamazaki M, Umegaki E, Li MR, Xu ZW, Terada S, Taka M, Naoi N, Mohri T. (2002) Neuritogenesis of herbal (+)- and (-)-syringaresinols separated by chiral HPLC in PC12h and Neuro2a cells. *Biol Pharm Bull*. 25(6):791-3.
- Guo BL, Xiao PG. (2003) Comment on main species of herba epimedii. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 28(4):303-7.
- Chiu JH, Chen KK, Chien TM, Chiou WF, Chen CC, Wang JY, Lui WY, Wu CW. (2006) *Epimedium brevicornum* Maxim extract relaxes rabbit corpus cavernosum through multitargets on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. *Int J Impot Res*. 18(4):335-42.
- Escames G, Leon J, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D. (2004) Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol*. 16(11):929-35.

제8장 첨부서류

- 분석법 (약전용)

음양곽과 천궁 추출물에 대한 분석법을 첨부하였음.

음양곽

정량법

이 약의 가루 약 1 g을 정밀하게 달아 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 30 분간 가열하고 식힌 다음 여과한다. 잔류물에 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 희석시킨 메탄올(7→10)을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린의 각 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 한 다음 이 액 5 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 에탄올(7→10)을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 또는 이카린의 각 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

$$\text{하이페로사이드 (C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{)의 양 (mg) = 하이페로사이드표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 A (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{)의 양 (mg) = 에피메딘 A표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 B (C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{18}\text{)의 양 (mg) = 에피메딘 B표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 C (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}\text{)의 양 (mg) = 에피메딘 C표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{이카린 (C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}\text{)의 양 (mg) = 이카린표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정과장 260 nm)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 25 cm인 스테인레스 강관에 입자 크기가 5 μ m인 액체크로마토그래프용옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한다.

칼럼 온도 : 35 $^{\circ}$ C 부근의 일정 온도

이동상 : (A) 희석시킨 포름산 (1→1000), (B) 희석시킨 포름산 (1→1000) · 아세트니트릴 혼합액 (10 : 90)

이동상 조성 : 이동상의 용리는 다음과 같은 기울기 용리 조건을 이용한다.

Time (min)	%A	%B
0	75	25
12	50	50
15	15	85
20	15	85
22	75	25
30	75	25

유량 : 1 mL/min

시스템 적합성

시스템의 성능 : 이카린, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C 표준품 및 하이페로사이드의 각 표준품 1.0 mg을 메탄올을 넣어 녹여 20 mL로 한다. 이 액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

시스템의 재현성 : 표준액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 6회 반복하여 주입할 때 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린 각각의 피크면적의 상대표준편차는 1.5% 이하이다.

천궁

정량법

이 약의 가루 약 1 g을 정밀하게 달아 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 30 분간 가열하고 식힌 다음 여과한다. 잔류물에 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 희석시킨 메탄올(7→10)을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 클로로제닉산, 페룰릭산, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 각 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 한 다음 이 액 5 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 에탄올(7→10)을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 클로로제닉산, 페룰릭산, senkyunolide A, 또는 (Z)-ligustilide의 각 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

$$\text{클로로제닉산 (C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{)의 양 (mg) = 클로로제닉산표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{페룰릭산 (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{)의 양 (mg) = 페룰릭산표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{Senkyunolide A (C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{18}\text{)의 양 (mg) = Senkyunolide A표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{(Z)-ligustilide (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}\text{)의 양 (mg) = (Z)-ligustilide표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 15~25 cm인 스테인레스 강관에 입자 크기가 5 μ m인 액체크로마토그래프용옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한다.

칼럼 온도 : 35 $^{\circ}$ C 부근의 일정 온도

이동상 : (A) 희석시킨 초산 (1→1000), (B) 희석시킨 초산 (1→1000) · 아세토니트릴 혼합액 (10 : 90)

이동상 조성 : 이동상의 용리는 다음과 같은 기울기 용리 조건을 이용한다.

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
4	45	55
10	15	85
14	15	85
15	80	20
20	80	20

유량 : 1 mL/min

시스템 적합성

시스템의 성능 : 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide 표준품 1.0 mg을 각각 메탄올을 넣어 녹여 50 mL로 한다. 이 액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

시스템의 재현성 : 표준액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 6회 반복하여 주입할 때 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide 각각의 피크면적의 상대표준편차는 1.5% 이하이다.

제1세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 분석법 개발

세부과제책임자 : 박영인 / 고려대학교

제1장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

가. 최종 연구 목표

- 한약재의 과학화를 위하여 음양곽과 천궁을 대상으로 생리활성 성분을 추출, 분리하여 구조를 분석하여 국가표준품을 확립함에 있다. 그리고 음양곽과 천궁의 유효 성분 에 대한 동시 분석법을 확립하고 품질 관리 기반 기술을 구축한다.

나. 연구배경 및 목적

- 최근 들어 국민 소득의 지속적인 증가와 노인 인구의 증가 그리고 각종 환경 문제의 대두 등으로 과거에 비해 국민들이 삶의 질적인 측면을 중시하는 사회적 분위기가 조성되고 있다. 이에 비례하여 건강의 중요성에 대한 인식이 한층 높아졌고 이에 따라 각종 건강관련사업들이 폭발적으로 증가하고 있다. 그 중에서도 특히 우리나라의 전통 약물인 한약재에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 한약은 우리가 오랫동안 사용해온 전통 약물 (Traditional Medicine)로서 연구 가치가 매우 높은 천연자원이라 볼 수 있다. 실제로 미국 과학자 쏘스광 박사는 19종의 식물 및 한약재로 ‘기적의 항폐암 식품 SV’를 개발하여 한약제재로는 처음으로 미국 식품의약국 (FDA)의 제 3단계 임상 실험에 진입했다. 따라서 우리나라도 다양한 한약서에 기록되어 있는 기성한약 처방의 약리 작용을 잘 검증하고 한약의 효능 성분을 연구하는 등 전통 약물의 연구를 위하여 보다 과학적인 방법으로 접근할 필요가 있다.
- 이러한 취지에서 보건복지부는 한방제제의 활성화 및 한약재에 대한 규격화를 목적으로 다양한 정책 및 용역 연구를 실시해왔다. ‘한약처방의 우수 경험방 수집 및 활용방안연구’를 910여개의 처방을 수집, 정리한 ‘한약처방조사수록집’을 공개하여 사장, 멸실의 우려가 있는 한약 처방을 기록화하고 고전문헌을 조사하여 활용 방안을 제시함으로써 전통 한약 처방의 임상적 가치를 계승 발전시키고 한약제제 또는 신약 개발에 기여하고자 하였다. 또한 ‘우수한약관리기준’ (GAP, GMP, GSP)을 마련하고 또한 주요 한약 250여 품목에 대해 정품 개념을 도입하여 표준 한약을 만드는 한편 한방 의료기관 등에서 판매되는 한약에 대한 품질 조사를 실시하는 등 우수 한약재 및 한약에 대한 체계적인 관리를 위한 다양한 시도를 하고 있다.
- 우리나라는 대한약전과 생약 규격집에 의하여 대부분의 한약재들이 관리되고 있다. 한약재들은 주로 각 한약재의 약효를 얻기 위하여 단독으로 혹은 여러 한약재를 섞어서 사용되고 있으나 이들 공정서에는 주로 한약재의 외형상의 이화학적 특징, 총 회분량이나 한 두가지의 지표 물질들을 기준으로 하여 생약들을 구분하고 있어 한약재들의 약리작용 물질과는 관계없이 구분되어 있다. 실제로 본 과제에서 연구하고자 하는 음양곽과 천궁의 경우 대한약전에 수록된 것을 보면 음양곽의 경우는 삼지구엽초의 지상부를 사용하는 것으로 식물의 성상에 대해서는 자세히 수록되어 있으나, 확인을 위한 시험법으로는 지표성분인 icariin을 분석하기 위하여 박층크로마토그래피를 이용한 정성분석법만 소개되어 있어 정량분석법의 개념은 들어있지 않다. 특히 천궁의 경우는 뿌리 줄기에 대한 성상만 수록되어 있을 뿐 지표성분이나 약리작용을 나타내는 성분에 대해서는 전혀 언급되어있지 않다. 이와 같이 한약재들의 약효 성분과는 관계없는 기준에 의해 관리되는 한약재들을 사용할 경우 한약재 복용 시 기대와 다른 약리 작용 또는 부작용이 나타날 우려가 있다.
- 음양곽(Epimedii Herba)은 삼지구엽초 (Epimedium koreanum Nakai) 또는 기타 동속 근연 식물 (매자나무과 Berberidaceae)의 지상부로 한방과 민간에서 강장, 강정, 이뇨, 음위, 창종, 건망증 등에 약

제로 사용하였다. 음양곽은 이선탕, 장양단, 선령비산 등의 한방처방에 사용되고 있으나 이에 대한 전반적인 연구가 진행되지 않았다. 따라서 음양곽의 유효성분, 약리 효과 및 독성 작용에 대한 다양한 연구가 필요하다. 음양곽 성분 중 icariin, epimedin A, B, C, hyperoside 등의 flavonoid glycosides계 성분이 주요한 활성 성분으로 알려져 있으며 따라서 본 연구에서는 음양곽으로부터 유효성분을 추출 분리하여 국가 표준품을 확립하고, 이들 물질에 대하여 HPLC-UV와 LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법을 개발하고자 한다.

- 천궁(*Cnidii Rhizoma*)은 천궁(또는 일천궁, *Cnidium officinale* Makino)의 뿌리를 말린 것으로 혈관 확장, 진정 작용, 진통, 진경작용을 억제하는 약리 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 천궁은 가미패독산, 육울탕, 쌍화탕, 십전대보탕 등 다양한 한방 처방에 사용되고 있다. 그러나 우리나라에서는 토천궁(*Ligusticum chuanxiong* Hort)과 구별없이 혼용되고 있으며 대한약전에 지표 물질 조차 설정되어 있지 않은 실정으로 한약재 과학화를 위하여 천궁에 대한 다양한 약리 및 유효 물질 연구, 분석법 개발을 통한 표준화 및 품질 관리가 시급한 한약재이다.
- 천궁의 주요 성분으로는 cnidilide, ligustilide, senkyunolide 등의 정유성분, ferulic acid, chlorogenic acid, coniferyl ferulate 등의 페놀성 물질, pregnenolone 등의 스테로이드성 물질, anthocyanin계 물질, polyacetylene계 물질 등이 알려져 있다. 이 중 ferulic acid는 진통, 진경 작용과 평활근 이완작용을 나타내며 정유 성분은 중추신경계에 작용하여 대뇌의 작용을 억제하여 진정작용을 나타내고 카페인의 흥분 작용에 대한 길항 작용을 나타낸다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 천궁으로부터 유효성분을 추출, 분리하여 국가표준품을 확립하고, 천궁의 주요 약효 성분으로 여겨지는 ferulic acid, chlorogenic acid, ligustilide, senkyunolide A에 대하여 HPLC-UV와 LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법을 개발하고자 한다.

다. 연구 범위

(1) 1차년도: 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 구조분석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립

- 음양곽 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명
- 음양곽 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- 실제 유통되는 음양곽 시료 분석
- 음양곽의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용

(2) 2차년도: 천궁의 생리활성 성분의 분리, 구조분석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립

- 천궁 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명
- 천궁 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- 실제 유통되는 천궁 시료 분석
- 천궁의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용

1.2 세부연구개발과제의 목표달성도

연구 개발 목표	연구 범위	달성도	관련 연구에의 기여도
1차년도 : 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 구조분 석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립	- 음양곽 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명	100%	<ul style="list-style-type: none"> - icariin 대량분리 방법 확립 - 음양곽으로부터 신물질 분리 (Epimedaside F) - 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공 - 음양곽이 함유된 건강 보조식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시 - 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시 - 음양곽의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
	- 음양곽 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립	100%	
	- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation	100 %	
	- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation	100 %	
	- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting	100 %	
	- 실제 유통 시료 분석	100 %	
	- 패턴인식분석법 적용	100 %	
2차년도 : 천궁의 생리활성 성 분의 분리, 구조분석 및 약효 성분에 대한 분석법 확립	- 천궁 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명	100 %	<ul style="list-style-type: none"> - 공정서의 분석법 등재를 위한 분석방법, 분석법 신뢰도 확인 및 SOP 제공 - 천궁이 함유된 건강 보조식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준 제시 - 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법 제시 - 천궁의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여
	- 천궁 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립	100 %	
	- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation	100 %	
	- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립	100 %	
	- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting	100 %	
	- 실제 유통 시료 분석	100 %	
	- 패턴인식분석법 적용	100 %	

1.3 국내·외 기술개발 현황

- 중국은 풍부한 생약자원 및 사용경험을 바탕으로 화학약품과 구분된 허가제도를 운영하여 다양한 전통중국의약품(Traditional Chinese Medicine)(중약제제) 개발의 제도적 뒷받침과 수출지원 정책에 힘입어 세계시장 점유율을 계속 높이고 있다. 음양곽이나 천궁에 대한 천연물 연구는 많이 되고 있지 않으나 주로 새로운 성분을 분리하여 약리작용을 관찰하는 연구들이 한국, 중국 및 일본학자들을 중심으로 진행되고 있다.
- 음양곽의 경우 일본의 Chiba 등(2002)은 syringaresinol를 음양곽으로부터 분리하여 PC12 세포에서 저농도에서 dose-dependent neuritogenesis를 나타낸다고 보고하였다. 그리고 중국의 Guo 와 Xiao (2003)은 중국내에 있는 *Epimeidum herba*, *Epimedium sagittatum*, *E. brevicornu*, *E. acuminatum*, *E. koreanum*, *E. pubescens*, *E. leptorrhizum* and *E. wushanense* 등 7종에 대하여 중국내의 분포 및 성분, 의학적 특성에 대하여 보고하였으며, Sun 등(2004)은 5S rRNA gene spacer의 염기서열에 의하여 이들을 분류하는 것에 대하여 설명하였다. 그리고 icariin의 HL-60 세포의 differentiation 증가 및 간독성 보호등에 대한 알려진 효능이 아닌 다른 약리작용에 대하여도 관찰하였다. 그리고 오 등(2004)은 음양곽의 methanol 추출물이 anti-cholinesterase 작용을 갖고 있으며, 기억력과 인식능력의 향상을 나타낼 수 있을 것으로 예상하였다. 서울대학교 김영중 교수팀(1995)과 강삼식 교수팀(1988)이 flavonoid glycoside 계통을 분리하였으며, icarisid II는 간독성보호 작용을 나타내는 것으로 보고하였다. 특히 강삼식 교수팀(1990)은 음양곽의 지하부도 물질분리를 실시하여 β -sitosterol 계통의 물질들의 구조를 밝힌 바 있다. 충남대 김충렬 교수팀(1992)과 경희대 박병림교수팀(1997) 음양곽 methanol 추출물과 열수추출물이 강력한 항산화작용을 나타냄을 보고하였고, 경희대 김호철 교수팀(1997)은 음양곽이 미약하나마 혈압하강작용을 나타낸다고 하였다. 충북대의 임홍빈 교수팀(2001)은 음양곽의 장기투여에 의하여 노화에 따라 감소하는 간의 약물대사효소들의 활성도를 더욱 감소시킴을 보고하면서 노년기의 이물질대사에 부담을 줄 수 있을 것을 예견하였다. 음양곽은 강정, 강장의 목적으로 민방에서 주로 사용되고 있으나 이에 대한 과학적인 연구에 대한 보고는 아직 우리나라에서 찾을 수가 없었다.
- 천궁의 유효 성분에 관한 연구로서는 1960년대에 주로 일본 그룹(Mitsuhashi et al., 1960; Mitsuhashi et al., 1961; Mitsuhashi and Nagai, 1963)에 의하여 정유 성분인 butyl phthalide의 구조 분석에 관한 연구가 진행되기 시작하여 다양한 구조의 butyl phthalide 화합물이 분리, 동정되었다. 1987년에 butyl phthalide 이외의 성분에 대한 연구가 행하여져서(Kobayashi et al., 1987) pregnenolone, coniferyl ferulate 등이 보고되었다. 그 후의 연구에서는 주로 천궁의 성분을 동시 분석하여 생약들을 비교 분석하는 연구가 진행되어 왔다. 즉, GC-MS에 관한 연구(Yamagishi and Kaneshima, 1977)를 시작으로 HPLC를 이용한 천궁의 12가지 생리활성 성분의 동시 분석(Yan et al., 2005), HPLC fingerprint를 이용한 principal component analysis(PCA)을 통해 각종 유사 생약을 구별하려는 시도(Lu et al., 2005) 및 HPLC-DAD-MS를 통한 천궁의 주요 성분의 동시 정성, 정량분석(Yi et al., 2006)으로 발전하였다. 고분자 물질에 관한 연구는 천궁의 70% EtOH ext.의 함량을 고려할 때 중요한 부분이라고 생각되는데 산성 다당류의 면역증강 작용에 관한 연구(Tomoda et al., 1992) 및 reticuloendothelial system 강화 및 항보체활성을 가지는 novel glucan에 관한 연구(Tomoda et al., 1994)가 주목받을 만한 연구이다. 천궁의 기원 식물에 대한 논란이 계속되고 있는 가운데 국내 연구진에 의하여 토천궁과 일천궁의 효능 및 품질 비교에 관한 연구(Park, 1998)는 기원식물에 대한 효능 및 성분 면에서의 고찰이 앞으로의 연구에 많은 시사를 준다고 하겠다.
- 음양곽과 천궁의 유효성분 분석법 개발에 대한 현황 및 본 연구팀의 연구결과를 표로 정리하면 다음

과 같다.

연구 과제	국내 현황	국의 현황	본 과제의 연구결과
음양곽의 유효성분 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -음양곽의 flavonoid 성분 연구 (강삼식 et al., 1988) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin 정량 (신국현 et al., 1989) -GC/MS에 의한 삼지구엽초의 지하부 성분 연구 (강삼식 et al., 1990) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin과 epimedin A 함량의 계절적 변동 연구 (강삼식 et al., 1991) -HPLC에 의한 음양곽 중 icariin의 함량 분석 (김호경 et al., 2001) 	<ul style="list-style-type: none"> -HPLC에 의한 icariin의 함량 분석 (Sha et al., 1997) -Micellar electrokinetic capillary chromatography를 이용한 flavonoid 성분 분석 (Wang et al., 2003) -IR을 이용한 삼지구엽초의 판별법 (Jin et al., 2006) 	<ul style="list-style-type: none"> -기존의 HPLC 분석법은 주로 icariin만을 대상으로 하였으나 본 연구에서는 icariin을 포함한 5종의 flavonoid glycoside에 대한 동시 분석법 확립함 -HPLC/MS/MS를 이용한 음양곽의 분석법을 처음 확립 -음양곽의 품질 관리를 위한 패턴분석법의 적용을 처음 시도함
천궁의 유효성분 분석법 개발	<ul style="list-style-type: none"> -HPLC에 의한 토천궁과 일천궁의 phthalide 성분 비교 (이숙연 et al., 1990) 	<ul style="list-style-type: none"> -천궁의 acidic polysaccharide 연구 (Tomoda et al., 1992) -천궁의 glucan 성분 연구 (Tomoda et al., 1994) -천궁의 alkylphthalide 유도체 성분 연구 (Tsukamoto et al., 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> -기존의 연구는 주로 천궁에서 약리활성을 나타내는 성분을 규명한 연구가 대부분이며 유효 성분에 대한 동시 분석법은 확립되어 있지 않음. -본 연구에서는 HPLC와 LC/MS/MS를 이용한 천궁 유효 성분의 분석법을 최초로 확립 -천궁의 품질 관리와 판별을 위한 패턴분석법의 적용을 처음 시도함

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분 에 대한 분석법 연구

가. 연구개발 내용

- 음양곽으로부터 생리활성 성분 분리, 구조분석
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- 실제 유통되는 음양곽 시료 분석
- 음양곽의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용

나. 방법

< 분리법 >

(1) 음양곽의 구입 및 인증

- 2005년 5월 강원도 철원 재배지에 방문하여 (Figure 1), 건조한 음양곽 잎 12 kg을 직접 구입하였으며, 그 중 1kg과 재배하고 있는 삼지구엽초 1본을 경희대 이제현 교수님께 보내어 감정, 인증 받았으며, 추가 실험을 위해 2005년 11월 같은 곳에서 18 kg을 더 구입하였다.



Figure 1. Pictures of *E. koreanum* Nakai used in this experiment (Chulwon, Kangwondo, Korea, 2005. 5).

(2) 시약 및 기구

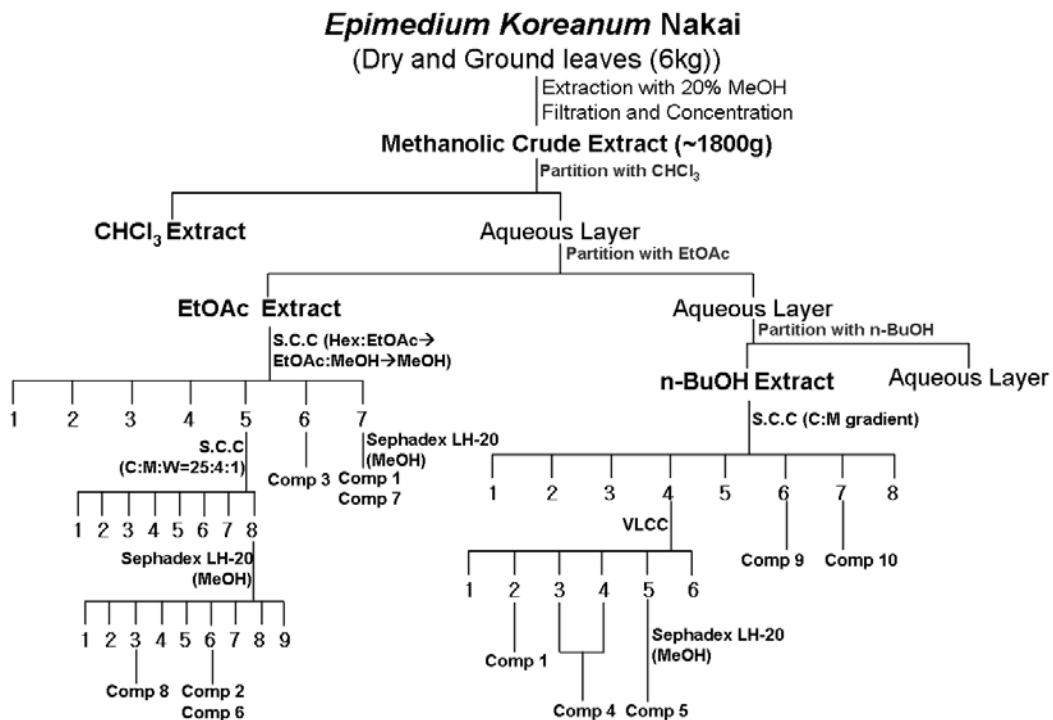
- $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 Bruker CXP-300 spectrophotometer를 사용하였고, TMS를 internal standard로 사용하였다. FAB-MS는 JMS 700 spectrometer를 사용하였다. Column chromatography의 packing material은 Kieselgel 60(70-230 mesh, Art. 7734, 230-400 mesh, Art. 9385, Merck, Germany)와 Sephadex LH-20(Bead size 25-100 μm , Pharmacia, Sweden), 그리고 Cosmosil 75C18-PREP(nacalai tesque)을 사용하였다. Thin layer chromatography용 plate는 precoated silica gel 60 F₂₅₄ plate(layer thickness 0.25 mm, 20x20 cm, Art. 5715, Merck)와 precoated RP-18 F₂₅₄ S plate(layer thickness, 0.25 mm, 20x20 cm, Art. 15423, Merck)를 사용하였으며, 발색시약으로는 10% H_2SO_4 및 FeCl_3 를 사용하였다. 추출, 분획 및 column chromatography용 시약은 특급 및 EP급 용매를 사용하였다.

(3) 음양곽 70% ethanol 추출물제조

- Oligo DNA Chip 및 HPLC/MS/MS 실험을 위해 산지에서 직접 구입한 것과 경동시장에서 구입한 국산 및 중국산 음양곽을 건조 세절하여 분말로 만들고 이를 water-bath상에서 70% EtOH로 가열 추출, 감압 농축한 후 동결 건조하여 LC/MS/MS 및 Oligo DNA Chip 분석팀에 전달했다.

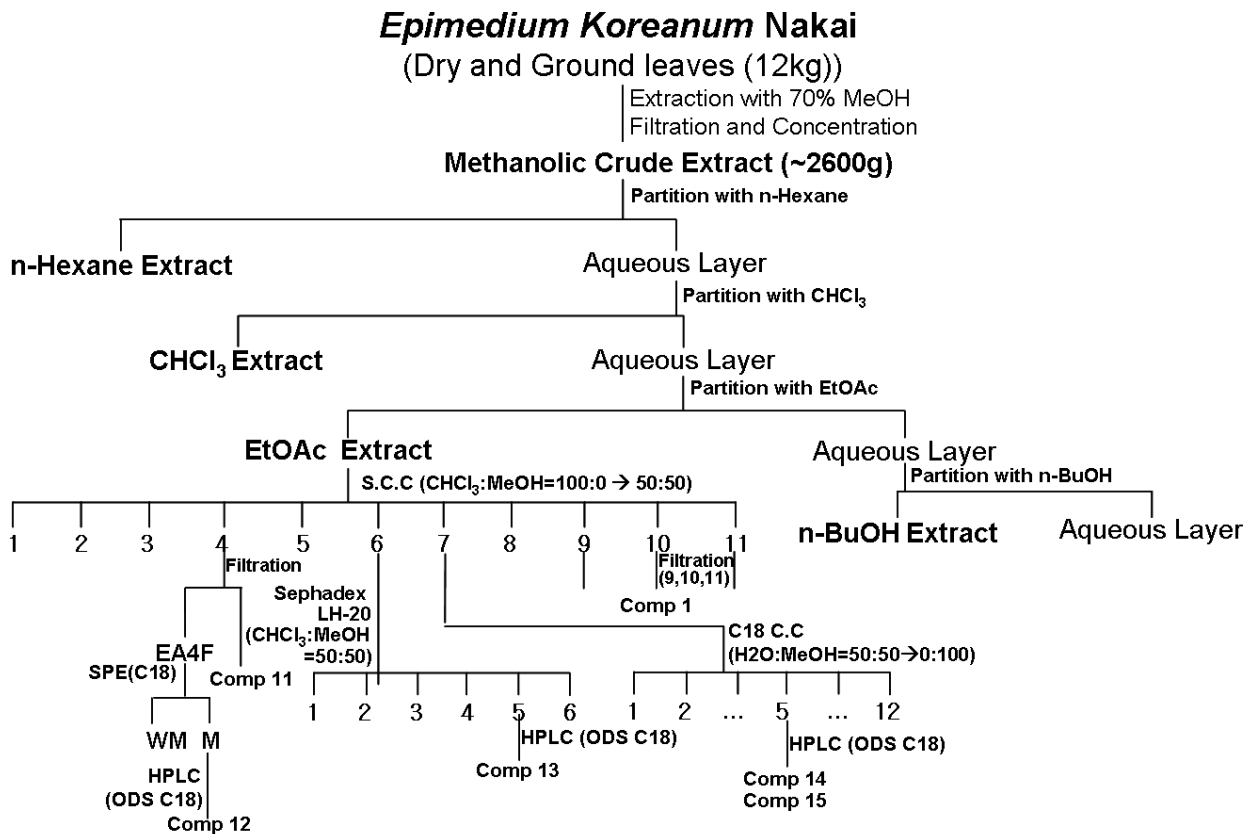
(4) 음양곽의 생리활성 성분의 분리 및 동정

- 음양곽의 생리활성 화합물의 분리 및 화학구조 결정을 위해 건조 음양곽 분말 총 6kg을 20% MeOH로 가열추출을 3회 반복한 후 감압농축하여 얻은 MeOH extract (1800g)를 n-Hexane, CHCl₃, EtOAc, n-BuOH로 계통 분획하였다 (Scheme 1).
- EtOAc 분획물 (120.3g)을 silica gel column chromatography (Hexane → Hexane:EtOAc → EtOAc:MeOH → MeOH)를 이용하여 7개의 소분획을 얻었다. 이들 소분획 중 No. 7로부터 compound 1 과 compound 7 을 얻었다. 다시 No. 5 분획을 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH:H₂O = 25:4:1)를 실시하여 8개의 분획을 얻었으며, 그 중 No. 8 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 실시하여 No. 6 소분획으로부터 compound 6 을 얻었으며, 동일 분획물을 다시 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH:H₂O = 25:4:1)를 반복 수행하여 No. 3 소분획에서 compound 8, No. 6 소분획에서 compound 2를 얻었다.
- BuOH 분획물(320.4g)에 대한 silica gel column chromatography (Hexane:EtOAc→EtOAc:MeOH → MeOH)를 실시하여 8개의 소분획을 얻었으며 그중 No. 4 분획으로 vacuum liquid column chromatography를 통해 다시 6개의 소분획을 얻었으며 그 중 No. 3, No. 4 분획으로부터 compound 4, No. 5 분획으로부터 sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 통해 compound 5 를 얻었다. No. 6, No. 7 분획으로부터 각각 preparative HPLC를 통해 compound 9, compound 10을 분리하였다.



Scheme 1. First isolation of bioactive compounds from *E. koreanum* Nakai.

- 그러나, 분리된 화합물들의 양이 사업단의 요구량에 비해 작고, 순도가 기준에 부합하지 못하는 것들이 있어서, 일부 화합물의 대량 분리 정제 및 추가적인 화합물의 분리를 위해 2005년 11월 구입한 음양곽 건조 분말 중 12 kg을 70% MeOH로 가열추출을 3회 반복하고 감압농축하여 얻은 MeOH extract (2600g)를 n-Hexane, CHCl₃, Ethyl acetate, n-BuOH로 계통분획하고 감압농축하여 각각의 extract를 확보하였다 (Scheme 2).
- 그 중 Ethyl acetate 분획물 중 100g으로 silica gel column chromatography (CHCl₃:MeOH = 98:2→50:50)를 통해 11개의 소분획을 얻었으며, No. 4 소분획에서 filtration을 통해 compound 11을 분리하였으며. 분리후의 여과액으로 C18 resin을 이용한 solid-phase extraction (50% MeOH→100% MeOH)을 통해 얻은 100% MeOH 분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통하여 compound 12를 분리하였다. No. 6 소분획은 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH = 1:1)를 통해 다시 6개의 소분획으로 분리하고, 그중 No. 5 소분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통하여 compound 13을 분리하였다. No. 7 소분획을 cosmosil 75C18 resin을 이용한 reverse phase column chromatography (50% MeOH→100% MeOH)를 통해 12개의 소분획으로 나누고 그 중 No. 5 소분획으로부터 preparative HPLC column (ODS C18)을 통해 compound 14, 15를 분리하여 현재 구조 분석 중이며, 나머지의 분획 및 CHCl₃ 분획물로부터 화합물을 분리하고자 실험을 진행 중이다.



Scheme 2. Second isolation of bioactive compounds from *E. koreanum* Nakai.

< 분석팀 >

(1) 실험재료

- 본 실험에서는 산지가 다른 7종의 음양곽 시료부터 얻어진 70% 에탄올 추출물 21종, 타 식물로부터 유래한 70% 에탄올추출물인 Ext-PR, Ext-GT, Ext-CT을 사용하였다. Icarin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside는 음양곽으로부터 추출된 표준품을 사용하였고, 내부표준물질로 사용한 digoxin, α -naphthoflavone은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. 각 시료의 산지, 구입처, 수득량은 다음과 같다.

시료번호	산지	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)	추출물 시료번호
K-1	한국산	청풍약초	40	8.50	EK-K1-I
				8.48	EK-K1-II
				8.71	EK-K1-III
K-2	한국산	신금강약국 (철원)	40	8.46	EK-K2-I
				8.21	EK-K2-II
				8.16	EK-K2-III
K-3	한국산	지리산 한약나라 (인제)	40	7.18	EK-K3-I
				7.21	EK-K3-II
				6.99	EK-K3-III
K-4	한국산	철원재배지	80	7.76	Ext-1
				8.01	Ext-2
				8.53	Ext-3
C-1	중국산	제기당물산	40	7.20	EK-C1-I
				6.98	EK-C1-II
				7.35	EK-C1-III
C-2	중국산	부영약업사	40	7.69	EK-C2-I
				7.99	EK-C2-II
				8.06	EK-C2-III
C-3	중국산	신초당약국	40	7.23	EK-C3-I
				7.44	EK-C3-II
				7.16	EK-C3-III

(2) 시약 및 기구

- HPLC용 용매는 J. T. Baker (USA) 제품을 사용하였으며, 그 외 분석용 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Compound profiling을 위한 실험에는 Agilent 1100 series LC/MSD trap을 사용하였으며 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)을 사용하였다. HPLC/UV를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shiseido Nanospace SI-1을, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)을 사용하였다. LC/MS/MS를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shimadzu HPLC system LC-10A series를 mass detector로 API2000 triple-quadrupole mass spectrometry를, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)을 사용하였다.

(3) 표준액의 조제

- 표준품 icariin, epimedin A, epimedin A, epimedin A, digoxin, α -naphthoflavone을 메탄올에 녹여 1mg/mL의 농도가 되도록 조제하여 표준 원액으로 사용하였다.

<추가 15종>

시료 번호	산지	종류	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)
K-1	한국산	음양곽	전남생약	20	3.93
K-2	한국산	음양곽	정도약업사	19.4	5.07
K-3	한국산	음양곽	제기동 시장	8	1.12
K-4	한국산	음양곽 (위품)	농협	34.1	5.86
C-1	중국산	음양곽	난주시장	10	1.9
C-2	중국산	음양곽	안국시장	10	1.78
C-3	중국산	음양곽	운장무역	10	1.71
C-4	중국산	음양곽	창달중약	10	1.78
C-5	중국산	음양곽	귀양시장	5.5	1.21
C-6	중국산	음양곽	곤명시장	10	1.83
C-7	중국산	음양곽	제기동 시장	9	1.41
C-8	중국산	음양곽	안국시장	10	2.08
C-9	중국산	음양곽	시상판나시장	10	1.97
C-10	중국산	음양곽	제기동 시장	9	1.28
C-11	중국산	음양곽	장사시장	10	1.75

(3) 표준액의 조제

- 표준품 icariin, epimedin A, epimedin A, epimedin A, digoxin, α-naphthoflavone을 메탄올에 녹여 1mg/mL의 농도가 되도록 조제하여 표준 원액으로 사용하였다.

(4) 검액의 조제

- 각각의 추출물을 2 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹여 검액으로 사용하였다.

(5) LC/UV/MS를 이용한 음양곽 추출물의 compound profiling

- 3종의 음양곽 추출물 용액을 LC/UV/MS에 주입하여 각각에 대한 UV와 MS profile을 얻었으며 HPLC와 MS 조건은 다음과 같다.

(가) HPLC-UV condition

- HPLC-UV-MS system: Agilent 1100 series LC/MSD trap
- Column: Capcellpak C18 (4.6 X 250 mm)
- Mobile phase: (A) 90% ACN in 0.1% formic acid, (B) 0.1% formic acid
- Flow rate: 1 mL/min (split ratio 1/5), Injection vol.: 20 µL
- UV detector: 320 nm
- Sample concentration: 2 mg/mL
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	30	70
10	70	30
20	70	30
21	30	70

(나) Mass spectrometric parameter

- Polarity: Positive
- Compound stability: 50%
- Nebulizer pressure: 35 psi
- Dry gas flow: 8 L/min
- Dry temperature: 350°C

(6) LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC/MS 조건: 음양극 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC와 mass spectrometer의 조건은 다음과 같다.

◦ HPLC condition

- HPLC system: Shimadzu HPLC system LC-10A series (Kyoto, Japan)
- Column: Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	65	35
4	35	65
5	65	35
7	65	35

- Flow rate: 0.2 mL/min
- Injection vol.: 10 µL
- Column oven temperature: 35°C

Mass spectrometric parameter

- MS spectrometer: API2000 triple-quadrupole mass spectrometry
- Polarity: Positive
- Dry temperature: 350°C
- Nebulizing, turbo, curtain gas: 40, 80, 40
- Multiple reaction monitoring parameters:

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
Icariin	677	369	47
Epimedin A	839	369	57
Epimedin B	809	369	51
Epimedin C	823	369	61
Hyperoside	465	303	33
Digoxin (IS)	781	97	61

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin B, quercetin)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 mass spectrum으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin B, quercetin)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 0.5, 1, 2, 10 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL씩 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 mass spectrum으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 5일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값과 이론값을 비교하여 백분율로 표시하였다.

(라) 완전성

- 2 µg/mL의 QC시료에 대하여 용매의 pH(3, 4, 5), 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, YMC C₁₈), 컬럼 온도(30, 40, 50°C), gradient 조건을 변화시켜서 3회 반복 분석을 통하여 분석법의 완전성을 시험하였다. 완전성의 시험을 위한 gradient 조건은 다음과 같다.

◦ Gradient-1

Time (min)	%A	%B
0	65	35
4	35	65
5	65	35
7	65	35

◦ Gradient-2

Time (min)	%A	%B
0	70	30
4	30	70
5	70	30
7	70	30

(마) 음양곽 시료 중 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 함량 분석

- 산지가 각기 다른 7종의 음양곽으로부터 추출된 총 21개의 음양곽 추출물 시료를 각각 메탄올에 녹여 2 mg/mL의 농도로 조제한 후 100 µL를 취해서 digoxin 용액(100 µg/mL)을 5 µL를 첨가하여 시료 용액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 분석한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(7) HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC 조건: 음양곽 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC의 조건은 다음과 같다

- HPLC system: Shiseido Nanospace SI-1
- Column: Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	75	25
12	50	50
15	15	85
20	15	85
22	75	25
30	75	25

- Flow rate: 1 mL/min, Injection vol.: 10 μ L
- Detection: 260 nm
- Column oven temperature: 35°C

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 2, 5, 10, 25, 50 μ g/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 μ L 취한 후 내부표준액인 α -naphthofalvone 용액(100 μ g/mL)을 10 μ L씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 μ L를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 2, 10, 50 μ g/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 μ L 취한 후 내부표준액인 α -naphthofalvone 용액(100 μ g/mL)을 10 μ L 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 μ L를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 5일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값을 이론값에 대한 백분율로 표시하였다.

(라) 완전성

- 25 μ g/mL의 QC시료에 대하여 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, Beckman C₁₈)를 바꾸어 3회 반복 분석하여 본 분석법의 완전성을 시험하였다.

(마) 음양곽 시료 중 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 함량 분석

- 산지가 각기 다른 7종의 음양곽으로부터 추출된 총 21개의 추출물 시료를 메탄올에 녹여 2 mg/mL의 농도로 조제한 후 100 μ L를 취해서 α -naphthoflavone 용액(100 μ g/mL)을 10 μ L를 첨가하여 시료 용액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 10 μ L를 HPLC에 주입하여 분석한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(8) 생약의 품질 관리를 위한 패턴분석

- 7종의 음약과 추출물 이외에 3종의 식물추출물 NP-1, NP-2, NP-3를 위와 같은 방법으로 LC/MS에 주입하여 각각에 대한 total ion chromatogram (TIC)을 얻었다. 총 7종의 추출물의 TIC 데이터를 바탕으로 retention time, m/z value, peak intensity를 데이터화하여 SAS 8.02 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 통계처리 하였다. 다변량 패턴인식분석을 위하여 주성분 분석

(Principle component analysis, PCA)을 수행하였으며, Bray-Curtis식을 이용하여 각 추출물 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다. Bray-Curtis식은 다음과 같다.

$$SI = \frac{2 \sum_{i=1}^s \min(x_{ij}, x_{ik})}{\sum_{i=1}^s (x_{ij} + x_{ik})}$$

2.2 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분 에 대한 분석법 연구

가. 연구개발 내용

- 천궁으로부터 생리활성 성분 분리, 구조분석
- HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting
- HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation
- HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립
- 실제 유통되는 천궁 시료 분석
- 천궁의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용

나. 방법

< 분리법 >

(1) 천궁의 구입 및 인증

(가) 성분 대량 추출용

- 성분 대량 추출용 천궁(Cnidii Rhizoma)은 천궁 (*Cnidium officinale* Makino, 20 kg)를 재배지인 강원도 정선군 정선읍 애산리에서 직접 구입하여 경희대학교 이재현 교수의 감정을 거쳐 진품을 확인하고 한약재 과학화 사업단에 정품으로 제출하고 실험에 사용하였다.

(나) 비교 분석용

- 비교 분석용 천궁 시료의 내역 및량은 아래의 Table 1과 같다.

(2) 추출

- 천궁은 정유 성분을 유효성분으로 하고 있는 생약임으로 다른 생약에 적용하는 추출법과는 다른 추출법을 사용하여야 한다. 따라서 재료로부터 직접 용매를 분획 추출하는 아래의 Scheme에 따라 추출하였다. 그리고 70% ethanol 추출물은 따로 추출하였다.

(가) 70% EtOH extract의 제조

① 성분 대량 추출용

- 천궁 분말(2.5kg)을 70% ethanol로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 ethanol을 vacuum rotary evaporator를 이용하여 날려 보낸 다음 동결건조에 의하여 70% ethanol ext.를 제조하였다.

Table 1. Sample list of Cnidii Herba

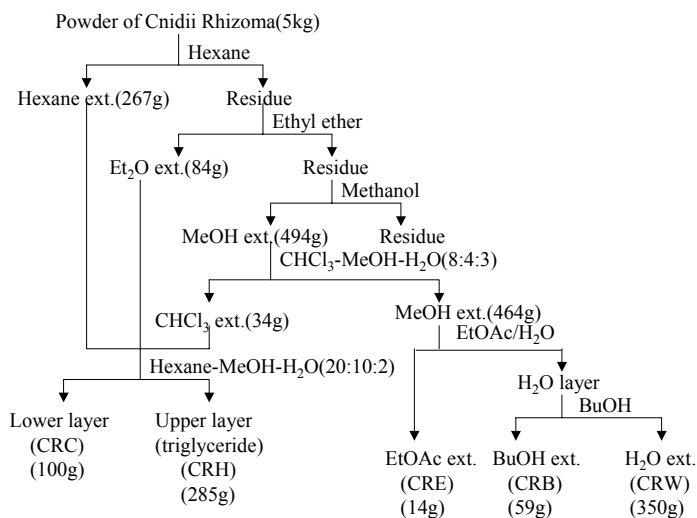
연번	시료명	국가	구입처	년도	연번	시료명	국가	구입처	년도
1	K-1	한국	정*물산 경북 안동시 용상동산	2005	9	K-9	한국	김포시장 수집품	-
2	K-2	한국	정*물산 경북 영천시 임고면산	2005	10	K-10	한국	제기동시장 수집품	-
3	K-3	한국	우*한약유통 경북 영양군 수비면산	2004	11	C-1	중국	식품 수입품 농림	-
4	K-4	한국	한국생약협회 경북 달성군산	2004	12	C-2	중국	중국 장사시장 수집품	-
5	K-5	한국	농림생약 영천시장 수집	-	13	C-3	중국	중국 나주시장 수집품	-
6	K-6	한국	구미시장 수집품 경북 영양군 수비면산	-	14	C-4	중국	중국 곤명시장 수집품	-
7	K-7	한국	영천시장 수집품	-	15	C-5	중국	중국 안국시장 수집품	-
8	K-8	한국	제기동 시장 수집품	-					

② 비교 분석용

- 비교 분석용 시료 일정량(K1-K6: 40g; K7-K10: 20 g, C1-C5: 20 g)을 취하여 위에서와 같은 방법으로 70% ethanol ext.를 제조하였다.

(나) 분획 추출

- Scheme 3에 따라 천궁 분말(5 kg)을 먼저 hexane으로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 vacuum rotary evaporator를 이용하여 증발 농축하여 hexane ext.를 얻었다. 다음으로 분말의 hexane을 상온에서 증발시킨 다음 ether로 온침(reflux, 3시간, 3회)하고 ether를 증발 농축하여 ether ext.를 얻었다. 다음으로 분말의 ether를 상온에서 증발시킨 다음 methanol로 온침(reflux, 3시간, 3회)하여 methanol ext.를 얻었다. 이 methanol ext.에 함유되어 있는 저극성 물질과 극성 물질을 분리하기 위하여 chloroform-methanol-H₂O (8:4:3)으로 분획하였다. Chloroform ext.와 앞에서 얻은 hexane ext. 및 ether ext.를 합하여 극성 물질과 비극성 물질을 나누기 위하여 hexane-MeOH-H₂O (20:10:2)로 분획하여 hexane ext.와 methanol ext.를 얻었다. 위에서 얻은 methanol ext.를 물에 현탁시키고 ethyl acetate로 분획하여 ethyl acetate ext.를 얻었다. 최종적으로 물 fraction을 butanol로 분획하여 butanol ext.와 물 ext.를 얻었다.



Scheme 3. Solvent fractionation of *Cnidii Rhizoma*

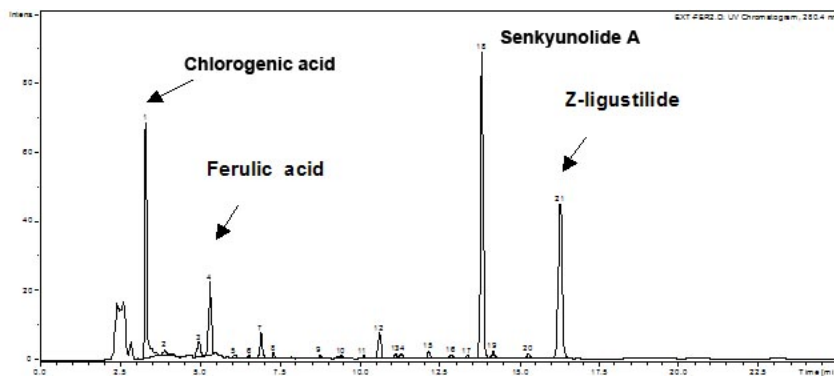


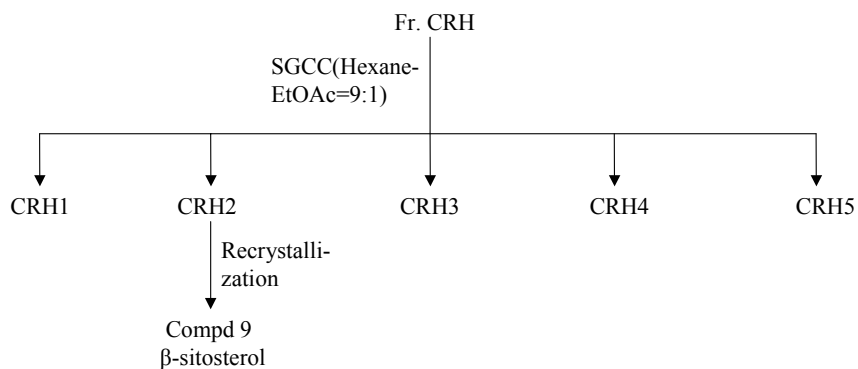
Figure 2. HPLC chromatogram of 70% EtOH ext.

(3) 물질 분리

- 천궁의 물질 분리는 2차대사산물이 집중되어 있는 모든 용매 분획(Fr. CRH, CRC, CRE, CRB)으로 행하였다. 그 중에서도 Fr. CRC 분획을 중심으로 행하여졌다. 이것은 분석팀이 확인한 70% ethanol ext.의 HPLC 분석 data(Figure 2)로부터 판단하여 볼 때 main으로 얻어지는 물질이 이 분획에 집중되어 있고, 분획의 량으로부터도 1차대사산물 분획인 Fr. CRH, CRW를 제외하고 가장 많은 분획이고, 천궁의 유효성분으로 인정되고 있는 alkylphthalide가 주로 포함되어 있는 분획이기 때문에 이 분획에서 천궁의 지표물질이 분리되어야 하기 때문이었다.

(가) Fr. CRH 분획의 물질 분리

- Fr. CRH 10g을 silica gel 60(70-230 mesh) 1kg, 용매로서는 hexane-EtOAc(9:1)을 이용하여 column chromatography(SGCC)를 실시하였다. 모두 5개의 분획을 얻고 각 분획의 물질을 재차 정제하였다. Fr. CRH2를 MeOH로 재결정하여 Compd 9을 분리하였다 (Scheme 4).



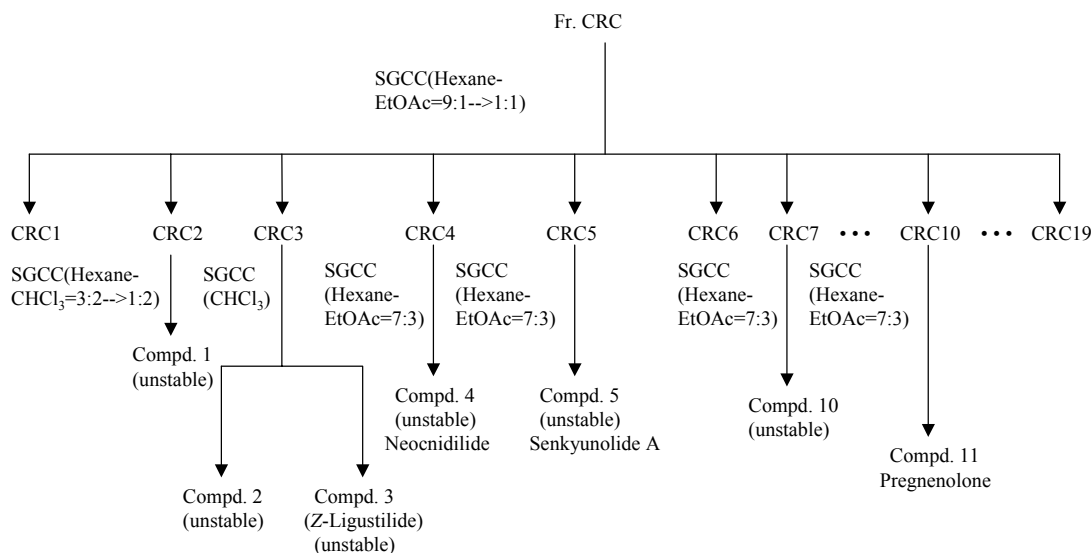
Scheme 4. Isolation of compounds from Fr. CRH

Compd. 9: 무색 결정으로 Liebermann-Burchard 반응에서 양성을 나타내었다.

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 5.35(1H, m, H-6), 3.52(1H, m, H-3), 1.01(3H, s, H-19), 1.01(3H, s, H-19), 0.92(1H, d, J=6.4, H-21), 0.83(3H, d, J=6.8 Hz, H-26), 0.81(3H, d, J=6.9, H-27), 0.85(3H, t, J=7.8 Hz, H-29), 0.69(3H, s, H-18); ¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 37.3(C-1), 31.6(C-2), 71.7(C-3), 42.2(C-4), 140.7(C-5), 121.6(C-6), 32.0(C-7), 31.8(C-8), 51.1(C-9), 36.4(C-10), 21.1(C-11), 39.8(C-12), 42.4(C-13), 56.8(C-14), 24.2(C-15), 28.3(C-16), 56.0(C-17), 11.8(C-18), 19.5(C-19), 36.1(C-20), 18.7(C-21), 34.0(C-22), 26.1(C-23), 45.8(C-24), 29.2(C-25), 19.8(C-26), 19.2(C-27), 23.1(C-28), 11.0(C-29)

(나) CRC 분획의 물질 분리

◦ CRC 50g을 silica gel 60(70-230 mesh) 3kg, 용매로서는 hexane-EtOAc(9:1) → (1:1)을 이용하여 column chromatography(SGCC)를 실시하였다 (Scheme 5). 모두 19개의 분획으로 나누고 각 분획의 물질을 재차 정제하였다. 물질의 확인은 TLC(silica gel 60F254, solvent: hexane-EtOAc=7:3) spot의 확인은 UV(254nm, 366nm) 및 황산 발색으로 확인하였다.



Scheme 5. Isolation of compounds from Fr. CRC

Compd. 1: CRC2의 main spot으로 황산에 의하여서만 보라색으로 발색이 되는 물질이었다. UV 254nm에서 갈색으로 보이는 물질이 섞여 있었기 때문에 2차 SGCC(silica gel 60, solv.: chloroform-hexane=3:2→1:2)를 실시하여 단일한 물질로 분리하였다. 현재 이 물질은 구조 결정 중에 있다.

Compd. 2: CRC3으로부터 chloroform을 이용하는 2차 SGCC로 Compd. 3보다 먼저 분리되는 물질로 UV 254nm에서만 확인이 되고 UV 366nm에서는 형광을 나타내지 않는 물질이다.

Colorless oil

UV(MeOH): λ_{max} 262, 312 nm

ESI-MS: m/z 189(100) [M+H]⁺, 171, 153

¹H-NMR(500MHz, CDCl₃): δ 7.89(1H, d, J=8.0, H-7), 7.64-7.69(2H, m, H-4, 5), 7.50(1H, ddd, J=11.0, 7.5, 1 Hz, H-6), 5.64(1H, t, J=7.5, H-8), 2.46(2H, td, J=7.5, 7.5 Hz, H-9), 1.56(2H, tq, J=7.5, 7.5 Hz, H-10), 0.99(3H, t, J = 7.5 Hz, H-11)

¹³C-NMR(125MHz, CDCl₃): δ 167.2(C-1), 145.7(C-3a), 139.6(C-3), 134.2(C-5), 129.3(C-6), 125.2(C-7), 124.4(C-7a), 119.6(C-4), 109.4(C-8), 27.8(C-9), 22.5(C-10), 13.8(C-11)

Compd 3: CRC3으로부터 얻어지는 물질로 거의 단일 spot으로 UV 254nm에서 갈색으로 보이고 UV 366nm에서 청색 형광을 나타낸다. 황산 발색에서도 옅은 갈색을 나타내었다. 그러나 이 spot은 단일 물질이 아니고 chloroform을 전개용제로 한 TLC에서 2개의 spot으로 나누어지는 혼합물이었다. Chloroform을 용매로 사용하는 2차 SGCC를 실시하여 UV 366nm에서 형광을 나타내는 물질만을 순수 분리하였다. 이 화합물은 Figure 2의 t_R 13.8분의 미지의 물질과 일치함을 확인하였다. 이 화합물은 극히 불안정한 물질로 공기 중에 잠시라도 노출이 되면 변화해 버리는 물질로 순수 분리 후부터는 질소 기류 하에서 모든 조작을 행하였다.

Colorless oil

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 6.29(1H, dt, $J = 9.5, 2.0$ Hz, H-7), 6.00(1H, dt, $J = 10, 4.0$ Hz, H-6), 5.22(1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-8), 2.60(2H, t, $J = 9.5$ Hz, H-4), 2.44-2.49(2H, m, H-5), 2.38(2H, dt, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H-9), 1.51(1H, tq, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H-10), 0.96(3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-11)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): δ 167.6(C-1), 148.6(C-3a), 147.0(C-3), 129.9(C-6), 124.0(C-7a), 117.2(C-7), 112.9(C-8), 28.1(C-9), 22.4(C-5, 10), 18.5(C-4), 13.8(C-11)

ESI-MS: m/z 191[M+H] $^+$, 173(100), 145

Compd. 4: Compd. 4와 5가 섞여 있는 CRC4 분획을 2차 SGCC(용매: hexane-EtOAc=7:3)으로 분리, 정제를 하여 얻었다.

Colorless oil

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 6.75(1H, dt, $J = 3.5, 3.5$ Hz, H-7), 3.97(1H, ddd, $J = 8.6, 7.0, 6.0$ Hz, H-3), 2.48-2.53(1H, m, H-3a), 2.35(1H, dddd, $J = 20.3, 6.8, 3.5, 3.7, 1.2$ Hz, H-6), 2.16-2.25(1H, m, H-6), 2.05-2.10(1H, m, H-4), 1.94(1H, dddd, $J = 13.9, 6.8, 3.3, 3.2$ Hz, H-5), 1.73-1.81(2H, m, H-8), 1.48-1.60(2H, m, H-5, H-9), 1.34-1.47(2H, m, H-9, H-10), 1.14-1.22, 1H, m, H-4), 0.92(3H, t, $J = 7.0$ Hz, H-11)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): δ 169.8(C-1), 134.8(C-7), 130.9(C-7a), 85.0(C-3), 42.8(C-3a), 34.0(C-8), 27.2(C-9), 25.1(C-4), 24.7(C-6), 22.2(C-10), 20.5(C-5), 13.6(C-11)

ESI-MS: m/z 217 [M+Na] $^+$, 195[M+H] $^+$, 177, 149(100)

Compd. 5: Compd. 5가 main이고 Compd. 4가 극미량 섞여 있는 CRC5 분획을 2차 SGCC(용매: hexane-EtOAc=7:3)으로 분리, 정제를 하여 얻었다.

Colorless oil

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 6.21(1H, dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-7), 5.91(1H, dt, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-6), 4.93(1H, dd, $J = 8.0, 3.5$ Hz, H-3), 2.47(4H, m, H-4, H-5), 1.87(1H, m, H-8a), 1.54(1H, m, H-8b), 1.33-1.45(4H, m, H-9, H-10), 0.91(3H, t, $J = 7.0$, H-11)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): δ 171.2(C-1), 161.4(C-3a), 128.3(C-6), 124.5(C-7a), 116.9(C-7), 82.59(C-3), 31.9, 26.7, 22.4, 22.3(C-10), 20.8(C-5), 13.8(C-11)

ESI-MS: m/z 215 [M+Na] $^+$, 193[M+H] $^+$, 175, 147(100)

Compd. 10: Fr. CRC7을 hexane-EtOAc(7:3)로 2차 SGCC로 정제하여 얻어진 무색 oil 상태의 물질로 366 nm UV에서 약한 형광을 발하는 물질

Colorless oil

UV(MeOH): λ_{max} 232, 278 nm

ESI-MS: m/z 381(100)[M+H] $^+$, 191

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 7.35(1H, d, $J=7.0$ Hz, H-7'), 5.07(1H, t, $J=8$ Hz, H-8), 5.00(1H, t, $J=7$ Hz, H-8'), 3.25(1H, d, $J=9$ Hz, H-7), 2.99(1H, m, $J=6.5, 2.5, 2.5, 2.5$ Hz, H-6'), 2.55(1H, dd, $J=9, 6.5$ Hz, H-6), 2.29(2H, m, $J=8, 7.5$ Hz, H-9), 2.20(1H, m, H-4), 2.18(2H, m, $J=7.5, 7.5$ Hz, H-9'), 2.06(1H, dd, $J=17, 5$ Hz, H-4), 1.95(1H, dd, $J=13, 3$ Hz, H-4'), 1.87(2H, m, H-5, 5'), 1.56(1H, d, $J=13, H-4'$), 1.53(1H, m, H-5), 1.45(4H, m, $J=7.5, H-10, 10'$), 0.92(3H, t, $J=7.5$

Hz, H-11)

^{13}C -NMR(125MHz, CDCl_3): δ 168.1(C-1), 155(C-3a), 148.1(C-3), 126.6(C-7a),
112.1(C-8), 38.4(C-6), 41.6(C-7), 29.0(C-5), 28.0(C-9), 22.3(C-10), 19.8(C-4),
13.9(C-11)

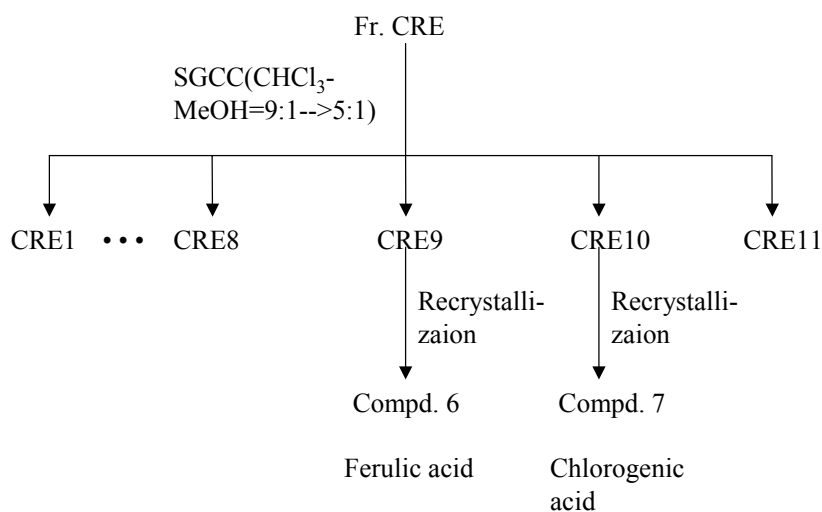
Compd. 11: Fr. CRC10으로부터 hexane-EtOAc(7:3)로 2차 SGCC로 정제하여 얻어진 무색 결정성 물질로 Liebermann-Buchard 반응에 양성이고 현재 TLC co-spotting 소견으로 pregnenolone로 추정된다.
Colorless powder

^1H -NMR(500MHz, CDCl_3): δ 5.35(1H, t, C-6), 3.53(1H, m, H-3), 2.13(3H, s, C-21),
1.01(3H, s, H-19), 0.64(3H, s, H-18)

^{13}C -NMR(125MHz, CDCl_3): δ 209.6(C-20), 140.8(C-5), 121.4(C-6), 71.7(C-3),
63.7(C-17), 56.9(C-14), 50.0(C-9), 44.0(C-13), 42.2(C-4), 38.8(C-12),
37.2(C-1), 36.5(C-10), 31.8(C-8), 31.7(C-7), 31.6(C-2), 31.5(C-21), 24.5(C-15),
22.8(C-16), 21.1(C-11), 19.4(C-19), 13.2(C-18),

(다) CRE 분획의 물질 분리

◦ CRE를 chloroform-MeOH(9:1→5:1)로 SGCC를 행하여 11개 분획으로 나누고 각 분획에서 물질을 분리, 정제하였다 (Scheme 6).



Scheme 6. Isolation of compounds from Fr. CRE

Compd. 6: CRE10 분획을 2차 SGCC(용매: chloroform-MeOH=5:1)로 정제를 하여 얻어진 물질임.

Yellow powder

^1H -NMR(500MHz, DMSO-d_6): δ 7.60(1H, d, $J = 16$ Hz, H-7), 7.17(1H, d, $J = 2$ Hz, H-2),
7.06(1H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-6), 6.81(1H, d, $J = 8$ Hz, H-5), 6.31(1H, d, $J = 16$ Hz, H-8),
3.89(3H, s, $-\text{OCH}_3$)

^{13}C -NMR(125MHz, DMSO-d_6): δ 171.2(C-9), 150.6(C-3), 149.5(C-7), 147.0(C-4), 127.9(C-1),
124.1(C-6), 116.6(C-5), 116.1(C-8), 111.9(C-2), 56.6($-\text{OCH}_3$)

Compd. 7: CRE11 분획을 2차 SGCC(용매: chloroform-MeOH=5:1)로 정제를 하여 얻어진 물질임.

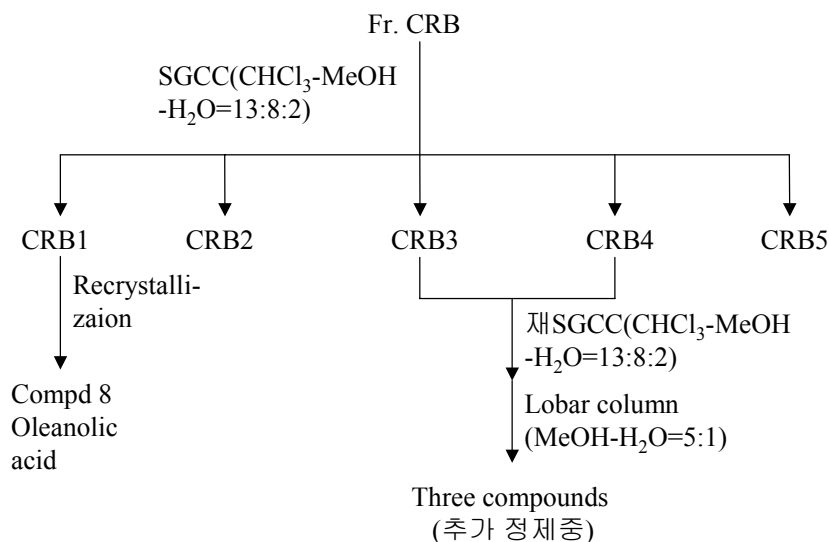
Yellow powder

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6): δ 7.56(1H, d, $J = 16$ Hz, H-3'), 7.05(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5'), 6.95(1H, dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, H-9'), 6.78(1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-8'), 6.263(1H, d, $J = 16$ Hz, H-2'), 5.32(1H, td, $J = 8.7, 4.5$ Hz, H-5), 4.17(1H, m, H-3), 3.72(1H, dd, $J = 8.7, 3$ Hz, H-4), 2.03-2.24(4H, double AMX, H-6e, H-2a, H-6a, H-2e)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, DMSO-d_6): δ 177.2(-COOH), 168.8(C-1'), 149.7(C-3'), 147.2(C-6'), 146.9(C-7'), 128.0(C-4'), 123.1(C-2'), 116.6(C-8'), 115.4(C-9'), 115.3(C-5'), 76.3(C-1), 73.6(C-4), 72.1(C-5), 71.5(C-3), 38.9(C-2), 38.3(C-6)

(라) CRB 분획의 물질 분리

- CRB 분획을 chloroform-MeOH-H₂O(13:8:2)의 용매를 사용하여 SGCC를 실시하여 5개의 분획으로 나누었다. Fr. 1을 MeOH로 재결정을 반복하여 compound 8을 얻었다. 이 물질은 Liebermann-Burchard 반응에 양성이고 TLC co-spotting의 소견으로 oleanolic acid로 추정된다. Fr. 3 및 Fr. 4을 chloroform-MeOH-H₂O(13:8:2)으로 재 column, MeOH-H₂O(5:1)의 용매 조건으로 Lobar column으로 3종의 물질을 확인하고 추가 정제 중에 있다 (Scheme 7)



Scheme 7. Isolation of compounds from Fr. CRB

Compd 8: 최종으로 methanol로 재결정하였다.

Colorless powder

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, CDCl_3): δ 0.75, 0.77, 0.90, 0.91, 0.93, 0.99, 1.13(3H each, s, 7 CH₃), 2.82(1H, dd, $J=4.3, 13.8$ Hz, H-18), 3.22(1H, dd, $J=4.5, 11.0$ Hz, H-3), 5.28(1H, t, $J=3.5$ Hz, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, CDCl_3): δ 183.4(C-28), 143.6(C-13), 122.6(C-12), 79.0(C-3), 55.2(C-5), 47.6(C-9), 46.5(C-17), 45.9(C-19), 41.6(C-14), 41.0(C-18), 39.3(C-8), 38.7(C-4), 38.4(C-1), 37.1(C-10), 33.8(C-21), 33.0(C-7), 32.4(C-22), 30.7(C-20), 28.1(C-23), 27.7(C-15), 27.2(C-2), 25.9(C-27), 32.6(C-29), 23.6(C-30), 23.5(C-16), 22.9(C-11), 18.3(C-6), 17.1(C-26), 15.5(C-24), 15.3(C-25)

< 분석팀 >

(1) 실험재료

- 본 실험에서는 산지가 각기 다른 천궁 70% 에탄올 추출물 15종을 사용하였다. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide는 천궁으로부터 추출된 표준품을 사용하였고, 내부표준 물질로 사용한 digoxin, α -naphthoflavone은 Sigma-Aldrich로부터 구매하였다. 천궁의 시료 분석에 사용된 각 천궁 시료의 산지, 구입처, 실험에 쓰인 생약의 무게와 70% 에탄올로 추출 후 얻어진 추출물의 무게는 다음과 같다.

시료 번호	산지	통용명	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)
K-1	한국산	토천궁	안동	40	11.11
K-2	한국산	일천궁	경북 영천	40	8.66
K-3	한국산	일천궁	경북 영양	40	11.73
K-4	한국산	일천궁	경북 달성	40	8.71
K-5	한국산	토천궁	영천	40	10.02
K-6	한국산	일천궁	영양	40	11.65
K-7	한국산	일천궁	영천	20	7.00
K-8	한국산	일천궁	서울 제기동	20	6.29
K-9	한국산	일천궁	김포시장	20	6.90
K-10	한국산	일천궁	서울 제기동	20	6.96
C-1	중국산	중국산 천궁	중국, 농림	20	3.96
C-2	중국산	중국약전품	중국, 장사시장	20	6.80
C-3	중국산	중국약전품	중국, 난주시장	20	6.50
C-4	중국산	중국약전품	중국, 곤명시장	20	7.94
C-5	중국산	중국산 천궁	중국, 안국시장	20	5.09

(2) 시약 및 기구

- HPLC용 용매는 J. T. Baker (USA)제품을 사용하였으며, 그 외 분석용 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. Compound profiling을 위한 실험에는 Agilent 1100 series LC/MSD trap을 사용하였으며 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (4.6 × 250 mm) 을 사용하였다. HPLC/UV를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shiseido Nanospace SI-1을, 분석용 컬럼은 Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm, Waters)을 사용하였다. LC/MS/MS를 이용한 동시분석법 실험에서는 HPLC 시스템으로 Shimadzu HPLC system LC-10A series를 mass detector로 API2000 triple-quadrupole mass spectrometry를, 분석용 컬럼은 Capcellpak C₁₈ (2.0 × 150 mm)을 사용하였다.

(3) 표준액의 조제

- 표준품 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin, α -naphthoflavone을 메탄올에 녹여 1mg/mL의 농도가 되도록 조제하여 표준 원액으로 사용하였다.

(4) 검액의 조제

- 각각의 천궁 추출물을 2 mg/mL의 농도로 70% EtOH에 녹여 검액으로 사용하였다.

(5) LC/UV/MS를 이용한 천궁 추출물의 compound profiling

- 천궁 추출물 용액을 LC/UV/MS에 주입하여 각각에 대한 UV와 MS profile을 얻었으며 HPLC와 MS 조건은 다음과 같다.

(가) HPLC-UV condition

- HPLC/UV/MS system: Agilent 1100 series LC/MSD trap
- Column: Capcellpak C18 (4.6 × 250 mm)
- Mobile phase: (A) 90% ACN in 0.1% formic acid, (B) 0.1% formic acid
- Flow rate: 1 mL/min (split ratio 1/5),
- Injection vol.: 20 µL
- UV detector: 280 nm
- Sample concentration: 5 mg/mL in MeOH
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	30	70
10	70	30
20	70	30
21	30	70
30	30	70

(나) Mass spectrometric parameter

- Polarity: Positive
- Scan range: 100-500 m/z
- Compound stability: 80%
- Nebulizer pressure: 35 psi,
- Dry gas flow: 8 L/min,
- Dry temperature: 350°C

(6) LC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립

(가) HPLC/MS 조건

- 천궁 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC와 mass spectrometer의 조건은 다음과 같다.

HPLC condition

- HPLC system: Shimadzu HPLC system LC-10A series (Kyoto, Japan)
- Column: Capcellpak C18 (2.0 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% formic acid, (B) 90% ACN in 0.1% formic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	90	10
0.5	40	60
4	5	95
5	90	10
7	90	10

- Flow rate: 0.2 ml/min

- Injection vol.: 5 µL

Mass spectrometric parameter

-MS spectrometer: API2000 triple-quadrupole mass spectrometry

-Polarity: Positive

-Dry temperature: 350°C

-Nebulizing, turbo, curtain gas: 40, 80, 40

Analyte	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy(V)
Chlorogenic acid	355	163	27
Ferulic acid	195	177	17
Senkyunolide A	193	91	33
(Z)-ligustilide	191	91	47
Digoxin (IS)	781	97	53

-Multiple reaction monitoring parameters:

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 chlorogenic acid의 경우, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/mL, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg/mL, ferulic acid의 경우 1, 2, 5, 20, 100 µg/mL의 농도가 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 10 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 10 µL를 HPLC/MS에 주입하여 MRM mode로 분석 후 extracted ion chromatogram으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복한 후 피크면적비에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(다) 천궁 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량 분석

- 산지 또는 기원이 서로 다른 15종의 천궁 추출물을 50 µg/mL의 농도가 되도록 70% EtOH에 녹인 후, 100 µL를 취하여 내부표준액인 digoxin 용액(100 µg/mL)을 10 µL 첨가하여 시료액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 각 시료액 10 µL를 LC/MS에 주입하여 MRM mode로 분석 후 extracted ion chromatogram으로부터 각 peak 면적비를 구한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(7) HPLC/UV를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation

(가) HPLC 조건

- 천궁 유효성분의 동시 분석을 위한 HPLC의 조건은 다음과 같다

- HPLC system: Shiseido Nanospace SI-1
- Column: Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm)
- Mobile phase: (A) 0.1% acetic acid, (B) 95% MeOH in 0.1% acetic acid
- Solvent gradient system:

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
4	45	55
10	15	85
14	15	85
15	80	20
20	80	20

- Flow rate: 1 mL/min
- Injection vol.: 5 µL
- Detection: 280 nm
- Column oven temperature: 35°C

(나) 검량선 작성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액 (1 mg/mL in MeOH)을 가지고 각각의 농도가 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL씩 가하여 표준액을 조제하였다. 각 표준액 5 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적을 구하였다. 이와 같은 조작을 3번 반복하여 피크면적비에 대한 평균치를 구하여 검량선을 작성하였다.

(나) 일내 일간 정확성 및 재현성

- 각 표준품(chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide)에 대한 표준 원액을 가지고 각각의 농도가 2, 20, 100 µg/mL이 되도록 70% 에탄올로 희석하여 각각을 100 µL 취한 후 내부표준액인 α-naphthofalvone 용액(100 µg/mL)을 10 µL 가하여 QC용 표준액을 조제하였다. 각 표준액 5 µL를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 피크 면적비를 구하였다. 이와 같은 조작을 하루에 5번 반복하여 일내 재현성과 정확성을 구하고 매일 각 시료를 1회씩 4일간 분석하여 일간 재현성과 정확성을 구하였다. 재현성을 나타내는 정밀도는 relative standard deviation (%RSD)로 나타내고 정확도는 각 시료로부터 측정된 농도의 평균값을 이론값에 대한 백분율로 표시하였다.

(다) 완전성

- 50 µg/mL의 QC시료에 대하여 컬럼 종류(Atlantis C₁₈, Capcellpak C₁₈), column oven temperature (30, 35, 40°C), 이동상의 acetic acid 농도(0.05%, 0.1%, 0.2%)를 변화시켜 각각 3회 반복 분석하여 본 분석법의 완전성을 시험하였다. 분석 후 얻어진 크로마토그램에 대하여 이론단수 (NTP), peak 너비 (W), retention factor (K), tailing factor (AS) 등의 값을 계산하여 분석 조건의 변화에 따른 완전성을 나타내었다.

(라) 천궁 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량 분석

- 산지 또는 기원이 서로 다른 15종의 천궁 추출물을 2.5 mg/mL의 농도가 되도록 70% EtOH에 녹인 후, 100 μ L 취하여 내부표준액인 α -naphthofalvone 용액(100 μ g/mL)을 10 μ L 첨가하여 시료액을 조제하였다. 위의 분석법에 따라 각 시료액 5 μ L를 HPLC에 주입하여 UV 크로마토그램으로부터 내부표준물질에 대한 피크 면적비를 구한 후 각 성분에 대한 함량을 계산하였다.

(9) 천궁의 품질 관리를 위한 패턴분석의 응용

- 15종의 천궁 추출물 용액을 HPLC에 주입하여 각각에 대한 UV 크로마토그램을 얻은 후, 이를 바탕으로 UV 크로마토그램 상에 발견되는 각 peak의 retention time, peak area를 데이터화하여 SAS 8.02 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 패턴인식분석을 수행하였다. 다변량 패턴인식분석을 위하여 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하였으며, Bray-Curtis식을 이용하여 각 추출물 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다. Bray-Curtis식은 다음과 같다.

$$SI = \frac{2 \sum_{i=1}^s \min(x_{ij}, x_{ik})}{\sum_{i=1}^s (x_{ij} + x_{ik})}$$

제3장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 연구

가. 음양곽 70% Ethanol 추출물 제공

- 산지가 다른 7종의 음양곽 시료로부터 각 40g의 건조분말을 70% Ethanol로 가열 추출을 3회 반복하여 감압농축한 후 동결건조하여 Ethanol 추출물을 확보하였는데, 각 시료당 3 set의 추출물을 제조하여 분석팀에 제공하였다. 각 시료의 산지, 구입처, 수득량은 다음과 같다.

시료번호	산지	구입처	생약 무게 (g)	추출물 무게 (g)
K-1	한국산	청풍약초	40	8.50
				8.48
				8.71
K-2	한국산	신금강약국 (철원)	40	8.46
				8.21
				8.16
K-3	한국산	지리산 한약나라 (인제)	40	7.18
				7.21
				6.99
K-4	한국산	철원재배지	80	7.76
				8.01
				8.53
C-1	중국산	제기당물산	40	7.20
				6.98
				7.35
C-2	중국산	부영약업사	40	7.69
				7.99
				8.06
C-3	중국산	신초당약국	40	7.23
				7.44
				7.16

나. 음양곽으로부터 생리활성 성분의 분리 및 동정

- Compd. 1 : 화학식은 $C_{33}H_{40}O_{15}$, LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 676이며, spectral data를 문헌과 비교해본 결과 Icariin임을 확인하였으며, 화합물의 순도는 92.7%이다.

1H -NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ : 12.57 (1H, s, OH-5), 7.88 (2H, d, $J=8.7$, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, $J=8.7$, H-3', 5'), 6.64 (1H, s, H-6), 5.14 (1H, d, $J=7.0$, anomeric proton), 3.85 (3H, s, OCH₃), 1.69 (3H, s, H-14), 1.60 (3H, s, H-15), 0.78 (3H, d, $J=5.7$, H-6'');

^{13}C -NMR (75MHz, DMSO- d_6) δ : 178.6 (C-4), 161.7 (C-7), 160.8 (C-5), 159.4 (C-4'), 157.6 (C-9), 153.3 (C-2), 134.9 (C-3), 131.4 (C-13), 130.9 (C-2', 6'), 122.5 (C-12), 122.4 (C-1'), 114.4 (C-3', 5'), 108.6 (C-8), 105.9 (C-10), 102.3 (C-1''), 100.8 (C-1'''), 98.4 (C-6), 77.5 (C-3'''), 76.9 (C-5'''), 73.7 (C-2'''), 71.4 (C-4'''), 71.0 (C-3''), 70.6 (C-2''), 70.4 (C-5''), 60.9 (C-6'''), 55.8 (OCH₃), 25.8 (C-14), 21.7 (C-11), 18.2 (C-6''), 17.7 (C-15);

FABMS m/z 677 $[M+H]^+$, 531 $[M+H-Rha.]^+$, 369 $[M+H-Rha.-Glc.]^+$
 구조식과 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

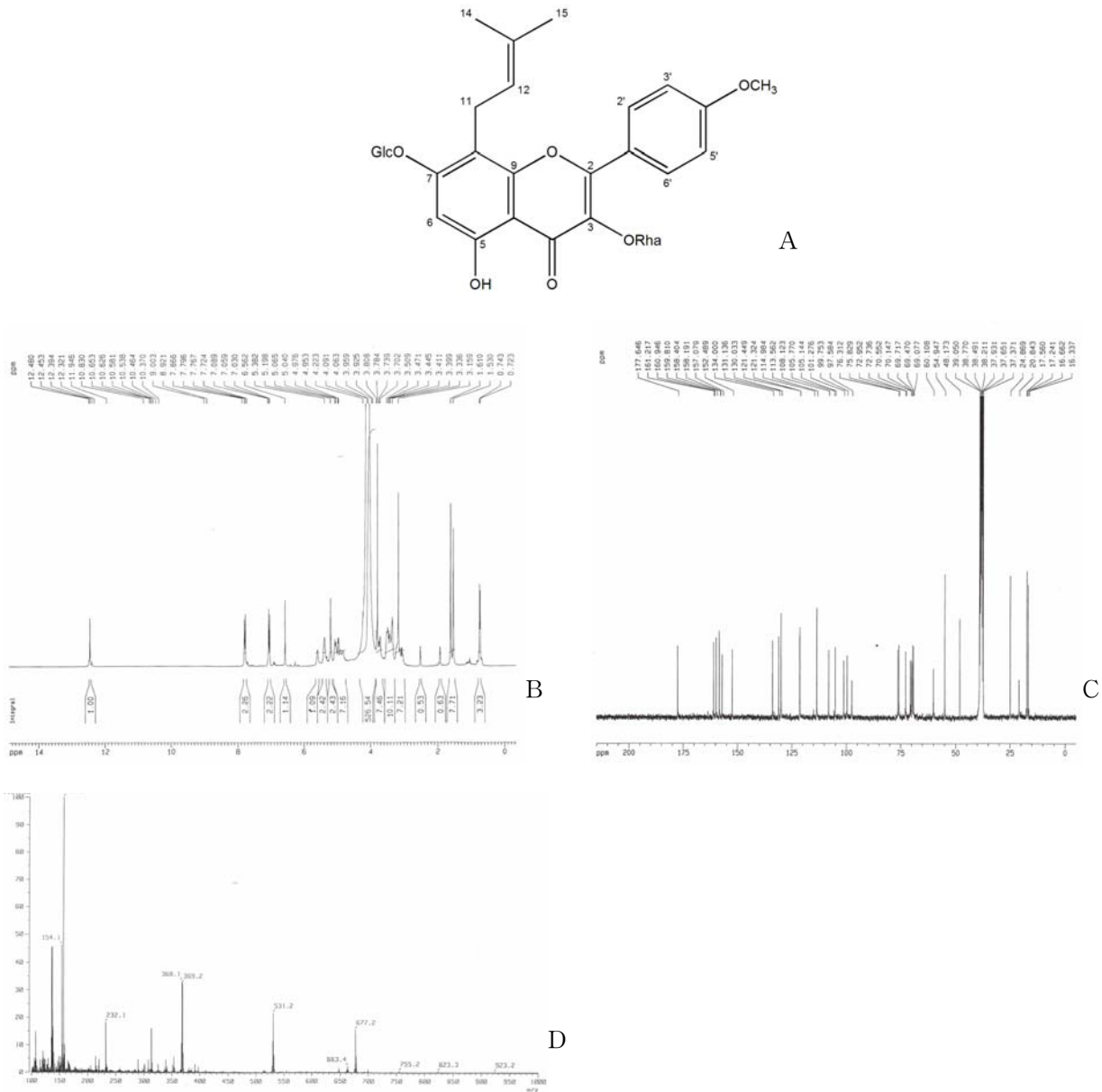


Figure 3. A. Chemical structure of Icarin, and B. 1H -NMR C. ^{13}C -NMR, and D. FABMS spectra

- Compd. 2 : 화학식은 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 이며, LC/MS 및 FABMS로 측정된 분자량은 464이다. spectral data 를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Hyperoside임을 확인하였으며 순도는 98.6% 이다.

1H -NMR (300MHz, $DMSO-d_6$) δ : 12.63 (1H, s, OH-5), 7.65 (2H, dd, $J=2.2, 8.5$, H-6'), 7.53 (1H, d, $J=2.2$, H-2'), 6.81 (1H, d, $J=8.5$, H-5'), 6.41 (1H, d, $J=2.0$, H-8), 6.20 (1H, d, $J=2.0$, H-6), 5.37 (1H, d, $J=7.7$, anomeric proton);

^{13}C -NMR (75MHz, DMSO- d_6) δ : 177.3 (C-4), 164.0 (C-7), 161.1 (C-5), 156.1 (C-2), 156.1 (C-9), 148.3 (C-4'), 144.7 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.8 (C-6'), 120.9 (C-1'), 115.8 (C-5'), 115.0 (C-2'), 103.8 (C-10), 101.6 (C-1''), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8), 75.5 (C-5''), 73.0 (C-3''), 71.0 (C-2''), 67.8 (C-4''), 60.0 (C-6'');

FABMS m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303 $[\text{M}+\text{H}-\text{Gal}]^+$

구조식과 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

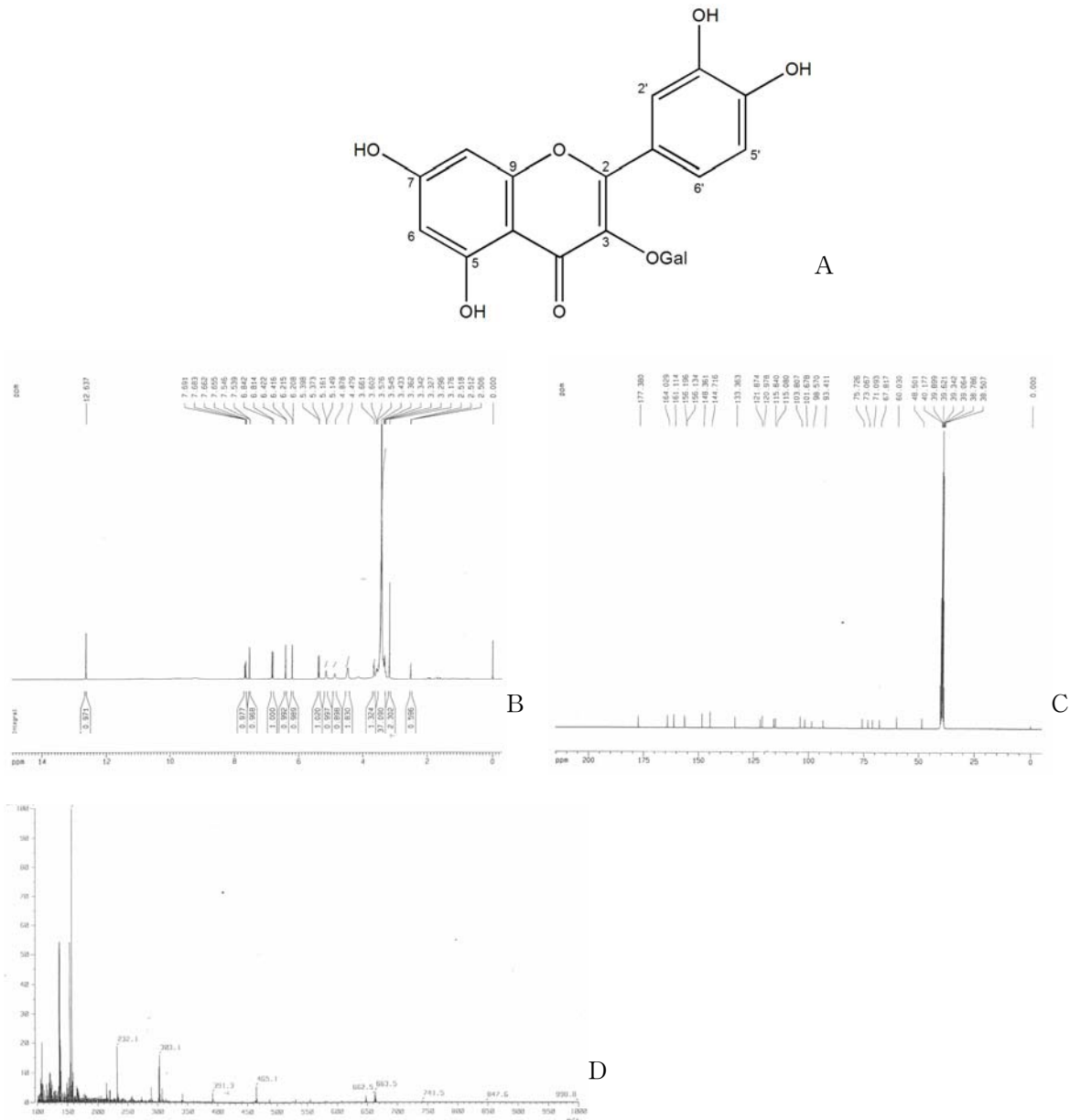


Figure 4. A. Chemical structure of Hyperoside, and B. ^1H -NMR C. ^{13}C -NMR, and D. FABMS spectra

- Compd. 3 : 화학식은 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 354이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Chlorogenic acid로 확인되었으며, 순도는 100%이다.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.39 (2H, *d*, $J=15.9$, H-7'), 7.03 (2H, *d*, $J=1.9$, H-2'), 6.96 (1H, *dd*, $J=1.9, 1.9$, H-6'), 6.75 (1H, *d*, $J=15.9$, H-8'), 5.03 (H, *m*, H-5);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 175.2 (C-7, COO), 166.0 (C-9'), 148.6 (C-4'), 145.8 (C-3'), 145.2 (C-7'), 125.9 (C-1'), 121.7 (C-6'), 116.0 (C-5'), 115.0 (C-2'), 114.5 (C-8'), 73.7 (C-1), 71.2 (C-5);

FABMS m/z 355 $[\text{M}+\text{H}]^+$

구조식과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

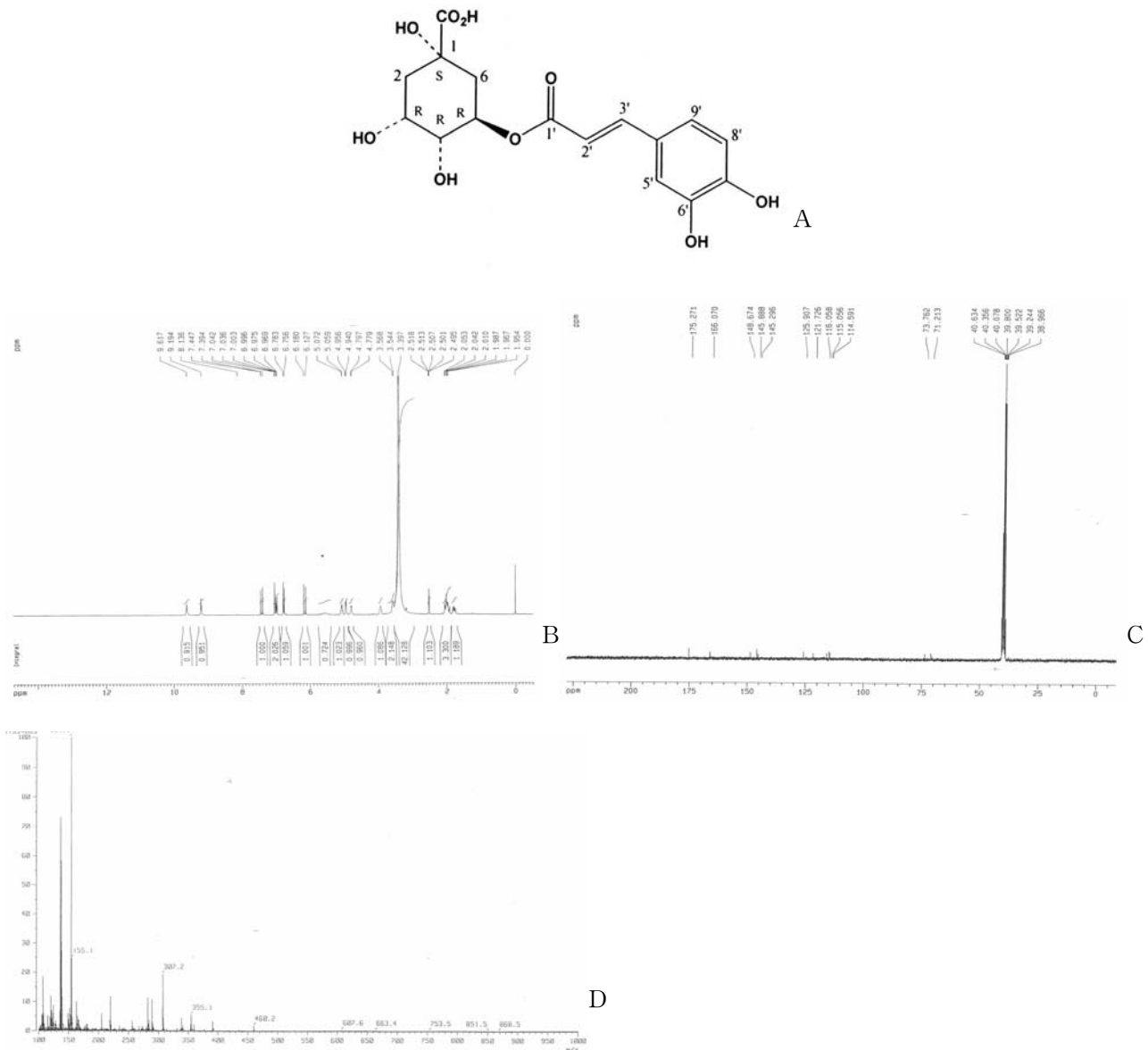


Figure 5. A. Chemical structure of Chlorogenic acid, and B. $^1\text{H-NMR}$ C. $^{13}\text{C-NMR}$, and D. FABMS spectra

- Compd. 4 : 화학식은 $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}$ 이며 LC/MS와 FABMS에 의해 측정된 분자량은 838이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin A로 확인되었으며, 순도는 94.1%이다.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.55 (1H, s, OH-5), 7.90 (2H, d, $J=8.9$, H-2', 6'), 7.13 (2H, d, $J=8.9$, H-3', 5'), 6.63 (1H, s, H-6), 3.42 (3H, s, OCH_3), 1.69 (3H, s, H-15), 0.85 (3H, d, $J=6.2$, H-6'');

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 178.1 (C-4), 161.3 (C-7), 160.4 (C-5), 158.9 (C-4'), 156.9 (C-2), 152.8 (C-9), 134.8 (C-3), 131.0 (C-13), 130.4 (C-2', 6'), 122.0 (C-12, 1'), 114.0 (C-3', 5'), 108.2 (C-8), 105.9 (C-10), 105.4 (C-1'''), 101.0 (C-1''), 98.4 (C-6), 79.0 (C-5'''), 77.0 (C-3'''), 76.5 (C-5'''), 76.4 (C-3'''), 73.7 (C-2'''), 73.2 (C-2'''), 71.5 (C-4''), 69.5 (C-4'''), 69.1 (C-4'''), 60.5 (C-6'''), 60.3 (C-6'''), 55.3 (OCH_3), 25.3 (C-14), 17.7 (C-6''), 17.2 (C-15);

FABMS m/z 861 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 839 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 531 $[\text{M}+\text{H-Rha.-Glc.}]^+$

구조식과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

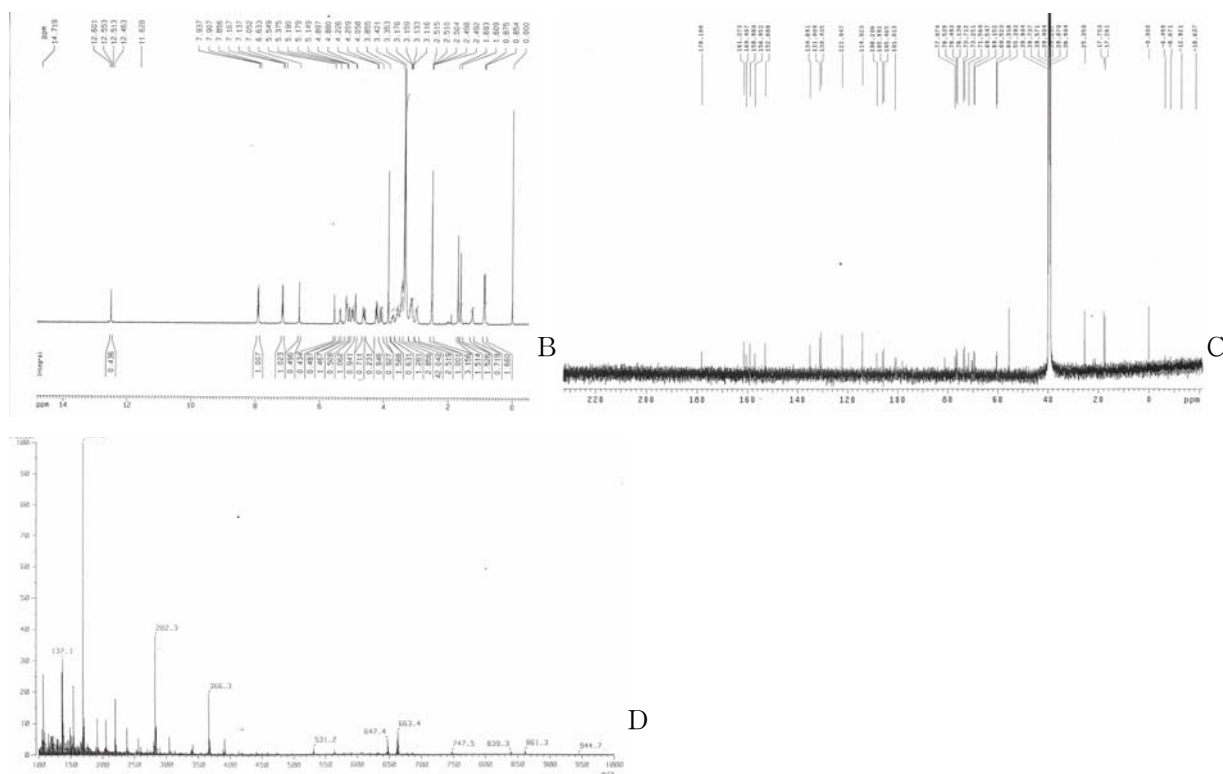
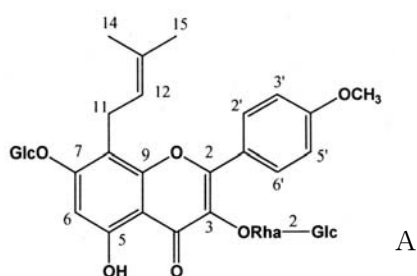


Figure 6. A. Chemical structure of Epimedin A, and B. $^1\text{H-NMR}$, C. $^{13}\text{C-NMR}$, and D. FABMS spectra

- Compd. 5 : 화학식은 $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{19}$ 이며 LC/MS로 측정된 분자량은 808이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin B로 확인되었으며, 순도는 85%이다.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.61 (1H, s, OH-5), 7.90 (2H, *d*, $J=8.9$, H-2', 6'), 7.15 (2H, *d*, $J=8.9$, H-3', 5'), 6.64 (1H, s, H-6), 4.16 (1H, *d*, $J=7.0$, anomeric proton), 3.86 (3H, s, OCH_3), 1.70 (3H, s, H-14), 1.62 (3H, s, H-15), 0.88 (3H, *d*, $J=6.1$, H-6'');

$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 178.6 (C-4), 161.8 (C-7), 160.8 (C-5), 159.4 (C-4'), 157.5 (C-2), 153.3 (C-9), 135.0 (C-3), 131.5 (C-2', 6'), 131.0 (C-13), 122.4 (C-12), 122.3 (C-1'), 114.5 (C-3', 5'), 108.6 (C-8), 106.7 (C-10), 105.8 (C-1'''), 101.3 (C-1''), 100.8 (C-1'''), 98.4 (C-6), 80.9 (C-2''), 77.5 (C-5'''), 76.9 (C-3'''), 76.5 (C-3'''), 74.0 (C-2'''), 73.6 (C-2'''), 71.9 (C-4''), 70.7 (C-3''), 70.5 (C-4'''), 69.9 (C-5''), 69.6 (C-4'''), 66.1 (C-5'''), 60.9 (C-6'''), 55.8 (OCH_3), 25.8 (C-14), 21.7 (C-11), 18.2 (C-6''), 17.7 (C-15)

구조식과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 의 data는 아래 그림과 같다.

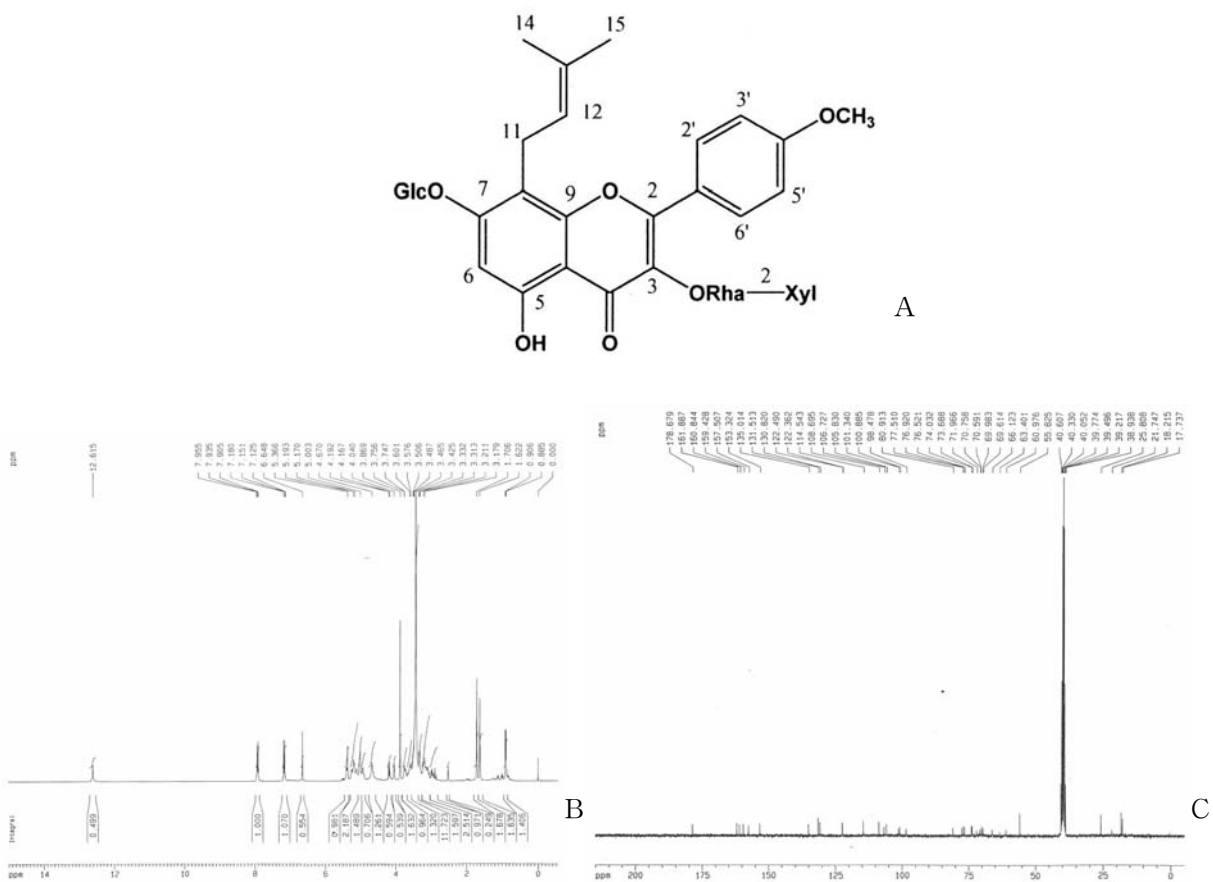


Figure 7. A. Chemical structure of Epimedin B, and B. $^1\text{H-NMR}$, and C. $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

- Compd. 6 : 화학식은 $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 822이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedin C로 확인되었으며, 순도는 69.6% 이다.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.83(2H, *d*, $J=8.8$, H-2', 6'), 7.04(2H, *d*, $J=8.8$, H-3', 5'), 6.64(1H, s, H-6), 5.52(1H, s, anomeric proton), 5.06(1H, *d*, $J=6.5$ anomeric proton), 3.87(3H, s, OCH_3), 1.71(3H, s, H-14), 1.63(3H, s, H-15), 1.20(3H, *d*, $J=6.0$, H-6''), 0.90(3H, *br s*, H-6'');

^{13}C -NMR(75MHz, DMSO- d_6) δ : 179.9(C-4), 163.4(C-7), 162.0(C-5), 160.9(C-4'), 159.1(C-2), 154.9(C-9), 136.5(C-3), 132.6(C-13), 131.8(C-2', 6'), 123.7(C-1'), 123.5(C-12), 115.2(C-3', 5'), 110.5(C-8), 107.5(C-10), 103.7(C-1'''), 102.3(C-1'''), 100.8(C-1''), 99.3(C-6), 78.2(C-5'''), 78.2(C-3'''), 74.9(C-2''), 73.9(C-2'''), 73.4(C-4''), 72.2(C-4'''), 72.0(C-3'''), 71.9(C-3'', 2''), 71.8(C-5'''), 71.1(C-5''), 70.3(C-4'''), 62.3(C-6'''), 56.0(OCH₃), 25.9(C-14), 22.7(C-11), 18.3(C-15), 17.9(C-6''), 17.8(C-6''');

FABMS m/z 823[M+H]⁺, 677[M+H-Rha.]⁺, 531[M+H-2Rha.]⁺, 369[M+H-2Rha.-Glc.]⁺

구조식과 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

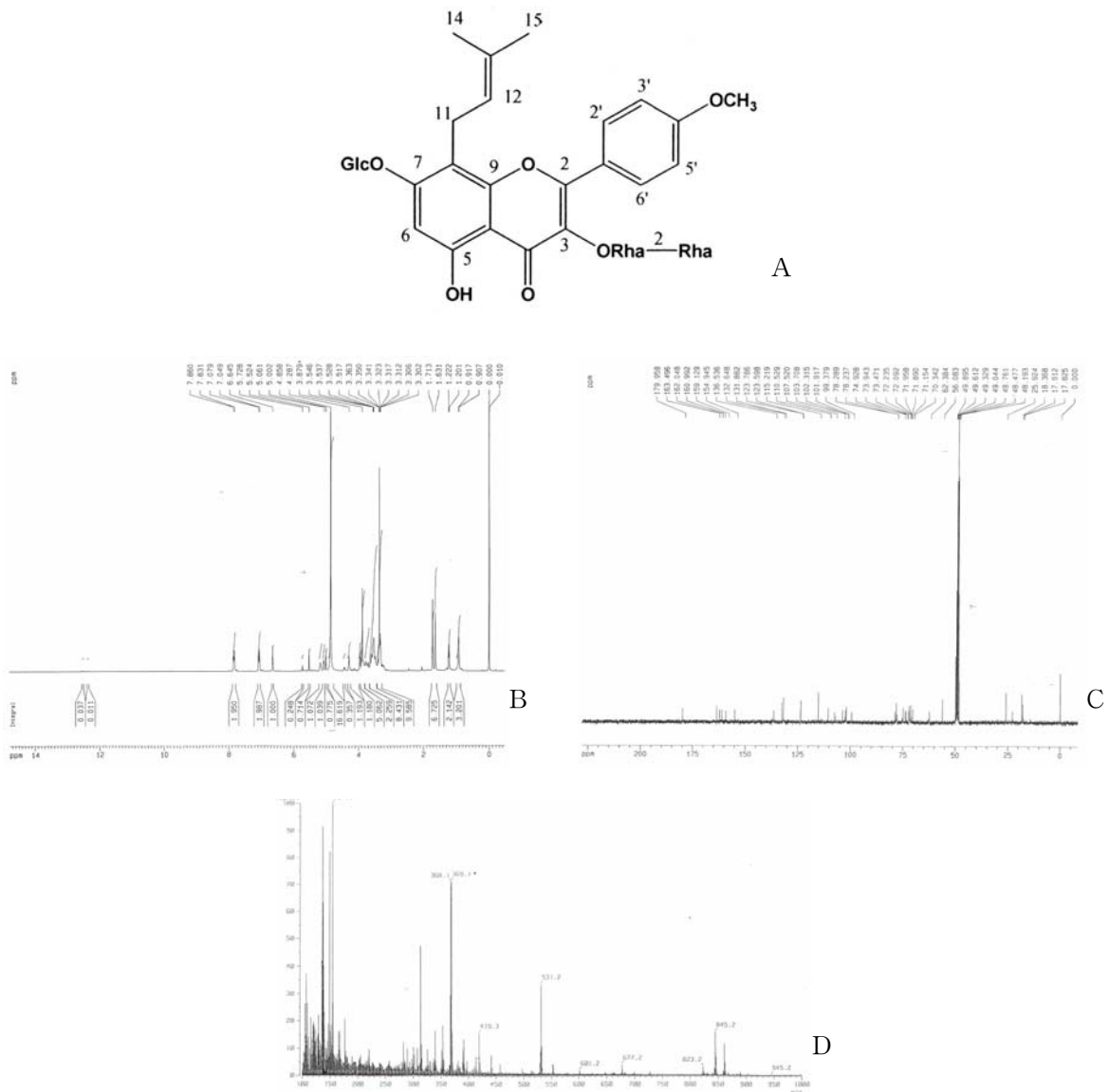


Figure 8. A. Chemical structure of Epimedin C, and B. ^1H -NMR, C. ^{13}C -NMR, and D. FABMS spectra

- Compd. 7 : 화학식은 $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$ 이며 LC/MS와 FABMS에 의해 측정된 분자량은 678이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Hexandraside E로 확인되었으며, 순도는 87.4% 이다.

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 12.60(1H, s, OH-5), 8.07(2H, *d*, $J=8.8$, H-2', 6'), 6.89(2H, *d*, $J=8.8$, H-3', 5'), 6.62(1H, s, H-6), 5.48(1H, *d*, $J=7.5$, anomeric proton), 5.01(1H, *d*, $J=7.0$, anomeric proton), 1.72(3H, s, H-14), 1.62(3H, s, H-15);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 177.8(C-4), 160.2(C-7), 160.0(C-4'), 158.9(C-5), 156.5(C-2), 152.7(C-9), 133.1(C-3), 131.0(C-13), 130.8(C-2', 6'), 122.1(C-12), 120.8(C-1'), 115.0(C-3', 5'), 108.0(C-8), 105.2(C-10), 100.7(C-1''), 100.3(C-1'''), 97.9(C-6), 77.3(C-5''), 77.0(C-5'''), 76.4(C-3''), 76.3(C-3'''), 74.1(C-2''), 73.2(C-2'''), 69.7(C-4''), 69.5(C-4'''), 60.6(C-6''), 60.5(C-6'''), 25.3(C-14), 21.3(C-11), 17.7(C-15);

FABMS m/z 703[M+H+Na] $^+$

구조식과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

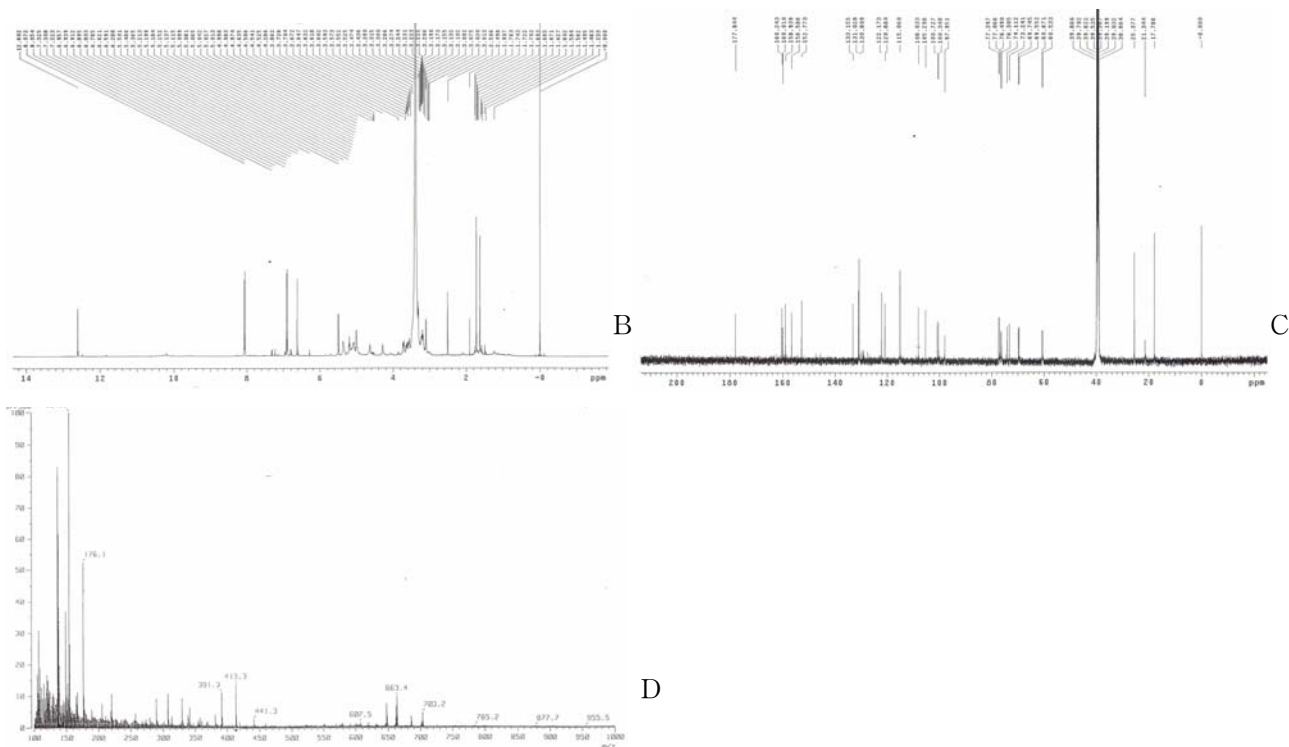
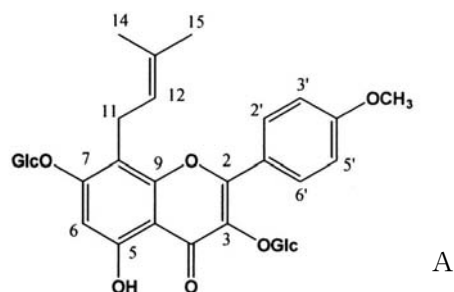


Figure 9. A. Chemical structure of Hexandraside E, and B. $^1\text{H-NMR}$ C. $^{13}\text{C-NMR}$, and D. FABMS spectra

- Compd. 8 : 화학식은 $C_{32}H_{38}O_{16}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 678이다. spectral data를 조사해본 결과 이 화합물은 아직까지 밝혀지지 않았던 새로운 화합물임을 알아내었으며 화합물명을 Epimedoside F라 명명하였으며, 순도는 82.2% 이다.

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ :12.47(1H, s, OH-5), 8.03(2H, d, $J=9.0$, H-2', 6'), 6.93(2H, d, $J=9.0$, H-3', 5'), 6.58(1H, s H-6), 5.14(1H, m, H-12), 4.56(1H, d, $J=7.5$, anomeric proton), 1.73(3H, s, H-14), 1.59(3H, s, H-15);

$^{13}\text{C-NMR}$ (125MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 176.4(C-4), 159.6(C-7), 159.4(C-4'), 158.5(C-5), 152.7(C-9), 147.5(C-2), 135.8(C-3), 130.8(C-13), 129.5(C-2', 6'), 122.9(C-12), 121.8(C-1'), 115.5(C-3', 5'), 108.1(C-8), 104.4(C-10), 104.1(C-1'''), 98.2(C-1''), 97.1(C-6), 81.2(C-2''), 77.0(C-3'', 5''), 76.3(C-3'''), 76.3(C-5'''), 74.7(C-2'''), 69.5(C-4'''), 69.3(C-4''), 60.6(C-6'''), 60.5(C-6''), 25.5(C-14), 21.4(C-11), 18.0(C-15);

FABMS m/z 677[M-H] $^+$ 515[M-H-Glc.] $^+$ 353[M-H-2Glc.] $^+$

구조식과 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

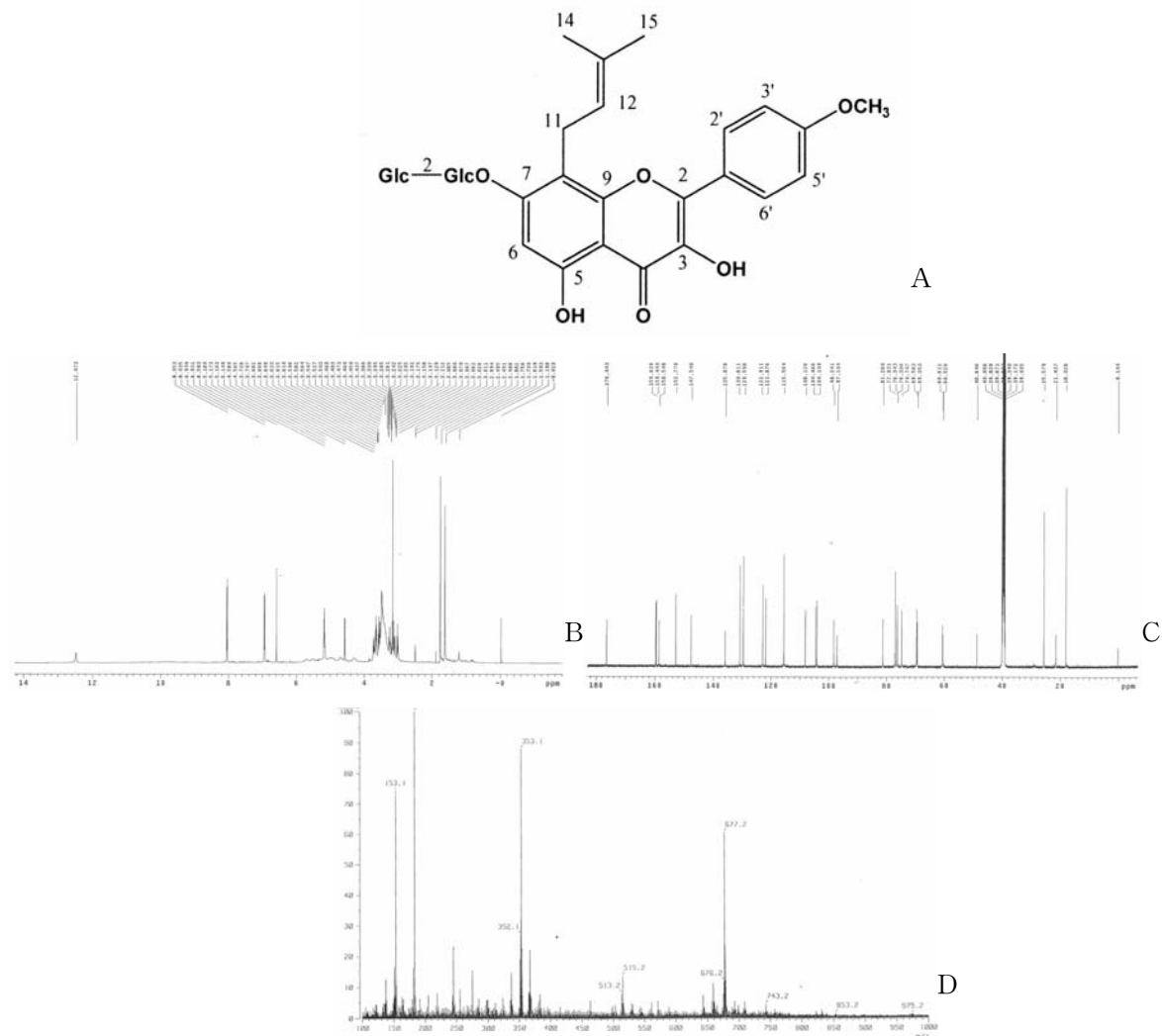


Figure 10. A. Chemical structure of Epimedoside F, and B. $^1\text{H-NMR}$ C. $^{13}\text{C-NMR}$, and D. FABMS spectra

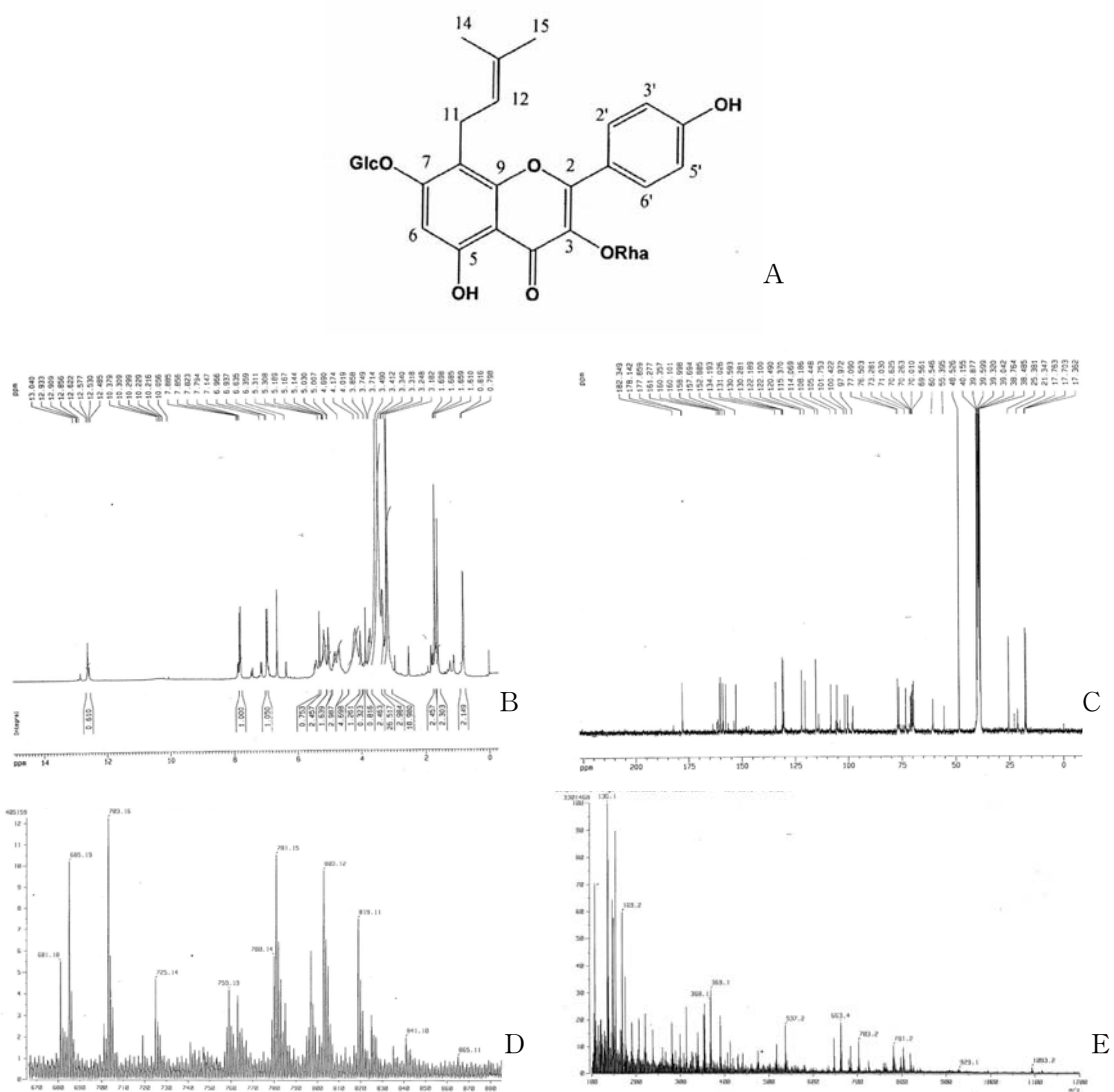
- Compd. 9 : 화학식은 $C_{32}H_{38}O_{15}$ 이며 LC/MS 및 FABMS에 의해 측정된 분자량은 662이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 Epimedoside A로 확인되었으며, 순도는 70.2% 이다.

1H -NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ : 12.85(1H, s, OH-5), 7.79(2H, *d*, $J=8.7$, H-2', 6'), 6.93(2H, *d*, $J=8.7$, H-3', 5'), 6.63(1H, s, H-6), 5.30(1H, *br s*, anomeric proton), 5.14(1H, *br t*, $J=7.0$, H-12), 5.00(1H, *br d*, $J=7.0$ anomeric proton), 1.69(3H, s, H-14), 1.61(3H, s, H-15), 0.79(3H, *d*, $J=5.4$, H-6'');

^{13}C -NMR(75MHz, DMSO- d_6) δ : 178.1(C-4), 160.3(C-7), 160.1(C-4'), 158.9(C-5), 157.6(C-2), 152.8(C-9), 134.1(C-3), 131.0(C-13), 130.5(C-2', 6'), 122.1(C-12), 120.4(C-1'), 115.3(C-3', 5'), 108.1(C-8), 105.4(C-10), 101.7(C-1'''), 100.4(C-1''), 97.9(C-6), 77.0(C-5'''), 76.5(C-3'''), 73.9(C-2'''), 71.0(C-5''), 70.6(C-4''), 70.2(C-2''), 70.0(C-4'''), 69.5(C-3''), 60.5(C-6'''), 25.3(C-15), 21.3(C-11), 17.7(C-14), 17.3(C-6'');

FABMS m/z 663[M+H] $^+$, 685[M+Na] $^+$

구조식과 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.



◦ Compd. 10 : 화학식은 C₃₃H₄₀O₁₄이고 LC/MS에 의해 측정된 분자량은 660이다. spectral data를 문헌과 비교해본 결과 이 화합물은 2"-O-Rhamnosylcariside II로 확인되었고, 순도는 96.3% 이다.

¹H-NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ:12.60(1H, s, OH-5), 7.88(2H, d, J=9.0, H-2', 6'), 7.06(2H, d, J=9.0, H-3', 5'), 6.62(1H, br t, J=6.5, H-12), 4.99(1H, br s, anomeric proton), 4.84(1H, br, s, anomeric proton), 3.84(3H, s, OCH₃), 1.68(3H, s, H-14), 1.59(3H, s, H-15), 1.08(3H, d, J=6.0, H-6''), 0.79(3H, d, J=5.5, H-6'');

¹³C-NMR(125MHz, DMSO-d₆) δ : 178.2(C-4), 161.4(C-5), 160.4(C-7), 159.0(C-4'), 157.1(C-2), 152.9(C-9), 131.0(C-13), 130.4(C-2', 6'), 122.1(C-12, 1'), 114.1(C-3', 5'), 108.2(C-10), 105.4(C-8), 100.4(C-1''), 100.0(C-1''), 98.0(C-6), 77.2(C-2''), 76.5(C-5''), 73.3(C-2''',4'''), 70.3(C-5'''), 69.6(C-4'', 3'''), 60.5(C-3'''), 55.4(OCH₃), 25.5(C-14), 22.9(C-6''), 21.4(C-11), 17.8(C-15), 17.4(C-6''');

FABMS m/z 661[M+H]⁺

구조식과 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FABMS의 data는 아래 그림과 같다.

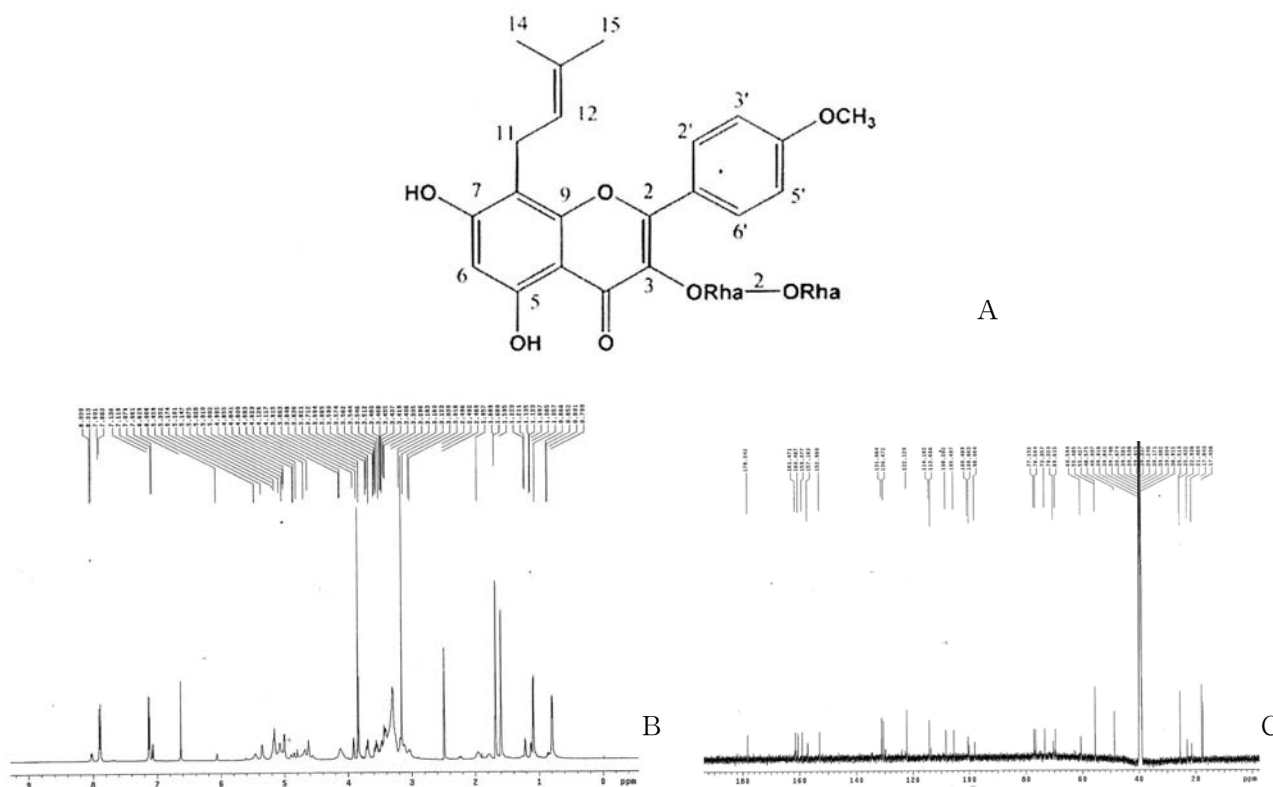


Figure 12. A. Chemical structure of 2''-O-Rhamnosylcariside II and, B. ¹H-NMR and C. ¹³C-NMR spectra

◦ Compd. 11 : 백색의 powder이며, UV 254nm, 365nm에서는 발색이 되지 않음. 10% 황산발색에서 보라색으로 발색되는 것으로 미루어 terpenoid 계열일 것으로 추정되며 현재 구조분석을 진행 중임.

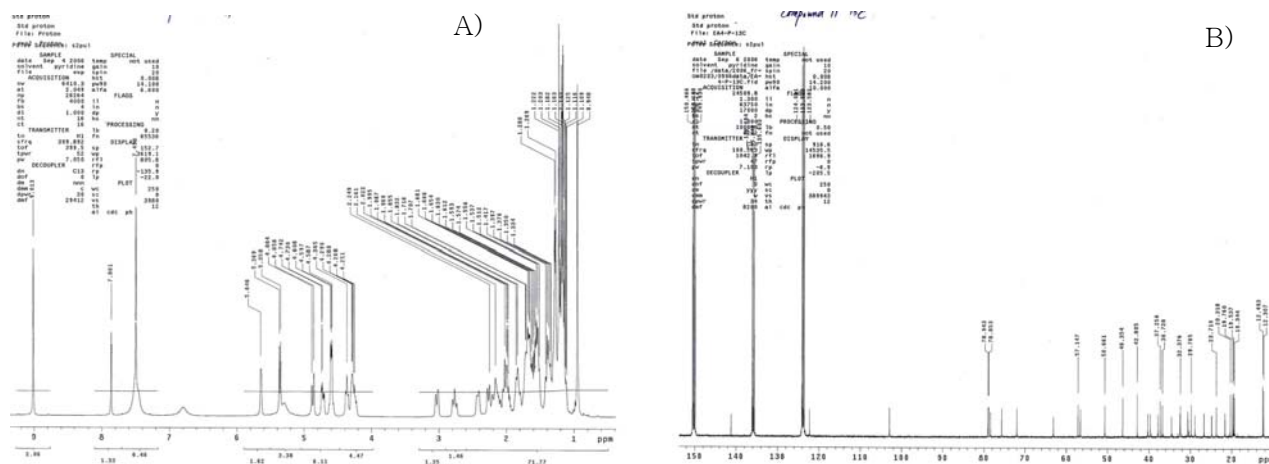


Figure 13. A) ^1H -NMR and B) ^{13}C -NMR spectra of Compd. 11.

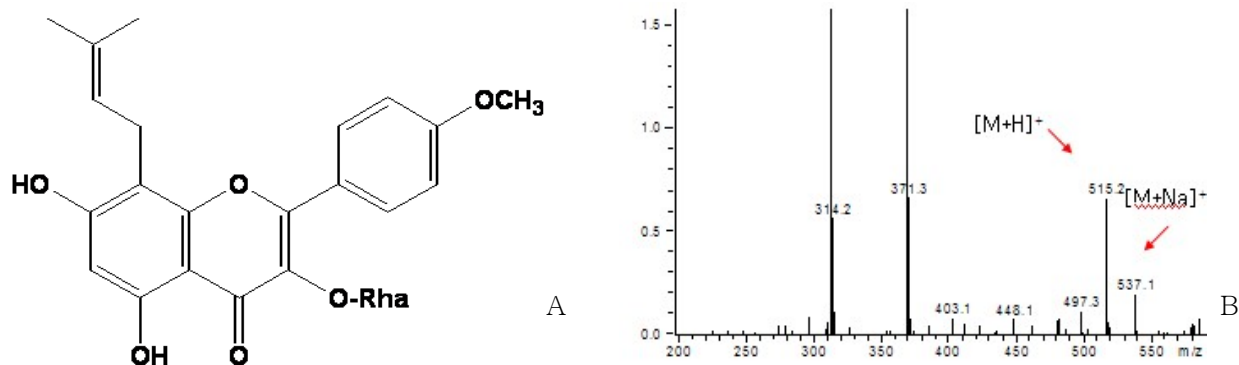
- Compd. 12 : Yellow powder이며, 10% 황산발색에서 노란색으로 발색됨. LC/MS에 의해 측정된 분자량은 514.2 이며, spectral data를 문헌과 비교해본 결과 icaricide II 임을 확인하였으며 화학식은 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{10}$ 이다. HPLC로 확인해 본 결과 95.6%의 순도를 나타내었다.

^1H -NMR (Methanol- d_4 , 500 MHz): δ 6.29 (1H, s, H-6), 3.45 (2H, m, H-11, overlapped), 5.20 (1H, t, $J = 6.0$ Hz, H-12), 1.66 (3H, s, H-14), 1.71 (3H, s, H-15), 7.87 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', 6'), 7.10 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3', 5'), 3.90 (3H, s, 4'-OCH₃), 5.40 (1H, br s, H-1₃-O-Rha), 0.90 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6_{Rha}), 3.00-5.40 (sugar protons);

^{13}C -NMR (Methanol- d_4 , 125 MHz): δ 158.9(C-2), 136.3(C-3), 180(C-4), 163.5(C-5), 99.5(C-6), 163.6(C-7), 108.1(C-8), 156(C-9), 106.1(C-10), 124.3(C-1'), 132(C-2'), 115.3(C-3'), 161(C-4'), 115.3(C-5'), 132(C-6'), 22.6(C-11), 123.8(C-12), 132.6(C-13), 26.0(C-14), 18.3(C-15), 56.2(4'-OMe), 103.6(C-1₃-O-Rha), 72.1(C-2''), 72.2(C-3''), 73.3(C-4''), 72.3(C-5''), 17.8(C-6'');

LC/MS m/z 515.2[M+H]⁺, 537.1[M+Na]⁺

구조식과 LC/MS 및 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spectra는 Figure 14와 같다.



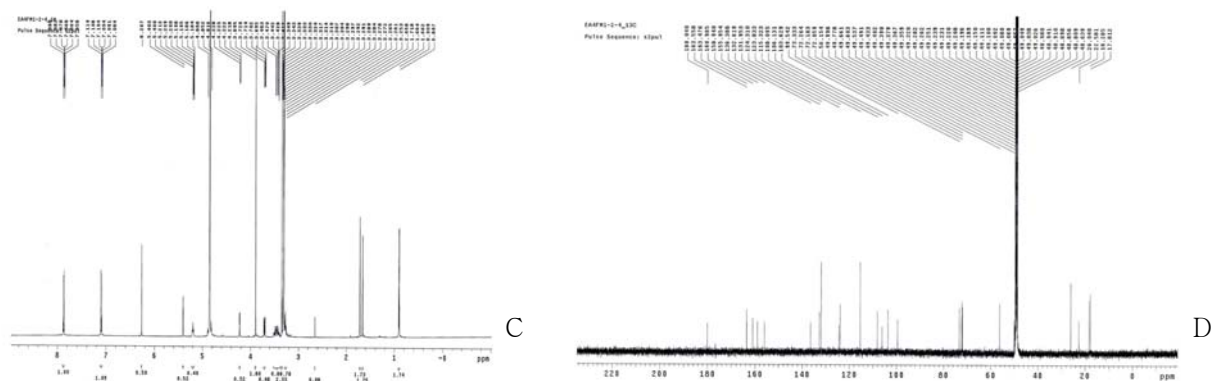


Figure 14. A) Icariside II chemical structure and B) mass , C) ^1H -NMR and D) ^{13}C -NMR spectra

- Compd. 13 : 약간의 녹색빛을 띠는 yellow powder이며, 황산발색시 노란색으로 발색됨. LC/MS에 의해 측정된 분자량은 302이며 spectral data를 문헌과 비교해본 결과 Flavonol 계열의 Quercetin임을 확인하였다. 화학식은 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ 이며 HPLC 분석결과 98%의 순도를 나타내었다.

^1H -NMR(500MHz, Methanol- d_4) δ : 7.73(1H, s, H-2'), 7.63(1H, d, $J=8.5$, H-6'), 6.88(1H, d, $J=8.0$, H-5'), 6.39(1H, s, H-8), 6.18(1H, s, H-6);

^{13}C -NMR(125MHz, Methanol- d_4) δ : 177.5(C-4), 165.8(C-7), 162.7(C-5), 158.4(C-9), 148.9(C-3'), 148.1(C-2), 146.4(C-4'), 137.4(C-3), 124.3(C-1'), 121.8(C-6'), 116.4(C-5'), 116.1(C-2'), 104.7(C-10), 99.4(C-6), 94.6(C-8);

LC/MS m/z 303[M+H] $^+$

구조식과 LC/MS, ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR,의 data는 아래 그림과 같다.

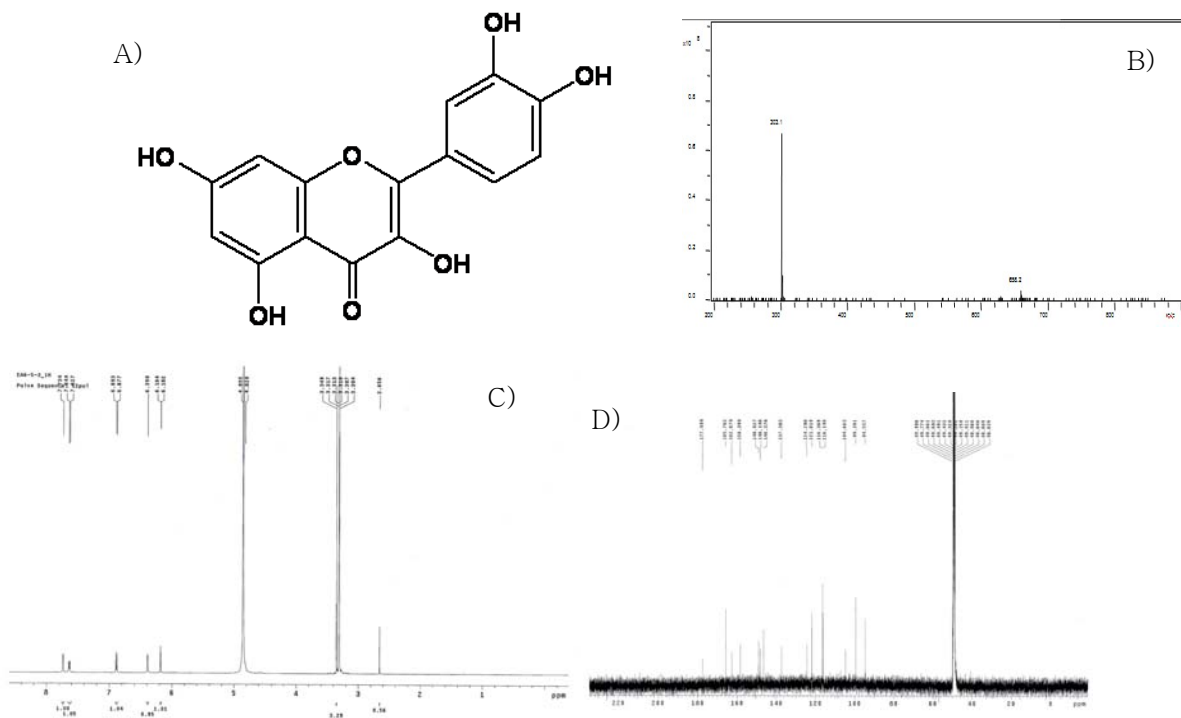


Figure 15. A) Quercetin chemical structure and B) mass, C) ^1H -NMR and D) ^{13}C -NMR spectra

음양곽에서 분리한 compound에 대한 정보를 아래의 table 2와 3에 정리하였다.

Table 2. Name of purified compounds from *E.koreanum* Nakai

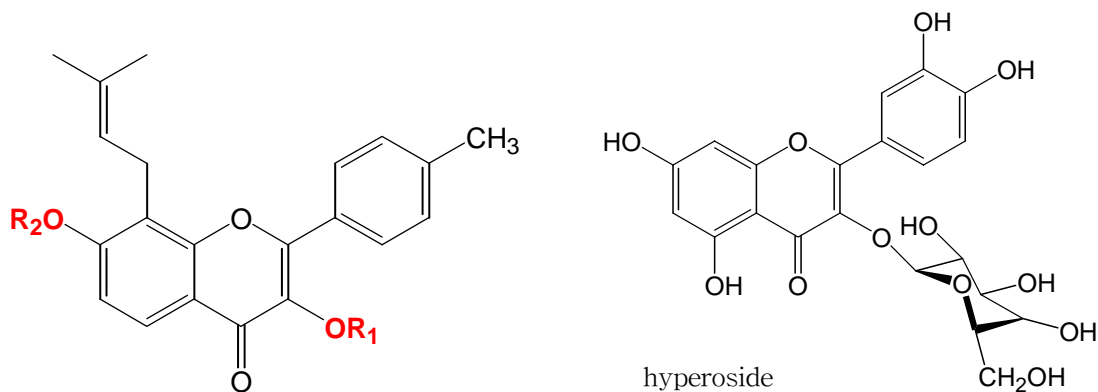
Comp No.	Name	Synonym	IUPAC name
1	Icariin	Ieariline	4H-1-Benzopyran-4-one,3-[(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
2	Hyperoside	Hyperin, Quercetin-3- β -D-galactoside	4H-1-Benzopyran-4-one,2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-(β -D-galactopyranosyloxy)-5,7-dihydroxy-(9CI)
3	Chlorogenic acid	3-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)quinic acid, 3-Caffeoylquinic acid	Cyclohexanecarboxylic acid,3-[[3-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxy-, (1S,3R,4R,5R)- (9CI)
4	Epimedin A		4H-1-Benzopyran-4-one,3-[6-deoxy-2-O- β -D-glucopyranosyl- α -L-mannopyranosyl]oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
5	Epimedin B		4H-1-Benzopyran-4-one,3-[6-deoxy-2-O- β -D-xylopyranosyl- α -L-mannopyranosyl]oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
6	Epimedin C	Baohuoside VI	4H-1-Benzopyran-4-one,3-[[6-deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
7	Hexandraside E		4H-1-Benzopyran-4-one,3,7-bis(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
8	Epimedeside F		3,4',5-Trihydroxy-8-prenylflavone 7-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside]
9	Epimedeside A	Epimedeside A	4H-1-Benzopyran-4-one,3-[6-deoxy- α -L-mannopyranosyl]oxy]-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
10	2''-O-Rhamnosylcariside II		4H-1-Benzopyran-4-one,3-[[6-deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
12	Icariside II	Baohuoside 1 Baohuoside I Baohuside I Icariin II, Icariside II	4H-1-Benzopyran-4-one,3-[6-deoxy- α -L-mannopyranosyl]oxy]-5,7-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methyl-2-butenyl)-(9CI)
13	Quercetin	3',4',5,7-Tetrahydroxyflavonol, Sophoretin, Meletin, Quercetol, Quertin, Ericin	4H-1-Benzopyran-4-one,2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-(9CI)

Table 3. Purified compounds from *E.koreanum* Nakai

Comp No.	Name	M.W.	amount (mg)	Purity(%)	제출량 (mg)
1	Icariin	676.2	12500	92.7	3,000
2	Hyperoside	464.3	1670	98.6	1,000
3	Chlorogenic acid	354.3	67	100	50
4	Epimedin A	838.7	15	94.1	3
5	Epimedin B	808.7	175	85.0	10
6	Epimedin C	822.8	64	69.6	10
7	Hexandraside E	678	38	87.4	2
8	Epimedoside F	678	34	70.2	5
9	Epimedoside A	662	20	70.2	3
10	2''-O-Rhamnosylcariside II	660	57	96.3	
11	compound 11 (구조분석중)		49		
12	icariside II	514.2	1080	95.6	500
13	Quercetin	302	17	98.7	5
14	compound 14 (구조분석중)		29	94.5	
15	compound 15 (구조분석중)		30	93.1	

다. LC/MS/MS를 이용한 음양곽 유효성분의 분석법 개발 및 validation

- 음양곽 추출물 시료에서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside (Figure 18)의 5개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하기 위하여 LC/MS/MS의 multi reaction monitoring (MRM) mode를 이용한 분석법을 연구하였다.
- Positive ion mode에서 분석하였을 때 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, digoxin(I.S.)은 m/z 465, 839, 809, 823, 677, 781에서 각각 protonated된 molecular ion peak를 나타내었으며 각 화합물의 molecular ion peak를 precursor로 하여 MS/MS 분석을 수행한 결과 flavonoid glycoside의 구조로부터 당이 순차적으로 탈락된 fragment peak를 확인할 수 있었다 (Figure 19).
- 각 화합물에 대하여 MS/MS spectrum 상에서 가장 큰 강도를 나타내는 fragment peak를 선택하여 parent peak와 함께 MRM을 위한 precursor, product ion pair로 사용하였다. 이와 같이 설정된 MRM 조건을 바탕으로 LC/MS/MS 분석을 수행한 결과 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, digoxin(I.S.)는 각각 2.6, 3.6, 3.8, 3.9, 4.2, 4.7 분경에 검출되었으며 모든 분석물질에 대해 양호한 peak shape와 intensity를 보였다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다(Figure 20).



Compound	R1	R2	MW
Icariin	Rhamnose	Glucose	676.67
Epimedin A	Rhamnose-Glucose	Glucose	838.81
Epimedin B	Rhamnose-Xylose	Glucose	808.79
Epimedin C	Rhamnose-Rhamnose	Glucose	822.81
Hyperoside			464.38

Figure 18. Chemical structures of five flavonoid glycosides from *Epimedium koreanum*

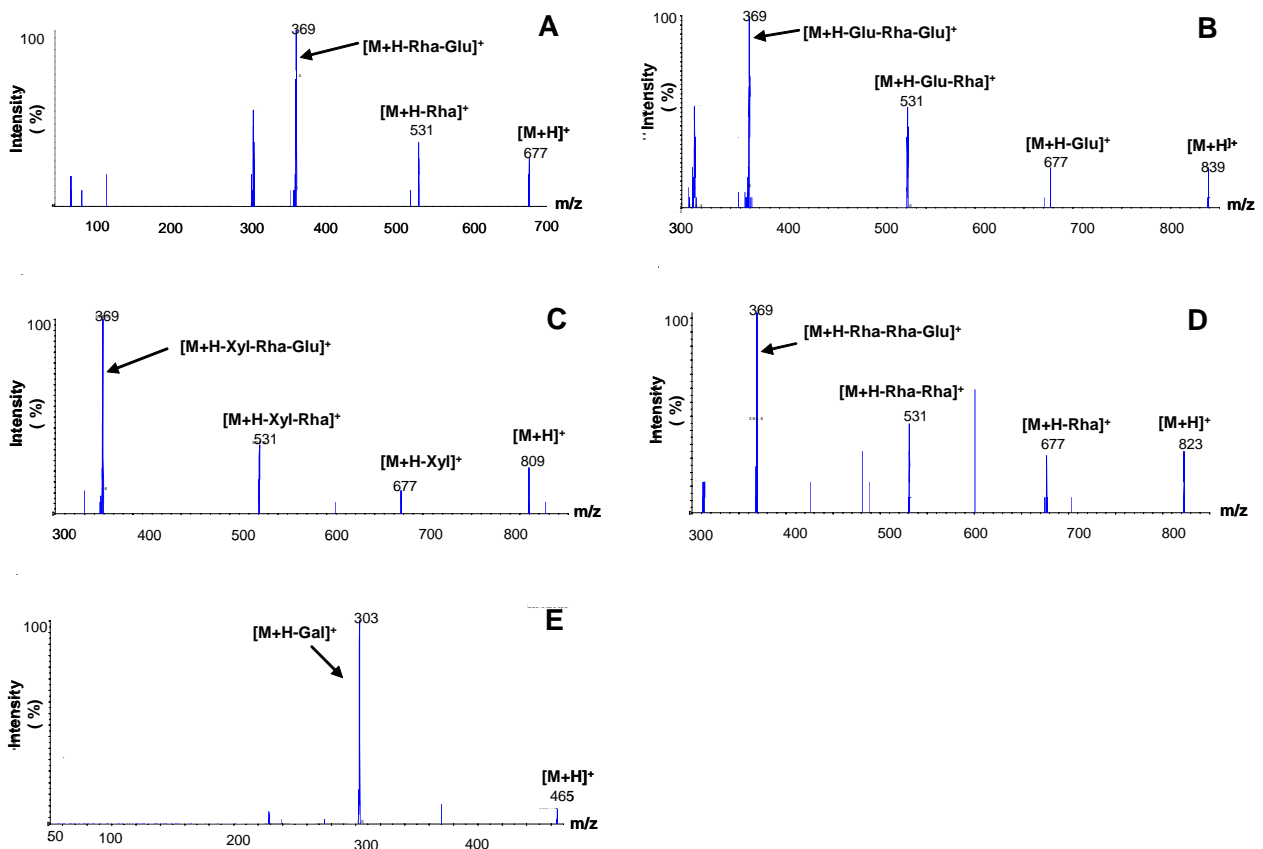


Figure 19. Icariin(A), epimedin A(B), epimedin B(C), epimedin C(D), hyperoside(E)의 MS/MS spectrum (MS/MS spectrum of icariin(A), epimedin A(B), epimedin B(C), epimedin C(D), hyperoside(E))

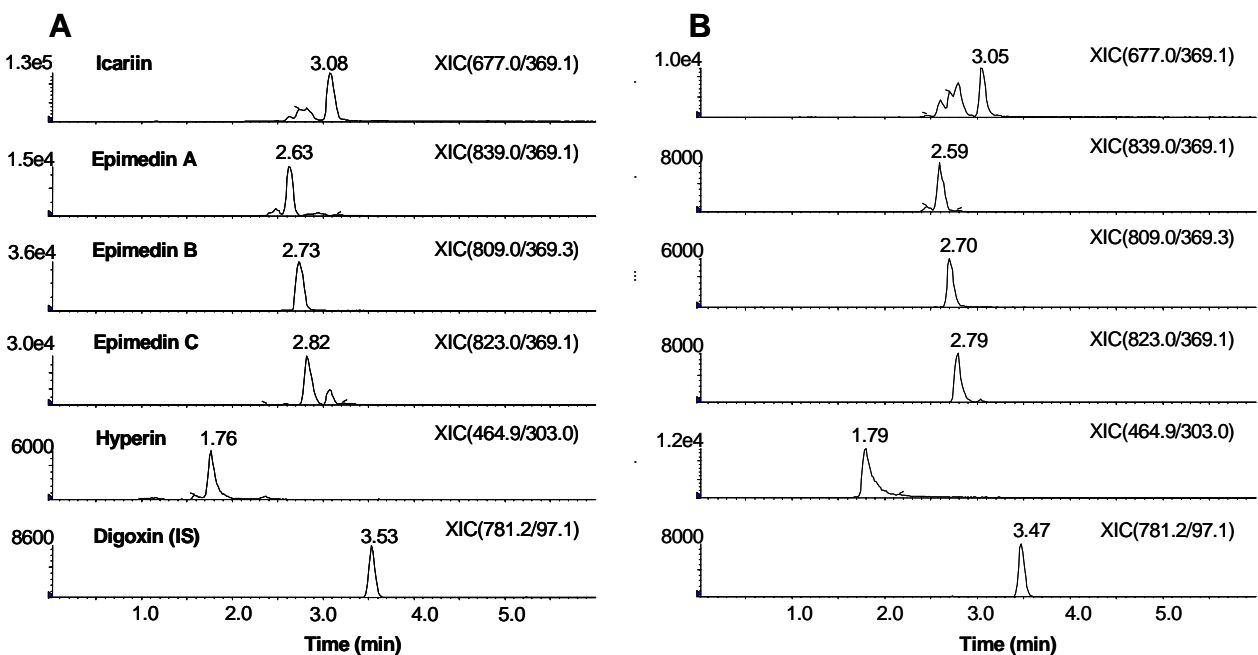


Figure 20. Extraction ion chromatograms of icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside, and digoxin(IS) in MRM mode: (A) Standard mixture, (B) *E. koreanum* extract.

- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 표준액의 농도 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 상관계수 (r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었으며, 따라서 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 을 최저정량한계로 설정하였다 (Figure 20). 네 농도(0.5, 1, 2, 10 $\mu\text{g/mL}$)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였으며 그 결과는 Table 4, 5에 나타내었다. 일내 정확성은 이론치 대비 90.08-110.6%, %RSD는 0.39-6.51%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 92.28-111.0%, %RSD는 1.07-7.78%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.
- 본 분석법의 완전성(Robustness)를 검토하고자 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 QC시료에 대하여 용매의 pH(3, 4, 5), 컬럼 종류(Capcellpak C₁₈, YMC C₁₈), 컬럼 오븐 온도(30, 40, 50°C), gradient 조건을 변화시켜서 분석하였다. 각 조건의 변화에 따라 피크너비 또는 이론단수의 변화가 나타났다. 그러나 피크 면적을 가지고 각 성분을 정량 분석했을 때는 column의 종류나 column oven 온도에 따른 큰 차이는 보이지 않았으며 (Table 6, 7), gradient elution 조건의 기울기를 변화하였을 때도 분석 결과의 큰 차이는 나타나지 않았다 (Table 8). 그러나 용매의 pH를 4에서 3 또는 5로 변화시켰을 때 정확도에 있어 70% 이상의 큰 변화를 보여 (Table 9) LC/MS/MS를 이용한 음양곽의 유효 성분 분석 시 pH 조건이 매우 중요함을 시사하였다.

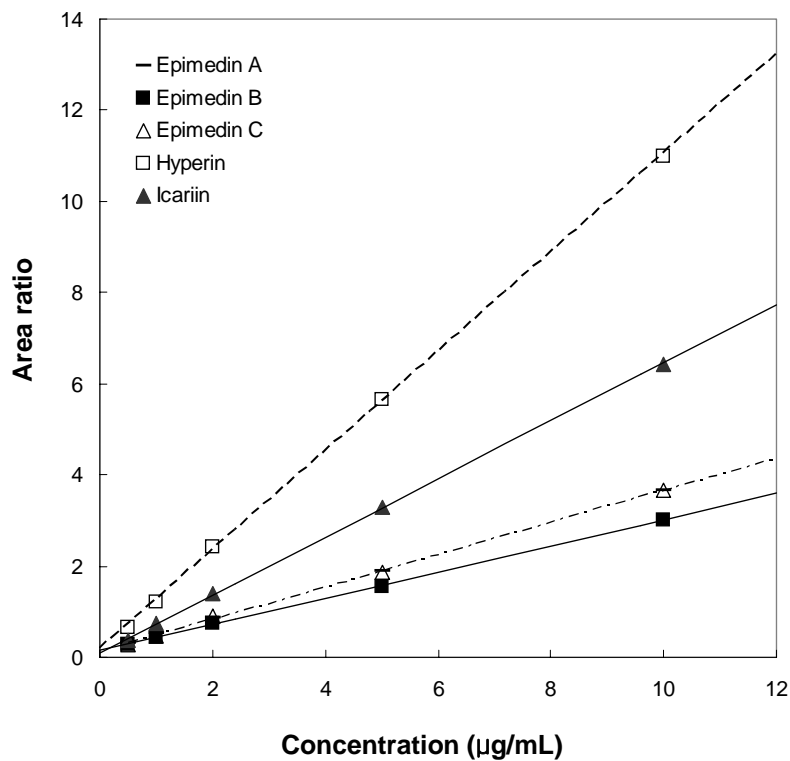


Figure 16. Calibration curves for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside

Table 4. Intra-day accuracy and precision for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside

Compound	Nominal conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. found ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
Icariin	0.5	0.500 \pm 0.019	100.02	3.88
	1	0.983 \pm 0.036	98.32	3.70
	2	2.056 \pm 0.061	102.74	2.97
	10	10.052 \pm 0.217	100.52	2.16
Epimedin A	0.5	0.479 \pm 0.027	95.80	5.57
	1	1.090 \pm 0.041	107.60	1.06
	2	2.126 \pm 0.058	106.20	2.71
	10	9.662 \pm 0.260	96.62	2.69
Epimedin B	0.5	0.520 \pm 0.034	104.14	6.51
	1	1.090 \pm 0.041	109.00	3.73
	2	2.212 \pm 0.038	110.60	1.73
	10	9.496 \pm 0.380	94.96	0.39
Epimedin C	0.5	0.450 \pm 0.014	90.08	3.13
	1	1.005 \pm 0.055	100.52	5.46
	2	2.080 \pm 0.060	103.80	2.90
	10	9.778 \pm 0.248	97.78	2.53
Hyperoside	0.5	0.452 \pm 0.011	90.46	2.48
	1	0.969 \pm 0.010	96.86	1.11
	2	1.912 \pm 0.032	95.62	1.67
	10	9.818 \pm 0.136	98.18	1.38

Data were represented as mean \pm S.D. (n=5).

Table 5. Inter-day accuracy and precision for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside

Compound	Nominal conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. found ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
Icariin	0.5	0.496 \pm 0.017	98.16	3.48
	1	0.995 \pm 0.037	99.45	3.68
	2	2.080 \pm 0.036	103.80	1.77
	10	10.208 \pm 0.328	102.08	3.21
Epimedin A	0.5	0.468 \pm 0.017	93.54	1.93
	1	1.008 \pm 0.057	100.80	5.70
	2	2.122 \pm 0.022	106.20	1.07
	10	9.664 \pm 0.364	96.64	2.73
Epimedin B	0.5	0.519 \pm 0.028	103.78	5.34
	1	1.110 \pm 0.034	111.00	3.06
	2	2.196 \pm 0.043	110.00	1.95
	10	9.824 \pm 0.180	98.24	1.84
Epimedin C	0.5	0.461 \pm 0.012	92.28	2.54
	1	1.019 \pm 0.079	101.90	7.78
	2	2.160 \pm 0.035	108.00	1.60
	10	9.686 \pm 0.250	96.86	2.58
Hyperoside	0.5	0.481 \pm 0.033	96.30	6.86
	1	0.963 \pm 0.057	96.26	5.93
	2	2.006 \pm 0.039	100.16	1.95
	10	9.782 \pm 0.118	97.82	1.21

Data were represented as mean \pm S.D. (n=5).

Table 6. Robustness test: effect of column oven temperature (n=3)

Compound (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Condition	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	RRT	W	NTP
Icariin	30 $^{\circ}\text{C}$	2.043 \pm 0.096	0.90	0.49	651.6
	40 $^{\circ}\text{C}$	2.003 \pm 0.006	0.88	0.64	358.4
	50 $^{\circ}\text{C}$	1.987 \pm 0.015	0.86	0.68	338.4
Epimedin A	30 $^{\circ}\text{C}$	1.993 \pm 0.046	0.76	0.65	270.4
	40 $^{\circ}\text{C}$	1.857 \pm 0.021	0.75	0.51	418.7
	50 $^{\circ}\text{C}$	1.957 \pm 0.071	0.73	0.69	236.9
Epimedin B	30 $^{\circ}\text{C}$	2.113 \pm 0.085	0.79	0.51	448.7
	40 $^{\circ}\text{C}$	2.033 \pm 0.023	0.78	0.57	356.6
	50 $^{\circ}\text{C}$	2.100 \pm 0.017	0.76	0.80	192.5
Epimedin C	30 $^{\circ}\text{C}$	1.980 \pm 0.085	0.82	0.33	1132.9
	40 $^{\circ}\text{C}$	1.777 \pm 0.023	0.81	0.29	1440.9
	50 $^{\circ}\text{C}$	1.997 \pm 0.017	0.79	0.36	983.5
Hyperoside	30 $^{\circ}\text{C}$	1.867 \pm 0.021	0.54	0.89	68.68
	40 $^{\circ}\text{C}$	1.903 \pm 0.012	0.51	1.08	44.05
	50 $^{\circ}\text{C}$	1.780 \pm 0.020	0.49	1.09	41.67

RRT: relative retention time to IS peak. W: 피크너비, NTP: 이론단수

Table 7. Robustness test: effect of column (n=3)

Compound (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Condition	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	RRT	W	NTP
Icariin	YMC	1.867 \pm 0.047	0.86	0.49	705.8
	Capcell	2.003 \pm 0.006	0.88	0.64	358.4
Epimedin A	YMC	1.993 \pm 0.046	0.75	0.80	203.7
	Capcell	1.857 \pm 0.021	0.75	0.51	418.7
Epimedin B	YMC	2.023 \pm 0.085	0.78	0.87	180.3
	Capcell	2.033 \pm 0.023	0.78	0.57	356.6
Epimedin C	YMC	1.843 \pm 0.138	0.80	0.38	980.1
	Capcell	1.777 \pm 0.023	0.81	0.29	1440.9
Hyperoside	YMC	1.867 \pm 0.047	0.51	0.98	60.27
	Capcell	1.903 \pm 0.012	0.51	1.08	44.05

RRT: relative retention time to IS peak. W: 피크너비, NTP: 이론단수

Table 8. Robustness test: effect of gradient condition (n=3)

Compound (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Condition	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	RRT	W	NTP
Icariin	gradient-1	2.003 \pm 0.006	0.88	0.64	358.4
	gradient-2	1.990 \pm 0.020	0.90	0.68	421.5
Epimedin A	gradient-1	1.857 \pm 0.021	0.75	0.51	418.7
	gradient-2	1.803 \pm 0.083	0.82	0.70	322.5
Epimedin B	gradient-1	2.033 \pm 0.023	0.78	0.57	356.6
	gradient-2	1.947 \pm 0.097	0.83	0.69	356.3
Epimedin C	gradient-1	1.777 \pm 0.023	0.81	0.29	1440.9
	gradient-2	1.770 \pm 0.044	0.85	0.36	1371.2
Hyperoside	gradient-1	1.903 \pm 0.012	0.51	1.08	44.05
	gradient-2	1.833 \pm 0.015	0.57	1.01	75.3

Table 9. Robustness test: effect of pH of mobile phase (n=3)

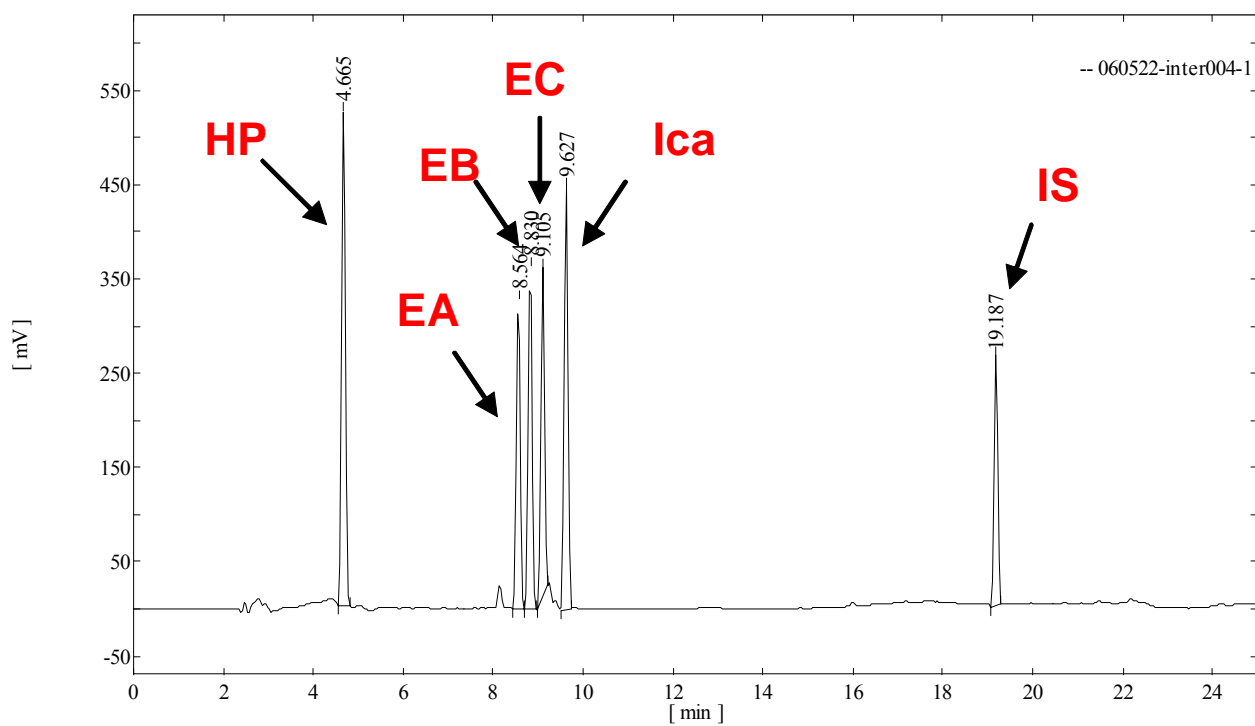
Compound (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Condition	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	RRT	W	NTP
Icariin	pH 3	2.043 \pm 0.096	0.90	0.49	651.6
	pH 4	2.003 \pm 0.006	0.88	0.64	358.4
	pH 5	1.987 \pm 0.015	0.86	0.68	338.4
Epimedin A	pH 3	1.993 \pm 0.046	0.76	0.65	270.4
	pH 4	1.857 \pm 0.021	0.75	0.51	418.7
	pH 5	1.957 \pm 0.071	0.73	0.69	236.9
Epimedin B	pH 3	2.113 \pm 0.085	0.79	0.51	448.7
	pH 4	2.033 \pm 0.023	0.78	0.57	356.6
	pH 5	2.100 \pm 0.017	0.76	0.80	192.5
Epimedin C	pH 3	1.980 \pm 0.085	0.82	0.33	1132.9
	pH 4	1.777 \pm 0.023	0.81	0.29	1440.9
	pH 5	1.997 \pm 0.017	0.79	0.36	983.5
Hyperoside	pH 3	1.867 \pm 0.021	0.54	0.89	68.68
	pH 4	1.903 \pm 0.012	0.51	1.08	44.05
	pH 5	1.780 \pm 0.020	0.49	1.09	41.67

RRT: relative retention time to IS peak. W: 피크너비, NTP: 이론단수

라. HPLC/UV를 이용한 음양곽 유효성분의 분석법 개발 및 validation

- 의약품 또는 천연물 분석시 보편적으로 사용되고 있는 HPLC/UV를 이용하여 음양곽 추출물 시료에서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside의 5개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하였다. 5개의 flavonoid glycoside에 대하여 대체적으로 UV 흡수가 크게 나타나는 파장인 260 nm을 검출 파장으로 설정하여 분석한 결과, hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, α -naphthoflavone(I.S.)은 각각 약 4.7, 8.7, 8.9, 9.2, 9.8, 19.0 분에서 검출되었으며, 양호한 peak shape를 나타내었다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다 (Figure 22).
- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 표준액의 농도 2-50 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 상관계수(r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었으며, 따라서 2 $\mu\text{g/mL}$ 을 최저정량한계로 설정하였다 (Figure 18). 세 농도(2, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였으며 그 결과는 Table 10과 11에 나타내었다. 일내 정확성은 이론치 대비 95.88-103.5%, %RSD는 0.19-3.33%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 95.12-104.9%, %RSD는 0.46-4.38%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.
- 본 분석법의 완건성(Robustness)를 검토하고자 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 QC시료에 대하여 컬럼의 종류 (Capcellpak C₁₈, Beckmann C₁₈)를 변화시켜 분석하였다. Capcellpak C₁₈, Beckmann C₁₈의 두가지 컬럼을 가지고 분석을 수행한 결과 대체적으로 Beckmann C₁₈을 이용하여 분석시, retention time이 짧아지고 이론단수가 감소하였다. Epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 경우는 측정치에는 큰 차이를 보이지 않았으나, hyperoside의 경우 Beckmann 컬럼으로 분석시 측정치가 이론치의 약 77%로 나타나 매우 큰 차이를 나타내었다 (Table 12). 이는 컬럼의 종류에 따라 물질이 검출되는 정도가 크게 달라질 수 있음을 나타낸다. 따라서 한약재의 품질 관리에 있어 일정하고 정확한 유효 성분 분석이 이루어지기 위해서는 동일한 컬럼을 사용한 분석이 이루어져야 할 것이다.

Standard mixture



Sample

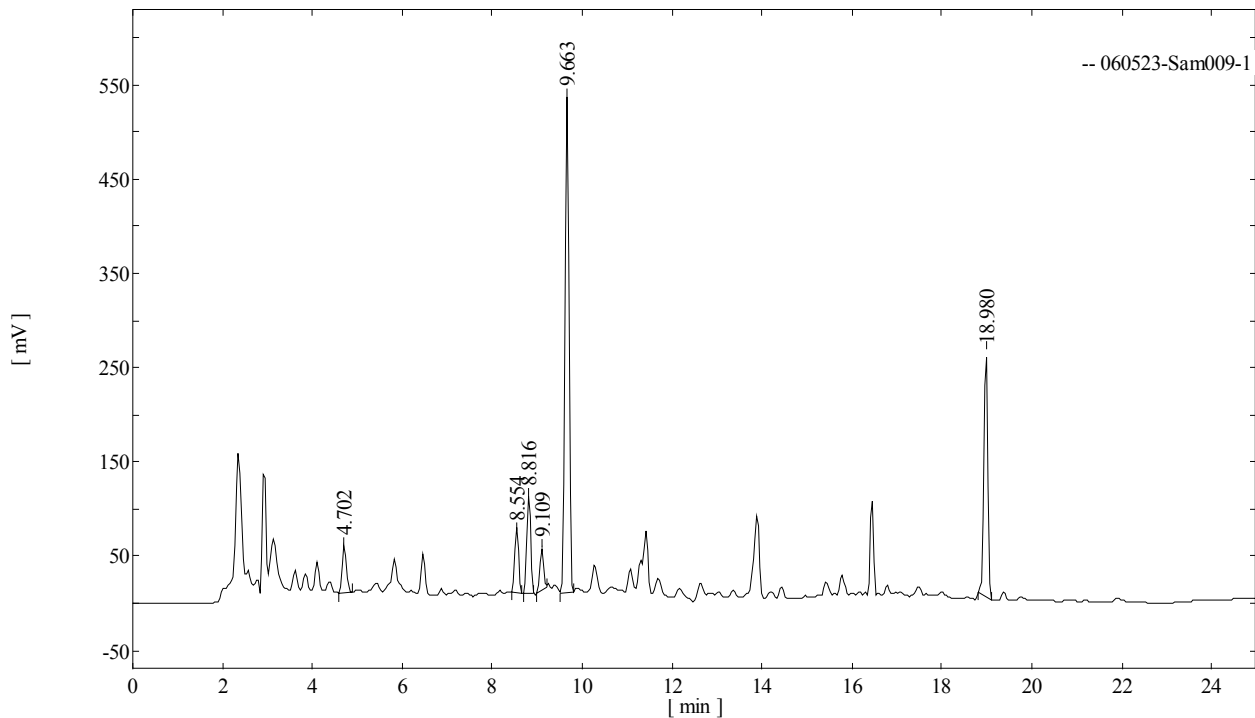


Figure 22. UV chromatograms for standard mixture and extract sample of *Epimedium koreanum*. HP: hyperoside, EA: epimedin A, EB: epimedin B, EC: epimedin C, Ica: icariin.

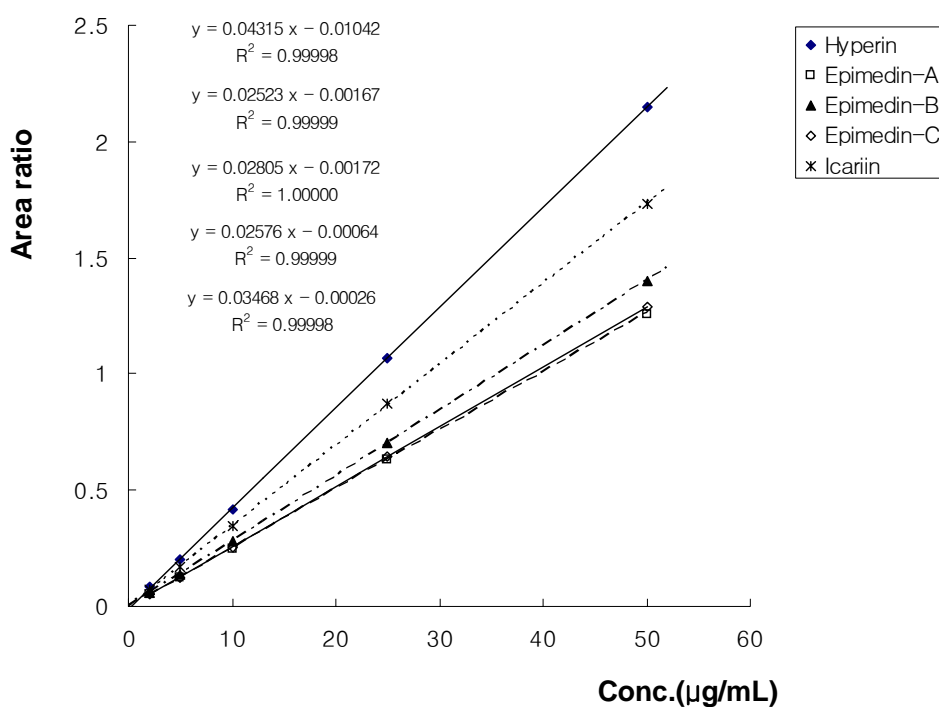


Figure 23. Calibration curves for icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, and hyperoside based on HPLC/UV method

Table 10. Intra-day accuracy and precision for flavonoids from *E. koeanum* extract

Compound	Nominal conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. found ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
Icariin	2	2.03 \pm 0.04	103.00	2.12
	10	10.12 \pm 0.04	101.20	0.38
	50	51.06 \pm 0.35	102.12	0.69
Epimedin A	2	2.07 \pm 0.07	103.50	3.33
	10	10.08 \pm 0.12	100.80	1.17
	50	50.86 \pm 0.37	101.71	0.73
Epimedin B	2	2.07 \pm 0.03	103.50	1.39
	10	10.06 \pm 0.09	100.58	0.93
	50	50.91 \pm 0.02	101.82	0.40
Epimedin C	2	2.06 \pm 0.01	102.80	0.27
	10	10.01 \pm 0.08	100.10	0.77
	50	50.91 \pm 0.20	101.81	0.39
Hyperoside	2	2.07 \pm 0.01	103.50	0.34
	10	9.59 \pm 0.07	95.88	0.69
	50	48.82 \pm 0.09	97.65	0.19

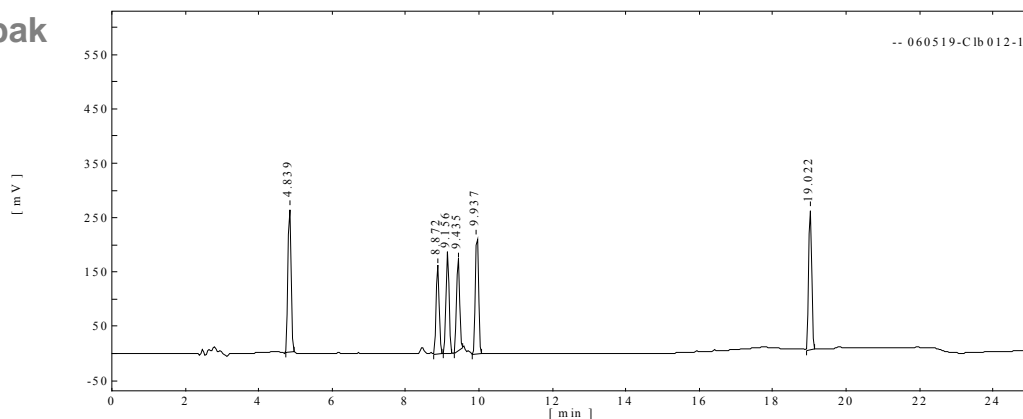
Data were represented as mean \pm S.D. (n=5).

Table 11. Intra-day accuracy and precision for flavonoids from *E. koeanum* extract

Compound	Nominal conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. found ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
Icariin	2	2.04 \pm 0.02	102.50	0.89
	10	10.00 \pm 0.28	98.60	2.78
	50	51.19 \pm 1.19	102.38	3.71
Epimedin A	2	2.09 \pm 0.05	104.40	2.43
	10	9.97 \pm 0.24	99.74	2.36
	50	50.49 \pm 0.23	100.98	0.46
Epimedin B	2	2.07 \pm 0.06	103.50	2.86
	10	9.99 \pm 0.29	99.94	2.94
	50	52.45 \pm 2.30	104.90	4.38
Epimedin C	2	2.05 \pm 0.03	102.30	1.64
	10	9.94 \pm 0.31	99.38	3.13
	50	51.37 \pm 2.23	102.74	4.34
Hyperoside	2	2.04 \pm 0.02	102.10	0.80
	10	9.51 \pm 0.22	95.12	2.27
	50	48.54 \pm 0.23	97.07	0.47

Data were represented as mean \pm S.D. (n=5).

Capcellpak



Beckmann

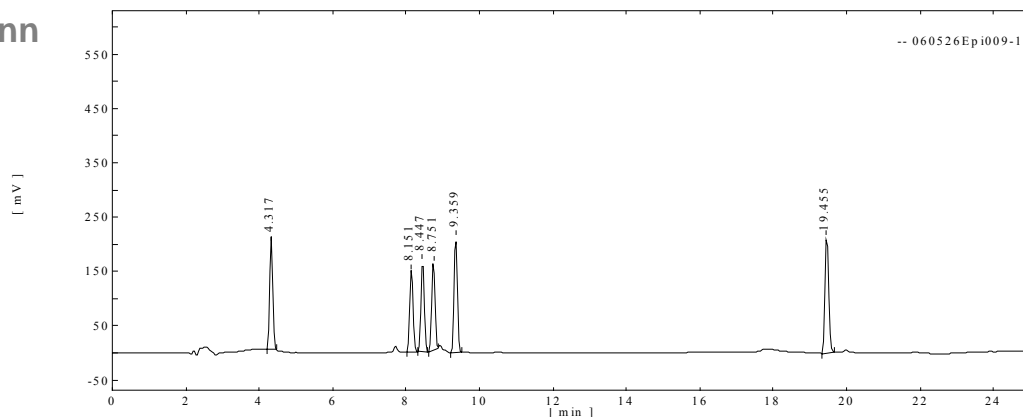


Figure 24. UV chromatograms of *E. koreanum* extract sample using Capcellpak and Beckmann column.

Table 12. Robustness test: Effect of column

Compound (25 $\mu\text{g/mL}$)	Condition	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	W	K	AS	NTP
Hyperoside	Beckman	1.867 \pm 0.047	0.16	0.74	1.04	705.8
	Capcell	2.003 \pm 0.006	0.16	1.00	0.93	358.4
Epimedin A	Beckman	1.993 \pm 0.046	0.16	2.13	0.91	203.7
	Capcell	1.857 \pm 0.021	0.16	2.25	0.99	418.7
Epimedin B	Beckman	2.023 \pm 0.085	0.16	2.27	1.01	180.3
	Capcell	2.033 \pm 0.023	0.16	2.35	0.93	356.6
Epimedin C	Beckman	1.843 \pm 0.138	0.16	2.37	1.04	980.1
	Capcell	1.777 \pm 0.023	0.16	2.46	0.99	1440.9
Icariin	Beckman	1.867 \pm 0.047	0.17	2.56	0.95	60.27
	Capcell	1.903 \pm 0.012	0.16	2.68	0.90	44.05

Data are represented as mean of duplicate determination. NTP: 이론단수, W: 피크너비, K: retention factor, AS: tailing factor.

다. 음양곽 추출물 시료 중 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 함량 분석

- 위와 같이 개발된 동시 분석법을 이용하여 산지가 다른 7종의 음양곽 시료(한국산 4종, 중국산 3종)로부터 만들어진 21개의 추출물 시료(각 시료 당 batch가 다른 3가지 추출물)에 대하여 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin의 함량을 분석하였다. LC/MS/MS법을 이용하여 분석한 결과는 Table 13과 14 같으며, HPLC/UV를 이용한 결과는 Table 15와 16과 같다. 각 시료에서의 flavonoid glycoside의 함량 분석 결과를 보면 음양곽 시료의 산지에 따라 유효 성분의 함량 분포에 차이가 나는 것을 알 수 있다.
- hyperoside의 경우 3종의 시료에서는 검출되지 않았으며 EK-K-10-26-1 (K1) 시료의 경우 분석 대상인 5개의 flavonoid glycoside가 전부 검출되지 않았다. LC/MS/MS법에 의한 함량 분석 결과와 HPLC/UV에 의한 함량 분석 결과는 대체적으로 비슷하게 나타났다.
- 사업단에서 보내온 추가 15종의 음양곽 시료를 분석한 결과, 위품인 K4 시료의 경우 hyperoside이외의 성분은 모두 검출되지 않았다, 중국산 중 C2 시료의 경우 epimedin C이외의 성분은 검출되지 않았으며 특히 epimedin C의 함량이 다른 시료에 비해 10배 이상 높았다. 중국산 시료의 경우는 epimedin C의 함량이 높은 경우가 많았다.

Table 13. Contents of flavonoid glycosides in E. koreanum plant based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Flavonoids content (mg/g plant)_LC/MS/MS				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	3.93	0.94	1.60	2.14	ND
EK-K-2-II	3.99	0.70	1.29	1.75	ND
EK-K-2-III	6.36	0.72	1.19	0.87	ND
EK-K-3-I	5.23	0.84	1.23	0.44	0.37
EK-K-3-II	3.40	0.79	1.20	0.53	0.55
EK-K-3-III	3.75	0.58	1.03	0.42	0.52
EK-C-1-I	5.80	1.17	1.99	0.91	0.51
EK-C-1-II	4.29	0.96	1.31	0.65	0.55
EK-C-1-III	3.97	1.07	1.48	0.81	0.46
EK-C-2-I	8.71	1.59	6.26	2.76	ND
EK-C-2-II	9.48	1.38	6.68	2.93	ND
EK-C-2-III	9.73	1.64	6.93	3.07	ND
EK-C-3-I	5.59	0.93	1.55	0.61	0.51
EK-C-3-II	5.18	1.09	1.91	0.73	0.75
EK-C-3-III	3.49	0.87	1.29	0.77	0.55
Ext-1	2.82	0.83	1.18	0.86	0.71
Ext-2	2.05	0.59	0.89	0.63	0.59
Ext-3	2.45	0.78	1.14	0.93	0.70

Table 14. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* extract based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Flavonoids content (% of dried extract)_LC/MS/MS				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	1.86	0.45	0.76	1.01	ND
EK-K-2-II	1.94	0.34	0.63	0.85	ND
EK-K-2-III	3.12	0.35	0.58	0.43	ND
EK-K-3-I	2.92	0.47	0.68	0.25	0.21
EK-K-3-II	1.88	0.44	0.66	0.29	0.31
EK-K-3-III	2.15	0.33	0.59	0.24	0.30
EK-C-1-I	3.22	0.65	1.11	0.50	0.28
EK-C-1-II	2.46	0.55	0.75	0.37	0.32
EK-C-1-III	2.16	0.58	0.81	0.44	0.25
EK-C-2-I	4.53	0.83	3.26	1.44	ND
EK-C-2-II	4.75	0.69	3.35	1.47	ND
EK-C-2-III	4.83	0.82	3.44	1.53	ND
EK-C-3-I	3.09	0.52	0.86	0.34	0.28
EK-C-3-II	2.78	0.58	1.03	0.39	0.40
EK-C-3-III	1.95	0.48	0.72	0.43	0.31
Ext-1	2.91	0.86	1.21	0.88	0.73
Ext-2	2.04	0.59	0.89	0.63	0.59
Ext-3	2.30	0.73	1.07	0.87	0.66

Table 15. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* plant based on the results of HPLC/UV analysis

Sample No.	Flavonoids content (mg/g plant)_LC/UV				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	4.05	1.02	1.44	2.26	ND
EK-K-2-II	4.46	0.80	1.14	1.75	ND
EK-K-2-III	5.87	0.88	1.27	0.96	ND
EK-K-3-I	5.28	0.99	1.26	0.44	0.42
EK-K-3-II	3.80	0.77	1.08	0.34	0.46
EK-K-3-III	3.14	0.76	1.04	0.30	0.46
EK-C-1-I	5.40	1.17	1.57	0.73	0.52
EK-C-1-II	3.99	1.04	1.32	0.82	0.55
EK-C-1-III	3.93	0.96	1.37	1.18	0.44
EK-C-2-I	9.45	1.91	7.83	3.05	ND
EK-C-2-II	9.72	1.75	7.18	2.68	ND
EK-C-2-III	11.76	2.77	9.58	3.66	ND
EK-C-3-I	5.71	0.99	1.33	0.72	0.53
EK-C-3-II	4.96	1.20	1.66	0.93	0.79
EK-C-3-III	3.77	0.95	1.25	0.73	0.55
Ext-1	2.75	0.77	1.00	0.90	0.34
Ext-2	2.43	0.69	0.93	0.66	0.58
Ext-3	2.56	0.93	0.98	0.66	0.58

Table 16. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* extract based on the results of HPLC/UV analysis

Sample No.	Flavonoids content (% of dried extract)_LC/UV				
	Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	hyperoside
EK-K-1-I	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-II	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-1-III	ND	ND	ND	ND	ND
EK-K-2-I	1.92	0.48	0.68	1.07	ND
EK-K-2-II	2.17	0.39	0.56	0.85	ND
EK-K-2-III	2.88	0.43	0.62	0.47	ND
EK-K-3-I	2.94	0.55	0.70	0.25	0.24
EK-K-3-II	2.11	0.43	0.60	0.19	0.25
EK-K-3-III	1.79	0.44	0.59	0.17	0.26
EK-C-1-I	3.00	0.65	0.87	0.41	0.29
EK-C-1-II	2.29	0.59	0.76	0.47	0.31
EK-C-1-III	2.14	0.52	0.75	0.64	0.24
EK-C-2-I	4.91	0.99	4.08	1.58	ND
EK-C-2-II	4.87	0.88	3.59	1.34	ND
EK-C-2-III	5.83	1.37	4.76	1.82	ND
EK-C-3-I	3.16	0.55	0.74	0.40	0.29
EK-C-3-II	2.66	0.64	0.89	0.50	0.42
EK-C-3-III	2.10	0.53	0.70	0.41	0.31
Ext-1	2.84	0.80	1.03	0.93	0.25
Ext-2	2.43	0.69	0.93	0.66	0.58
Ext-3	2.40	0.88	0.92	0.62	0.55

Table 17. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* plant based on the results of HPLC/UV analysis (추가 15종)

Sample No.	산지	구입처	Flavonoids content (mg/g plant)_LC/UV				
			Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	Hyperoside
EK-K-1	한국산	전남생약	3.18	1.47	2.07	1.81	0.21
EK-K-2	한국산	정도약업사	6.13	2.39	2.95	2.33	0.58
EK-K-3	한국산	제기동시장	1.44	0.73	1.05	0.50	0.26
EK-K-4	한국산(위품)	농협	0.00	0.00	0.00	0.00	0.51
EK-C-1	중국산	난주시장	2.91	0.82	1.32	0.65	0.69
EK-C-2	중국산	안국시장	0.00	0.00	0.00	32.41	0.00
EK-C-3	중국산	운장무역	2.97	0.80	1.35	0.55	0.74
EK-C-4	중국산	창달중약	2.13	0.78	1.26	0.78	0.85
EK-C-5	중국산	귀양시장	1.68	1.14	1.55	14.93	0.61
EK-C-6	중국산	곤명시장	1.23	0.55	0.69	6.20	0.00
EK-C-7	중국산	제기동시장	2.18	0.71	1.12	0.45	0.73
EK-C-8	중국산	안국시장	10.44	1.70	3.54	7.60	0.00
EK-C-9	중국산	시상판나시장	3.70	0.82	1.14	14.38	0.00
EK-C-10	중국산	제기동시장	1.57	0.49	0.72	0.70	0.35
EK-C-11	중국산	장사시장	0.94	0.52	0.64	5.57	0.00

Table 18. Contents of flavonoid glycosides in *E. koreanum* extract based on the results of HPLC/UV analysis (추가 15종)

Sample No.	산지	구입처	Flavonoids content (mg/g plant)_LC/UV				
			Icariin	Epimedin A	Epimedin B	Epimedin C	Hyperoside
EK-K-1	한국산	전남생약	1.620	0.748	1.053	0.923	0.108
EK-K-2	한국산	정도약업사	2.347	0.914	1.129	0.892	0.223
EK-K-3	한국산	제기동시장	1.031	0.520	0.749	0.360	0.187
EK-K-4	한국산(위품)	농협	0.000	0.000	0.000	0.000	0.296
EK-C-1	중국산	난주시장	1.530	0.434	0.696	0.343	0.364
EK-C-2	중국산	안국시장	0.000	0.000	0.000	18.208	0.000
EK-C-3	중국산	운장무역	1.738	0.469	0.792	0.322	0.435
EK-C-4	중국산	창달중약	1.195	0.439	0.710	0.440	0.479
EK-C-5	중국산	귀양시장	0.764	0.518	0.706	6.786	0.279
EK-C-6	중국산	곤명시장	0.671	0.301	0.378	3.388	0.000
EK-C-7	중국산	제기동시장	1.391	0.451	0.712	0.284	0.469
EK-C-8	중국산	안국시장	5.020	0.818	1.702	3.656	0.000
EK-C-9	중국산	시상관나시장	1.876	0.418	0.581	7.299	0.000
EK-C-10	중국산	제기동시장	1.106	0.342	0.510	0.489	0.249
EK-C-11	중국산	장사시장	0.540	0.297	0.367	3.183	0.000

바. HPLC/UV/MS를 이용한 음양곽 추출물의 chemical profiling

- 음양곽 추출물 성분의 chemical fingerprinting 방법의 확립을 위하여 HPLC/UV/MS를 이용하여 chemical profiling을 하였다. 플라보노이드 계열의 물질이 대체적으로 320 nm에서 특징적인 UV 흡수를 보임으로 320 nm에서 UV 흡수를 검출하고 동시에 mass detector를 이용하여 각 피크에 대한 m/z 값을 확인하였다. 대표적인 음양곽 추출물의 UV chromatogram은 Figure 25에 나타내었다.
- UV 크로마토그램을 통하여 음양곽의 약리 작용을 나타내는 주성분인 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside 등의 peak를 확인할 수 있었으며, 이들 성분을 포함하여 음양곽 추출물의 UV 크로마토그램 상의 총 22개의 peak에 대하여 chemical profiling을 수행하였다. 배치가 다른 음양곽 추출물 I, II, III에 대하여 UV 크로마토그램 상의 각 peak에 대한 retention time, m/z 값을 표시하였고 UV 흡수와 mass intensity를 바탕으로 하여 각 peak의 면적을 계산하여 표시하였다 (Table 19).
- 3가지의 음양곽 추출물 시료는 UV와 mass data에 의거한 chemical profiling에 있어 유사한 패턴을 보였다.

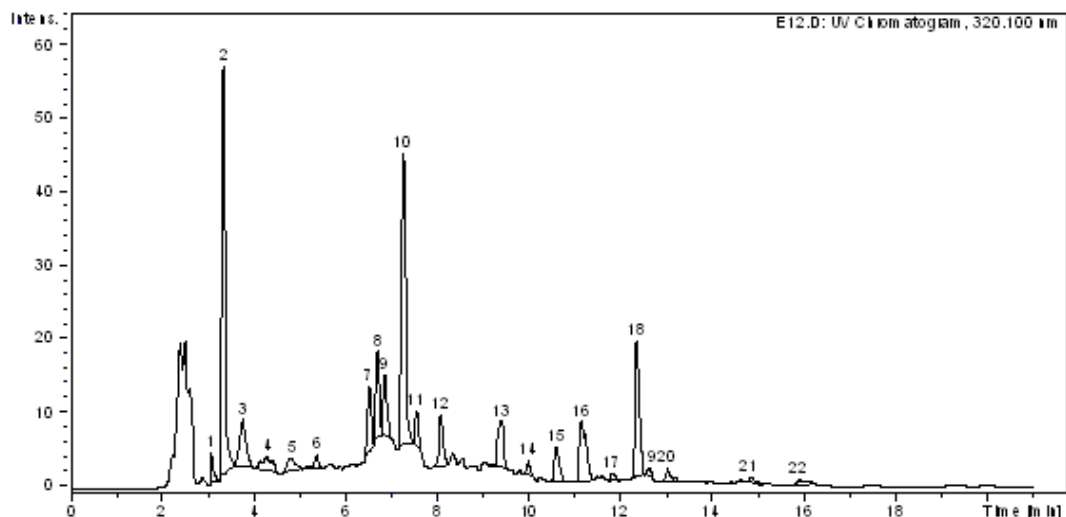


Figure 25. UV chromatogram for *E. koreanum* extract

Table 19. Chemical profiling *E. koreanum* extract with HPLC/UV/MS

Peak No.	RT (min)	m/z	UV (% area)			Mass (% area)		
			Ext-I	Ext-II	Ext-III	Ext-I	Ext-II	Ext-III
1	3.1	342	1.4	1.9	1.7	1.9	2.0	0.7
2	3.3	297	21.4	25.3	24.1	5.7	5.6	26.7
3	3.7	319	4.8	4.7	4.7	1.4	1.2	1.1
4	4.3	303	2.4	2.3	2.5	22.3	26.0	21.1
5	4.8	370	1.7	1.6	1.7	10.8	10.7	8.9
6	5.3	517	1.2	0.9	1.0	8.8	7.1	5.0
7	6.5	839	3.4	3.0	3.3	5.1	5.1	3.1
8	6.7	809	4.6	3.9	4.1	5.1	4.7	3.7
9	6.8	823	4.4	3.5	3.9	5.8	6.5	5.1
10	7.2	677	19.4	18.0	16.2	16.5	15.5	10.9
11	7.5	821	2.2	2.1	3.3	7.4	6.5	6.4
12	8.1	617	3.6	3.4	3.6	1.1	0.9	0.5
13	9.4	719	4.4	4.4	4.3	0.3	0.2	0.1
14	10.0	355	0.9	0.8	1.0	1.9	1.8	1.7
15	10.6	699	2.4	2.4	2.6	0.2	0.2	0.2
16	11.1	669	6.8	6.9	7.2	1.7	0.08	0.1
17	11.8	746	0.5	0.4	0.4	0.01	0.06	0.03
18	12.3	369	10.3	10.4	9.8	4.3	4.4	3.5
19	12.6	659	0.5	0.6	1.1	0.09	0.06	0.1
20	13.0	783	1.1	1.2	1.1	0.2	0.2	0.3
21	14.8	825	0.5	0.5	0.5	0.06	0.1	0.1
22	15.9	331	1.1	0.8	0.8	0.1	0.1	0.1

바. 음양곽의 품질 관리를 위한 패턴 인식 분석법의 적용

- 음양곽의 유효 성분으로 여겨지는 몇 가지 flavonoid glycoside계 물질 뿐 아니라 음양곽에 포함되어 있는 전체 성분에 대한 정보를 반영한 품질 관리법을 확립하기 위하여, 음양곽 추출물 시료를 LC/MS로 분석한 뒤 얻어진 total ion chromatography (TIC)에 대하여 패턴 인식 분석을 수행하였다.
- 우선, 패턴 인식 분석법으로서 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석법 (Principle component analysis, PCA)을 적용하여 얻어진 PC score plot을 통하여 음양곽 추출물 시료간의 화학적 성분 패턴에 따른 분포를 관찰하였다. Score plot (Figure 21)을 살펴보면, PC1에 대해서 icariin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, hyperoside이 모두 검출되지 않았던 K1 시료를 제외한 모든 음양곽 시료는 전체적으로 일정한 값을 나타내었으며 음양곽이 아닌 다른 한약재 시료 (NP)와 확연한 차이를 나타내었다. PC2에 의해서는 각 시료의 산지에 따른 미세한 구분이 가능하였으며, PC3에 의해서는 대부분의 음양곽 시료와 확연한 차이를 보이는 NP와 K1 시료 이외에 C2 시료가 다른 시료들과 구분되어 cluster를 형성하였다. C2 시료의 경우 hyperoside이 검출되지 않았으며 icariin, epimedin A, B, C의 함량이 다른 추출물 시료에 비해 현저하게 높은 것이 다른 시료와 구분된 cluster를 형성한 원인으로 사료된다. 결론적으로 PC1의 한 가지 factor만으로도 타 한약재와의 구분이 가능하였으며, PC2, PC3를 추가적으로 적용하였을 때 산지 또는 기원식물 등에 의한 차이를 구분할 수 있었다.
- 패턴 분석을 이용한 한약재의 품질 관리 기준의 마련하고자, 각 음양곽 추출물 시료에 대한 분석 결과에 Similarity Index (SI)를 적용하여 패턴 분석 결과를 수치화하였다 (Table 20). 각 시료 간 SI값을 살펴보면, 성분 패턴이 확연히 다른 NP와 K1 시료의 경우 타 시료와의 SI값이 0.2-0.4 정도로 매우 낮은 값을 보였으며 이들 시료를 제외한 경우 0.6-0.8사이의 SI 값을 보였다. 같은 음양곽 시료에 대하여 추출한 batch가 다른 시료간의 SI값은 0.8-1 사이의 높은 값을 나타냈으나, 같은 시료를 가지고 추출한 경우라도 그 batch에 따라 성분 프로파일의 차이가 나타남을 알 수 있었다.

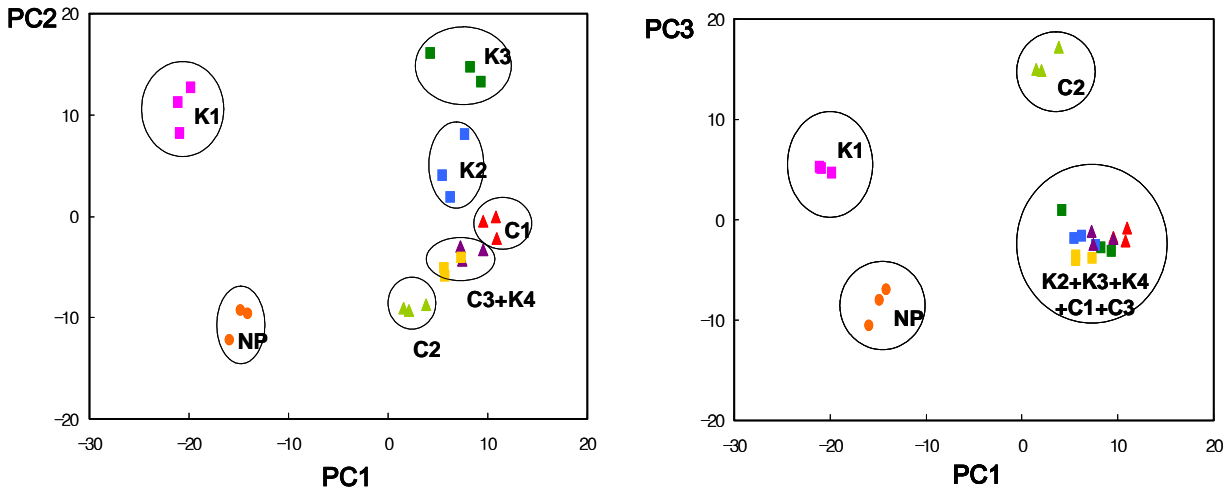


Figure 26. PC score plots for *E. koreanum* extract sample

Table 20. Similarity index for *E. koreanum* extract sample

	K1-1	K1-2	K1-3	K2-1	K2-2	K2-3	K3-1	K3-2	K3-3	K4-1	K4-2	K4-3	C1-1	C1-2	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C3-1	C3-2	C3-3	NP-1	NP-2	NP-3
K1-1	1.00	0.88	0.86	0.40	0.43	0.40	0.45	0.38	0.40	0.34	0.35	0.34	0.33	0.32	0.30	0.37	0.40	0.39	0.36	0.32	0.30	0.31	0.33	0.36
K1-2		1.00	0.90	0.42	0.44	0.41	0.48	0.40	0.43	0.33	0.35	0.33	0.33	0.32	0.30	0.37	0.39	0.37	0.34	0.30	0.29	0.30	0.35	0.37
K1-3			1.00	0.47	0.47	0.43	0.53	0.45	0.46	0.35	0.35	0.33	0.34	0.34	0.32	0.38	0.40	0.39	0.36	0.32	0.31	0.29	0.34	0.38
K2-1				1.00	0.87	0.86	0.79	0.81	0.85	0.74	0.73	0.69	0.80	0.81	0.77	0.62	0.61	0.64	0.81	0.79	0.74	0.23	0.26	0.27
K2-2					1.00	0.88	0.75	0.76	0.79	0.74	0.72	0.71	0.81	0.80	0.80	0.64	0.64	0.65	0.82	0.80	0.80	0.24	0.26	0.29
K2-3						1.00	0.72	0.74	0.78	0.77	0.75	0.73	0.83	0.83	0.80	0.66	0.65	0.65	0.82	0.79	0.78	0.25	0.29	0.30
K3-1							1.00	0.85	0.81	0.68	0.68	0.65	0.69	0.72	0.68	0.61	0.59	0.59	0.71	0.70	0.68	0.22	0.24	0.26
K3-2								1.00	0.86	0.68	0.67	0.64	0.74	0.77	0.74	0.58	0.55	0.55	0.73	0.73	0.71	0.20	0.23	0.25
K3-3									1.00	0.70	0.72	0.68	0.77	0.79	0.76	0.60	0.58	0.58	0.76	0.76	0.71	0.21	0.23	0.24
K4-1										1.00	0.88	0.90	0.75	0.75	0.74	0.66	0.65	0.65	0.79	0.81	0.78	0.28	0.29	0.32
K4-2											1.00	0.93	0.75	0.73	0.74	0.64	0.64	0.64	0.76	0.78	0.76	0.25	0.29	0.28
K4-3												1.00	0.73	0.71	0.72	0.63	0.63	0.63	0.74	0.75	0.75	0.24	0.26	0.26
C1-1													1.00	0.92	0.92	0.68	0.65	0.65	0.83	0.82	0.81	0.22	0.25	0.25
C1-2														1.00	0.93	0.68	0.64	0.64	0.84	0.84	0.81	0.24	0.27	0.27
C1-3															1.00	0.69	0.66	0.65	0.81	0.83	0.83	0.22	0.24	0.25
C2-1																1.00	0.90	0.89	0.69	0.67	0.66	0.22	0.26	0.26
C2-2																	1.00	0.93	0.69	0.66	0.66	0.26	0.28	0.29
C2-3																		1.00	0.71	0.69	0.66	0.27	0.30	0.29
C3-1																			1.00	0.91	0.87	0.27	0.30	0.30
C3-2																				1.00	0.90	0.25	0.28	0.29
C3-3																					1.00	0.25	0.28	0.29
NP-1																						1.00	0.61	0.61
NP-2																							1.00	0.69
NP-3																								1.00

3.2 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 연구

가. 천궁 추출

(1) 70% Ethanol extract

가) 성분 대량 추출용

- 70% Ethanol ext.를 약 785g 얻었다(yield 31.4%). 이 중 150g(50g×3개)을 한약재과학화 사업단, 제1세부과제 분석팀 및 제2세부과제 BT팀에 제공하였다.

나) 비교 분석용

- 비교 분석용의 70% ethanol ext.는 Table 21과 같으며, 이들 70% ethanol ext.를 각 1 g씩 분석팀에 제공하였다.

Table 21. 70% Ethanol ext. from various Cnidii Rhizoma

시료명	사용량 (g)	70% Ethanol ext. 량 (g)
K-1	40	11.11
K-2	40	8.66
K-3	40	11.73
K-4	40	8.71
K-5	40	10.02
K-6	40	11.65
K-7	20	7.00
K-8	20	6.29
K-9	20	6.90
K-10	20	6.96
C-1	20	3.96
C-2	20	6.80
C-3	20	6.50
C-4	20	7.94
C-5	20	5.09

(2) 분획 추출

- Hexane ext., ether ext. 및 chloroform ext.의 hexane-MeOH-H₂O(20:10:2) 분획물 중 상층(hexane 층)은 액체(267 g)로서 triglyceride가 주가 되는 분획(CRH)이었다. 하층(methanol 층)은 비극성 물질 중에서도 극성이 높은 물질을 함유하는 분획(CRC, 액체, 100 g)으로 천궁의 정유 성분이 주로 함유되어 있는 분획이었다. 이어서 ethyl acetate ext.(CRE, 14 g), butanol ext.(CRB, 59 g), 물 ext.(CRW, 350 g)을 얻었다. 전체적으로 볼 때 CRH 분획과 CRW 분획이 대부분을 차지하고 있는데 이 두 분획은 triglyceride 및 당류가 주로 되는 1차대사산물에 해당되는 분획이고 2차대사산물로서는 CRC 분획에 집중되는 것을 알았다.

나. 물질 분리

(1) Fr. CRH 분획의 물질 분리

Compd. 9: TLC co-spotting 소견으로 볼 때 β -sitosterol로 추정되며 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 β -sitosterol임을 확인하였다.

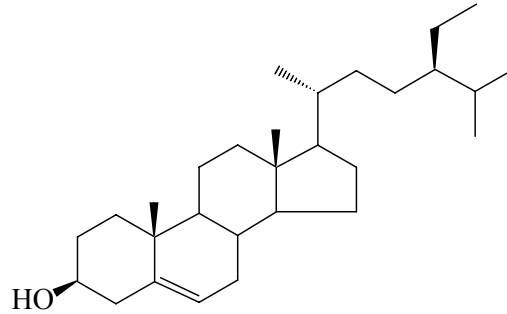


Figure 27. β -Sitosterol의 구조

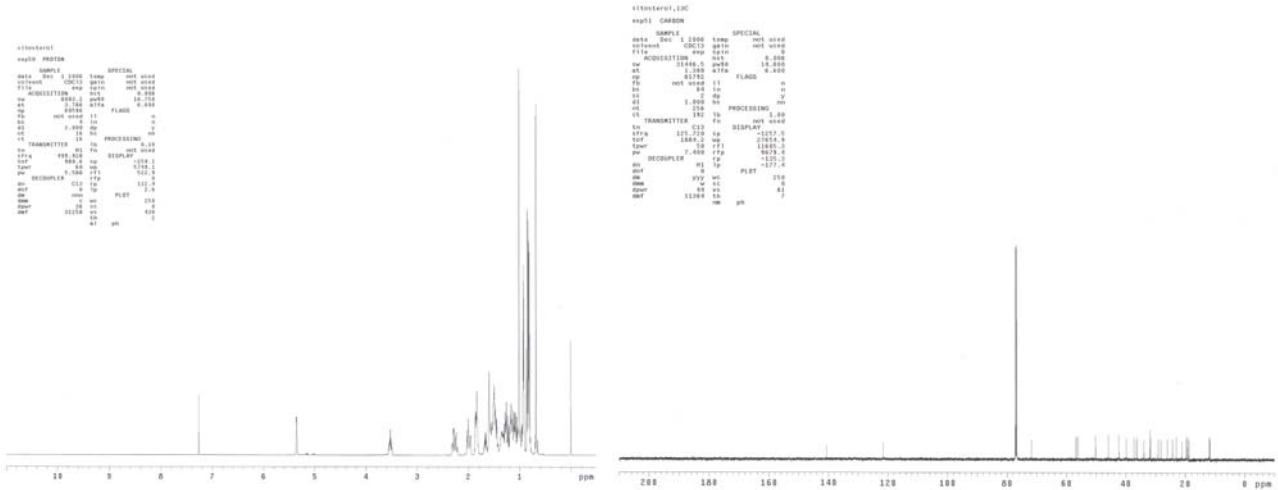


Figure 28. $^1\text{H-NMR}$ spectrum and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of Compd. 9

(나) CRC 분획의 물질 분리

◦ Compd. 1: 황산에 의하여 보라색으로 발색되는 것으로 보아 terpenoid 계열의 물질로 추정됨. 분자량 추정을 위하여 ESI-MS를 측정하였으나 분자량 peak를 얻을 수 없었음은 물론이고 정확한 개열 pattern도 얻을 수 없었으므로 연구 기간 내에 구조 분석이 곤란할 것으로 생각되어 다른 물질의 분리에 힘을 쓰기로 함.

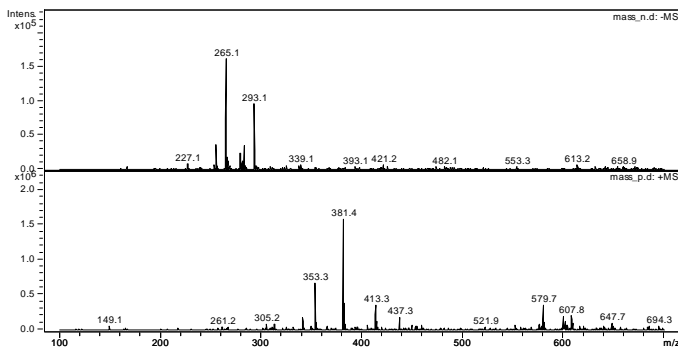


Figure 29. MS spectrum of Compd. 1

- Compd. 2: 이 화합물은 *Z*-ligustilide와 거의 같은 R_f 치를 보이나 형광은 없고 UV 흡수가 강한 것으로 보아 같은 계열의 화합물로 추정되며 UV 흡수 pattern으로 보아 benzene환이 있는 것으로 예상되며 H-8의 2중결합의 proton의 존재로 보아 butylienepthalide로 추정된다. MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 butyldenepthalide임을 확인하였다.

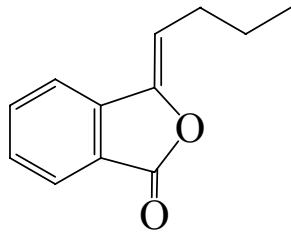


Figure 30. Butyldenepthalide의 구조

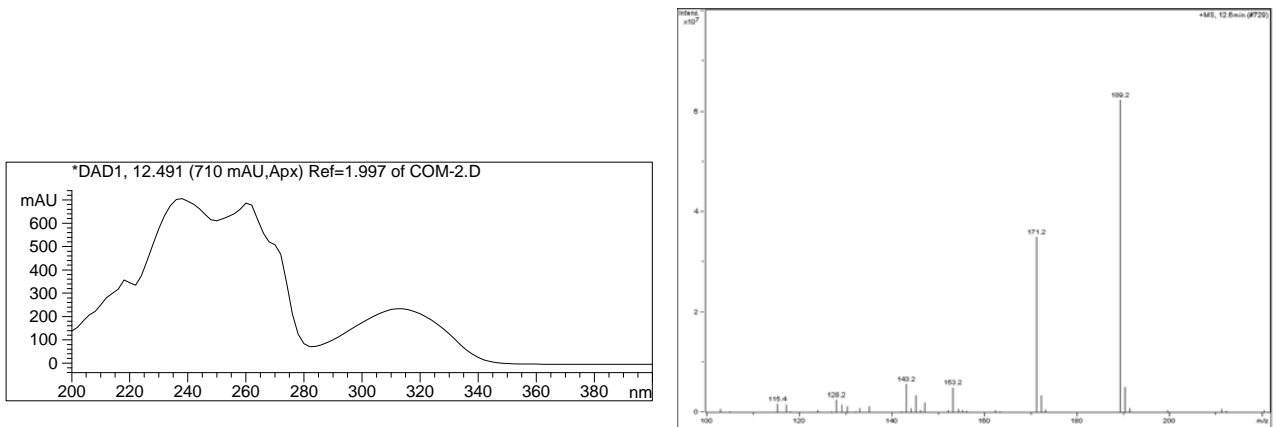


Figure 31. UV and MS spectra of Compd. 2

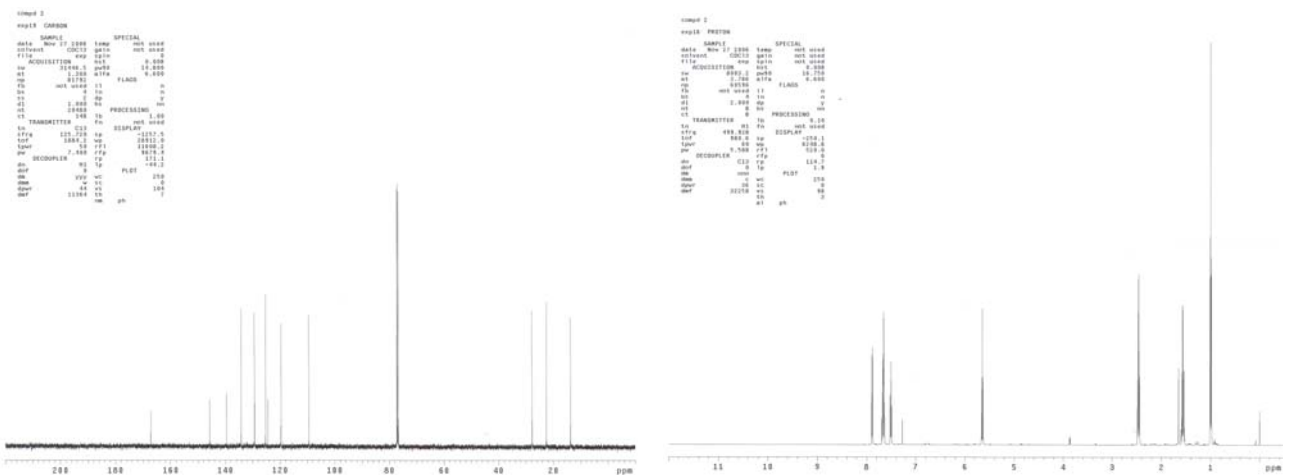


Figure 32. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of Compd. 2

- Compd. 3: 이 화합물은 UV 366nm에서 강한 청색 형광을 나타내며 UV에서 320nm의 흡수 극대를 보이는 것으로 보아 천궁, 당귀 등의 정유 성분으로 존재하는 butyl phthalide 계열을 화합물로 추정되어 mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 *Z*-ligustilide임을 확인하였다.

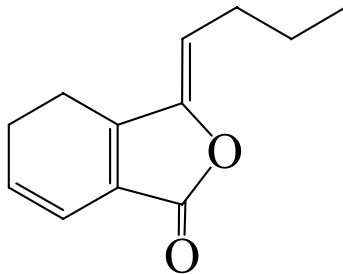


Figure 33. *Z*-Ligustilide의 구조

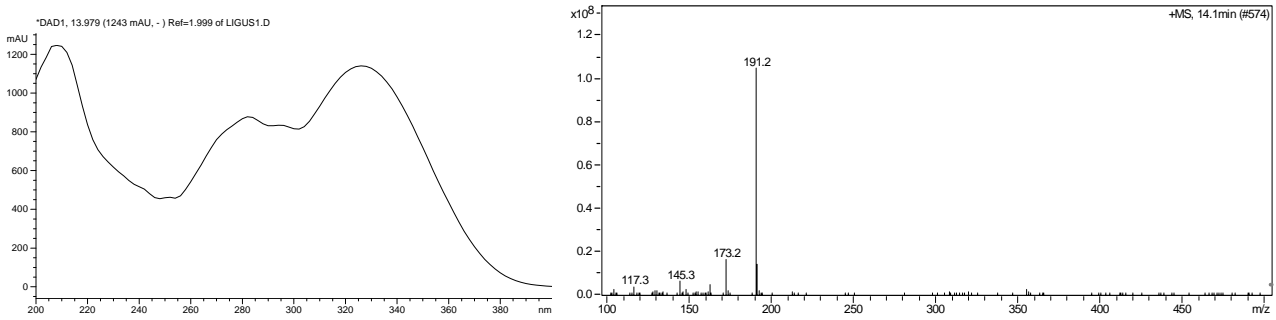


Figure 34 UV spectrum and Mass spectrum of Compd. 3

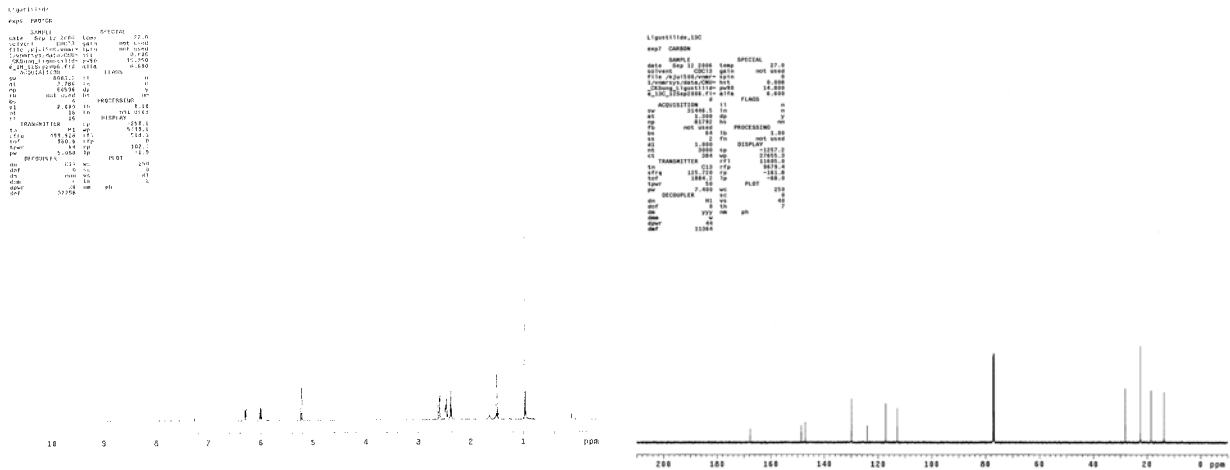


Figure 35. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compd. 3

Compd. 5: 천궁의 70% EtOH ext.의 HPLC에서 가장 강한 peak를 나타내는 화합물로 UV 366nm에서 형광을 나타내지 않으며 UV 254nm에서 UV의 강한 흡수를 보인다. UV 225nm의 흡수 극대를 보이는 것으로 보아 Compd. 4와 유사한 골격 구조를 가지는 것으로 추정되며 mass, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 senkyunolide A임을 확인하였다.

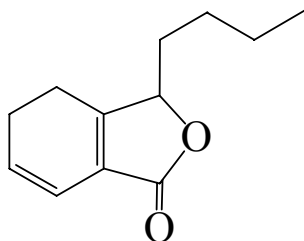


Figure 39. Senkyunolide A의 구조

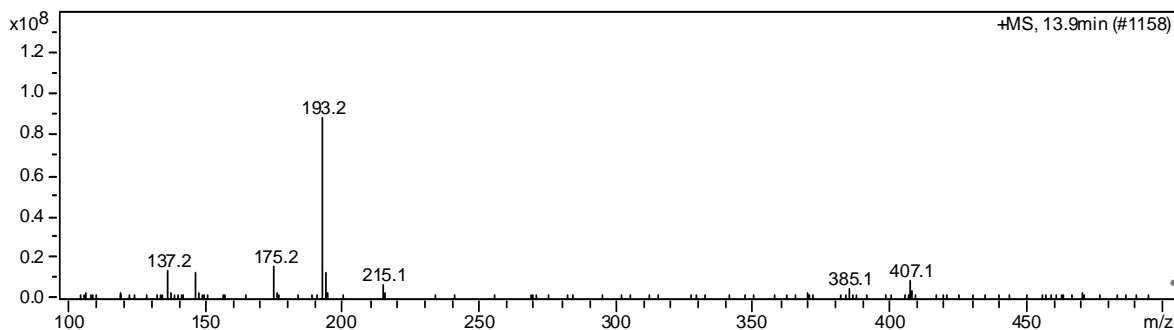


Figure 40. MS spectrum of Compd. 5

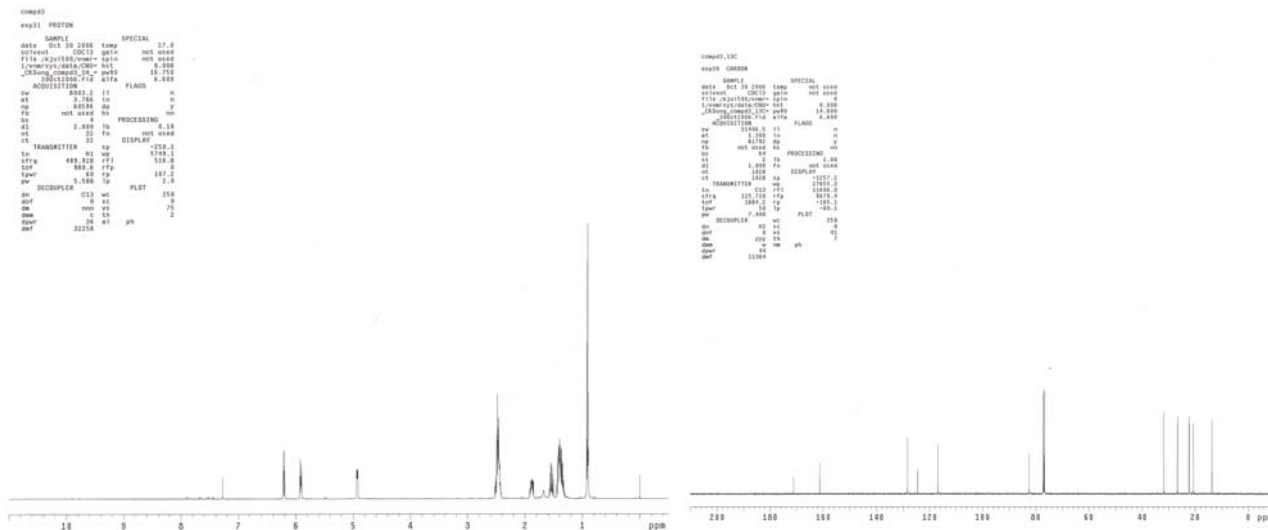


Figure 41. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of Compd. 5

Compd. 10: ^{13}C -NMR에서 탄소의 개수가 24개로 butylphthalide의 2배로 dimer로 예측되었다. LC-ESI-MSdata를 search한 결과 butylphthalide dimer의 하나인 levistolide A로 추정되었다. 이 물질의 UV, MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR가 문헌치와 비교한 결과 정확히 일치하였다.

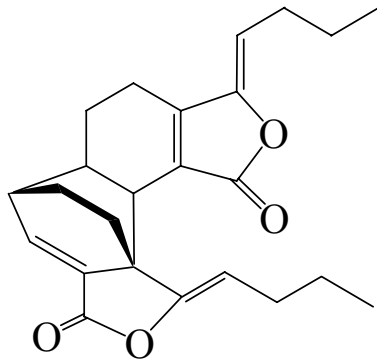


Figure 42. Levistolide A의 구조

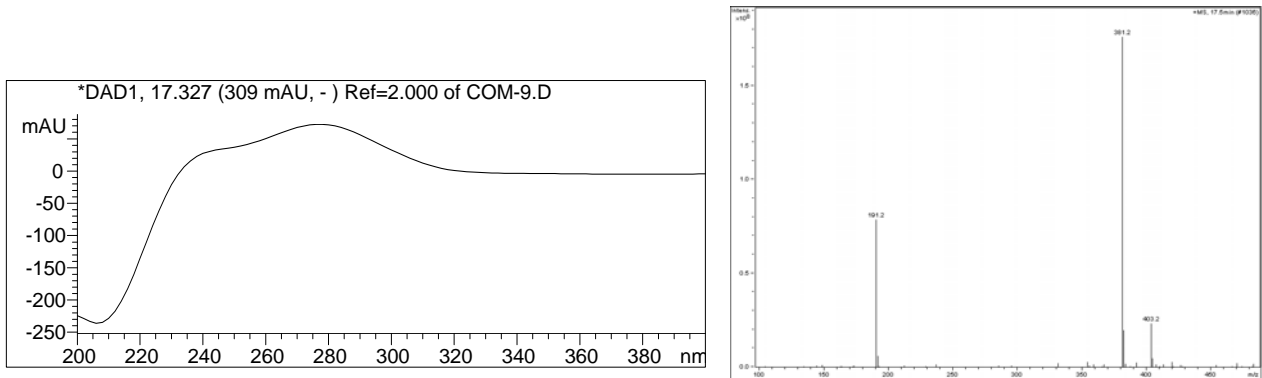


Figure 43. UV and MS spectra of Compd. 10

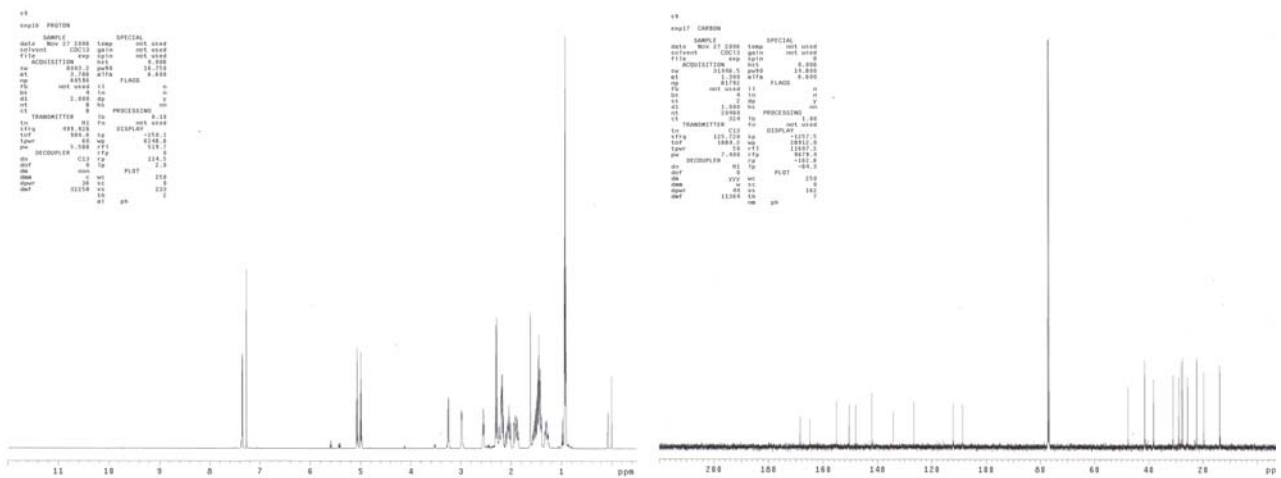


Figure 44. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compd. 9

Compd. 11: LB test 양성(오록색) 및 TLC co-spotting 소견으로 볼 때 pregnenolon으로 추정되며 Mass, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 pregnenolon임을 확인하였다.

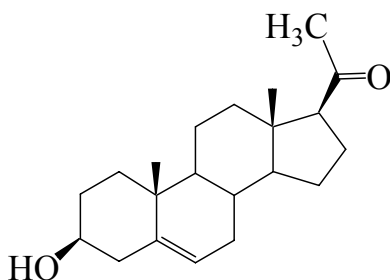


Figure 45. Pregnenolon의 구조

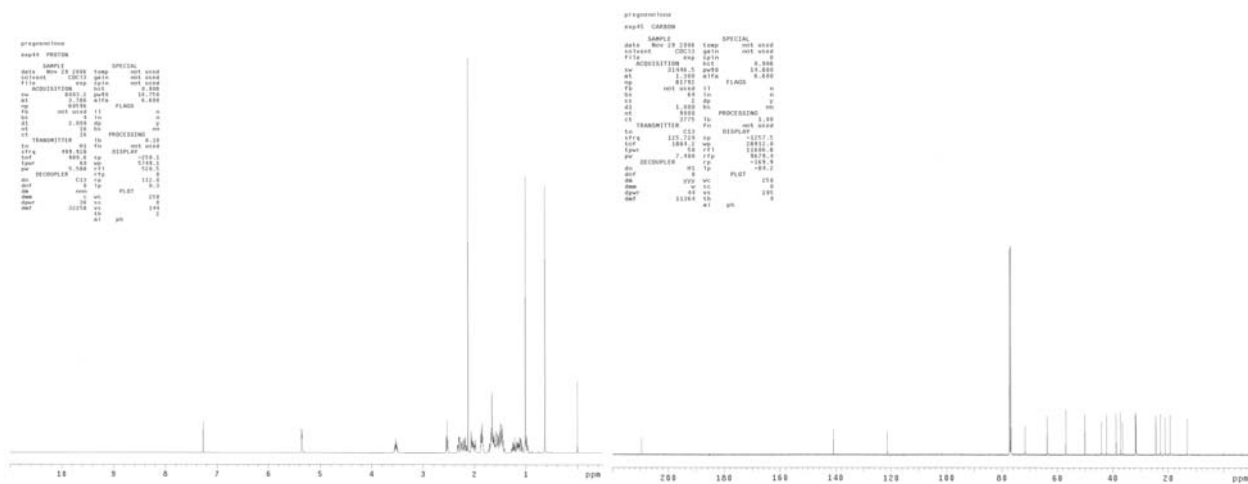


Figure 46. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of Compd. 11

(다) CRE 분획의 물질 분리

Compd. 6: Mass, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 ferulic acid임을 확인하였다.

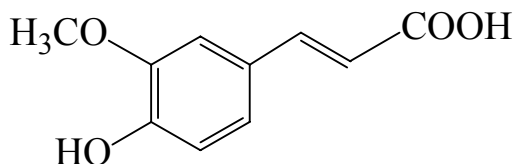


Figure 47. Ferulic acid의 구조

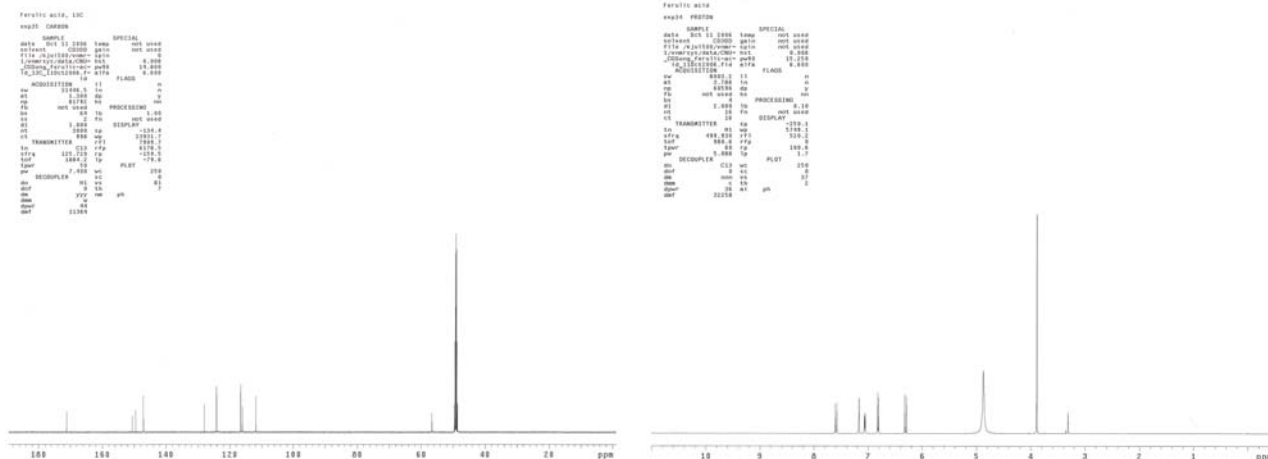


Figure 48. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compd. 6

Compd. 7: Mass, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 chlorogenic acid임을 확인하였다.

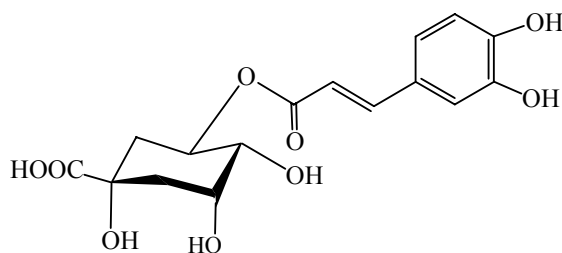


Figure 49. Chlorogenic acid의 구조

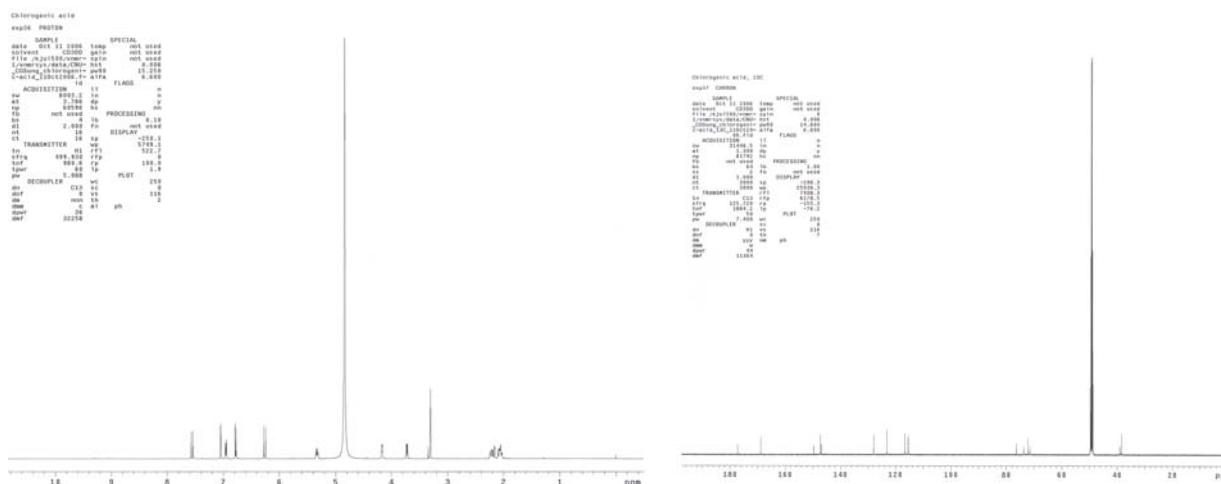


Figure 50. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of Compd. 7

(라) CRE 분획의 물질 분리

Compd. 8: LB test 양성(violet) 및 TLC co-spotting의 결과 oleanolic acid로 추정되며 Mass, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 spectral data를 문헌치와 비교해 본 결과 oleanolic acid임을 확인하였다.

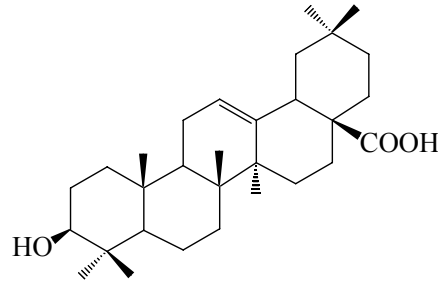


Figure 51. Oleanolic acid의 구조

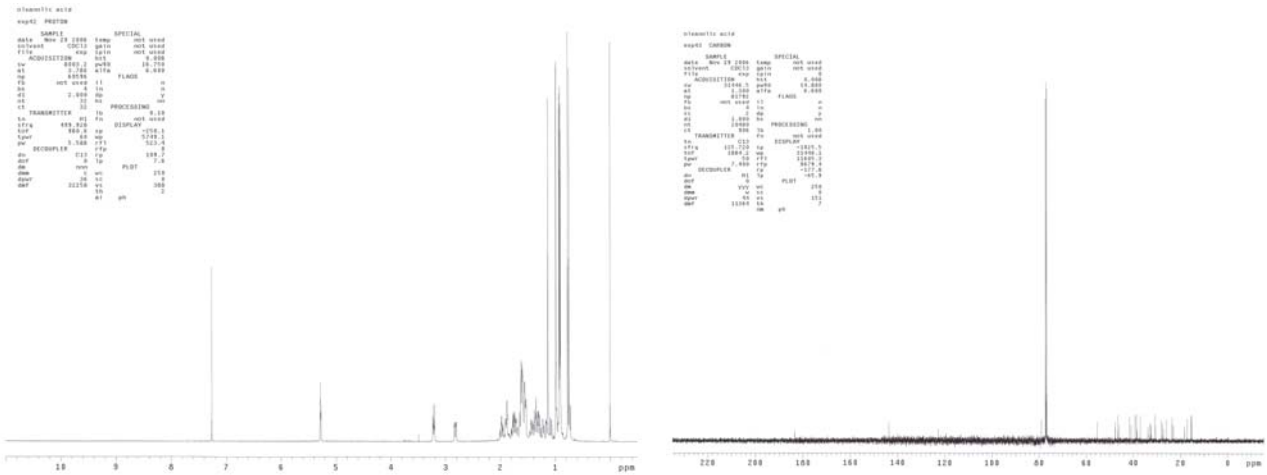


Figure 52. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of Compd. 8

- 천궁 추출물에서 분리한 단일물질들은 Z-Butyridenepthalide, Z-ligustilide, neocnidilide, senkyunolide A, ferulic acid, chlorogenic acid, oleanolic acid, β-sitosterol, levistolide A, 과 pregnenolone 등의 총 10종에 대하여 분리, 동정하였으며 현재는 1종을 더 분리하였으며 이에 대한 구조를 동정하고 있다.
- 천궁에서 분리한 물질에 대한 정보는 Table 23과 24에 요약하였다.

Table 23. Name of purified compounds from Cnidii Rhizoma

No. (Compd. No.)	Name	synonym	IUPAC name
1 (2)	Z-Butylidenephthalide	3-Butylidenephthalide	3-Butylidene-1(3H)-isobenzofuranone, 9CI
2 (3)	Z-Ligustilide		3-Butylidene-4,5-dihydro-1(3H)-isobenzofuranone, 9CI. 3-Butylidene-4,5-dihydrophthalide, 8CI
3 (4)	Neocnidilide	Sedanolid	3-Butyl-3a,4,5,6-tetrahydro-1(3H)-isobenzofuranone, 9CI
4 (5)	SenkyunolideA	Sedanenolide Senkyunolide	3-Butyl-4,5-dihydro-1(3H)-isobenzofuranone 3-Butyl-4,5-dihydrophthalide
5 (6)	Ferulic acid	3-Methoxy-4-hydroxycinnamic acid Caffeic acid 3-methyl ether	3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid
6 (7)	Chlorogenic acid	3-Caffeoylquinic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinic acid	[1S-(1a,3β,4a,5a)]-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid 1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexane carboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)
7 (8)	Oleanolic acid	Oleanol Caryophyllin	(3β)-3-Hydroxyolean-12-en-28-oic acid
8 (9)	β-Sitosterol	22:23-Dihydrostigmast erol α-Dihydrofucostero	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol
9 (10)	Levistolide A	Z-Levistolide	1H-5,10c-Ethanophtho[1,2-c:7,8-c']difuran-3,10-dione, 1,8-dibutylidene-5,5a,6,7,8,10b-hexahydro, (1Z,5S,5aS,8Z,10bS,10cS)-(9CI)
10 (11)	Pregnenolone	Δ ⁵ -Pregnen-3β-ol-20-one	(3β)-3-Hydroxypregn-5-en-20-one

Table 24. Purified compounds from Cnidii Rhizoma

No. (Compd. No.)	Name	M.W.	Amount (mg)	Purity(%)	제출량 (mg)
1 (2)	<i>Z</i> -Butylidenephthalide	188	60	>95	20
2 (3)	<i>Z</i> -Ligustilide	190	1200	>99	500
3 (4)	Neocnidilide	194	41	>98	20
4 (5)	SenkyunolideA	192	3100	>95	1,000
5 (6)	Ferulic acid	194	160	>93	100
6 (7)	Chlorogenic acid	354	199	>98	100
7 (8)	Oleanolic acid	456	50	>97	200
8 (9)	β -Sitosterol	414	40	>95	200
9 (10)	Levistolide A	380	14	>93	100
10 (11)	Pregnenolone	316	100	>98	30

다. LC/MS/MS를 이용한 천궁 유효성분의 분석법 개발

- 천궁의 70% 에탄올 추출물 시료에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide (Figure 53)의 4개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하기 위하여 LC/MS/MS의 multi reaction monitoring (MRM) mode를 이용하여 분석법을 연구하였다.
- Positive ion mode에서 분석하였을 때 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin(I.S.)은 m/z 355, 195, 193, 191, 781에서 각각 protonated된 molecular ion peak를 나타내었으며 MS/MS 분석을 수행한 결과, 각각 m/z 163, 177, 91, 91에서 major fragment peak을 보였다 (Figure 54).
- 이러한 MS/MS 분석 데이터를 바탕으로 MRM을 위한 precursor, product ion pair를 설정하고 LC/MS/MS 분석을 수행한 결과 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, digoxin(I.S.)는 각각 2.41, 2.60, 4.55, 5.19, 2.57 분경에 검출되었으며 모든 분석물질에 대해 양호한 peak shape와 intensity를 보였다. 또한 이 분석 조건에서 타물질에 의한 방해 peak는 나타나지 않았으며 우수한 선택성을 보였다 (Figure 55).
- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과 chlorogenic acid의 경우, 0.05-2 µg/mL, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 0.1-2 µg/mL, ferulic acid의 경우 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다 (Figure 56).

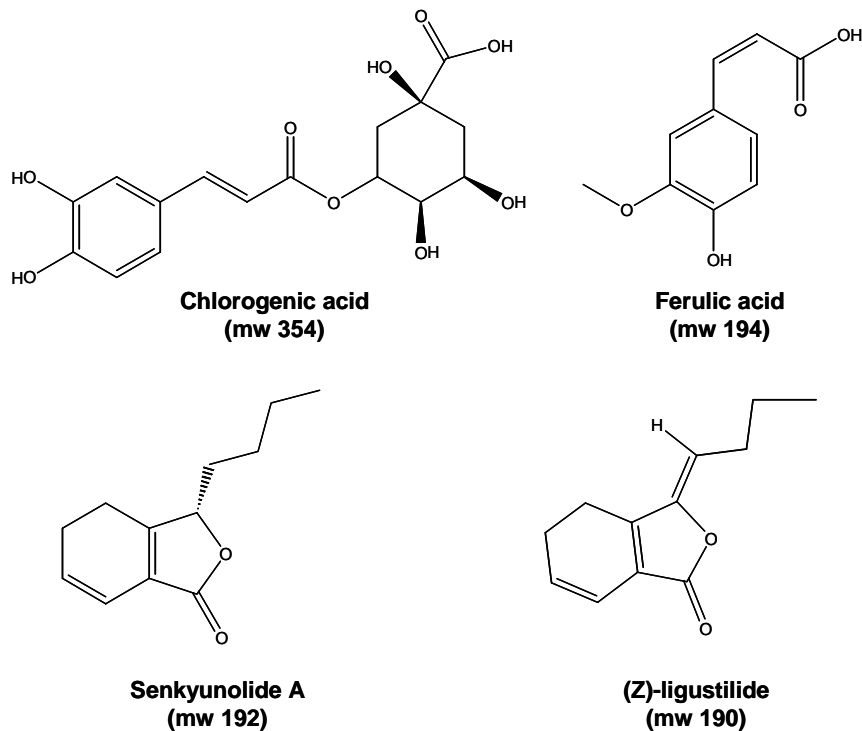


Figure 53. Chemical structures of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide from *C. officinale* extract.

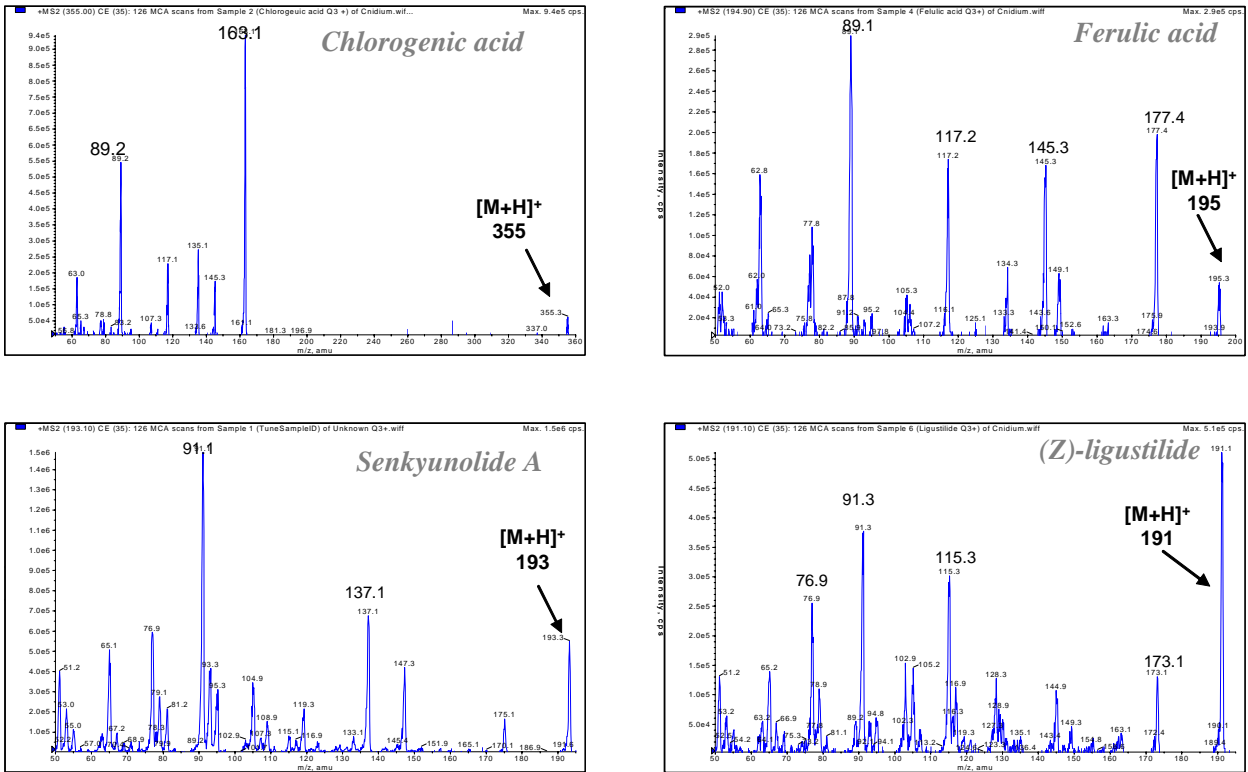


Figure 54. MS/MS spectrum of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide

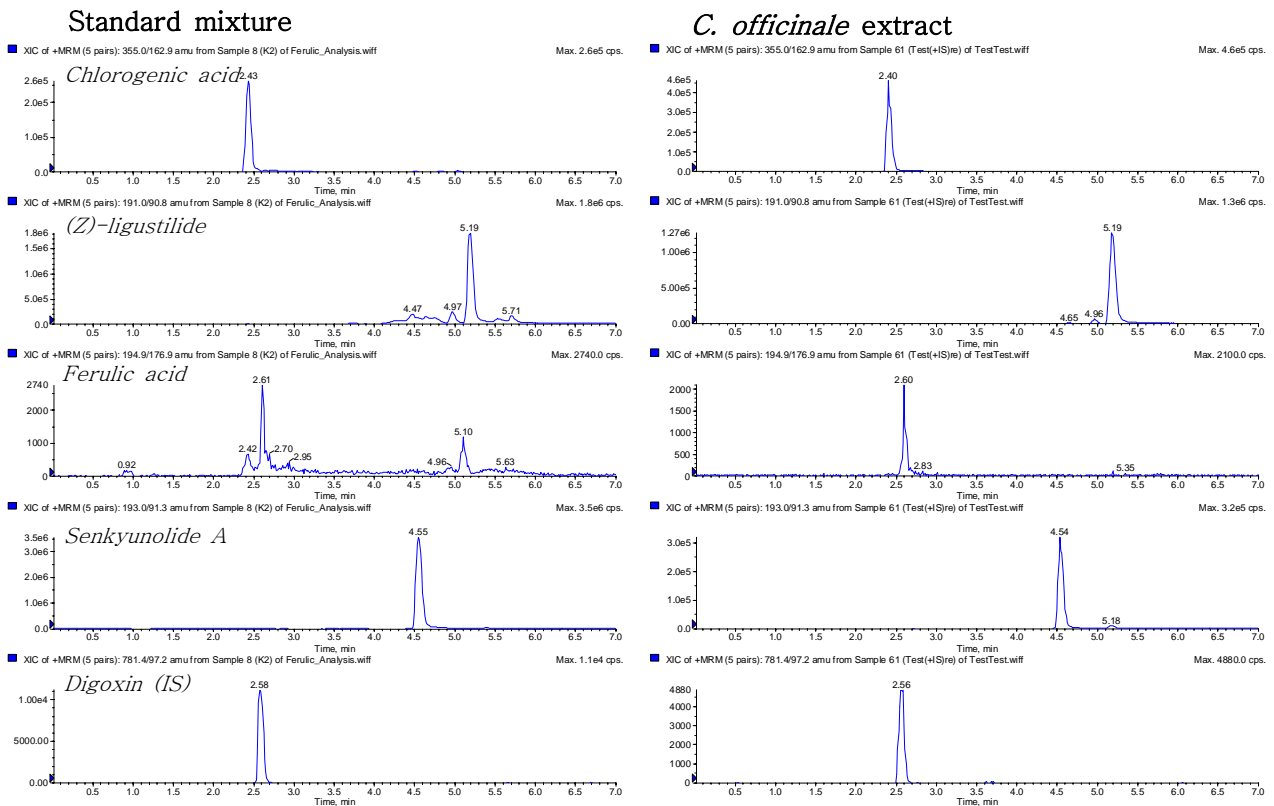


Figure 55. Extracted ion chromatograms (EIC) of standard mixture and *C. officinale* extract

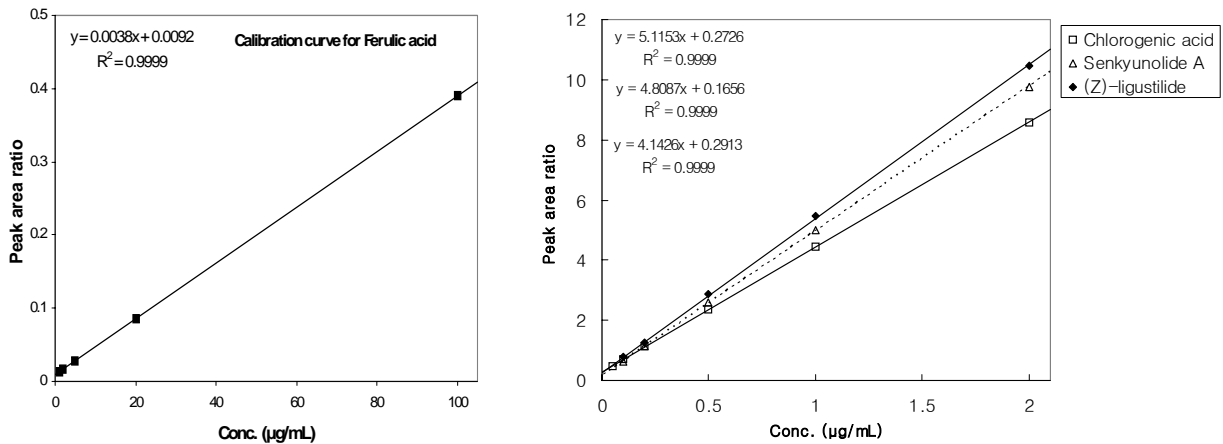


Figure 56. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide에 대한 검량선 (Calibration curves for Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide)

라. HPLC/UV를 이용한 천궁 유효성분의 분석법 개발 및 validation

- 의약품 또는 천연물 분석시 보편적으로 사용되고 있는 HPLC/UV를 이용하여 천궁 추출물 시료에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4개의 성분에 대한 동시 분석법을 확립하였다. 4개의 화합물에 대하여 대체적으로 UV 흡수가 크게 나타나는 파장인 280 nm을 검출 파장으로 설정하여 분석한 결과, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide, α -naphthoflavone(I.S.)은 각각 약 5.1, 6.5, 10.5, 11.7, 14.4분에서 검출되었으며, 각 peak 분리정도와 peak shape는 양호하였다 (Figure 57).
- 각 표준품 시료에 대하여 검량선을 작성한 결과, 표준액의 농도 2-100 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 상관계수 (r^2) 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다(Figure 58). 세 농도(2, 20, 100 $\mu\text{g/mL}$)의 QC 시료를 가지고 일내, 일간 validation을 수행하였으며 그 결과는 Table 25, 26에 나타내었다. 일내 정확성은 이론치 대비 95.88-103.5%, %RSD는 0.19-3.33%로 우수한 일내 정확성과 정밀성을 보였다. 일간 정확성은 이론치 대비 95.12-104.9%, %RSD는 0.46-4.38%로 우수한 일간 정확성과 정밀성을 보였다.
- 본 분석법의 완건성(Robustness)를 검토하고자 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 QC시료에 대하여 컬럼의 종류(Atlantis C₁₈, Capcellpak C₁₈), 컬럼 오븐 온도 (30, 35, 40°C), 이동상 중 acetic acid의 농도 (0.05, 0.1, 0.2%)를 변화시켜 분석하였다.
- 컬럼 오븐 온도를 30, 35, 40°C로 변화시켰을 때 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 peak 면적, retention time에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 분리 효율에 있어서 chlorogenic acid의 경우 30°C나 40°C에서는 peak가 broad해지고 이론단수가 현저하게 감소하여 본 분석 조건에 설정된 온도는 35°C가 최적의 조건임을 알 수 있었다. 다른 세 가지 물질의 경우는 분석 효율에 있어 큰 차이를 보이지 않았다 (Table 27).
- 컬럼의 종류를 Atlantis C₁₈에서 Capcellpak C₁₈로 바꾸어 분석하였을 때는 네 화합물의 측정값에는 큰 차이를 보이지 않았으나 Atlantis C₁₈로 분석할 때 보다 더 빨리 elution되고 peak 너비가 넓어졌으며 이론단수가 크게 감소하였다 (Table 28).

- 이동상에 포함된 acetic acid 농도를 0.05, 0.1, 0.2%로 변화시켜 실험하였을 때는 대체적으로 측정값이나 컬럼 효율에 있어서 큰 차이를 보이지 않았으나 phthalide 계열 물질인 senkyunolide A나 ligustilide의 경우 산의 농도가 0.2%일 때 이론단수가 더 증가하여 산성 조건에서 더 분리가 잘 됨을 알 수 있었다 (Table 29).
- 모든 데이터를 종합하였을 때 컬럼 오븐 온도, 컬럼 종류, 산 농도의 변화에 따라 분리능은 약간의 영향을 받았으나, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 정량에는 큰 영향을 주지 않았다.

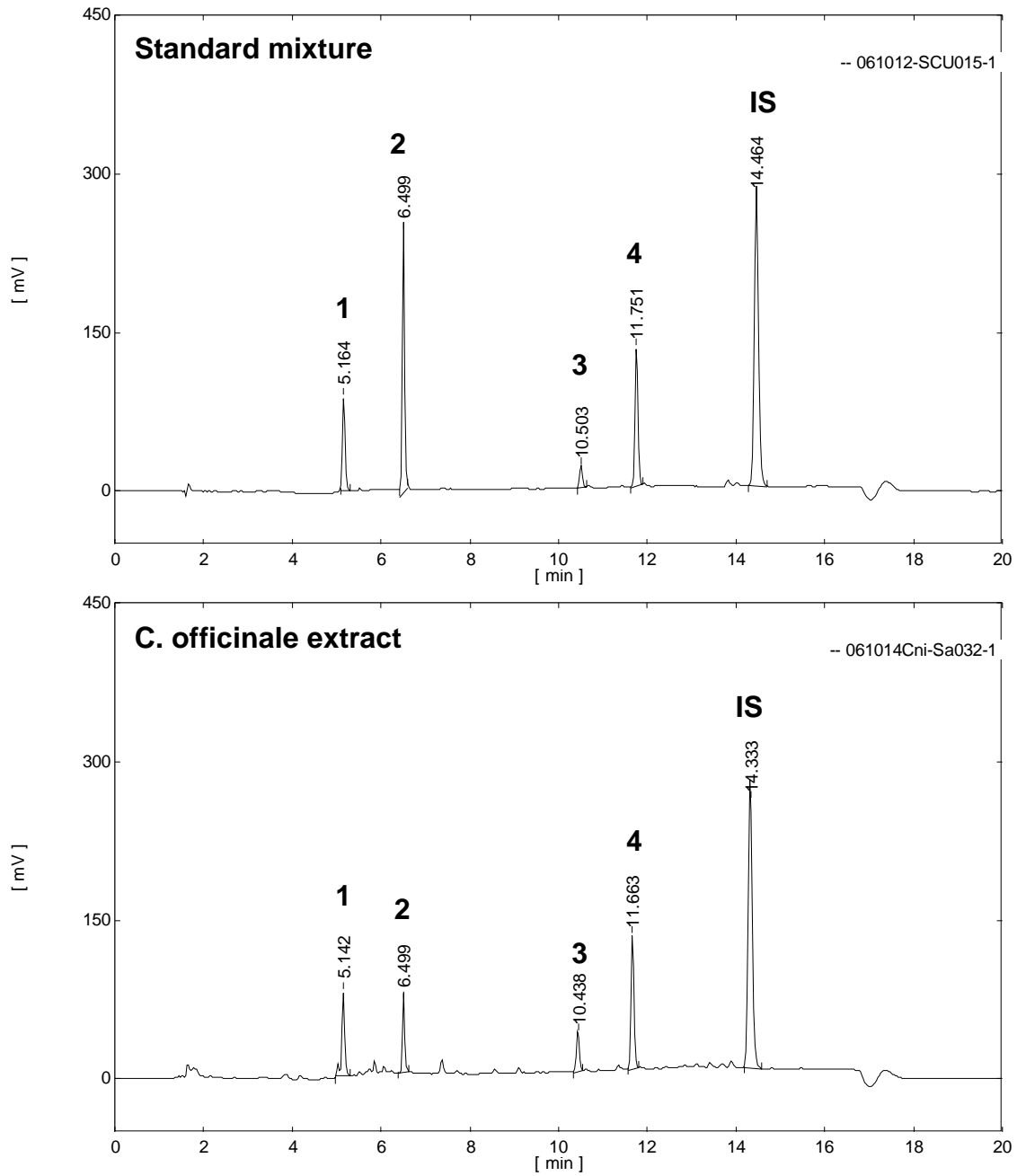


Figure 57. UV chromatograms for standard mixture and extract sample of *Cnidium officinale*. 1: chlorogenic acid, 2: ferulic acid, 3: senkyunolide A, 4: (Z)-liquistilide, IS: α -naphthoflavone.

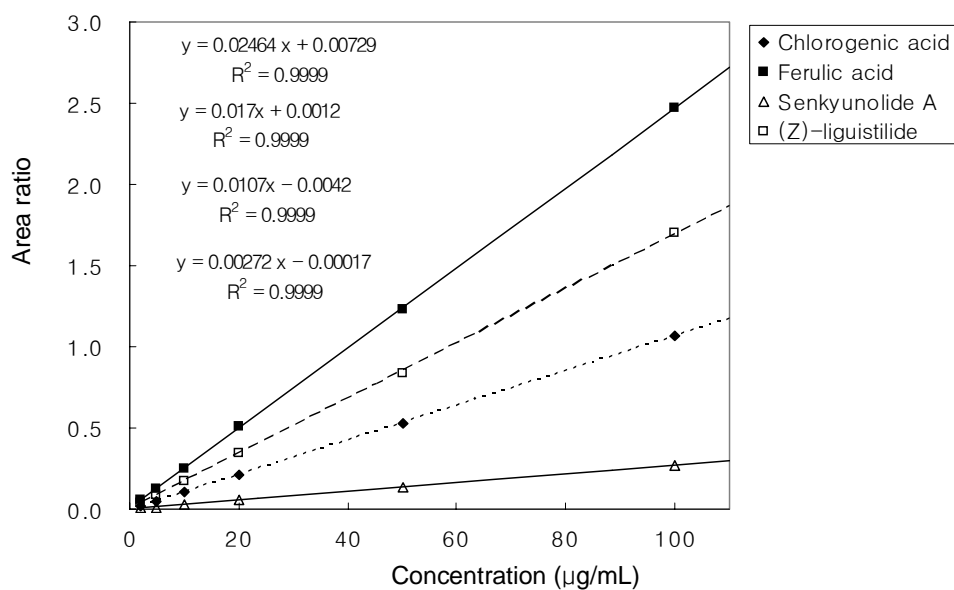


Figure 58. Calibration curves for chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide based on HPLC/UV method

Table 25. Intra-day accuracy and precision for the HPLC/UV method (n=5)

Compound	Nominal conc. (µg/mL)	Conc. found (µg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)
Chlorogenic acid	2	2.01±0.09	100.75	4.43
	20	20.20±0.15	101.06	0.72
	100	98.80±0.87	98.80	0.88
Ferulic acid	2	1.89±0.08	94.32	4.12
	20	20.54±0.31	102.70	1.53
	100	101.80±0.80	101.80	0.78
Senkyunolide A	2	1.99±0.09	99.56	4.58
	20	20.58±0.50	102.90	2.44
	100	101.01±1.01	101.01	1.00
Ligustilide	2	1.98±0.04	98.83	1.78
	20	20.14±0.29	100.70	1.43
	100	98.78±0.63	98.78	0.64

Table 26. Inter-day accuracy and precision for the HPLC/UV method (n=4)

Compound	Nominal conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. found ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy (%)	Precision (%)
Chlorogenic acid	2	2.03 \pm 0.07	101.45	3.60
	20	20.25 \pm 0.13	101.27	0.66
	100	101.33 \pm 3.16	101.33	3.12
Ferulic acid	2	2.02 \pm 0.10	99.43	5.08
	20	21.22 \pm 0.86	104.77	4.06
	100	100.04 \pm 4.08	98.72	4.08
Senkyunolide A	2	1.97 \pm 0.09	97.73	4.62
	20	20.82 \pm 0.46	98.10	2.22
	100	104.63 \pm 9.98	104.56	9.54
Ligustilide	2	2.07 \pm 0.11	104.96	5.37
	20	20.58 \pm 0.57	98.88	2.75
	100	101.59 \pm 6.08	97.09	5.99

Table 27. Robustness test: Effect of column oven temperature

Compound (50 $\mu\text{g/mL}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	W	K	AS	NTP
Chlorogenic acid	30	46.81 \pm 1.16	0.18	2.14 \pm 0.03	0.79 \pm 0.06	14404
	35	49.38 \pm 0.40	0.15	2.08 \pm 0.01	0.87 \pm 0.02	20005
	40	49.13 \pm 0.24	0.16	1.99 \pm 0.02	0.96 \pm 0.04	14938
Ferulic acid	30	51.94 \pm 0.17	0.14	2.99 \pm 0.04	0.89 \pm 0.06	38492
	35	49.83 \pm 0.81	0.13	2.89 \pm 0.01	0.86 \pm 0.12	38089
	40	51.75 \pm 0.58	0.13	2.85 \pm 0.02	0.78 \pm 0.04	37391
Senkyunolide A	30	50.58 \pm 1.90	0.15	5.28 \pm 0.08	0.86 \pm 0.13	82642
	35	50.30 \pm 0.86	0.15	5.27 \pm 0.03	0.80 \pm 0.09	79748
	40	50.54 \pm 1.61	0.15	5.18 \pm 0.02	0.83 \pm 0.07	78608
Ligustilide	30	48.15 \pm 1.87	0.15	6.02 \pm 0.09	0.91 \pm 0.10	102390
	35	49.41 \pm 0.35	0.15	6.02 \pm 0.03	0.86 \pm 0.03	98594
	40	49.35 \pm 0.32	0.15	5.90 \pm 0.02	0.92 \pm 0.12	98732

Data is represented as mean \pm S.D. (n=3). NTP: 이론단수, W: 피크너비, K: retention factor, AS: tailing factor.

Table 28. Robustness test: Effect of column

Compound (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Column	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	W	K	AS	NTP
Chlorogenic acid	Atlantis	49.38 \pm 0.40	0.15	2.08 \pm 0.01	0.87 \pm 0.02	20006
	Capcell	51.06 \pm 2.96	0.17	1.94 \pm 0.01	1.33 \pm 0.07	11936
Ferulic acid	Atlantis	49.83 \pm 0.81	0.13	2.89 \pm 0.01	0.86 \pm 0.12	38090
	Capcell	52.69 \pm 0.76	0.14	2.73 \pm 0.04	1.05 \pm 0.11	27158
Senkyunolide A	Atlantis	50.30 \pm 0.86	0.15	5.27 \pm 0.03	0.80 \pm 0.09	79749
	Capcell	48.69 \pm 2.98	0.16	4.82 \pm 0.03	0.94 \pm 0.10	48727
Ligustilide	Atlantis	49.41 \pm 0.35	0.15	6.02 \pm 0.03	0.86 \pm 0.03	98595
	Capcell	49.73 \pm 2.46	0.17	5.61 \pm 0.03	1.23 \pm 0.06	60558

Data is represented as mean \pm S.D. (n=3). NTP: 이론단수, W: 피크너비, K: retention factor, AS: tailing factor.

Table 29. Robustness test: Effect of acid concentration in mobile phase

Compound (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Acetic acid conc.(%)	Mean \pm S.D. (Measured conc.)	W	K	AS	NTP
Chlorogenic acid	0.05	44.55 \pm 1.25	0.14	2.10 \pm 0.01	0.93 \pm 0.14	21966
	0.1	45.28 \pm 0.29	0.13	2.06 \pm 0.03	0.89 \pm 0.11	22518
	0.2	49.35 \pm 2.43	0.13	2.08 \pm 0.01	0.90 \pm 0.07	23392
Ferulic acid	0.05	51.07 \pm 0.57	0.13	2.89 \pm 0.01	0.82 \pm 0.10	36599
	0.1	49.62 \pm 0.13	0.13	2.86 \pm 0.02	0.84 \pm 0.12	36687
	0.2	51.22 \pm 1.00	0.14	2.90 \pm 0.02	0.88 \pm 0.12	36711
Senkyunolide A	0.05	50.94 \pm 2.07	0.15	5.29 \pm 0.02	0.84 \pm 0.04	78904
	0.1	49.83 \pm 0.65	0.15	5.27 \pm 0.04	0.86 \pm 0.14	78007
	0.2	51.32 \pm 2.36	0.15	5.42 \pm 0.03	0.93 \pm 0.03	86013
Ligustilide	0.05	50.44 \pm 1.06	0.15	6.02 \pm 0.03	1.02 \pm 0.02	98900
	0.1	48.69 \pm 0.81	0.15	6.01 \pm 0.04	0.90 \pm 0.10	97519
	0.2	50.47 \pm 1.59	0.15	6.15 \pm 0.04	1.02 \pm 0.04	101914

Data is represented as mean \pm S.D. (n=3). NTP: 이론단수, W: 피크너비, K: retention factor, AS: tailing factor.

마. 천궁 추출물 시료 중 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide 함량 분석

- 위와 같이 개발된 LC/MS/MS와 HPLC/UV를 이용한 동시분석법에 의하여 각각 산지가 다른 15종 (한국산 10종, 중국산 5종)의 천궁 추출물 시료에 대하여 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 함량을 분석하였다. LC/MS/MS법을 이용하여 분석한 결과는 Table 30, 31과 같 으며, HPLC/UV를 이용한 결과는 Table 32, 33과 같다. 천궁 시료의 분석에 쓰인 senkyunolide A 표 준품의 경우 순도가 약 77%이었으므로, 이를 참조하여 보정한 후 senkyunolide A의 함량을 계산하였 다.
- HPLC/UV 결과를 바탕으로 분석 결과를 살펴보면, chlorogenic acid의 함량은 0.21-2.70%, ferulic acid는 0.15-0.45%, senkyunolide A는 1.78%-5.16%, (Z)-ligustilide는 0.50-2.72%로 각각의 함량은 천 궁 시료에 따라 조금씩 차이를 보였으나, 이 네 가지의 성분에 대해서는 중국산 천궁과 한국산 천궁, 또는 일천궁과 토천궁 사이에 대체로 유사한 함량 분포를 나타내었다.
- LC/MS/MS로 분석한 결과와 HPLC/UV로 분석한 결과는 약간의 차이는 있으나 대체적으로 유사한 결과를 보여 두 가지 분석법 모두 천궁의 품질 관리를 위한 유효 성분 분석에 적합할 것으로 사료된 다.

Table 30. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* extract based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Relative percentage of extract (%)_LC/MS/MS			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	2.12	0.40	1.96	2.48
C2	0.11	0.33	3.74	2.14
C3	0.17	0.39	3.02	2.66
C4	0.17	0.35	3.58	2.86
C5	1.43	0.36	3.36	2.72
K1	0.40	0.36	1.27	1.31
K2	0.67	0.71	3.26	1.30
K3	0.67	0.23	2.10	0.56
K4	1.11	0.53	2.58	1.28
K5	0.17	0.49	2.16	1.61
K6	0.29	0.36	2.84	1.26
K7	0.67	0.19	1.37	0.94
K8	0.83	0.34	1.49	0.82
K9	0.51	0.49	3.74	1.37
K10	0.57	0.26	1.35	0.99

Table 31. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* plant based on the results of LC/MS/MS analysis

Sample No.	Content in plant (mg/g plant)_LC/MS/MS			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	4.20	0.79	3.88	4.91
C2	0.38	1.13	12.72	7.28
C3	0.54	1.27	9.82	8.65
C4	0.66	1.40	14.21	11.35
C5	3.64	0.93	8.55	6.92
K1	1.11	0.99	3.53	3.63
K2	1.45	1.53	7.06	2.82
K3	1.96	0.67	6.16	1.65
K4	2.41	1.15	5.62	2.79
K5	0.42	1.23	5.41	4.04
K6	0.84	1.04	8.27	3.68
K7	2.35	0.66	4.78	3.30
K8	2.60	1.06	4.71	2.57
K9	1.76	1.69	12.90	4.73
K10	1.98	0.91	4.70	3.45

Table 32. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* extract based on the results of LC/UV analysis

Sample No.	Relative percentage of extract (%)_LC/UV			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	2.70	0.35	2.15	2.19
C2	0.25	0.35	3.91	1.73
C3	0.30	0.40	3.22	2.41
C4	0.21	0.42	3.62	2.28
C5	1.80	0.34	3.92	2.72
K1	0.57	0.33	1.37	1.17
K2	0.90	0.40	3.76	1.22
K3	0.78	0.15	2.22	0.50
K4	1.41	0.32	3.00	1.09
K5	0.34	0.45	2.42	1.27
K6	0.51	0.26	3.19	0.98
K7	0.89	0.25	1.54	0.73
K8	1.15	0.25	1.64	0.69
K9	0.70	0.37	3.97	1.00
K10	0.78	0.23	1.50	0.78

Table 33. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *C. officinale* plant based on the results of LC/UV analysis

Sample No.	Content in plant (mg/g plant)_LC/UV			
	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	5.35	0.69	4.26	4.33
C2	0.84	1.20	13.29	5.90
C3	0.96	1.30	10.47	7.83
C4	0.84	1.65	14.35	9.06
C5	4.58	0.87	9.97	6.93
K1	1.57	0.91	3.81	3.24
K2	1.95	0.86	8.15	2.64
K3	2.29	0.45	6.50	1.47
K4	3.07	0.70	6.53	2.37
K5	0.85	1.11	6.06	3.19
K6	1.47	0.75	9.30	2.86
K7	3.10	0.87	5.38	2.55
K8	3.62	0.79	5.16	2.16
K9	2.43	1.27	13.71	3.44
K10	2.70	0.81	5.24	2.70

바. HPLC/UV/MS를 이용한 천궁 추출물의 chemical profiling

- 천궁 추출물 성분의 chemical fingerprinting 방법의 확립을 위하여 HPLC/UV/MS를 이용하여 chemical profiling을 하였다. 270 nm에서 UV 흡수를 검출하고 동시에 mass detector를 이용하여 각 피크에 대한 m/z 값을 확인하였다. 천궁 추출물의 대표적인 UV chromatogram과 TIC를 Figure 59, 60에 나타내었으며 각 크로마토그램 상에 나타나는 peak에 대하여 retention time, m/z 값, UV 흡수 강도와 해당 m/z에 대하여 extraction하였을 때 나타나는 mass intensity 등을 정리하였다 (Table 34, 35). UV 크로마토그램과 TIC 상에 나타나는 peak의 패턴은 약간 차이가 있었으나 천궁의 주요한 유효 성분으로 여겨지는 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide 등의 peak은 UV 크로마토그램과 TIC에서 모두 확인할 수 있었다.
- 화합물 중에서는 UV 흡수가 없거나 미미한 경우가 있고 한편, LC/MS와 같이 soft ionization 조건에서 잘 이온화되지 않아 LC/MS 상에서는 잘 검출되지 않는 경우가 존재하므로, 한약재의 chemical profiling을 위하여 UV과 MS 데이터 서로 보완하여 사용하는 것이 유용할 것으로 사료된다.

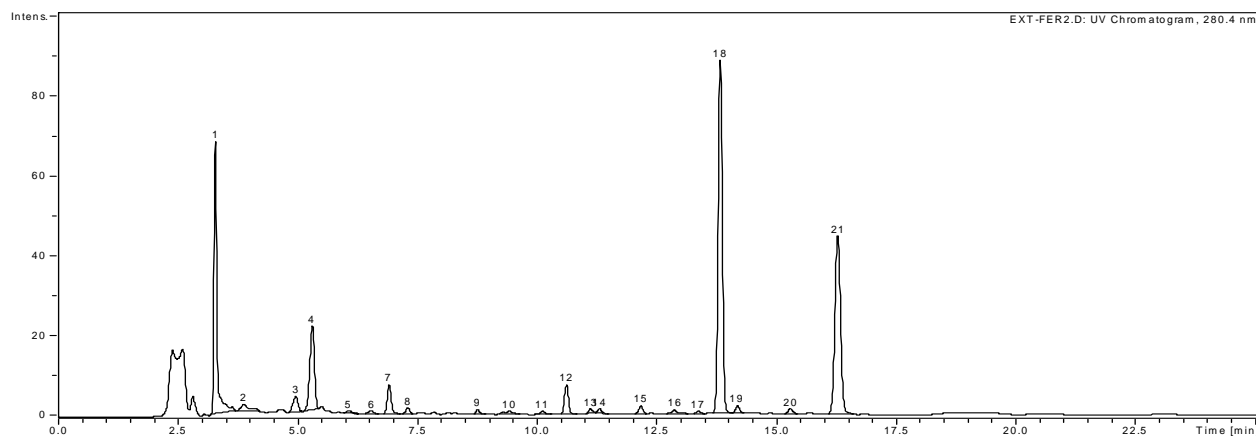


Figure 59. UV chromatogram of *Cnidium officinale* extract

Table 34. Compound profiling of *Cnidium officinale* extract based on UV chromatogram

Peak no.	RT (min)	m/z	Peak area	% Relative	Remark
1	3.3	355	291	18.9	Chlorogenic acid
2	3.9	369	13	0.8	
3	4.9	-	31	2.0	
4	5.3	195	141	9.1	Ferulic acid
5	6.1	211	6	0.4	
6	6.5	-	6	0.4	
7	6.9	207	41	2.7	
8	7.3	-	8	0.5	
9	8.7	-	5	0.3	
10	9.4	177	12	0.8	
11	10.1	-	7	0.5	
12	10.6	-	41	2.7	
13	11.1	-	6	0.4	
14	11.3	-	6	0.4	
15	12.1	439	11	0.7	
16	12.9	149	7	0.5	
17	13.4	-	4	0.3	
18	13.8	193	523	33.9	Senkyunolide A
19	14.2	304	10	0.6	
20	15.3	195	9	0.6	
21	16.3	191	365	23.7	(Z)-ligustilide

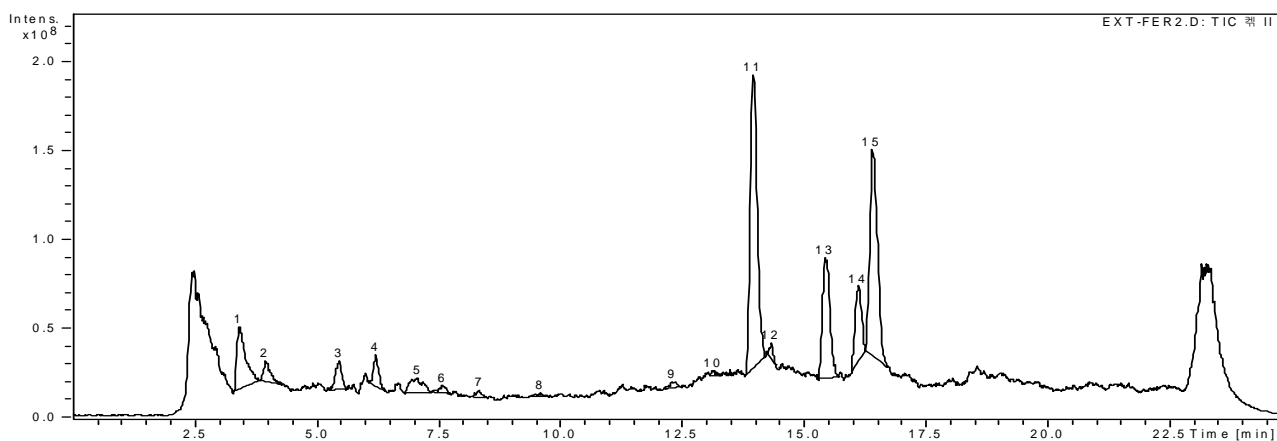


Figure 60. Total ion chromatogram (TIC) of *Cnidium officinale* extract

Table 35. Compound profiling of *Cnidium officinale* extract based on TIC

Peak no.	RT (min)	m/z	Peak area	% Relative	Remark
1	3.4	355	429622298	8.5	Chlorogenic acid
2	3.9	369	109879664	2.2	
3	5.4	195	141582453	2.8	Ferulic acid
4	6.2	211	124098987	2.4	
5	7.1	207	154490955	3.0	
6	7.6	313	41011741	0.8	
7	8.3	432	29824390	0.6	
8	9.6	177	18211291	0.4	
9	12.3	439	31946324	0.6	
10	13.1	149	19348949	0.4	
11	13.9	193	1597931613	31.5	Senkyunolide A
12	14.3	304	41275257	0.8	
13	15.4	195	701823761	13.8	Neocnidilide
14	16.1	217	389534835	7.7	
15	16.4	191	1250168460	24.6	(Z)-ligustilide

사. 천궁의 품질 관리를 위한 패턴 인식 분석법의 적용

- 천궁에 포함되어 있는 전체 성분에 대한 정보를 반영한 품질 관리법을 확립하기 위하여, 천궁 추출물 시료를 HPLC/UV와 LC/MS로 분석한 뒤 얻어진 UV 크로마토그램과 TIC에 대하여 패턴 인식 분석을 수행하였다. 패턴 인식 분석법으로서 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하고, 패턴 분석 결과를 수치화하기 위하여 각 시료 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다 (Figure 61과 62, Table 36).
- 먼저, HPLC/UV로 15종의 천궁 시료를 분석한 후 얻은 UV 크로마토그램 상에서 공통적으로 검출되어지는 10개의 peak를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였으며, 다음으로 15종의 천궁 추출물 시료의 total mass data를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였다. Figure 61의 PC score plot을 보면, 중국산 시료와 한국산 시료 사이에 분리된 cluster가 형성됨을 알 수 있다. Chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 네 가지 성분에 대한 분석 결과에서는 한국산과 중국산 천궁 시료사이에 큰 함량 차이를 보이지 않았으나 패턴 인식 분석 수행 시 한국산과 중국산 시료 간에는 확연한 차이를 나타내었으며, 0.6이하의 SI 값을 보였다. 이는 한국산과 중국산 천궁이 전체적인 성분 프로파일에서는 뚜렷한 차이가 있음을 시사한다. 한편 토천궁 (K2-K4, K6-K10)과 일천궁 (K1, K5) 사이에는 큰 차이를 나타내지 않아 현재 국내에서는 토천궁과 일천궁의 학명이 혼용되어 사용되고 있음을 시사했다. 중국산 천궁의 경우 중국 약진품으로 알려진 C2, C3, C4의 각 point는 PC score plot에서 매우 근접하게 위치하였으며 이들 시료는 0.89-0.96의 높은 SI값을 가져 이들 시료간의 유사성이 매우 높음을 알 수 있었다. UV data를 이용한 주성분 분석 결과와 total mass data를 사용한 주성분 분석 결과를 비교할 때 약간의 차이는 있었으나, 비슷한 양상을 띠고 있었으며, 두 경우 모두 한국산 천궁과 중국산 천궁 시료는 확연히 구분되었다

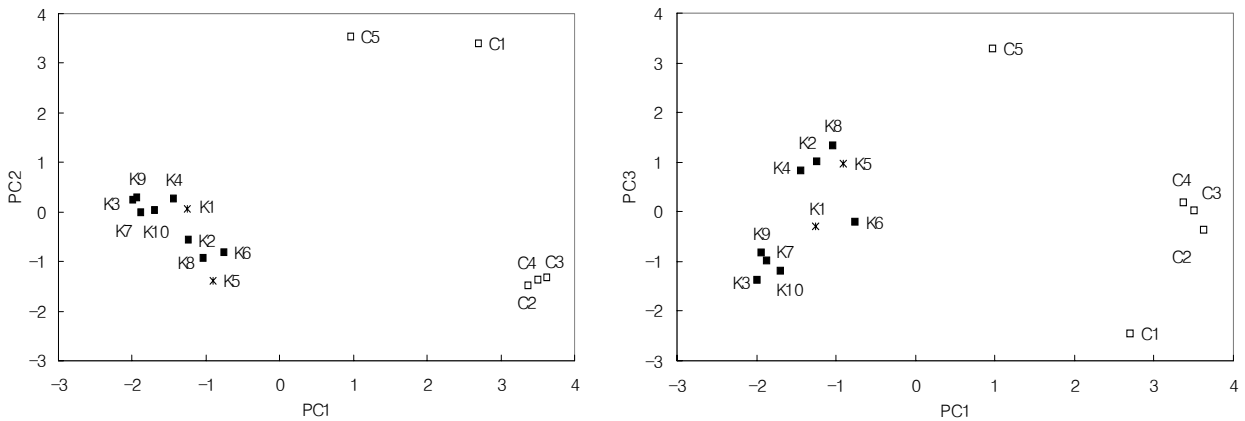


Figure 61. PC score plots for UV data of *Cnidium officinale* extract

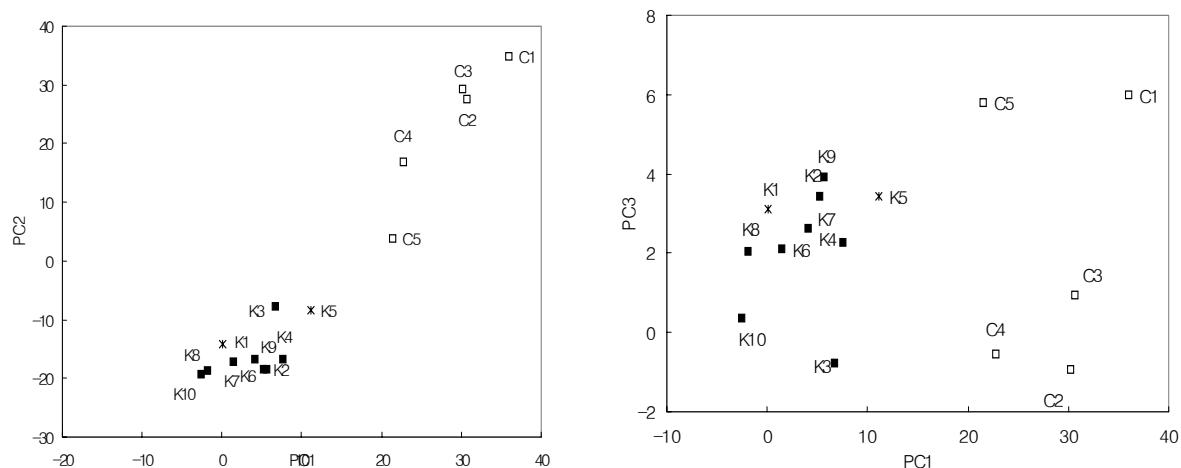


Figure 62. PC score plots for total mass data of *Cnidium officinale* extract

Table 36. Similarity index for *Cnidium officinale* extract

	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	C1	C2	C3	C4	C5
K1	1.000	0.841	0.628	0.804	0.803	0.718	0.805	0.826	0.747	0.759	0.605	0.596	0.561	0.573	0.574
K2		1.000	0.713	0.918	0.831	0.787	0.806	0.940	0.794	0.787	0.598	0.630	0.595	0.612	0.645
K3			1.000	0.680	0.610	0.658	0.811	0.687	0.818	0.823	0.543	0.416	0.397	0.402	0.456
K4				1.000	0.786	0.753	0.766	0.868	0.803	0.743	0.667	0.593	0.568	0.575	0.691
K5					1.000	0.750	0.704	0.832	0.665	0.650	0.520	0.683	0.667	0.679	0.608
K6						1.000	0.733	0.800	0.694	0.680	0.690	0.704	0.672	0.682	0.553
K7							1.000	0.794	0.918	0.928	0.589	0.476	0.454	0.460	0.494
K8								1.000	0.752	0.740	0.571	0.648	0.596	0.613	0.642
K9									1.000	0.930	0.615	0.454	0.434	0.440	0.525
K10										1.000	0.591	0.457	0.436	0.442	0.479
C1											1.000	0.669	0.642	0.637	0.603
C2												1.000	0.891	0.921	0.647
C3													1.000	0.962	0.711
C4														1.000	0.696
C5															1.000

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 연구

- 본 연구에서 음양곽으로부터 유효 성분을 분리하기 위해 다양한 분리 정제 방법을 사용하여 현재까지 구조분석이 완료된 화합물 10종 및 구조분석이 진행 중인 화합물 5종을 분리했다. 음양곽 MeOH 추출물의 Ethyl acetate 분획물의 경우, 황산발색 결과를 보면 대부분의 물질들이 flavonoid 계열임을 확인할 수 있었으며, 극성과 분자량의 차이가 크지 않은 flavonoid 계열의 물질들이 다양하게 함유되어 있을 것으로 생각된다. 특히 음양곽 내의 flavonoid 들은 주로 prenylflavonoid 모핵으로 대부분의 flavonoid들이 pernylflavonoid 모핵 중 4' 탄소에 hydroxy group이나 methoxy group이 위치하거나 그리고 3번과 7번 탄소위치에 존재하는 hydroxy group에 결합되어 있는 당의 종류와 숫자가 다른 glycosylated flavonoid가 대부분의 다양한 음양곽의 flavonoid를 구성하고 있다. 음양곽 70% ethanol 추출물을 HPLC-UV 분석을 하였을 때 6.5-8.1분 사이에 많은 peak가 모여 있는 양상이 나타나고 있어 구조상의 유사성을 뒷받침하고 있다.
- 특히 음양곽 추출물 내의 icariin 함유량이 높아서 다른 물질을 분리 정제하는데 장애 요인이 되기도 하였다. 현재 CHCl₃ 분획물에 대한 분리 정제 작업도 계속 진행 중이므로 보다 많은 유효성분들의 분리가 가능할 것으로 생각되어진다.
- 음양곽의 과학적 품질 관리를 위하여 LC/MS, HPLC를 이용하여 유효 성분의 동시 분석법을 확립하였으며, LC/UV/MS를 통해 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 수행하고 이를 바탕으로 패턴인식분석법을 적용시킨 음양곽의 품질 관리법을 제시하였다.
- 음양곽 유효 성분의 동시 분석법 연구는 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin 등의 5종의 flavonoid glycoside 화합물에 대하여 수행하였다. 이들 화합물은 모두 양호한 UV 흡수성을 보임으로 HPLC/UV법에 의한 분석이 비교적 용이하였다. 또한 MS detector에서도 잘 이온화되어 MRM mode를 이용한 분석도 가능하였다. Epimedin A, epimedin B, epimedin C의 세 화합물의 경우 구조가 상당히 유사함에도 불구하고 본 연구에서 확립된 HPLC 조건에서 비교적 잘 분리되었다. LC/MS/MS로 분석할 경우 HPLC에 비해서 peak shape은 좋지 않았으나, 약 5분 정도의 짧은 시간 안에 5개의 화합물이 모두 검출됨으로써 신속한 분석이 가능하였다. 기존의 음양곽 분석법이 주로 icariin을 포함하는 한두가지의 flavonoid glycoside만을 분석하는데 그쳤으나 본 연구법은 음양곽의 주요 활성 성분인 5가지의 flavonoid glycoside 화합물에 대한 동시 분석이 가능하였으며, 이것은 음양곽의 품질관리를 위한 유효 성분 분석법에 활용될 수 있을 것이라 기대된다.
- LC/UV/MS를 통한 chemical profiling을 통하여 음양곽의 대표적인 약효 물질인 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin을 포함한 전체 성분에 대한 UV흡수 패턴과 mass profile을 분석하였다. 각peak에 대한 identification이 뒤따라야 할 것이나, 이 분석 결과는 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 위한 데이터 베이스로 이용될 수 있을 것이다. 음양곽 추출물에 대한 total ion chromatogram을 이용하여 전체 성분 프로파일에 대하여 패턴인식분석법을 적용하였다. 그 결과 산지나 성분 프로파일에 따라 각 추출물 시료가 구분되었으며 SI 값을 통해 각 시료간의 유사성을 확인할 수 있었다. 주성분 분석 결과나 SI 결과에는 hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin 의 유효 성분의 함량 차이도 뚜렷이 나타났다. 본 연구의 결과를 토대로 할 때, 표준 음양곽 시료가 설정된다면, 음양곽 한약재 표준품과의 SI값을 통하여 음양곽의 품질 관리에 이용할 수 있을 것이라 사료된다.

4.2 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 연구

- 천궁의 유효성분은 현재까지 butyl phthalide류의 정유성분으로 알려져 있다. 그러나 이들 성분은 정도의 차이는 있더라도 모두 액체로서 공기와 접하게 되면 분해하게 된다. 본 연구과제의 초기 단계에서는 그런 사실을 인식을 못하여 물질 분리에 많은 어려움이 있었다. 물질 분리가 원활하지 못하여 전체적인 연구 진행이 늦어지게 되었다.
- 한편 생약의 지표물질이란 측면에서 보자면 실제로 약물을 복용하기 위하여 전제를 만들 때 오랜 시간 끓이는 것이 일반적인데, 그러면 천궁의 정유성분과 같은 불안정한 화합물은 모두 분해되고 말 것이기 때문에 그러한 물질로 지표물질을 정하는 것은 의미가 없어질 것이다. 따라서 생약의 제제화를 고려한 유효성분의 추적과 그에 따른 지표물질의 선정을 제안코자 한다.
- 천궁의 경우 정유성분은 생약 자체 또는 엑기스 상태로 다른 물질과 섞여 있는 경우는 그 안정성이 확보되거나 순수한 상태로 단독으로 분리가 될 경우는 극히 불안정한 상태로 된다. 따라서 column chromatography의 단계부터는 농축 등 모든 조작을 질소 기류 하에서 행함으로써 공기 중의 분해를 막을 수 있었다. 단일 성분의 보관, 표준 시료의 제공 시에는 물질을 일정한 농도로 용매에 녹인 후 ampule에 밀봉하여 행하였다.
- 현재 butyl phthalide 계열의 정유 성분 5종과 phenylpropanoid 화합물 2종을 분리하였는데 연구 종료까지는 10종 이상의 정유성분을 분리할 수 있을 것으로 본다.
- 본 연구에서는 천궁의 과학적 품질 관리를 위하여 LC/MS, HPLC를 이용하여 유효 성분의 동시 분석법을 확립하였으며, LC/UV/MS를 통해 음양곽 성분의 chemical fingerprinting을 수행하고 이를 바탕으로 패턴인식분석법을 적용시킨 천궁의 품질 관리법을 제시하였다.
- 천궁의 경우 음양곽과는 달리 유효 성분으로 다양한 계열의 화합물을 함유하고 있었다. 따라서 특정 계열의 성분이 아닌 UV 크로마토그램상에서 주성분으로 나타나는 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4종의 성분에 대하여 동시 분석법 연구를 수행하였다. 이들 화합물은 대체로 양호한 UV 흡수성을 보이고 크로마토그래피에서 peak간 분리도 잘 되어 HPLC/UV법에 의한 분석이 비교적 용이하였다. 그러나 MS detector에서는 각 성분에 따라 이온화도와 이동상 완충액의 종류에 따른 mass의 response에 큰 차이를 나타냈다. 특히 ferulic acid의 경우 MS detector에서의 response가 좋지 않아 다른 화합물에 비해 저농도에서의 검출이 어려웠다. Phthalide계 물질인 senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 경우 열에 매우 불안정하였으며, 상대적으로 UV 흡수가 낮았다. 기존의 천궁 분석법은 주로 특정 계열 성분의 한 두가지 물질만을 분석하는데 그쳤으나 본 연구법은 천궁의 주요 약효 성분으로 기대되는 다양한 계열의 성분에 대한 동시 분석이 가능하였으며, 이것은 천궁의 품질관리를 위한 유효 성분 분석법에 활용될 수 있을 것이라 기대된다.
- LC/UV/MS를 통한 chemical profiling을 통하여 천궁의 대표적인 성분인 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide을 포함한 전체 성분에 대한 UV흡수 패턴과 mass profile을 분석하였다. 각 peak에 대한 identification이 뒤따라야 할 것이나, 이 분석 결과는 천궁 성분의 chemical fingerprinting을 위한 데이터 베이스로 이용될 수 있을 것이다. 천궁 추출물에 대한 total ion chromatogram과 UV 크로마토그램을 이용하여 전체 성분 프로파일에 대하여 패턴인식분석법을 적용하였으며 SI 값을 통해 시료 간 유사성을 확인하였다. HPLC 또는 LC/MS를 이용한 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 4 가지 성분에 대한 분석 시에는 산지 간의 차이가 거의 나타나지 않았으나, 패턴인식분석법을 적용한 결과 산지 (한국산과 중국산)에 따라 각 추출물 시료가 확연히 구분되었으며 국내산과 중국산 천궁 시료 간의 SI 값은 0.6 이하의 낮은 값을 보였다. 본 연구의 결과를 토대로 할 때, 패턴 분석법의 적용은 유효 성분 분석의 결과를 보완하여 천궁

한약재의 품질 관리에 효과적으로 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

제5장 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

세부과제명	천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 분석법 개발
세부과제책임자	박영인 / 고려대학교 / 생물화학

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1	Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of five flavonoid glycosides in Herba <i>Epimedium</i>	Nurul M. Islam, 유혜현, 이민우, 동미숙, 박영인, 정하숙, 김동현	<i>Phytochemical analysis</i>	submitted		1.398	국외	SCI
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	LC/MS의 한약재 품질관리 응용	심포지엄 구두 발표	유혜현	한국질량분석학회	2006.8.24		국내
2	High-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of four ingredients, chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide from <i>Cnidium officinale</i> extract	포스터 발표	유혜현, Nurul M. Islam, 임선영, 동미숙, 박영인, 정하숙, 김동현	대한약학회	2006. 11.6		국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

※ 임상시험, 관련 DB구축, 워크샵 또는 심포지움 개최 등의 경우 구체적으로 기술함.

5.2 활용계획

제6장 기타 중요변경사항

◦처음 선정 시와 비교하여 변경된 내용을 명시

제7장 참고문헌

- 강삼식, 김주선, 강윤정, 한혜경. 음양곽의 성분에 관한 연구 (II). 삼지구엽초의 지하부의 성분. *생약학회지* 21(1), 56-59 (1990)
- 강삼식, 신국현, 정순간, 조의환. 음양곽의 flavonoid 성분에 관한 연구. *생약학회지* 19(2), 93-96 (1988)
- 강삼식, 김주선. 삼지구엽초 flavonoid glycoside의 계절적 변동. *생약학회지* 22(2), 85-90 (1991)
- 김호경, 이혜원, 황성원, 고병섭. 음양곽으로부터 icariin의 분리 및 함량분석. *생약학회지* 32(1), 43-48 (2001)
- 신국현, 강삼식, 정순간, 조의환. 고속액체크로마토그래피에 의한 음양곽 중 Icariin의 정량. *생약학회지* 20(1), 21-24 (1989)
- 이숙연, 김명진, 임동술, 지형준, 김현수. 토천궁과 일천궁의 Phthalide류 성분비교. *생약학회지* 21(1), 69-73 (1990)
- Jin XJ, Li XP, Liu ZQ, Zhao B. Identification of *Epimedium Koreanum Nakai* by Fourier transfer infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 26(4), 614-616 (2006)
- Kobayashi, M., Fujita, M. and Mitsushashi, H.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XV. Constituents of *Cnidium officinale*: Occurrence of pregnenolone, coniferylferulate and hydroxyphthalides, *Chem. Pharm. Bull.*, 1987, 35(4), 1427-1433.
- Lu, G.-H., Chan, K., Liang, Y.-Z., Leung, K., Chan, C.-L., Jiang, Z.-H. and Zhao, Z.-Z., *Journal of Chromatography A*, 2005, 1073, 383-392.
- Mitsushashi, H. and Nagai, U.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants - VII. Structure of ligustilide. 2: *Tetrahedron*, 1963, 19, 1277-1283.
- Mitsushashi, H., Nagai, U. and Muramatsu, T.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. III. Structure of ligustilide, *Chem. Pharm. Bull.*, 1961, 115-119.
- Mitsushashi, H., Nagai, U., Muramatsu, T. and Tashiro, H.: Studies on the constituents of Umbelliferae plants. II. Isolation of the active principles of *Ligusticum* root, *Chem. Pharm. Bull.*, 1960, 243-245.
- Momoda, M., Ohara, N., Gonda, R., Shimizu, N., Takada, K., Satoh, Y. and Shirai, S.: An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of *Cnidium officinale*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40(11), 3025-3029.

- Park, Y.-K.: The study on antioxidative effects and quality comparison of *Ligusticum chuanxiong* and *Cnidium officinale*(I), *Kor. J. Herbology*, 1998, 12(2), 103-114.
- Sha M, Cao A, Yang S, Xue Y. Determination of icariin in *epimedium koreanum nakai* by high performance liquid chromatography. *Se Pu* 15(2), 166-167 (1997)
- Tomoda M, Ohara N, Gonda R, Shimizu N, Takada K, Satoh Y, Shirai S. An acidic polysaccharide having immunological activities from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 40(11), 3025-3029 (1992)
- Tomoda M, Ohara N, Shimizu N, Gonda R. Characterization of a novel heteroglucan from the rhizome of *Cnidium officinale* exhibiting high reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities. *Biol Pharm Bull*. 17(7), 973-976 (1994)
- Tomoda, M., Ohara, N., Shimizu, N. and Gonda, Y.: Characterization of a novel glucan, which exhibits reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities, from the rhizome of *Cnidium officinale*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, 42(3), 630-633.
- Tsukamoto T, Ishikawa Y, Miyazawa M. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem*. 53(14), 5549-5553 (2005)
- Wang S, Wu Y, Ju Y, Chen X, Zheng W, Hu Z. On-line concentration by field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles in micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of flavonoids in *Epimedium brevicornum Maxim.* *J Chromatogr A*. 1017(1-2), 27-34 (2003)
- Yamagishi, T. and Kaneshima, H.: Constituents of *Cnidium officinale* Makino. Structure of senkyunolide and gas chromatography-mass spectrometry of the related phthalides, *Yakugaku Zasshi*, 1977, 97(3), 237-243.
- Yan, R., Li, S.-L., Chung, H.-S., Tam, Y.-K. and Lin, G.: Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong Hort.* by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, 87-95.
- Yi, T., Leung, K. S.-Y., Lu, G.-H., Chan, K. and Zhang, H.: Simultaneous qualitative and quantitative analyses of the major constituents in the rhizome of *Ligusticum chuanxiong* using HPLC-DAD-MS, *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, 54(2), 255-259.

제8장 첨부서류

- 분석법 (약전용)

음양곽과 천궁 추출물에 대한 분석법을 첨부하였음.

음양곽

정량법

이 약의 가루 약 1 g을 정밀하게 달아 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 30 분간 가열하고 식힌 다음 여과한다. 잔류물에 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 희석시킨 메탄올(7→10)을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린의 각 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 한 다음 이 액 5 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 에탄올(7→10)을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 또는 이카린의 각 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

$$\text{하이페로사이드 (C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{)의 양 (mg)} = \text{하이페로사이드표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 A (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{)의 양 (mg)} = \text{에피메딘 A표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 B (C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{18}\text{)의 양 (mg)} = \text{에피메딘 B표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{에피메딘 C (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}\text{)의 양 (mg)} = \text{에피메딘 C표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{이카린 (C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}\text{)의 양 (mg)} = \text{이카린표준품의 양 (mg)} \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 260 nm)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 25 cm인 스테인레스 강관에 입자 크기가 5 μ m인 액체크로마토그래프용옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한다.

칼럼 온도 : 35 $^{\circ}$ C 부근의 일정 온도

이동상 : (A) 희석시킨 포름산 (1→1000), (B) 희석시킨 포름산 (1→1000) · 아세트니트릴 혼합액 (10 : 90)

이동상 조성 : 이동상의 용리는 다음과 같은 기울기 용리 조건을 이용한다.

Time (min)	%A	%B
0	75	25
12	50	50
15	15	85
20	15	85
22	75	25
30	75	25

유량 : 1 mL/min

시스템 적합성

시스템의 성능 : 이카린, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C 표준품 및 하이페로사이드의 각 표준품 1.0 mg을 메탄올을 넣어 녹여 20 mL로 한다. 이 액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

시스템의 재현성 : 표준액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 6회 반복하여 주입할 때 하이페로사이드, 에피메딘 A, 에피메딘 B, 에피메딘 C, 이카린 각각의 피크면적의 상대표준편차는 1.5% 이하이다.

천궁

정량법

이 약의 가루 약 1 g을 정밀하게 달아 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 30 분간 가열하고 식힌 다음 여과한다. 잔류물에 희석시킨 에탄올(7→10) 40 mL를 넣어 같은 방법으로 조작한다. 여액을 모두 합하여 희석시킨 메탄올(7→10)을 넣어 정확하게 100 mL로 하여 검액으로 한다. 따로 클로로제닉산, 페룰릭산, senkyunolide A, (Z)-ligustilide의 각 표준품 약 10 mg을 정밀하게 달아 메탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 한 다음 이 액 5 mL을 정확하게 취하여 희석시킨 에탄올(7→10)을 넣어 정확하게 20 mL로 하여 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 클로로제닉산, 페룰릭산, senkyunolide A, 또는 (Z)-ligustilide의 각 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

$$\text{클로로제닉산 (C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}\text{)의 양 (mg) = 클로로제닉산표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{페룰릭산 (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{20}\text{)의 양 (mg) = 페룰릭산표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{Senkyunolide A (C}_{38}\text{H}_{48}\text{O}_{18}\text{)의 양 (mg) = Senkyunolide A표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

$$\text{(Z)-ligustilide (C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_{19}\text{)의 양 (mg) = (Z)-ligustilide표준품의 양 (mg) } \times \frac{A_T}{A_S} \times \frac{1}{4}$$

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)

칼럼 : 안지름 4.6 mm, 길이 15~25 cm인 스테인레스 강관에 입자 크기가 5 μ m인 액체크로마토그래프용옥타데실실릴화한실리카겔을 충전한다.

칼럼 온도 : 35 $^{\circ}$ C 부근의 일정 온도

이동상 : (A) 희석시킨 초산 (1→1000), (B) 희석시킨 초산 (1→1000) · 아세토니트릴 혼합액 (10 : 90)

이동상 조성 : 이동상의 용리는 다음과 같은 기울기 용리 조건을 이용한다.

Time (min)	%A	%B
0	80	20
2	80	20
4	45	55
10	15	85
14	15	85
15	80	20
20	80	20

유량 : 1 mL/min

시스템 적합성

시스템의 성능 : 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide 표준품 1.0 mg을 각각 메탄올을 넣어 녹여 50 mL로 한다. 이 액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide의 순서로 유출하고 각각의 피크가 완전하게 분리된다.

시스템의 재현성 : 표준액 10 μ L를 가지고 위의 조건으로 6회 반복하여 주입할 때 클로로제닉산, 페룰릭산, 센큐놀라이드 A, (Z)-ligustilide 각각의 피크면적의 상대표준편차는 1.5% 이하이다.

제2세부연구개발과제 연구결과

세부과제명 : 유전자칩을 활용한 천궁과 음양곽 생리활성 성분의 효능유전자 검증연구

세부과제책임자 : 동미숙/고려대학교

제 1 장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 목표

1.1 세부연구개발과제의 목표

가. 최종 연구 목표

- 본 과제에서는 유효성분 중심의 한약재 관리를 위하여 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 효능을 예측하고자 유전자칩 기반의 activity oriented screening system을 이용하여 천궁과 음양곽의 분획물질 및 단리물질들의 약리 효능 유전자를 찾아 약리유전자 database를 구축하고, 이를 활용한 효능정보처리시스템(software)을 구축함을 최종목표로 한다.

나. 연구배경 및 목적

- 생약(한약)은 인류의 시작과 더불어 우리 식생활에 중요한 몫을 차지하는 한편 우리 민족의 전통의 학으로 질병을 치료하거나 예방하는데 사용되어져 왔다. 생약의 효능 및 효과는 과거에는 경험적 판단에 의해 사용되었지만 현대에는 과학기술의 발달로 약리효과를 나타내는 유효성분의 확인 등 과학적인 확실한 근거가 입증됨에 따라 관리방법 또한 변화하고 있다.
- 1990년대 들어서면서 국민소득의 지속적인 증가(1995년도 1만불)와 노인인구의 증가 그리고 각종 환경문제의 대두 등 과거에 비해 국민들이 삶의 질적인 측면을 중시하는 사회적 분위기가 조성되다. 이에 비례하여 건강의 중요성에 대한 인식이 각인되었고 각종 건강관련사업들이 폭발적으로 증가하게 되었으며, 이에 따른 한약재에 대한 관심이 고조되고 있다.
- 한편으로 신약개발분야는 생명과학의 종합학문으로 저개발 국가에서는 하기 힘든 선진국형 고부가 가치를 지니는 산업으로 많은 화합물 보유하고 있지 못한 우리나라 뿐 아니라 선진국에서도 신약개발 분야에서도 다양한 구조의 화합물을 포함하고 있으며, 오랜 기간동안 민간요법에 사용해 왔던 한약재로부터 물질을 분리하거나 추출분획들의 약리작용을 검증함으로써 새로운 신약으로 개발하려는 노력이 많이 되고 있다.
- 실제로 <http://clinicaltrials.gov/>에서 복합제를 포함하여 33종의 herbal medicine이 clinical trial에 진입한 것으로 보고되고 있다. 전통적으로 herbal medicine이 강한 중국, 일본 및 독일 등을 중심으로 천연물 신약을 비롯하여 다양한 건강기능식품으로 개발하기 위하여 천연물에 대한 활발한 연구가 진행되고 있으며, 아울러 herbal medicine의 표준화를 위한 다양한 시도가 진행되고 있다.
- 우리나라에서도 보건복지부에서는 우수 한약재 및 한약에 대한 체계적인 관리를 위해 ‘우수한약관리 기준’(GAP, GMP, GSP)을 마련하고 또한 주요한약 250 여품목에 대해 정품 개념을 도입, 표준한약을 만드는 한편 한방의료기관 등에서 판매되는 한약에 대한 품질조사도 실시하는 등 다양한 시도를 하고 있다. 그리고 허준의 동의보감을 비롯한 방약합편, 한약집성방, 광제비급, 제중신편, 약성가, 사상 의학, 의학입문, 경약신서, 수세보원, 본초강목, 한약조제지침서 등 보건복지부 고시 12종의 기성한약서 처방에 대하여 안전성·유효성을 면제하고 있어, 제조업체들은 이들을 현대화해서 산업화를 추진하고 있다.
- 그러나 한약재는 생산지, 토양, 채취시기, 재배조건 등에 따라 품질차이가 현저하고, 이를 가열하고 추출하는 과정에서 주요 성분의 함량차이가 있다. 동일 품목이더라도 규격이 떨어진다거나 검증되지 않은 유사기원의 원료를 사용한다면 약효가 없거나 부작용이 발생할 수도 있다. 따라서 한약재들에 대하여 다양한 과학적인 실험을 통하여 규격 및 약효 등을 제시함과 동시에 체계적인 관리가 절실히



Figure 1. Pictures of *Epimedium Koreanum Nakai* and *Cnidium officinale Makino*

요구된다.

- 우리나라는 대한약전과 생약규격집에 의하여 대부분의 한약재들이 관리되고 있다. 한약재들은 주로 각 한약재의 약효를 얻기 위하여 단독으로 혹은 여러 한약재를 섞어서 사용되고 있으나 이들 공정서에는 주로 한약재의 외형상의 이화학적인 특징, 총 회분량이나 한두가지의 지표물질들을 기준으로 하여 생약들을 구분하고 있어, 한약재들의 약리작용 물질과는 관계없이 구분되어 있다. 따라서 한약재들의 약리작용물질에 대한 분리 및 이들의 다양한 약리작용에 대한 연구를 통하여 한약재에 대한 약리 작용 및 품질의 가이드라인을 제시하는 것이 매우 필요하다.
- 음양곽 (淫羊藿, *Epimedium Koreanum Nakai*)은 삼지구엽초, 선령비라고도 하며 다년생 초본으로 주로 전초를 말려 약용으로 사용한다. 주로 강장(强壯), 강정(强精), 진정, 건망 등의 약리작용을 갖고 있으며, 한방제제에서는 이선탕, 장양단, 선령비산 등에 사용한다. 민간에서 강장, 강정 목적으로 전제로 하여 복용하며, 음양곽 추출물은 중국을 비롯한 여러 나라에서 말기부전에 판매하고 있다. 음양곽의 지표물질은 flavonoid계 물질인 icariin으로 그 외에 icaraside, Epimedin A & B (flavonoid glycoside), des-O-methylcariin(flavonoid), (-)-olivil, (-)-olivil-4'-B-D-glucopyranoside, icariresinol, icariresinol-4'-B-D-glucopyranoside(lignan) magnoflorine(alkaloid) 등이 밝혀졌다.
- 천궁 (川芎, *Cnidium officinale Makino*)은 미나리과 (Umbelliferae)의 다년생 초본의 덩어리 형태로 된 줄기뿌리로 궁궁이, 일천궁이라고도 한다. 천궁은 짙은 방향을 풍기며, 한방에서는 보혈, 활혈, 정혈제로 부인병에 많이 쓰는 대표적인 약재이며, 진통, 진정제로도 효과가 우수하여 두통, 어지럼증, 빈혈 등에 쓰고 강장약으로도 효과가 뛰어나 쌍화탕, 십전대보탕, 천국다조산, 궁귀교애탕, 궁귀과립 등 한방제제에 널리 사용되고 있다. 대표적인 물질은 정유성분인 ligustilide, ligustilidiol, butylidenephthalide(Z-form), butylphthalide 외에 adenosine cnidilide, falcariindiol, falcarnalone, pregnolone, ferulic acid, chlorogenic acid, vanillin, apiol, coniferyl ferulate, neocnidilide, isocnidilide, senkyunolide B-I 등 다수의 단일물질들이 보고되어 있다.
- Post-genome 시대에 들어서 생명체들의 유용한 정보를 이용하는 산업분야는 생명체 기원에 대한 정보를 얻게 하고 나아가 인간을 질병으로부터 해방시킬 수 있는 가장 유력한 방법으로 제시되어지고 있다. DNA chip은 지금까지 알지 못했던 유전자들의 상호 연관성을 규명하는 실험적 수단으로 최근에 개발된 유전정보를 분석할 수 있는 여러 방법 중 가장 주목받고 있는 방법이다.
- 최근 발달한 DNA chip을 이용한 다양한 연구는 의약학을 포함한 독성학, 생물학의 다양한 분야에서 새로운 지평을 열었다. 특히 질병과 관련된 병인 규명, 신약개발을 위한 target 개발, 염기서열 해석 (Genotyping), 돌연변이 및 다형의 검출 (Detection of mutation/polymorphism), 질병의 진단 (Disease diagnosis) 등의 의약학 분야, 약물에 의한 독성 유발 원인 규명, 및 marker 개발을 통한 독

성물질의 독성유발 예측 등의 독성학분야 외에도 친자 확인이나 범인 확인 등을 위한 법의학적 활용, DNA 고고학 등의 다양한 분야에서 DNA chip을 이용한 연구가 진행되고 있다.

- 국제시장에서 herbal medicine에 대한 수요가 급증함에 따라 진통약물의 세계화를 위하여 국내 한약재의 품질 경쟁력 확보가 시급하며, 한약재의 품질을 의약품 수준으로 향상시킬 수 있는 방법인 유효성분 중심의 규격관리가 필요하며, 유효성분 중심의 한약재 관리를 위하여 DNA chip을 이용한 효능유전자를 찾아 biological finger printing에 적용하는 것이 매우 효과적일 것이다.

I.2 세부연구개발과제의 목표달성도

년도	연구개발 추진내용	달성도 (%)	관련 연구에의 기여도
1차년도	❖ 음양곽의 생리활성성분의 효능유전자 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 음양곽 및 그 구성물질에 의해 발현이 변화되는 유전자들의 생물학적 분석을 통한 약리효능 검증 - 음양곽 및 단리물질들에 대한 약리유전자 database 데이터 베이스 구축 - 음양곽이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 약리효능 품질 관리를 위한 기준 제시
	i) 7종의 세포에서의 음양곽 추출분획 및 활성물질의 세포독성 측정 및 세포주 선정	100	
	ii) 세포주에 추출분획 처리 및 target preparation	100	
	iii) Oligo DNA chip assay	100	
	iv) Oligo DNA chip data analysis	100	
	V) Real Time PCR	100	
2차년도	❖ 천궁의 생리활성성분의 효능유전자 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 천궁 및 그 구성물질에 의해 발현이 변화되는 유전자들의 생물학적 분석을 통한 약리효능 검증 - 천궁 및 단리물질들에 대한 약리유전자 database 데이터 베이스 구축 - 천궁이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 약리효능 품질 관리를 위한 기준 제시
	i) 7종의 세포에서의 음양곽 추출분획 및 활성물질의 세포독성 측정 및 세포주 선정	100	
	ii) 추출분획 처리 및 target preparation	100	
	iii) Oligo DNA chip assay	100	
	iv) Oligo DNA chip data analysis	100	
	v) Real Time PCR	100	
	vi) 생리활성성분의 효능유전자 data base 구축 및 효능 정보 system 구축	100	

1.3 국내외 기술개발 현황

- 생약·한약제제 및 천연물신약 분야는 국가별로 오래전부터 국민보건에 중추적 역할을 담당하여 왔으며, 시장 규모도 약 1,000억달러로 추산되는 거대시장이다. 세계화의 진전으로 이 분야는 사실상 독일 등 유럽이 주도하고 있으며, 동양의학의 중심을 자처하는 중국은 국가적 지원아래 연구개발을 확대하여 세계시장 진출을 활발히 전개하고 있다. 또한 신약개발을 주도하는 미국도 이 분야에 대한 투자와 관심을 집중하고 있으나, 미국의 생약은 아직 의약품보다는 건강식품의 형태로 유통되고 있다. 그러나, 1999년 FDA에서 Dietary Supplements의 Ingredient Labeling, Nutrition Labeling 등에 대한 가이드를 정하여, 건강식품에 대한 개념을 의약품에 준하는 형태로 관리하려고 시도하고 있다.
- 중국은 풍부한 생약자원 및 사용경험을 바탕으로 화학약품과 구분된 허가제도를 운영하여 다양한 전

통중국의약품(Traditional Chinese Medicine)(중약제제) 개발의 제도적 뒷받침과 수출지원 정책에 힘입어 세계시장 점유율을 계속 높이고 있다. 최근들어 herbal medicine을 천연물 신약으로 개발하려는 노력이 재미 중국학자들을 중심으로 하여 활발히 전개되고 있으며, consortium for globalization of chinese medicine을 포함한 다양한 회의체를 만들어 한약재의 표준화를 위한 다양한 시도를 하고 있다.

- 한약재에서 DNA microarray 방법이 이용되는 것은 주로 한약재의 효능을 확인하기 위한 한 방법으로 주로 사용되고 있다. 즉, ginkgo biloba (Watanabe *et. al.*, 2001), licorice (Leung *et. al.*, 2003), Scutellaria barbata (Yin *et. al.*, 2004), huanglian (Kang *et. al.*, 2005), Echinacea purpurea (Yang *et. al.*, 2006) 등의 단일 한약재 추출물 뿐 아니라 Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) (Sakaida *et. al.*, 2003) 복합 처방전에 의한 한약재의 효능을 확인하기 위한 생체 또는 세포주에서의 유전자 발현 변화를 관찰하기 위한 방법으로 사용되었다.
- Herbal medicine을 천연물 신약으로 개발하기 위해서는 품질의 표준화가 매우 중요하며, 이를 위하여 HPLC, GC, LC-MS, LS/MS-MS 등의 최신 분석기기들을 이용한 다양한 분석법들이 적용되고 있다. 그 중에서 DNA microarray 방법이 한약재의 품질 표준화를 위한 biological response fingerprinting (BioReF) 방법을 이용한 human cell에서 botanical drug product에 biological response를 나타내는 일련의 marker gene을 결정하기 위한 실험법을 최근 발표하였다 (Rong *et. al.*, 2006).
- 음양곽이나 천궁에 대한 천연물에 대한 연구는 상대적으로 많이 되고 있지 않으나 주로 새로운 성분을 분리하여 약리작용을 관찰하는 연구들이 한국, 중국 및 일본학자들을 중심으로 진행되고 있다. 음양곽의 경우 일본의 Chiba 등(2002)은 syringaresinol를 음양곽으로부터 분리하여 PC12 세포에서 저농도에서 dose-dependent neuritogenesis를 나타낸다고 보고하였다. 그리고 중국의 Guo 와 Xiao (2003)은 중국내에 있는 Epimeidum herba Epimeidum sagittatum, E. brevicornu, E. acuminatum, E. koreanum, E. pubescens, E. leptorrhizum and E. wushanense 등 7종에 대하여 중국내의 분포 및 성분, 의학적 특성에 대하여 보고하였으며, Sun 등(2004)은 5S rRNA gene spacer의 염기서열에 의하여 이들을 분류하는 것에 대하여 설명하였다. 그리고 icariin의 HL-60 세포의 differentiation 증가 및 간독성 보호등에 대한 알려진 효능이 아닌 다른 약리작용에 대하여도 관찰하였다. 그리고 오 등 (2004)은 음양곽의 methanol 추출물이 anti-cholinesterase 작용을 갖고 있으며, 기억력과 인식능력의 향상을 나타낼 수 있을 것으로 예상하였다.
- 천궁의 경우에는 주로 우리나라와 일본 학자들이 성분분석 및 효능 시험을 실시하였다. 우리나라의 경우 최근들어 다양한 실험 및 성분분석이 실시되고 있다. 경희대 동서의학대학원의 김교수팀은 ethylacetate 층이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, faltarindiol이 약리작용을 나타내는 물질로 보고하였다. 서울대학교 안교수팀은 천궁의 정유성분인 butylidenephthalide을 분류하여 acaricidal activity를 갖는다고 보고하였다. 원광대의 추영국교수팀은 천궁의 추출물이 antiangiogenic activity를 갖고 있다고 보고하였다. 일본과 한국의 공동연구(2003)에 의하여 1,3-selenazol-4-one derivatives (Sz-A, B, C, D and E)이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, 천궁의 정유성분을 분석하였다(2002). beta-heteroglucan인 cnidirhan SIIA이 anticomplement 효과를 나타낸다고 Tomoda등(1994)이 보고하는 등 천궁과 음양곽의 다양한 물질들을 분리하여 효능을 관찰하고 있다.
- 최근들어 국내자생식물이나 한약재들에 대한 개발에 대한 관심이 증대되면서 다양한 한약재들로부터 물질분리 및 효능검색에 대한 연구가 국내에서 활발히 진행되고 있다. 음양곽의 경우는 서울대학교 김영중 교수팀(1995)과 강삼식 교수팀(1988)이 flavonoid glycoside 계통을 분리하였으며, icarid II는

간독성보호 작용을 나타내는 것으로 보고하였다. 특히 강삼식 교수팀(1990)은 음양곽의 지하부도 물질 분리를 실시하여 β -sitosterol 계통의 물질들의 구조를 밝힌 바 있다. 충남대 김충렬 교수팀(1992)과 경희대 박병림 교수팀(1997)이 음양곽 methanol 추출물과 열수추출물이 강력한 항산화작용을 나타냄을 보고하였고, 경희대 김호철 교수팀(1997)은 음양곽이 미약하나마 혈압하강작용을 나타낸다고 하였다. 충북대의 임홍빈 교수팀(2001)은 음양곽의 장기투여에 의하여 노화에 따라 감소하는 간의 약물대사효소들의 활성도를 더욱 감소시킴을 보고하면서 노년기의 이물질대사에 부담을 줄 수 있을 것을 예견하였다.

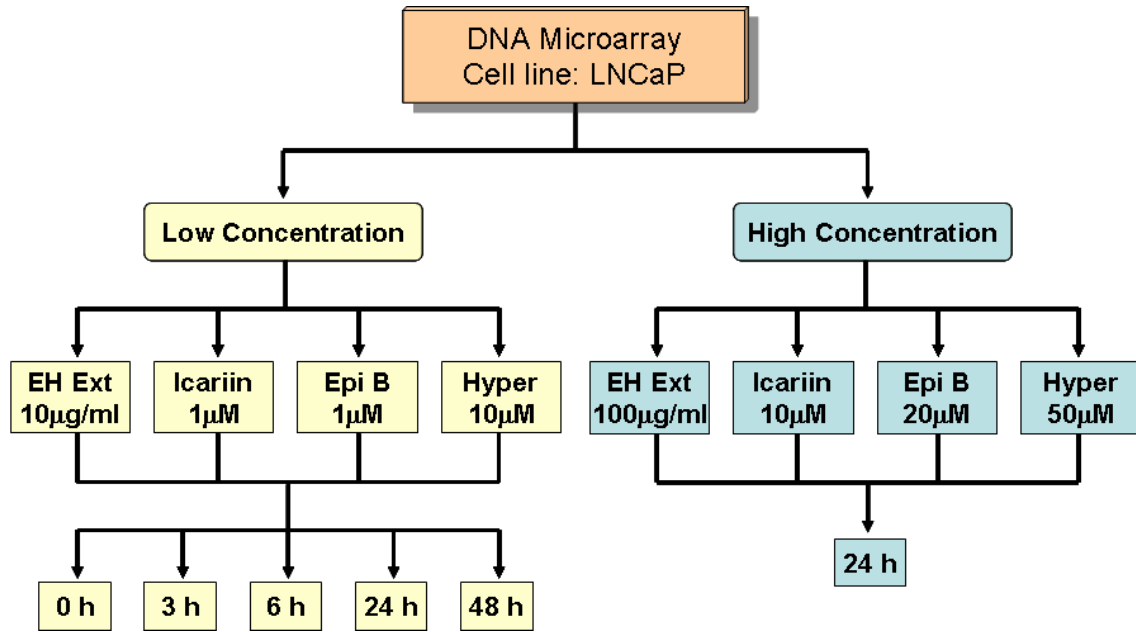
- 천궁에 대하여는 좀 더 다양한 연구가 진행되고 있다. 우리나라의 경우 경희대 동서의학대학원의 김교수팀은 ethylacetate 층이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, faltarindiol이 약리작용을 나타내는 물질로 보고하였다. 서울대학교 안교수팀은 천궁의 정유성분인 butylidenephthalide을 분류하여 acaricidal activity를 갖는다고 보고하였다. 원광대의 추영국교수팀은 천궁의 추출물이 antiangiogenic activity를 갖고 있다고 보고하였다. 일본과 한국의 공동연구(2003)에 의하여 1,3-selenazol-4-one derivatives (Sz-A, B, C, D and E)이 nitric oxide production을 저해하여 신경세포보호작용을 나타낸다고 보고하였으며, 천궁의 정유성분을 분석하였다(2002). 서울여대의 노봉수 교수팀(2003)은 수입산과 국내산 천궁의 향기의 pattern을 GC를 이용하여 분석하였을 때 그 향들의 함량차이가 뚜렷이 나므로 구분이 가능하다고 보고하였다. 동국대 박용기 교수팀(1998)은 토천궁과 천궁을 비교하였을 때 아미노산 함량은 토천궁이 많으나, 총질소량은 천궁이 더 많이 함유하고 있으며, 둘 다 항산화작용을 갖고 있으나 특히 천궁이 더욱 강력하였다고 보고하였다. 대구대 강선태, 이태호 교수팀(1989)은 천궁이 혈전증 및 고점도혈증에 효과가 있음을 보고하였다.
- 아직 음양곽이나 천궁에 대한 DNA microarray를 이용한 실험 결과는 전혀 보고된 바가 없다.

제2장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 내용 및 방법

2.1. 음양곽 연구개발 내용 및 방법

가. 연구개발 내용

- 일반적으로 화학물질은 세포주에 따라 세포독성이나 작용이 다르게 나타므로 음양곽 70% ethanol 추출물과 그 분리화합물 3종에 대한 DNA microarray 실험을 하기 위하여 먼저 음양곽 추출물을 이용하여 세포주 선정을 실시하였다.
- 음양곽 70% ethanol 추출물을 먼저 사람유래 각 장기별 세포주인 HepG2 (간세포주), MCF-7 (유방암세포주), LNCaP(전립선암세포주), A549 (폐암세포주), ACHN (신장세포주), CCF-STTG1 (brain, astrocyte)등 6종의 세포주에서 세포독성을 측정하여 IC50 농도를 정하였다.
- 음양곽은 음양곽은 남성의 성기능향상 작용을 위하여 민간에서 주로 사용하고 있는 생약으로 음양곽의 주성분인 icariin이 phosphoesterase 5 (PDE5)를 저해하여 성기능향상 작용을 나타낸다는 보고를 바탕으로 세포주에서 PDE5가 발현되는 것으로 알려진 A549세포와 성기능 작용과 관련된 prostate cancer cell line인 LNCaP 세포 중에서 음양곽 추출물에 의한 PDE5 발현과 testosterone 합성 관련된 효소들의 발현을 관찰하여 선정하였다.
- 본 연구에서는 남성호르몬과 관계된 androgen receptor와 aromatase, 기질적인 작용을 나타내는데 관여하는 PDE5를 선정하여 음양곽 추출물 및 그 분리물질에 의하여 용량 및 시간에 따른 유전자 발현변화 양상을 관찰하여 용량 및 시간을 선정하였다.
- 약물 처리에 의한 유전자 변화는 빨리 나타나는 것도 있고 천천히 나타나는 것도 있으며, 일반적으로 한약재의 약리작용은 만성 질환에 효과가 좋은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제에서는 Oligo DNA chip 실험은 유전자 발현 및 용량시험에서 얻은 결과를 기준으로 하여 추출물이나 분리 화합물들의 저농도는 0, 6, 24 및 48시간 동안 처리하였으며, 고농도는 24시간 동안 처리하여 시간과 농도에 따른 유전자 발현 변화를 관찰하였다.
- 국산 음양곽 추출물에 의한 유전자 발현을 중국산과 비교 관찰하기 위하여 중국산 음양곽 추출물 100ug/ml 농도로 24시간 동안 처리하였다.
- Oligo DNA chip 실험은 다음 그림과 같은 scheme으로 각 농도별로 3반복 실험을 하였다.
- DNA chip은 ABI사의 Human Genome Survey Microarray, V2.0 oligo chip을 사용하였으며, 세포에서 분리한 total RNA는 ABI사에서 제공하는 RT-IVT Labeling kit를 사용하여 cRNA를 만들어 labeling 하였다.
- DNA chip 실험을 하여 얻어진 image 분석을 통해 얻은 결과는 normalization, DEG 분석, clustering, classification 등의 과정을 거쳐 분석하여 효능 유전자를 선정하였으며, 이를 database 화하기 위하여 database 팀에 제공하였다.



Scheme 1. Design of the DNA microarray experiment for the selection of biomarker genes in the 70% EtOH extract of Epimedium herba, its major components, icariin, epimedin B and hyperoside.

음양곽 추출물과 그 주성분들인 icariin, Epimedin B, hyperoside 등에 대하여 고농도와 저농도로 실험함. 저농도는 0, 3, 6, 24 및 48h 동안 처리하였으며, 고농도에서는 24h 만은 처리하여 RNA를 분리한 후 DNA chip 실험을 하였음.

EH Ext: 음양곽 추출물 Epi B: Epimedium B, Hyper: hyperoside

나. 실험방법

1) Cell culture 및 음양곽, 그 분리물질들의 세포 독성 측정

- 세포주 LNCaP (prostate), MCF-7(Breast), A549 (Lung), ACHN (Kidney) 및 CCF-STTG1 (brain, astrocyte) 등 6종의 세포주는 10% FBS를 함유하는 DMEM이나 RPMI1640 media를 사용하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.
- 세포주에 동결건조한 음양곽 70% ethanol 추출물이나 단일물질들은 약 5단계 정도의 농도로 처리한 후 72 시간 경과 후 MTS assay (Promega, USA) 방법으로 세포독성을 측정하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

2) RT-PCR을 이용한 세포주 선정을 위한 실험

- A549 세포와 LNCaP 세포에 음양곽 추출물 및 그 분리물질들의 여러 농도로 24시간 동안 처리한 후 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 이용하여 PDE5나 남성호르몬 합성 및 작용 관련 효소들의 발현을 관찰하여 처리 농도 및 세포주를 선정하였으며, 선정된 농도를 선정된 세포에 0, 3, 6, 24, 48 처리하여 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다.
- 분리한 total RNA는 reverse transcriptase와 dNTP를 이용하여 cRNA를 합성하였으며, 이를 다시 PDE5, AR, 3β-HSD, aromatase, CYP17, β-actin 등의 sense, antisense primer를 이용하여 PCR을 하여 β-actin의 량과 비교하여 각 단백질의 mRNA 발현변화를 관찰하였다. 이때 음양곽 추출물에

의한 발현 변화가 큰 세포를 DNA microarray를 위한 세포주로 선정하였다.

3) 음양곽 및 음양곽 분리물질이 NO 생성에 미치는 영향 관찰

- 배양된 세포주 LNCaP (전립선 암세포주)는 chamber slide에 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 부착하였다. 이 세포주에 동결 건조한 음양곽의 70% ethanol 추출물을 100 ug/ml, 200 ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였고, 음양곽의 단일물질인 icariin을 10 uM, 20 uM, 200 uM 의 농도로 24 시간 동안 처리하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터의 NO 발생은 DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)로 염색하여 확인 하였다. 즉, 각 sample들이 처리된 세포에 DAF-FM diacetate를 5 uM의 농도로 37°C에서 1 시간 동안 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 형광 현미경 (Ex. 490, Em. 515)으로 NO생성을 측정하였다.

4) DNA microarray 실험

- 세포주 LNCaP (전립선 암세포주)는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 세포주에 동결 건조한 음양곽의 70% ethanol 추출물을 10 ug/ml 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 100 ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, 음양곽의 단일물질인 icariin을 1 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 10 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 또 다른 음양곽의 단일물질인 epimedin B 역시 1 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 20 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, hyperoside는 10 uM의 농도로 3 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, 50 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 또한 Quercetin은 2 uM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터 total RNA는 RNeasy Mini Kit (Quagene사, USA)의 protocol에 따라 분리하였다. 그 후 RNA를 ΔA 260/280 ratio를 측정하여 1.8 이상이 되는 것과 formaldehyde gel을 이용하여 전기 영동한 후 그 band를 확인 및 정량하여 28S, 18S의 ratio가 1.8-2.3 범위에 있는 RNA를 실험에 사용하였다.
- cDNA 합성, cRNA labeling, sample hybridization 및 detection은 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 cRNA 제조 및 hybridization등의 과정을 진행하였다. 즉, 5 ug의 Total RNA로부터 RT-IVT Labeling Kit v 1.0을 사용하여 labeling된 cRNA를 만들었으며, 만들어진 labeling cRNA 10 ug을 1700 Full Genome Expression Human Microarray에 roading하여 55°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. Hybridization 시킨 Microarray는 세척 및 antibody binding과정을 거친 후 Chemiluminescence Detection Kit를 사용하여 detection을 하였고, image 분석은 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer 을 사용하였다.

5) DNA chip data analysis

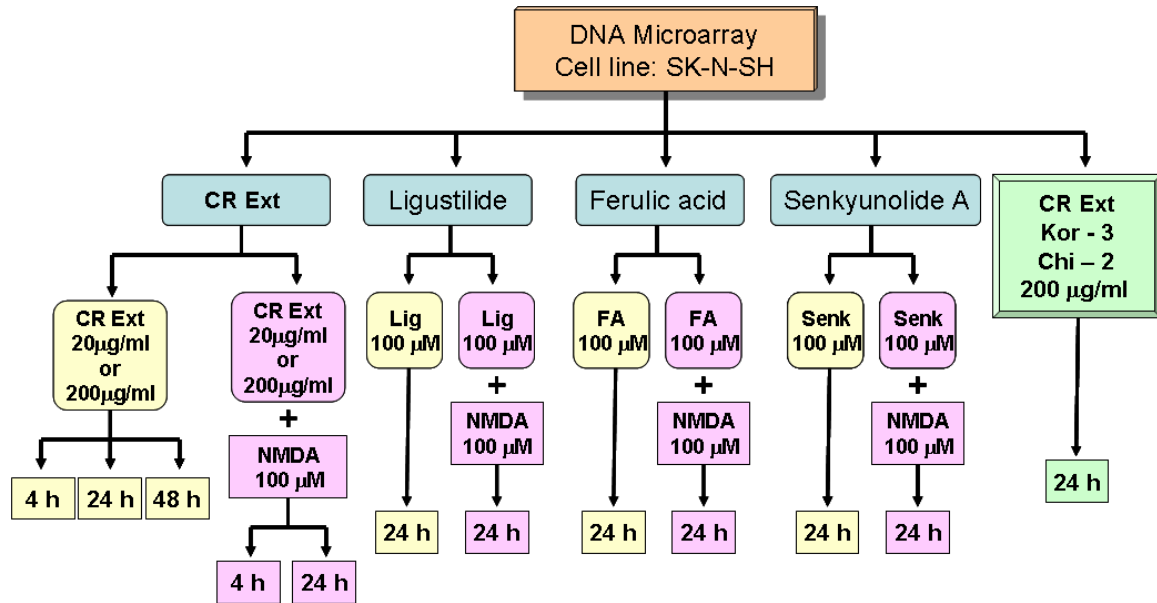
- DNA chip data는 Avadis Explorer 3.3과 GenPlex 2.0 (Istech, Korea)를 이용하여 분석하였다. Microarray의 이미지를 스캔하여 얻은 데이터를 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2 배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.

6) Real-time PCR을 이용한 효능유전자 검증

- 먼저 cDNA를 합성하기 위하여 oligo dT 2 μ l와 5 μ g에 해당하는 분리한 RNA를 섞어서 70°C에서 10분 동안 incubation시킨 후 ice에 넣는다. 2 μ l transcriptase RT enzyme, RNase inhibitor 2 μ l, 10 μ l 5X RT buffer, 10 μ l dNTP와 DEPC를 넣어 50 μ l로 맞추고 42°C에서 1시간 동안 reverse transcription 시킨 후 95°C에서 5분 동안 reverse transcriptase를 불활성화 시킨다.
- 합성된 cDNA를 1/10 희석시켜서 1 μ l cDNA, iQTM SYBR Green Supermix 25 μ l, primer 2 μ l와 DEPC를 넣고 50 μ l로 맞추었다. PCR조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 2분 동안 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 45초로 40cycle을 Mini Opticon(Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다. 각 cDNA sample은 triplicate로 수행하였고, β -actin cDNA의 real-time PCR data를 통해 normalization되었다.
- PCR quantitation data와 melting curve는 Opticon Monitor software를 통해 얻었으며, 그 결과는 $2^{-((\text{sample Ct} - \beta\text{-actin Ct}) - (\text{sample control Avg. Ct} - \beta\text{-actin control Avg. Ct}))}$ 를 이용하여 fold induction을 계산하였다.

2.2 천궁의 연구개발 내용 및 방법

- 천궁의 약리 효능을 관찰하기 위하여 이미 알려진 효능을 중심으로 실험을 디자인 하였다. 천궁은 혈관확장, 진정, 진통, 진경작용 및 장관 경련 억제 등의 주약리 작용이 있는 것으로 알려져 있는 한약재료, 이러한 약리 작용은 nitric oxide와 관련 있는 작용으로 본 과제에서는 nitric oxide 생성 변화에 따른 유전자 발현변화에 중점을 두어 먼저 효능 검정을 실시하고자 하였다.
- 1차년도에는 음양곽과 그 분리물질에 유전자 발현변화를 농도와 처리시간을 변수로 주어서 관찰하였을 때 유의 유전자들에 의한 pathway 관찰에는 적합한 것 같았으나, 효능 유전자 선정에는 적합하지 않았다. 따라서 2차년도에는 천궁 효능관련 유전자를 선정하기 위하여 독성물질에 의한 세포에 변화 (nitric oxide 생성 증가)를 주고 그것을 천궁 추출물이 저해하는 것을 중심으로 하여 세포주를 선정하였다.
- 세포주 선정 및 천궁의 세포독성을 관찰하기 위하여 8종의 세포주 즉 SH-SY5Y, SK-N-MC, SK-N-SH, 22RV1, PC3, LNCaP, A549, MCF7 cell line에서 세포독성을 측정하였다.
- 천궁의 효능이 nitric oxide와 관련되어 있으며, 혈관확장은 eNOS와 관련되어 있으며, 기타 진정, 진통 등은 iNOS와 관련되어 있을 것으로 사료되어 천궁에 의한 eNOS 및 iNOS에 미치는 영향에 대하여 Huvec 세포와 Raw264.7 세포주에서 NO 유도 물질인 LPS로 NO 생성을 증가시켰을 때 천궁이 NO 생성량에 미치는 영향을 관찰하였다. 그러나 iNOS에 대한 실험은 mouse Raw264.7 세포가 가장 많이 사용하는 세포주이나 이는 사람의 것이 아니고 조금만 잘못 다뤄도 세포 자체가 활성화되어 DNA chip 실험에 바람직하지 않을 것으로 사료되었다. 그리고 Huvec 세포의 경우에는 사람의 primary 세포로 이것은 batch에 따라 유전자 발현 변화가 심할 것으로 사료되었으며, 재



Scheme 2. Design of the DNA microarray experiment for the selection of biomarker genes in the 70% EtOH extract of *Cnidii Rhizoma* (CR Ext), its major components, Ligustilide, ferulic acid and Senkyunolide A.

현성이 떨어질 것으로 사료되었다.

- 뇌세포에서 여러 중추신경 독성물질들 즉 MPP⁺, LPS 및 NMDA 등을 처리하였을 때 NO 생성에 천궁 추출물이 미치는 영향을 관찰하였다. 특히 NMDA는 중추성 흥분물질로 NMDA를 뇌세포주에 처리하였을 때 NO 생성량이 증가함을 관찰하였으며, 따라서 본 과제에서는 천궁의 진정작용을 주 약리효능으로 다음과 같이 DNA chip 실험을 디자인하였다 (Scheme 2).
- 2차년도에는 천궁 추출물에 의한 유전자 변화를 국산과 중국산에서 추출물의 성분이 조금씩 다른 샘플을 사용하여 추출성분 차이에 따른 효능 유전자 발현을 비교하였다.
- Oligo DNA chip 실험은 다음 그림과 같은 scheme으로 각 농도별로 3반복 실험을 하였다.
- DNA chip은 ABI사의 Human Genome Survey Microarray, V2.0 oligo chip을 사용하였으며, 세포에서 분리한 total RNA는 ABI사에서 제공하는 RT-IVT Labeling kit를 사용하여 cRNA를 만들어 labeling 하였다.
- DNA chip 실험을 하여 얻어진 image 분석을 통해 얻은 결과는 normalization, DEG 분석, clustering, classification 등의 과정을 거쳐 분석하여 효능 유전자를 선정하였으며, 이를 database화하기 위하여 database 팀에 제공하였다.

2. 실험방법

1) Cell culture 및 천궁, 그 분리물질들의 세포 독성 측정

- Neuroblastoma 세포주인 SH-SY5Y, SK-N-MC, SK-N-SH, Prostate cell line인 22RV1, PC3, LNCaP, 폐암세포주 A549와 유방암 세포주 MCF7 cell line 등 8종의 세포주는 10% FBS를 함유하

는 DMEM이나 RPMI1640 media를 사용하여 37°C CO₂ incubator에서 배양하였다.

- 세포주에 동결건조한 천궁 70% ethanol 추출물이나 단일물질들은 약 5단계 정도의 농도로 처리한 후 24 시간 경과 후 MTS assay (Promega, USA) 방법으로 세포독성을 측정하여 IC50 값을 계산하였다.

2) 세포주 선정에 의한 독성물질에 의한 NO 생성량 증가 및 천궁에 의한 NO 생성에 대한 실험

- 배양된 세포주 SK-N-SH (신경아세포종주)는 chamber slide에 10% FBS를 함유하는 α -MEM배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 부착하였다. 여기에 동결 건조한 천궁의 70% ethanol 추출물을 10, 20, 100, 200 ug/ml 농도로 4 시간, 24 시간 동안 처리하였고, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 100 uM 를 천궁과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리하였다. 천궁의 단일 물질인 Ferulic acid (100 uM)와 Z-Ligustilide (50 uM), Senkyunolide A (100 ug/ml)도 24 시간 동안 처리 하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터의 NO 발생은 DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate)로 염색하여 확인 하였다. 즉, 각 sample들이 처리된 세포에 DAF-FM diacetate를 5 uM의 농도로 37°C에서 1 시간 동안 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 형광 현미경 (Ex. 490, Em. 515)으로 NO 생성을 측정하였다.

3) DNA microarray 실험

- 세포주 SK-N-SH (신경아세포종주)는 10% FBS를 함유하는 α -MEM배지를 사용하여 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이 세포주에 동결 건조한 천궁의 70% ethanol 추출물을 20, 200 ug/ml 농도로 4 시간, 24 시간, 48 시간 동안 처리하였고, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 100 uM 를 천궁과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리하였으며, 천궁의 단일 물질인 Ferulic acid (100 uM)와 Z-Ligustilide (50 uM)도 NMDA 100 uM과 함께 혹은 단독으로 24 시간 동안 처리 하였다. 또한 산지별 천궁 추출물인 C1, C3, K4, K7, K8을 200 ug/ml 농도로 24 시간 동안 처리 하였다.
- 각 sample들을 처리한 세포로부터 total RNA는 RNeasy Mini Kit (Quagene사, USA)의 protocol에 따라 분리하였다. 그 후 RNA를 ΔA 260/280 ratio를 측정하여 1.8 이상이 되는 것과 formaldehyde gel을 이용하여 전기 영동한 후 그 band를 확인 및 정량하여 28S, 18S의 ratio가 1.8-2.3 범위에 있는 RNA를 실험에 사용하였다.
- cDNA 합성, cRNA labeling, sample hybridization 및 detection은 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT labeling Kit를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 cRNA 제조 및 hybridization등의 과정을 진행하였다. 즉, 5 ug의 Total RNA로부터 RT-IVT Labeling Kit v 1.0을 사용하여 labeling된 cRNA를 만들었으며, 만들어진 labeling cRNA 10 ug을1700 Full Genome Expression Human Microarray에 roading하여 55°C에서 16시간 동안 hybridization시켰다. Hybridization 시킨 Microarray는 세척 및 antibody binding과정을 거친 후 Chemiluminescence Detection Kit를 사용하여 detection을 하였고, image 분석은 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer 을 사용하였다.

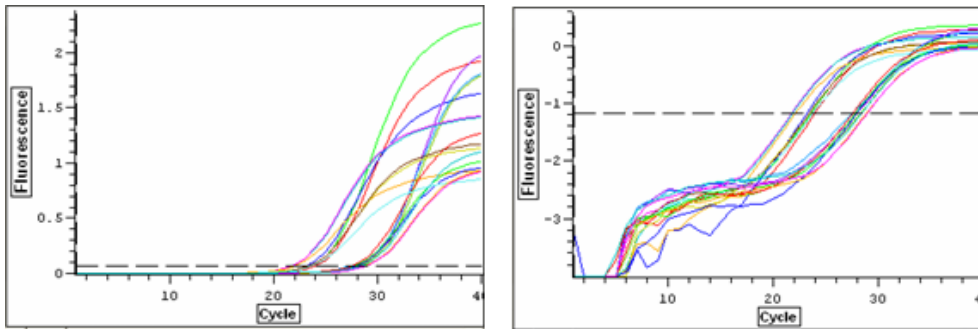
4) DNA chip data analysis

- DNA chip data는 Avadis Explorer 3.3과 GenPlex 2.0 (Istech, Korea)를 이용하여 분석하였다. Microarray의 이미지를 스캔하여 얻은 데이터를 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인

데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2 배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 ($P < 0.05$)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.

5) Real-time PCR을 이용한 효능유전자 검증

- 먼저 cDNA를 합성하기 위하여 oligo dT 2 μ l와 5 μ g에 해당하는 분리한 RNA를 섞어서 70°C에서 10분 동안 incubation시킨 후 ice에 넣는다. 2 μ l transcriptase RT enzyme, RNase inhibitor 2 μ l, 10 μ l 5X RT buffer, 10 μ l dNTP와 DEPC를 넣어 50 μ l로 맞추고 42°C에서 1시간 동안 reverse transcription 시킨 후 95°C에서 5분 동안 reverse transcriptase를 불활성화 시킨다.
- 합성된 cDNA를 1/10 희석시켜서 1 μ l cDNA, iQTM SYBR Green Supermix 25 μ l, primer 2 μ l와 DEPC를 넣고 50 μ l로 맞추었다. PCR조건으로 첫 cycle에서 95°C에서 2분 동안 수행하였고 나머지 cycle에서는 95°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 45초로 40cycle을 Mini Opticon(Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다. 각 cDNA sample은 triplicate로 수행하였고, β -actin cDNA의 real-time PCR data를 통해 normalization되었다.
- PCR quantitation data와 melting curve는 Opticon Monitor software를 통해 얻어졌고, $2^{-((\text{sample Ct} - \beta\text{-actin Ct}) - (\text{sample control Avg. Ct} - \beta\text{-actin control Avg. Ct}))}$ 를 통해 표현하였다.



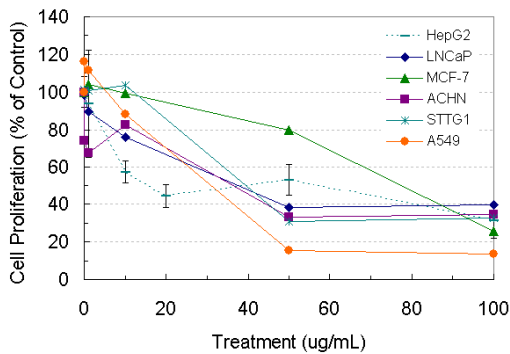
Real-Time PCR의 cycle spectrum

제 3 장 세부연구개발과제의 최종 연구개발 결과

3.1 음양곽 연구결과

가. DNA chip 실험을 위한 세포주와 처리조건 설정

- 제2세부 DNA chip 과제에서는 한약재 과학화를 위하여 음양곽과 그 주성분인 icariin, epimedin B 외 1종의 분리물질이 유전자 발현 profile에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적합한 세포주를 선정 한 후 DNA microarray 실험을 실시하였다.
- DNA microarray 실험을 위한 세포주를 선정하기 위하여 음양곽 70% ethanol 추출물을 LNCaP (prostate), MCF-7(Breast), A549 (Lung), ACHN (Kidney) 및 CCF-STTG1 (brain, astrocyte) 등 6가지 여러 장기 유래 암세포주에 여러 농도로 72시간 동안 처리한 후 세포증식 저해 정도를 MTS assay를 실시하였다. 먼저 serum free 배지를 사용하였을 때 그림2에서와 같이 70% ethanol 추출물 처리에 의하여 농도 의존적으로 세포증식이 저해되었으며, 그중에서 세포증식 저해 정도가 MCF-7에서 IC50값이 81 ug/ml로 상대적으로 높게 나타났고, A549세포에서는 23.5 ug/ml로 저해가 크게 나타났다.
- 음양곽은 민간에서 주로 남성의 성기능향상 작용을 위하여 사용하고 있는 생약으로 음양곽의 주성분인 icariin이 phosphoesterase 5 (PDE5)를 저해하여 성기능향상 작용을 나타낸다는 보고를 바탕으로 세포주에서 PDE5가 발현되는 것으로 알려진 A549세포와 성기능 작용과 관련된 prostate cancer cell line인 LNCaP 세포에서 음양곽 70% ethanol 추출물에 의한 세포 증식저해정도를 serum을 넣은 배지(serum media)와 넣지 않은 배지(serum free media)에서 관찰하였을 때 serum media에서는 세포증식 저해가 매우 낮게 나타난 반면 serum free media에서는 세포증식이 크게 저해되었다 (그림3). 일반적으로 생체내의 세포는 serum이 있는 조건에 있기 때문에 이후의 실험에는 10% serum을 함유하는 배지를 사용하였다.
- 본 연구에서는 남성호르몬과 관계된 androgen receptor와 aromatase, 기질적인 작용을 나타내는 데 관여하는 PDE5를 선정하여 음양곽 추출물 및 icariin에 의하여 용량 및 시간에 따른 유전자 발현변화 양상을 관찰하였다. 그림 4에서와 같이 음양곽 추출물에 의하여 LNCaP 세포에서 이들 유전자의 발현 변화가 나타났으나, A549세포에서는 PDE5의 발현 변화가 크지 않았고 AR이나 aromatase의 발현이 잘 되지 않았다. 따라서 DNA chip을 이용하여 음양곽 추출물 및 그 분리화합물에 의한 유전자



	HepG2	LNCaP	MCF-7	ACHN	CCF-ST TG1	A549
IC50(μg/mL)	36.4	34.5	81	36.1	43.1	23.5

Figure 2. Effect of 70% ethanol extracts of Epimedium herba on the cell proliferation and IC50 values in various cancer cell lines

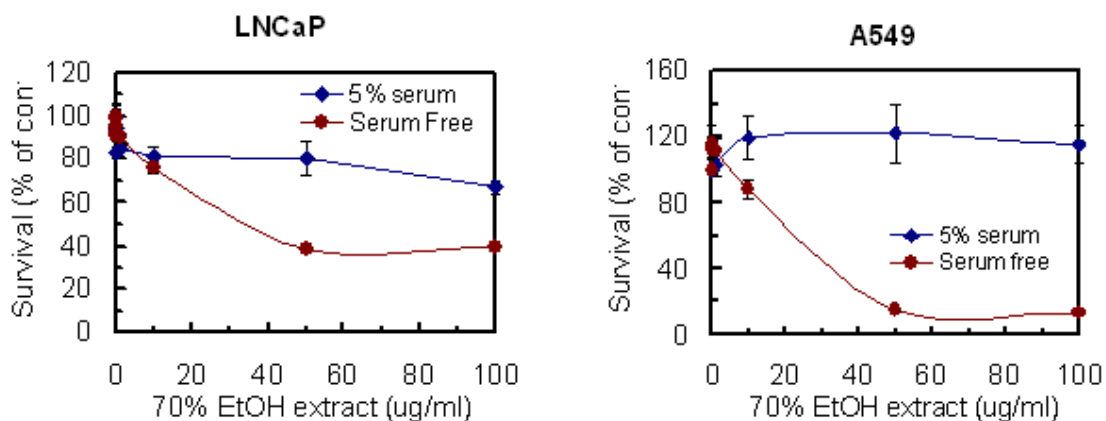


Figure 3. Effect of 70% ethanol extracts of Epimedi herba on the cell proliferation in LNCaP and A549 cells.

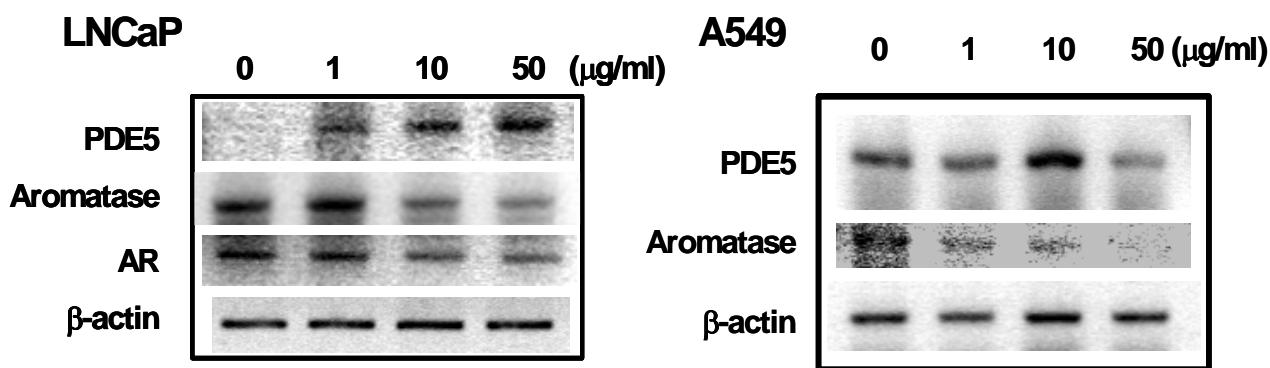


Figure 4. Effect of 70% ethanol extracts of Epimedi herba on the gene expression in LNCaP and A549 cells.

발현 변화 양상을 관찰하기 위하여 LNCaP 세포주를 선정하였다.

- 음양곽 처리 농도와 시간을 정하기 위하여 음양곽 추출물을 1과 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 0, 3, 6, 12, 24, 48h 동안 처리한 후 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 mRNA 발현변화를 RT-PCR을 통해 관찰하였을 때, 그림 5에서와 같이 PDE5는 저농도의 음양곽 추출물에 의하여는 변화가 없었으나 고농도로 처리하였을 때는 처리시간이 길어짐에 따라 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 androgen receptor (AR)의 경우에는 저농도 처리에 의하여 시간이 증가할수록 발

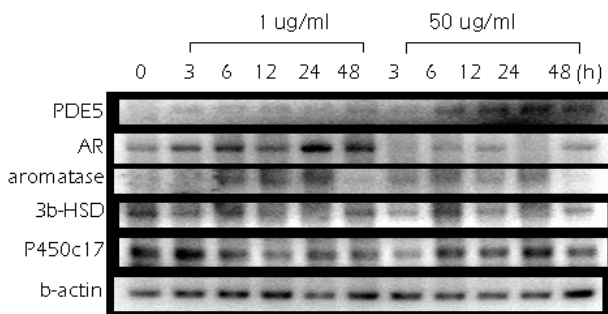


Figure 5. Time- and dose-dependent effect of 70% ethanol extracts of Epimedi herba on the gene expression in LNCaP cells.

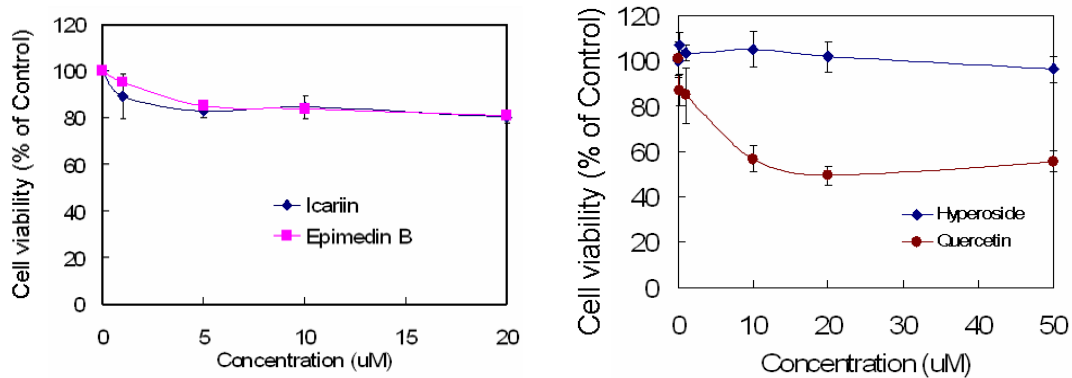


Figure 6. Effect of Epimedi herba components on the proliferation of LNCaP cells.

현이 증가되었으나 고농도에서는 AR 발현이 잘 나타나지 않았다. 그러나 전체적으로 관찰하였을 때 유전자 발현은 좀 더 고농도에서 변화가 많을 것으로 사료되어 음양곽 추출물은 10, 100ug/ml로 처리할 것을 결정하였다.

- 음양곽 70% ethanol 추출물의 주성분은 1세부 분석팀에서 분석한 결과 icariin이 가장 많이 함유되어 있으며, hyperoside와 epimedin B가 다음으로 많이 존재하였다. 음양곽에는 주로 flavonoid glycoside 가 많이 존재하고 있으며, 특히 prenylflavonoid 모핵에 당이 다른 것이 많이 존재하고 있다. 따라서 본 과제에서는 함량이 많이 있으며, 같은 prenylflavonoid 모핵을 갖고 있으나 구성 당이 다른 icariin과 epimedin B를 또한 quercetin의 7 위치에 galactose가 붙어있는 hyperoside를 효능 분석 물질로 선정하여 효능 분석 및 DNA microarray 실험을 실시하였다.
- icariin, epimedin B 및 hyperoside에 대한 용량 결정을 위하여 먼저 LNCaP 세포에 여러 농도의 분리물질들을 24시간동안 처리한 후 세포독성을 측정하였을 때 icariin, epimedin B 및 hyperoside 등의 glycoflavonoids는 세포독성이 거의 나타나지 않았으나 hyperoside의 aglycon인 quercetin은 상대적으로 세포독성이 크게 나타났다(그림 6).
- 음양곽의 주성분인 icariin의 실험조건을 잡기 위하여 1uM과 10uM을 0, 3, 6, 24, 48시간 동안 처리한 후 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 mRNA 발현변화를 RT-PCR을 통해 관찰하였을 때 그림 7과 같이 나타났다. 1uM icariin 처리에 의하여 AR의 발현이 처리 시간이 길어질수록 크게 증가되었다. 그러나 10 uM 농도에서는 저농도 (1uM) 처리에 의한 유전자 발현과는 달리 나타났다.

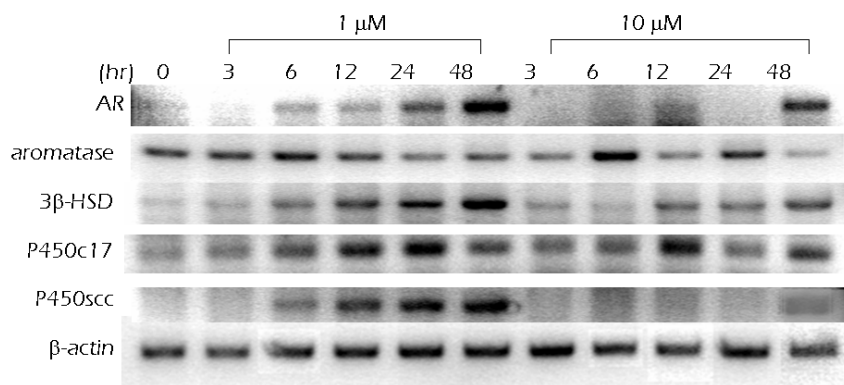


Figure 7. Time- and dose-dependent effect of icariin on the gene expression in LNCaP cells.

- Epimedin A, B 및 C에 의한 PDE5와 androgen 합성과정에 중요한 역할을 하는 효소들의 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 LNCaP 세포에 분리물질들의 농도를 달리하여 24시간동안 처리하였다. 이때 관찰하였을 때 epimedin A, B 나 C에서 유전자 발현변화는 크게 나타나지 않았다(그림 8). 따라서 음양곽에는 epimedin B가 가장 많이 존재하므로 DNA microarray 실험을 위하여 epimedin B를 선정하였다.

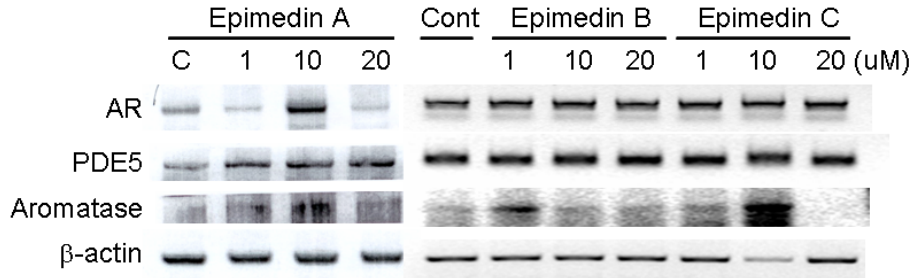


Figure 8. Dose-dependent effect of epimedin on the gene expression in LNCaP cells.

- Hyperoside에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 hyperoside와 그 aglycon이 quercetin을 여러 농도로 24시간 동안 LNCaP 세포에 처리한 후 RT-PCR을 하였다. 그 때 quercetin은 aromatase 발현이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나 aglycon은 전혀 변화가 나타나지 않았다 (그림 9). 그러나 quercetin은 음양곽에는 hyperoside의 형태로 존재하므로 hyperoside를 선정하였다.

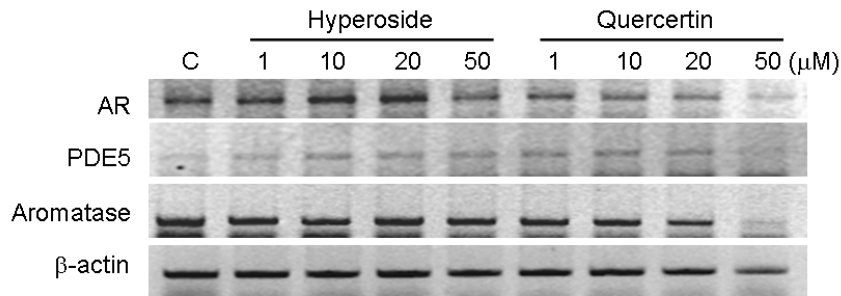


Figure 9. Dose-dependent effect of hyperoside and quercetin on the gene expression in LNCaP cells.

- DNA chip 실험을 위한 분리물질은 이상의 세포독성 및 성기능관련 효소들의 발현을 기준으로 하여 본 과제에서는 icariin, epimedin B 및 hyperoside 등의 3종을 선정하였다 (그림 10)

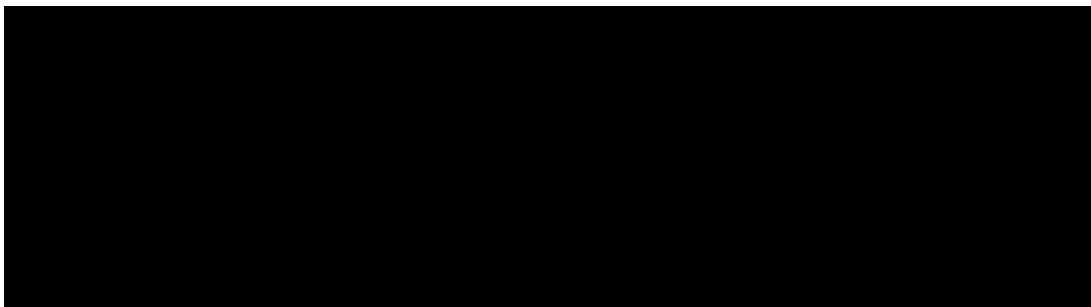


Figure 10. Chemical structures of three compounds isolated from Epimedium koreanum for DNA microarray experiment.

- 이상의 LNCaP 세포에서 testosterone 합성 관련 효소들의 발현을 관찰한 외에도 음양곽이 성기능 향상 작용을 하는 데 관여하는 것은 음양곽 추출물이나 icariin 등에 의한 PDE5 저해에 따른 L-arginine/NO/cGMP pathway의 활성화에 따라 nitric oxide 생성량이 증가되어 penis 내의 동맥 혈관 확장에 의하여 발기작용이 오랜시간 동안 유지될 수 있다. 음양곽 추출물과 그 주성분인 icariin 이 nitric oxide 생성과 세포독성에 미치는 영향에 대하여 Raw264.7 세포주와 HUVEC 세포에서 실험하였다.
- Raw264.7 세포주에 여러 농도의 음양곽 추출물이나 icariin을 처리한 후 세포독성, nitric oxide 생성량 및 immunoblot을 이용하여 iNOS 발현을 실험하였을 때 그림 11에서와 같이 음양곽 추출물 800ug/mL 농도까지 세포독성이 거의 나타나지 않았으나, nitrite 생성량은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때 농도의존적으로 증가된 양상이 나타났다. 그러나 iNOS inducer인 LPS와 함께 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 농도-의존적으로 nitrite 생성량이 감소되었다. iNOS은 음양곽 추출물을 단독으로 처리하였을 때는 발현량의 변화를 관찰할 수 없었으나 LPS에 의한 iNOS induction을 천궁 추출물 처리에 의하여 농도-의존적으로 저해되었다. 음양곽 추출물에 의한 iNOS 관련 nitric oxide 결과와는 대조적으로 icariin은 200uM 이상에서는 세포독성이 용량 의존적으로 증가되었다. LPS에 의한 nitric oxide 생성량 증가 및 발현량 증가에 대해서 icariin이 용량 의존적으로 저해하였으나 그 저해정도는 음양곽 보다 약하게 나타났다.
- Huvec 세포에서 음양곽 추출물 및 icariin에 의한 nitric oxide 생성을 관찰하였다. 그림 12에서와 같이 음양곽 추출물 처리에 의하여 세포독성이 전혀 나타나지 않는 400ug/mL에서 nitric oxide 생성량이 크게 증가되었으며, 양성대조군으로 사용한 PMA 보다도 약 1.4배 정도 증가되었다. Icariin에 의한 nitric oxide 생성량 역시 크게 증가되었으나 음양곽에 비하여 약하게 증가되었으며, 거의 PMA 수준과 유사하였다. 이러한 Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의하여 nitric oxide 생성량이 증가하는 것은 NO에 의한 혈관 확장 작용에 의하여 발기능을 향상시켜 성기능을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

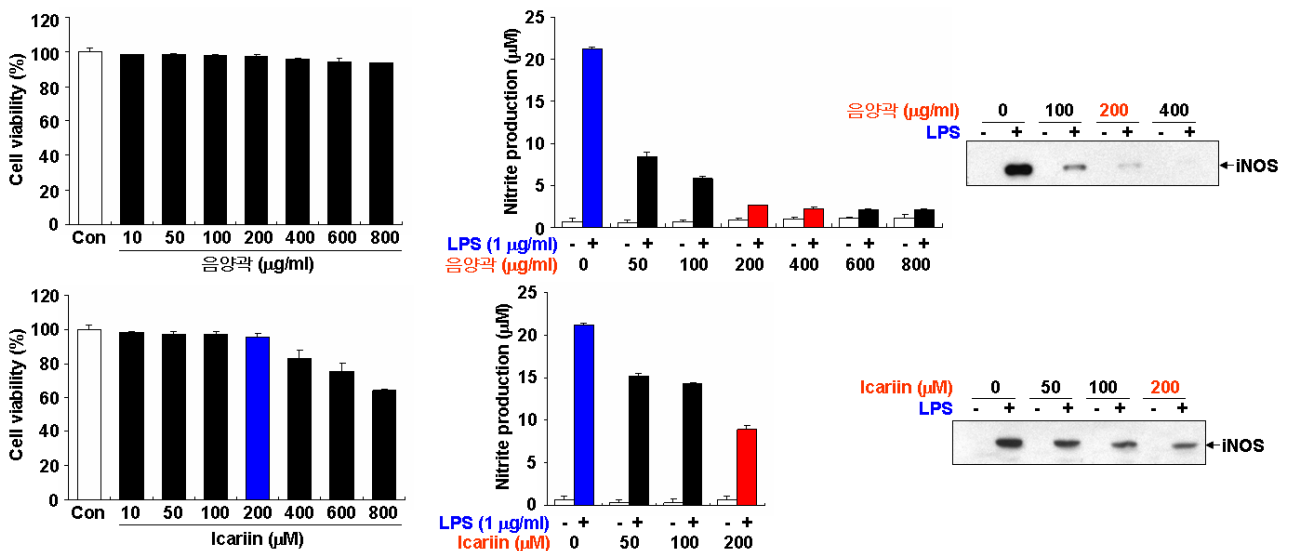


Figure 11. Effect of Epimeii herba extract and icariin on the cytotoxicity, the production of nitric oxide and expression of iNOS in Raw264.7 cells.

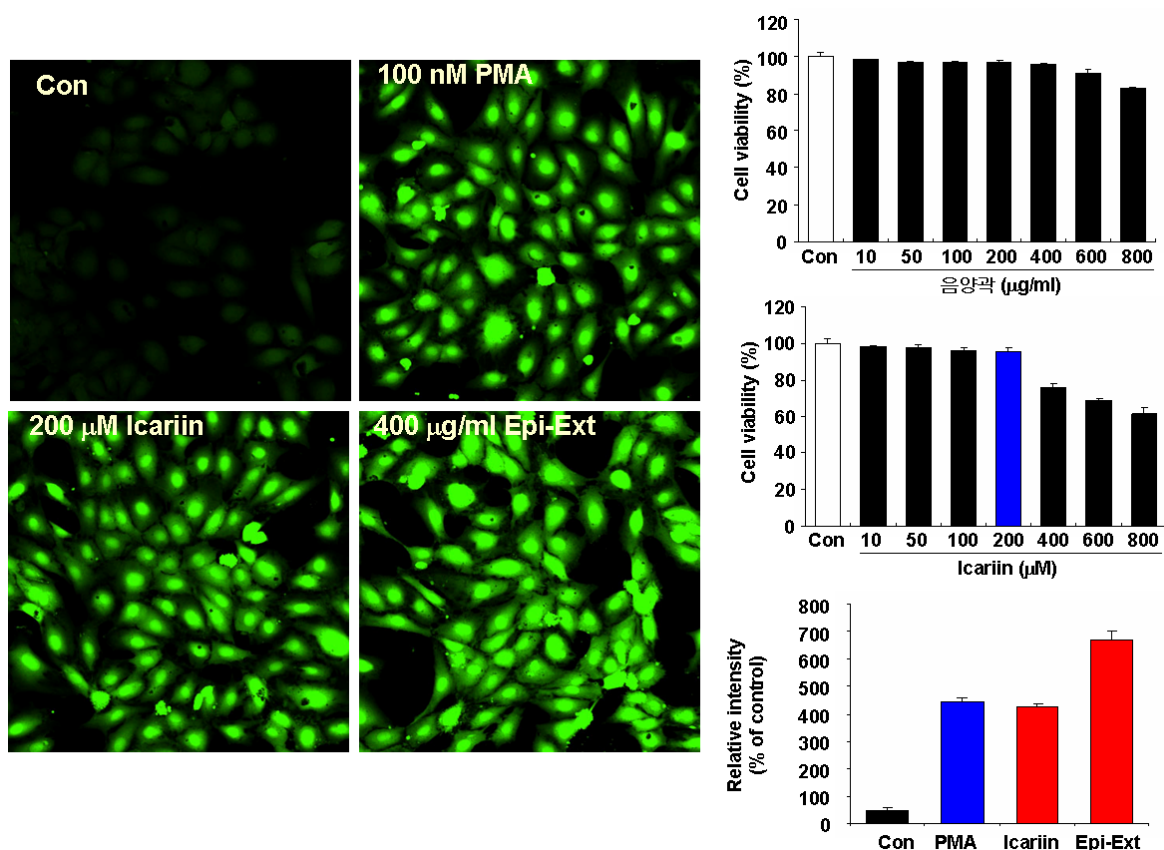


Figure 12. Effect of Epimedium herba extract and icariin on the cytotoxicity and the production of nitric oxide in HUVEC cells.

- 그러나 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람의 것이며 구입하기 쉬운 것으로 선정하고자 음양곽 추출물에 의하여 testosterone 합성 관련 효소들이나 PDE5의 유전자 발현변화를 관찰했던 LNCaP 세포를 성기능 향상과 관련지어 실험하였다.
- LNCaP 세포에서 음양곽 추출물과 추출물 3종에 대하여 nitric oxide 생성량에 대하여 관찰하였다. 그림 13에서와 같이 음양곽 추출물에 의하여 nitric oxide 생성량이 농도 의존적으로 크게 증가하였다. 특히 icariin에 의한 nitric oxide 생성은 1uM에서도 매우 크게 증가하였으며, 10uM에서 최고조를 이루다가 20uM과 200uM에서는 농도 의존적으로 감소되었다. 그리고 예상외로 epimedin A, B, C에 의하여는 nitric oxide 생성량이 매우 적었다. 특히 epimedin B에서의 nitric oxide 생성 변화가 적게 나타났다. 이러한 결과는 같은 prenylflavonoid 구조를 같은 물질이더라도 붙어있는 당의 종류와 수에 따라서 영향이 달리 나타날 수 있음을 나타내었다. Hyperoside에 의하여도 nitric oxide 생성이 농도 의존적으로 증가되었으나 그 증가량은 icariin에 비하여 매우 적었다.

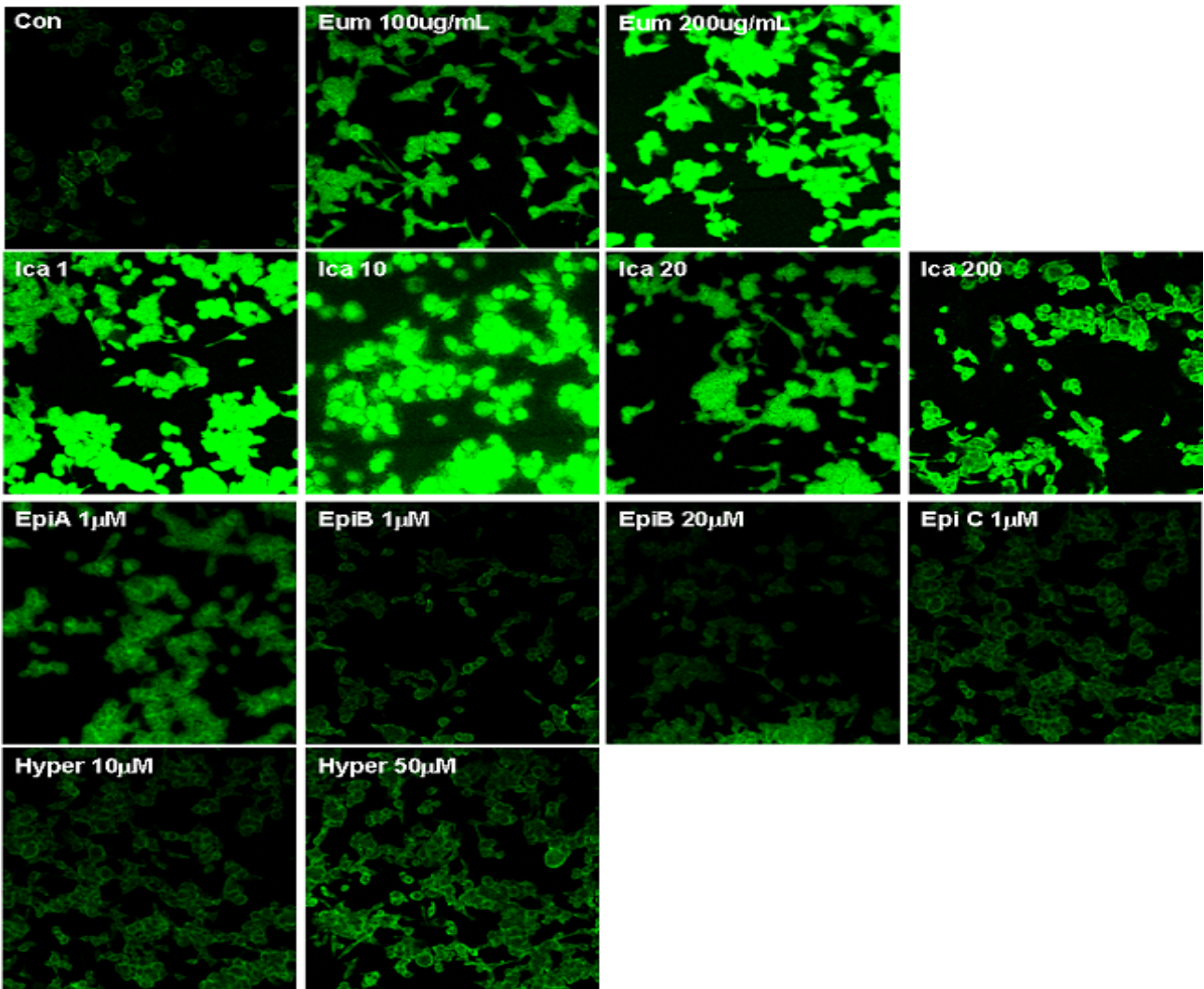


Figure 13. Effect of Epimedii herba extract and its components on the production of nitric oxide in LNCaP cells.

나. DNA microarray analysis

- 음양곽 70% EtOH 추출물과 icariin, epimedin B 및 hyperoside의 농도 및 시간에 따른 유전자 발현을 관찰하기 위하여 음양곽 추출물을 LNCaP 세포에 Scheme 1에서와 같은 조건으로 처리하여 실험을 실시하였다. DNA microarray 분석조건을 요약하였을 때 표 1과 같았다.
- DNA microarray 데이터를 분석조건에 따라 filtering 한 후 normalization 한 후 box plotting과 MA plotting을 filtering 하기 전의 것과 비교하여 normalization이 적절히 수행되었음을 확인하였다 (그림 14).
- Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y축은 Welch's T-test 결과를 나타냄)을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test < 0.05의 유의성을 나타내는 유전자를 검색하였다(그림 15, 표 2).

Table 1. Experimental and analysis conditions of DNA microarray for Epimedium herba extracts, icariin, epimedin B and hyperoside in LNCaP cells

		Experimental condition			
Epimedium herba	Time (4 conditions)	3hr (10 μ g)	6hr (10 μ g)	24hr (10 μ g)	48hr (10 μ g)
	Dose (4 conditions)	1 μ g(24h)	10 μ g(24h)	50 μ g(24h)	100 μ g(24h)
Icariin	Time (4 conditions)	3hr (0 μ M)	6hr (0 μ M)	24hr (0 μ M)	48hr (0 μ M)
	Dose (2 conditions)	x	1 μ M(24h)	x	10 μ M(24h)
Epimedin B	Time (4 conditions)	3hr (1 μ M)	6hr (1 μ M)	24hr (1 μ M)	48hr (1 μ M)
	Dose (2 conditions)	x	30 μ M(24h)	x	30 μ M(24h)
Hyperoside	Time (4 conditions)	3hr (10 μ M)	6hr (10 μ M)	24hr (10 μ M)	48hr (10 μ M)
	Dose (2 conditions)	x	50 μ M(24h)	x	50 μ M(24h)

- ◆ Array Type: ABI human chip
- ◆ Number of Total spots: 36179
- ◆ Data pre-processing
 - ◆ Quantile normalization
 - ◆ Data filtering: Signal to Noise ratio 3 미만의 spot이 전체 조건에서 30% 이상을 차지하는 spot과 Flag 100이상 제거
- ◆ Hierarchical clustering with complete linkage and similarity measure by Euclidean distance

◦ 그림 15의 Volcano plot으로부터 각 실험군의 처리시간 및 농도에 따른 유의 유전자를 계산하였을 때 표 2에서와 같이 처리시간이 길어질수록 유의 유전자 수가 증가하였다. 모든 처리군에서 3시간동안 처리했을 때 발현이 올라간 유전자보다는 감소한 것이 많았으며, 처리시간이 증가할수록 발현이 올라간 유전자 수가 상대적으로 많이 증가되었다. 그리고 예상외로 icariin이나 epimedin B의 고농도 처리에 의해 발현이 변화된 유전자 수가 저농도에서 변화된 유전자 수 보다 적은 것으로 나타났다. 그러나 hyperoside의 경우에는 10uM 처리에 의하여 유의적으로 변화된 유전자수가 icariin이나 epimedin B보다 적었으나 50uM에서 변화된 유전자수가 10uM에서 변화된 유전자 수보다 매우 크게 나타났다.

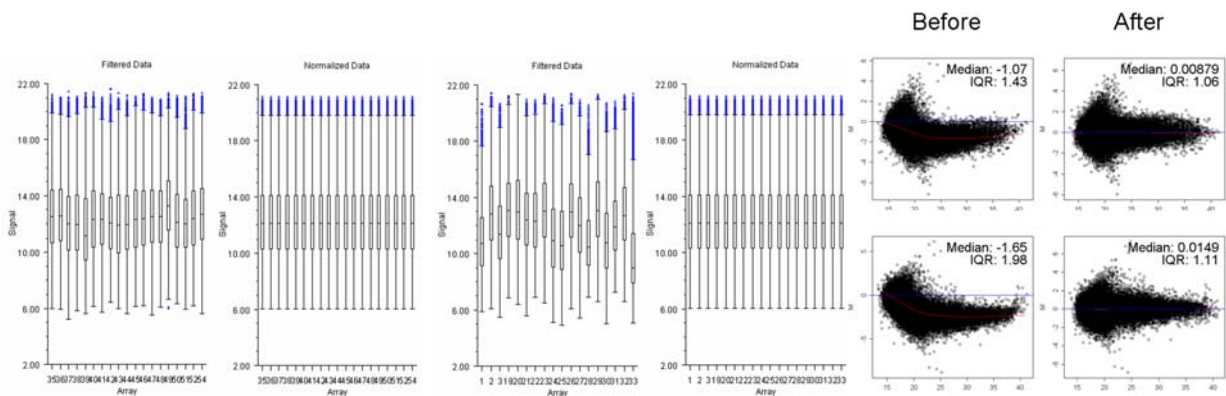


Figure 14. Images of box plot and MA plot in after and before the Normalization of data.

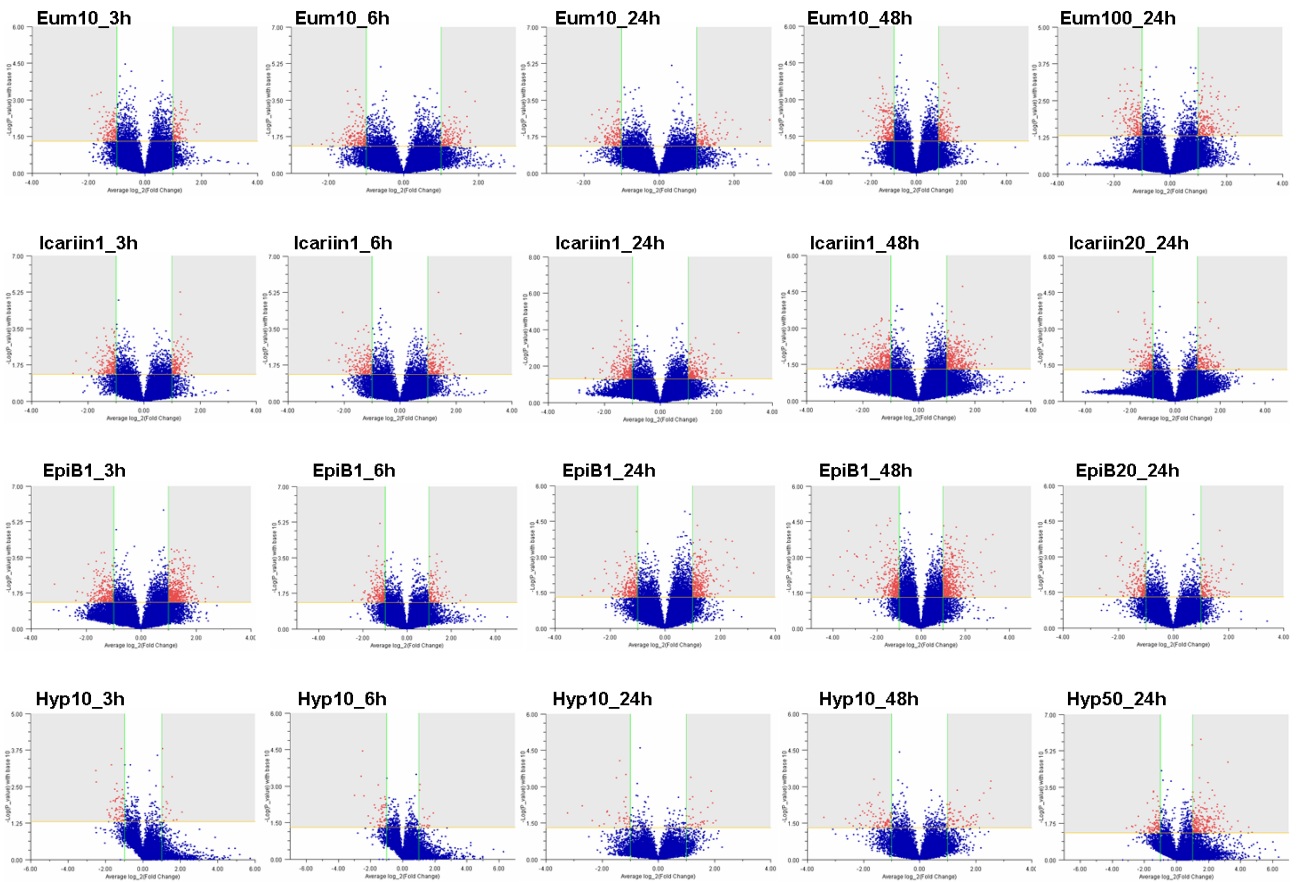


Figure 15. Volcano plots compared control to experiments for the selection of biomarker genes in *Epimedium herba* and its major components.

- 음양곽 추출물 및 그 분리물질들에 의하여 시간 및 용량에 따른 유의 유전자수를 모두 더하였을 때 음양곽 추출물은 757개 이었으며 icariin, epimedin B 및 hyperoside는 각각 1004, 1373 및 598개 이었다. 이들의 biological pathway를 관찰하기 위하여 gene annotation을 하였을 때 음양곽 추출물은 98개 (12.9%), icariin과 epimedin B는 각각 981 (97.7%)과 1345 (97.8%)개 그리고 hyperoside는 585 (98.0%)개의 유전자 기능을 알 수 있었다.
- 각 물질들의 처리에 의하여 얻어진 각각의 유의 유전자들을 처리시간과 처리 농도에 따라 나누어 합하여 처리 물질의 그룹별로 유전자 발현 변화를 관찰하였다 (그림 16).
- 음양곽의 EtOH 추출물의 경우 처리시간 및 처리용량에 따른 유의 유전자의 합은 757개로 그림 16-a에서와 같이 7개의 cluster로 나누었을 때 3시간부터 유전자발현이 증가한 후 24시간에는 발현이 감소되는 유전자수가 가장 많았으며, 그 다음은 3시간부터 유전자 발현이 유도되기 시작하여 48시간 동안 지속적으로 증가되는 유전자수가 그 뒤를 이었다. 처리농도에 따른 유전자 변화는 농도 의존적으로 증가하는 유전자 수가 가장 많았으며, 그 뒤로 저농도에서는 유전자 발현이 감소하다 고농도에서 증가하는 것이 다음으로 많았다.

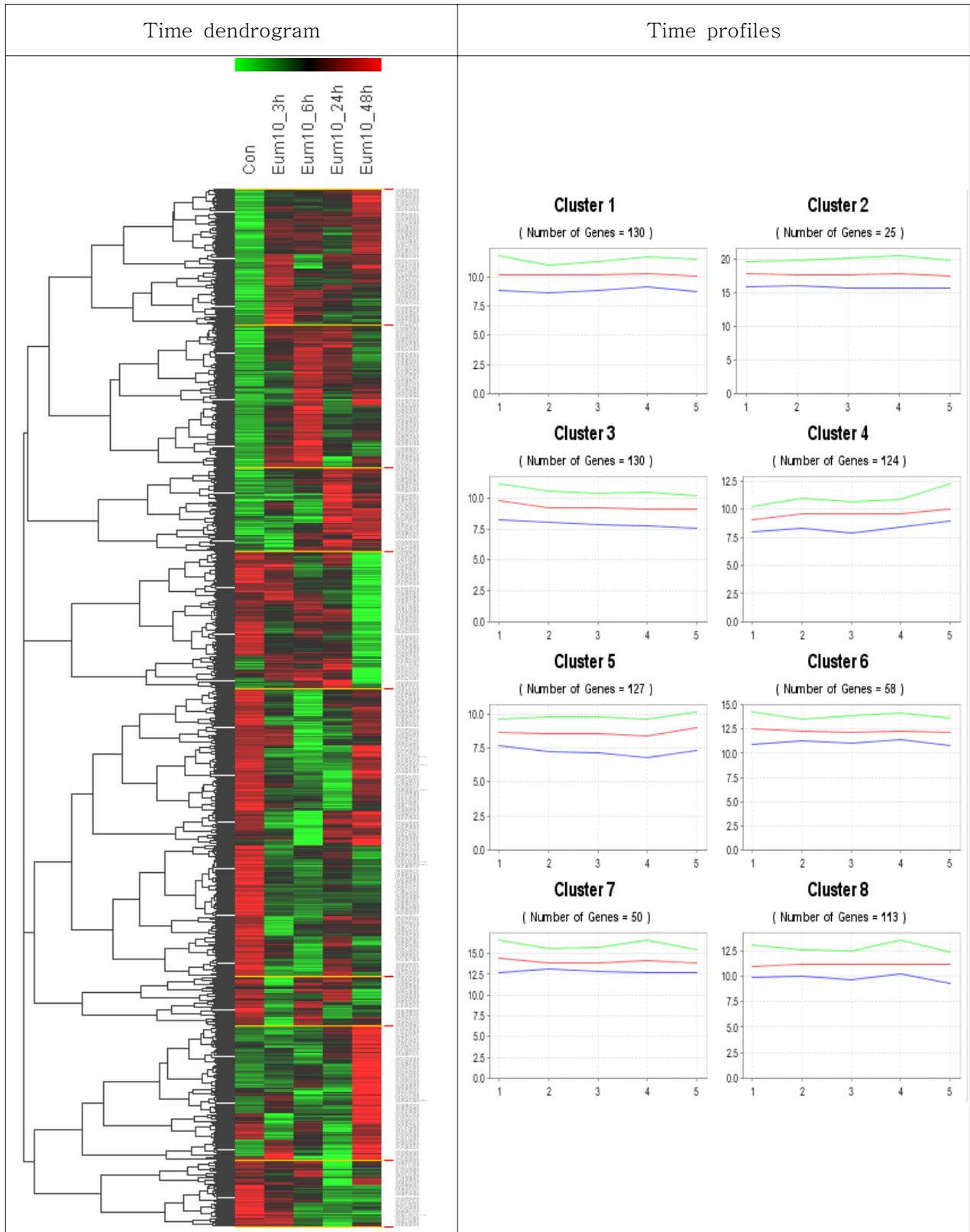
Table 2. Gene numbers satisfied the conditions; Fold changes>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups.

	Exp Name	Gene Number				Annotation
		Up	Down	Common	Total	
Eum_Ext	Eum10_3h	52	64			
	Eum10_6h	92	127			
	Eum10_24h	61	95	1	757	98
	Eum10_48h	119	107			
	Eum100_24h	103	67			
Icariin	Icariin1_3h	32	129			
	Icariin1_6h	92	83			
	Icariin1_24h	136	130	0	1004	981
	Icariin1_48h	237	190			
	Icariin20_24h	71	36			
Epimedin B	EpiB1_3h	396	104			
	EpiB1_6h	70	67			
	EpiB1_24h	163	154	3	1373	1345
	EpiB1_48h	312	292			
	EpiB20_24h	61	99			
Hyperoside	Hyp10_3h	16	59			
	Hyp10_6h	15	55			
	Hyp10_24h	41	41	0	598	585
	Hyp10_48h	76	88			
	Hyp50_24h	217	90			

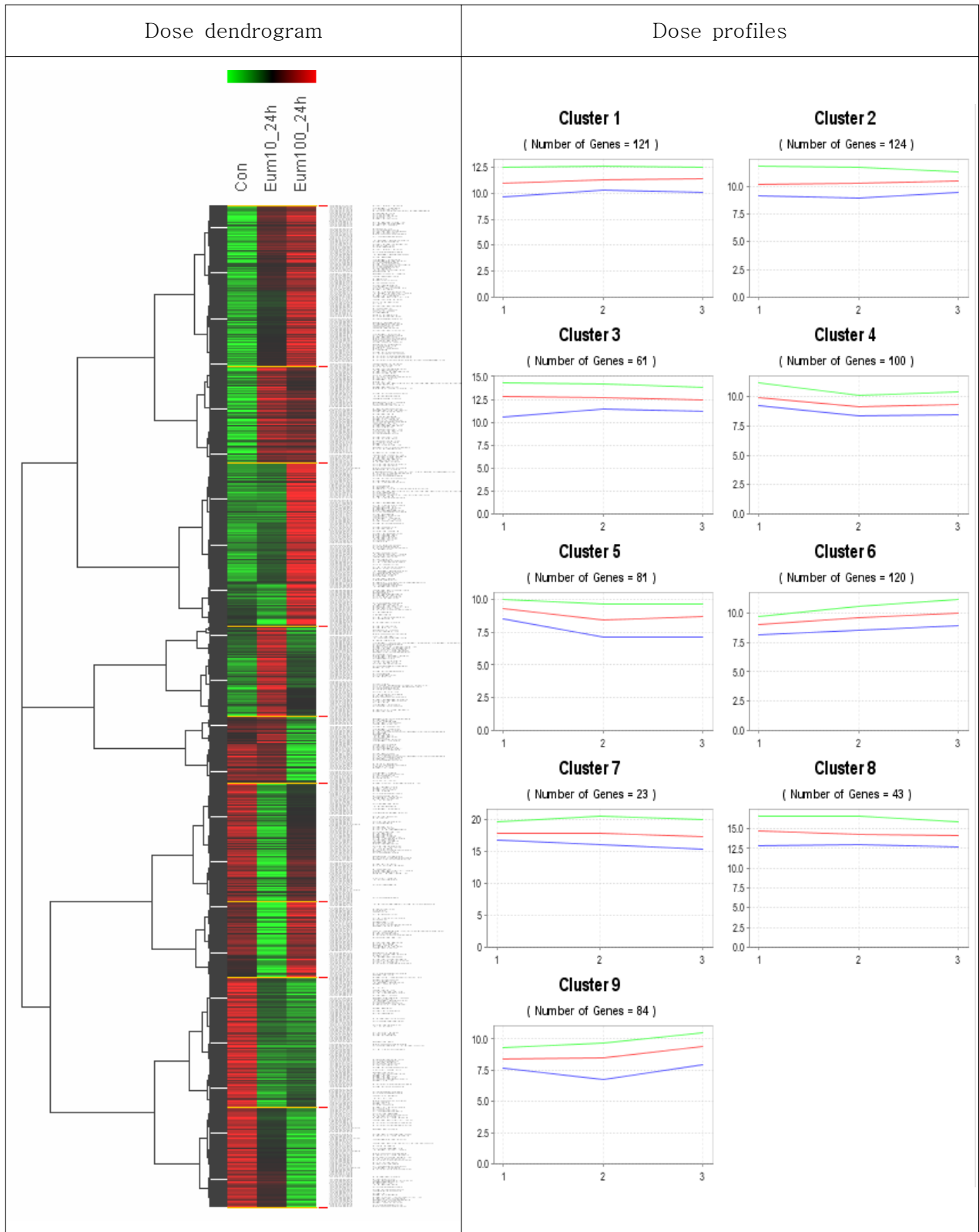
- Icariin의 경우에는 처리시간 및 처리용량에 따른 발현 변화를 유의 유전자 1004개로 관찰하였다. 처리시간에 따른 유전자는 3시간부터 지속적으로 증가되는 유전자 수가 가장 많았으며, 다음에는 48시간동안 계속 감소되는 발현 양상을 나타내는 유전자 수가 그 다음을 이뤘다. 처리용량에 따른 발현 변화는 그림 16-b에서와 같이 1uM에서 발현이 증가하지 않다가 20uM에서 20uM 으로 발현이 증가하는 유전자 수가 가장 많았다.
- Epimedin B는 유의 유전자 1373개로 처리시간 및 처리용량에 따른 발현 변화를 관찰하였다. 유전자 발현 양상을 처리시간 및 처리 용량에 따라 각각 10종으로 나누었을 때 그림 16-c와 같았다. Epimedin B는 유의유전자 숫자가 다른 물질들 보다 많았으며, 특히 처리시간에 따른 유의 유전자는 1302종 이었으나 농도에 따른 유의 유전자는 421종 이었다.
- Hyperoside는 유전자 발현변화를 유의 유전자 598개로 관찰하였을 때 그림 16-d와 같이 처리시간 및 처리용량에 따라 각각 16 가지와 8가지로 발현 양상으로 나누었다. 발현양상이 초기에는 감소하였다가 시간이 지날수록 증가하는 양상을 나타내는 유전자가 가장 많았고, 그 다음에는 초기에는 증가하였다가 시간이 지날수록 감소하는 양상을 나타내는 유전자가 많았다.

Figure 16. Cluster analysis of time- and dose-dependent expression data in LNCaP cells treated with 70% ethanol extract of *Epimedii herba*, icariin, epimedinin B and hyperoside.

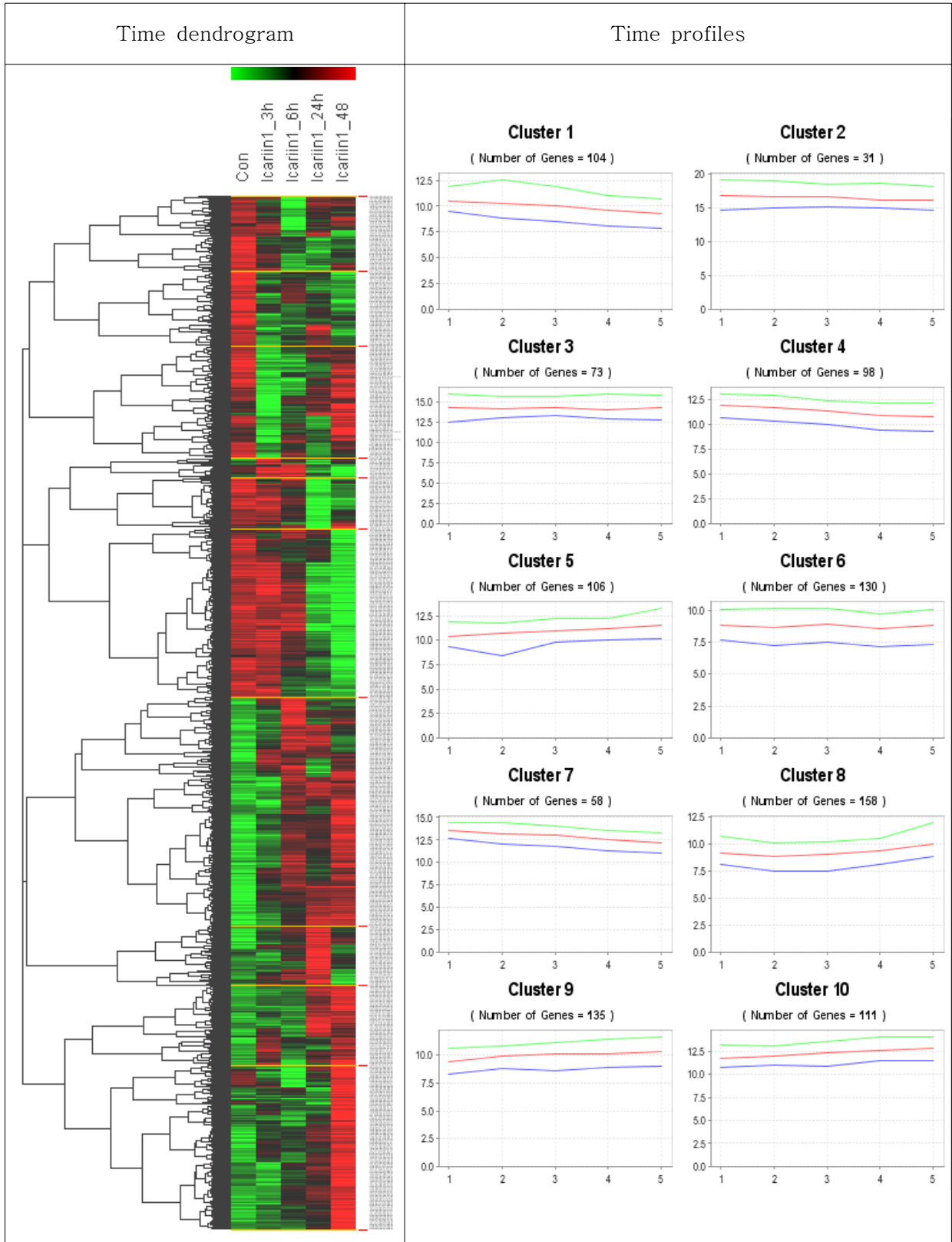
a-1. 70% ethanol extract of *Epimedii herba* (time dependent expression)



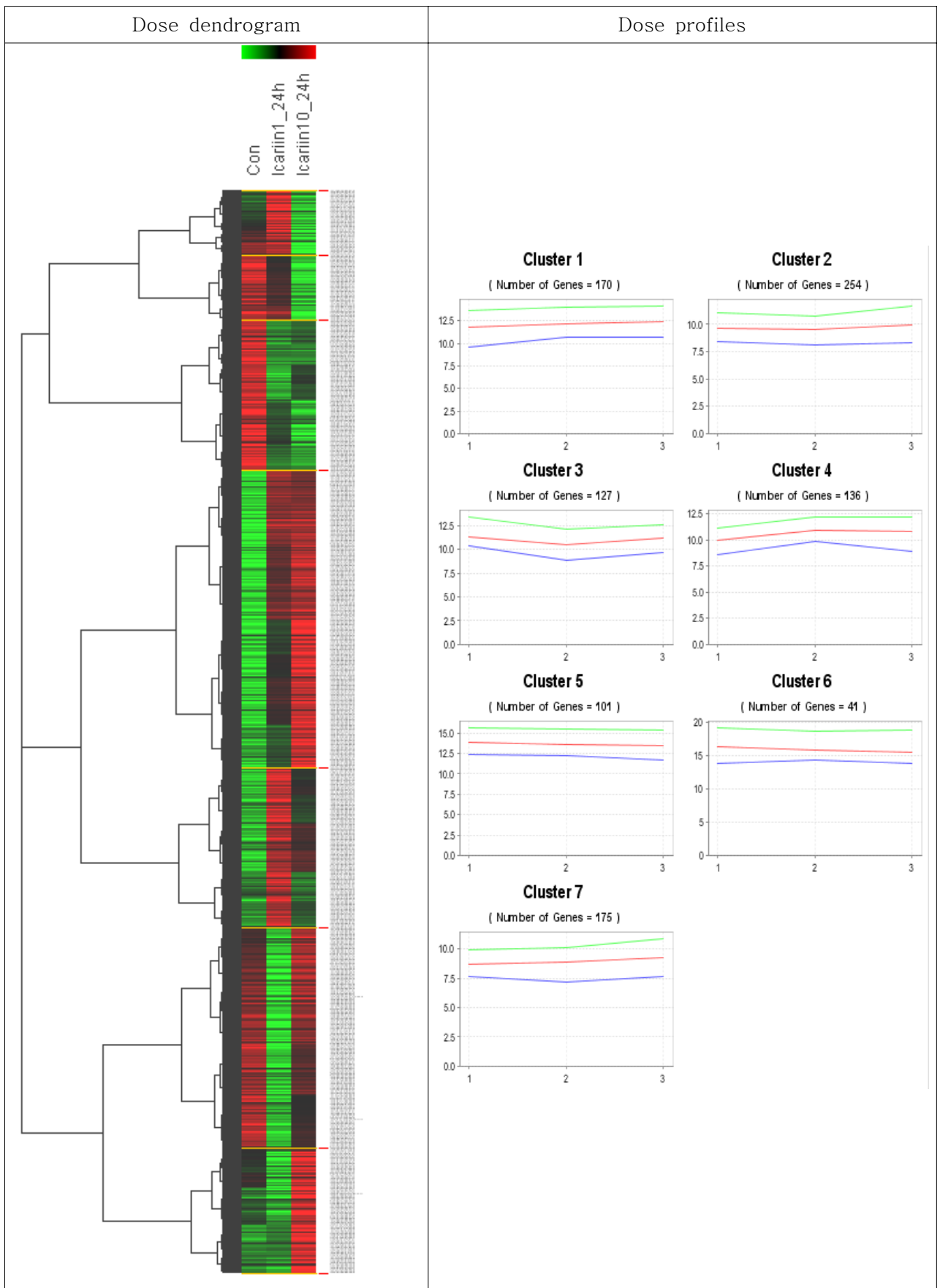
a-2. 70% ethanol extract of *Epimedii herba* (dose dependent expression)



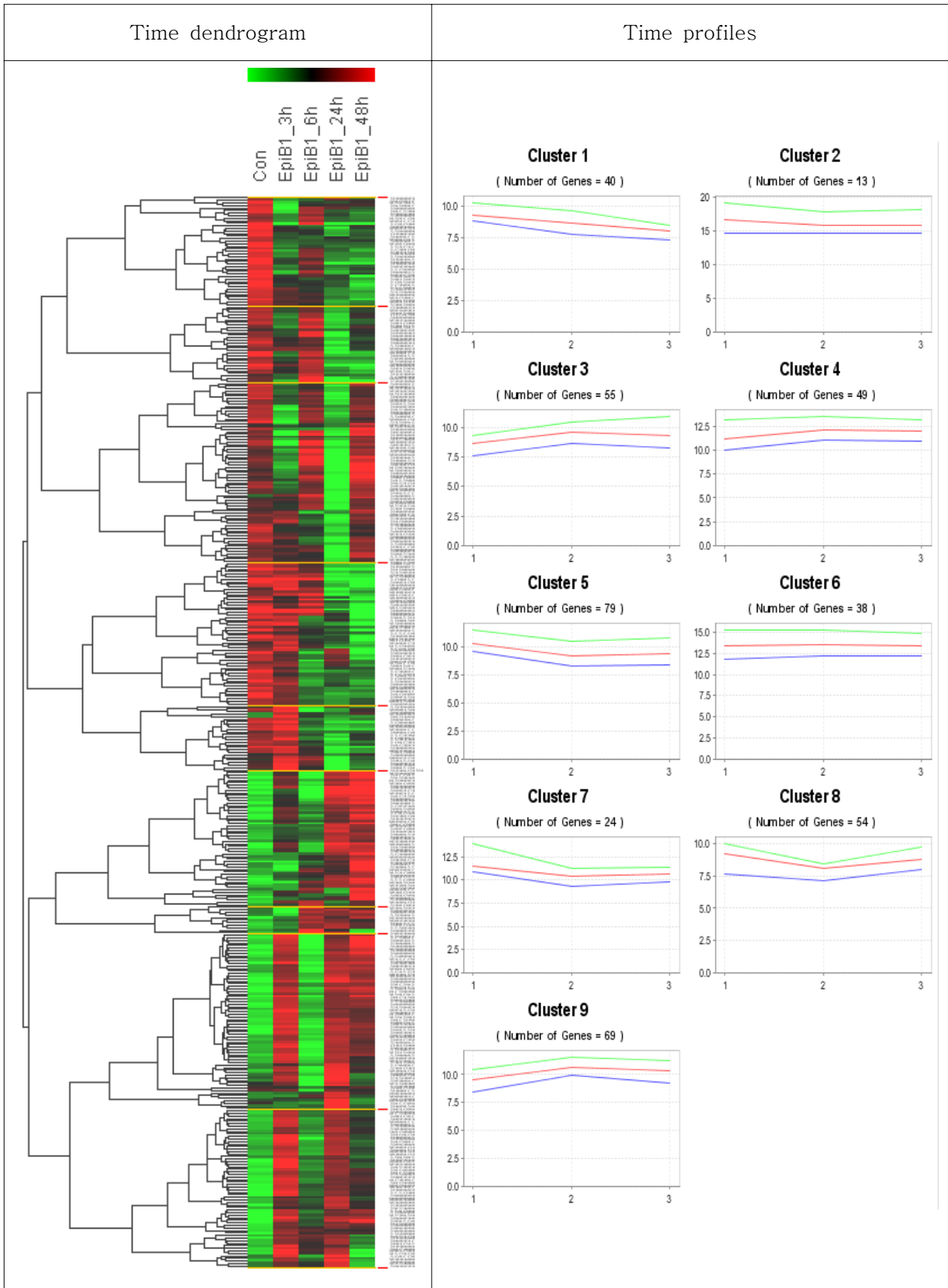
b-1. Icariin (time dependent expression)



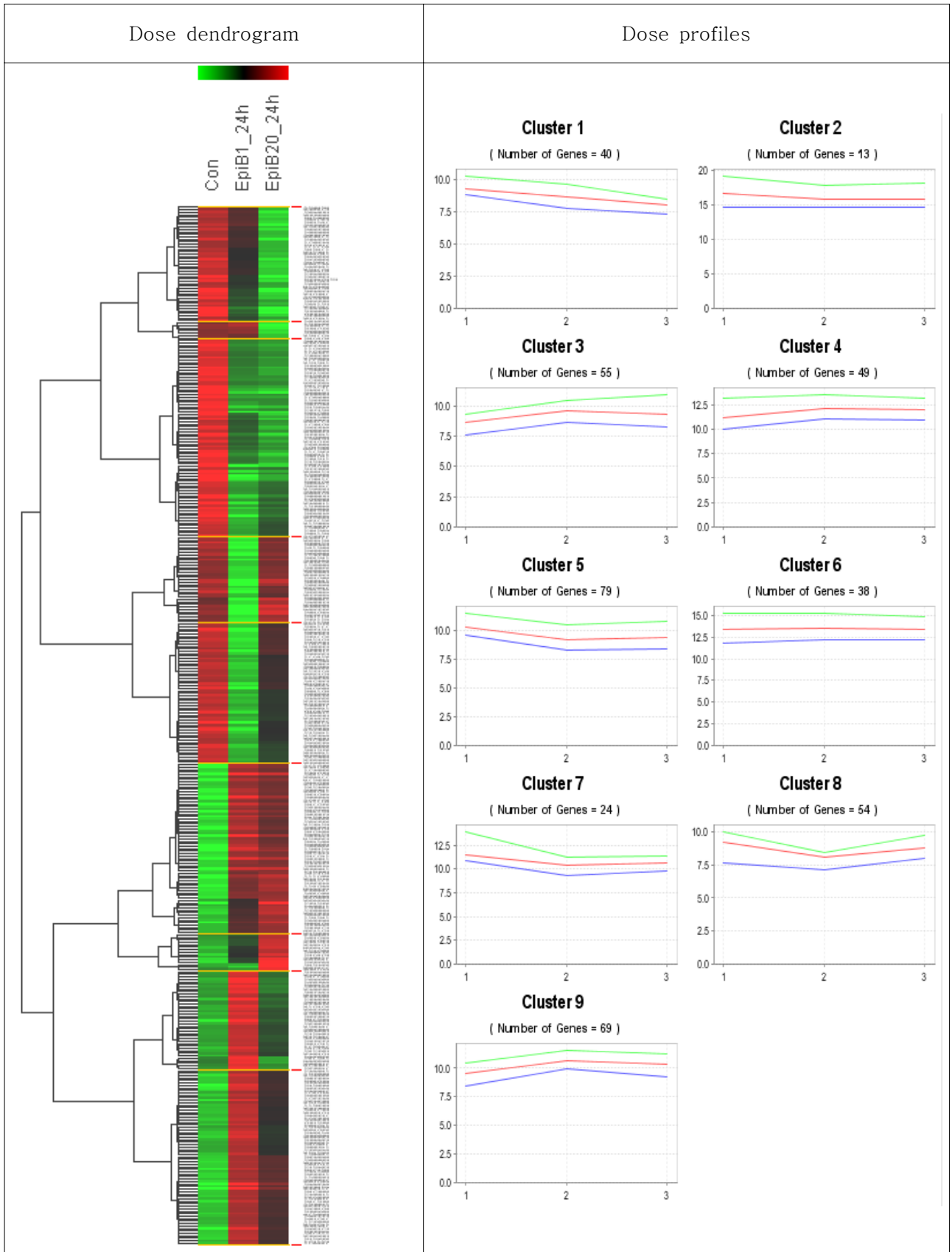
b-2. Icarin (dose dependent expression)



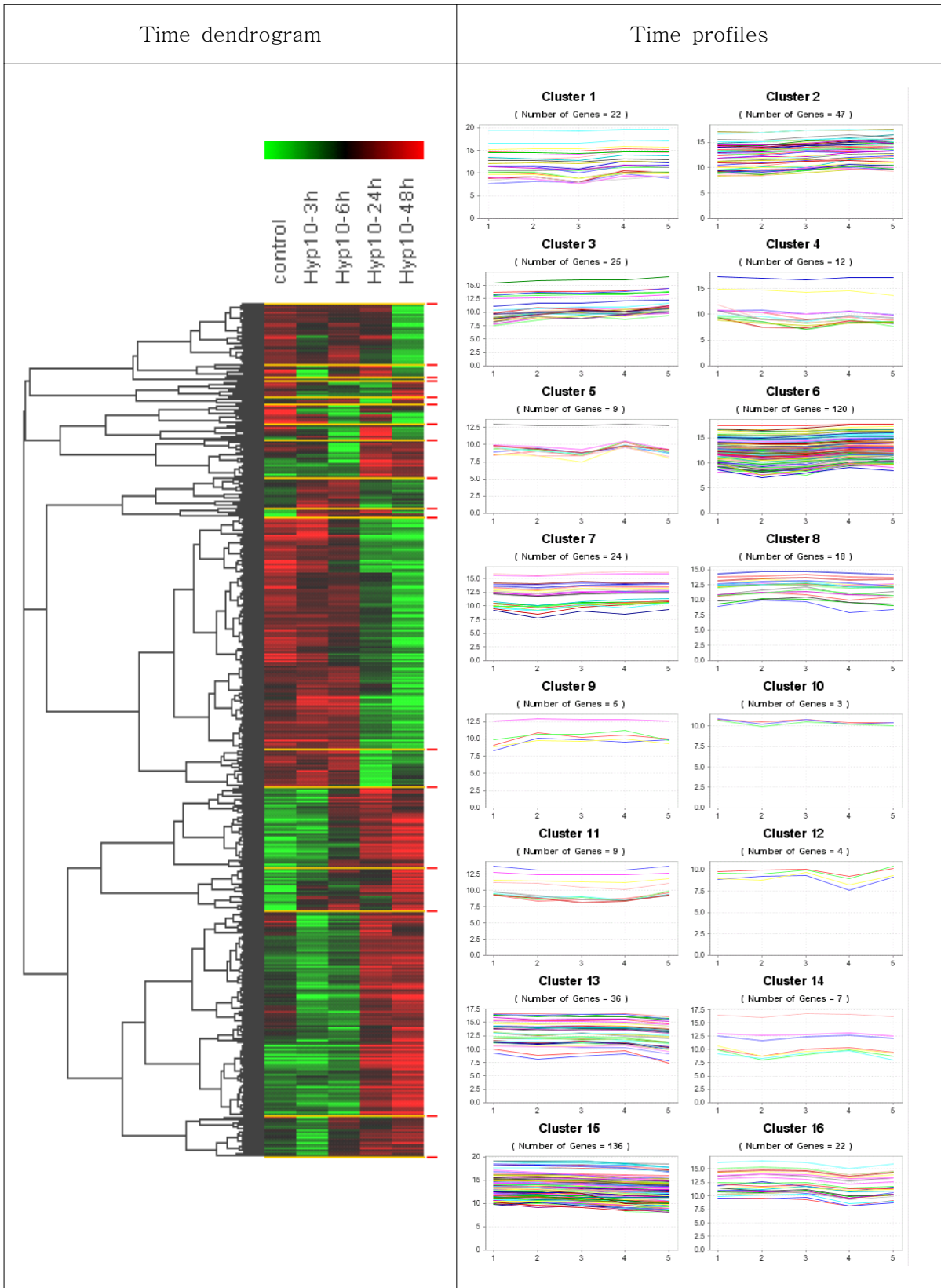
c-1. Epimedin B (time-dependent expression)



c-2. Epimedin B (dose-dependent expression)



d-1. Hyperside (time-dependent expression)



d-2. Hyperside (dose-dependent expression)

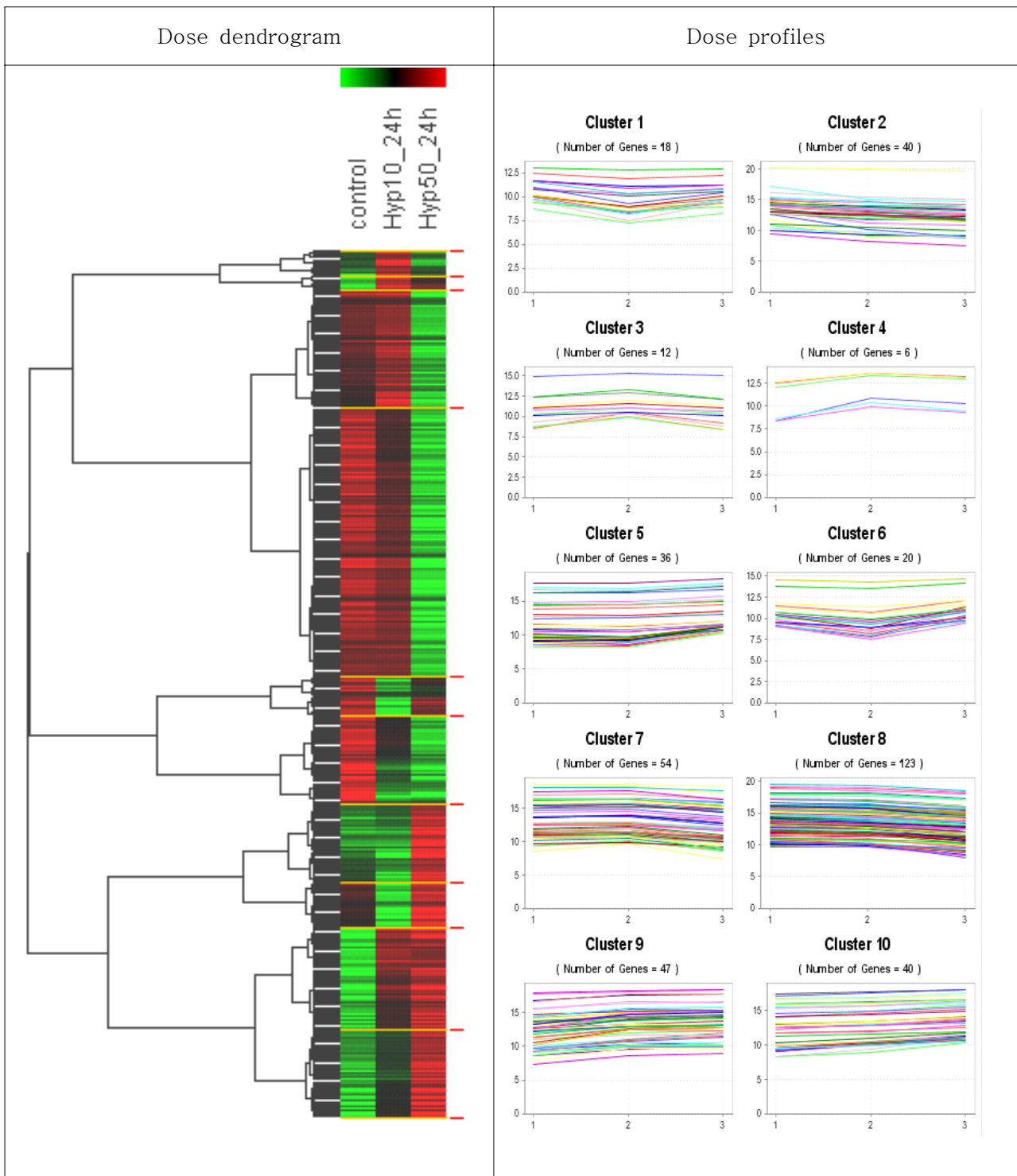


Table 3. Major biological pathways of significant genes selected from Volcano plot of Epimedium herba, icariin, epimedium B and hyperoside.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

KEGG Pathway	Gene Counts
Wnt signaling pathway	8
T cell receptor signaling pathway	7
Insulin signaling pathway	7
GnRH signaling pathway	7
Purine metabolism	6
Neuroactive ligand-receptor interaction	6
MAPK signaling pathway	6
Gap junction	6
Focal adhesion	6
Calcium signaling pathway	6
Adherens junction	6

b. Icariin

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	15
Wnt signaling pathway	11
Regulation of actin cytoskeleton	10
Insulin signaling pathway	10
Cell cycle	10
Axon guidance	10
Purine metabolism	9
Calcium signaling pathway	8
Pyrimidine metabolism	7
Natural killer cell mediated cytotoxicity	7
Gap junction	7
Cytokine-cytokine receptor interaction	7

c. Epimedin B

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	19
Regulation of actin cytoskeleton	16
Focal adhesion	13
Cell Communication	12
Calcium signaling pathway	12
Neuroactive ligand-receptor interaction	11
Glycan structures - biosynthesis 1	11
Cytokine-cytokine receptor interaction	10
Insulin signaling pathway	9
GnRH signaling pathway	8
Gap junction	8
Cell cycle	8

d. Hyperoside

KEGG Pathway	Gene Counts
MAPK signaling pathway	12
Starch and sucrose metabolism	9
Androgen and estrogen metabolism	8
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6
Tight junction	5
Regulation of actin cytoskeleton	5
Porphyrin and chlorophyll metabolism	5
Pentose and glucuronate interconversions	5
Oxidative phosphorylation	5
Insulin signaling pathway	5
Wnt signaling pathway	4

- Volcano plot에서 선별된 유전자 총 757에 대한 음양곽 추출물에 대한 biological pathway을 관찰하였을 때 12.9%에 해당하는 98개의 유전자 만이 유전자 기능이 알려진 것으로 그 중에서 상위 11종의 biological signal pathway는 표 3과 같았다.
- 음양곽 추출물에 의하여 유전자 발현변화가 가장 많이 있는 것은 암진이와 관련된 Wnt 경로이며, T cell receptor signaling pathway, Insulin signaling pathway, GnRH signaling pathway 등이 그 뒤를 이었다.
- 음양곽 70% EtOH 추출물의 주 성분인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 의하여 발현이 변화된 유전자의 기능 중 공통적으로 MAPK signaling pathway가 가장 크게 변화되었다. 그러나 음양곽

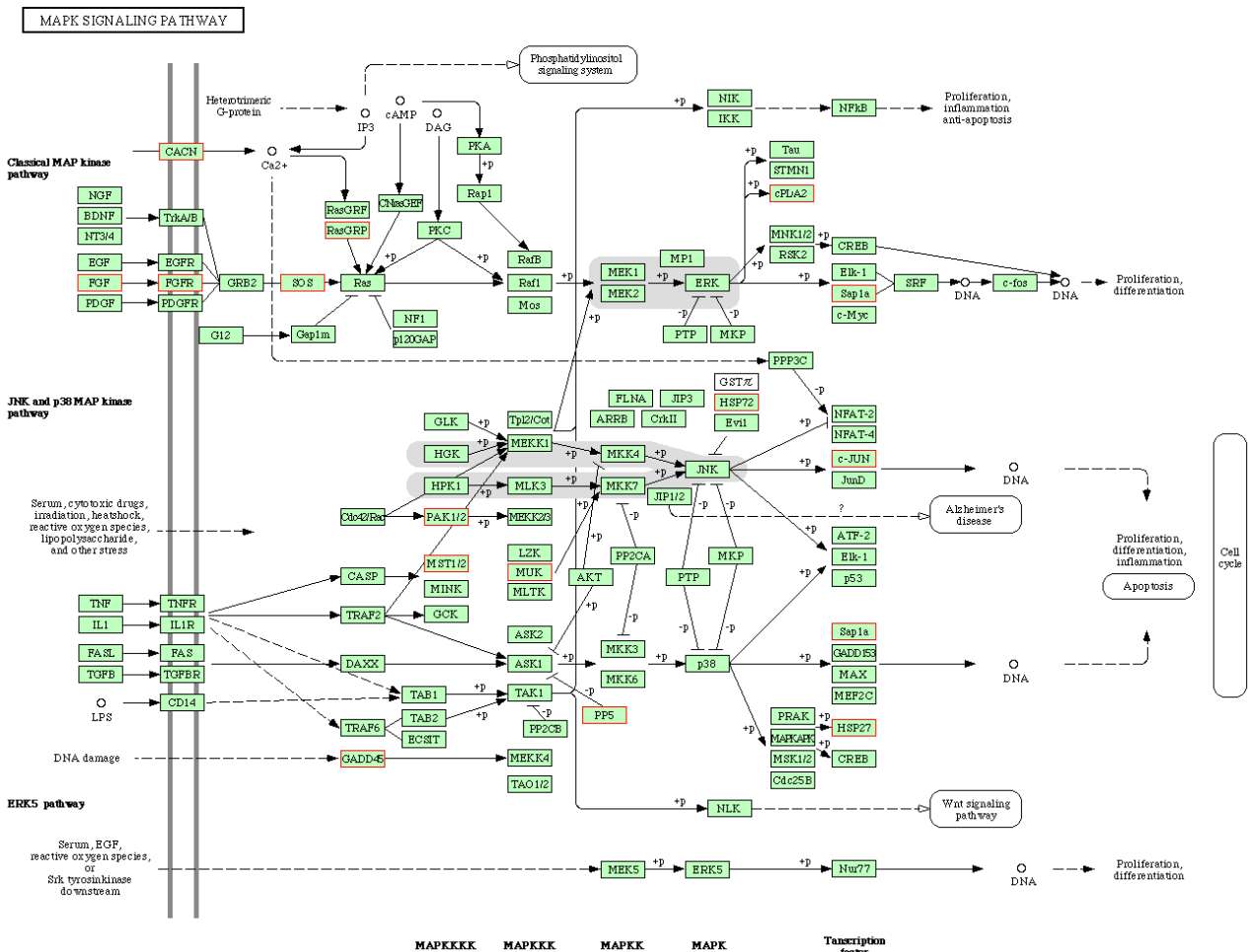


Figure 17. Significant genes selected by treating the 70% extract of Epimedium herba in MAPK signal pathway

추출물에 의하여 변화된 유전자 기능에서 MAPK signal pathway (그림 17)에 관련된 유전자 수는 대 표적 구성 성분에 의한 것 보다는 숫자가 작았다.

- 음양곽 추출물 및 그 주성분에 의한 성기능 관련 유전자들의 변화는 본 실험디자인에서는 관찰할 수 가 없었으며, 특히 음양곽 추출물과 icariin에 의한 PDE5에 의한 NO 증가에 의한 성기능 향상에 관 련한 pathway는 나타나지 않았으나, hyperoside에 의하여 estrogen과 androgen metabolism에 관여하 는 유전자의 발현과 음양곽 추출물에서 GnRH 경로에 관여하는 유전자들의 발현이 변화되었다.
- DNA microarray 실험결과 음양곽 추출물에서 가장 많은 유전자에 영향을 미칠 수 있는 biological pathway는 Wnt pathway로 8종의 단백질이 이에 영향을 미치고 있으며, icariin이나 epimedin B 역 시 각각 11종과 6종의 단백질이 영향을 미치는 것으로 나타났다 (표 4). 이들을 비교하였을 때 음양 곽 추출물에 의하여는 Wnt 경로 중 DVL2와 PRKY와 발현이 증가되고 NFAT5, FZD9, PLCB3, CSNK1E, NFATC1 등은 발현이 감소되어 총체적으로 발현이 증가되는 것 보다는 발현 감소가 더욱 우세하였다. 반면에 icariin의 경우에는 MMP7, Wnt7A, 및 PRKCG의 발현량이 증가하였으며, epimedin B의 경우에는 JUN 및 PLCB3 만이 감소되었고 FZD3, WNT5A, WNT7A, VANGL2는 증 가하였다. NEAT5는 icariin과 음양곽 추출물에서 발현이 크게 감소하였고, NFATC1 역시 두 종의 약물에서 감소되었다. 그러나 음양곽 추출물이나 icariin 과는 달리 epimedin B의 경우 Wnt pathway

Table 4. Effect of Epimedii herba extract, icariin and epimedin B on the Wnt pathway in LNCaP cells.

Probe ID	Gene Symbol	Con	Eum10_3h	Eum10_6h	Eum10_24h	Eum10_48h	Eum100_24h
111052	DVL2	1.16	4.02	3.12	3.07	3.10	3.94
126969	NFAT5	1.29	0.49	0.45	0.49	0.47	0.46
145949	NFAT5	1.10	1.12	0.41	0.70	1.13	0.78
148434	FZD9	1.02	0.64	0.49	0.87	0.90	1.01
175969	PLCB3	1.11	0.97	1.34	1.27	0.49	0.96
181860	PRKY	1.04	4.02	3.12	3.07	3.10	3.94
196110	CSNK1E	1.05	0.73	0.54	0.82	0.42	0.48
212217	NFATC1	1.06	0.77	0.49	0.73	0.84	0.47

Probe ID	Gene Symbol	Con	Icariin1_3h	Icariin1_6h	Icariin1_24h	Icariin1_48h	Icariin10_24h
126969	NFAT5	0.82	0.27	0.62	0.60	0.52	0.85
145919	MMP7	1.58	2.52	2.54	3.87	2.94	2.05
145949	NFAT5	0.90	0.54	0.62	0.75	0.58	0.65
164611	WNT7A	1.21	1.58	2.45	2.43	2.27	2.28
181860	PRKY	0.95	0.69	0.59	0.50	0.79	0.83
196110	CSNK1E	0.96	0.53	0.40	0.54	0.76	0.26
200152	CAMK2B	0.91	0.61	0.28	0.47	0.62	0.37
201970	DKK2	1.44	0.33	0.82	0.63	1.39	3.11
212217	NFATC1	0.98	0.70	0.78	1.36	1.13	0.34
212244	PRKCG	1.27	2.29	2.34	1.41	2.18	3.72
227829	CAMK2B	0.95	0.58	0.41	0.46	0.57	0.28

Probe ID	Gene Symbol	Con	Epi1_3h	Epi1_6h	Epi1_24h	Epi1_48h	Epi20_24h
118274	FZD3	1.05	2.56	1.62	2.63	2.43	2.17
123273	JUN	1.69	0.49	0.89	0.21	0.75	0.55
139494	WNT5A	1.09	2.22	1.80	3.23	2.04	1.56
164611	WNT7A	1.15	2.30	1.17	1.63	1.96	1.57
165348	VANGL2	1.02	2.60	0.97	1.62	2.47	1.08
175969	PLCB3	1.11	0.45	1.34	0.64	1.07	0.86

가 더욱 활성화될 것으로 예상되었다. 이러한 결과는 음양곽의 주성분인 icariin이 Wnt 경로에 영향을 미쳐서 음양곽 추출물 역시 Wnt 경로에 영향을 미칠 것으로 사료되었으며, icariin과 epimedin B는 모핵은 prenylflavonoid로 같으나 붙어있는 당이 다른 물질로 in vitro 실험에서는 당 부분 역시 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

◦DNA microarray 실험결과로부터 음양곽 70% EtOH 추출물과 주성분인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 의하여 발현이 변화된 약리 효능 유전자들을 선정하기 위하여 각 물질 군 중에서 처리 농도별 유의 유전자를 중심으로 하여 Welch's T-test에서 $P < 0.05$ 이고, $0.5 < \text{fold induction} > 2$ 인 유전자를 선정하여 그 중에서 유전자명이 있는 유전자를 약리효능 선정하였다 (표 4).

◦음양곽 70% EtOH 추출물 처리군은 42개의 유의 유전자가 선정되었으나 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 24개이었으며 (표5-a), 이들 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.

Table 5. Pharmacological active genes selected from the groups of Epimedium herba, icariin, epimedium B and hyperoside.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

ID	10_3h	10_6h	10_24h	10_48h	100_24h	Gene_Name
187003	0.46	0.73	0.60	0.51	0.27	type I hair keratin KA35
152190	0.62	0.59	0.65	0.33	0.36	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12
197857	0.78	0.75	0.85	0.43	0.45	acid-inducible phosphoprotein; cisplatin resistance-associated overexpressed protein
107304	0.82	1.10	0.89	0.37	0.48	chromosome 18 open reading frame 24
204547	0.50	0.53	0.72	0.51	0.49	chromosome 22 open reading frame 8
141522	0.70	0.53	0.64	0.41	0.49	hypothetical protein LOC51252
160171	1.76	2.00	1.55	2.20	2.09	hypothetical protein FLJ20534
192781	1.57	1.61	1.26	1.92	2.11	suppressor of cytokine signaling 6
156541	1.52	0.73	0.76	0.78	2.15	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 14
138964	1.06	1.18	2.40	1.62	2.16	phosphoglycerate kinase 1
127002	1.70	1.61	0.96	2.88	2.16	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)
132554	0.96	1.34	2.07	1.93	2.18	insulin induced gene 2
141890	1.18	0.96	0.82	1.44	2.19	WAP four-disulfide core domain 8
109165	0.94	1.05	1.87	1.41	2.24	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
169650	1.65	1.47	0.94	1.33	2.34	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1
125119	2.47	2.70	2.34	3.65	2.80	RALBP1 associated Eps domain containing 2
199871	1.03	0.63	1.55	2.52	3.13	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1
131512	1.83	1.91	1.67	2.11	3.35	hypothetical protein MGC10744
218420	1.33	0.84	0.86	1.07	3.38	hypothetical protein MGC26989
176082	0.69	0.77	4.27	1.98	3.56	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase) 2
178866	1.21	0.57	0.43	1.08	3.74	leucine rich repeat containing 19
105946	1.12	1.18	2.18	1.33	4.82	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A
227204	1.88	1.09	1.08	1.32	5.08	hypothetical protein LOC90768
109421	0.96	1.36	7.71	3.38	5.44	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12

b. Icariin

ID	1_3h	1_6h	1_24h	1_48h	10_24h	Gene_Name
120417	1.56	1.19	1.01	1.32	0.29	hypothetical protein FLJ23825
151336	0.92	0.98	0.31	0.19	0.49	Fanconi anemia, complementation group D2
122793	0.57	1.17	2.39	1.73	0.82	hypothetical protein DKFZp434G0625
112997	1.45	0.94	0.46	0.43	1.13	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
208509	0.52	0.46	0.45	0.35	1.57	aminomethyltransferase (glycine cleavage system protein T); nicotin 1
177096	0.87	1.51	2.18	4.09	1.70	hypothetical protein MGC26989
117336	0.89	0.54	0.50	0.96	1.85	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 1
212750	1.07	0.65	0.78	0.80	2.02	hypothetical protein FLJ90231
217622	0.64	0.57	0.62	0.59	2.19	mannan-binding lectin serine protease 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)
705413	1.76	0.75	1.69	0.95	3.46	FLJ35767 protein
168970	1.34	0.70	0.45	0.59	3.85	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N
120350	1.70	0.56	1.52	2.18	4.07	zinc finger protein 537
231889	0.83	0.96	1.06	0.86	4.09	calcium channel, voltage-dependent, alpha 11 subunit
135605	0.84	0.91	1.16	0.75	4.98	tweety homolog 1 (Drosophila)
124914	1.35	1.50	1.05	1.48	5.65	laminin, beta 4

c. Epimedin B

ID	1_3h	1_6h	1_24h	1_48h	20_24h	Gene_Name
174706	0.11	1.01	0.22	0.18	0.19	sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase) A
158378	0.81	0.54	0.30	0.20	0.35	transmembrane, prostate androgen induced RNA
130316	0.28	0.61	0.31	0.37	0.45	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6
135086	0.52	6.43	0.32	0.49	0.16	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
113737	0.35	0.43	0.38	0.39	0.36	tribbles homolog 3 (Drosophila)
201259	0.62	0.74	0.41	0.28	0.54	progastricsin (pepsinogen C)
169853	0.52	0.65	0.42	0.35	0.42	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)
117183	0.47	0.47	0.43	0.29	0.38	FK506 binding protein 5
162911	0.38	0.85	0.44	0.37	0.28	thrombospondin 1
115926	0.45	0.80	0.47	0.45	0.46	24-dehydrocholesterol reductase
213519	2.94	1.81	2.65	2.69	2.06	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2
118274	2.51	1.56	2.76	2.37	2.06	frizzled homolog 3 (Drosophila)
114422	3.04	1.54	2.76	2.75	2.00	collectin sub-family member 12
183458	2.10	1.04	2.77	3.10	1.82	mannosidase, endo-alpha
111748	1.37	1.70	2.82	4.00	3.33	protease, serine, 11 (IGF binding)
216999	2.74	0.92	2.93	3.47	1.42	chromosome 20 open reading frame 100
147316	1.33	0.77	3.10	3.06	1.51	POU domain, class 2, transcription factor 3
203726	3.63	1.36	3.20	2.29	1.63	poly(A) binding protein, cytoplasmic 5
101592	2.23	1.92	3.37	3.95	1.82	ARP10 protein
167316	4.62	1.12	3.44	4.52	2.18	matrilin 2
125526	3.14	0.88	3.61	2.85	1.24	tripartite motif-containing 2
151904	2.55	0.69	4.05	7.73	2.91	ceramide kinase
116915	3.63	1.41	4.35	3.91	2.94	leucine rich repeat neuronal 1
108283	0.86	0.79	4.64	3.32	0.92	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
123436	3.76	1.00	4.81	3.65	2.03	BMX non-receptor tyrosine kinase
140953	4.28	0.90	5.43	9.71	3.81	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
154434	6.23	2.97	6.12	5.10	3.50	amphoterin induced gene 2
122174	7.00	4.20	9.29	9.18	5.67	cerebellin 2 precursor

d. Hyperoside

Probe ID	Hyp10_3h	Hyp10_6h	Hyp10_24h	Hyp10_48h	Gene _Name
204743	0.15	0.12	0.12	0.11	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
101377	0.61	0.46	0.27	0.21	cell death-inducing DFFA-like effector b
169853	0.65	0.52	0.28	0.22	NK3 transcription factor related, locus 1 (Drosophila)
173876	1.03	0.89	0.36	0.33	membrane bound O-acyltransferase domain containing 2
194271	0.84	0.62	0.38	0.46	transmembrane protease, serine 2
117183	1.15	0.81	0.42	0.29	FK506 binding protein 5
169984	0.78	0.74	0.44	0.38	selenoprotein P, plasma, 1
702618	0.78	0.69	0.46	0.26	FLJ44715 gene product
114304	1.46	1.37	2.01	2.32	homeobox C13
168773	1.07	1.16	2.12	2.24	homeobox C9
188051	1.18	1.17	2.29	2.65	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
122174	1.24	2.11	2.35	2.14	cerebellin 2 precursor
116915	0.88	0.94	2.36	2.82	leucine rich repeat neuronal 1
171247	0.50	0.77	2.39	3.11	tetraspanin 7
167743	1.15	1.16	2.43	2.96	chromosome 20 open reading frame 102
116423	1.49	1.52	2.61	3.41	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 3
182844	1.03	1.46	3.01	3.97	golgi phosphoprotein 3-like
111620	1.16	1.98	3.29	4.36	deiodinase, iodothyronine, type I
209603	1.09	1.01	3.45	5.77	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1
140953	0.81	0.87	3.71	5.89	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
192802	1.17	0.74	3.99	6.62	hypothetical protein DKFZp566J091

- Icariin 처리군의 경우에는 유의 유전자 수가 35개로 다른 그룹에 비하여 적게 선정되었으며, 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 15개이었으나 (표5-b), 이들 역시 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.
- Epimedin B 처리군의 경우에는 유의 유전자수가 53개 이었으며, 그 중 유전자 효능이나 이름이 있는 것은 28개이었으며 (표5-c), 이들 역시 유전자간의 상호 공통 biological pathway를 공유하고 있는 것은 없었다.
- Hyperoside 처리군의 경우에는 유의유전자 선정을 음양곽 추출물이나 icariin 및 epimedin B와 달리 처리시간에 따른 유전자 발현을 중심으로 하였다. Hyperoside 10uM로 24시간과 48시간동안 처리하였을 때 Welch's T-test에서 $P < 0.05$ 이고, $0.5 < \text{fold induction} > 2$ 인 유전자들을 중 공통적인 유의 유전자를 선정하였다. 선정된 유의 유전자 중 유전자명이 있으며, 그 signal 값이 전체적으로 2⁸개 이상인 것을 유전자를 약리효능 유전자로 선정하였다. 선정된 유의 유전자는 총 27개로 그 중 24개가 gene name이 있었으나 그 중 3개가 signal 값이 너무 작아 탈락되어 표 5-d와 같이 21개의 유전자를 약리효능 유전자로 선정하였다.

다. DNA microarray 결과 검증

- 음양곽 및 그 추출물질 3종에 대해 선정했던 약리효능 유전자를 cyber green dye를 사용하여 realtime PCR을 실시하여 검증하였다. Realtime PCR의 경우 그 PCR product가 DNA microarray의 oligo probe 주변을 중심으로 100-200bp를 가져야 결과가 잘 도출되므로 (그림 16), PCR primer를 짜는 것도 한계가 있었다. 아울러 유전자 copy 수가 적은 경우에는 fold change가 큰 것도 잘 나타나지 않은 한계를 나타내었다.
- 음양곽 70% EtOH 추출물과 주성분인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 대한 약리효능 유전자에 대한 realtime PCR의 결과는 표 6에 나타내었다.
- 음양곽 70% EtOH 추출물에 대한 biomarker gene을 검증하기 위하여 primer를 만들기가 힘든 4개의 유전자를 제외한 20종의 primer들을 사용하여 각각의 대응 유전자에 대하여 검증을 하였다. 표 5-a와 같이 20 종 중 13 종이 어느 정도 DNA chip data와 realtime PCR의 결과와 일치하여 약 65% 정도가 검증되었다.
- Icariin의 biomarker gene 검증은 15개의 유의 유전자 중에서 primer 제작이 힘든 4개를 제외한 11개의 유전자로 realtime PCR을 이용하여 실시하였다. 그 중에서 5개는 DNA microarray 결과와 일치하지 않았으며 약 55%에 해당하는 6개만이 검증되었다(표 6-b).
- Epimedin B의 경우 28종의 유의 유전자 중 23종을 검증하였으며, 그 중 48%에 해당하는 11개 유전자만이 검증되었다 (표 6-c).
- Hyperoside에서는 총 21종의 유의 유전자를 선정하였으나 그 중 ID702618(FLJ44715)의 경우에는 panthersite에 유전자 정보가 나오지 않아서 실험을 할 수 없었으며, ID140953(DDC)는 세포 내에서 mRNA가 측정이 안됐다. 전체 21종의 유전자 중 2종을 제외한 19종에서 14종이 검증되어 약 73.4%가 확인되었다. 이는 그동안 실험을 했던 것과 비교하여 primer 위치 선정 및 RNA copy수가 많은 것을 유의유전자로 선정한 결과로 사료되었다.

Table 6. Validation of selected biomarker genes using real time PCR with cyber green dye.

a. 70% Ethanol extract of Epimedium herba

ID	Gene_Name	S primer	AS primer	Fold induction				Result
				DNA chip		Realtime PCR		
				Eum10	Eum100	Eum10	Eum100	
187003	KA35	TCTAACAACGGCTGCCATCC	GCGACAGAAGCGAGGAGTG	0.60	0.27	0.50	0.75	O
152190	SLC6A12	GAAGTCAGGGGTTTGGCGT TA	ATG CCG TCA GTC TGG AGT TT	0.65	0.36	2.38	3.69	X
197857	CROP	TGGTTATCCAGAAGGGATGG	GCCTCCAGCTTTCACACTTC	0.85	0.45	0.43	0.68	O
107304	C18orf24	ACGGACTTGAGAGGCTTAAA	CACAGAGTTCCTTGAGTGAA	0.89	0.48	0.60	0.43	O
141522	LOC51252	GCTGCTGGGCTCTGTATCTCC	ACCTCAATGCTGTAAGTCTGTCC	0.64	0.49	1.12	2.30	X
160171	C4orf27	ATGGTGCAGGCTTGGTTGTT	CCCCATGCCATAATCACATTCA	1.55	2.09	0.91	1.25	X
192781	SOCS6	TCTCTCGGTTCCCTCTCAAG	GGTGCCAATCAACAAGCCATTC	1.26	2.11	4.15	2.32	O
156541	ADAMTS14	CAGCACAGACTTTCGGGGAC	GGAGTGTGCTGGTAGTGTGG	0.76	2.15	0.87	2.46	O
138964	PGK1	TTAAAGGAAGCGGGTCGTTA	TCCATTGTCCAAGCAGAATTGA	2.40	2.16	2.77	3.70	O
127002	STK17B	ACATCTAAAGAGCTAGGGAGAGG	TGCCCGACAATCCTGTCCCT	0.96	2.16	0.99	1.32	X
132554	INSIG2	TGACGCTCTTCCACCTGATG	GCTACACACCGCATTACACTG	2.07	2.18	0.95	0.69	X
109165	BNIP3	TCAGCAATAATGGGAACG GG	TCATCAAAAGGT GCTGGTGG	1.87	2.24	2.00	1.38	O
169650	SLC15A1	CCATGCTCAGAGTTCAACAATGT	ACAAACACAATCAGGGCTACAG	0.94	2.34	2.18	2.40	O
125119	REPS2	GTGCAAAGCGGGTTGGTTAT	AAAGCGAGGCAGAGGCAATT	2.34	2.80	3.72	1.60	O
199871	CYP39A1	GGTTGCCTTGCTCTGTTCTTA	GGGGCTTTCCAAACTCAAATC	1.55	3.13	0.85	0.97	X
131512	TMEM107	GGAGCATTCTGGGAAGAAGT	CACCTGACGATACAGACAAA	1.67	3.35	1.69	1.71	O
176082	PLOD2	CGAAAAGGCTGGAGCTTCAT	CATGCCAGTCATTCATCCAA	4.27	3.56	3.77	3.22	O
178866	LRRC19	ACAAAGTCTCGCACTGTCTCC	AGTCAGAAGAATTGCTTGAACCC	0.43	3.74	1.65	2.26	X
105946	HTR5A	CCAGTGAACCTAACCTCTTTTC	CAAGGTGAGAATAAGCACTCCG	2.18	4.82	1.28	2.43	O
227204	MGC45800	ACCTGTCTTGGAAGCGTG	TGCAAGTGGATTTCCTAACGG	1.08	5.08	2.13	2.29	O
109421	AKAP12	GGAGCTTTAAGCCTCAGTTA	TAGCACACTCCGTGTAATAG	7.71	5.44	4.99	8.35	O

b. Icarin

ID	Gene_Name	S primer	AS primer	Fold induction				Results
				DNA chip		Realtime PCR		
				icariin1	icariin10	icariin1	icariin10	
151336	FANCD2	GATGTCCTTTCAAGCCTCCGA	CATCACCAACTGGCGAACC	0.31	0.49	0.89	0.74	O
122793	PLXNA4A	GCCGAGGGTTTCAATCACCT	CTCATGCGTCACCAAGACCT	2.39	0.82	0.02	0.03	X
112997	CDKN2C	GGGACCTAGAGCAACTTACT	GGCAATCTCGGGATTTCGAAG	0.46	1.13	2.44	2.07	X
208509	AMT	GTGTCGTCCACTTAGTTGCG	AGACTCTCCATCAGCTTACACC	0.45	1.57	1.19	0.74	X
212750	FLJ90231	AACGGGGCCACATATTCCGG	GGGAGGAAGTTTGGGTACTCG	0.78	2.02	2.63	1.65	X
217622	MASP1	AGCCCTTAAATTCCTATTGTCA AC	GTCTGGAGCAGCAGGTGTG	0.62	2.19	0.91	1.21	O
705413	FLJ35767	GGGAGCAGTTGGCAAAGG	GTAAGAACTTGTTTCCAGGTTATG	1.69	3.46	3.29	4.45	O
168970	PTPRN	GCATAAACTGAAGGTGGAGAG	CTGCGTGGCTATGTAGGC	0.45	3.85	5.80	6.40	X
120350	ZNF537	GCCACCCGCTTCTTTTG	GCTATCTGACTGTTAATCTGTTCG	1.52	4.07	1.67	1.98	O
231889	CACNA1I	GCCGTGACTCTAGCACTCTC	GCTGCCGCTTGGTTTCTC	1.06	4.09	9.87	10.29	O
135605	TTYH1	AGTCTCCTGGTTCTCGTC	AACATAAGGGTCTGGATTGG	1.16	4.98	15.78	17.40	O

c. Epimedin B

ID	Gene_Symbol	S primer	AS primer	Fold induction				Results
				DNA chip		Realtime PCR		
				EpiB1	EpiB20	EpiB1	EpiB20	
174706	ST6GALNAC1	GGTGAGTGCTTATGGCTTCA	ACGCTGGTACAGCCGGATTA	0.22	0.19	0.08	0.12	O
158378	TMEPAI	CTACCGAAGGAGACACCTTT	GGGACCTTCACAGTTGGAAA	0.30	0.35	0.81	0.64	O
130316	SLC16A6	CCAGGCCAAGCGAAAAGAAA	CAAAACCAGCTCCGATCCTT	0.31	0.45	1.59	1.79	X
135086	CYP1A1	CTGACTGGCTTCAGCAAGTT	GGGCAGAGGAATGTGATGTT	0.32	0.16	0.37	0.45	O
201259	PGC	GGGTGCCCTCTGTCTACTG	CAGGAGAAAGGTCTGCCCA	0.41	0.54	0.42	0.35	O
169853	NKX3-1	ACTTGGGGTCTTATCTGTGGGA	CTCGATCACCTGAGTGTGGG	0.42	0.42	1.02	0.76	X
117183	FKBP5			0.43	0.38	1.06	1.00	X
162911	THBS1	GCATACCCGAGACGATTGTA	CCACTGCAGGTGATGAGTAA	0.44	0.28	1.11	0.69	X
115926	DHCR24	GCCGCTCTCGCTTATCTTCG	GTCTTGCTACCTGCCTCTT	0.47	0.46	30.17	19.70	X
213519	SLC12A2	CAAGACATACCGGCAGATCAG	ACTAGACACAGCACCTTTTCG	2.65	2.06	0.67	0.79	X
118274	FZD3	CAGAGATATTCAGGGTTTGG	ACATGCCTCCACAAAGCAAA	2.76	2.06	4.64	5.16	O
111748	HTRA1	CAAGGGCAGGAAGATCCCAAC	CCGGCACCTCTCGTTTAGAAA	2.82	3.33	1.52	2.21	O
216999	C20orf100	GCCACATGAGTGCCCTCAG	CTTCGGGTCTTGGCCTTTTT	2.93	1.42	3.39	2.66	O
147316	POU2F3	ACCCCTGAACTGATCCCAAA	CACCAAGGGCAGCTCTTTTA	3.10	1.51	0.36	0.59	X
203726	PABPC5	CAAGGCCGCTCTGTACGTG	CCACATAAGGGCGAATGGTTTTC	3.20	1.63	1.91	1.86	O
101592	RP4-742C19.3	GAGGAAGGCCCTCTGTGTTA	CACTGCGTTTCGTCCAGTC	3.37	1.82	4.99	4.65	O
167316	MATN2	AGCAGGGGAAGTCCAAAAA	CTTCCAAAGGGTTCCTGAA	3.44	2.18	0.60	0.95	X
116915	LRRN1	AGGATGAGCTTTGTTATAGCAGC	AGGGACGAATTTACATACGC	4.35	2.94	4.22	3.24	O
108283	ROR2	CTCCCTTAGCAGCCAAAGA	CCGTGTTCTGTACAATACTG	4.64	0.92	0.69	0.88	X
123436	BMX	GACGCCTGTAGAGAGACAGTA	CGTCCACGAAGAACCCTACTAT	4.81	2.03	1.73	2.08	O
140953	DDC	ACTGGCTCGGGAAGATGCT	CCGATGGATCACTTTGGTCC	5.43	3.81	1.36	1.68	X
154434	AMIGO2	AGTCGCACCAAAAAACCTG	GCAAACGATACTGGAATCCACT	6.12	3.50	1.73	1.36	X
122174	CBLN2	CTGGGGTTGAGGAGAGAAAA	CTCAGGAACACCAGGTTCTT	9.29	5.67	1.43	1.69	X

D. Hyperoside

Probe ID	Gene Symbol	S primer	AS primer	Fold induction				Result
				DNA Chip		Real-Time PCR		
				hyp10	hyp50	hyp10	hyp50	
204743	ID1	AATGGTCACGTTTGGTGCTT	AAAAACAGCCCACAGAACT	0.118	0.154	0.053	0.123	O
101377	CIDEB	GATCTGTGCACGTCCCTTTA	CCAGGCTGTCACTATCTCTA	0.270	0.351	0.731	0.999	O
169853	NKX3-1	ACTTGGGGTCTTATCTGTGGGA	CTCGATCACCTGAGTGTGGG	0.284	0.190	0.544	0.918	O
173876	MBOAT2	GAGGGTATGACGAAAATGGA	GAGCCAAAAGACTGTCTGAA	0.355	0.303	0.687	1.569	X
194271	TMPRSS2	AGTAAGAGTGGTGGCCTATT	GGACCACAGAGAGTCCAAAA	0.383	0.253	0.372	0.383	O
117183	FKBP5	AGCAGATGAGAGTTTCTGGA	AGAGGAGGGGAGAAAAAGCA	0.419	0.303	0.420	0.425	O
169984	SEPP1	GCAGCTTATACCCACAGAAG	TCTGGAAGCCAATTCAGTAG	0.442	0.356	1.291	1.390	X
702618	FLJ44715			0.461	0.400			
114304	HOXC13	GTTCTGTCTCTCAGTCAAC	ATCCCAACCTTACCACCTA	2.008	1.173	1.568	2.226	-
168773	HOXC9	TAACCAAGGACCGTCGGTAT	GTCCTTGTGCGTTTCTCT	2.118	3.272	1.257	2.273	-
188051	CDH3	GCCTCTGGTGCAACTTAAT	ACGCAGAGATCCATCCGAAT	2.289	1.209	1.331	2.082	-
122174	CBLN2	CTGGGGTTGAGGAGAGAAAA	CTCAGGAACACCAGGTTCTT	2.353	1.733	5.182	6.471	O
116915	LRRN1	AGGATGAGCTTTGTTATAGCAGC	AGGGACGAATTTACATACGC	2.361	2.033	2.730	3.488	O
171247	TSPAN7	GCATCTTTCCTCTCAGTTG	TGGATGAGTCTCAATGTC	2.390	3.247	3.410	1.487	O
167743	C20orf102	GTACTCAGTTCCCTCACGAT	ACCAGAGGTGCCAGCCAATT	2.428	2.049	4.148	5.303	O
116423	GARNL3	GGCTTTCTCCGATGAAGACA	GTGCAGAAGGTTTGGTCCAA	2.609	3.620	2.051	1.890	O
182844	GOLPH3L	CCAGGTTTTCTGTGGAAG	CTGAAGGTATCCTCGTCTTA	3.010	4.539	3.372	5.041	O
111620	DIO1	TGAGACCCAGCTGGCTTTTA	GCCTGAACAGCTCAAGTGTT	3.290	1.394	5.683	5.150	O
209603	CAMK2N1	GCAGGACACCAACAACTTCT	AGGTGCCTTGTGCGTCATAT	3.455	5.995	4.298	3.614	O
140953	DDC	ACTGGCTCGGGAAGATGCT	CCGATGGATCACTTTGGTCC	3.706	6.076			
192802	LBH	TCCTATCTGGCCTCTCTTT	AGTTTCTCCCTGAGCCTCAA	3.989	2.550	5.527	2.530	O

3.2 천궁의 연구결과

- 천궁은 혈관확장, 진정, 진통, 진경작용 및 장관 경련 억제 등의 주약리 작용이 있는 것으로 알려져 있는 한약재이다. 이러한 작용은 nitric oxide와 관련 있는 작용으로 본 과제에서는 천궁 추출물에 의한 nitric oxide 생성 변화에 따른 유전자 발현변화에 중점을 두어 실험을 실시하였다.

가. DNA chip 실험을 위한 세포주와 처리조건 설정

- 먼저 세포주에 따른 천궁 추출물의 용량을 선정하기 위하여 여러 장기유래 암세포주에서 천궁 70% ethanol 추출물의 세포독성을 관찰하였다(그림 18). A549 세포주를 제외한 모든 암세포주에서 200ug/ml 농도까지 세포독성이 나타나지 않았다. A549 세포주에서는 농도의존적으로 세포독성이 나타났으며, 200ug/mL 농도에서 70.2±0.2%의 생존율을 나타내었다.
- 천궁 추출물이 nitric oxide 생성과 세포독성에 미치는 영향에 대하여 Raw264.7 세포주와 HUVEC 세포에서 실험하였다. Raw264.7 세포주에 여러 농도의 천궁 추출물을 처리한 후 세포독성, nitric oxide 생성량 및 immunoblot을 이용하여 iNOS 발현을 실험하였을 때 그림 19에서와 같이 천궁 추출물 800ug/mL 농도까지 세포독성이 거의 나타나지 않았으나, nitrite 생성량은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때 저농도에서는 감소되었으나 고농도에서는 증가된 양상이 나타났다. 그러나 iNOS inducer인 LPS와 함께 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 농도-의존적으로 nitrite 생성량이 감소되었다. iNOS은 천궁 추출물을 단독으로 처리하였을 때는 발현량의 변화를 관찰할 수 없었으나 LPS에 의한 iNOS induction을 천궁 추출물 처리에 의하여 농도-의존적으로 저해되었다.
- Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의한 nitric oxide 생성을 관찰하였을 때 그림 20에서와 같이 세포독

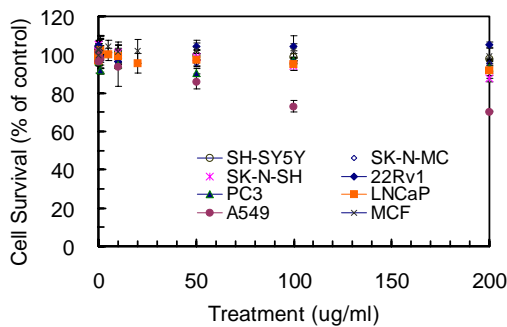


Figure 18. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity of various cancer cell lines.

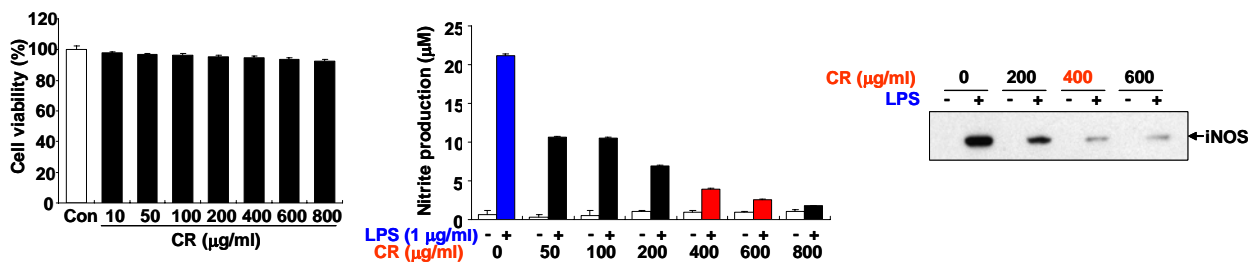


Figure 19. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity, the production of nitric oxide and expression of iNOS in Raw264.7 cells.

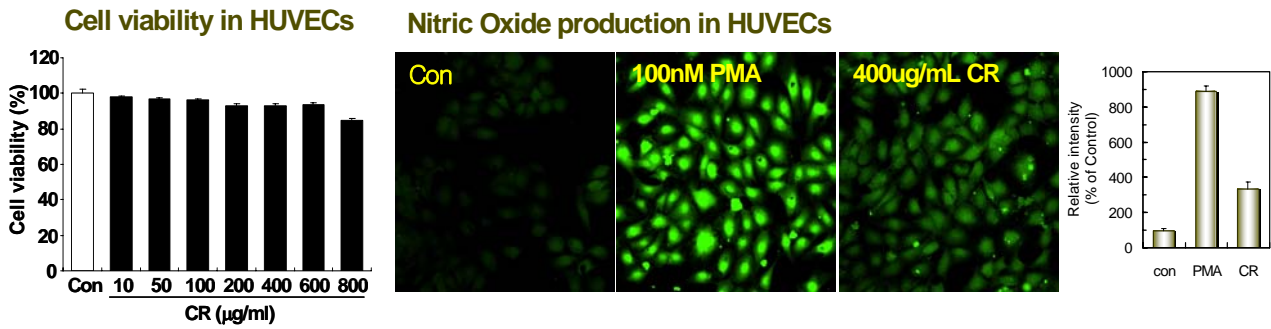


Figure 20. Effect of *C. officinale* extract on the cytotoxicity and the production of nitric oxide in HUVEC cells.

성이 전혀 나타나지 않는 400ug/mL에서 nitric oxide 생성량이 크게 증가되었다. Huvec 세포에서 천궁 추출물에 의하여 nitric oxide 생성량이 증가하는 것은 NO에 의한 혈관 확장 작용에 의하여 혈압강하효과를 나타낼 것으로 예상할 수 있었다.

- 그러나 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람의 것이며 구입하기 쉬운 것으로 선정하고자 천궁 추출물에 의하여 약간의 세포독성이 나타난 A549 세포주와 천궁의 약리작용 중 진정작용을 관찰하기 위한 세포주로서 neuroblastoma 세포주들을 이용하여 nitric oxide 생성과 관련지어 실험하였다.
- 각 세포주에 신경독성물질인 MPP나 SIN-1을 처리한 후 세포독성을 관찰하였을 때 그림 21에서와 같이 500uM 까지 처리하였을 때 세포독성이 나타나지 않아 이들 독성물질에 의한 뇌세포 보호작용을 세포독성으로 관찰하기 힘들 것으로 사료되었다.
- 따라서 본 과제에서는 사람의 neuroblastoma 세포주들인 SH-SY5Y, SK-N-SH와 SK-N-MC 3종의 세포주에서 NO 관련 유전자들의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. 그림21에서와 같이 SK-N-SH세포에서는 eNOS의 발현을 측정할 수 없었으나 nNOS의 발현이 SH-SY5Y나 SK-N-MC 세포주에서 보다 많은 양이 발현되었으며, iNOS 나 nNOS 발현이 천궁 추출물에 의하여 처리 농도가 높아질수록 발현량이 증가됨을 알 수 있었다. 그리고 SK-N-SH는 다른 두 세포주 보다 증식도 잘되고 다루기도 쉬워서 본 과제에서는 SK-N-SH를 모델 세포주로 선정하였다.
- SK-N-SH 세포에서 천궁 추출물과 그 주 구성성분인 ferulic acid, ligustilide와 Senkyunolide A, 그리고 MPP, NMDA 및 LPS와 같은 여러 독성물질을 처리하기 위한 용량을 선정하기 위하여 이들에 의한 세포독성을 10% serum을 함유하고 있으나 L-glutamine은 첨가하지 않은 배지에서 이들 물질

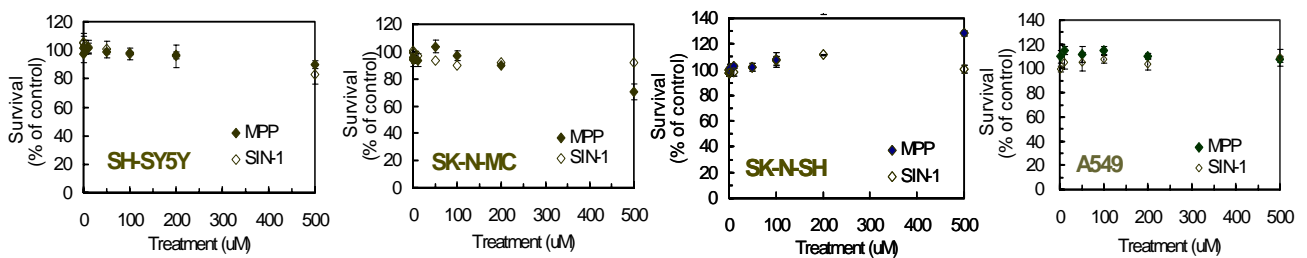


Figure 21. Effect of MPP or SIN-1 on the cytotoxicity of neuroblastoma cell lines and A549 cells.

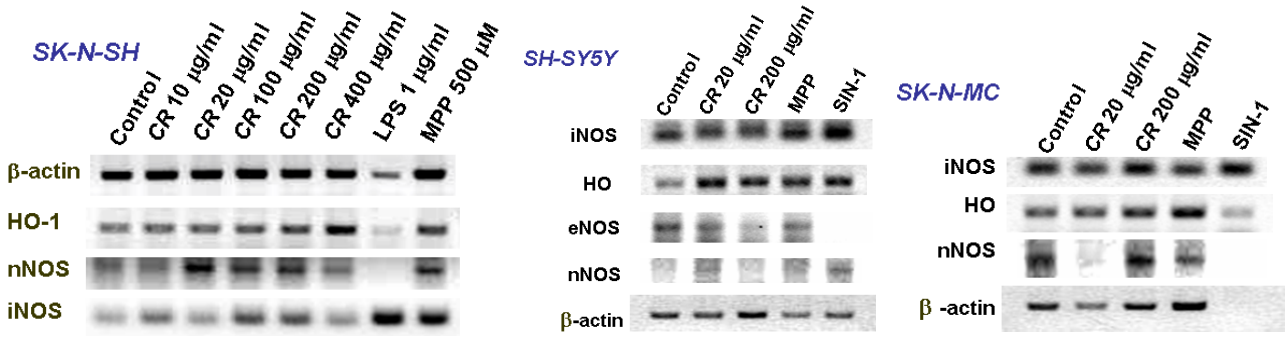


Figure 22. Effect of Cnidii Rhizoma 70% EtOH extracts, LPS, MPP and SIN-1 on the expression of NO related genes in SK-N-SH, SH-SY5Y, and SK-N-MC cell lines.

에 의한 세포독성을 측정하였다. 그림 23에서와 같이 ligustilide와 senkyunolide A가 다른 물질보다 세포독성이 크게 나타나 ligustilide는 50μM 농도에서 $84.4 \pm 2.24\%$ 생존율이 나타났으며, senkyunolide A는 IC₅₀ 값이 189.6 μg/ml 이었으나 나머지 물질들은 고농도에서도 세포독성이 거의 나타나지 않았다.

- 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 nitric oxide 량에 변화를 관찰하기 위하여 SK-N-SH 세포주에 여러 독성물질을 처리한 후 DAF-FM으로 nitric oxide를 형광 염색하고 confocal microscope으로 관찰하였다. 그림 24에서와 같이 여러 농도의 천궁 추출물을 처리하였을 때 저농도에서 nitric oxide가 대조군보다 적게 생성되었으나 농도가 높아질수록 nitric oxide 생성량이 증가되었으며, 천궁의 주성분인 Z-ligustilide와 ferulic acid를 고농도 처리하였을 때도 모두 nitric oxide 생성량이 크게 증가하였다.
- 중추신경계의 흥분작용을 나타내는 물질로 알려진 N-methyl-D-aspartate (NMDA)와 중추신경계 독성 물질인 MPP 및 iNOS의 대표적인 inducer인 LPS를 처리하여 nitric oxide 생성량의 변화를 관찰하였을 때 모두 nitric oxide 생성량이 증가되었다 (그림 25).

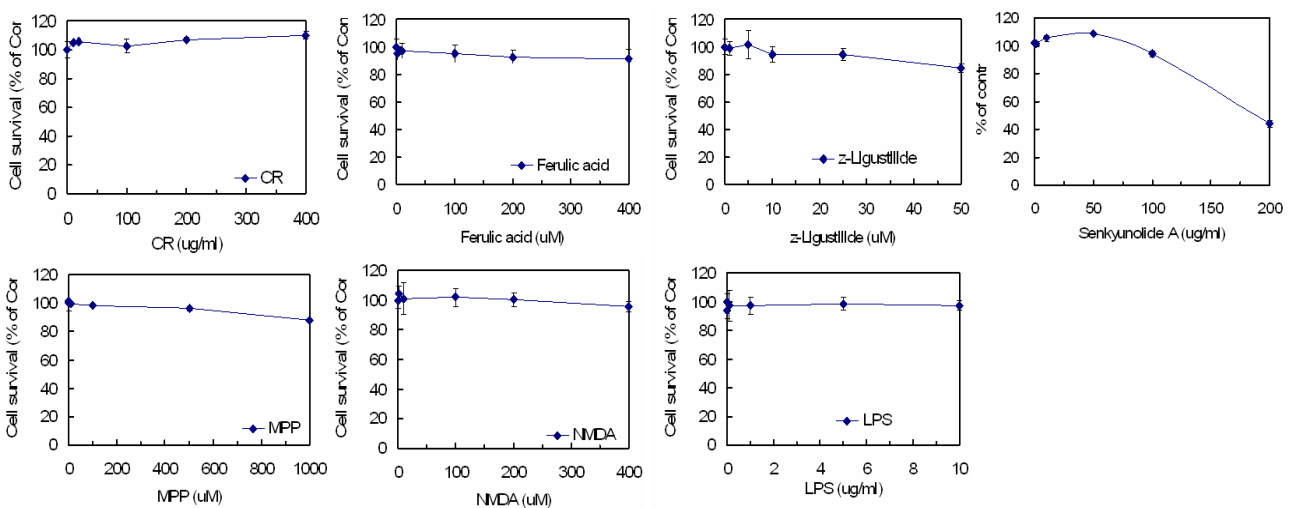


Figure 23. Cytotoxicity of 70% EtOH Cnidii Rhizoma Extract, ferulic acid, ligustilide, senkynolide A and several toxicant in SK-N-SH cells.

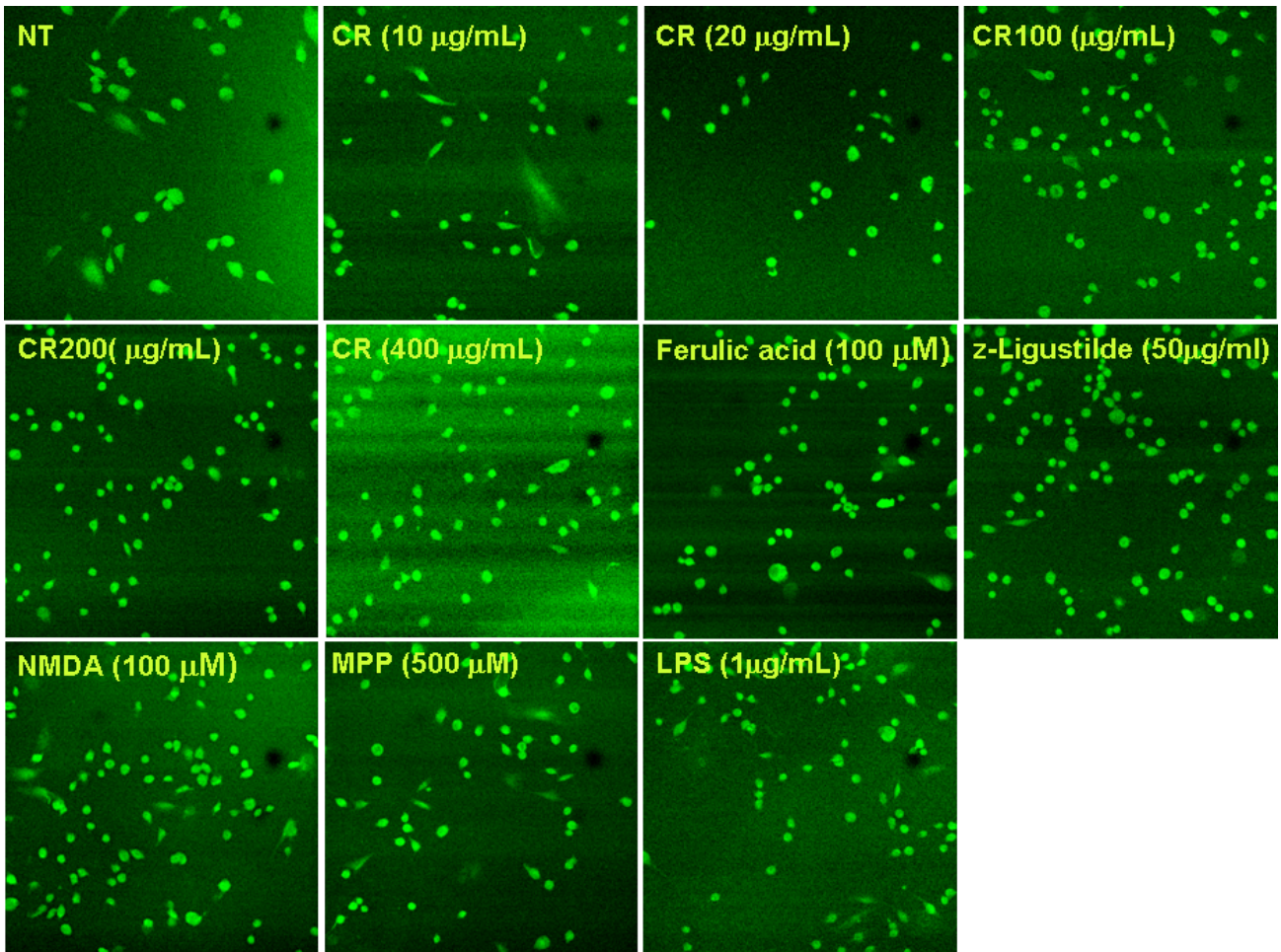


Figure 24. Effect of *C. officinale* extract, ferulic acid, z-ligustilide and various toxicants on the production of nitric oxide in SK-N-SH cells. Cells were treated the extract of Cnidii Rhizoma or the compounds for 24h.

- 따라서 본 과제에서는 중추신경계의 glutamate receptor를 통해 흥분 작용을 시켜 세포독성을 나타내는 것으로 널리 알려진 N-methyl-d-aspartate (NMDA)를 선정하여, 천궁의 약리작용으로 진정작용을 관찰하고자 하였다.
- NMDA에 의하여 400uM까지 처리하였을 때 SK-N-SH 세포에서는 세포독성이 거의 나타나지 않았으며, 대신 nitric oxide 생성량이 크게 증가하였으므로, NMDA에 의하여 생성되는 nitric oxide를 천궁 추출물이 nitric oxide 생성을 저해시키는가에 대한 실험을 실시하였다. 천궁 추출물이나 NMDA와 4시간동안 동시에 처리하였을 때 그림 25에서와 같이 nitric oxide 생성량은 증가되었으나, 증가정도는 24시간에서 보다 적었다. NMDA와 천궁 추출물을 동시에 처리하였을 때 전반적으로 nitric oxide 생성량은 감소되는 경향을 나타내었다.
- 이러한 nitric oxide와 관련된 여러 결과로부터 DNA chip 실험을 위한 실험조건은 천궁의 진정작용에 대한 것을 약리작용으로하여 SK-N-SH 세포주를 선정하였으며, 독성물질로는 중추신경 흥분작용을 나타내는 NMDA를 선정하였다. 천궁 70% ethanol 추출물과 ligustilide 및 ferulic acid는 nitric oxide 생성을 저해하는 저농도와 nitric oxide 생성을 증가시키는 고농도를 선정하여 실험하였다. DNA chip 실험을 위한 실험 design은 실험방법에서 보여준 scheme 2와 같이 실시하였다.

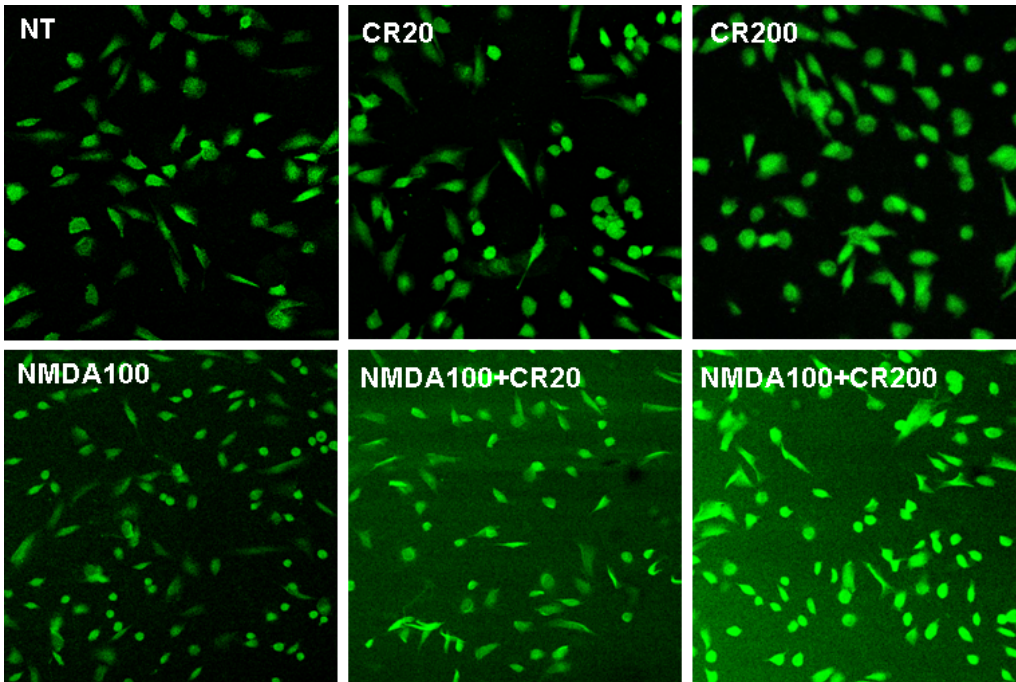


Figure 25. Effect of co-treatment of Cnidii Rhizoma extract and/or NMDA on the production of nitric oxide in SK-N-SH cells. Cells were cotreated the extract of Cnidii Rhizoma and/or NMDA for 4h.

- 본 과제에서 선정한 천궁 분리물질 및 독성물질인 NMDA의 구조는 그림 26과 같다.

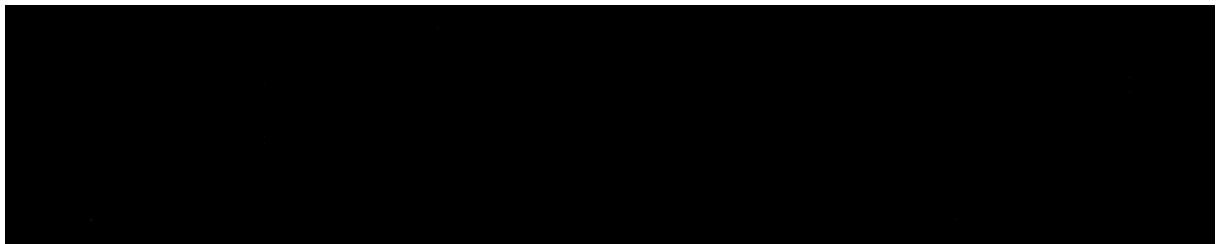


Figure 26. Chemical structures of three compounds isolated from Cnidii Radix and N-methyl-d-aspartate(NMDA) for DNA microarray experiment

나. DNA microarray analysis

- 천궁 70% EtOH 추출물과 흥분독성물질 NMDA를 단독으로 또는 동시에 처리하였을 때 유전자 발현 변화를 관찰하기 위하여 표 6에서와 같은 조건으로 실험하였다.
- 천궁 추출물의 주 구성성분으로 천궁에 주로 많이 존재하고 있는 성분인 Ligustilide, Ferulic acid 및 Senkyunolide A가 NMDA에 의한 유전자 발현 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.
- 재배지가 다른 여러 곳의 천궁 추출물의 함유 물질의 profile을 관찰하여 profile이 조금씩 다른 것 중 한국산 3종과 중국산 2종을 선정하여 이들에 의한 유전자 발현변화 양상을 관찰하였다.
- 천궁의 진정작용을 중심으로 약리효능 유전자를 선정하기 위하여 Scheme 2에서와 같은 조건으로 처리하여 실험을 실시하였다. DNA microarray 분석조건을 표로 요약하였을 때 표 6과 같았다.

Table 6. Experimental and analysis conditions of DNA microarray for Cnidii Rhizoma extracts, z-ligustilide, ferulic acid and senkyunolide A in SK-N-SH cells.

Samples	Experimental condition	Toxicant (NMDA, 100uM)	
		-	+
Cnidii Rhizoma	Time (3 conditions)	6hr, 24hr, 48hr	6hr, 24hr
	Dose (2 conditions)	20 μ g, 200 μ g	20 μ g, 200 μ g
Ligustilide	Time, dose (1 condition)	50uM, 24h	50uM, 24h
Ferulic acid	Time, dose (1 condition)	100uM, 24h	100uM, 24h
Senkyunolide A	Time, dose (1 condition)	50uM, 24h	50uM, 24h
		200ug, 24h	
Other batches of Cnidii Rhizoma	Time, dose (1 condition)	(Korea: 3 samples, Chinese: 2 samples)	

- ◆ Array Type: ABi human chip
- ◆ Number of Total spots: 36179
- ◆ Data pre-processing
 - ◆ Quantile normalization
 - ◆ Data filtering: Signal to Noise ratio 3 미만의 spot이 전체 조건에서 30% 이상을 차지하는 spot과 Flag 100이상 제거
- ◆ Hierarchical clustering with complete linkage and similarity measure by Euclidean distance

- DNA microarray 데이터를 표 6의 분석조건에 따라 filtering과 normalization을 한 후 box plotting과 MA plotting을 filtering 하기 전, 후의 것을 비교하여 normalization이 적절히 수행되었음을 확인하였다 (그림 27).
- Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 전체적 유전자에 대하여 Gene clustering을 실시하였다. 이때 gene clustering은 Hierarchical clustering with Complete Linkage 방법으로 Similarity measure는: Pearson correlation distance를 이용하여 실시하였다. (그림 28).

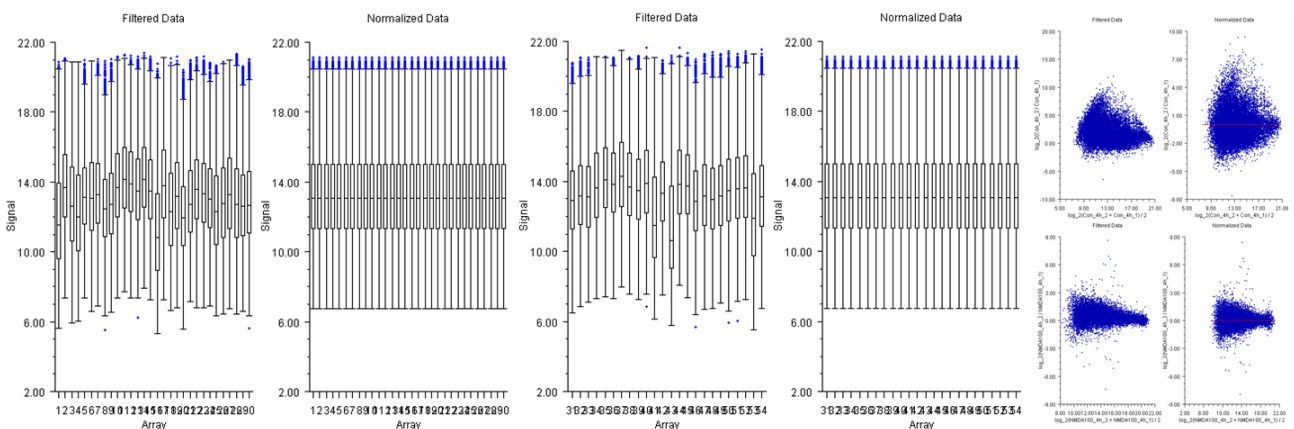


Figure 27. Images of box plot and MA plot in after and before the Normalization of data.

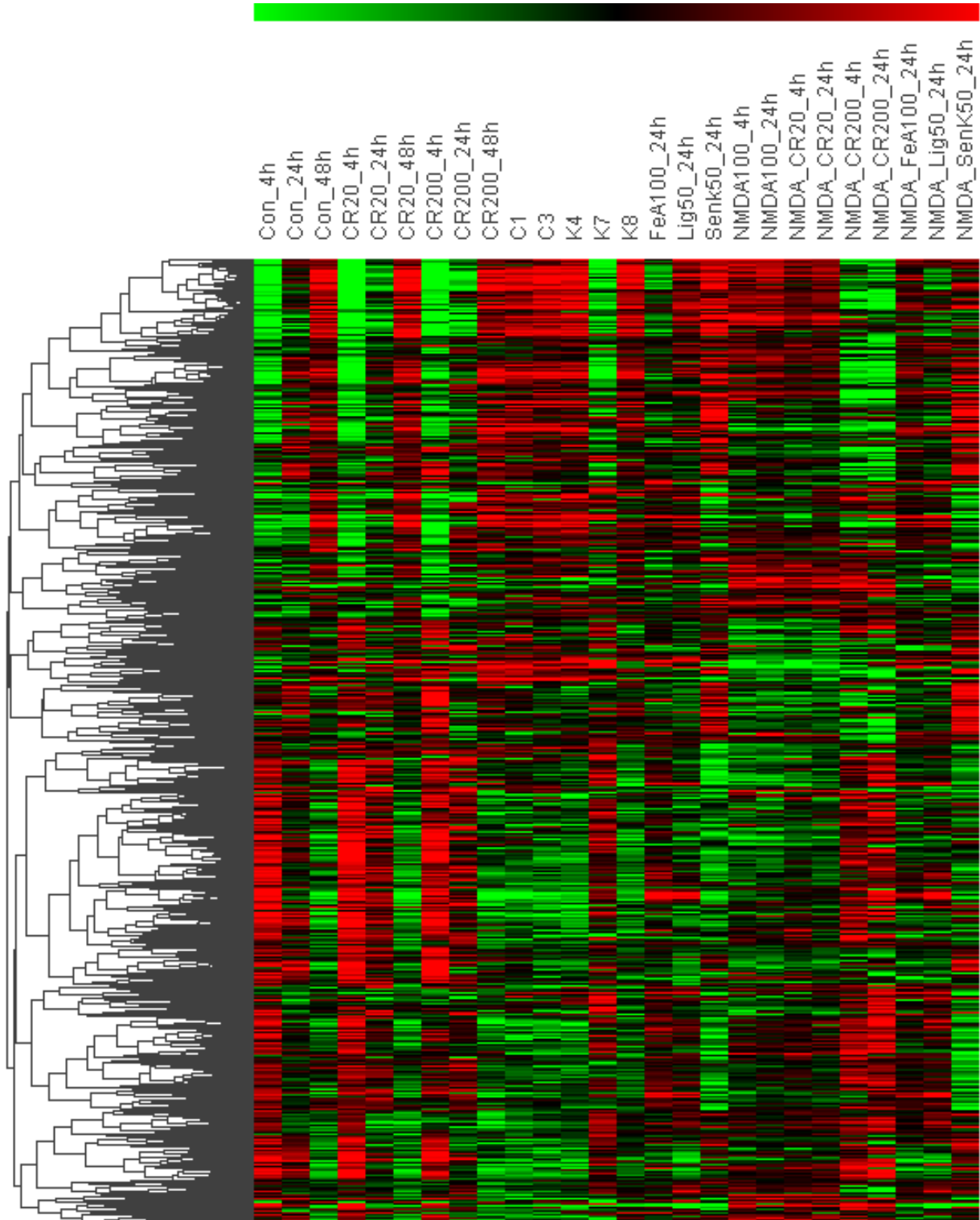


Figure 28. Gene cluster analysis of time- and dose-dependent expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of CR and its major components with or without NMDA.

- 그림 27의 전반적인 유전자 발현 변화를 관찰하면 DMSO를 시간별로 처리한 대조군에서도 유전자 변화가 매우 크게 나타났으며, 천궁 추출물 20 이나 200ug/mL을 처리하였을 때의 유전자 발현 변화가 대조군 DMSO 처리 후 시간별 유전자 발현 변화가 더욱 크게 나타난 것으로 나타났다.

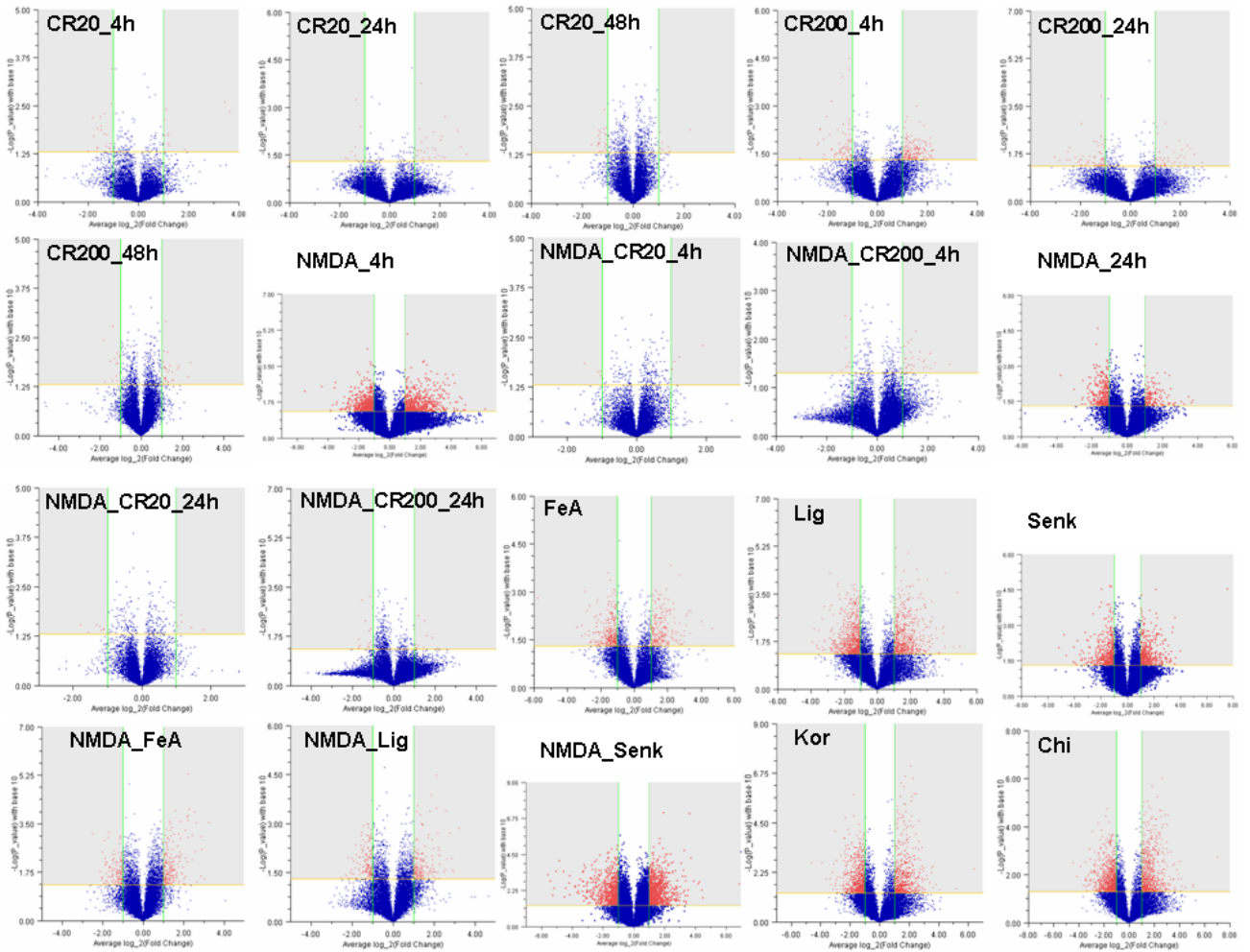


Figure 29. Volcano plots compared control to experiments for the selection of pharmacological biomarker genes in *Cnidii Rhizoma* and its major components.

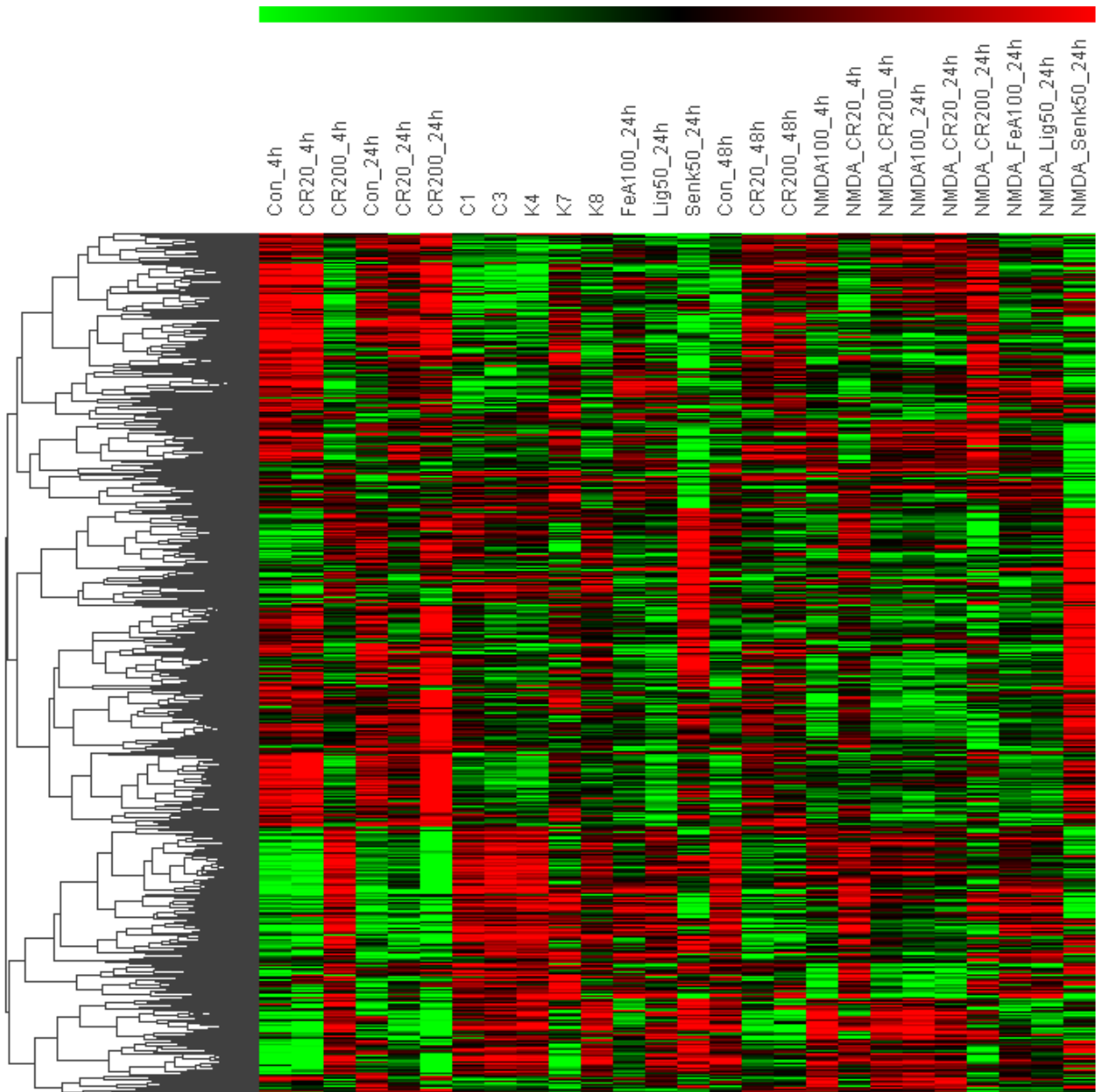
- 천궁의 70% ethanol 추출물로 본 실험의 천궁 대표물질로 사용한 CR200_24h 그룹과 한국산 중의 하나인 K7과의 유전자 발현 양상이 매우 유사하게 나타났으나, 중국산 (C1, C3)과 한국산 중 K3와 K8는 유전자 발현이 유사하게 나타났다.
- Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y축은 Welch's T-test 결과를 나타냄)을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test < 0.05의 유의성을 나타내는 유전자를 검색하였다 (그림 29, 표 7).
- 전체적인 유의 유전자에 대한 Gene clustering을 하기 위하여 Volcano Plot으로부터 얻은 유전자를 공통으로 갖는 것은 없으므로, 표 7의 조건을 만족하는 유전자들을 합하여 전체적으로 clustering을 실시하였다. 이때 나온 유의 유전자를 모두 합하였을 때 총 4,428개로 이에 대한 유전자들의 clustering은 Hierarchical clustering with Complete Linkage 방법으로 similarity measure는 Pearson correlation distance를 이용하여 실시하였다 (그림 30).
- 그림 31에서 보면 천궁 추출물의 유전자 발현 변화는 산지에 따라 조금씩 다른 양상을 나타냈으며, NMDA에 의한 유전자 발현변화는 Senkynolide 처리에 의하여 다시 원상태로 돌아가는 유전자 수가 가장 컸으며, 그 다음으로는 ligustilide 순으로 나타났다.

Table 7. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number	
			Up (GO gene)	Down (GO gene)
CR_Ext	CR20_4h	Con_4h	19 (9)	19 (13)
	CR20_24h	Con_24h	38 (17)	22 (13)
	CR20_48h	Con_48h	17 (8)	25 (6)
	CR200_4h	Con_4h	192 (120)	69 (37)
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)
	CR200_48h	Con_48h	39 (17)	24 (9)
CR_Ext/ NMDA	NMDA_4h	Con_4h	476 (399)	556 (280)
	NMDA_24h	Con_24h	139 (87)	337 (235)
	CR20_NMDA_4h	NMDA_4h	7 (5)	6 (3)
	CR20_NMDA_24h	NMDA_24h	8 (5)	9 (4)
	CR200_NMDA_4h	NMDA_4h	35 (16)	13 (7)
	CR200_NMDA_24h	NMDA_24h	17 (6)	20 (10)
Ferulic acid	FeA	Con_24h	206 (203)	362 (257)
	FeA_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)
Z-Ligustilide	Lig	Con_24h	206 (203)	365 (257)
	Lig_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)
Senkyunolide A	Senk	Con_24h	323 (320)	698 (490)
	Senk_NMDA	NMDA_24h	225 (134)	230 (225)
산지별	C1	Con_24h	249 (150)	323 (220)
	C3	Con_24h	404 (264)	471 (293)
	K4	Con_24h	545 (373)	498 (329)
	K7	Con_24h	95 (61)	99 (61)
	K8	Con_24h	65 (34)	102 (58)

- 각 실험별 DEG 조건을 만족하는 유전자 수는 표 8이며, 이들의 생물학적 정보를 관찰하였을 때 그 유전자의 기능이 알려진 숫자도 표 8에 표시하였다
- 표 8에 따른 각 sample group 별 유전자 발현 변화 및 유의 유전자 선정에 관한 것은 각 sample group 별로 항을 만들어 자세히 분석하였다.
- 천궁 추출물 및 Ferulic acid, ligustilide, senkynolide A에 대한 약리효능 유전자는 NMDA에 의하여 Fold change 2 이상, P>0.05의 조건을 만족하는 유의유전자 중에 천궁 추출물 및 Ferulic acid, ligustilide, senkynolide A를 NMDA와 동시에 24시간 동안 처리하였을 때 다시 대조군과 유사한 수준으로 되돌아가는 유전자를 선정하였다.

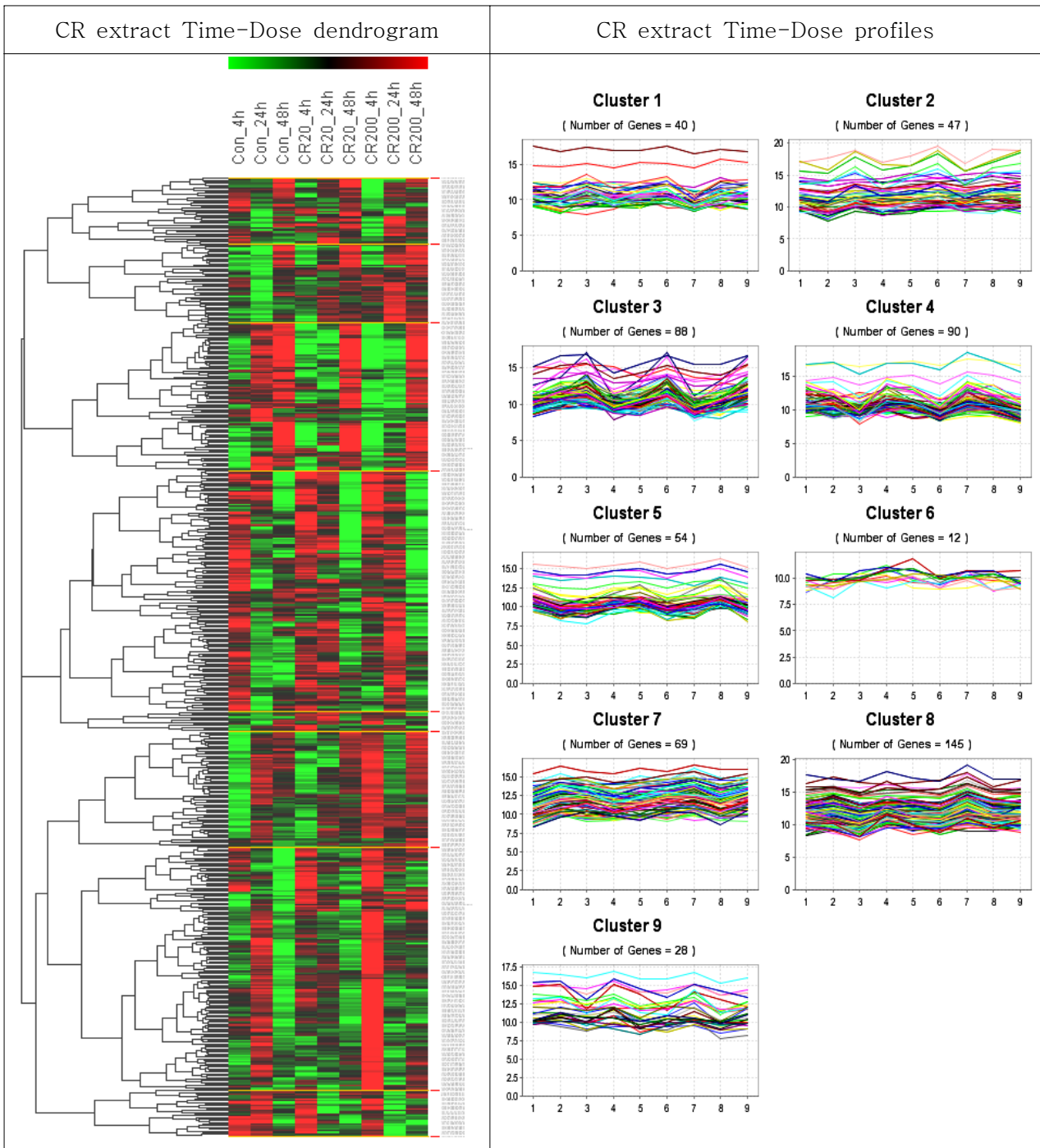
Figure 30. Gene cluster analysis of time- and dose-dependent expression data using the sum of significant genes obtained from Volcano's plot in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of CR and its major components with or without NMDA.



1) CR extract의 용량별-시간별에 따른 유전자변화 관찰

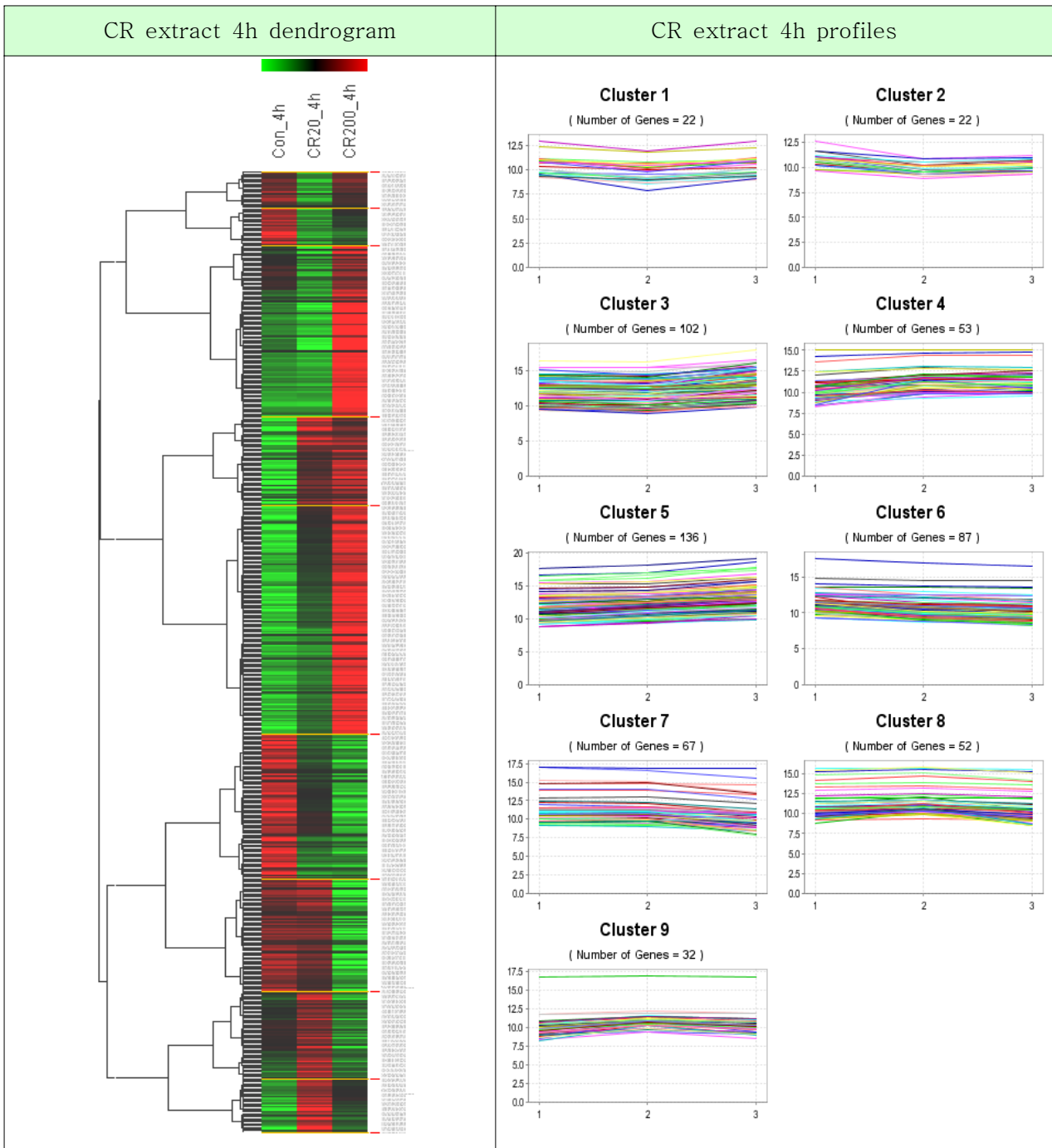
- 표 8에서 CR_Ext 군에서의 유전자 발현 변화를 volcano plot을 이용하여 각 실험군들, 즉 CR20_4h-Con_4h, CR20_24h-Con_24h, CR20_48h-Con_48h, CR200_4h-Con_4h, CR200_24h-Con_24h, CR200_48h-Con_48h 들에 대한 Fold Change cutoff 2.0, P>0.05를 적용하여 나온 결과를 합집합하여 총 573개의 유전자가 선별되었다. 이것을 이용하여 전체 CR 추출물 처리군에 대하여 전체적으로 clustering 하여 각 실험군별 발현 양상의 변화를 관찰하였으며(그림 31), 아울러 이들의 biological pathway를 panther site로부터 얻었다.

Figure 31. Cluster analysis of time- and dose-dependent gene expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract.



- 그림 31의 Hierarchical clustering dendrogram에서 DMSO만 처리한 대조군(con)들도 시간에 따라서 유전자 변화가 크게 나타났으며, 48시간동안 처리군 (con-48h)의 경우는 4시간 처리한 대조군 (con-4h)에 비하여 유의 유전자가 매우 크게 나타나는 것으로 보아 각 time에 따른 추출물의 효능을 볼 때는 처리 시간에 따른 대조군이 필요함을 나타내었다.
- 총 573개의 유의 유전자에 대하여 여러 농도의 천궁 추출물을 4시간, 24시간, 48시간 동안 처리한 결

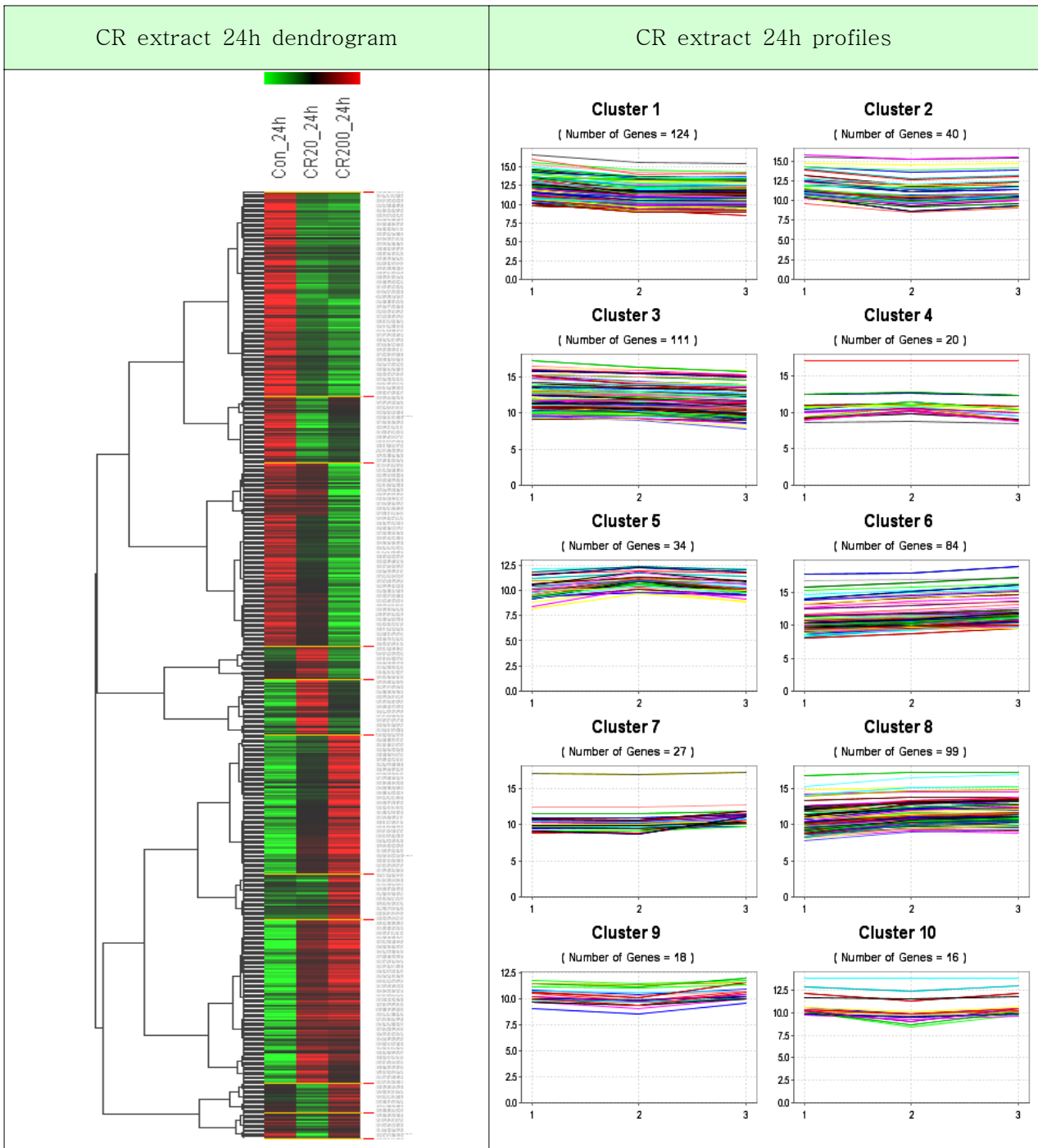
Figure 32. Cluster analysis of dose-dependent gene expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of Cnidii Rhizoma for 4hr.



과들을 time을 중심으로 각각 Hierarchical clustering with Complete Linkage 방법으로 clustering 하였으며, similarity measure는 Pearson correlation distance를 이용하여 실시하였다(그림 32-34).

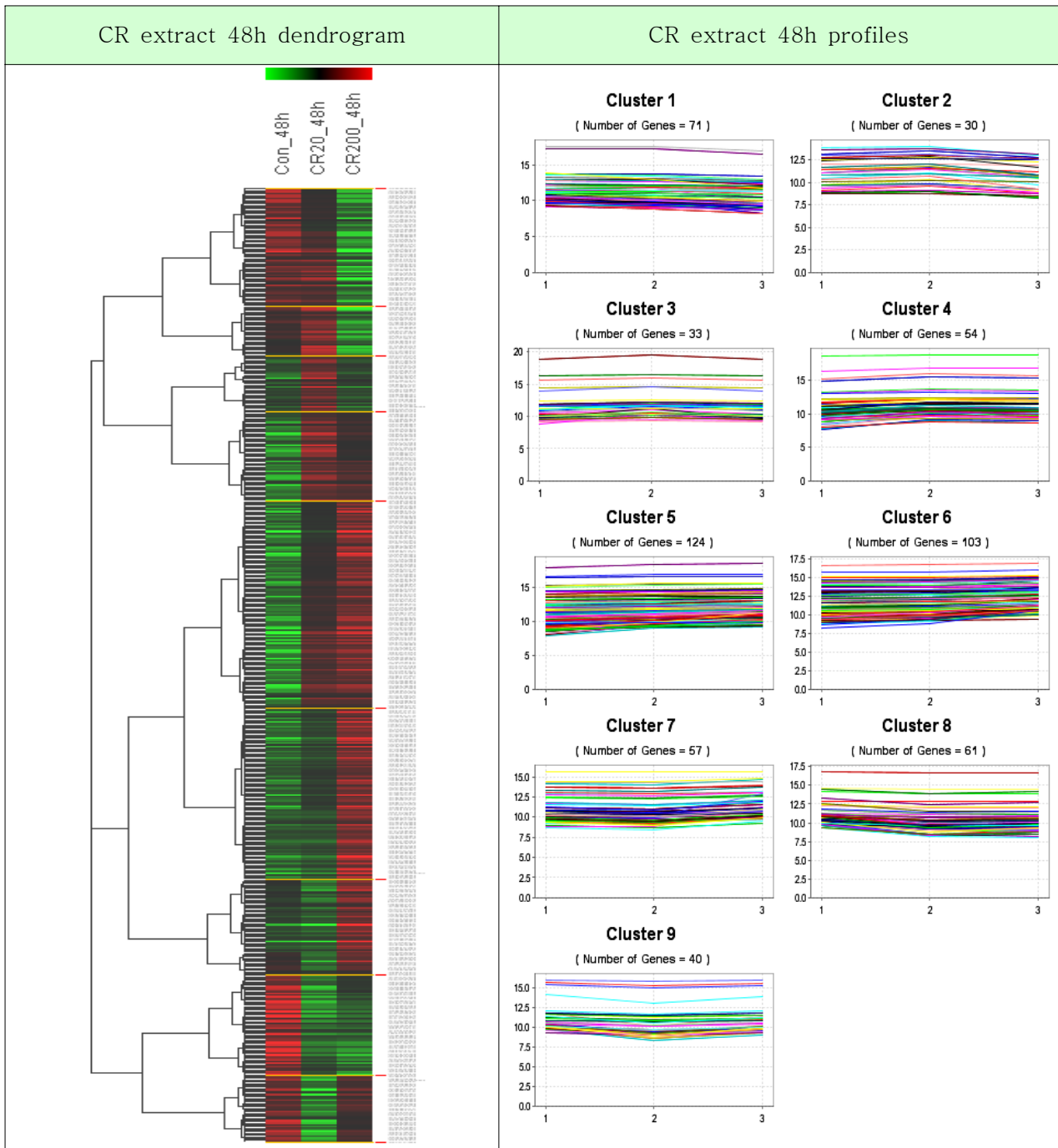
- 4시간 처리했을 때 유전자 발현변화를 profiling 했을 때 그림 32에서와 같이 선정된 유전자 중에서 천궁 추출물의 농도 의존적으로 발현이 증가하는 cluster 5에 속하는 유전자가 가장 많았으며, 다음이 CR20_4h에서의 발현은 별로 증가하지 않으나 CR200_4h에서 발현이 증가하는 cluster에 속하는 유전자가 각각 136과 102로 많은 부분을 차지하고 있었다.

Figure 32. Cluster analysis of dose-dependent gene expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of Cnidii Rhizoma for 24hr.



- CR 추출물을 24시간 처리했을 때의 선정된 유전자 발현 profile을 10개의 cluster로 나뉘었을 때 평균 추출물 처리 농도가 증가됨에 따라 유전자 발현이 저해되는 cluster 1과 cluster 3에 속하는 유전자가 각각 124 및 111개를 차지하였으며, 4시간 처리했을 때 보다 발현이 감소하는 유전자 수가 증가하는 양상을 나타내었다. 농도에 따라 발현이 증가되는 양상을 나타내는 그룹은 cluster 6와 8으로 두 군을 합한 유전자 수가 183개로 처리 농도에 따라 발현이 감소하는 양상을 나타내는 유전자 235개에 비하여 적게 나타났다.

Figure 33. Cluster analysis of dose-dependent gene expression data in SK-N-SH cells treated with 70% ethanol extract of *Cnidii Rhizoma* for 48hr.



- CR 추출물을 48시간 처리했을 때의 선정된 유전자 발현 profile을 9개의 cluster로 나뉘었을 때 천궁 추출물 처리 농도가 증가됨에 따라 유전자 발현이 저해되는 cluster 1과 cluster 8에 속하는 유전자가 132개이었으나 농도에 따라 발현이 증가되는 양상을 나타내는 그룹인 cluster 4, 5와 6의 3군을 합한 유전자 수가 281개로 처리 농도에 따라 발현이 감소하는 양상을 나타내는 유전자 수에 비하여 2배 이상 되었다.

Table 8. Major biological pathways of significant genes merged the significant genes of each experimental group which was treated the 70% ethanol extract of Cnidii Rhizoma with dose- and time dependant manner in SH-N-SH cells analyzed using Volcano plots.

KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Neuroactive ligand-receptor interaction	6	Tight junction	3
Focal adhesion	6	Phosphatidylinositol signaling system	3
Regulation of actin cytoskeleton	5	Natural killer cell mediated cytotoxicity	3
MAPK signaling pathway	5	Leukocyte transendothelial migration	3
Wnt signaling pathway	4	Fc epsilon RI signaling pathway	3
T cell receptor signaling pathway	4	ECM-receptor interaction	3
Jak-STAT signaling pathway	4	Cell Communication	3
Cell cycle	4	Calcium signaling pathway	3
Apoptosis	4	Axon guidance	3
mTOR signaling pathway	3	Adipocytokine signaling pathway	3
Toll-like receptor signaling pathway	3	ABC transporters - General	3

◦ 이들 유전자 573개 중 GO 유전자는 310개로 이들에 의한 biological pathway를 관찰하였을 때 표 8에서와 같이 neuroactive ligand-receptor interaction pathway와 focal adhesion pathway에 관여하는

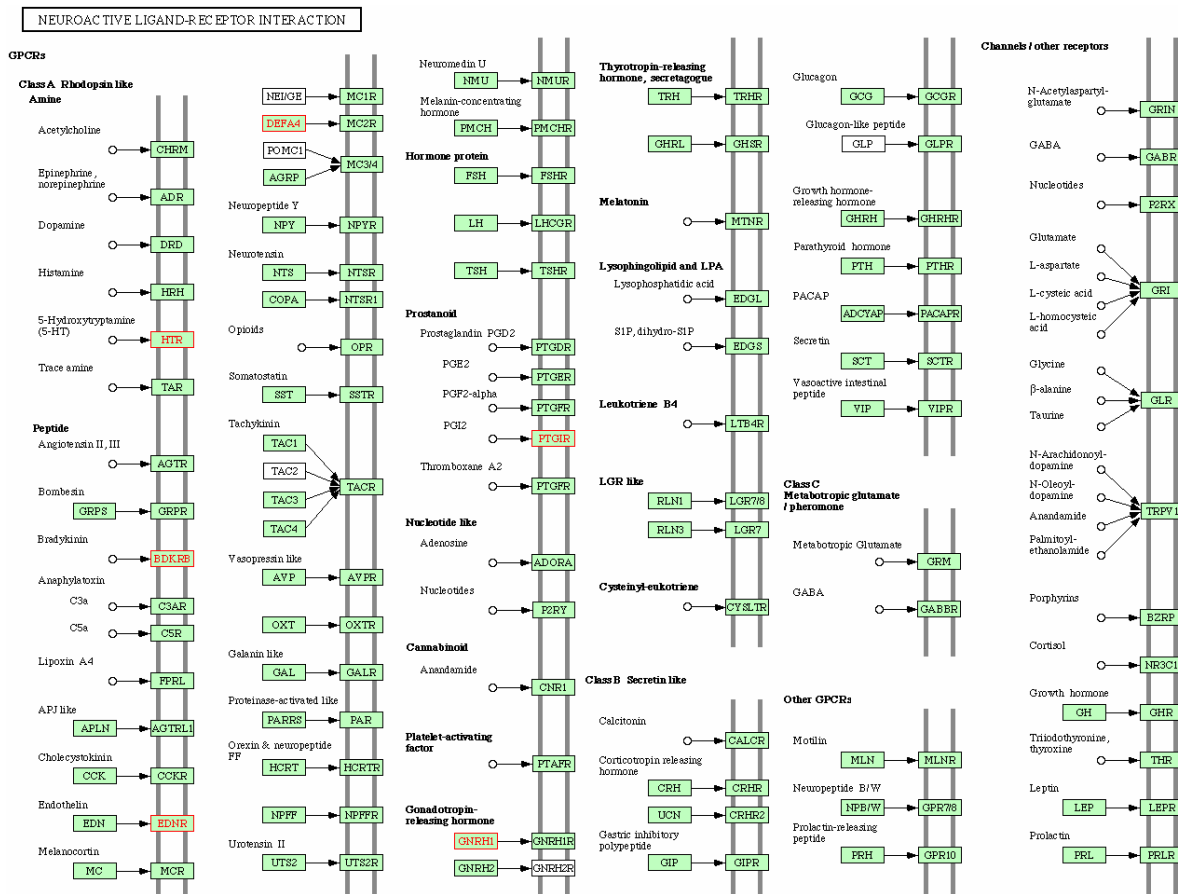


Figure 34. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 70% extract of Cnidii Rhizoma with time- and dose-dependant manner in neuroactive ligand-receptor interaction pathway

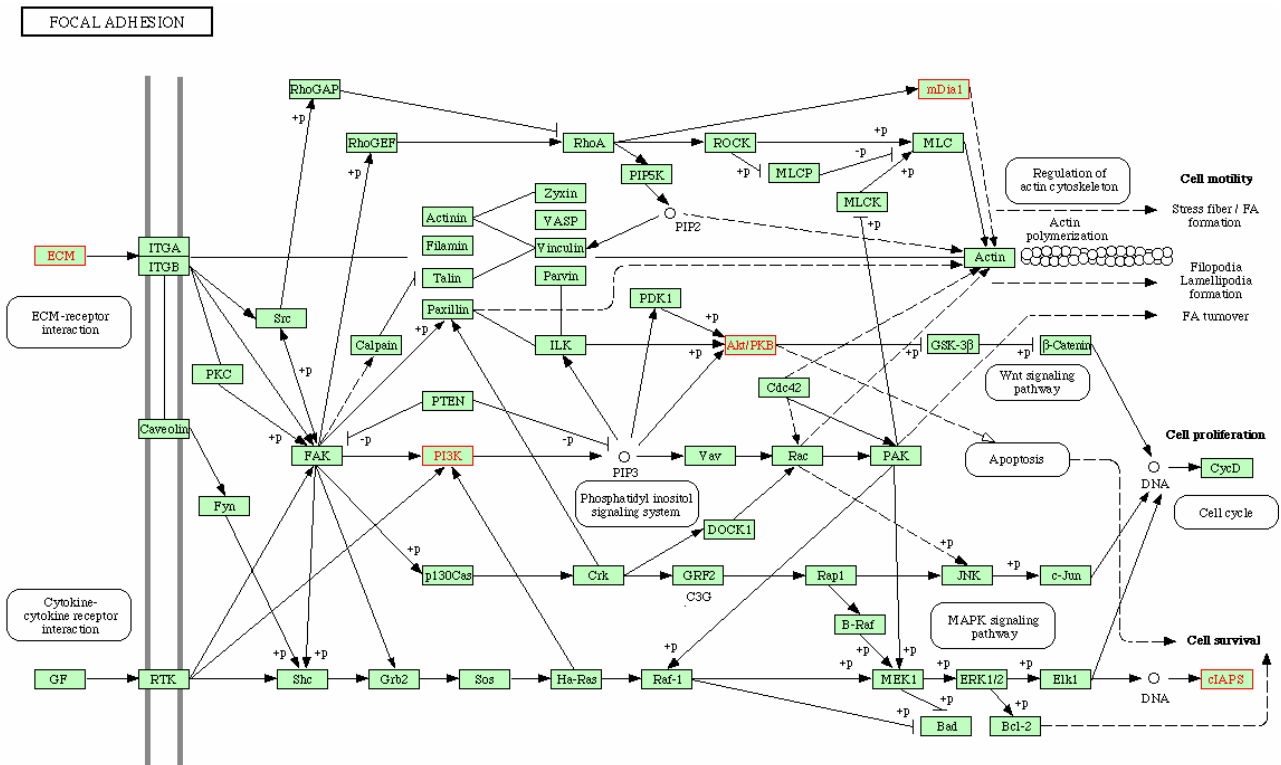


Figure 35. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 70% extract of *Cnidii Rhizoma* with time- and dose-dependant manner in focal adhesion pathway

유전자들이 가장 많이 변화를 나타내었다. KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway에서 두 경로에 관여하는 유전자들을 관찰하였을 때 그림 34와 35에서와 같았다.

- Neuroactive ligand-receptor interaction에 관여하는 유전자는 BDKRB1, HTR2A, EDNRB, GNRH1, PTGIR와 DEFA6 등이 있으며, Focal adhesion에는 DIAPH1, LAMC3, AKT2, BIRC3, COL1A1 등의 유전자가 있었다.
- 천궁 추출물 처리에 의한 유전자 발현변화를 일정처리시간 즉, 4시간, 24시간 및 48시간에서 처리농도에 따른 발현 별로 유의 유전자 및 biological pathway를 관찰하였다. 각 실험별 DEG 조건을 만족하는 유전자 수와 이들의 생물학적 정보를 관찰하기 위하여 유전자의 기능이 알려진 숫자를 표 9에 표시하였다.
- 표 9에서 보면 천궁 추출물 처리에 의하여 유의적으로 변화하는 유전자 숫자는 예상 외로 매우 적었으며, 각 시간에서 두 처리 농도에서 공통적으로 변화되는 유전자 숫자는 4, 24 및 48시간 동안에 각각 14, 10과 8개로 나타났다. 이러한 결과는 천궁 추출물에 의한 유전자 발현변화는 주로 짧은 시간에 변화되는 것으로 사료되었다.
- 천궁 추출물을 농도별, 시간별로 처리한 후 Volcano plot을 이용하여 fold change >2, P>0.05이상을 만족하는 유의 유전자를 각각 선정한 것 중 공통적인 유전자는 없었다.
- 표 9의 각 sample group에서 공통적인 또는 합한 유전자에 대한 biological pathway를 관찰하였을 때 표 10과 11에서와 같이 나타났다.

Table 9. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups in CR_Ext sample groups.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO genes)	Down (GO genes)	Common (GO genes)	Total (GO genes)
CR_Ext	CR20_4h	Con_4h	19 (9)	19 (13)	14(8)	285(171)
	CR200_4h	Con_4h	192 (120)	69 (37)		
	CR20_24h	Con_24h	38 (17)	22 (13)	10(6)	202(110)
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)		
	CR20_48h	Con_48h	17 (8)	25 (6)	8(4)	97(26)
	CR200_48h	Con_48h	39 (17)	24 (9)		

- 천궁추출물 20 또는 200ug/mL 농도로 4시간 처리하였을 때 공통적으로 변화된 유전자 수는 14개로 그 중에 molecular function이 구분된 유전자는 표 10에서와 같이 huntingtin, thy-1 membrane glycoprotein 등의 2개로 3종의 경로에 관여하고 있다. 그러나 각각의 유의 유전자를 합한 것은 285개로 이들에 대한 biological pathway를 관찰하였을 때 표 11에서와 같이 Regulation of actin cytoskeleton과 Cell cycle 경로가 주작용 경로 이었다.
- 천궁 추출물을 24시간 동안 처리하였을 때 공통적으로 변화된 유전자는 10개로 그 중에 molecular function이 구분된 유전자는 PTPRB (Adherens junction), HTR2A (Calcium signaling pathway; Neuroactive ligand-receptor interaction; Gap junction), CD33 (Hematopoietic cell lineage) 등의 3개 이었다. 그리고 각각의 유의 유전자를 합한 것은 202개이었으며, biological pathway를 관찰하였을 때 Focal adhesion이 주작용 경로 이었다.
- 천궁 추출물을 48시간 동안 처리하였을 때 공통적으로 변화된 유전자는 8개로 그 중에 molecular function이 구분된 유전자는 EDNRB, NRP1 등 2개로 3종의 경로에 관여하고 있다. 그리고 각각의 유의 유전자를 합한 것은 97개이었으며, biological pathway를 관찰하였을 때 Neuroactive ligand-receptor interaction 이었다.

Table 10. Biological pathways of common significant genes of each time CR experimental groups in SH-N-SH cells analyzed.

4h		24h		48h	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Huntington's disease	1	Adherens junction	1	Axon guidance	1
Leukocyte transendothelial migration	1	Calcium signaling pathway	1	Calcium signaling pathway	1
Neurodegenerative Disorders	1	Gap junction	1	Neuroactive ligand-receptor interaction	1
		Hematopoietic cell lineage	1		
		Neuroactive ligand-receptor interaction	1		

Table 11. Major biological pathways of genes merged the significant genes (fold change>2, P>0.05) selected from each time CR experimental groups in SH-N-SH cells using Volcano-plot.

4h		24h		48h	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Regulation of actin cytoskeleton	3	Focal adhesion	4	Neuroactive ligand-receptor interaction	3
Cell cycle	3	Tight junction	3	mTOR signaling pathway	1
Wnt signaling pathway	2	Neuroactive ligand-receptor interaction	3	Urea cycle and metabolism of amino groups	1
Axon guidance	2	MAPK signaling pathway	3	Toll-like receptor signaling pathway	1
Apoptosis	2	ECM-receptor interaction	3	T cell receptor signaling pathway	1
Phosphatidylinositol signaling system	2	Wnt signaling pathway	2	Phosphatidylinositol signaling system	1
Neurodegenerative Disorders	2	Cell Communication	2	Calcium signaling pathway	1
Natural killer cell mediated cytotoxicity	2	Calcium signaling pathway	2	Axon guidance	1
Leukocyte transendothelial migration	2	Apoptosis	2	Natural killer cell mediated cytotoxicity	1
Jak-STAT signaling pathway	2	Regulation of actin cytoskeleton	2	MAPK signaling pathway	1
Huntington's disease	2	Jak-STAT signaling pathway	2	Long-term potentiation	1

◦ 유전자들의 발현 조절은 유전자의 종류에 따라 발현이 변화되는 시간이 달라지므로 같은 물질들을 처리하더라도 처리 시간에 따라 유전자 발현 양상이 달라지므로 유의 유전자들이 다른 것을 알 수 있었다.

2) NMDA의 처리에 따른 유전자 발현 변화 및 이에 미치는 천궁 추출물 및 그 분리물질의 약리 효능 유전자 선정

- 천궁 70% ethanol 추출물(CR)과 ligustilide, senkynolide A 및 ferulic acid의 약리효능을 관찰하기 위하여 중추신경 흥분독인 NMDA를 독성물질 선정하여 처리하였을 때 nitric oxide 생성이 증가되었으며, 천궁 추출물을 동시에 처리하면 증가된 nitric oxide 양이 감소함을 관찰하였다. 이를 바탕으로 먼저 100uM NMDA 처리에 의한 유전자 발현 변화를 천궁 물질들을 동시에 처리한 후 유전자 발현을 비교하였다.
- 먼저 NMDA를 100uM로 4시간과 24시간 처리한 후 각각의 대조군과 비교하여 2 fold 이상 변화가 있으며, P>0.05인 유전자들을 선정하여, 공통적인 것과 합한 것에 대한 유전자 발현 양상을 비교를 하였다 (표 12).
- NMDA를 처리하였을 때 4시간과 24시간에 공통적으로 나타나는 유전자는 총 90개로 GO 유전자는 65개로 나타났다. 그리고 합한 유전자는 총 1478개로 GO 유전자는 876개 이었다. 합한 유전자

Table 12. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups treated with or without NMDA.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO 유전자)	Down (GO 유전자)	Common (GO 유전자)	Total (GO 유전자)
NMDA	NMDA_4h	Con_4h	476 (399)	556 (280)	90(65)	1478(876)
	NMDA_24h	Con_24h	139 (87)	337 (235)		
CR_Ext/ NMDA	CR20_NMDA_4h	NMDA_4h	7 (5)	6 (3)	1(0)	60 (31)
	CR200_NMDA_4h	NMDA_4h	8 (5)	9 (4)		
	CR20_NMDA_24h	NMDA_24h	8 (5)	9 (4)	0	65(32)
	CR200_NMDA_24h	NMDA_24h	17 (6)	20 (10)		
Ferulic acid /NMDA	FeA	Con_24h	206 (115)	365 (257)	103(69)	895(573)
	FeA_NMDA	NMDA_24h	179 (111)	248 (159)		
Z-Ligustilide /NMDA	Lig	Con_24h	323 (206)	698 (490)	106(74)	1312(850)
	Lig_NMDA	NMDA_24h	228 (108)	169 (120)		
Senkyunolide A /NMDA	Senk	Con_24h	396 (276)	445 (287)	323(223)	2589(1719)
	Senk_NMDA	NMDA_24h	1254 (858)	817 (523)		

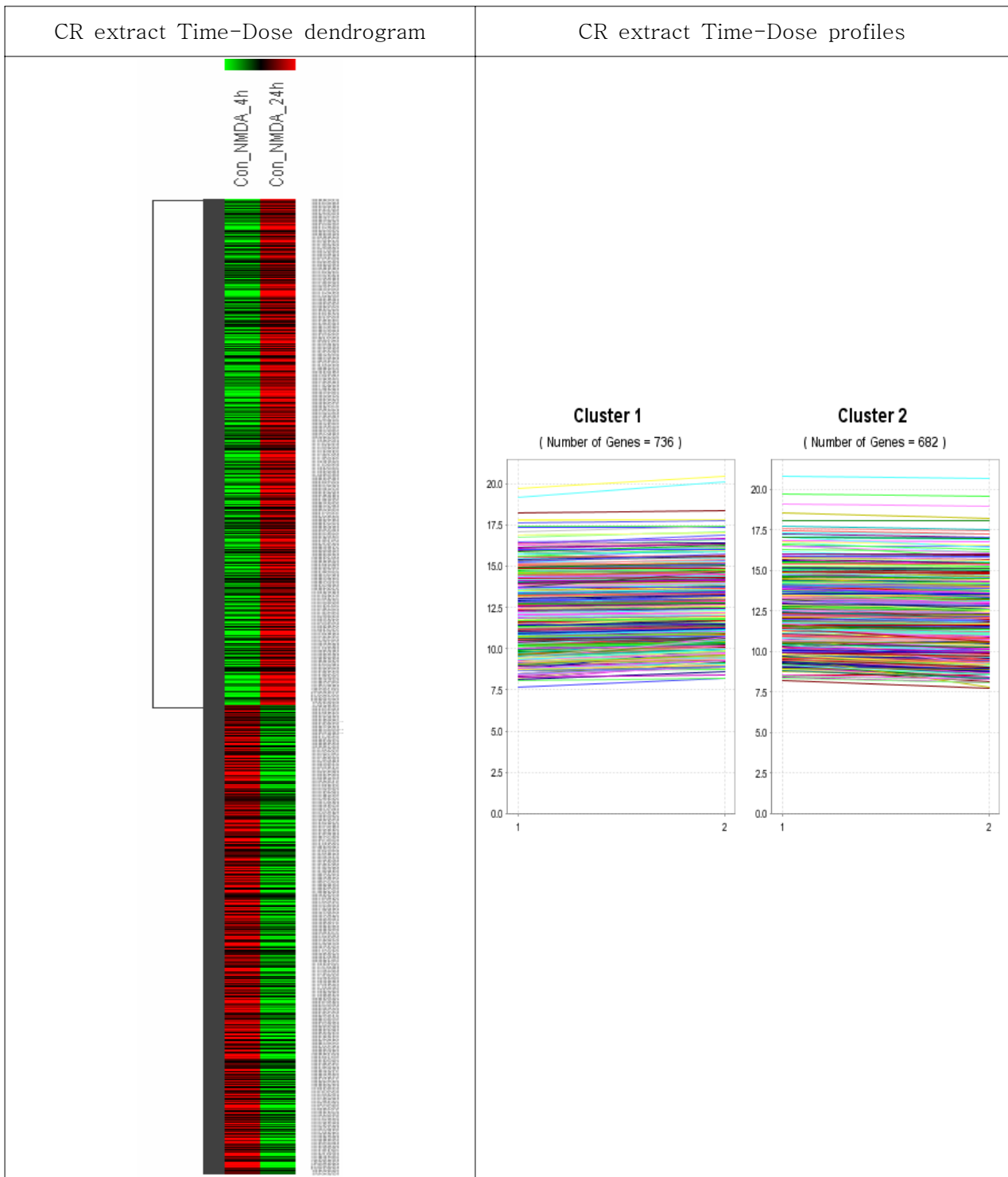
1478개를 갖고 NMDA 처리시간에 따른 유전자 발현변화에 대한 gene clustering을 실시하였다. 그림 35에서 보면 크게 두 개의 군으로 나뉘어 4시간에서 발현이 낮아졌다가 다시 24시간에서 높아지는 class I과 그 반대 경향을 나타내는 class II로 나눌 수가 있었다. NMDA에 의한 유전자 발현 변화는 4시간이 24시간 보다 크게 나타나 처리 초기에 유전자 발현이 크게 변화됨을 알 수 있었다.

- NMDA에 의해 발현이 변화된 유전자들의 biological pathway를 관찰하였을 때 표13에서와 같이 focal adhesion과 actin cytoskeleton pathway에 관여하는 유전자 발현 변화가 가장 크게 나타났다.

Table 13. Major biological pathways of significant genes merged the significant genes of each experimental group which was treated the 100uM NMDA for 4h and 24h in SH-N-SH cells analyzed using Volcano plots.

KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Focal adhesion	26	Adipocytokine signaling pathway	12
Regulation of actin cytoskeleton	23	Phosphatidylinositol signaling system	11
MAPK signaling pathway	17	Natural killer cell mediated cytotoxicity	10
Leukocyte transendothelial migration	17	Jak-STAT signaling pathway	10
Tight junction	15	Gap junction	10
Insulin signaling pathway	13	Cell adhesion molecules (CAMs)	10
TGF-beta signaling pathway	12	Calcium signaling pathway	10
Cell cycle	12	Apoptosis	10
Axon guidance	12		

Figure 35. Cluster analysis of time-dependent gene expression data in the SK-N-SH cells treated with 100uM NMDA for 4h and 24hr.



- NMDA에 의한 발현이 변화된 유전자 중 focal adhesion pathway에 관여하는 유전자를 관찰하였을 때 그림 36과 같았다. 각 유전자들의 시간별 발현정도를 관찰하였을 때 표 14에서와 같이 많은 유전자들이 NMDA 처리에 의하여 발현이 감소되었으며, 관련 유전자 대부분이 4h이나 24h에서 발현 변화가 유사한 양상으로 나타났다.

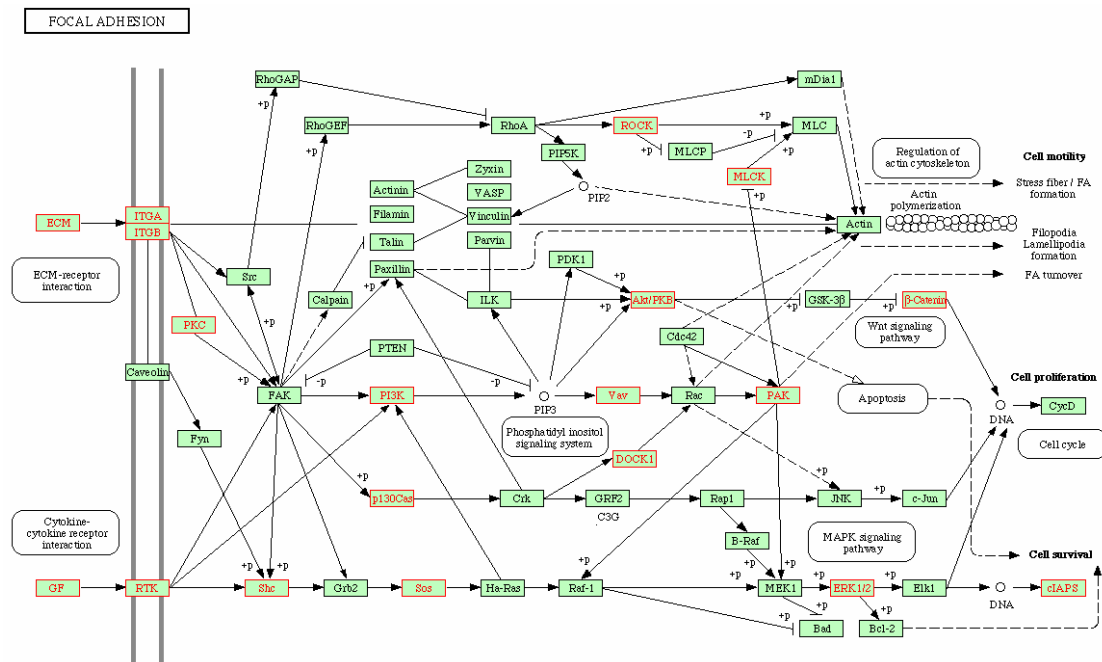


Figure 36. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 100uM NMDA for 4 and 24h in focal adhesion pathway

Table 14. The list of genes related to focal adhesion pathway in NMDA treated SK-N-SH cells.

Selected genes	gene expression level (log2 based)			
	Con_4h	Con_NMDA_4h	Con_24h	Con_NMDA_24h
LAMA4	15.672	12.527	13.889	12.355
VAV1	10.475	9.099	9.409	9.630
ITGAV	15.043	14.198	15.524	14.279
AKT2	9.264	10.087	8.343	10.007
PRKCA	9.480	9.480	11.181	9.122
ITGA6	18.775	17.113	18.531	17.405
FN1	11.150	12.026	10.407	11.543
GDPD3:MAPK3	8.827	11.665	9.102	11.307
PAK4	16.148	14.883	15.614	15.166
SOS1	10.293	9.826	10.958	9.696
BIRC3	11.200	9.876	12.119	9.101
SHC3	12.262	10.754	11.975	11.298
BCAR1	11.290	14.045	12.199	13.931
IGF1R	10.020	8.941	9.949	8.612
THBS1	13.883	15.658	15.334	15.350
DOCK1	12.851	12.508	13.798	12.679
MLCK	12.207	10.455	10.888	10.523
PIK3R1	9.915	8.903	10.394	8.424
ITGB4	10.541	12.752	11.265	12.771
PDGFC	15.390	15.198	16.406	15.320
ROCK1	14.014	12.846	14.023	12.834
LAMA5	11.901	13.271	12.367	13.288
PIK3CB	11.259	10.023	11.722	9.656
CTNNB1	11.008	14.844	13.852	14.907
ROCK2	14.928	13.771	14.591	13.768
ROCK1	14.062	13.040	13.977	12.924

- 천궁 (CR) 70% ethanol 추출물의 약리효능관련 유전자를 관찰하기 위하여 CR 70% ethanol 추출물을 20ug/ml과 200ug/ml을 100uM NMDA와 동시에 4시간이나 24시간 동안 처리한 후 유전자 발현변화를 관찰하였다.
- 표 12에서 보면 CR과 NMDA를 동시에 처리하였을 때 유의 유전자 수가 매우 적었으며, CR 농도나 시간에 따른 변화도 크지 않았으나 CR 20ug/ml 농도로 처리한 것 보다는 200ug/ml 농도로 처리한 것에서 유의 유전자수가 크게 나타났다. 이러한 결과는 NMDA를 100uM과 CR 20ug/ml 을 동시에 처리하였을 때 NMDA에 의한 NO 생성량은 감소되었으나 예상외로 유전자 변화에는 영향을 미치지 못한 것으로 사료되었다. 그리고 효능 유전자변화는 CR 200ug/ml 농도 이상으로 처리하면 효능이 더욱 커질 것으로 예상되었다.
- 천궁 추출물에 대한 약리 효능 유전자는 CR 200ug/ml과 NMDA 100uM 농도로 동시에 24시간 동안 처리한 후 변화된 유전자들을 중심으로 선정하였다. 즉 천궁 EtOH 추출물의 경우 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_CR200_24h 유의 유전자를 합친 527개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 그림 36에서와 같이 14개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10에 속한 유전자들을 합하여 얻은 164개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_CR200_24h 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 천궁 추출물의 효능 유전자로 선택하였다(표 15).
- Ferulic acid(FeA)는 천궁 70% ethanol 추출물 중에 약 2.5mg/g 정도 차지하고 있는 물질로 이를 100uM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, $P > 0.05$ 이상인 유전자를 volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 표 12에서와 같이 568개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 460개 이었다. 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 표 16에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 Regulation of actin cytoskeleton pathway, Focal adhesion pathway 및 MAPK signaling pathway로 각각 12종, 11종과 9종의 유전자가 관련되어 있었다.
- FeA의 약리 효능 유전자는 FeA 100uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, $P > 0.05$ 인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_FeA 유의 유전자를 합친 1012개의 유전자를 Hierarchical clustering 하였다. 그림 37에서와 같이 13개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8에 속한 유전자들을 합하여 얻은 584개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_FeA 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Ferulic acid의 효능 유전자로 선택하였다 (표17).
- Ligustilide(Lig)는 천궁 추출물 중에 약 6.5mg/g 정도 포함되어 있는 물질로 50uM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, $P > 0.05$ 이상인 유전자를 volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 표 12에서와 같이 1312개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 850개 이었다. 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 표 16에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 Cell cycle, Focal adhesion 과 Regulation of actin cytoskeleton 경로들이었으며, 각각 19종, 16종 및 14종의 유전자가 관여하고 있었다.
- Ligustilide의 약리 효능 유전자는 Lig 50uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, $P > 0.05$ 인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_Lig 유의 유

Figure 36. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with 200ug/ml 70% ethanol extract of *Cnidii Rhizoma* with or without 100uM NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

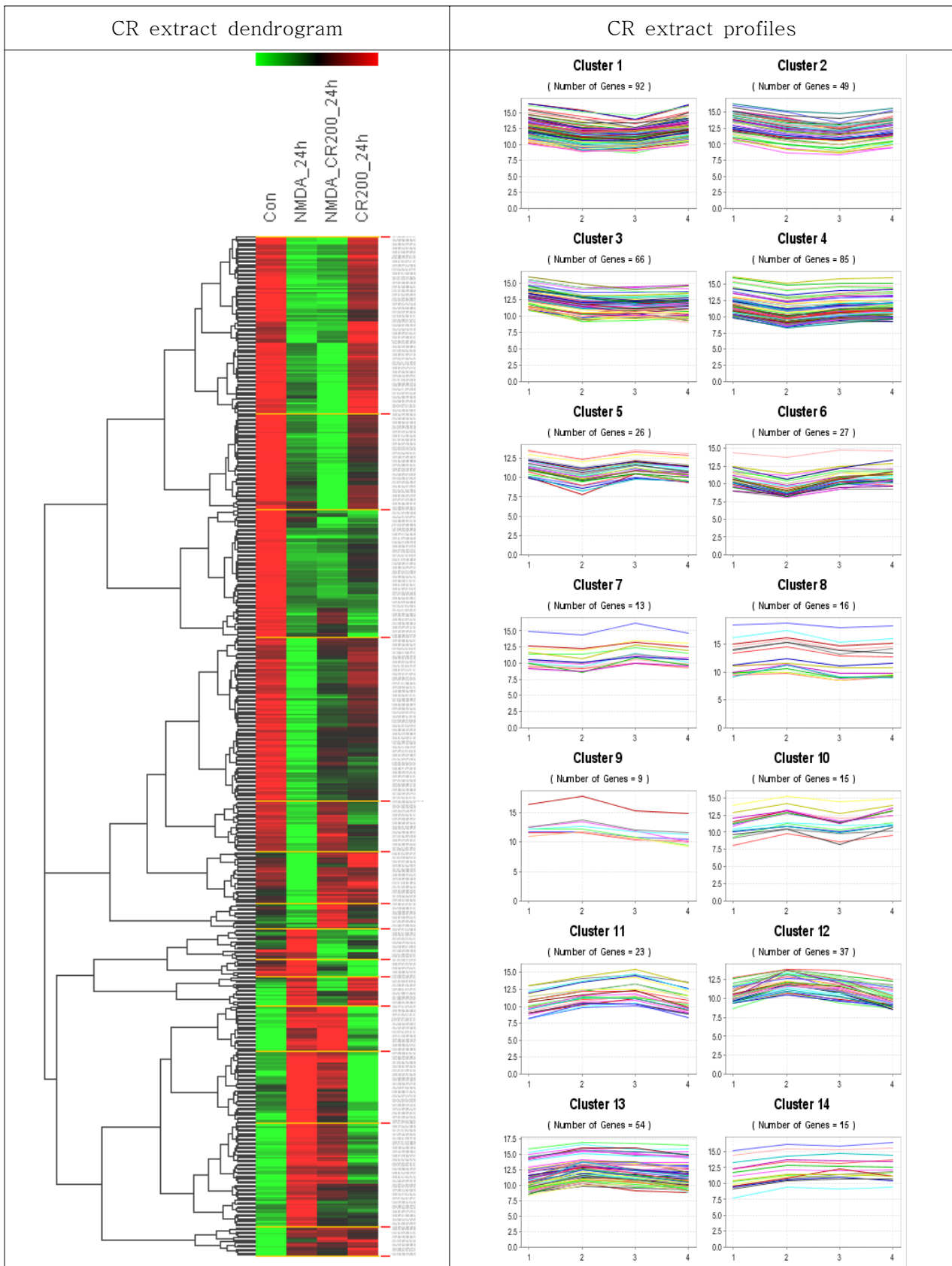


Table 15. Pharmacological active genes selected from the groups treated CR 200ug/ml with or without 100uM NMDA in the SK-N-SH cells for 24h

	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_CR20	NMDA_CR200
1	192466	GSG1	9.213	11.261	10.978	9.218
2	142958	MAFG;SIRT7	8.626	10.777	10.985	9.428
3	213890	NRP1	12.279	8.518	9.026	9.586
4	144588	MFGES	8.948	10.752	10.396	9.746
5	159850	AP1GBP1	10.162	8.703	8.939	10.004
6	100694	PHTF2	11.510	9.004	9.019	10.013
7	213519	SLC12A2	11.358	9.174	9.764	10.306
8	100966	KIAA1641	10.608	8.572	9.544	10.417
9	123450	NR4A2	10.046	7.788	8.844	10.543
10	236580	GPR125	11.489	9.422	9.674	10.654
11	105113	DOCK5	11.600	9.716	9.425	10.742
12	101594	CCDC95	10.098	12.073	11.606	10.789
13	113036	PARD6B	11.028	9.679	10.564	10.831
14	225893	PDE7A	11.123	9.757	9.977	10.838
15	227033	DMXL1	10.915	8.737	9.918	10.927
16	235590	DHX40	12.433	9.881	9.420	10.944
17	207047	HESX1	10.510	9.179	9.777	10.994
18	177512	RAB4B	10.411	12.136	11.975	11.056
19	118400	INTS2	11.150	9.811	9.340	11.071
20	117435	EP400	11.281	10.131	9.974	11.279
21	128717	MTPN	11.478	13.074	12.655	11.413
22	143978	CASK	11.503	10.449	10.397	11.622
23	148950	SCARF2	10.920	13.309	13.056	11.696
24	163861	FGD6	12.024	10.697	10.837	11.924
25	162667	STAG1	12.258	10.882	10.951	11.971
26	227835	PDE4DIP	12.496	11.437	11.736	12.522
27	149339	CUEDC1	12.810	14.114	13.980	12.660
28	150170	SLC25A1	14.542	15.900	15.814	14.001
29	166760	ABL1	15.048	16.120	15.811	14.751
30	172572	TAGLN	16.372	17.808	17.534	15.324
31	125960	CRIP2	16.190	17.450	17.191	15.436

전자를 합친 920개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 그림 38에서와 같이 10개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 3, 4, 6, 8에 속한 유전자들을 합하여 얻은 288개의 유전자 중 fold change가 Con_NMDA와 NMDA_Lig 각각에 대하여 2.5이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Ligustilide의 효능 유전자로 선택하였다 (표 18).

- Senkyunolide A(Senk)는 천궁 추출물 중에 약 23.9mg/g 정도 포함되어 있는 물질로 50uM 농도로 24시가 동안 처리하였을 때 대조군과 비교하여 fold change 2이상이고, P>0.05이상인 유전자들

Table 16. Major biological pathways of the significant genes (fold change>2, P>0.05) selected from the groups treated with ferulic acid, ligustilide or senkyunolide in SH-N-SH cells.

Ferulic acid		Ligustilide		Senkyunolide A	
KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
Regulation of actin cytoskeleton	12	Cell cycle	19	MAPK signaling pathway	18
Focal adhesion	11	Focal adhesion	16	Cell cycle	15
MAPK signaling pathway	9	Regulation of actin cytoskeleton	14	Tight junction	10
Cell cycle	9	Pyrimidine metabolism	13	Tryptophan metabolism	9
Purine metabolism	8	Purine metabolism	13	Purine metabolism	9
Calcium signaling pathway	7	MAPK signaling pathway	13	Focal adhesion	9
Axon guidance	7	ECM-receptor interaction	10	Insulin signaling pathway	8
Wnt signaling pathway	6	Tight junction	9	Glycan structures - biosynthesis 1	8
Tight junction	6	Axon guidance	9	Axon guidance	8
Jak-STAT signaling pathway	6	Phosphatidylinositol signaling system	8	Regulation of actin cytoskeleton	7
Complement and coagulation cascades	6	Leukocyte transendothelial migration	7	Glutathione metabolism	7
Pyrimidine metabolism	5	Jak-STAT signaling pathway	7	Cytokine-cytokine receptor interaction	7
Cytokine-cytokine receptor interaction	5	Insulin signaling pathway	7	Adipocytokine signaling pathway	7
Phosphatidylinositol signaling system	4	DNA polymerase	7	Wnt signaling pathway	6
Neuroactive ligand-receptor interaction	4	Cell Communication	7	TGF-beta signaling pathway	6
Insulin signaling pathway	4	Calcium signaling pathway	7	Neuroactive ligand-receptor interaction	6
Gap junction	4	ABC transporters - General	7	Calcium signaling pathway	6

volcano plot을 통하여 선정하였다. 선정된 유전자수는 표 12에서와 같이 2589개이었으며, 그 중에 GO 유전자는 1719개 이었다. 이들 유전자들에 대하여 pathway analysis를 하였을 때 표 16에서와 같이 가장 많이 관련하고 있는 경로는 MAPK signaling pathway, Cell cycle 및 Tight junction 경로 이었으며, 각각 18종, 15종과 10종의 유전자가 관여하고 있었다.

- Senkyunolide A의 약리 효능 유전자는 Senk 50uM과 NMDA 100uM을 동시에 24시간 처리한 후 변화된 유전자를 NMDA 단독 처리 후 발현이 변화된 유전자와 비교하여 fold change 2이상이고, P>0.05인 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다. 그리고 Con_NMDA 유의 유전자와 NMDA_Senk 유의 유전자를 합친 2070개의 유전자를 Hierarchical clustering 하여 그림 39에서와 같이 13개의 cluster로 나눈 뒤 clusters 1, 2, 3, 4에 속한 유전자들을 합하여 얻은 556개의 유전자 중

Figure 37. Cluster analysis of genes selected from the groups treated 100uM Ferulic acid with or without NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

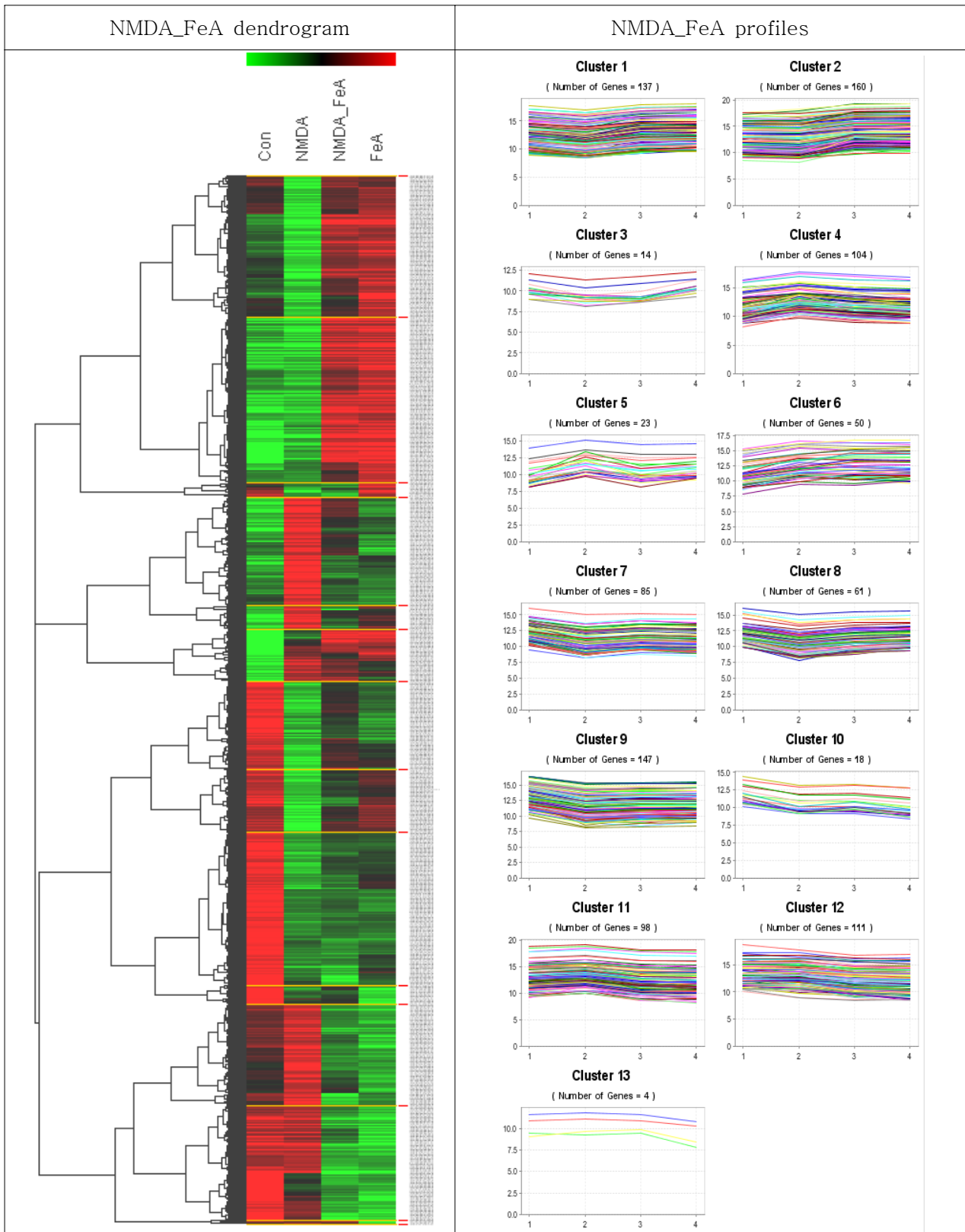


Table 17. Pharmacological active genes selected from the SK-N-SH cells treated 100uM Ferulic acid with or without 100uM NMDA for 24h

	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_FeA	FeA
1	227485	SCOTIN	9.681	11.427	9.181	10.599
2	215361	DAZAP1	9.759	11.121	9.014	10.979
3	163073	PSG9	10.761	11.773	9.741	10.075
4	173477	PSG2	12.179	13.281	11.270	11.761
5	137897	TNFRSF12A	14.331	16.436	14.445	13.708
6	178131	PCOLN3	10.615	12.238	10.393	10.319
7	165200	UCP2	12.852	14.150	12.329	11.522
8	160938	TGM1	9.618	10.650	8.968	9.696
9	198888	CRIP1;C14orf80	10.910	11.888	10.343	10.668
10	148242	HSPA1B;HSPA1A	13.367	14.272	12.826	13.001
11	129361	SLC16A3	15.278	16.442	15.023	14.869
12	167575	ABI3	12.858	13.721	12.394	12.426
13	141668	WISP2	9.742	11.121	9.835	10.237
14	161046	WNT3	11.744	12.690	11.430	11.315
15	234756	TAGLN2	16.391	17.404	16.252	15.957
16	116510	MAGEC3	10.285	11.330	10.181	10.212
17	112112	NUP43	11.680	12.767	11.671	11.957
18	117730	SBF2	13.308	11.982	13.097	13.011
19	197221	MTHFD2	16.155	15.144	16.305	16.605
20	128967	GARS	16.523	15.520	16.683	16.486
21	129799	DOCK4	12.221	10.687	11.938	12.004
22	214622	FBXL21	13.248	11.935	13.299	13.465
23	167731	MAML2	11.570	10.235	11.614	11.574
24	178884	PCSK5	10.566	8.754	10.182	10.514
25	178586	LRP4	13.087	12.085	13.540	13.151
26	207047	HESX1	10.510	9.179	10.635	10.771
27	132892	HIPK3	10.530	8.772	10.330	9.270
28	123450	NR4A2	10.046	7.788	9.673	9.781
29	222417	STIM1	9.606	8.430	10.417	9.867

Figure 38. Cluster analysis of genes selected from the groups treated 50uM ligustilide with or without NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

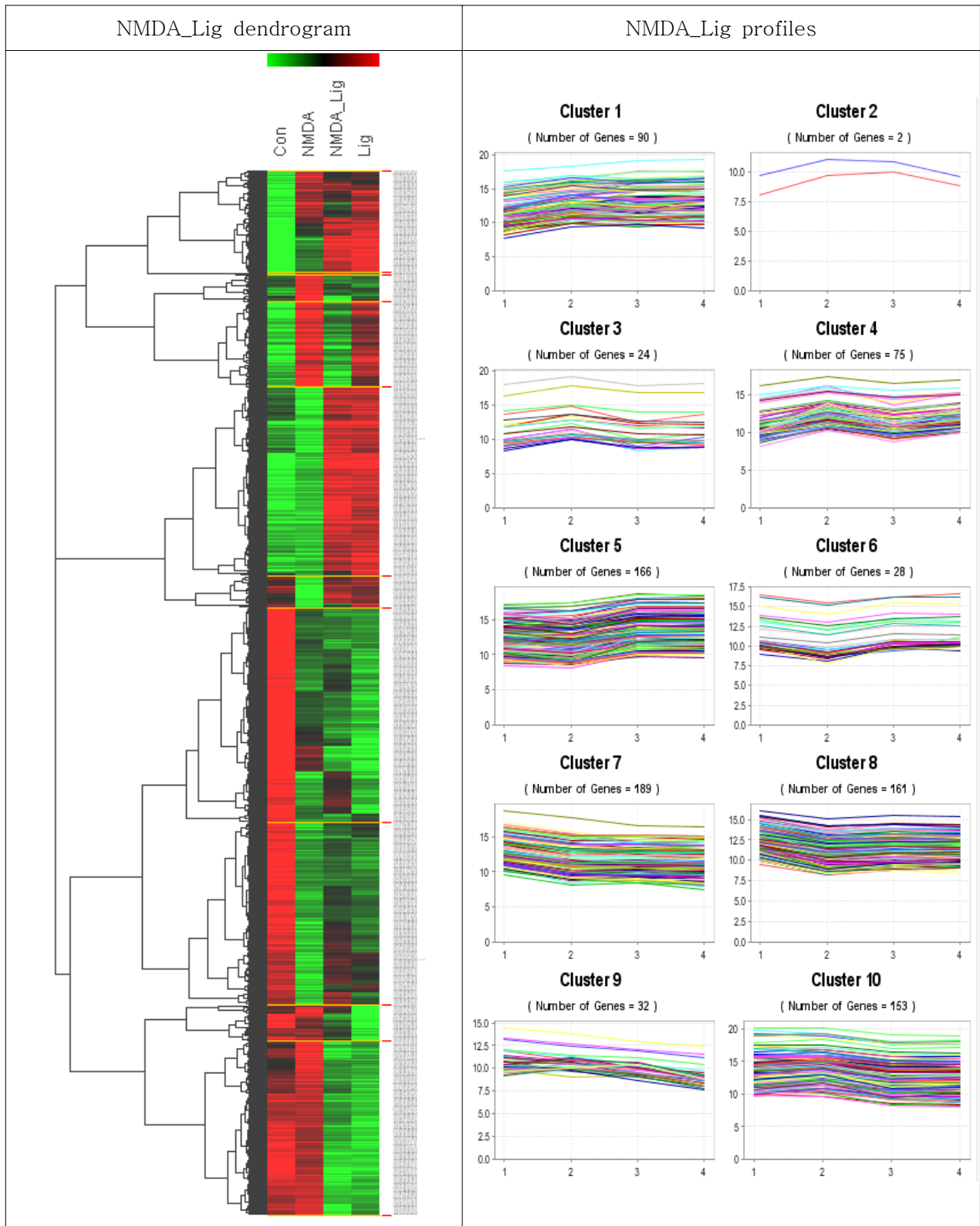


Table 18. Pharmacological active genes selected from the SK-N-SH cells treated 50uM ligustilide with or without 100uM NMDA for 24h

	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_Lig	Lig
1	113036	PAR6B	11.028	9.679	10.942	10.433
2	167731	MAML2	11.570	10.235	11.462	11.012
3	148527	ESCO1	11.972	10.666	11.877	10.861
4	214622	FBXL21	13.248	11.935	13.137	13.070
5	167308	CRY1	11.525	9.630	10.822	10.111
6	148950	SCARF2	10.920	13.309	11.891	12.698
7	150170	SLC25A1	14.542	15.900	14.455	15.152
8	206444	H2AFX	18.027	19.240	17.786	18.109
9	199976	C10orf54	11.800	13.745	12.291	12.212
10	125674	PDK2	10.531	11.848	10.279	11.983
11	181105	DPM2	13.980	15.423	13.845	15.248
12	145225	SLC30A7	11.061	12.651	11.065	12.303
13	101594	CCDC95	10.098	12.073	10.467	11.249
14	177512	RAB4B	10.411	12.136	10.494	11.590
15	185071	NR2F6	10.219	11.518	9.851	11.341
16	210222	MGC4618	10.064	11.345	9.519	10.891
17	172180	CENPB	10.430	13.069	11.127	12.248
18	194434	hCAP-H2	11.210	12.899	10.876	11.792
19	147144	CSG1cA-T	10.132	12.497	10.378	11.376
20	134760	FGFRL1	10.767	12.298	10.062	10.828
21	203030	TUBB2B	13.714	14.876	12.486	13.714
22	182241	AGPAT2	10.038	13.278	10.747	12.634
23	204042	AP1S1	10.900	13.744	11.194	12.534
24	211134	ARHGDI1	10.122	13.779	11.214	12.956
25	105119	TK1	14.277	16.254	13.648	15.077
26	216903	REEP4	11.311	13.729	11.115	12.530
27	178131	PCOLN3	10.615	12.238	9.584	11.774
28	165944	PPP5C	10.972	13.723	11.018	12.562
29	127877	MAP2K3	10.039	11.513	8.678	9.826

fold change가 Con_NMDA와 NMDA_FeA 각각에 대하여 3이상이며, control group의 유전자 copy 수가 상대적으로 크고, 기능이 알려진 유전자를 Senkyunolide A의 효능 유전자로 선택하였다 (표 19).

Figure 39. Cluster analysis of genes selected from the groups treated 50uM senkyunolide A with or without NMDA in the SK-N-SH cells for 24h.

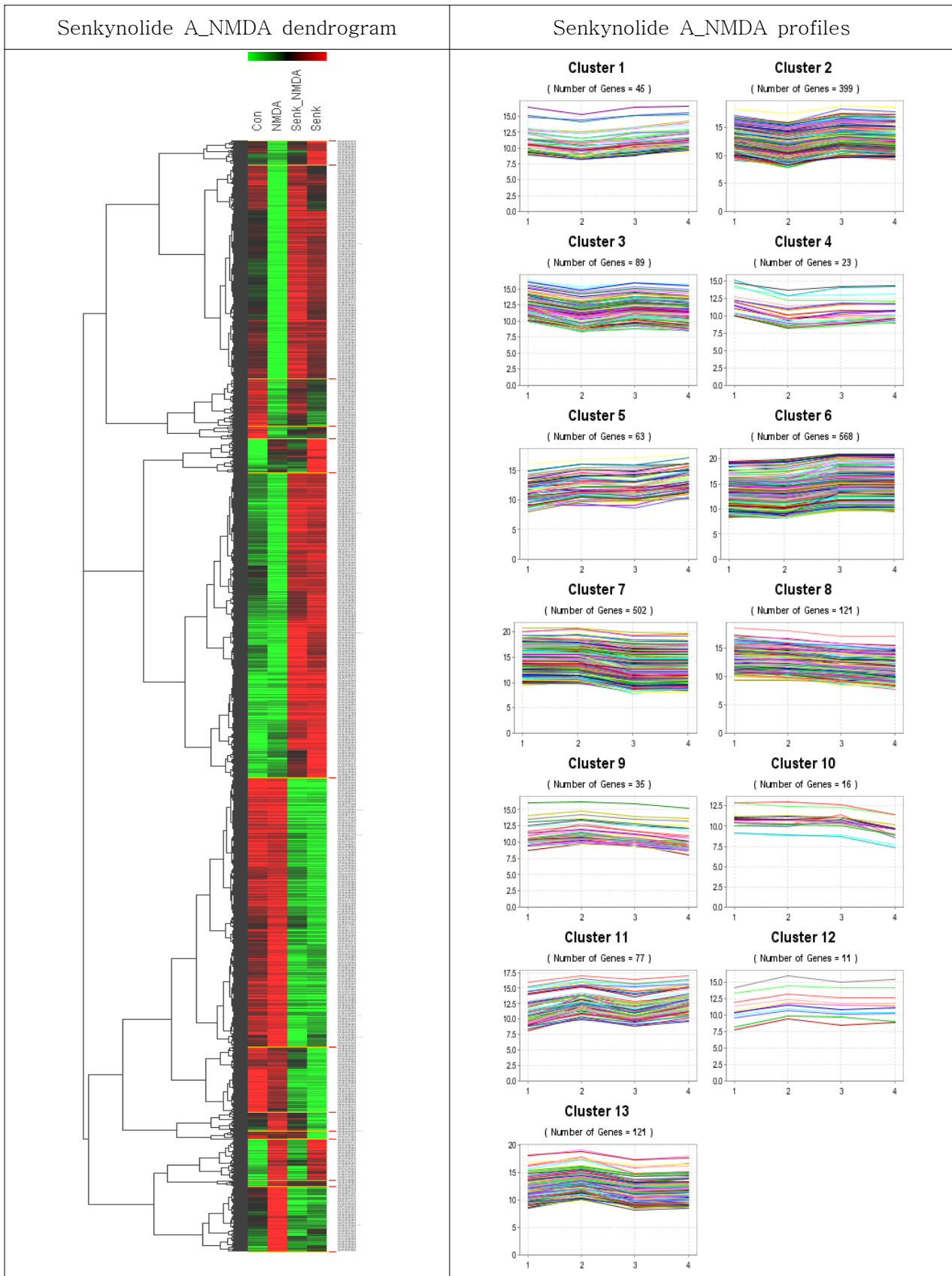


Table 19. Pharmacological active genes selected from the SK-N-SH cells treated 50uM senkyunolide A with or without 100uM NMDA for 24h

	Probe ID	Gene Symbol	Con	NMDA	NMDA_Senk	Senk
1	176899	IL8	14.773	8.969	15.722	15.851
2	213890	NRP1	12.279	8.518	13.364	12.954
3	173408	CXCL2	12.884	9.362	12.189	12.357
4	182859	TRUB1	11.607	9.040	12.526	12.414
5	124216	UHRF2	10.800	8.235	11.896	11.667
6	235590	DHX40	12.433	9.881	13.345	13.271
7	100694	PHTF2	11.510	9.004	11.892	11.701
8	123450	NR4A2	10.046	7.788	10.316	9.629
9	233986	HIPK2	12.645	10.430	13.353	12.618
10	227033	DMXL1	10.915	8.737	10.914	9.876
11	107039	XIST	11.415	9.250	11.845	11.346
12	219437	POLR1B	13.191	11.048	13.435	13.037
13	234638	DST	13.663	11.556	14.188	13.359
14	236580	GPR125	11.489	9.422	12.097	12.109
15	130014	PRKCA	11.181	9.122	11.780	11.332
16	201517	B4GALT6	11.886	9.836	12.034	11.098
17	205153	XPO1	11.463	9.424	12.666	12.398
18	180157	PIK3R1	10.394	8.424	10.645	10.624
19	143920	IPO8	11.197	9.294	11.994	11.682
20	187427	AFTPH	13.480	11.686	13.995	13.819
21	234875	GBE1	11.934	10.165	12.582	12.613
22	132892	HIPK3	10.530	8.772	11.334	10.775
23	135186	ATP11C	10.344	8.590	11.078	10.417
24	151426	VPS41	11.018	9.271	11.982	12.051
25	185324	CCDC6	12.632	10.899	13.402	12.950
26	167300	ROBO1	13.439	11.715	14.240	13.264
27	224778	SENP1	11.334	9.688	12.193	12.171
28	178301	PCTK2	12.715	11.116	13.351	13.062

- 천궁 70% ethanol 추출물과 그 주 구성성분인 FeA, Lig, 및 Senk를 각각 처리한 후 변화된 유전자 중에서 선정된 유의유전자들이 관여하고 있는 biological pathway는 매우 유사한 것으로 나타났으며, 천궁추출물의 주 biological pathway 중 Focal adhesion, Regulation of actin cytoskeleton, MAPK signaling pathway, Tight junction 및 Cell cycle 등은 이들 3종의 물질에 의한 것으로 사료되었다.

3) 천궁의 산지별 효능 유전자 비교

- 천궁의 효능을 산지별로 비교하고자 사업단에서 보내온 시료 15종 한국산(일천궁, *Cnidium officinale* Makino) 3종과 중국산(토천궁, *Ligusticum chuanxiong* Hort) 2종에 대하여 DNA chip 실험을 실시하였다. 시료는 국산 일천궁과 중국산 토천궁 중에서 70% ethanol 추출물의 물질 profile이 조금씩 다른 것을 선정하였다(그림 40, 표 20).
- 천궁 추출물의 성분을 보았을 때 일천궁이나 토천궁 모두에서 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide 등이 주성분으로 나타나는 것은 같았으나 토천궁에서는 이들 성분 외에 다른 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났었다.

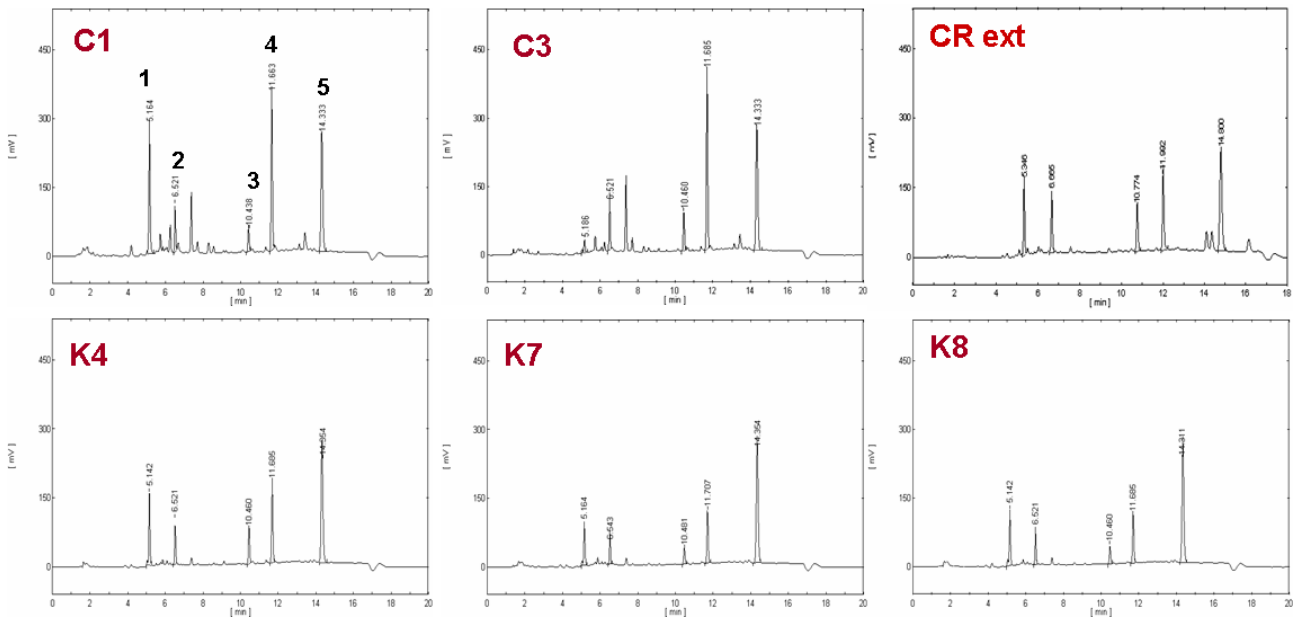


Figure 40. UV chromatograms for the extract samples of *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong*. 1: chlorogenic acid, 2: ferulic acid, 3: senkyunolide A, 4: (Z)-ligustilide, IS: α -naphthoflavone. C1 and C3 were 70% ethanol extract of *Ligusticum chuanxiong* Hort. CR ext, K4, K7 and K8 were 70% ethanol extract of *Cnidium officinale* Makino.

Table 20. Contents of chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, and (Z)-ligustilide in *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong* plants based on the results of LC/UV analysis

Sample No.	산지, 구입처	통용명	Content in plant (mg/g plant)			
			Chlorogenic acid	Ferulic acid	Senkyunolide A	(Z)-ligustilide
C1	중국, 농림	중국산 천궁	4.20	0.79	3.88	4.91
C3	중국, 난주시장	중국약전품	0.54	1.27	9.82	8.65
CR	한국, 강원도 정선	일천궁	2.45	0.79	7.51	2.05
K4	한국, 경북 달성	일천궁	1.96	0.67	6.16	1.65
K7	한국, 경북 영천	일천궁	2.35	0.66	4.78	3.30
K8	한국, 서울 제기동	일천궁	2.60	1.06	4.71	2.57

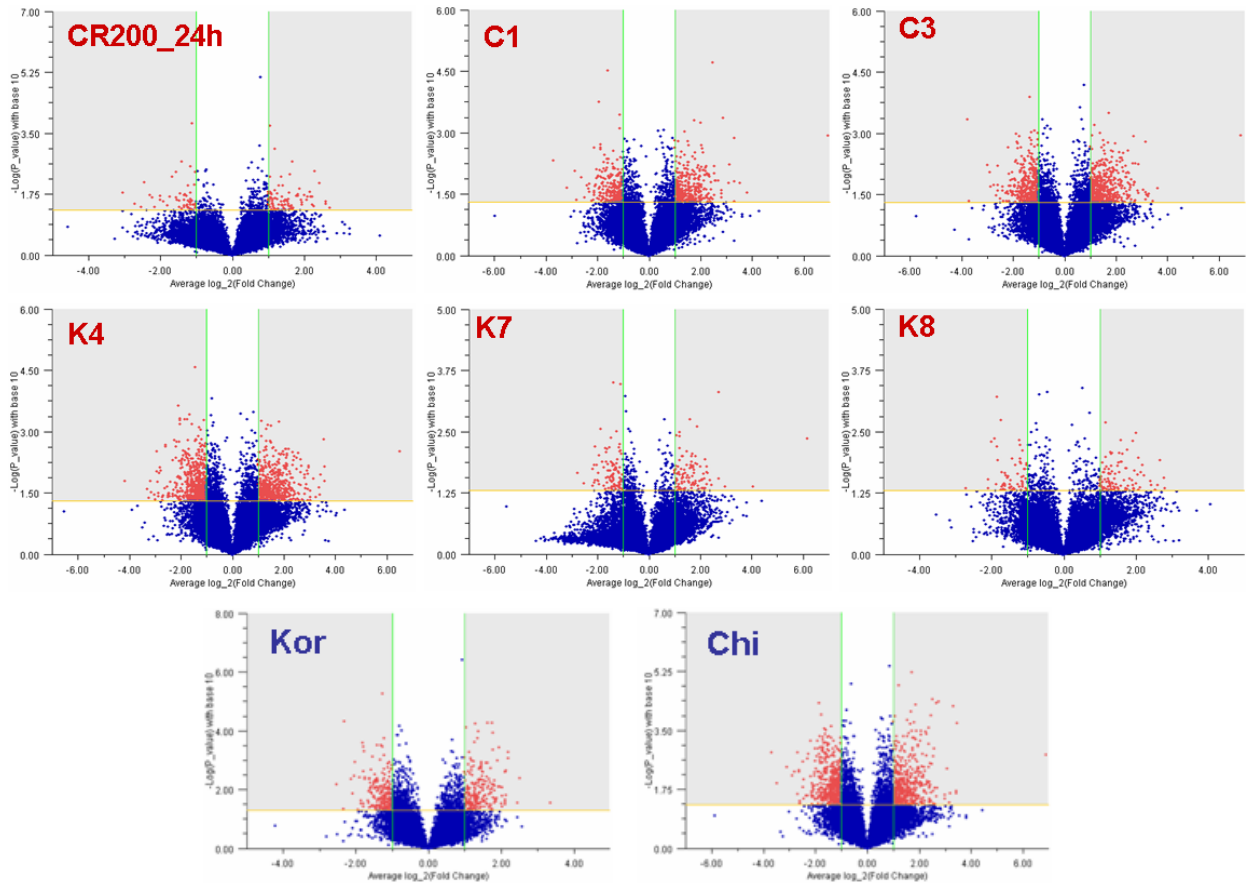


Figure 41. Volcano plots compared the control to the experiments treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location for the selection of biological active genes from in the SK-N-SH cells. Kor were united the results of CR200, K4, K7, and K8. Chi were merged the results of C1 and C3.

- 각 천궁 추출물에 대한 유의 유전자는 천궁 70% ethanol 추출물을 200ug/mL 농도로 SK-N-SH 세포에 24시간동안 처리한 후 대조군과 비교하여 fold change가 2 이상이고, $P > 0.05$ 로 변화된 유전자를 volcano plot을 통하여 구하였다(그림 41). 그리고 일천궁 전체 결과와 토천궁 전체 결과에 대한 유의 유전자는 역시 그림 41에서와 같이 volcano plot을 얻어서 fold change 2 이상이고, $P > 0.05$ 로 변화된 유전자를 구하였다.
- 각 토천궁과 일천궁 실험 그룹 당 유의 유전자 수와 GO 유전자에 대한 정보는 표 21에 나타내었다.
- 일천궁 전체 결과 Kor를 대조군과 비교하였을 때 442개의 유의 유전자를 얻었으나 토천궁 전체결과 Chi의 경우에는 1019개의 유의 유전자를 얻었으며, 일천궁 추출물에 대한 유의 유전자 수는 토천궁 추출물의 것보다 반 정도로 나타났다.
- 토천궁과 일천궁의 유의 유전자 중에서 공통적인 유전자를 관찰하였을 때 그림 42의 Vendiagram에서와 같이 공통적으로 발현이 증가되는 유전자는 155개, 감소되는 유전자는 176개로 나타났다.

Table 21. Gene numbers satisfied the conditions; fold change>2 and P<0.05 from Volcano plots which were compared control to experimental groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino or those of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

Sample group	Exp Name	Control	Gene Number			
			Up (GO 유전자)	Down (GO 유전자)	Common (GO 유전자)	Total (GO 유전자)
CR_Kor	Kor	Con_24h	210 (118)	232 (138)		
	CR200_24h	Con_24h	94 (45)	58(41)		
	K4	Con_24h	545 (373)	498 (329)	3(2)	1301(833)
	K7	Con_24h	95 (61)	99 (61)		
	K8	Con_24h	65 (34)	102 (58)		
LC_Chi	Chi	Con_24h	465 (299)	544 (347)		
	C1	Con_24h	249 (150)	323 (220)	362(248)	1085(679)
	C3	Con_24h	404 (264)	471 (293)		
천궁추출물	Total	Con_24h	131 (78)	164 (114)		

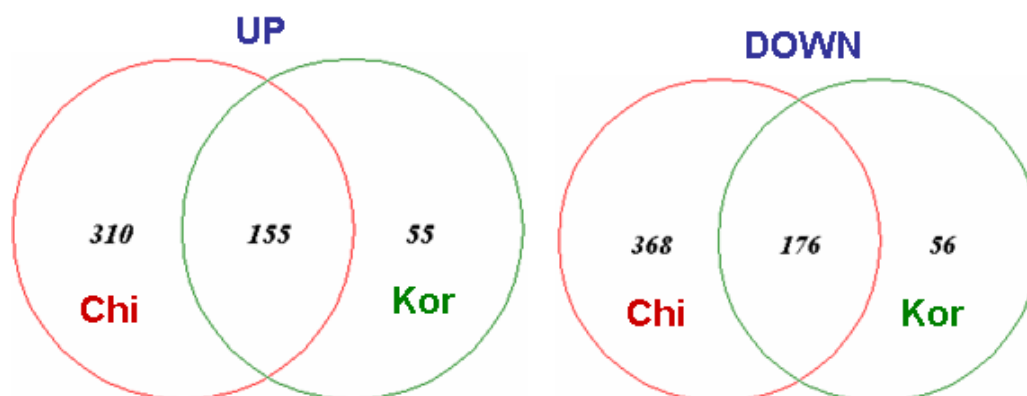


Figure 42. Vendiagram of common genes upregulated or down-regulated by the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (Chi) in SK-N-SH cells.

- 일천궁과 토천궁 추출물에 의하여 발현이 유의적으로 변화된 유전자들을 합하여 Hierarchical clustering하였을 때, 그림 43에서와 같이 6개의 cluster로 나누었으며, 일천궁과 토천궁에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하였을 때 정도 차이는 있었으나 전반적으로 유사한 경향을 나타내었다.

Figure 43. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

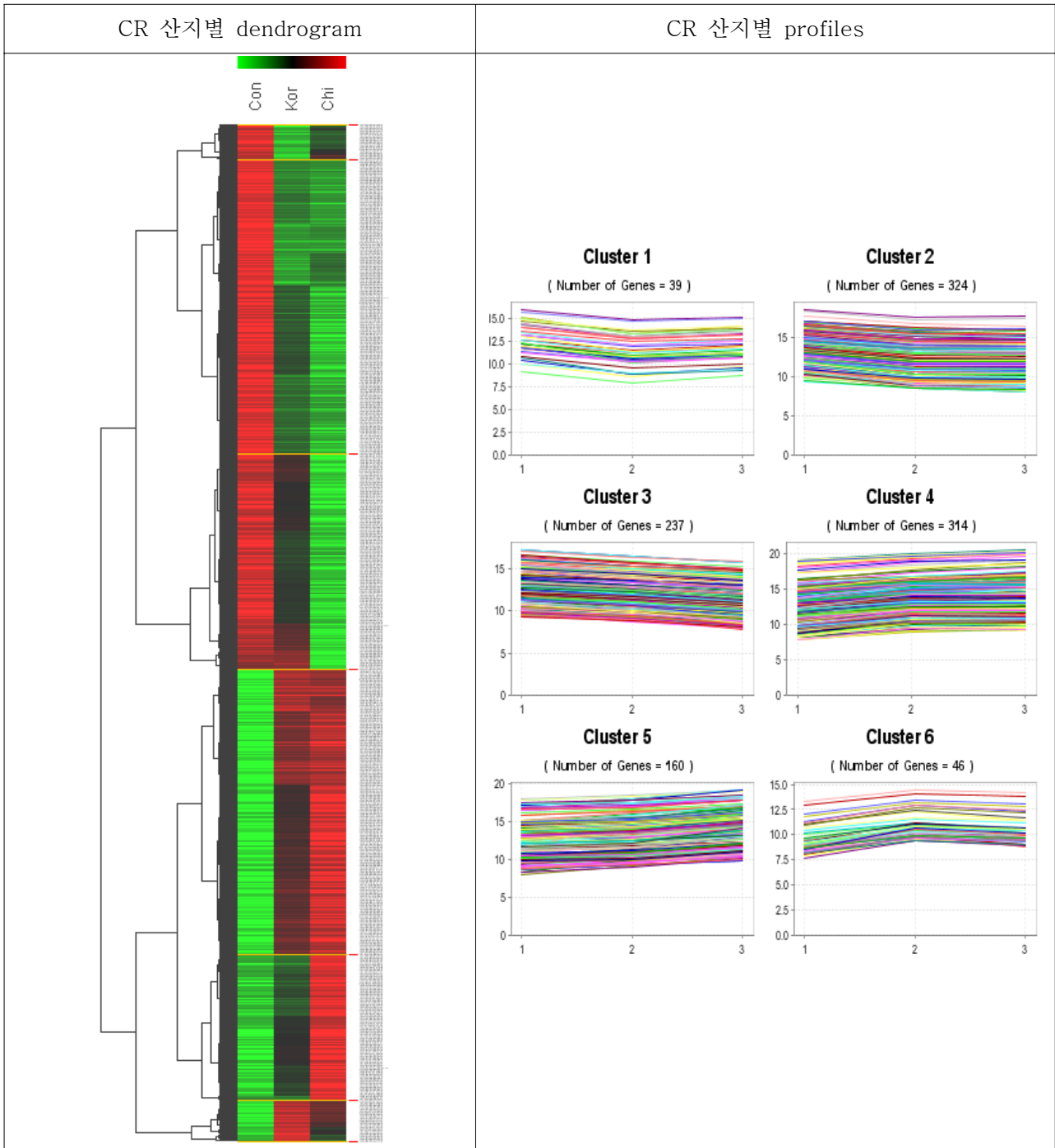


Table 22. Major biological pathways of the significant genes (fold change>2, P>0.05) selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

	Korea		China	
	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
1	Regulation of actin cytoskeleton	9	Cell cycle	21
2	MAPK signaling pathway	9	Purine metabolism	13
3	Cell cycle	9	Pyrimidine metabolism	12
4	Calcium signaling pathway	8	MAPK signaling pathway	12
5	Purine metabolism	6	Regulation of actin cytoskeleton	11
6	Focal adhesion	6	Axon guidance	9
7	Pyrimidine metabolism	5	Focal adhesion	8
8	Jak-STAT signaling pathway	5	Calcium signaling pathway	7
9	Complement and coagulation cascades	5	Tight junction	6
10	Wnt signaling pathway	4	Jak-STAT signaling pathway	6
11	T cell receptor signaling pathway	4	Cytokine-cytokine receptor interaction	6
12	Neuroactive ligand-receptor interaction	4	ABC transporters - General	6
13	ECM-receptor interaction	4	Complement and coagulation cascades	6

- 일천궁과 토천궁 추출물의 유의 유전자들에 대한 biological pathway를 관찰하였을 때 표 22에서와 같이 Regulation of actin, cytoskeleton, MAPK signaling pathway, Cell cycle, Calcium signaling pathway, Purine metabolism, Focal adhesion, 및 Pyrimidine metabolism pathway에 관련 되어 있었으며, 중국산 토천궁에서는 Axon guidance에 관련된 유전자가 국산 일천궁 보다 눈에 띄었다.
- 국산 일천궁과 중국산 토천궁 추출물의 유의 유전자들의 biological pathway 중에서 cell cycle에 대한 것을 비교하였을 때 국산 일천궁에 의해서 9개 단백질이, 중국산 토천궁에 의해서는 21개의 단백질의 발현 변화가 되었으며 이들을 KEGG chart로 나타내었을 때 그림 44와 같았다. 대부분의 cell cycle 관련 단백질의 발현은 down regulation 되었으며, cell cycle이 저해되는 경향으로 나타날 것으로 예상되었다.
- 이러한 일천궁과 토천궁 추출물에 의한 발현 차이는 주성분은 유사하나 다른 성분들이 토천궁에 많이 함유되어 있어 이들에 의하여 유의 유전자 수가 많아지고 효능이 더욱 강하게 나타날 것으로 사료되었다.
- 국산 일천궁의 경우에 성분 중 전반적으로 senkyunolide A나 Z-ligustilide의 함량이 토천궁 보다 적었으나 (1세부 분석팀), chlorogenic acid나 ferlic acid는 차이가 없었다. 특히 토천궁의 경우 senkyunolide A나 Z-ligustilide의 평균 함량은 국산 일천궁에 비하여 약 2배 정도 많이 있었으나

standard deviation 역시 평균 값 만큼 크게 나타나 산지에 따라 함량 차이가 많이 나는 것을 알 수 있었다.

- 다음에는 일천궁과 토천궁을 산지별로 나누어 유의 유전자에 대한 분석을 실시하였다. 산지별 천궁의 Microarray normalization 결과를 대조군과 각 처리군을 Volcano plot (x축은 fold induction 결과, Y축은 Welch's T-test 결과를 나타냄) 을 이용하여 2배 이상 발현이 변화되었고, Welch's T-test < 0.05의 유의성을 나타내는 유전자를 선정하였다 (그림 41, 표21).
- 국산 일천궁의 경우 본 과제에서 천궁 sample로 사용한 CR의 경우 유의 유전자수가 발현이 증가되는 것은 94개 이었고 감소되는 것은 58개로 총 154개로 나타났다. K7이나 K8의 경우 유의 유전자가 각각 194, 167개로 나타나 CR과 유사했으나 경북 달성에서 구입한 K4의 경우 유의 유전자수가 총 1043개로 다른 국산 일천궁에 배하여 유의 유전자수가 약 5배 이상 크게 나타났다.
- 일천궁 각각으로부터 얻은 유의 유전자 중 공통적으로 나타난 것은 3개로 그 중 pirin (iron-binding nuclear protein)과 NDRG family member 4 등 2 종만이 GO 유전자이었다.
- 중국산 천궁의 경우 C1에서는 유의 유전자가 572개로 발현이 증가되는 것은 249개 이었고 감소되는 것은 323개 이었다. C3의 경우 중국약전품으로 875개의 유의 유전자가 선정되었으며, 이 중 발현이 증가되는 것과 감소되는 것은 각각 404종과 471종이 차지하고 있었다. 전체적으로 보았을 때 국산 일천궁과 비교하였을 때 K4를 제외한 국산 일천궁의 유의 유전자 수에 비하여 약 2-3배 정도가 많이 선정되었다.
- 표 21에서와 같이 각 산지별 유의 유전자를 구한 후 일천궁과 중국산 천궁에서 공통적인 유의 유전자는 pirin (iron-binding nuclear protein)한 종류로 천궁추출물에 의하여 5.04 ± 1.08 배가 증가되었다.
- 국내산 일천궁과 중국산 천궁 각각의 결과로부터 얻은 유의 유전자들을 모두 합한 것 (total) 1656종과 이들을 다시 발현이 증가되는 유전자 (up) 762종과 감소되는 유전자 (down) 894종으로 나누어 Hierarchical clustering 한 후 cluster profile을 구하였다.
- 그림 45에서 total 유의 유전자들의 발현 양상을 보았을 때 C1과 C3 및 K4가 유사한 발현 양상을 나타냈으며, CR, K7 및 K8의 경우에는 그 발현양상에 공통점이 크지 않았다. 이러한 결과는 C1, C3 및 K4는 유효 성분들의 함량이 높아서 유전자 발현변화가 잘 나타났으나 CR, K7 및 K8의 경우에는 유효 성분들의 함량이 적은 편이라 천궁에 의한 전형적인 유전자 발현을 나타내기 위해서는 좀 더 높은 농도가 필요할 것으로 사료되었다.
- 그림 46에서 천궁 추출물 처리에 의하여 발현이 감소되는 유의 유전자들의 Hierarchical clustering 결과를 관찰하였을 때 역시 C1, C3 및 K4가 유사한 dendrogram 양상을 나타내었으며, CR의 경우에 대조군과 유사한 양상을 나타내었고 CR과는 K7이 가장 유사한 발현 양상을 나타내었다.
- 그림 47에서는 천궁 추출물 처리에 의하여 발현이 증가되는 유의 유전자들의 Hierarchical clustering 결과를 나타낸 것으로, 이들 역시 C1, C3 및 K4가 유사한 dendrogram 양상을 나타내었으며, CR의 경우에 대조군과 유사한 양상을 나타내었고 CR과는 K7이 가장 유사한 발현 양상을 나타내었다.

Figure 45. Cluster analysis of genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

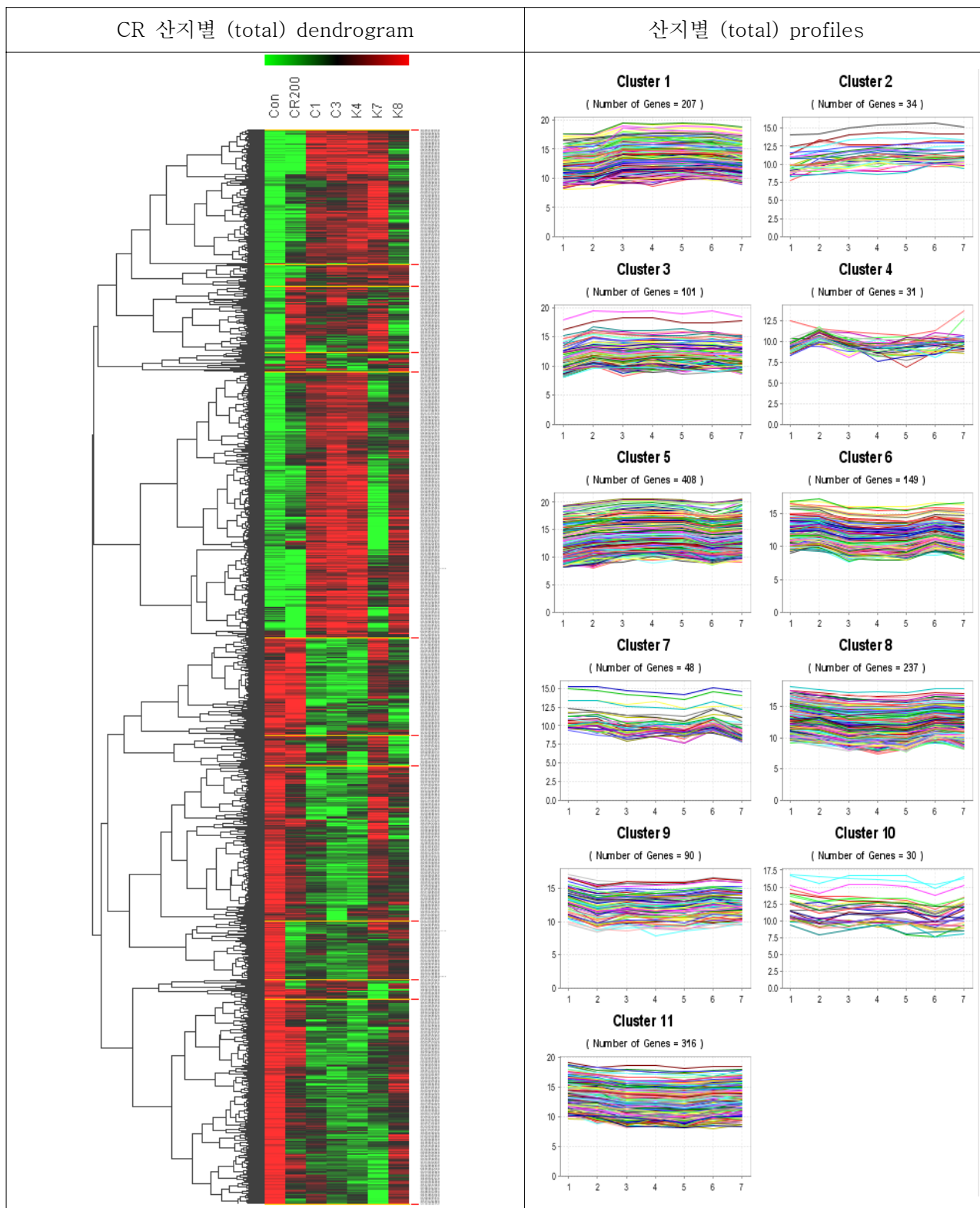


Figure 46. Cluster analysis of down-regulating genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

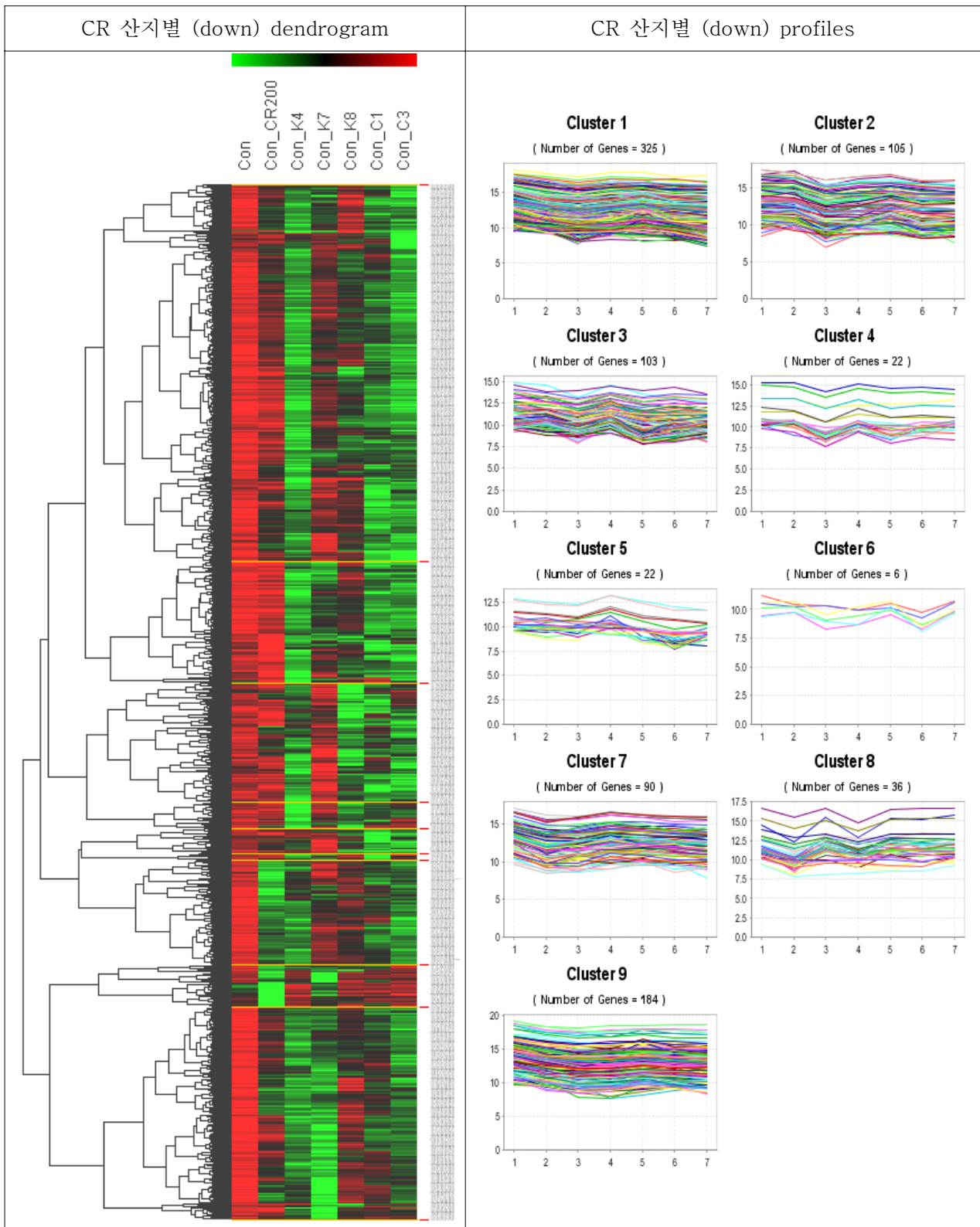
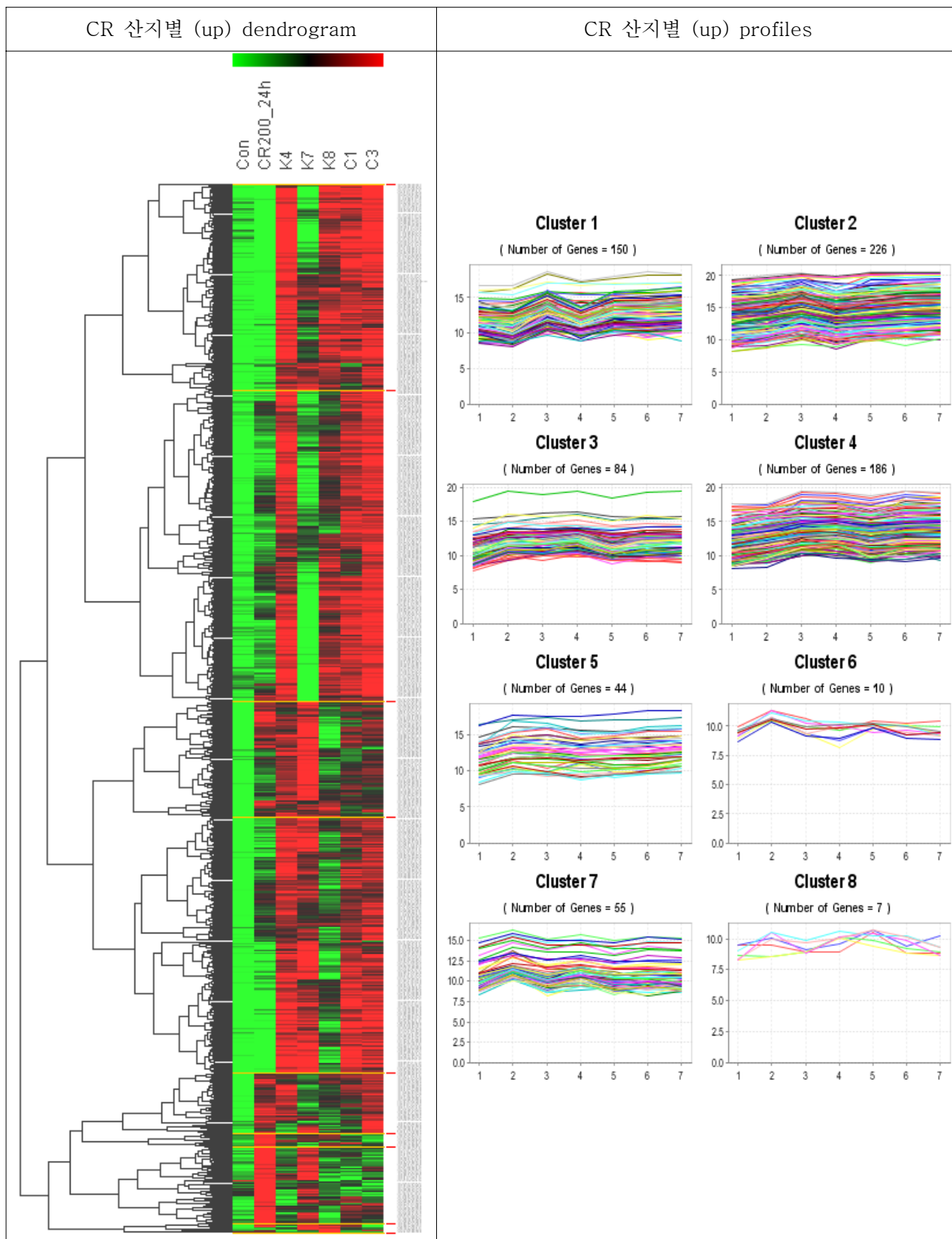


Figure 47. Cluster analysis of up-regulating genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(K) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.



- 산지별 천궁 추출물에 대한 유의 유전자들을 발현이 증가되는 유전자와 감소되는 유전자로 나누어 관련된 biological pathway를 조사하였다. 발현이 증가되는 유의 유전자는 764개로 이중 GO 유전자는 462개였으나 pathway analysis에 분류되어 있는 유전자는 131개 밖에 되지 않았다. 그것을 biological pathway로 분류하였을 때 표 23에서와 같이 주로 focal adhesion 관련 경로에 9종의 유전자가 관련되어 있어 가장 많은 유전자들이 관련되었으며, 다음에는 Wnt signaling으로 8종, MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Axon guidance 관련 유전자가 7종이 있었다.
- 산지별 천궁 추출물에 의하여 up-regulation되는 유의 유전자가 가장 많이 관련되어 있는 focal adhesion pathway를 KEGG chart로 관찰하였을 때 그림 48과 같이 나타났다. ECM은 주로 laminin 들로 laminin γ 3, β 2, β 3와 α 5가 관여되어 있으며, ITGB는 integrin beta 4으로 나타났다. 그리고 GF에는 placenta growth factor가 RTK에는 platelet-derived growth factor receptor alpha와 platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase가 관련되어 있었다. 이러한 결과는 천궁 추출물에 의하여 focal adhesion pathway의 상위 부분에 영향을 미쳐서 전체 관련 경로가 stimulation 될 것으로 사료되었다.
- 산지별 천궁 추출물을 처리하였을 때 발현이 감소된 유의 유전자수는 893개로 증가된 유전자보다 숫자가 많았으며, 그 중 GO 유전자는 565개이고 pathway 관련 유전자는 150개 밖에 되지 않았다. 이것을 관련 biological pathway로 나누어 봤을 때 주로 cell cycle 관련 유전자가 23종으로 가장 많았으며, 다음에 DNA metabolism과 관련된 pyrimidine metabolism 및 purin metabolism에 관련된 유전자

Table 23. Major biological pathways of the up-regulated or down-regulated significant genes (fold change>2, P>0.05) selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(Kor) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(Chi) in the SK-N-SH cells for 24h.

Rank	UP (131/462/764)		DOWN (150/565/893)	
	KEGG Pathway	Gene Counts	KEGG Pathway	Gene Counts
1	Focal adhesion	9	Cell cycle	23
2	Wnt signaling pathway	8	Pyrimidine metabolism	18
3	MAPK signaling pathway	7	Purine metabolism	18
4	Calcium signaling pathway	7	MAPK signaling pathway	13
5	Axon guidance	7	Regulation of actin cytoskeleton	11
6	Regulation of actin cytoskeleton	6	Tight junction	8
7	Porphyryn and chlorophyll metabolism	6	TGF-beta signaling pathway	8
8	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	6	Neuroactive ligand-receptor interaction	8
9	Glutathione metabolism	6	Axon guidance	8
10	ECM-receptor interaction	6	Tryptophan metabolism	7

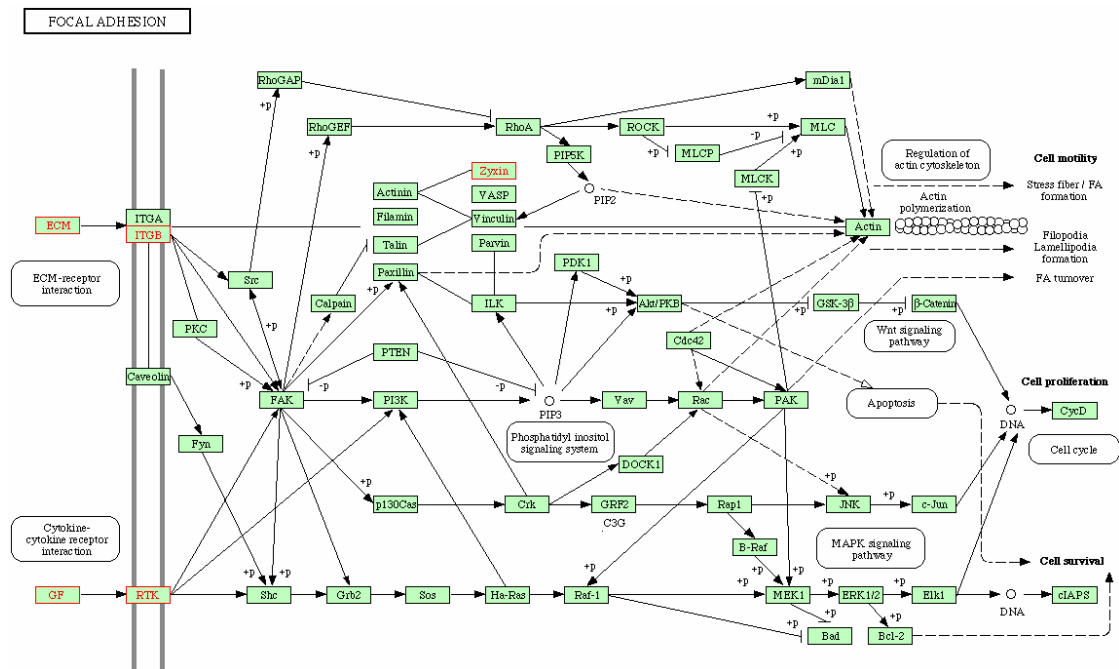


Figure 48. Genes which were obtained from merging the up-regulated significant genes selected by treating the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(B) which were cultivated at different place in focal adhesion pathway.

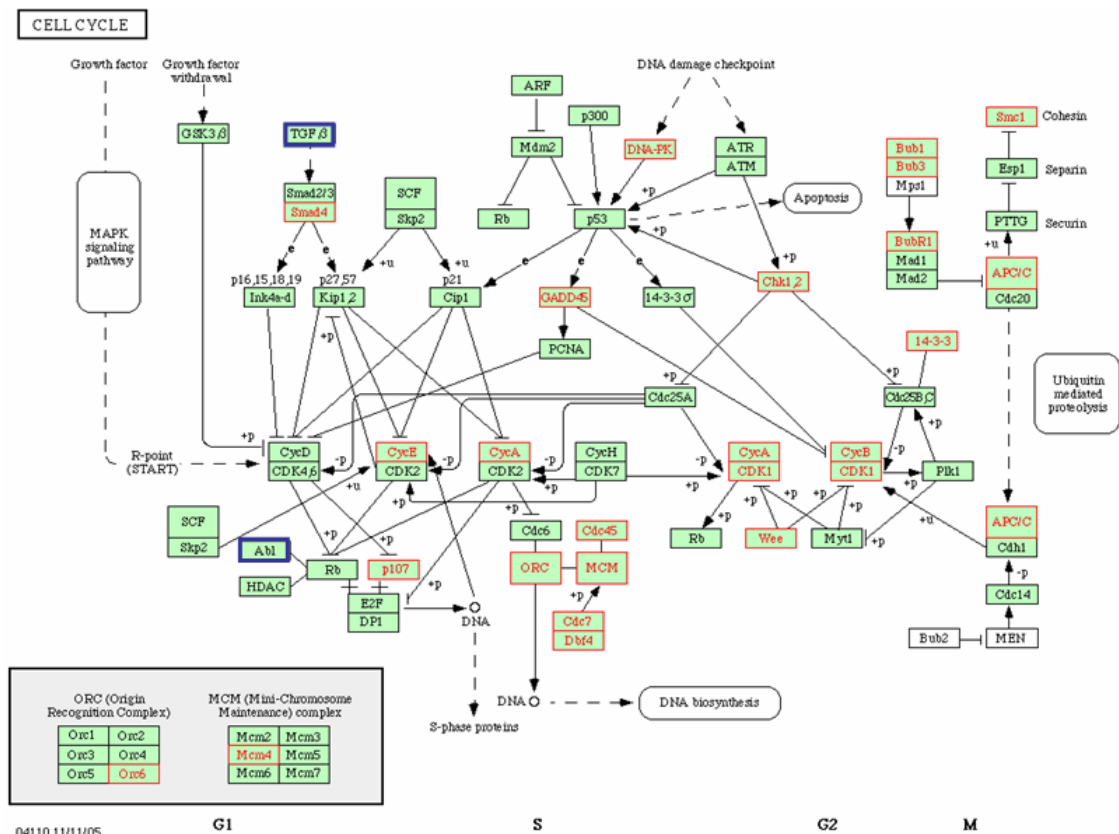


Figure 49. Genes which were obtained from merging the significant genes selected by treating the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(A) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(B) which were cultivated at different place in cell cycle pathway. Red and blue lines were indicated the up-regulated and down-regulated genes.

들이 각각 18종으로 다음을 차지하였다. 그리고 그 다음이 MAPK signaling pathway로 13 종이 차지하고 있었으며, 흥미롭게도 산지별 천궁 추출물에 의하여 MAPK signaling pathway 중 7 종은 증가하기도 하였다.

- 산지별 천궁 추출물을 처리하였을 때 발현이 감소된 유의 유전자수가 가장 많이 관여하는 경로인 cell cycle pathway를 관찰하였을 때 그림 49에서와 같이 23개의 유전자는 cell cycle 관련 단백질의 발현을 저해시켰으며, 2종 즉 TGFβ와 abl1의 발현을 증가시켰으나 이들은 전반적으로 cell cycle을 저해하는 쪽으로 관여하고 있음을 알 수 있었다.

4) 천궁의 품질 관리를 위한 biological pattern recognition analysis의 적용

- 천궁에 대한 유의 유전자를 이용한 생물학적 품질 관리법을 확립하기 위하여 산지별 유의 유전자를 모두 합한 1651 종의 유전자를 이용하여 패턴 인식 분석을 수행하였다. 패턴 인식 분석법으로 가장 일반적으로 쓰이는 주성분 분석(Principle component analysis, PCA)을 수행하고, 패턴 분석 결과를 수치화하기 위하여 각 시료 간의 similarity Index (SI)를 계산하였다 (그림 50, 그림 51, 표 24).
- 그림 50-A의 3차원 PCA graph를 보았을 때 대조군(con) 3개의 sample과 천궁 추출물들에 대한 결과가 나뉘는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 국산 일천궁 K7의 한 sample과 본 과제에서 천궁으로 사용한 CR sample 3종은 다른 천궁 sample들 즉 중국산 천궁 C1, C3이나 일천궁 중 K4, K8과 K7의 한 sample과는 다른 위치에 존재함을 알 수 있었다. 이들 각 sample에 대한 Hierarchical clustering과 비교하였을 때 이들 sample의 유전자 발현 pattern은 유사하고 다른 천궁 sample들과는 다른 것을 알 수 있었다(그림 50-E). 그러나 3차원 그래프를 2차원으로 나누어 관찰하였을 때 XY축 면에서는 K7 외에도 C1이 차이가 많이 나는 것을 알 수 있었으며(그림 50-B), 이 역시 Hierarchical clustering에서 두군 간에 차이가 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 전반적인 천궁 추출물과 대조군과는 유사성이 떨어지는 것이 관찰되었다. YZ 축에서는 역시 K7과 C1이 차이가 많이 나는 것이 보였으나, 이때는 대조군의 위치가 중간으로 들어가 천궁과의 차이를 관찰하기가 힘들었다(그림 50-C). XZ 축에서는 3차원의 그래프와 유사하게 나타나 K7과 CR이 대조군과 유사하였으며, 나머지 군들은 그룹을 이루고 있었다(그림 50-D).
- PCA 결과를 similarity index (SI)와 비교하였을 때 대부분 값이 0.70-0.98 정도를 나타내고 있었으며 (그림 51, 표 24), 이는 중국산이나 한국산이나 그 값의 차이가 실험오차 안에 있음을 알 수 있었으며, 처리한 200ug/mL 농도에서 천궁의 약리작용이 그리 크지 않거나 비교 유전자수가 너무 많아서 또는 선정 유전자의 종류에 따라서 대조군과 큰 차이를 나타내지 않을 수도 있을 것으로 사료되었다.
- 먼저 유전자 수를 적게하기 위하여 천궁 추출물 200ug/mL을 24시간 동안 처리한 후 volcano plot로부터 fold change 2이상, P<0.05인 유의 유전자 152 종을 선정하여 천궁 추출물들 외에 그 구성성분인 ferulic acid, ligustilide, senkyunolide와 독성물질로 사용한 NMDA의 결과에 대해서도 함께 PCA를 시행하였다.
- 각 처리군 별로 유전자 발현 값에 대하여 평균값을 구하여 PCA를 실시하였다. 그림50-A에서와 같이 3D graph로 나타내었을 때 CR20이나 CR200군은 유사하게 나타났으며, 대조군이나 다른 군들과는 차이가 있었다. K4, C1과 C3는 역시 유사한 위치에 존재하였으며, NMDA, FeA나 Lig 군이 함께 유사한 위치에 존재하였으나 대조군이나 CR들과는 다른 위치에 있었다. 그리고 Senk 군이 다른 실험군과 가장 많이 떨어져 있어 유전자 발현이 차이가 많이 날 것으로 예상되었다. 이러한 PCA

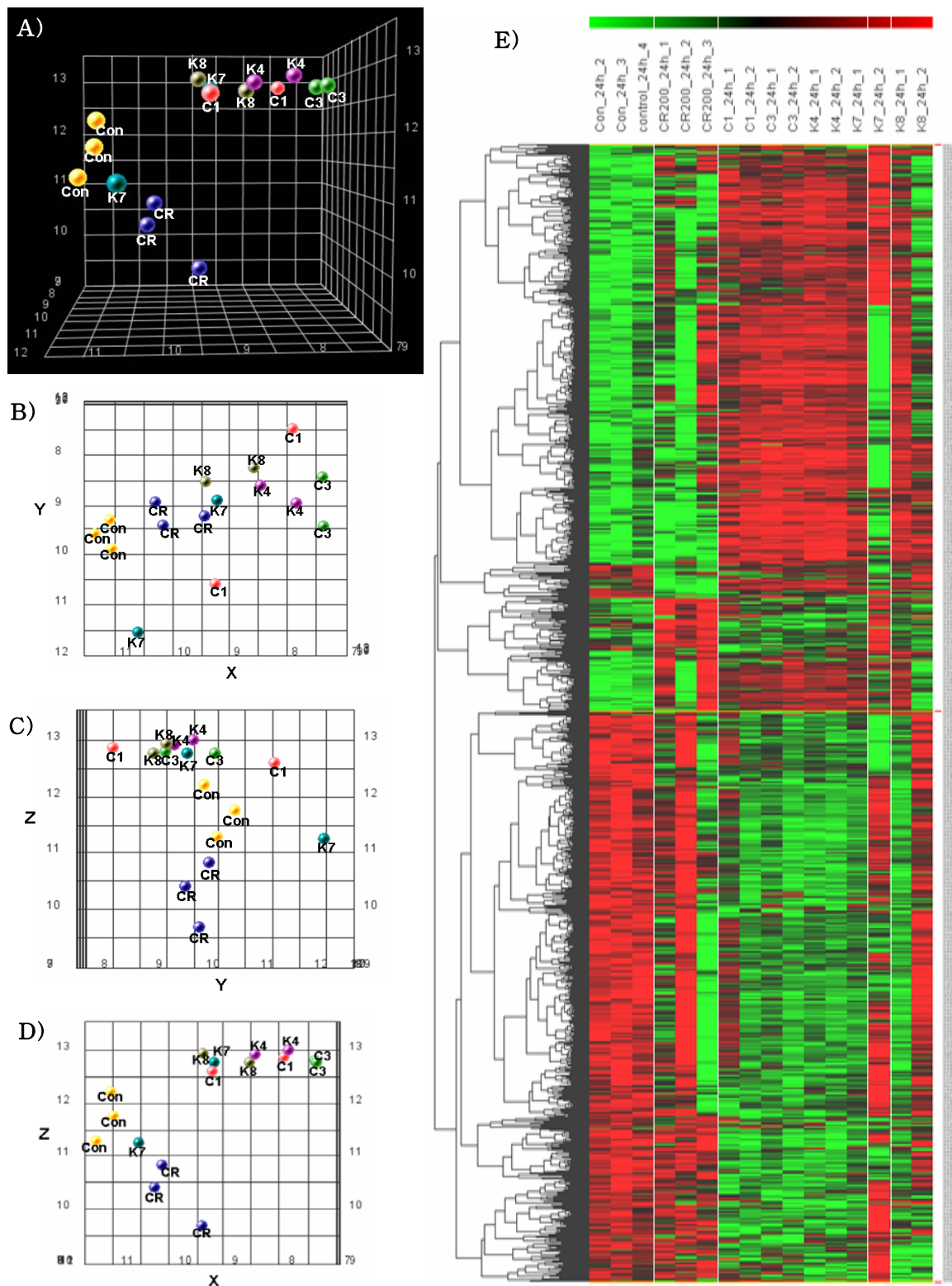


Figure 50. PCA plots and Hierarchical clustering dendrogram for the 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells. A) 3D-PCA graph, B) 2D XY-PCA graph, C) 2D-YZ-PCA graph, D) 2D-XZ-PCA graph and E) Hierarchical clustering dendrogram

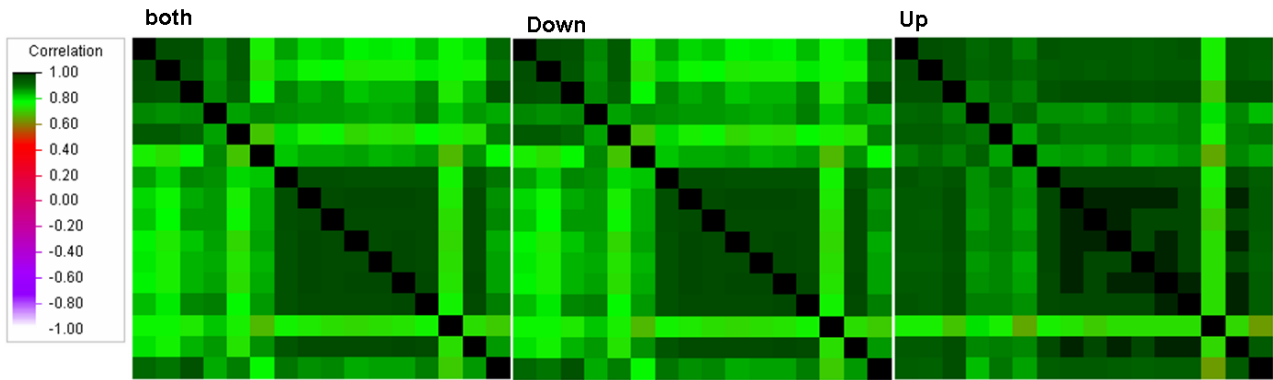


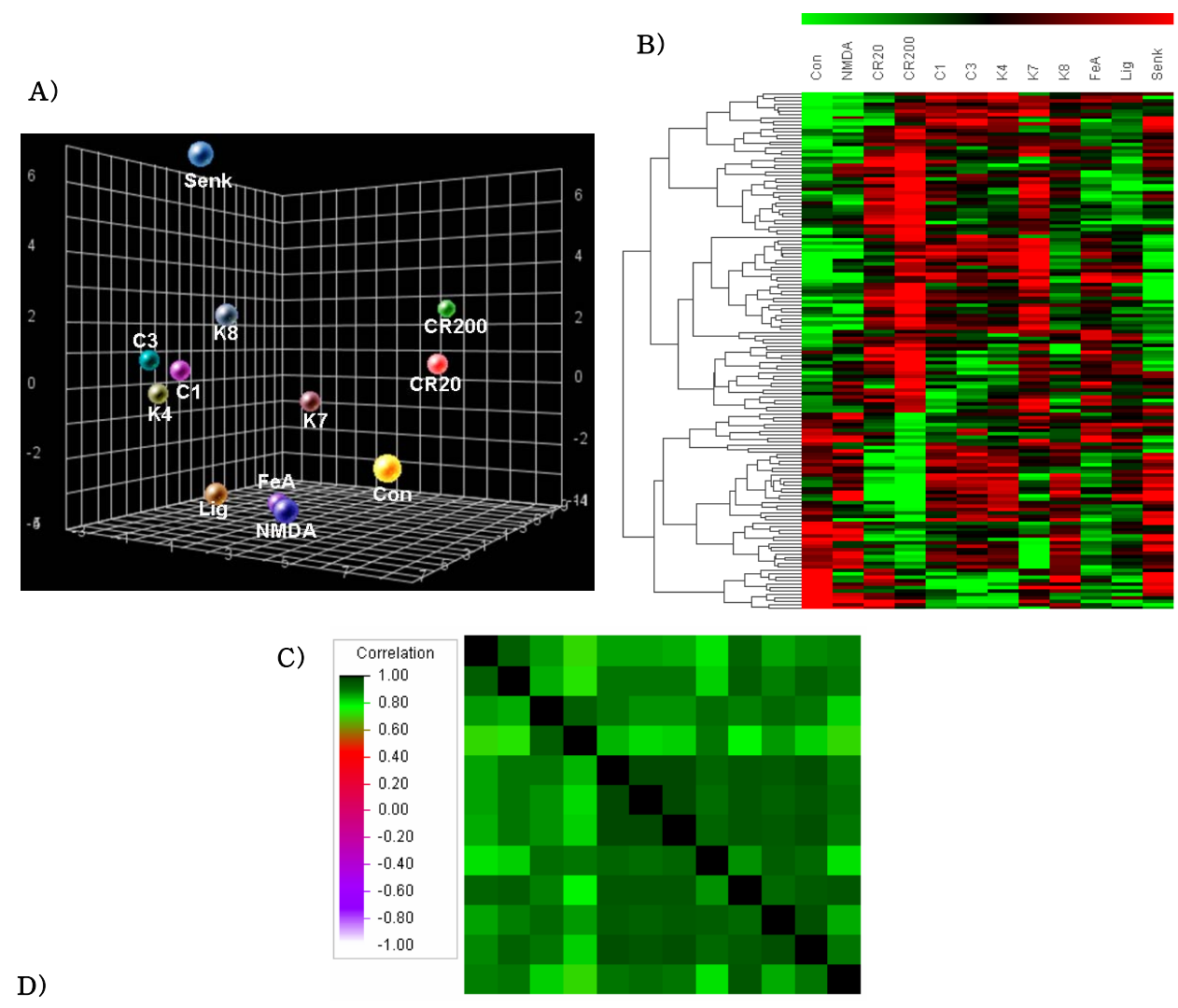
Figure 49. Similarity analysis of 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

Table 24. Similarity index of 1651 significant genes selected from the groups treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino(CR, K4, K7 and K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort(C1 and C3) which were cultured at the different location in the SK-N-SH cells.

Sample	Con_1	Con_2	Con_3	CR200_1	CR200_2	CR200_3	C1_1	C1_2	C3_1	C3_2	K4_1	K4_2	K7_1	K7_2	K8_1	K8_2
Con_1	1.000															
Con_2	0.962	1.000														
Con_3	0.959	0.953	1.000													
CR200_1	0.881	0.868	0.878	1.000												
CR200_2	0.938	0.939	0.917	0.852	1.000											
CR200_3	0.746	0.725	0.767	0.882	0.693	1.000										
C1_1	0.853	0.813	0.880	0.874	0.811	0.822	1.000									
C1_2	0.806	0.764	0.848	0.863	0.743	0.850	0.962	1.000								
C3_1	0.822	0.780	0.864	0.863	0.760	0.848	0.963	0.975	1.000							
C3_2	0.781	0.736	0.825	0.856	0.715	0.854	0.956	0.979	0.975	1.000						
K4_1	0.791	0.748	0.838	0.850	0.734	0.839	0.959	0.978	0.972	0.975	1.000					
K4_2	0.787	0.746	0.836	0.854	0.724	0.846	0.957	0.982	0.973	0.980	0.983	1.000				
K7_1	0.835	0.797	0.877	0.887	0.773	0.860	0.959	0.974	0.973	0.971	0.975	0.977	1.000			
K7_2	0.762	0.762	0.735	0.824	0.747	0.679	0.756	0.737	0.724	0.717	0.726	0.727	0.750	1.000		
K8_1	0.798	0.757	0.843	0.867	0.733	0.867	0.950	0.976	0.970	0.975	0.975	0.977	0.976	0.726	1.000	
K8_2	0.911	0.895	0.956	0.845	0.885	0.770	0.897	0.868	0.882	0.846	0.858	0.857	0.885	0.702	0.864	1.000

결과를 Hierarchical clustering과 비교하였을 때 그림 52-B에서와 같이 유전자 발현 변화에 차이가 나타남을 알 수 있었다.

- 이들 유전자에 대한 correlation plot에서도 색깔이 연두색 이상으로 나타나 유사성이 매우 높을 것이 예상되었으며(그림 52-C), 실제로 similarity index를 관찰하였을 때 (그림 52-D), 최대 유사치는 0.981로 C3와 K4가 가장 발현이 유사하게 나타났으며, 최소 유사치는 대조군과 CR200 사이의 0.711로 나타나 이는 유전자 선정을 대조군과 CR200 사이에서 선정했기 때문일 것으로 사료되었다. 그 외의 다른 물질들과의 SI 값은 0.711-0.981사이에 존재했으며, SI 값이 예상한 것보다 매우 높게 나타났다.



Sample	Con	NMDA	CR20	CR200	C1	C3	K4	K7	K8	FeA	Lig	Senk
Con	1.000											
NMDA	0.930	1.000										
CR20	0.861	0.851	1.000									
CR200	0.711	0.727	0.935	1.000								
C1	0.852	0.893	0.893	0.836	1.000							
C3	0.853	0.895	0.874	0.806	0.978	1.000						
K4	0.848	0.898	0.875	0.814	0.978	0.981	1.000					
K7	0.798	0.816	0.904	0.891	0.919	0.902	0.916	1.000				
K8	0.915	0.930	0.885	0.786	0.952	0.950	0.947	0.874	1.000			
FeA	0.853	0.883	0.912	0.865	0.943	0.929	0.940	0.932	0.912	1.000		
Lig	0.875	0.927	0.894	0.817	0.962	0.951	0.963	0.913	0.941	0.968	1.000	
Senk	0.886	0.894	0.820	0.717	0.896	0.902	0.892	0.800	0.946	0.845	0.891	1.000

Figure 52. PCA (A), Hierarchical clustering (B), correlation plot (C) and similarity index of 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location, and their major components and NMDA using the 152 significant genes selected from the CR200 group treated with 200ug of the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino for 24h in the SK-N-SH cells.

- 다음에는 PCA를 본과제에서 천궁 추출물의 약리 효능 유전자로 선정한 31개의 유전자를 이용하여 분석하였다. 천궁의 약리 효능 유전자는 앞장에서 언급하였듯이 CR 200ug/ml과 NMDA 100uM 농도로 동시에 24시간 동안 처리한 후 변화된 유전자들을 중심으로 선정하였다. 약리효능유전자를 천궁 추출물의 유의 유전자와는 다른 방법으로 선정하여 이들을 천궁의 biological finger printing을 위한 기준 유전자로 사용하는 것은 그리 좋은 기준은 아니라고 사료되었으나, 각 처리군 별로 유전자 발현 값에 대하여 평균값을 구하여 PCA를 시도해 보았다.
- 그림 53-A에서와 같이 3D graph로 나타내었을 때, 대조군과 NMDA 간의 차이가 가장 크게 나타났으며, 그 중간에 다른 물질들이 위치하고 있었다. K4, C1과 C3는 역시 유사한 위치에 NMDA와 가장 멀리 떨어져서 존재하였다. 이들의 이러한 PCA 결과를 Hierarchical clustering과 비교하였을 때 그림 53-B에서와 같이 대조군과 NMDA 간의 유전자 발현 변화에 차이가 가장 크게 나타남을 알 수 있었으며, 그 중간 정도로 다른 물질들의 유전자 발현 변화가 있었다. 그리고 이들 유전자에 대한 correlation plot에서도 색깔이 연두색 이상으로 나타나 유사성이 매우 높을 것이 예상되었으며(그림 53-C), 실제로 similarity index를 관찰하였을 때 (그림 53-D), 최대 유사치는 0.980으로 역시 C3와 K4가 가장 발현이 유사하게 나타났으며, 최소 유사치는 대조군과 NMDA 사이의 0.734로 나타나 이는 유전자 선정을 대조군과 NMDA군에 사이에서 유의적으로 변화된 유전자 중에서 선정했기 때문일 것으로 사료되었다. 그 외의 다른 물질들과의 SI 값은 0.734-0.980사이에 존재했으며, 역시 SI 값이 예상한 것보다 매우 높게 나타났다.
- DNA chip 실험결과를 이용한 biological finger printing을 위한 PCA를 위하여 좀더 엄격한 기준을 적용하여 분석을 실시하였다. 천궁 추출물들 즉 일천궁과 토천궁 전체 결과를 합하여 천궁결과로 두고 이를 대조군과 비교하여 4배이상 증가되며, $P < 0.05$ 인 유전자를 선정하여 33개를 얻었다. 이를 PCA 기준을 잡아 분석을 실시하였다.
- 그림 54-A와 B에서와 같이 PCA pattern에서 대조군을 기준으로 관찰하였을 때, CR의 경우 20과 200ug/mL을 처리하였을 때 대조군과의 거리가 처리 농도에 따라 멀어짐을 알 수 있었다. 그러나 여전히 일천궁 간의 결과들은 매우 많이 다름을 알 수 있었고, C1, C3 및 K4는 유사함을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 similarity index (그림 54-E)에서도 잘 나타나 있었다. SI 값을 보면 이전의 분석과는 달리 최소값이 0.113이었고 최대는 0.992로 나타났으며, 평균값은 0.658이었다. SI값이 Lig, Senk 및 FeA 등은 천궁과 차이가 났으나 대조군과의 차이보다는 작았다. 이러한 결과는 이들이 천궁의 구성성분이기 때문일 것으로 사료되었다, NMDA 역시 대조군과 차이가 있었으나 (SI=0.615), 천궁이나 천궁 추출물들과의 차이는 상대적으로 적게 나타났다. 이러한 NMDA의 결과는 천궁 발현결과를 대조군과 비교하여 얻은 결과를 그 기준으로 삼아, NMDA나 다른 물질들에 의한 변화에는 기준으로는 그리 좋지는 않은 것으로 나타났다.
- 이상의 PCA 결과는 DNA chip의 실험 조건을 잘 잡고 실험 간의 variation을 줄이고, 한약재 추출물들에 대한 유의 유전자들에 대한 similarity 및 패턴 인식 분석을 통해서 biological finger printing이 가능할 것이라는 것을 제시하고 있다.

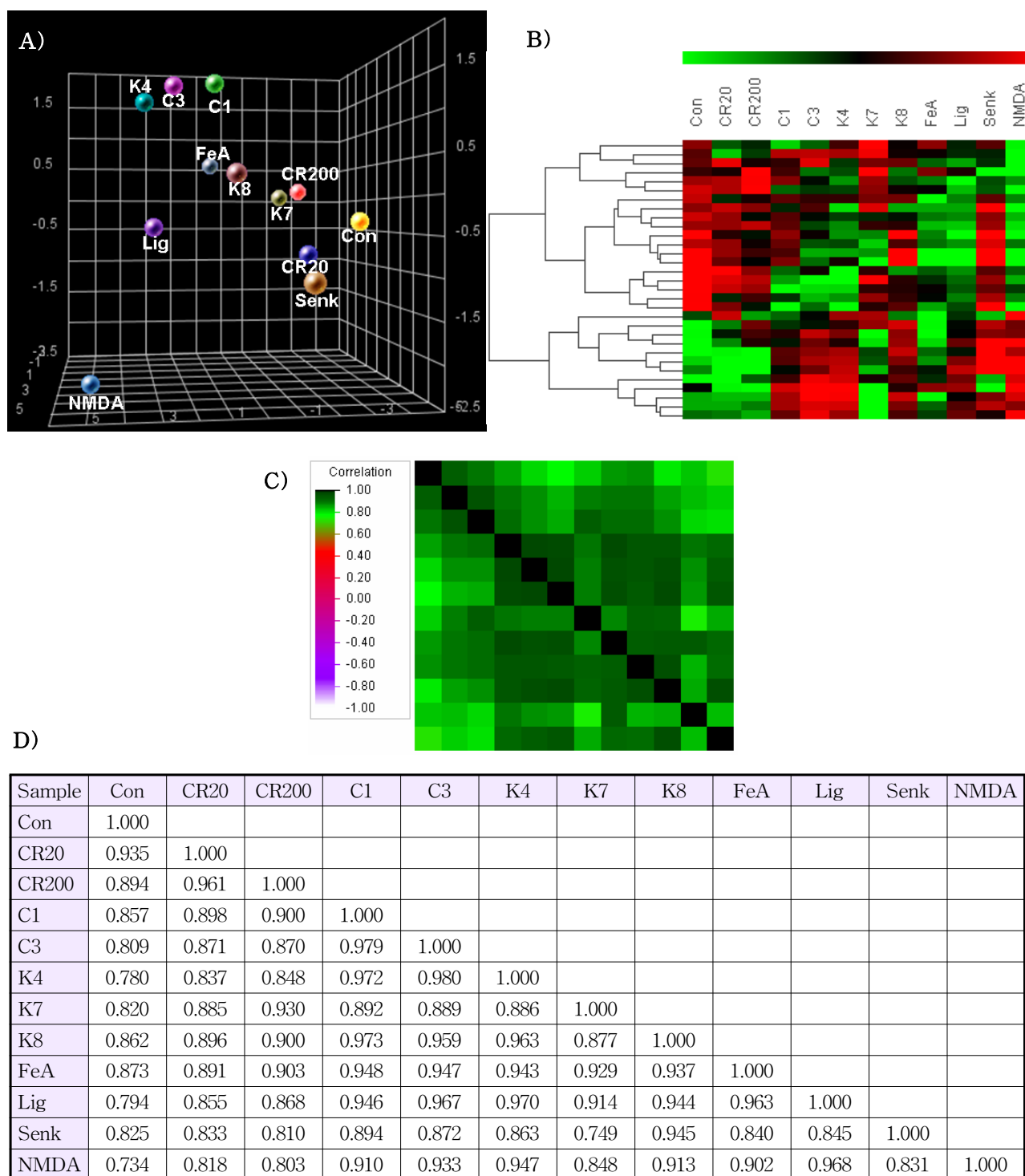
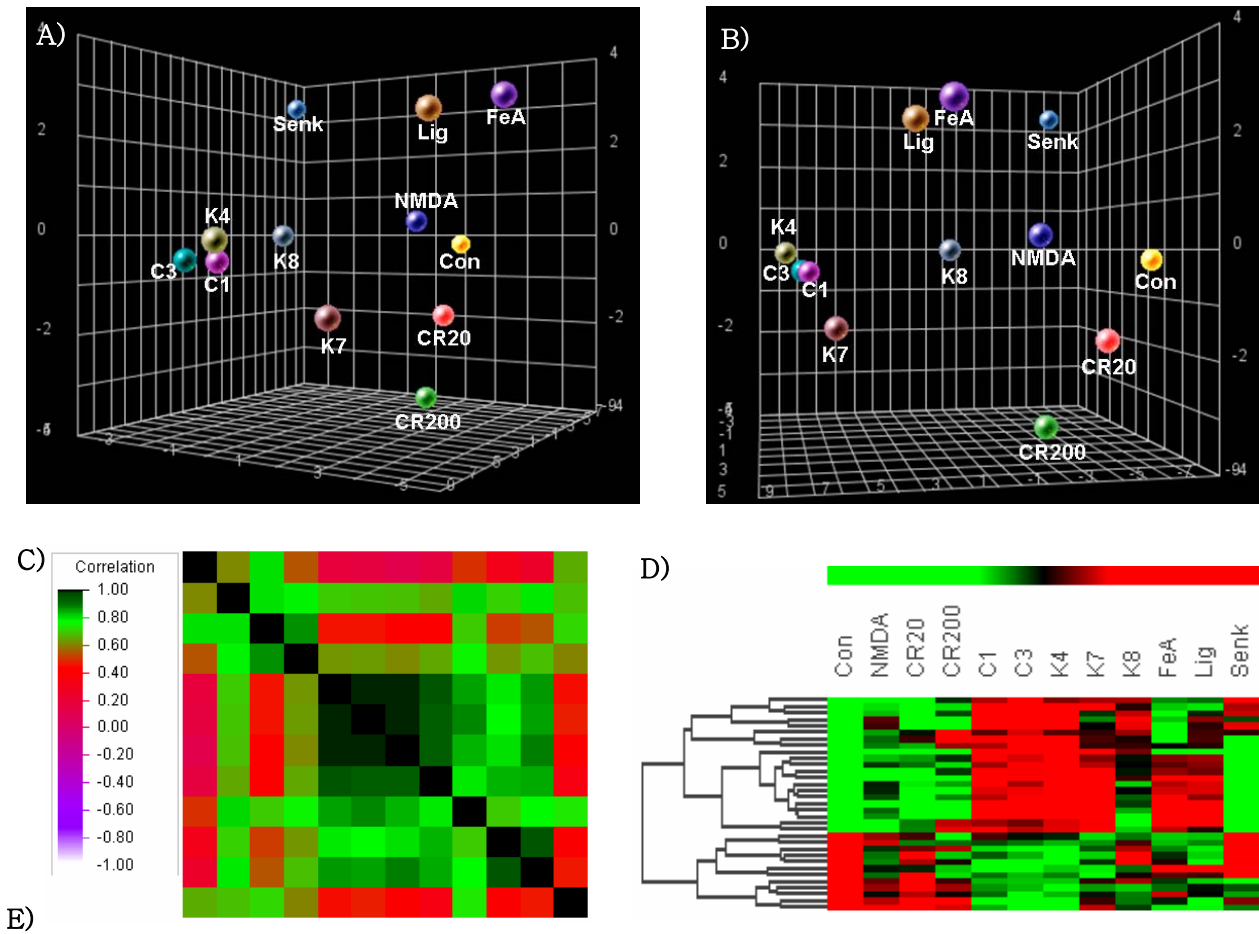


Figure 53. PCA (A), Hierarchical clustering (B), correlation plot (C) and similarity index (D) of 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location, and their major components and NMDA using the 31 pharmacological effective genes selected from the CR200 and NMDA groups treated 200ug of the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino with or without 100uM NMDA for 24h in the SK-N-SH cells.



Sample	Con	NMDA	CR20	CR200	C1	C3	K4	K7	K8	FeA	Lig	Senk
Con	1.000											
NMDA	0.615	1.000										
CR20	0.804	0.805	1.000									
CR200	0.543	0.786	0.874	1.000								
C1	0.186	0.696	0.457	0.630	1.000							
C3	0.166	0.694	0.456	0.638	0.992	1.000						
K4	0.113	0.686	0.413	0.612	0.987	0.988	1.000					
K7	0.170	0.652	0.429	0.650	0.950	0.933	0.937	1.000				
K8	0.494	0.812	0.697	0.765	0.859	0.876	0.839	0.789	1.000			
FeA	0.305	0.703	0.514	0.626	0.792	0.775	0.803	0.839	0.701	1.000		
Lig	0.248	0.794	0.541	0.682	0.863	0.856	0.886	0.847	0.777	0.946	1.000	
Senk	0.657	0.685	0.717	0.607	0.449	0.469	0.402	0.336	0.741	0.399	0.465	1.000

Figure 54. PCA (A and B), Hierarchical clustering (C), correlation plot (D) and similarity index (E) of 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) which were cultured at the different location, and their major components and NMDA using the 33 significant genes.

33 significant genes were selected from the criteria, fold induction > 4 and P<0.05, in the merged results treated with the 70% ethanol extracts of *Cnidium officinale* Makino (CR, K4, K7, K8) and *Ligusticum chuanxiong* Hort (C1 and C3) in the SK-N-SH cells for 24h.

5) DNA microarray 결과 검증

- 천궁 추출물 및 그 함유 물질 3종에 대해 선정했던 약리효능 유전자를 cyber green dye를 사용하여 realtime PCR을 실시하여 검증하였다. Realtime PCR의 경우 그 PCR product가 DNA microarray의 oligo probe 주변을 중심으로 100-200bp를 갖도록 primer를 디자인하여 실험하였다. Realtime PCR 실험 결과를 관찰하였을 때 그림 55에서와 같이 realtime PCR을 3반복했을 때 각 cycle이 별차이 없는 것을 확인한 후 각 primer 사용에 따른 realtime PCR cycle 결과를 구하여 각 유전자의 mRNA량 변화를 관찰하였다.
- 천궁 70% EtOH 추출물과 주성분인 Ferulic acid (FeA), Ligustilide (Lig) 및 Senkyunolide A (Senk)에 대한 약리효능 유전자에 대한 realtime PCR의 결과 및 사용한 primer는 표 25에 나타내었다.
- 약리효능 유전자는 천궁 추출물이나 그 주성분들만 각각 처리했을 때 변화된 유전자 발현과는 관계 없이 NMDA 처리시 증가되거나 감소된 것을 이들 물질들과 함께 처리했을 때 원 상태로 돌아가는 것을 중심으로 하여 선정한 것이었다. 천궁 추출물의 경우에는 유의유전자로 선정한 총 31종의 유전자 중에서 2종은 PCR 결과가 잘 않나왔다. 그리고 PCR 결과를 DNA chip 결과와 비교하여 경향이 일치하였을 때는 o 표로, 어느 정도 경향만 나타냈을 때는 △로, 틀렸을 경우에는 x 표로 나타내었다.
- 실험결과는 표 52 에서와 같이 1차년도와는 달리 일치되는 결과가 별로 없었다. 이러한 결과들은 사용한 천궁 물질들의 효능이 크지 않아서 그럴 것도 있겠고, NMDA에 의한 독성 유발이 한 요인으로 더 작용하여 나타난 결과일 것으로 사료되었다.

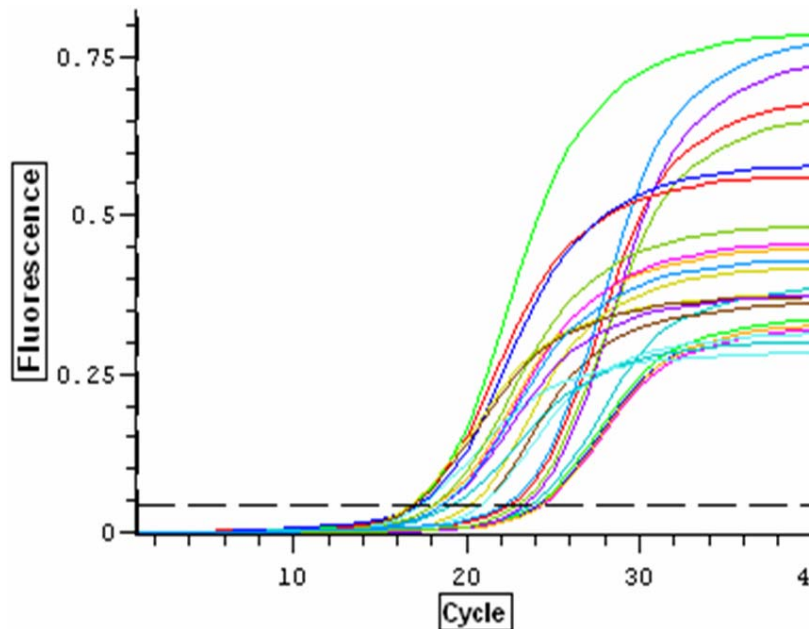


Figure 55. Amplification plots of Realtime PCR cycle

Table 25. Validation of pharmacological effective genes using real time PCR with cyber green dye.

a. 70% Ethanol extract of *Cnidii Rhizoma*

ID	Gene Symbol	primers (S, AS)	PCR product (bp)	Fold induction						Result
				DNA chip			Realtime PCR			
				NMDA	NMDA ⁺ CR200	CR200	NMDA	NMDA ⁺ CR200	CR200	
192466	GSG1	ACCACCAGCCAAGAGAGAAA GTTCCCAAGTGTAGCAAGT	115	0.183	0.466	0.323				
142958	MAFG	GACGACCCCAATAAAGGAA AGCTGGACGATCTCCTCCTT	153	0.250	1.422	0.950	0.854	5.904	2.468	x
213890	NRP1	CGCACCTCATTCTACATCA GTTGCTGTACCCGATCTTGA	139	4.244	1.760	0.449	0.282	1.093	1.199	x
144588	MFGE8	CCCAGCAGCAATGACGATAA CCAGTTACCCACAAACTCCT	204	0.279	0.680	0.684	3.447	12.849	4.637	x
159850	AP1GBP1	ACTCTGCAGCCGTGAAGAAT TCCATGGTCACAGTCTTTG	128	0.404	1.154	0.799	0.473	0.399	0.718	x
100694	PHTF2	GGTTCCTCATTTCGGTTGA AAGTAGCTGGGCACAACAGA	163	0.461	1.140	0.674				
213519	SLC12A2	CAAGACATACCGGCAGATCAG ACTAGACACAGCACCTTTTCG	230	0.397	1.178	1.113	0.457	0.754	0.798	△
100966	KIAA1641	CAACCACACCAGTTCTCCAA CGCTTTCAGATCGGTTAGGT	217	0.215	1.705	0.726	1.000	6.942	1.181	x
123450	NR4A2	GGTGGGCACAAGTATTACAC GTCAAAAAGCTGCTGCATGCA	184	2.427	1.023	0.892	0.393	0.952	1.118	x
236580	GPR125	AGCTAGGTGACGTGATGGTT AGGTAGCAATGCGCTGAAGA	129	3.173	1.114	3.697	1.722	3.976	1.191	x
105113	DOCK5	AGCACCAGAACCCGATTTGA GCCTTCATAGGGCTTGCTTT	244	4.740	1.939	1.136	0.614	0.753	0.844	x
101594	CCDC95	CTGAAGCGGAAGCTCAAGTT TCCGTCTCGCTGTTATCTGA	194	0.483	2.117	0.904	2.884	3.101	3.292	x
113036	PARD6B	GACTCCGCTTTGAAGGATGT GGAAGAACTTCGGTGAATTC	197	3.772	1.953	1.860	0.456	0.293	0.661	x
225893	PDE7A	CCCCTGAGCCTGATCATAA CAAGATGGCTGCACAGCATT	144	5.596	2.113	5.979	0.813	1.928	1.086	x
227033	DMXL1	GAATGGGGCCATTCTCAACA GCTTAGGCATGCTCCAGTA	175	2.530	1.161	2.705	0.385	0.549	0.454	x
235590	DHX40	CAAGCTGTGAGGGACAATTC GGATCCCAAAGTGCATTTCA	195	2.612	1.270	1.254	1.072	2.159	1.116	x
207047	HESX1	AATCCTCCCAGTGGGATTTTC TCGATACCAGGATAGCAGTT	218	0.365	1.219	1.055	0.548	0.521	0.534	x
177512	RAB4B	TGATTGGCAGTGCAGAACT CGTGTCCCAAATCTGTAGCT	155	0.390	1.177	0.802	1.095	2.080	1.181	x
118400	INTS2	GGAGAAACCAAGTGGATGGT GTTGGGTATATGCAGCAAAC	200	0.404	1.296	0.757	0.182	0.172	0.323	x
117435	EP400	CCCAGATCCAGTTGCAAAA CACCTGCTGCTGAATGAGTT	209	2.110	1.214	1.394	1.344	2.729	2.393	x
128717	MTPN	GTGATGTGCGACAAGGAGTT GGATTTCAAGCTGCCACAA	154	2.724	1.032	0.410	0.637	0.492	0.939	x
143978	CASK	ATGATCCAGCCAAGGATGAC GAAGGAATGAGACCTGCAGT	154	3.470	1.650	0.623	0.830	2.737	1.452	x
148950	SCARF2	CGCTTAAAGACCCCTCTTA AAGTAGCCCCGGCTCTATT	169	4.158	1.175	1.066	3.196	2.221	4.815	△
163861	FGD6	AACCTGGAACACTTTTGGG CGAATGAGCATCCTCTGCTT	206	0.402	3.003	1.928	0.648	2.488	0.671	o
162667	STAG1	GTGGAAGTAGCAGCAGCAAA GCAGTACAGTGGATGTGAGT	174	0.235	0.532	0.569	0.251	1.098	0.157	x
227835	PDE4DIP	GGCATAGGAGAGATGCTTAG TAGCAGGAGAGTCACAACCTC	242	0.079	0.187	1.211	0.157	0.336	0.286	△
149339	CUEDC1	TGGCTGTCGGAACGACTTTT CAGCGACTGATGCTTCAACA	212	0.396	1.099	0.704	0.493	0.571	0.868	△
150170	SLC25A1	CCAGTGCAGTAGTGCCAAAA AACACAGGCACAGGGTTCA	218	0.227	1.191	1.745	0.851	1.622	0.639	△
166760	ABL1	GGCCTTGAAGACAGAGCAAA CTATGCACACGCCACTTAGA	163	0.490	1.528	1.325	0.265	0.322	0.279	△
172572	TAGLN	GCATGTCAATTGGCCTCAGA CTCAGTGACAGAGCCTCAAA	221	0.200	0.584	0.894	3.238	6.007	1.410	x
125960	CRIP2	TACAGCGGCTCTCATGATGT GCAGACACAGAAGGGATCAT	227	0.249	0.721	0.688	0.650	0.788	1.291	△

b. Ferulic acid (FeA)

ID	Gene_Name	primers (S, AS)	PCR Product (bp)	Fold induction						Result
				DNA chip			Realtime PCR			
				NMDA	NMDA+ FeA	FeA	NMDA	NMDA+ FeA	FeA	
227485	SCOTIN	TCTGCTGTGGTACCTGTGAT GACGACAGACAGCACAAAAGA	227	3.355	0.707	1.890	0.751	0.798	0.973	x
215361	DAZAP1	CACGGAGGTAGTCATGATCT GAGGCTCAGCTCGTTTAACT	155	2.570	0.597	2.330	0.725	2.332	3.371	x
163073	PSG9	TCAGCCACTGGCAAGGAAAT GGCATTTCAGATAGACAGCAA	343	2.016	0.493	0.621	0.591	0.227	5.160	x
173477	PSG2	TGAACAGGCTGATACCTTCA GGCACTCAGATAGAGAGCAA	230	2.147	0.533	0.749	1.862	7.395	3.854	x
137897	TNFRSF12A	CTCGCCCACTCATCATTTCAT ACCAGACACCTTGGAAGGTT	158	4.302	1.083	0.649	0.389	1.191	0.399	x
178131	PCOLN3	CCCTGTTCCAGTTGAAGTTC CCAGTTCACACCTTCGTTCT	176	3.081	0.858	0.815	1.324	0.998	4.258	x
165200	UCP2	AAGGTCCGATTCCAAGCTCA ACATTGGGAGAGGTCCCTTT	128	2.459	0.696	0.398	0.643	0.873	0.591	x
160938	TGM1	GCACCTGAACCATGATTCTG ATGGCCTTCTCCTCCACATA	294	2.045	0.638	1.056	2.825	3.246	10.287	x
198888	CRIP1	GCCATCTGTCTGTCACTGAA TGGTTCTCACGCTCCAGAGT	85	1.970	0.675	0.846	0.484	0.521	0.406	x
148242	HSPA1B	AGCTCTTTGCTGCTTCACTT GTACAGAAGGTGGCAGTGTT	175	1.872	0.687	0.776	1.013	5.851	3.697	x
129361	SLC16A3	GAACCGTGTTCATTCCAGAGT GTTTCCAGGTCCCTTGAGCAT	129	2.241	0.838	0.753	0.857	1.831	0.881	x
167575	ABI3	GTCCTGGGGAGAGAGAATTT TAGCAGCAGCCTTAGAACTG	216	1.818	0.725	0.741	0.931	2.373	4.195	x
141668	WISP2	TTGGCTGCAGGCAACACTTT AGGAAAGGGGACTAGGTTCT	118	2.600	1.066	1.409	0.309	0.445	1.927	x
161046	WNT3	GACGTGCACACCTGCAAGTA GAGTTGGGTCTGGGTCAATTT	176	1.927	0.804	0.743	1.625	2.080	3.626	x
234756	TAGLN2	GACTGGCCTTGCTTCTACAA ATGTGTGGTGAGCACAGTCA	125	2.018	0.908	0.740	0.317	0.780	0.448	x
116510	MAGEC3	TGGGTGCAGAGAAAAGTACCT GGGCTCTGTCTTCCATATCT	200	2.063	0.930	0.950	1.024	0.951	5.772	x
112112	NUP43	GACCTGAGACCTTAATGACA GCCTCAGCAACAAGAGCAAA	164	2.125	0.994	1.212	0.172	0.270	0.182	x
117730	SBF2	CACCTACTTGGGTCTTCTT ACGGACCATGGAAGCATCTT	221	0.399	0.864	0.814	1.958	1.841	3.484	x
197221	MTHFD2	GGTACCAGACCTTTTGTAGTT CCTCAAAAAGGACAGCTTAGG	220	0.496	1.109	1.366	0.778	1.545	0.774	x
128967	GARS	GCTGTTGAACAGGGTGTGAT TCCCAACAGTCACAGGCATA	155	0.499	1.118	0.975	2.080	3.192	3.708	x
129799	DOCK4	CACACATCCGCTTTCGAGTTT GCCCTTGGAAAAGGGAAGTT	203	0.345	0.822	0.860	0.335	0.214	0.337	x
214622	FBXL21	CACCAGTGGATGATCCTTCA TCGCTTGAGAGTGCAAGGAA	196	0.402	1.036	1.162	1.677	3.095	3.797	x
167731	MAML2	CCCAATCAGCTAAGCACACA GCTGTGGTTCAGTTCCCTTGAA	159	0.397	1.031	1.003	0.637	0.802	0.864	x
178884	PCSK5	CAAGGATGCAACGGAAGAGT ATGGCTGCTCAGCCTTGAAA	132	0.285	0.767	0.965	1.298	0.889	33.314	x
178586	LRP4	GGGGAAGAGACCTAGAAAACA GGCTTGCTGTCCACTAACTT	192	0.499	1.369	1.046	1.184	0.732	0.986	x
207047	HESX1	AGCGTGGTGGATCACCCAAT ACCAGGATAGCAGTTTACTC	186	0.397	1.091	1.199	3.777	2.244	16.373	x
132892	HIPK3	GCATTCCAGCAGCAGCATT CTGCTGTGTGATTGGGACTT	166	0.296	0.871	0.418	0.484	0.466	0.527	x
123450	NR4A2	GGTGGGCACAAGTATTACAC GCTGCTGCATGCAAGTTTGTG	177	0.209	0.772	0.832	2.833	6.801	10.385	x

c. Ligustilide (Lig)

ID	Gene_Name	primers (S, AS)	PCR Product (bp)	Fold induction						Result
				DNA chip			Realtime PCR			
				NMDA	NMDA+ Lig	Lig	NMDA	NMDA+ Lig	Lig	
113036	PARD6B	GACTCCGCTTTGAAGGATGT GGAAGAACTTCGGTGAATTC	197	0.392	0.942	0.662	0.503	1.586	0.541	x
167731	MAML2	CCCAATCAGCTAAGCACACA GCTGTGGTCAGTTCCTTGAA	159	0.397	0.928	0.679	1.519	6.389	4.561	
148527	ESCO1	CCTGGTGCTGCTCAACATTA GAGTGGGATCTGAGAAAGCA	174	0.404	0.936	0.463	0.442	0.622	0.328	x
214622	FBXL21	TCGCTTGAGAGTGCAAGGAA TTCCTTGCACTCTCAAGCGA	196	0.402	0.926	0.884				
167308	CRY1	GGCAACTGTTATGGCGTGAA AATCCAACCCCTCTGACGAA	197	0.269	0.614	0.375	2.840	3.593	8.346	x
148950	SCARF2	CGCTTAAAGACCGCCTCTTA AAGTAGCCCCGGGCTCTATT	169	5.237	1.960	3.429				
150170	SLC25A1	CCAGTGCAGTAGTGCCAAAA AACACAGGCACAGGGTTCA	218	2.562	0.941	1.526				
206444	H2AFX	GGCAATCCAAGCACCTAGAT CCATCTAAAACCTCCCAATG	136	2.319	0.847	1.059	0.863	1.882	0.866	x
199976	C10orf54	AAGGGTGCCACACAATGTCT GAATGGCTCTGAAGCGAAGA	207	3.849	1.405	1.330	0.324	0.076	2.227	x
125674	PDK2	ACATGGCTAAGCTCCTGTGT ACCTTGATGGGTGGGAGAAT	208	2.492	0.840	2.735	0.406	0.379	0.838	x
181105	DPM2	GCCGTTAGCCTGATCATCTT AAGATGATCAGGCTAACGGC	199	2.719	0.911	2.407				
145225	SLC30A7	GCTCATGGACATGGACACTT GGGAGGAGTTCTCTGCATTA	273	3.009	1.003	2.365	0.572	0.962	0.651	x
101594	CCDC95	CTGAAGCGGAAGCTCAAGTT TCCGCTCTCGCTGTTATCTGA	194	3.930	1.291	2.221				
177512	RAB4B	TGATTGGCAGTGCAGGAACT CGTGTCCCAAATCTGTAGCT	155	3.307	1.060	2.264				
185071	NR2F6	GGCAAGCATTACGGTGTCTT CCCGGAAGCACTTCTTGAGA	163	2.461	0.775	2.177	1.383	2.088	2.965	x
210222	MGC4618	GGGAAAACAGACGACACACT GAATGCGTACCCACAATCA	180	2.431	0.685	1.774	0.540	1.154	1.492	x
172180	CENPB	CTGGTTCATGTGACCAGGAA GACCAGGGGAAGCATTACTA	200	6.229	1.621	3.525	2.133	4.073	7.929	x
194434	hCAP-H2	GGACTAACGTGGATCTCAAG CCCTCTGGCTCCAACATGAA	211	3.225	0.794	1.496	0.893	1.081	0.729	x
147144	CSG1cA-T	GAGCTCCAGACCCATTTCTT CACACGGTGGTAAGGAAGAA	178	5.152	1.186	2.369	1.108	2.585	2.526	x
134760	FGFR1	GACACACACATGCACGGATA TGTGTGTCCGGACAGCATAT	237	2.890	0.613	1.043	0.345	0.697	0.373	x
203030	TUBB2B	TGGGAGGTCATCAGTGATGA TGGTCCAGACCTAACCGAAT	180	2.238	0.427	1.000	2.926	3.070	22.805	x
182241	AGPAT2	ACGGTGGAGAACATGAGCAT ACCTCCATGAGGCCCATCAT	164	9.451	1.634	6.047	0.309	0.651	0.497	x
204042	AP1S1	GGATGATGCGGTTTCATGCTA TCCAGGAAGCTGCACATCTT	154	7.178	1.226	3.103	2.487	4.310	7.165	x
211134	ARHGDI1A	AGCAGTCGTTTGTGCTGAAG GCCTACCATGTAGTCAGTCT	146	12.619	2.132	7.132	2.636	3.312	1.313	x
105119	TK1	GGCCGATGTTCTCAGGAAAA CGCAGAACTCCATGATGTCA	252	3.934	0.646	1.741	1.461	4.228	5.083	x
216903	REEP4	GGCTGTGAAGACCAAGAACA AGCACGAAGGCCATCTTGAT	147	5.344	0.873	2.328				
178131	PCOLN3	CCAGTTCACACCTTCGTTCT AGAACGAAGGTGTGAACTGG	176	3.081	0.489	2.234				
165944	PPP5C	TTCGGCTTCAAGCTCCTGTA CACTCGAACCTCGCTAAA	152	6.730	1.032	3.010				
127877	MAP2K3	CTTGGTGACCATCTCAGAAC CGTCTCCCTCTCTGAATAGT	218	2.777	0.389	0.862				

D. Senkyunolide A (Senk)

ID	Gene_Name	primers (S, AS)	PCR Product (bp)	Fold induction			Result
				DNA chip		Realtime PCR	
				NMDA +Senk	NMDA +Senk	Senk	
176899	IL8	CTCTGTGTGAAGGTGCAGTT TTTCTGTGTTGGCGCAGTGT	144	0.018	1.930	2.111	
213890	NRP1	CGCACCTCATTCCCTACATCA GTTGCTGTACCCGATCTTGA	139	0.074	2.120	1.597	
173408	CXCL2	TGTCAGCCACTGTGATAGAG GACCACACACTGTGAAATCA	148	0.087	0.618	0.694	
182859	TRUB1	GGCCAGTGACTGTATACAGT TTTGGTTCCGGTTCAGCTCTA	161	0.169	1.891	1.749	
124216	UHRF2	AGACCACGAGCTAGAACCAT CTCCAGGTCTCTCAATCTTG	250	0.169	2.137	1.823	
235590	DHX40	CAAGCTGTGAGGGACAATTC GGATCCCAAAGTGCATTTCA	195	0.171	1.882	1.788	
100694	PHTF2	GGTTCCTCATTTCGGTGTGA GTAGCTGGGCACAACAGATA	161	0.176	1.303	1.142	
123450	NR4A2	GGTGGGCACAAGTATTACAC GTCAAAGCTGCTGCATGCA	184	0.209	1.206	0.749	
227033	DMXL1	GAATGGGGCCATTCTCAACA GCTTAGGCATGCTTCCAGTA	175	0.221	1.000	0.487	
219437	POLR1B	GGAGATAGTAGCCTGGTGTT CCACTCCCAGTGTCACTACT	224	0.226	1.184	0.899	
234638	DST	GCAAAGGACGCATACTGACA GATGACAGGCCAGAAGTCAT	169	0.232	1.439	0.810	
236580	GPR125	AGCTAGGTGACGTGATGGTT AGGTAGCAATGCGTGAAGA	129	0.239	1.524	1.537	
130014	PRKCA	GGGACCTCATGTACCACATT GTGACTCCATCCATCATGTG	214	0.240	1.514	1.110	
201517	B4GALT6	TTTTGGAGGGGACCCTTGAA CAGCGCACTGAATACTGATC	160	0.241	1.109	0.579	
205153	XPO1	AGAAGGAGCCCAGCAAAGAA GCACTGGTTTCCTTGGAAAGAA	184	0.243	2.302	1.912	
180157	PIK3R1	GGGAGAAGGAAACGTTAGCA GAAAACCCTCACCCCTAGTAC	258	0.255	1.190	1.173	
143920	IPO8	CAACCCTGATTTGCTGCTAC TCTACTGCAGGAGGTGCGATT	189	0.267	1.737	1.399	
187427	AFTPH	CAGAATACTGCTGCCCAACA CCTGGATGTAGCTGTATACC	179	0.288	1.429	1.265	
234875	GBE1	GGATACACTGGGATCCAGAA GCTCCATGATTGCCATCAAC	204	0.293	1.567	1.600	
132892	HIPK3	CTGCTGTGTGATTGGGACTT AAGTCCCAATCACACAGCAG	166	0.296	1.746	1.185	
135186	ATP11C	TTCACATCCTTGCCCATCCT CTTCTAGGGATGCAGTCTGA	211	0.296	1.663	1.052	
151426	VPS41	GAAGAGGAACCCAAGCTGAA TGATGTTCCCCTGGACATCA	157	0.298	1.950	2.045	
185324	CCDC6	CCATCTCTAATAGCCAATC GGAAGCAGGAAGAGGTGAAA	232	0.301	1.705	1.247	
167300	ROBO1	AGAGGATCAGGAAGCAGACA AGCCTCTTGGTTGTCTTCAG	145	0.303	1.743	0.886	
224778	SENPI	AAGAGAAGGGCTTGCCAAGT CCCATGGAGTCGTAATAGGT	211	0.320	1.813	1.787	
178301	PCTK2	CCAGGTTAGACTCTGAAGGA CCATGTCCTGTCTCTGGATA	223	0.330	1.554	1.272	

제4장 세부연구개발과제의 연구결과 고찰 및 결론

4.1. 음양곽에 대한 연구결과 고찰

- 음양곽은 본초강목(本草綱目)에서 ‘중국 사천 북부지방에 양의 일종인 ‘음양’이라는 동물이 하루에 암양과 백회의 교합을 하는 것을 보고 관찰한 바 이 풀(삼지구엽초)을 뜯어먹고 정력을 유지함을 알고 마을의 칠순노인이 이 풀을 먹고 자식을 낳고 청춘을 다시 찾게 되어 음양이 먹는 콩잎(菘)이라 하여 음양곽이라 부르게 되었다’고 한다. 음양곽은 예로부터 약용으로 쓰였는데, 한방과 민간에서 잎과 줄기를 강장, 강정, 이뇨, 음위, 창종, 건망증 등에 약재로 사용하고 있다. 음양곽은 이선탕, 장양단, 선령비산 등의 한방처방에 사용되고 민간에서는 강장, 거풍강정, 음위, 이뇨 및 신경성 강장제를 목적으로 주로 술을 담그거나 차로 다려서 복용하고 있다.
- 본 과제에서는 음양곽의 약리효능을 강장, 강정 등의 남성 성기능향상 작용에 초점을 두어 이에 따른 기초적인 실험을 한 후 LNCaP 세포를 선정하여 DNA microarray 실험을 실시하였다. 음양곽에 의한 남성 성기능 향상과 관련된 부분은 체내 testosterone level을 올려주어 전반적인 신체 기능향상에 의한 것과 phosphodiesterase 활성 저해에 의한 nitric oxide 생성량 증가에 따라 남성성기의 혈류 증가에 의한 성기능 향상으로 나누어 이들과 관련된 유전자들의 발현 변화 및 NO 발현량을 관찰하였을 때 음양곽에 의한 성기능 향상작용에 대한 가능성을 타진할 수 있어 이에 대한 유전자들의 발현 변화를 예상하고 실험을 실시하였다.
- 한약의 경우 양약에 비하여 일반적으로 오랜 기간 투여하였을 때 그 효능이 나타나는 것으로 알려져 있어 일반적으로 10일간 이상을 복용한다. 그리고 많은 약물의 경우 초기 발현 유전자와 나중에 발현이 변화되는 것이 있어 처리시간에 따른 유전자 발현 양상이 매우 다를 것으로 사료되었다. 약물 농도 역시 약하고 독하고의 차이는 용량이라 하여 생리학적인 농도와 고농도에의 유전자 발현 양상이 다를 것으로 사료되었다. 따라서 본 과제에서는 DNA microarray 실험을 위하여 약물의 처리시간 및 처리 농도에 대하여 유전자의 발현 변화를 관찰하였으며, 이때 약리효능 유전자와 독성관련 유전자를 선정할 수 있을 것으로 사료되었다.
- DNA microarray 결과 변화된 유전자들을 biological pathway로 구분하였을 음양곽의 성기능 작용과 관련되었다고 할 수 있는 직접적인 pathway는 GhRH pathway가 있었고 나머지는 크게 나타나지는 않았으나 nitric oxid 경로와 관련 IkappaB를 phosphorylation 시킬 수 있는 효소들이 발현이 감소됨을 관찰하였다.
- 음양곽 추출물이 Wnt 관련된 경로에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, icariin이나 epimedin B 역시 Wnt 경로는 영향을 미치는 것으로 나타났으나 음양곽이나 icariin의 경우 Wnt 경로를 저해할 것으로 예상되었으나 epimedin B의 경우에는 향상시킬 것으로 사료되었다. 따라서 같은 경로에 영향을 미친다고 하더라도 상반되는 작용을 하는 것이 함께 존재하고 어느 것이 많이 있는가와 얼마나 강력하게 작용하는가가 추출물에서의 효과를 관찰할 수 있을 것으로 생각되었다.
- DNA microarray 결과를 관찰하였을 때 음양곽 추출물과 주 구성물질인 icariin, epimedin B 및 hyperoside에 의한 유전자 변화를 바탕으로 biological pathway를 상위 10위 내외의 것을 비교하였더니 유사한 것이 많이 있었다(표26). 이러한 결과는 시간 의존적인 실험디자인과 주 구성물질들을 약리 주성분으로 예상하여 실험한 것에 기인할 것으로 사료되었다.
- 음양곽에서 분리되는 물질은 거의 모두가 flavonoid glycoside로 이들은 체내에 흡수되면 당이 떨어

Table 26. Gene counts of Wnt pathway significantly affected by treatment of Epimedii herba extract, icariin, epimedin B and hyperoside in LNCaP cells

KEGG Pathway	Gene Counts			
	Eum_Ext (98/757)	icariin (981/1004)	epimedin B (1345/1373)	hyperoside (585/598)
Wnt signaling pathway	8	11	6	4
T cell receptor signaling pathway	7	5	7	3
Insulin signaling pathway	7	10	9	5
GnRH signaling pathway	7	5	8	3
Purine metabolism	6	9	6	3
Neuroactive ligand-receptor interaction	6	6	11	1
MAPK signaling pathway	6	15	19	12
Gap junction	6	7	8	-
Focal adhesion	6	6	13	3
Calcium signaling pathway	6	8	12	4
Adherens junction	6	4	-	-
Regulation of actin cytoskeleton	3	10	16	5

저 나가고 aglycon으로 존재할 것으로 예상되었다. 그러나 in vitro assay system에서는 당에 의한 영향 역시 클 수 있으므로 같은 prenylflavonoid 모핵을 갖고 있으나 당 구성이 다른 icariin과 epimedin B를 실험하므로써 당에 의한 유전자 발현 변화를 관찰하였다. 두 물질간의 DNA chip 경로는 유사한 것도 있고 아주 다른 것도 있어서 당에 의한 영향이 나타나는 것으로 사료되었다.

- 음양곽이나 천궁 모두가 nitric oxide 생성에 영향을 미치므로 Raw264.7 cell이나 Huvec 세포에서 예비실험을 하여 흥미로운 결과를 얻었다. 그러나 이들 세포주는 본 한약제 품질과학화 과제에서 보면 Raw264.7 세포는 mouse 세포로 사람에서의 효능과 다르다는 보고가 있으며, Huvec cell은 거의 primary culture 수준이므로 이도 DNA chip을 위한 모델 cell system으로는 좋지 않을 것으로 사료되어 세포주가 잘 establish 되어 있으며, 사람 세포가 실험의 재현성 및 효능 검증을 위해서 좋을 것으로 생각되었다.
- 각 물질들의 처리 후 약리효능 유전자를 선정하기 위한 방법으로는 시간별로 관찰하는 것이 그리 좋은 조건이 아닌 것으로 사료되었다. 처리 시간에 따른 유전자 발현이 각각 달리 나타나 이들에 대한 공통집합으로 하였을 때는 유전자가 1-2개 정도만 선정되었으며 이들 역시 copy 수가 적은 것이었다. 특히 유전자 선정시 독성물질과 같은 특별한 경로를 증가시키지 않은 조건에서 추출물이나 약물을 처리하였을 때 유전자 변화가 크지 않고 변화가 큰 것들은 주로 유전자 copy수가 적은 것이었다. 이들을 realtime PCR로 validation 하였을 때 copy 수가 적은 유전자들은 결과가 DNA chip과 잘 일치하지 않은 것으로 나타났다.

4.2. 천궁에 대한 연구결과 고찰

- 천궁은 한방에서 보혈, 활혈, 정혈제로 부인병에 많이 쓰는 대표적인 약재이며, 진통, 진정제로도 효과가 우수하며, 정유 성분은 중추신경계에 대하여 소량에서는 흥분적으로, 다량에서는 억제적으로 작용하는 것으로 알려져 있다.

- 본 과제에서는 천궁 추출물의 약리효과를 관찰하기 위하여 다양한 독성물질을 3종의 뇌세포주에 처리하였으나 대부분의 물질은 세포독성을 거의 나타내지 않았다. 그러나 이들 독성물질에 의하여 NO가 많이 증가하는 것을 관찰하였으며, 그 중에서 중추신경계에서 흥분독성물질로 알려진 NMDA를 선정하였다. NMDA는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 활성화는 Ca^{2+} 이 세포내로 들어가는 것을 조절하는 multiple regulatory site를 포괄한다. 이러한 NMDA-유도 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가는 neuronal NO synthase (nNOS)의 활성화를 통하여 nitric oxide 생성을 증가시키고, 이러한 NO 생성 증가에 의하여 신경세포들이 죽는 것으로 보고되어 있다. 그러나 본 과제에서 사용한 100uM 농도에서는 세포 내 NO 생성량은 크게 증가되었으나 세포독성을 나타낼 수준은 아니었다.
- 천궁 추출물이나 분리물질들인 ferulic acid, ligustilide, Senkyunolide A는 단독 처리에 의하여 NO의 생성을 증가시키나 NMDA와 동시에 처리하면 NMDA에 의한 증가된 NO 생성을 감소시켰으며, 이러한 특성이 저농도에서는 신경 흥분작용을 나타낼 수 있으나 흥분 독성물질인 NMDA와 함께 사용했을 때에는 진정작용 및 신경세포 독성을 감소할 것으로 사료되었다.
- 천궁 추출물에 의한 DNA microarray 실험 결과에서 cell cycle은 전반적으로 저해되고 local adhesion, MAPK pathway 등이 주로 관여하는 것을 알 수 있었으며, ferulic acid, ligustilide, Senkyunolide A에 의해서도 유사한 biological pathway가 관여하고 있음을 알 수 있었다.
- 2차년도에는 1차년도와 달리 약리효능 유전자를 찾기 위하여 NMDA를 독성물질로 사용하였으며, 그것에 의하여 변화된 유전자를 천궁 추출물이나 그 구성성분들 3 종이 다시 원상태로 돌려놓는 것을 중심으로 하여 선정하였다. 본 과제에서 사용한 천궁의 경우 다른 산지의 것과 PCA 법을 이용하여 비교하였을 때 유전자 발현 변화가 달리 나타나는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 여러 원인으로 부터 유래될 수 있을 것이다. 그 중 하나는 CR을 먼저 DNA chip 실험을 한 후 약 3주 정도 후에 다른 산지의 것에 대한 실험을 실시하였으므로 실험 간의 오차로부터 올 수 있을 것이나 CR 삼반복 실험이나 산지간 반복 실험 자체 내에서도 variation이 매우 커 그 원인이 DNA chip 자체에서도 올 수 있을 것으로 사료되었다.
- 선정된 유효유전자의 validation을 위한 realtime PCR 결과를 DNA microarray 결과와 비교하였을 때 그 경향이 일치하는 율이 약 20% 내외로 매우 낮았다. 1차년도 실험에 대한 validation 경험을 바탕으로 ABI chip의 경우에는 gene copy 수가 작은 것과 primer 위치가 DNA chip 상의 probe과 멀리 떨어진 것은 두 결과가 일치하지 않아서 처음에는 약 30% 내외의 일치도를 나타냈으나 후에는 이러한 조건을 맞춰 쥐 hyperoside의 경우 약 70% 내외의 일치도를 나타내었다.
- 그러나 천궁 추출물이나 그 구성 물질로부터 얻은 약리효능 유전자의 validation은 1차년도 경험을 바탕으로 gene copy 수가 크고 primer도 DNA chip 상의 probe을 함유하고 있던 지 아주 가까운 곳을 선정하여 실험을 했어도 일치도가 20% 내외로 매우 나빴다. 이러한 결과는 율해의 DNA chip의 DNA labeling kit 상의 문제로 인한 것일 수도 있고, 실험에서 NMDA에 의한 독성 정도 및 그것에 대한 천궁 관련물질들의 효능간의 variation에 의한 것일 수도 있을 것이다.
- 한약재 과학화를 위한 DNA chip 실험은 크게 두가지 방향으로 접근할 수 있을 것이다. 하나는 한약재에 대한 효능을 관찰하기 위한 효능 유전자 발굴이고 또다른 하나는 유전자 발현 변화에 대한 패턴 인식 분석을 통한 biological finger printing을 할 수 있을 것이다.
- 한약재 효능을 관찰하기 위하여는 암세포주에 독성물질을 처리하여 인위적인 질병모델 즉 in vitro 질병 모델에 한약재를 처리한 후 유전자 발현 변화를 관찰하였다. 많은 한약재들이 그 효능이 의약품들 보다는 매우 약한 편이어서 용량이 매우 높은 농도에서 효능을 나타내었다. 그리고 용량에 따

른 약리효능이 달라지므로 예를 들면, 천궁의 경우 저용량에서는 중추신경 흥분작용을 나타내나 고용량에서는 저해작용을 나타내고 있었으며, 음양곽의 경우에도 단독투여에 의하여 저용량에서는 NO 생성량이 증가되었으나 고용량에서는 감소되는 양상이 나타났다. 이러한 현상은 대부분의 한약재가 나타내고 있는 것으로 한약재의 효능을 찾는 데 용량이 매우 중요할 것으로 사료되었다.

- 많은 독성물질이 암세포에서 독성을 나타내는 것이 거의 mM 단위까지 올라가야 세포독성이 나타나며, 이것도 처리할 때 마다 세포독성이 달리 나타나는 것을 관찰하였다. 이러한 것은 독성물질에 대한 한약재의 효능을 세포독성 저해를 질환 완화의 marker로서 사용하기가 힘들었으며, 실험별 variation이 크게 나타나 biochip을 한번에 하지 않고 나누어 실험했을 때 실험 간의 variation이 나타나는 원인이 될 수 있을 것이다.
- DNA microarray 실험을 한약재에 대한 biological finger printing을 할 수 있을 것이다. 천궁의 biological finger printing을 위하여 다양한 산지의 천궁을 처리하여 처음에 천궁 표준품으로 구입하여 사용한 것과 PCA 방법과 similarity index를 사용하여 비교하였다. 다양한 방법으로 분석하였을 때 천궁에 의하여 발현이 변화되는 유효유전자를 선정하는 것이 매우 중요하며, 유효유전자 숫자보다는 fold induction이 큰 것을 선정하는 것이 매우 중요할 것으로 사료되었다. 즉, 천궁 추출물의 경우 fold induction을 2 fold, $P < 0.05$ 인 것을 152개를 선정하였을 때 그 SI 값이 0.711-0.981정도로 NMDA 나 그 구성물질들과 천궁 추출물과의 차이를 관찰할 수 없었다.
- 그러나 일천궁이나 토천궁 전체를 통하여 fold induction을 4 fold, $P < 0.05$ 인 것을 선정하여 SI 값이 최소 0.113이었고 최대는 0.992로 나타났으며, 평균값은 0.658로 biological finger printing을 할 수 있는 SI 범위를 얻을 수 있었다. 이러한 방법을 바탕으로 천궁 표준품과 여러 산지에서 구입한 것을 관찰하였을 때 본 과제에서 사용한 천궁 표준품이 다른 산지의 것과는 매우 차이가 많이 나는 것을 보아 천궁 표준품 선정이 매우 중요할 것으로 사료되었으며, 이는 선정할 때 여러 산지의 한약재로부터 성분 분석 및 효능 검증을 한 후 표준품을 선정하는 것이 중요할 것으로 사료되었다.

제5장 세부연구개발과제의 연구성과

5.1 활용성과

세부과제명	유전자칩을 활용한 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 효능유전자 검증 연구
세부과제책임자	동미숙/고려대학교/약리독성

가. 연구논문

번호	논문제목	저자명	저널명	집(권)	페이지	Impact factor	국내/국외	SCI여부
1								
2								

나. 학술발표

번호	발표제목	발표형태	발표자	학회명	연월일	발표지	국내/국제
1	In vitro estrogenic/antiestrogenic activity of 70% ethanol extract of Epimedium koreanum Nakai and its major components in MCF/ERE cells	Poster	MJ Song, HJ Kin, HK Kang, DH Kim, YI Park and <u>MS Dong</u>	ASIATOX-I V	2006. 6. 18-21	Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology 20(3): 240, 2006	국제
2	Identification of biomarker genes from oriental herbal medicine, Epimedium koreanum Nakai, by oligonucleotide microarray	Poster	김현정, 박윤희, 박영인, 김동현, 정하숙, 동미숙	한국독성학회	2006. 11. 17	서울, 건국대학교	국내

다. 지적재산권

번호	출원/등록	특허명	출원(등록)인	출원(등록)국	출원(등록)번호	IPC분류
1						
2						

라. 정책활용

※ 기타 관련정책에 활용 예를 구체적으로 기술함.

마. 타연구/차기연구에 활용

※ 타연구 및 차기연구에 활용된 예를 구체적으로 기술함.

바. 언론홍보 및 대국민교육

※ 언론홍보 및 대국민교육 내용, 일자 등을 간략히 기술함.

사. 기타

2005년 10월과 2006년 2월 및 2006년 7월 10일 등 3회에 걸쳐 국가 한약재 품질 과학화 연구 사업단의 자체 세미나에 참석하여 발표 하였음.

2006. 8월 16일 국가 한약재 품질 과학화 연구 사업단 바이오칩팀의 미니심포지움을 구성하였음.

5.2 활용계획

- 음양곽 및 천궁의 한약재 품질 과학화를 위한 biological finger printing에 적용할 수 있을 것임
- 음양곽 및 천궁 추출물 및 각각의 유효 물질들에 의한 유전자 발현 변화에 대한 database 구축 및 이를 활용한 효능처리 시스템 구축

제 6장 기타 중요변경사항

- 천궁의 경우 실험디자인을 시간에 따른 유전자 발현 변화만을 관찰하기로 하였으나 1차년도 실험결과 실험디자인이 약리효능 유전자를 선정하기가 힘들어 이를 보정하기 위하여 처리 시간을 주로 24시간으로 하였으며, 독성 물질(NMDA)을 사용하여 이에 의한 유전자 발현 변화를 함께 관찰하였음.
- 천궁 추출물을 중심으로 하여 처리시간 변화를 4 가지 (3, 6, 24, 48시간)에서 3가지 (4, 24, 48시간)로 줄였으며, NMDA를 단독 또는 천궁추출물과 동시에 처리하여 (4, 24시간) 유전자발현을 관찰하였음.
- 흥분독성물질인 NMDA를 함께 처리하여 일정시간에 유전자 발현 보는 것을 첨가하였음.

제 7 장 참고문헌

- Watanabe CM, Wolffram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG, Gohil K. (2001) The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(12):6577-80.
- Sakaida I, Tsuchiya M, Kawaguchi K, Kimura T, Terai S, Okita K. (2003) Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol*. 38(6):762-9.
- Leung YK, Ng TB, Ho JW. (2003) Transcriptional regulation of fosl-1 by licorice in rat Clone 9 cells. *Life Sci*. 73(24):3109-21.
- Yin X, Zhou J, Jie C, Xing D, Zhang Y. (2004) Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. *Life Sci*. 75(18):2233-44.
- Kang JX, Liu J, Wang J, He C, Li FP. (2005) The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon-beta and TNF-alpha in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 26(11):1934-9.
- Wang CY, Chiao MT, Yen PJ, Huang WC, Hou CC, Chien SC, Yeh KC, Yang WC, Shyur LF, Yang NS. (2006) Modulatory effects of *Echinacea purpurea* extracts on human dendritic cells: A cell- and gene-based study. *Genomics*. 2006 Sep 28 [Epub ahead of print]
- Jianhui Rong, Jiangang shen, Kwan-Ming Ng, ChangLiu, Paul Kwon-Hwang Tam, and Allan Sik-Yin Lau (2006) Genome-wide biological response fingerprinting (BioReF) enables selection of multiple marker genes as potential quality control of bitanical drug products. Program and abstracts for the fifth meeting of Consortium for globalization of Chinese Medicine cum International forum on chinese medicine, p32.
- Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, Cho JH. (2004) Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity. *Phytomedicine*. 11(6):544-8.
- Sun Y, Fung KP, Leung PC, Shi D, Shaw PC. (2004) Characterization of medicinal *Epimedium* species by 5S rRNA gene spacer sequencing. *Planta Med*. 70(3):287-8.
- Chiba K, Yamazaki M, Umegaki E, Li MR, Xu ZW, Terada S, Taka M, Naoi N, Mohri T. (2002) Neuritogenesis of herbal (+)- and (-)-syringaresinols separated by chiral HPLC in PC12h and Neuro2a cells. *Biol Pharm Bull*. 25(6):791-3.
- Guo BL, Xiao PG. (2003) Comment on main species of herba epimedii. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 28(4):303-7.
- Chiu JH, Chen KK, Chien TM, Chiou WF, Chen CC, Wang JY, Lui WY, Wu CW. (2006) *Epimedium brevicornum* Maxim extract relaxes rabbit corpus cavernosum through multitargets on nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. *Int J Impot Res*. 18(4):335-42.
- Escames G, Leon J, Lopez LC, Acuna-Castroviejo D. (2004) Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol*. 16(11):929-35.

제8장 첨부서류

- 본 연구개발사업의 성과로 기술된 게재된 학술지 논문 전체 사본(게재 허가를 받은 경우 게재 증명서)과 산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본을 반드시 첨부할 것.

총괄 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여		공개가능여부
사업명	한약재의 과학화		
과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 천궁, 음양곽		
연구책임자	성 명	박영인	주민등록번호
	소속 기관명	고려대학교	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~ 600자)

- 음양곽, 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 확립을 최종목표로 하여 음양곽, 천궁 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명, 음양곽, 천궁 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립, HPLC/UV와 HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation, HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting 및 음양곽, 천궁의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용 등을 목표로 한다.
- 유효성분 중심의 한약재 관리를 위하여 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 효능을 예측하고자 유전자칩 기반의 activity oriented *in vitro* screening system을 이용하여 1차년도에는 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)과 2차년도에는 천궁(*Cnidium officinale* Makino)의 추출물 및 단리물질들의 약리 효능 유전자를 찾아 약리유전자 database를 구축하고, 이를 활용한 효능정보처리시스템(software)을 구축함을 최종목표로 한다. 아울러 효능 유전자를 이용하여 천궁과 음양곽의 biological fingerprinting system을 구축함을 목표로 한다.

○ 연구내용 (1000 ~ 1200자)

- 음양곽, 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 확립
 - 음양곽으로부터 추출물 분획을 실시하여 얻은 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 가용성 분획에 대해 반복적인 column chromatography를 수행하여, 10종의 화합물을 분리 정제하였으며 (Icariin, Hyperoside, Chlorogenic acid, Epimedin A, Epimedin B, Epimedin C, Hexandraside E, Epimedoside F, Epimedoside A, 2''-O-Rhamnosylicariside II), 추가적으로 5종의 화합물을 분리하여 구조를 분석 중이다.
 - 천궁으로부터 추출물 분획을 실시하고, column chromatography를 통해 5종의 화합물을 분리 정제하였으며 (Z-ligustilide, Neocnidilide, Senkyunolide A, Ferulic acid, Chlorogenic acid) 추

가적으로 5종이상의 화합물을 분리, 동정중이다.

- HPLC와 LC/MS/MS를 이용하여 음양곽의 경우, hyperin, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin에 대한 동시 분석법을 확립하고 validation을 한 후 실제 음양곽 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하며, 천궁의 경우 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide에 대한 동시 분석법을 확립하고 validation을 한 후 실제 천궁 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하였다.
- 음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 HPLC/UV/MS로 분석한 후 전체 프로파일에 대하여 각 peak의 retention time, m/z 값, UV 흡수 peak 면적, mass intensity에 대한 피크 면적을 정리하여 데이터베이스화하였다.
- 음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 LC/MS로 분석한 후 얻은 total ion chromatogram에 대하여 retention time, m/z 값, mass intensity를 데이터화하여 주성분 분석을 수행하고 각 시료 간 similarity index값을 구하여 시료간의 유사성을 관찰하였다.
- 음양곽은 남성 성기능과 관련된 효소들의 발현 정도를 실험하여 여러 세포주 중에서 LNCaP 세포주를 선정하였으며, 음양곽의 효능물질로는 nitric oxide 생성 및 성기능과 관련된 효소들의 발현과 함유량 등을 기본으로 icariin과 epimedin B 및 hyperoside 를 선정하였다.
- 천궁 및 그 분리물질 3종 ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid의 진정작용을 신경독성물질인 NMDA에 의한 NO 생성이 저해되는 결과를 바탕으로 천궁의 진정작용을 약리효능으로 DNA chip 실험을 실시하였다.
- 음양곽은 추출물질들을 저농도, 고농도로 하여 저농도는 0, 3, 6, 24, 48시간동안 처리하였으며, 고농도는 24시간 처리하였다. 천궁 추출물은 고농도와 저농도로 하여 단독으로 또는 NMDA와 동시에 4, 24시간 동안 처리하였으며, 3종의 분리물질들은 한 농도로 단독으로 또는 NMDA와 동시에 24시간동안 처리하한 후 RNA를 분리하였다
- DNA microarray 실험은 ABI사의 Full Genome Expression Human Microarray를 사용하였으며, 얻어진 결과는 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.
- 현재 천궁에 대한 DNA 결과는 분석하고 있다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~ 600자)

- 음양곽으로부터 주요 생리활성 화합물인 icariin의 다량분리 방법을 확립하였으며, 다양한 flavonoid 계열의 물질을 분리하였으며, 자연계에서 최초로 epimedin F를 분리하였다.
- 천궁의 정유성분 및 phenylpropanoid 성분 분리 및 생약의 제제화를 고려한 지표물질 선정의 필요성을 발견하였다.
- HPLC, LC/MS를 이용한 음양곽과 천궁의 유효 성분 에 대한 동시 분석법을 확립하고 검증하였다.
- 본 연구를 통해 개발된 분석법은 공정서의 분석방법 등재를 위한 자료로 이용될 수 있을 것이다.
- 음양곽 또는 천궁이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준을 제시하고 품질 관리를 위한 분석법의 SOP를 제공할 수 있다.

세부 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여	공개가능여부	
주관과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능 유전자 확인연구 ; 천궁, 음양곽		
제 1 세부과제명	천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 분석법 개발		
연구책임자	성 명	박영인	주민등록번호
	소속 기관명	고려대학교	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~ 600자)

<p>음양곽, 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 음양곽, 천궁 함유 생리활성 화합물 최소 10종 이상 분리 및 화학구조 규명 - 음양곽, 천궁 함유 생리활성물질의 국가표준품 확립 - HPLC/UV와 HPLC/MS/MS를 이용한 동시 분석법 확립 및 validation - HPLC/UV/MS를 이용한 chemical fingerprinting - 음양곽, 천궁의 품질 관리를 위한 패턴인식분석법의 적용
--

○ 연구내용 (1000 ~ 1200자)

○ 음양곽, 천궁의 생리활성 성분의 분리, 동정 및 유효 성분에 대한 분석법 확립

- 음양곽과 천궁 표준 추출물과 이들의 비교재료 (국산 및 중국산)의 70% ethanol 추출물을 제조하여 분석과 DNA chip 및 효능탐에 제공하였음.
- 음양곽으로부터 추출물 분획을 실시하여 얻은 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 가용성 분획에 대해 반복적인 column chromatography를 수행하여, 10종의 화합물을 분리 정제하였으며 (Icariin, Hyperoside, Chlorogenic acid, Epimedin A, Epimedin B, Epimedin C, Hexandraside E, Epimedoside F, Epimedoside A, 2''-O-Rhamnosylicariside II) 추가적으로 5종의 화합물을 분리하여 구조분석중이다.
- 천궁으로부터 추출물 분획을 실시하고, column chromatography를 통해 10종의 화합물을 분리 정제하였으며 (Z-Butylidenephthalide, Z-ligustilide, neocnidilide, senkyunolide A, ferulic acid, chlorogenic acid, oleanolic acid, β-sitosterol, levistolide A, pregnenolone) 추가적으로 1종 이상의 화합물을 분리, 동정중이다.
- HPLC와 LC/MS/MS를 이용하여 음양곽의 경우, hyperoside, epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin에 대한 동시 분석법을 확립하였으며, validation을 한 후 실제 음양곽 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하였으며, 천궁의 경우 chlorogenic acid, ferulic acid, senkyunolide A, (Z)-ligustilide에 대한 동시 분석법을 확립하였고 validation을 한 후 실제 천궁 추출물 시료를 분석하여 이들 화합물의 함량을 분석하였다.
- 음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 HPLC/UV/MS로 분석한 후 전체 프로파일에 대하여 각 peak의 retention time, m/z 값, UV 흡수 peak 면적, mass intensity에 대한 피크 면적을 정리하여 데이터베이스화 하였다.
- 음양곽 및 천궁의 추출물 시료를 LC/MS로 분석한 후 얻은 total ion chromatogram에 대하여 retention time, m/z 값, mass intensity를 데이터화하여 주성분 분석을 수행하였으며 각 시료 간 similarity index값을 구하여 시료간의 유사성을 관찰하였다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~ 600자)

- 음양곽으로부터 주요 생리활성 화합물인 icariin의 다량분리 방법을 확립하였으며, 다양한 flavonoid 계열의 물질을 분리하였으며, 자연계에서 최초로 epimedoside F를 분리하였다.
- 천궁의 정유성분 및 phenylpropanoid 성분 분리 및 생약의 제제화를 고려한 지표물질 선정의 필요성을 발견하였다.
- 천궁의 정유성분이 매우 불안정하여 분리보관이 힘들으나 보관이 가능한 방법을 개발하였다.
- HPLC, LC/MS를 이용한 음양곽과 천궁의 유효 성분에 대한 동시 분석법을 확립하고 검증하였다.
- 본 연구를 통해 개발된 분석법은 공정서의 분석방법 등재를 위한 자료로 이용될 수 있을 것이다.
- 음양곽 또는 천궁이 함유된 건강 보조 식품 또는 한방제제의 품질 관리를 위한 기준을 제시하고 품질 관리를 위한 분석법의 SOP를 제공할 수 있다.
- 패턴 인식분석법을 이용한 한약재 품질 관리 방법을 제시하였다.
- 음양곽과 천궁의 화학적 성분에 대한 database 구축에 기여하였다.

○ 참여연구원

세부 연구과제 요약

과제 고유번호	자동부여		공개가능여부
주관과제명	한약재의 생리활성성분 분리 및 효능유전자 확인 연구; 천궁, 음양곽		
제 1 세부과제명	유전자칩을 활용한 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 효능유전자 검증 연구		
연구책임자	성 명	동미숙	주민등록번호
	소속 기관명	고려대학교	
	전자우편		전화번호

○ 연구목표 (400 ~ 600자)

- 본 과제에서는 유효성분 중심의 한약재 관리를 위하여 천궁과 음양곽의 생리활성 성분의 효능을 예측하고자 유전자칩 기반의 activity oriented *in vitro* screening system을 이용하여 1차년도에는 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)과 2차년도에는 천궁(*Cnidium officinale* Makino)의 추출물 및 단리물질들의 약리 효능 유전자를 찾아 약리유전자 database를 구축하고, 이를 활용한 효능정보처리 시스템(software)을 구축함을 최종목표로 한다.
- 아울러 효능 유전자를 이용하여 천궁과 음양곽의 biological finger printing system을 구축함을 목표로 한다.

○ 연구내용 (1000 ~ 1200자)

- 음양곽은 남성의 성기능향상 작용을 위하여 민간에서 주로 사용하고 있는 생약으로 성기능과 관련된 효소들의 발현 정도를 실험하여 여러 세포주 중에서 LNCaP 세포주를 선정하였으며, 음양곽의 효능물질로는 음양곽의 주성분으로 알려진 icariin과 epimedin A, B, C, 및 hyperoside 중에서 이들 물질에 의한 nitric oxide 생성 및 성기능과 관련된 효소들의 발현과 함유량 등을 기본으로 icariin과 epimedin B 및 hyperoside 를 선정하였다.
- 천궁 및 그 분리물질 3종 ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid의 진정작용을 관찰하기 위하여 neuroblastoma 세포주인 SK-N-SH 세포를 선정하여 nNOS 와 iNOS 발현됨을 RT-PCR로 확인하였다. 천궁 및 분리물질들 자체는 NO 생성량이 농도가 증가함에 따라 증가하였으나, 신경독성물질인 NMDA를 동시에 처리하였을 때는 NMDA에 의한 NO 생성이 저해되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 천궁의 진정작용을 약리효능으로 DNA chip 실험을 실시하였다. 천궁의 효능물질로는 ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid를 약리효능 및 함유량을 기초로 하여 선정하였다.
- 음양곽은 추출물질들을 저농도, 고농도로 하여 저농도는 0, 3, 6, 24, 48시간동안 처리하였으며, 고농도는 24시간 처리하였다. 천궁 추출물은 고농도와 저농도로 하여 단독으로 또는 NMDA와 동시에 4, 24시간 동안 처리하였다. 3종의 분리물질들은 한 농도로 단독으로 또는 NMDA와 동시에 24시간 동안 처리한 후 RNA를 분리하였다.

- DNA microarray 실험은 ABI사의 Full Genome Expression Human Microarray를 사용하였으며, 얻어진 결과는 signal/noise ratio > 3 (50% 시료), flag < 100 인 데이터를 filtering 한 후 normalization 하였다. 그 후 DEG 분석을 실시하여 약물처리에 의하여 2배 이상 증가하고, 유의적으로 발현 (P<0.05)이 변화한 유전자만을 선별하여 clustering 분석 및 유전자들의 생물학적 기능 및 관련 biological pathway를 분석하였다.
- 현재 천궁에 대한 DNA 결과는 분석하고 있다.

○ 연구성과(응용분야 및 활용범위포함) (400 ~ 600자)

- 음양곽 및 그 분리물질의 처리 용량에 따른 NO 발생 및 성호르몬 관련 효소들의 발현 양상 실험을 통한 성기능 향상 작용을 관찰하여 음양곽의 약리효능 중심으로 한약재 품질 과학화 및 한약제제 제품화에 기여할 것임. 아울러 한약재 관리를 유효성분 중심으로 할 수 있도록 기초 결과를 제시할 수 있을 것임.
- 음양곽 추출물과 그 분리물질에서 유전자 발현이 많이 변화된 biological pathway를 각각 관찰한 후 상호 비교 관찰하여 이들간에 상호 유사성이 있음을 밝혔으며, 음양곽에서 성기능 향상과 관련된 효소들의 발현에 변화가 있는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 한약재 효능 유전자발현 데이터베이스구축사업에 활용할 수 있다.
- 음양곽 및 추출물질에 대한 유효 유전자는 realtime PCR로 검증한 결과 약 50% 내외의 결과가 일치되었으며, 일치되지 않은 것들의 많은 것을 massage 량이 적은 것들이 주를 이루고 있었다. 따라서 검증된 생물학적 유효유전자들은 음양곽의 품질 과학화에 기여할 것이며, 유효 유전자 중심의 한약재 품질관리가 가능할 것임.
- 천궁 및 그 분리물질 3종 ligustilide, Senkyunolide A 및 ferulic acid의 진정작용을 in vitro에서 관찰하여 약리효능 중심으로 한약재 품질 과학화 및 한약제제 제품화에 기여할 것임. 아울러 한약재 관리를 유효성분 중심으로 할 수 있도록 기초 결과를 제시할 수 있을 것임.
- 천궁 및 그 분리물질에 대하여는 진정작용을 약리효능으로 DNA chip 실험을 실시하였으며, 현재 이에 대한 결과를 분석하고 있는 중임.

