(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133798
(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/05* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/05 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0035986
(22) 출원일자 2022년03월23일
심사청구일자 2022년03월23일
(30) 우선권주장
1020210038651 2021년03월25일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호(초전동, 이지더원 아파트)
김태윤
경상남도 창원시 성산구 외동반림로 130번길 4 1층 안채
(74) 대리인
위병갑

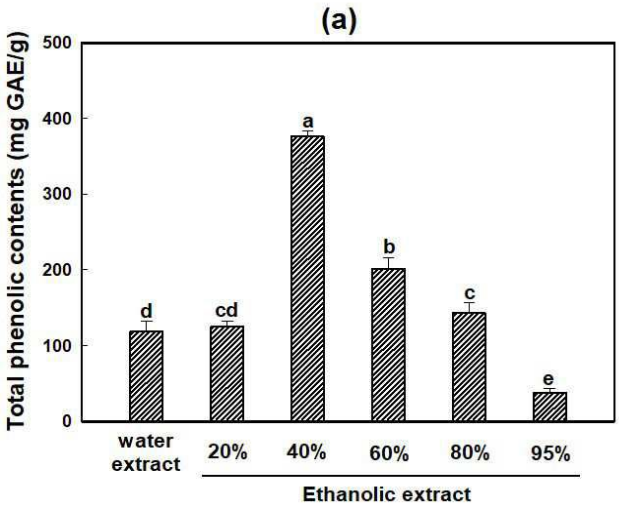
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **청각 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 청각 추출물이 폐, 비강 세포에서 발생되는 세포 독성에 대한 세포 보호 효과가 우수함 및 초미세먼지에 노출된 동물모델의 폐조직에서 지질과산화 억제효과 및 항산화 능력을 검증함으로써 초미세먼지로 인한 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 완성하였다. 이는 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2200/314 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345313660
과제번호 2018R1D1A3B07043398
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명
연구사업명 개인기초연구(지역대학우수과학자지원사업)
연구과제명 (초)미세먼지 유도성 염증 발생과 뇌신경세포 기능저하와의 연계기전 및 개선 기작 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물 또는 휘발성 용제를 이용한 유기용매 추출법을 이용하여 추출한 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유기용매 추출법은 30 내지 50% 에탄올을 이용한 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 염증성 호흡기 질환은 폐렴, 천식, 만성 기관지염, 진폐증, 결핵, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 낭포성 섬유증 중 어느 하나인 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 청각 추출물은 초미세먼지($PM_{2.5}$)에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 억제하는 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 청각 추출물은 초미세먼지($PM_{2.5}$)에 의해 유도되는 세포독성에 대한 세포 생존율을 증가시키는 것인, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

청각 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 호흡기 세포손상 보호용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

청각 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 본 발명은 청각(*Codium fragilea*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 청각 추출물을 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 호흡기 질환의 종류로는 폐렴, 천식, 만성 기관지염, 진폐증, 결핵, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 낭포성 섬유증 등이 있다.

[0003] 한편, 최근 미세먼지(Particulate Matter, PM)의 농도가 증가하고 지속기간이 증가됨에 따라 미세먼지에 의한 인체영향성에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다(Kim 등, 2017). 미세먼지는 우리나라의 오랜 역사와 함께 해왔으며, 예로부터 몽고와 중국 사막지역 및 황화강 유역에서 발원된 황사의 영향을 받았고, 최근에는 우리나라 및 동북아시아 국가들의 급격한 산업화가 미세먼지의 주요 발생 원인으로 보고되고 있다(Myung, 2016).

[0004] 초미세먼지($PM_{2.5}$)는 공기역학적 지름이 2.5 μm 이하인 미세먼지를 의미하며, 대기 오염 발생원에서 직접 배출되어지는 1차 오염물질과 대기에서 반응하여 생성되는 2차 대기오염 물질(NO_3^-, SO_4^-, $NH4^-$, polyacromatichydrocarbon(PAH), quinone 등)이 주를 이룬다(Kim 등, 2017, Lippmann 등, 2003). 세계보건기구(World Health Organization, 2013)에 의하면, PM_{10}(공기역학적 지름이 10 μm 이하인 미세먼지)에 장기 노출될 경우 호흡기관 관련 질환과 사망률이 증가하게 되는데, $PM_{2.5}$는 이보다 더 강한 위험 인자로 작용한다고 보고하였다(Block 등, 2009).

[0005] 지름 5~10 $\mu g/m^3$이하의 먼지는 코 점막을 통해 체내에 흡수가 가능하며 2~5 $\mu g/m^3$이하는 기도(호흡기)를 통과하고, 0.1~1 $\mu g/m^3$은 폐포 손상까지 유발하게 된다. 미세먼지가 인체에 흡입되었을 경우, 충돌·중력침강·확산·정전기적 흡착 등과 같은 다양한 기전에 의해서 조직에 침착될 수 있으며, 일부는 혈액을 따라서 전신을 순환하기도 한다.

[0006] 특히, 체내에 침착된 미세먼지는 산화적 스트레스와 염증 반응을 유도하고 호흡계 및 순환계 질환의 급성 악화 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다(Myung, 2016). 또한, 후각상피세포를 거치면 혈관 뇌 장벽(Blood-Brain Barrier; BBB)을 거치지 않고도 뇌로 직접 도달 할 수 있으며, 자성을 띄는 입자의 경우 뇌조직에 직접 침착됨으로써 미세아교세포(Microglia)를 활성화하여 pro-inflammatory cytokines 등을 생산함으로써 뇌신경 염증을 유도하고 더 나아가 인지장애를 유도하는 것으로 보고되었다(Block, 2004). 따라서, 이러한 미세먼지로 유도될 수 있는 인체내 산화적 스트레스 억제 및 염증반응을 억제시켜 줄 수 있는 천연 식품 소재에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

[0007] 최근 육상자원고갈로 해양자원을 활용한 연구가 주목을 받고 있으며, 특히 해조류는 다양한 생리활성물질의 함유한 식품소재로서 연구 중요성이 대두되고 있다(Lee 등, 2017). 청각(*Codium fragile*)은 대한민국에서는 사슴의 뿔을 닮았다는 점에서 청각채(靑角菜)나 녹각채(鹿角菜)로 일컫는다. 일본에서는 '미루'(海松, 해송. 바다의 소나무)로 칭하며, 영어로는 '시 스태그혼'(Sea staghorn, 바다의 사슴뿔)이라고 한다. 청각(*Codium fragile*)은 깃털말목 청각과에 속하는 녹조류의 일종으로 동아시아, 오세아니아 및 북유럽 해안에 널리 분포하는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2013). 청각은 우리나라에서 과거부터 식용, 약용으로 사용됐으며, 오늘날에도 한국, 중국, 일본, 하와이, 그리고 아프리카 등에서 식용으로 사용되고 있다. 청각 물 추출물은 항부종, 항염증, 피부보호 등 다양한 생리 활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Lee 등, 2017; Moon 등, 2018). Yoon 등(2011)의 연구에 따르면 청각 96% 에탄올 추출물은 대식세포(Raw264.7)에서 지질다당류에 의해 발현된 고리형 산화효소-2(Cyclooxygenase-2, COX-2), 산화질소 합성효소(inducible nitiric oxide synthase, iNOS), 및 종양 괴사 인

자(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)와 같은 전염증성 사이토카인과 프로스타글란딘 E2(PGE2) 및 산화질소(NO)와 같은 전 염증 매개체 수준을 효과적으로 억제하는 것으로 보고되었다. 청각이 갖는 일부 염증 모델에 대한 연구가 나타나고 있지만, 미세먼지로 유도될 수 있는 산화적 스트레스와 호흡기 및 뇌 세포 등에서의 보호 효과에 대한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 이에 본 연구에서는 초미세먼지($PM_{2.5}$)로 발생되는 산화적 독성이 중요한 유입경로에 해당되는 비강(RPMI-2650), 폐(A549) 2종의 세포에 대해 미치는 독성과 초미세먼지 유도성 질환에 대한 예방 소재로서의 청각의 생리활성 효과를 확인하고자 하였다.

[0008] 즉, 본 연구에서는 초미세먼지에 노출된 다양한 세포 및 동물 조직에서 그 보호효과를 검증함으로써 청각이 초미세먼지 유도성 관련 염증성 질환 예방 또는 치료의 효과가 있음을 본 발명을 통해 제공하고자 한다.

[0009] 이에 따라 본 연구에서는 폐, 비강세포에서 발생되는 세포 독성에 대한 세포 보호 효과 등을 검증함으로써 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 질환 중 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-1055447 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 청각 추출물이 비강, 폐 세포에서 발생되는 세포 독성에 대한 세포 보호 효과 및 초미세먼지에 노출된 동물모델의 폐 조직에서 지질과산화 억제효과 및 항산화효과를 검증함으로써 초미세먼지로 인한 염증성 질환 중 호흡기 질환의 예방 또는 치료 효능을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 대해 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물 또는 휘발성 용제를 이용한 유기용매 추출법을 이용하여 추출한 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 유기용매 추출법은 30 내지 50% 에탄올을 이용한 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 염증성 호흡기 질환은 폐렴, 천식, 만성 기관지염, 진폐증, 결핵, 폐기종, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 낭포성 섬유증 중 어느 하나인 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 청각 추출물은 초미세먼지($PM_{2.5}$)에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 억제시키는 효과를 특징으로 하는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 청각 추출물은 초미세먼지($PM_{2.5}$)에 의해 유도되는 세포독성에 대한 세포 생존율이 증가되는 것을 특징으로 하는 것이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 또한, 본 발명은 청각 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 호흡기 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 대해 제공하는 것이다.

[0019] 마지막으로, 본 발명은 청각 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 호흡기 세포손상 보호용 약학적 조성물에 대해 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 청각 추출물이 비강, 폐 세포에서 발생되는 세포 독성에 대한 세포 보호 효과 및 초미세먼지에 노출된 동물모델의 폐 조직에서 지질과산화 억제효과 및 항산화효과를 검증함으로써 초미세먼지로 인한 염증성 질환 중 호흡기 질환의 예방 또는 치료 효능을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물의 (a) 총 페놀성 화합물 함량 및 (b) 총 다당체 함량을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물의 (a) RPMI-2650 , (b) A549 세포에서 $PM_{2.5}$-유도된 산화 스트레스에 대한 청각(*Codium fragile*) 추출물의 세포 내 ROS 함량을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물의 (a) RPMI-2650 및 (b) A549 세포에서 $PM_{2.5}$-유도된 세포 독성에 대한 청각(*Codium fragile*)의 물 및 40 % 에탄올 추출물의 세포 생존력을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물의 지방질과산화 억제효과에 대해 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물 처리에 따른 마우스 폐 조직의 SOD 함량을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물 처리에 따른 마우스 폐 조직의 MDA 함량을 확인한 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물 처리에 따른 마우스 폐 조직의 GSH 함량을 확인한 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물 처리에 따른 마우스 폐 조직의 미토콘드리아 내 ROS 함량을 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물 처리에 따른 마우스 폐 조직의 미토콘드리아 막 전위를 확인한 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서 청각 추출물의 생리활성 물질에 대하여 UPLC-Q-TOF/MS 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 제공을 목적으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 청각(*Codium fragile*)으로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 제공을 목적으로 한다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0028] 일 측면에서, 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 청각(*Codium fragile*)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상

기 청각(*Codium fragile*)으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 식품학/약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(Methanol), 에탄올(Ethanol), 프로판올(Propanol), 이소프로판올(Isopropanol), 부탄올(Butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알콜, 아세톤(Acetone), 에테르(Ether), 벤젠(Benzene), 클로로포름(Chloroform), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(Methylene chloride), 헥산(Hexane) 및 시클로헥산 (Cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0030] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서, 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0031] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0032] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 하기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화 되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알콜 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0033] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 건강기능식품 조성물은, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강 기능성 식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강 기능성 식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀 기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며,

필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강 기능성 식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0036] 일 측면에서, 청각(*Codium fragile*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 초미세먼지로 인한 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(Adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0040] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 트윈(TweenW) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0042] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화 될 수 있다.

[0043] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0044] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0045] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않

는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0049] **<실시예 1> 청각(*Codium fragile*) 추출물의 제조 및 함량분석**

[0050] **1.1 청각(*Codium fragile*) 추출물의 제조**

[0051] 본 실험의 청각(*Codium fragile*)은 전남 완도군에서 채취된 것을 사용하였다. 염분 및 불순물을 제거하기 위하여 수세하고 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd., Yangju, Korea)에서 건조시킨 후, 분말화하여 냉동보관하였다. 건조된 시료 20 g을 각각 물(증류수), 20, 40, 60, 80 또는 95% 에탄올을 가한 뒤, 40℃에서 2시간 동안 환류냉각 추출하였고, 이를 No. 2 거름종이(Whatman Inc, Kent, UK)를 이용하여 여과 및 농축하여 동결건조한 뒤 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다(Park 등, 2019).

[0053] **1.2 총 페놀성 화합물(Phenolic compound) 함량 측정**

[0054] 총 페놀성 화합물 함량은 시료액 1 mL과 증류수 9 mL을 혼합한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 실온에서 5분간 반응시킨 뒤 7% 탄산나트륨 용액 10 mL를 넣고 25 mL 정용 플라스크를 이용하여 증류수로 정용하였다. 반응액을 2시간 동안 실온에서 반응시킨 뒤, UV-spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 동일한 방법으로 측정된 gallic acid의 검량곡선을 이용하여 계산하였고, 이를 mg gallic acid equivalents GAE/g of dried weight로 나타내었다(Kim 등, 2003).

[0056] **1.3 총 다당체(Polysaccharide) 함량 측정**

[0057] 총 다당체(polysaccharide 함량은 시료액 0.2 mL, 5% phenol 용액 0.2 mL, sulfuric acid 1 mL을 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤, UV-spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 다당체 함량은 동일한 방법으로 측정된 glucose의 검량곡선을 이용하여 계산하였다(Park 등, 2020).

[0059] **1.4 측정 결과**

[0060] 총 페놀성 화합물 함량 측정 결과이다(도 1a). 총 페놀성 화합물 함량은 청각 40% 에탄올 추출물에서 376.33 mg GAE/g of dried weight으로 가장 높은 함량을 나타냈으며, 60% 에탄올 추출물(201.33 mg GAE/g of dried weight), 80% 에탄올 추출물(143.00 mg GAE/g of dried weight), 20% 에탄올 추출물(124.66 mg GAE/g of dried weight), 물 추출물(118.00 mg GAE/g of dried weight), 95% 에탄올 추출물(38.00 mg GAE/g of dried weight) 순으로 높은 함량을 나타냈다.

[0061] 총 다당체(polysaccharide) 함량을 분석한 결과 총 페놀성 화합물 함량에서 상대적으로 낮은 함량을 나타냈던 물 추출물과 20% 에탄올 추출물에서 각각 46.31%, 29.86%로 높은 함량을 나타냈으며, 60% 에탄올 추출물에서 13.47%, 40% 에탄올 추출물에서 12.28%, 95% 에탄올 추출물에서 6.16%, 80% 에탄올 추출물에서 4.87% 순으로 높은 함량을 나타냈다(도 1b).

[0063] **<실시예 2> 초미세먼지($PM_{2.5}$) 유도성 ROS 함량과 세포 생존률 측정**

[0064] **2.1 세포 배양**

[0065] 본 실험에 사용된 폐세포(A549)와 비강세포(RPMI-2650)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 뇌신경세포(MC-IXC)는 American Type Culture Collection (Manasas, VA, USA)로부터 구매하여 사용하였다. RPMI-2650세포는 10% 소태아혈청, 1% 50 units/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신(P/S)이 포함된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640 배지를 사용하였다. A549세포는 10% 새끼소혈청(Bovine calf serum), 1% P/S가 포함된 DMEM 배지를 사용하였다.

[0067] **2.2 초미세먼지($PM_{2.5}$) 유도성 세포 내 ROS 생성 억제 효과**

[0068] 세포 내 산화적스트레스를 측정하기 위해 96 well에 세포를 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 청각추출물 처리 30분 후, 초미세먼지($PM_{2.5}$)를 전처리하였다. 초미세먼지 처리 24시간 후, 50 μM DCF-DA를 처리하여 40분간 배양하고 형광광도계(Infinite F200, Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 들뜸 파장 485 nm 및 방출 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다(Park 등, 2019).

[0069] 비강세포(RPMI-2650)에서 초미세먼지 처리 군(695.15%)에서는 대조군(100%) 대비 약 6.9배 증가된 세포 내 ROS 함량을 나타냈으며, 양성대조군(ascorbic acid)은 약 112.05%로 효과적으로 세포 내 ROS 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 청각 물 추출물과 40% 에탄올 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 세포 내 ROS 함량이 감소하는 경향을 보였으며, 100 μg/mL 농도에서는 각각 221.49%, 202.71%로 나타났다(도 2a).

[0070] 폐세포(A549)에서 초미세먼지 처리군(1329.13%)은 대조군(100%) 대비 증가된 세포 내 ROS 함량을 나타냈다. 반면, 청각 물 추출물 및 40% 에탄올 추출물에서는 농도가 증가함에 따라 ROS 함량이 감소하는 경향을 보였다. 특히, 40% 에탄올 추출물 100 μg/mL 농도에서는 299.50%로 ROS 생성량을 감소하는 것으로 확인되었으며, 이는 양성대조군(518.54%)과 비교시에도 높은 ROS 생성 억제효과를 나타냈다(도 2b).

[0072] **2.3 초미세먼지($P_{M2.5}$) 유도성 세포독성에 대한 세포사멸 억제 효과**

[0073] 세포 생존율 측정은 전처리된 세포에 MTT stock 용액 10 μL를 처리하여 2시간 동안 반응시키고, 배지를 모두 제거하고 dimethyl sulfoxide를 첨가하여 20분간 상온에서 반응시킨 뒤 570 nm (determination wavelength)와 690 nm (reference wavelength)에서 흡광도를 측정하였다(Park 등, 2019).

[0074] 비강세포(RPMI-2650)에서 초미세먼지 처리군(63.37%)에서는 대조군(100.00%)대비 약 36.63%의 세포 사멸이 유도되었다. 양성대조군(Ascorbic acid)과 청각 추출물(물, 40% 에탄올)에서는 초미세먼지 처리군 대비 유의적인 세포 생존율의 증가는 확인되지 않았다(도 3a).

[0075] 폐세포(A549)에서 초미세먼지 처리군(74.59%)에서는 대조군(100%) 대비 약 25.41% 세포사멸이 유도되었으며, 양성대조군은 102.31%로 대조군과 유사한 세포 생존율을 나타냈다. 청각 물 추출물에서는 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 증가하는 경향을 보였으며 100 μg/mL농도에서 132.05%를 나타냈다. 40% 에탄올 추출물에서는 20 μg/mL 농도에서 세포 생존률 119.95%를 나타냈다(도 3b).

[0077] **2.4 말론디알데히드(Malondialdehyde; MDA) 생성 억제 효과 분석**

[0078] 지방질 과산화물(malondialdehyde, MDA) 생성 억제 효과는 4주령 수컷 ICR 마우스(Samtako, Osan, Korea)를 구입후, 뇌를 적출하여 실험에 사용하였다. 본 실험은 경상대학교 동물윤리심의위원회로부터 승인(인가번호: GNU-181019-M0054)을 받아 진행하였다. 적출한 뇌 조직은 20 mM 트리스 염산 완충용액(pH 7.4)을 가하고 조직파쇄기(Next Advance Inc., Troy, NY, USA)를 사용하여 균질화한 뒤, 10,000 ×g에서 10분동안 원심분리한 상등액을 이용하였다. 추출물에 뇌 조직 상등액, 10 μM $FeSO_4$(II), 0.1 mM ascorbic acid을 혼합하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 30% trichloroacetic acid와 1% thiobarbituric acid를 첨가하여 95℃의 항온 수조에서 20분 동안 가열하였다. 최종 반응물은 원심분리(10,000 ×g, 10 min)하여 상층액을 UV-spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0079] 청각 추출물의 지질과산화물 생성 억제효과를 측정한 결과(도 4) 청각 40% 에탄올 추출물과 60% 에탄올 추출물에서 54.46%, 52.57%로 높은 활성을 나타냈으며, 물 추출물, 20% 에탄올 추출물 및 95% 에탄올 추출물에서는 활성이 거의 나타나지 않았다.

[0080] 미세먼지는 인체 내 유입 시 산화적 세포 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 그 결과로써 다양한 조직(뇌, 간, 신장)에서 지질과산화물 생성하는 것으로 보고되고 있다(Araujo 등, 2008; Hajipour 등, 2020). Kim 등(2015)의 연구에 따르면, 청각 에탄올 추출물의 *in vitro* 항산화 활성(ABTS/DPPH 라디칼 소거활성, superoxide dismutase 활성, reducing power, MDA 생성억제)은 총 페놀성 화합물 함량과 높은 관련성이 있는 것으로 보고하였다. 비록 물 추출물에서의 MDA 생성억제 효과가 상대적으로 미흡하였지만, Kolsi 등(2017)의 연구에 따르면 물 추출물에서 높은 함량을 나타내는 sulfated polysaccharide의 식이가 고지방 식이로 유도된 비만 wistar

rats 모델에서 간과 신장에서의 지질과산화물 생성을 효과적으로 억제한다고 보고하였다. 이에 따라, 청각의 주요 생리활성물질인 polysaccharide 함량이 우수하게 나타난 물 추출물과 총 페놀성 화합물 함량 및 지질과산화 활성이 우수하게 나타난 40% 에탄올 추출물의 미세먼지 유도성 산화적 손상에 대한 세포 보호효과를 확인하였다.

[0082] **2.5 통계처리**

[0083] 모든 실험은 mean±SD로 나타냈으며, 각 평균값에 대한 유의성 검증은 SAS software 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 실시하고, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료 간의 유의차를 5% 수준(P<0.05)에서 검증하였다.

[0085] **2.6 실험 데이터 총 분석결과**

[0086] 미세먼지로 인한 세포독성의 주요 메커니즘은 ROS 생성에 의한 DNA 산화 및 단백질 손상 등 으로 보고되고 있다. 퀴논 및 다환 방향족 탄화수소와 같은 유기 탄소 화합물은 미세먼지의 주요 산화-환원 활성 인자로써 cytochrome P450 환원 효소에 의해 산소라디칼과 같은 ROS를 형성한다. 또한, 미세먼지에 포함될 수 있는 전위금속들은 세포 내·외부에서 ROS 과잉 생산에 기여할 수 있으며, 이들은 DNA 산화 및 단백질 손상을 유발함으로써 세포 손상 및 기능 저하를 유발하게 된다(Valavandis 등, 2008 ; Xia 등, 2007).

[0087] 본 연구에서 청각 40% 에탄올 추출물은 총 페놀성 물질 함량, 지질과산화 억제 효과에서 물 추출물 대비 우수했고, 미세먼지 유도성 세포 내 ROS생성 억제 효과에서는 물 추출물과 유사하거나 더 높은 활성을 보였다. 하지만, 미세먼지로 유도되는 세포사멸 억제효과 측정에서 40% 에탄올 추출물의 세포에서 세포 생존률에 영향을 미치지 않거나(RPMI-2560) 처리 농도가 높아짐에 따라서 오히려 일정 수준의 세포독성(A549)을 나타내는 것으로 확인되었다. 반면, 물 추출물의 경우, 비강세포(RPMI-2650)를 제외한 모든 세포에서 뚜렷한 세포사멸 억제효과를 나타내는 것을 확인하였다. 일반적으로 해조류의 생리활성은 dieckol과 같은 polyphenol로 부터 기인하는 것으로 추정되어 왔지만, 최근 연구에서는 해조류가 포함하고 있는 다양한 polysaccharide 또한 해조류의 주요 생리활성물질로 밝혀지고 있고 그로 인해 다양한 연구가 진행되고 있는 추세이다(Juarez-Portilla 등, 2019). Wang 등(2020)의 연구에서 청각 효소 분해물로부터 분리한 sulfated polysaccharide는 신장(Vero)세포에서 H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스로 인한 세포 사멸 및 ROS 함량을 유의적으로 감소시켜 주었으며, zebrafish 배아를 이용한 *in vivo* 모델에서 H_2O_2로 유도된 ROS 함량 수준, 세포사멸 및 지질 과산화를 유의적으로 감소시키는 것으로 확인되었다. 이러한 물 추출물의 우수한 세포보호 효과는 청각의 sulfated polysaccharide와 같은 생리활성물질에서 기인된 효과로 유추된다.

[0088] 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때, 청각은 초미세먼지의 유입경로에 해당하는 비강, 폐 조직의 세포보호 및 기능 개선 등에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 다만, 청각 40% 에탄올 추출물의 경우 고농도에서 일부 세포독성이 나타남에 따라 물 추출물에 대한 잠재적 활용 가치가 높을 것으로 판단되며, 이는 *in vivo* 동물모델 연구 및 생리활성 물질분석과 같은 추가적인 연구를 통해 밝혀질 필요가 있다.

[0090] **<실시예 3> *in vivo* 동물모델**

[0091] 수컷 6주령의 BALB/c 마우스를 Samtako(Osan, Korea)로부터 구매하였다. 마우스를 케이지 당 5 마리씩 무작위로 분류하여, 55% 습도 및 22±2℃의 표준 실험실 조건에서 사육하였다. 이들을 7개의 그룹으로 분류하였다.

표 1

[0092]

1	sham control(Sham)	chamber exposure-/sample intake-
2	normal control(NC)	clean air+/sample intake-
3	normal+sample(NS)	clean air+/sample intake+; 100 mg/kg of body weight
4	$PM_{2.5}$ 노출(PM)	dust air+/sample intake-
5	$PM_{2.5}$ 노출 및 시료 섭취(CF50)	dust air+/sample intake+; 50 mg/kg of body weight

6	$PM_{2.5}$ 노출 및 시료 섭취(CF100)	dust air+/sample intake+; 100 mg/kg of body weight
7	positive control(PC)	dust air+/positive control intake+; 50 mg/kg of body weight

[0094] 각 그룹을 sham control(Sham) 그룹(chamber exposure-/sample intake-), normal control(NC) 그룹(clean air+/sample intake-), normal+sample(NS) 그룹(clean air+/sample intake+; 100 mg/kg of body weight), $PM_{2.5}$ 노출(PM) 그룹(dust air+/sample intake-), $PM_{2.5}$ 노출 및 시료 섭취(CF50) 그룹(dust air+/sample intake+; 50 mg/kg of body weight), $PM_{2.5}$ 노출 및 시료 섭취(CF100) 그룹(dust air+/sample intake+; 100 mg/kg of body weight), positive control(PC) 그룹(dust air+/positive control intake+; 50 mg/kg of body weight)으로 하였다. positive control은 식품의약품안전처에 등재된 인지기능 장애 개선을 나타내는 개별인정형 건강기능식품 소재인 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 뿌리 추출물 분말을 사용하였다. 청각 물 추출물과 참당귀 뿌리 추출물은 음용수에 녹인 후 12주 동안 1일 1회 경구 투여 하였으며, 마우스는 전신 노출 챔버에서 12주 동안 하루 500 $\mu g/m^3$ 농도의 $PM_{2.5}$에 노출시켰다.

[0095] 모든 동물실험은 경상국립대학교 동물실험실 운영위원회(인증번호 : GNU-210803-M0069, 2021-08-03 승인)와 보건복지부 윤리위원회의 승인을 받아 수행되었다.

[0097] **<실시예 4> 청각 추출물 처리에 따른 폐 조직 분석**

[0098] 상기 실험 종료 후 마우스를 희생하여 폐 조직을 채취하여 청각 물 추출물 처리가 폐 조직에 미치는 영향을 확인하였다.

[0100] **4.1 초과산화물 제거효소(Superoxide dismutase; SOD) 함량 분석**

[0101] phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에서 폐 조직을 균질화하였다(Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA). 균질화된 폐 조직을 4℃에서 10분간 400×g 조건으로 원심분리한 후, 상등액을 제거한 pellet을 SOD 함량 측정에 사용하였다. Pellet과 1×cell extraction buffer[10% SOD buffer, 0.4% (v/v) triton X-100, 200 μM phenylmethane sulfonylfluoride]를 4℃에서 10분간 10,000×g 조건으로 원심분리한 후 상용 SOD kit(Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)를 사용하여 SOD 함량을 측정하였다.

[0102] 폐 조직에서의 SOD 함량을 측정한 결과는 도 5에 나타내었다. 폐 조직에서 SOD의 함량은 Sham 그룹(7.62 unit/mg of protein), NC 그룹(7.81 unit/mg of protein), NS 그룹(6.39 unit/mg of protein)에서 그룹 간 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 폐 조직에서 SOD의 함량은 PM 그룹(4.56 unit/mg of protein)에서 감소하는 경향을 보였다. 반면 PC 그룹(7.51 unit/mg of protein), CF50 그룹(7.59 unit/mg of protein), CF100 그룹(9.08 unit/mg of protein)에서는 SOD 함량이 증가하는 것으로 확인되었다.

[0104] **4.2 초미세먼지 ($PM_{2.5}$)에 노출된 마우스 폐 조직 지질과산화 억제효과**

[0105] phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에서 폐 조직을 균질화하였다(Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA). 균질화된 폐 조직을 5,000 rpm 및 4℃에서 10분간 400×g 조건으로 원심분리한 후, 상등액을 95℃ 항온수조에서 1% phosphoric acid 및 0.67% TBA와 함께 1시간 반응시켰다. 반응물을 600×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0106] 폐 조직에서의 MDA 함량을 측정한 결과를 도 6에 나타내었다. 폐 조직에서 MDA 함량은 Sham 그룹(0.03 nmole/mg of protein), NC 그룹(0.30 nmole/mg of protein), NS 그룹(0.04 nmole/mg of protein)에서 그룹 간 유의적인 차이가 없었으며, PM 그룹(0.10 nmole/mg of protein)에서 MDA 함량은 유의적으로 증가하였다. 반면 PC 그룹(0.07 nmole/mg of protein), CF50 그룹(0.07 nmole/mg of protein), CF100 그룹(0.06 nmole/mg of protein)

에서는 MDA 함량이 효과적으로 감소하였다.

[0108] **4.3 환원형 글루타치온(Reduced glutathione; GSH) 함량 분석**

[0109] phosphate buffer(pH 6.0)에서 폐 조직을 균질화하였다(Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA). 균질화된 폐 조직을 10,000×g 조건에서 15분 동안 원심분리 후 상등액을 회수하였다. 상등액을 5% metaphosphoric acid와 반응시킨 후 2,000×g에서 원심분리하고, 상등액을 M tris-HCl(pH 7.8), 0.65 N NaOH 및 1 mg/mL의 o-phthaldialdehyde와 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 이 후, fluorescence microplate reader(Infinite 200, Tecan Co., Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 들뜸 파장 320 nm, 방출 파장 420 nm에서 형광 광도를 측정하였다.

[0110] 폐 조직에서의 reduced glutathione (GSH) 함량을 측정한 결과를 도 7에 나타내었다. 폐 조직에서 reduced GSH의 함량은 Sham 그룹(119.04%), NC 그룹(100%), NS 그룹(97.87%)으로 나타났으며 그룹 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 반면 폐 조직에서 reduced GSH의 함량은 PM 그룹(49.6%)은 NC 그룹(100%)보다 감소하였으며, PC 그룹(89.39%), CF50 그룹(82.24%), CF100 그룹(116.00%)에서는 PM 그룹에 비해 reduced GSH 함량이 개선된 것을 확인하였다.

[0112] **4.4 미토콘드리아 내 ROS 생성 함량 분석**

[0113] 폐 조직을 1 mM EGTA가 포함된 미토콘드리아 추출 용액(215 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES sodium salt, pH 7.2) 10배 부피를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 용액을 4℃ 및 1,300×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 추가로 4℃ 및 13,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 pellet을 0.1% digitonin을 포함하는 미토콘드리아 추출 buffer와 혼합하였다. 5분 후, 혼합물을 1 mM EGTA가 포함된 미토콘드리아 추출 buffer와 반응시키고 4℃ 및 13,000×g에서 15분간 원심분리하였다.

[0114] 분리된 미토콘드리아를 25 μM DCF-DA를 포함하는 KCl-based respiration buffer [125 mM potassium chloride, 2 mM potassium phosphate monobabic, 20 mM HEPES, 1 mM magnesium chloride, 500 μM EGTA, 2.5 mM malate and 5 mM pyruvate]와 20분간 반응시켰다. DCF 형광은 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co.)을 사용하여 485 nm에서 들뜸 파장을, 530 nm에서 방출 파장을 측정하였다.

[0115] 폐 조직의 미토콘드리아 유래 ROS 함량을 도 8에 나타내었다. 폐 직에서 미토콘드리아 ROS 함량은 Sham 그룹(104.30%), NC 그룹(100%), NS 그룹(87.06%)에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면 PM 그룹(179.70%)에서 유의적으로 증가하였으며, PC 그룹(66.68%), CF50 그룹(87.19%), CF100 그룹(90.52%)에서 ROS 함량이 유의적으로 감소하였다.

[0117] **4.5 미토콘드리아 내 mitochondrial membrane potential(MMP) 분석**

[0118] 5 mM pyruvate 및 5 mM malate를 포함하는 미토콘드리아 추출 버퍼와, 분리된 미토콘드리아를 96 well black plate에서 1 μM JC-1과 반응시켰다. 혼합물을 20분간 암실 조건에서 배양한 후 fluorescence microplate reader(Infinite 200, Tecan Co.)를 사용하여 530 nm에서 들뜸 파장을, 590 nm에서 방출 파장을 측정하였다.

[0119] 폐 조직의 미토콘드리아 막 전위를 도 9에 나타내었다. Sham 그룹(103.68%), NC 그룹(100%), NS 그룹(100.88%)에서 그룹 간 유의적인 차이가 나지 않았으며, PM 그룹(83.75%)에서 유의적으로 감소하였다. 반면 PC 그룹(106.92%), CF50 그룹(85.37%), CF100 그룹(86.26%)에서는 미토콘드리아 막 전위가 증가하는 것으로 확인되었다.

[0121] **<실시예 5> 청각 추출물의 생리활성 물질 분석**

[0122] 수세하여 염을 제거한 후 동결건조시킨 청각에 메탄올을 첨가하여 균질화한 후 원심분리 후 상등액을 취하여 분석에 사용하였다. 상등액은 BEH C_{18} column (100×2.1 mm, 1.7 μL; Waters, Milford, MA, USA)가 장착되어 있는 ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight / mass spectrometry(UPLC-Q-TOF/MS)를 이용하여 분석을 진행하였다. 컬럼 온도는 40℃, 용매는 0.1% formic acid를 함유한 acetonitrile과

증류수를 사용하였다. 컬럼을 통해 분리된 생리활성 물질을 Q-TOF/MS로 분석하였다. Q-TOF의 분석조건은 positive 조건을 사용하였으며, Capillary 전압은 2.5 kV, sampling cone 전압은 40 V. source 온도는 100℃, desolvation 온도는 400℃, desolvation 유량은 900 L/h 로 설정하였다.

[0123] UPLC-Q-TOF/MS 분석 결과, xanthin, 18:1 Lysophosphatidylcholine (LPC), Oleamide, 7,8 7',8'-tetradehydroastaxanthin으로 동정되었다. 분석 결과를 도 15에 나타내었다.

표 2

[0124]

No	RT (min)	m/z $[M+H]^+$	Q-TOF-MS Fragments	Proposed Compounds
1	0.56	153.0403	110.03, 136.01, 82.03, 66.01	Xanthin
2	7.05	522.3773	184.0, 86.1, 56.8	18:1 Lysophosphatidylcholine
3	8.43	282.2790	265.2, 274.2, 149.2	Oleamide
4	8.54	593.2773	90.91, 164.82, 127.89, 76.90	7,8 7',8'-tetradehydroastaxanthin

[0126] **<실시예 6> 청각 추출물의 다당체, 황산염, 수은, 중금속 함량 분석**

[0127] **6.1 다당체 및 황산염 함량 분석**

[0128] 동결건조된 청각 물 추출물을 5%의 페놀과 95% 황산과 혼합한 후 상온에서 20분간 반응시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하여 총 다당체 함량을 분석하였으며, 표준 곡선은 glucose를 이용하여 작성되었다.

[0129] 한편, 동결건조된 청각 물 추출물에 1 M HCl을 첨가하여 105℃에서 5시간 동안 가수분해 시켰다. 이후 4% TCA 용액, 황산바륨-젤라틴 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 반응시켜 360 nm에서 흡광도를 측정하여 총 황산염 함량을 분석하였으며. 표준 곡선은 Fe_2SO_4를 이용하여 작성되었다.

[0130] 다당체와 황산염 함량 분석 결과를 표 3에 기재하였다.

표 3

[0131]

Total polysaccharide (mg/g)	Sulfate (mg/g)
311.84 ± 12.01	310.57 ± 28.15

[0133] **6.2 중금속 함량 분석**

[0134] 수세하여 염을 제거한 후 동결건조시킨 청각을 수은분석기(DMA-80, Milestone)를 이용하여 산소와 함께 열분해하였다. 열분해를 통해 증기화 된 수은으로 아말감을 형성시킨 후 254 nm에서 흡광도를 측정하여 수은함량을 측정하였다.

[0135] 수세하여 염을 제거한 후 동결건조시킨 청각을 질산을 이용하여 가수분해시킨 후 주사기 필터(Sterile Acrodisc Syringe Filters with Supor Mebrane Prod. No. 4614, PALL Life Sciences)로 여과하여 정용하였다. 산분해된 시료를 ICP-MS (NexION 350D, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 중금속 분석하였으며, AsO분석은 Dynamic Reaction Cell (DRC) mode, Cd, Pb분석은 standard mode를 사용하였다.

[0136] 표 4에 중금속 함량 분석 결과를 기재하였다.

표 4

[0137]

Cd	Pb	Hg
N.D	0.04 mg/kg	0.09 μg/kg

[0139] 동결건조한 청각에서 Cd는 검출되지 않았으며, Pb는 0.04 mg/kg, Hg는 0.09 μg/kg으로 분석되었다(w/w). 이는

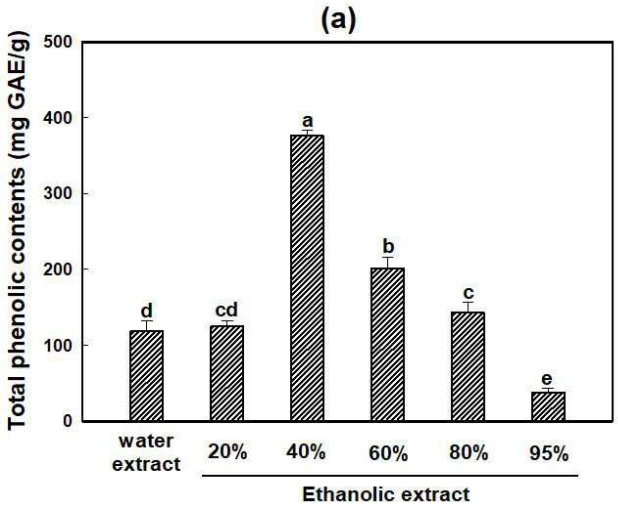
식품 의약품 안전처가 규정하는 중금속 허용 기준치인 Cd: 0.3 mg/kg 이하[김(조미김 포함) 또는 미역(미역귀 포함)], 그리고 Pb: 0.5 mg/kg 이하 [미역(미역귀 포함)]보다 낮은 수치로 확인되었다.

[0141] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

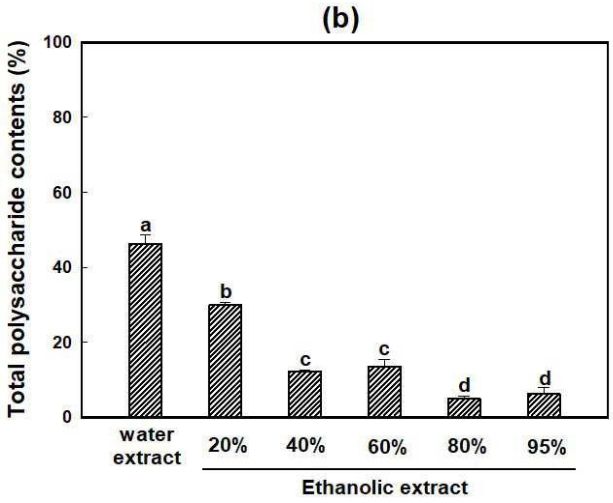
[0142] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

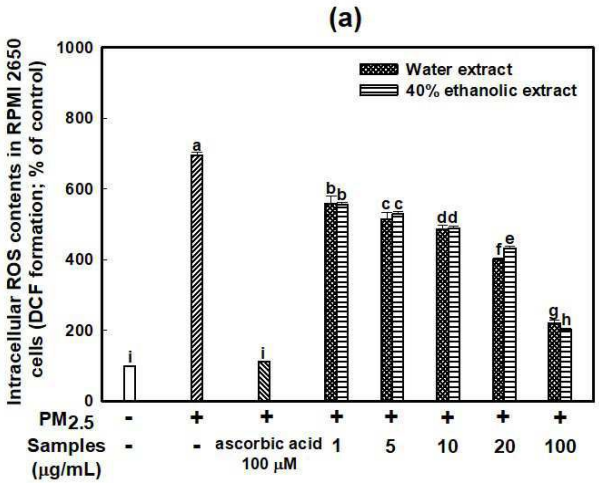
도면1a



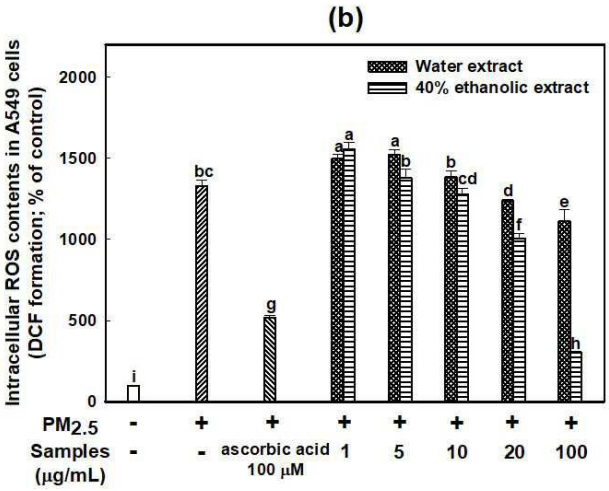
도면1b



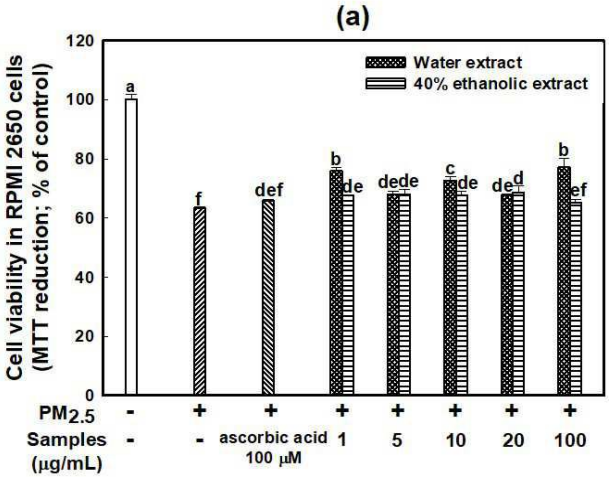
도면2a



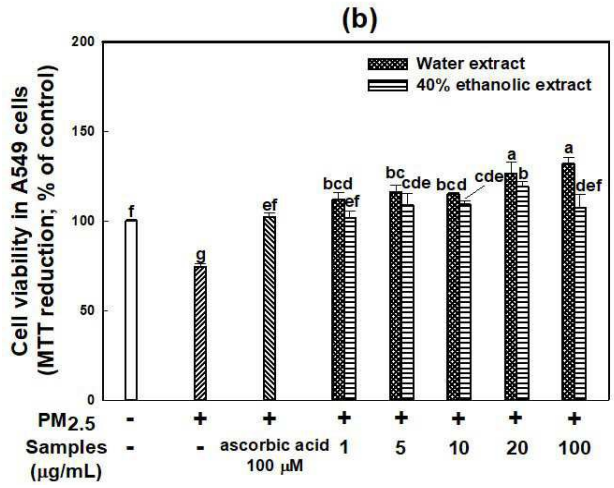
도면2b



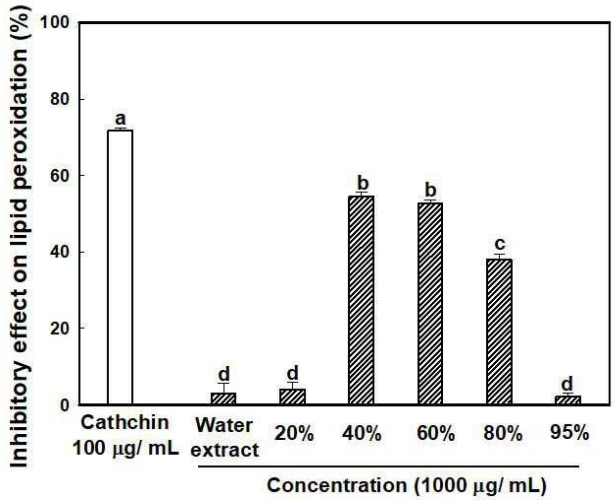
도면3a



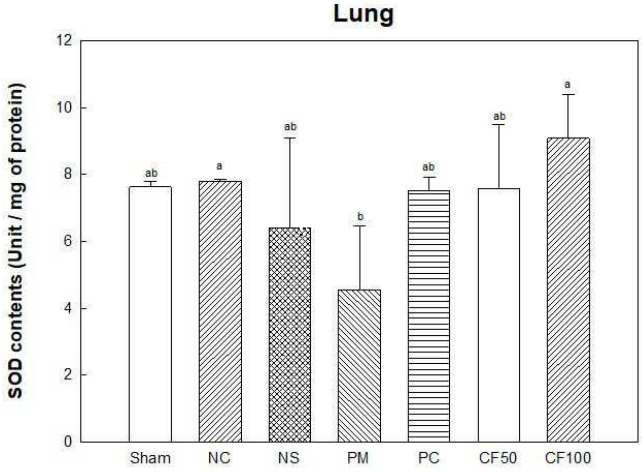
도면3b


(b)
Water extract
40% ethanolic extract
Cell viability in A549 cells (MTT reduction; % of control)
PM2.5
Samples (μg/mL)
ascorbic acid 100 μM
1
5
10
20
100

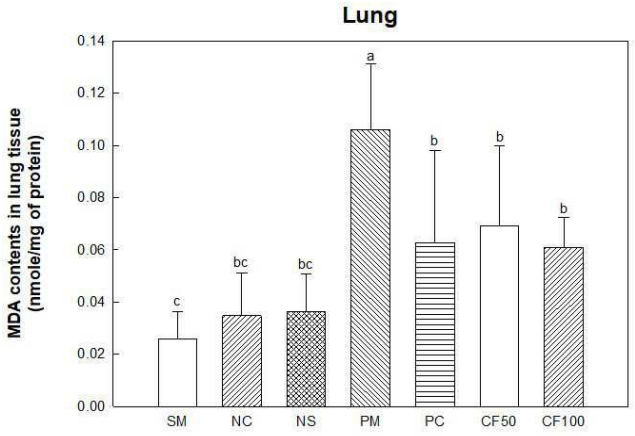
도면4


Inhibitory effect on lipid peroxidation (%)
Cathchin 100 μg/ mL
Water extract
20%
40%
60%
80%
95%
Concentration (1000 μg/ mL)

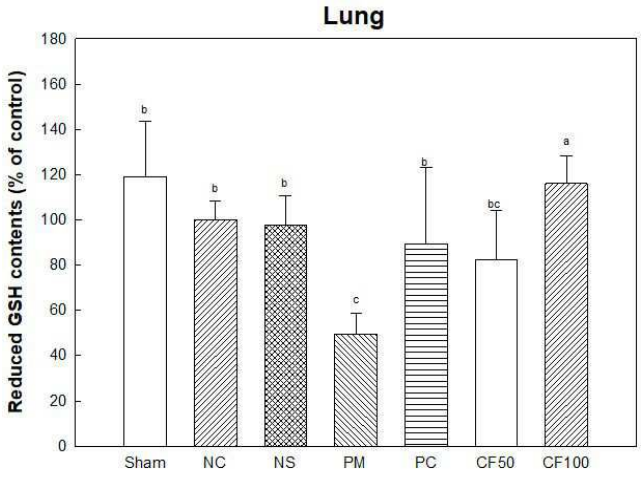
도면5


Lung
SOD contents (Unit / mg of protein)
Sham
NC
NS
PM
PC
CF50
CF100

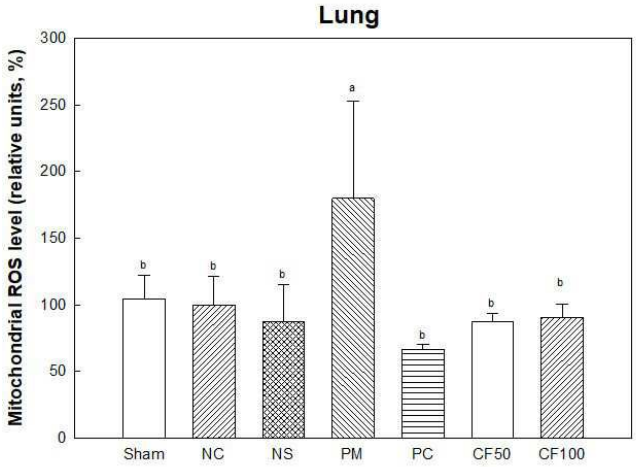
도면6


Lung
MDA contents in lung tissue (nmole/mg of protein)
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
a
b
b
b
bc
bc
c
SM
NC
NS
PM
PC
CF50
CF100

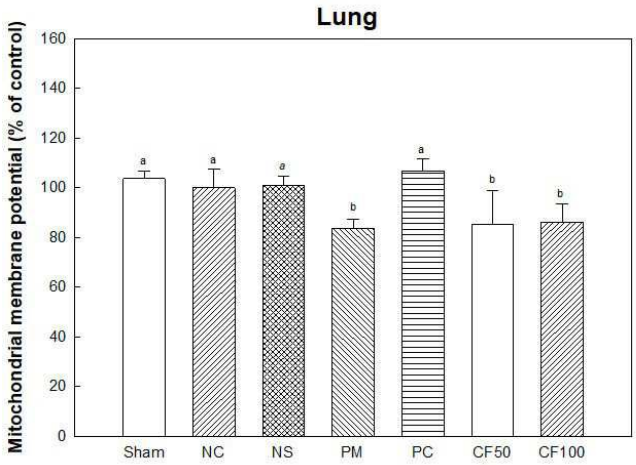
도면7


Lung
Reduced GSH contents (% of control)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
b
b
b
c
b
bc
a
Sham
NC
NS
PM
PC
CF50
CF100

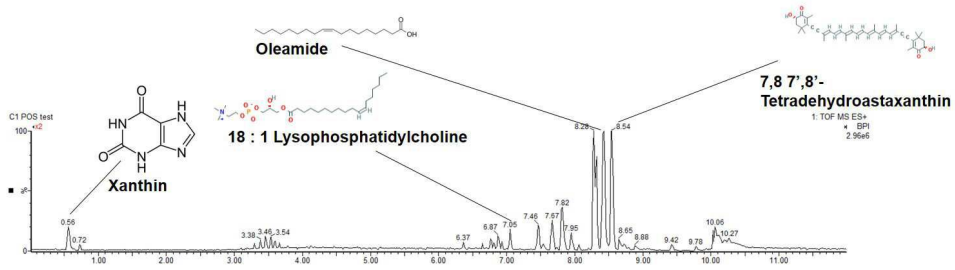
도면8


Lung
Mitochondrial ROS level (relative units, %)
300
250
200
150
100
50
0
b
b
b
a
b
b
b
Sham
NC
NS
PM
PC
CF50
CF100

도면9


Lung
Mitochondrial membrane potential (% of control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
b
a
b
b
Sham
NC
NS
PM
PC
CF50
CF100

도면10


Oleamide
7,8 7',8'-
Tetradehydroastaxanthin
18 : 1 Lysophosphatidylcholine
Xanthin