(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0028153
(43) 공개일자 2012년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/56 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0090197
(22) 출원일자 2010년09월14일
심사청구일자 2010년09월14일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트 125동 1402호 (사직동)
류보미
부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성엠파이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

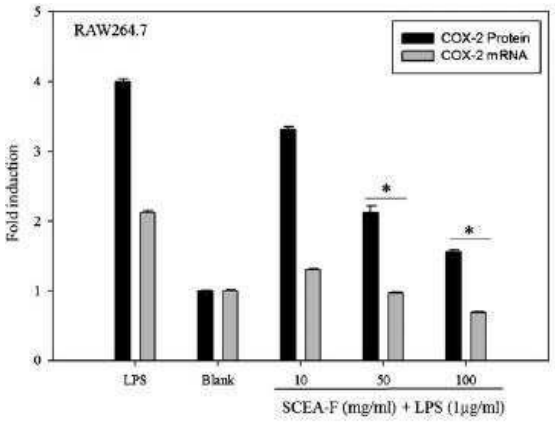
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물 및 이를 포함하는 항-염증 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 해삼을 메탄올로 추출한 후 유기용매로 분획추출하여 제조한 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물에 관한 것으로, 특히 아세트산에틸 분획 추출물이 LPS-유도 iNOS 및 COX-2 저해하여 우수한 항-염증 활성을 나타낸다.

대 표 도 - 도4c



(72) 발명자

에스.더블유.에이. 히마야

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

특허청구의 범위

청구항 1

해삼을 추출 용매로서 메탄올을 사용하여 추출하는 단계;

용매를 여과하여 제거하고 진공 증발하여 농축된 해삼 메탄올 추출물을 수득하는 단계;

농축된 메탄올 추출물을 동결건조한 후 증류수에 용해시키는 단계; 및

헥산, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올 중에서 선택한 유기용매를 사용하여 분획하는 단계

를 포함하여 제조되는 해삼 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서, 유기용매는 아세트산에틸임을 특징으로 하는 해삼 추출물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 해삼 추출물을 포함하는 항-염증 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물 및 이를 포함하는 항-염증 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 해삼을 메탄올로 추출한 후 유기용매로 분획추출하여 제조한 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포가 관여하는 손상 또는 감염에 대해 반응하는 조직에서 고도로 조절되는 작용이다. 염증 반응은 염증 부위에서 활성화되고 추가 매개체를 방출하는 매개체의 연속 방출 및 순환계 백혈구 보충으로 이루어진다. 대부분의 경우에서, 염증 반응은 세포내 음성 조절 인자의 축적뿐만 아니라 내생적 항-염증 매개체(항-염증 사이토카인)의 방출에 의해 해결된다. 그러므로, 염증 세포는 적절한 시간 내에 제거된다. 그러나, 백혈구의 지속적인 축적 및 활성화는 음성 조절 메카니즘의 기능부전을 야기하는 만성 염증의 원인이다. 그러므로, 이러한 자가-한정, 자가-용해 염증 병변에 관련된 분자 메카니즘을 확인하는 것이 중요하다. 이러한 분자 메카니즘의 확인은 분자 신호가 결여되거나 폐지되도록 하여 급성 염증에서 만성 염증으로 넘어가는 것을 조절하기 위한 치료학적 표적으로서 사용하는데 유용할 것이다.

[0003] 대식세포는 선천적 면역계에서 중요한 면역 세포이다. 대식세포의 활성화는 병원균에 감염되었을 때 면역 반응에서 중요한 역할을 한다. 대식세포는 직접적으로는 식균작용을 통해, 그리고 간접적으로는 생활성 지질(프로스타노이드 및 그외 아라키돈산-유래 대사산물), 활성 산소기 및 질소기, 메탈로프로테나아제, 사이클로옥시게나아제-2 (COX-2), 및 염증성 사이토킨, 종양 괴사 인자-α, 인터류킨-1β 및 인터류킨-1 (TNF-α, IL-1β 및 IL-6)과 같은 다양한 염증 매개체의 분비를 통해 병원균을 죽일 수 있다. 활성화된 대식세포의 염증성 매개체의 과생산은 류마티스 관절염, 죽상동맥경화증, 만성 간염, 폐 섬유증 및 염증성 뇌질환을 포함하는 많은 병리생리학적 염증 질환에 관련되어 있다. 지질다당류(LPS)-유도 대식세포 활성화는 사이클로옥시게나아제(COX-2)에 의해 유도성 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS) 및 프로스타글란딘 E_2(PGE_2)에 의한 염증성 사이토카인, 산화질소(NO)의 생산을 증가시키며 이는 많은 포유동물의 선천적 반응에 관여하는 주요 세포독성 및 세포사멸 메카니즘이다. 그러므로, LPS 자극 대식세포는 염증 및 이들의 작용 메카니즘을 갖는 잠재적 항-염증 매개체를 연구하기 위한 모델로서 효과적으로 사용될 수 있다.

[0004] 해삼은 부드러운 몸체를 갖는 벌레 모양의 극피동물로서 Holothuroidae 강에 속한다. 해삼은 필리핀, 말레이시아, 일본, 한국 및 중국과 같은 아시아 국가에서 중요한 식재료로서 취급되고 있으며, 또한 해삼은 동아시아에서 천식, 고혈압, 류머티즘, 빈혈 및ㄴ 비강울혈의 치료를 위해 전통 약제로서 사용해왔다. 게다가, 해삼의 고함량의 에이코펜타엔산(eicosapentaenoic acid; EPA)으로 인해 조직 복구 및 상처 치료를 유도하는 특징을 나타

낸다. 해삼으로부터 분리된 용매 추출물 및 화합물은 항균, 항암, 용혈, 세포증식억제, 항산화 및 면역-조절 효과와 같은 다양한 생물학적 활성을 나타낸다. 900여 종 이상의 해삼 중에서, Stichopus japonicus는 극피동물문(phylum Echinodermata)에 속하며 중국 및 일본에서는 유명한 전통 진미로 여겨지고 있으며 또한 중국 한의학에서 약제로서 사용되기도 한다. 그러나, 해삼(S. japonicus)의 항-염증 활성에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로, 해삼을 메탄올로 추출한 후 유기용매로 분획추출하여 제조한 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물 및 이를 포함하는 항-염증 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 LPS로 자극된 대식세포에서 NO, PGE2 및 항-염증 사이토카인(TNF-α 및 IL-1β)을 포함하는 염증 매개체의 생산에 대한 해삼 유래 용매 분획 추출물의 생물학적 효과를 규명하고, 마이토겐-활성 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase; MAPK) 신호 경로를 통해 분자 메카니즘을 확인함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0007] 본 발명은 지금까지 연구되지 않았던 해삼의 항-염증 활성을 규명함으로써, 우수한 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 RAW264.7 세포의 생존도에서 해삼 용매 분획 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다. 무혈청 배지에서 배양한 세포를 각각 다른 농도(10, 50 및 100㎍/㎖)의 네 분획(헥산, 클로로포름, 에틸, 아세트산에틸 및 부탄올) 추출물로 24시간 동안 처리한 후 세포 생존도를 MTT 검정으로 평가하였다. 3회의 독립적 실험 결과를 평균내어 비처리 세포 대조군의 생존도와 비교한 세포 생존도 비율(%)로 나타냈다.

도 2는 RAW254.7 세포의 LPS-유도 NO 생산에 대한 해삼 용매 분획 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다. 페놀 레드 없이 무혈청 배지에서 배양한 RAW254.7 세포를 다른 농도(10, 50 및 100㎍/㎖)의 네 분획(헥산, 클로로포름, 에틸, 아세트산에틸 및 부탄올) 추출물로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(1 ㎍/㎖)로 자극시켰다. 48시간 후에 조건 배지를 수집하여 NO 농도를 Griess 반응을 사용하여 측정하였다. 배지의 아질산(NO의 안정한 산화 산물) 수준을 표준 아질산 곡선과 비교하여 계산하였다.

도 3a는 RAW254.7 세포에서 LPS-유도 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 저해하는 SCEA-F(ethyl acetate solvent fraction of S. japonicus)의 효과를 도시한 것이다. RAW254.7 세포를 SCEA-F(10, 50 및 100㎍/㎖)로 1시간 동안 전처리한 후 LPS(1 ㎍/㎖)로 자극시키고 세포 용균물을 추출하여 iNOS의 단백질 및 유전자 수준을 각각 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR로 분석하였다. β-액틴 및 GAPDH 발현을 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR에서 단백질에 대한 내부 대조로서 사용하였다.

도 3b는 RAW254.7 세포에서 LPS-유도 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 저해하는 SCEA-F(ethyl acetate solvent fraction of S. japonicus)의 효과를 도시한 것이다. iNOS의 단백질 및 유전자 발현 수준을 비자극 블랭크 군과 비교하여 정량하였다. 수치는 평균±S.D로 나타냈으며, *은 LPS 단독 처리 대조군과 비교하여 $p<0.005$, #은 $p<0.01$인 것을 나타낸다.

도 4a는 RAW254.7 세포에서 LPS-유도 PGE_2 생산을 저해하는 SCEA-F의 효과를 나타낸 것이다. 다른 농도의 SCEA-F를 전처리하고 LPS로 자극한 RAW264.7 세포의 PGE_2 농도를 요소 면역검정을 사용하여 측정하였다. 데이터를 3회의 독립적 실험의 평균±S.E.M로 나타냈으며, *은 대조에 비교했을 때 $p<0.005$인 것을 나타낸다.

도 4b는 RAW254.7 세포에서 COX-2 단백질 및 mRNA 발현을 저해하는 SCEA-F의 효과를 나타낸 것이다. 다른 농도의 SCEA-F를 전처리하고 LPS로 자극한 RAW264.7 세포의 COX-2 단백질 및 mRNA 발현 수준을 각각 웨스턴 블롯팅 및 RT-PCR로 분석하였다. β-액틴 및 GAPDH 발현을 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR에서 내부 대조로서 사용하였다.

도 4c는 COX-2의 단백질 및 유전자 발현 수준을 비자극 블랭크 군과 비교하여 정량하였다. 수치는 평균±S.D로 나타냈으며, *은 LPS 단독 처리 대조군과 비교하여 p<0.005, #은 p<0.01인 것을 나타낸다.

도 5는 RAW254.7 세포에서 LPS-유도 염증성 사이토카인 IL-1β(a) 및 TNF-α(b)를 저해하는 SCEA-F의 효과를 나타낸 것이다. 데이터를 3회의 독립적 실험의 평균±S.E.M로 나타냈으며, *은 대조에 비교했을 때 p<0.005인 것을 #은 p<0.01인 것을 나타낸다.

도 6a는 SCEA-F를 전처리하고 LPS로 자극한 RAW264.7 세포의 IL-1β 및 TNF-α의 mRNA 수준을 RT-PCR로 측정한 결과를 나타낸 것이다. GAPDH 발현을 RT-PCR에서 내부 대조로서 사용하였다.

도 6b는 도 6a의 IL-1β 및 TNF-α의 mRNA 발현수준을 정량화한 것이다. 수치는 평균±S.D로 나타냈으며, *은 LPS 단독 처리 대조군과 비교하여 p<0.005, #은 p<0.01인 것을 나타낸다.

도 7a는 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 MAP 키나아제 활성을 억제하는 SCEA-F 효과를 나타낸 것이다. MAPK 분자 및 이의 인산화 형태를 분석하기 위해 세 MAPK 분자 ERK, JNK 및 p38 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 측정하였다.

도 7b는 RAW264.7 세포에서 LPS-유도 MAP 키나아제 활성을 억제하는 SCEA-F 효과를 나타낸 것이다. MAP 키나아제 p38, ERK 및 JNK의 수준을 덴시토미터(densitometer)를 사용하여 정량한 결과를 나타낸 것이다. 수치는 평균±S.D로 나타냈으며, *은 LPS 단독 처리 대조군과 비교하여 p<0.005, #은 p<0.01인 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 대식세포는 면역에 관련된 주요 세포로 면역의 주요 기능, 특히 다양한 사이토카인 및 성장인자의 생성을 통한 면역-조절에 관여한다. 대식세포는 그람-음성 박테리아의 지질다당류(LPS), 펩티도글리칸, 리포테이코산(lipoteichoic acid) 및 그람-양성 박테리아의 리포아라비노마난 (lipoarabinomannan)을 포함하는 여러 미생물 기원 분자에 의해 활성화될 수 있다. 혈장 맴브레인 상의 TLRs가 상기 미생물 기원 분자와 같은 면역 시발자들을 인식하고 작용하여 TNF-α 및 IL-1β와 같은 염증성 사이토카인, COX-2와 같은 유도성 효소 및 유도성 산화질소 합성효소 iNOS, NO 및 PGE_2와 같은 면역 인자를 포함하는 면역 매개체를 활성화시키는 다양한 분자 경로의 시그널링을 시작한다. 현재 염증 치료에서의 약물 수송은 대부분 양성 신호 경로를 억제하여 염증성 매개체를 저해하는 것에 초점을 맞추고 있다. 본 발명은 배양된 RAW264.7 세포에서 iNOS/NO, COX-2/PGE2 및 염증성 사이토카인을 포함하는 주요 염증 매개체의 LPS-유도 발현을 저해하는 해삼의 유기용매 분획 추출물, 특히 아세트산에틸 용매 분획 추출물의 잠재성을 규명하기 위한 것이다. 염증 반응 동안에 몇몇 염증성 사이토카인 및 내독소가 iNOS의 발현을 유도하고 NO의 생성을 야기하므로, NO 생산을 저해하는 능력은 항-염증 후보제를 탐색하는데 유용하다. 해삼 유기용매 분획 추출물 중 아세트산에틸 분획 추출물이 LPS-유도된 쥐과의 대식세포에서의 상당히 높은 NO 생산 저해능 및 적은 세포독성을 보이므로 효과적인 항-염증 활성을 가질 것을 알 수 있다. 아세트산에틸 분획의 높은 페놀 함량은 이를 뒷받침한다. 해삼의 폴리페놀 조성물에 관한 문헌은 매우 적으나, 최근 신선하고 가공된 해삼의 다른 부분에서 폴리페놀의 정량 및 특성화에 대한 몇몇 연구가 보고되고 있다 (Mamelona, J., Pelletier, E˘ ı., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S., Kermasha, S., 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber Cucumaria frondosa. Food Chem. 104, 1040-1047 ; Zhong, Y., Khan, A., Shahidi, F., 2007. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (Cucumaria frondosa). J. Agric. Food Chem. 55, 1188-1192). 페놀 화합물은 환원제, 산소 공여체, 단일 단소 켄처(single oxygen quencher) 및 금속 킬레이트제로서의 역할을 하도록 하는 산화환원 특성을 보유하고 있다. 이러한 페놀은 염증 반응 동안에 생성된 NO 라디칼을 소거할 수 있다. 또한 Surh 등의 문헌 (Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat. Res. 480-481, 243-268)에서 동일한 페놀 화합물의 항-염증 작용에 대해 검토하고 이들의 전사인자 NF-κB를 발현억제하여 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 발현을 저해하는 능력에 대해 나타냈다. 그러므로, 아세트산에틸 분획 추출물에 페놀 화합물이 많이 함유되어 있다는 것은 항-염증 작용을 매개할 수 있음을 제시하는 것이다.

[0010] NO 및 PGE_2는 염증의 중요한 매개체로서 확인되었으며 각각 iNOS 및 COX-2 효소를 생산한다. 이전 연구들에서 최대 iNOS mRNA 발현이 대략 18시간 기간 동안 일어남이 보고되었으므로(Chen, C.W., Lee, S.T., Wu, W.T.,

Fu, W.M., Ho, F.M., Lin, W.W., 2003. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. Br. J. Pharmacol. 1406, 1077-1087 ; Rajapakse, N., Kim, M.M., Mendis, E., Kim, S.K., 2008. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in lipopolyssacharide stimulated raw cells by carboxybutyrylated glucosamine takes place viadownregulation of mitogenactivated protein kinase mediated nuclear factor-κb signaling. Immunology 123, 348-357), RAW264.7 세포를 LPS로 18시간 동안 자극하여 iNOS 및 COX-2 전사 및 번역에서 아세트산에틸 분획 추출물의 효과를 분석하였다(실시예 6 및 7 참조). 예상된 바와 같이, iNOS 및 COX-2의 전사 및 번역 수준 둘 다 SCEA-F 처리에 의해 투여량 의존 저해되었다.

[0011] 해삼의 아세트산에틸 분획 추출물의 잠재적 항-염증 활성에 대해 좀더 조사하기 위해, 염증성 사이토카인 TNF-α 및 IL-1β의 생산 및 전사에서의 아세트산에틸 분획 추출물의 효과를 분석하였다(실시예 8). 사이토카인의 과량 생산이 대식세포에서 LPS 처리와 같은 염증 자극제에 의해 유도되었으며 이는 염증을 야기할 면역 반응을 증가시므로, 염증성 사이토카인을 저해하는 것이 항-염증 치료에서 주요 목표이다. 이는 해삼의 아세트산에틸 분획 추출물이 항-염증 활성을 가진다는 사실을 뒷받침해줄 발견이다.

[0012] 염증의 주요 매개체인 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 발현을 촉진하여 염증 반응에 관여하는 다양한 세포내 경로가 있다. MAPKs는 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 신호전달 분자 그룹으로서 LPS 처리는 MAPK 과의 주요한 세 가지 분자인 p38, ERK 및 JNK를 인산화시켜 MAPK 신호전달 경로를 통해 iNOS 및 COX-2의 발현을 조절한다. 그러므로 이러한 분자들의 인산화를 저해하여 치료학적 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되므로 이의 인산화 저해에 대한 해삼 분획 추출물의 효과를 분석하였다(실시예 9).

[0013] 본 발명은 해삼을 메탄올로 추출한 후 헥산, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올과 같은 유기용매로 분획추출하여 제조한 항-염증 활성을 갖는 해삼 추출물 및 이를 포함하는 항-염증 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 해삼 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0015] 또한 본 발명의 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐, 액제, 주사제 등의 약제학적 제제 형태일 수 있다.

[0016] 마우스 대식세포 RAW264.7를 ATCC(American Type Culture Collection) (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. 세포 배양 배지 [Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)], 페니실린/스트렙토마이신, 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 세포 배양시 필요한 그외 물질을 Gibco BRL, Life Technologies (Grand Island, NY)로부터 구입하였다. MTT 시약[(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)], Griess 시약 및 Escherichia coli 026:B6의 LPS를 Sigma Chemical Co에서 구입하였다. 웨스턴 블롯 분석에 사용한 일차 및 이차 항체를 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) 및 Amersham Pharmacia Biosciences (Piscataway, NJ)로부터 구입하였다. 그외 화학물질 및 시약은 시판되는 분석용 품위 제품을 사용하였다.

[0017] 모든 통계 분석에서 일원 분산 분석(one-way analysis of variance)을 사용하였으며 데이터는 평균±S.D로 나타냈다. 평균값은 신선하게 제조된 시약을 사용하여 다른 날 실시된 적어도 3회의 독립적인 실험을 기초로 하여 계산하였다.

[0018] **실시예 1. 해삼 추출물의 제조 및 분획화**

[0019] 신선한 해삼 (Stichopus japonicus)을 대한민국 부산의 자갈치 시장에서 구입하여 수돗물로 세척하고 작게 절단하였다. 분석용 품위의 메탄올을 추출용 용매로 사용하여 실온에서 3일간 추출하였다. 추출을 3회 반복하였다. 추출 후에 용매를 여과하여 제거하고 진공 증발하여 농축된 해삼 메탄올 추출물을 수득하였다. 농축된 메탄올 추출물을 동결건조한 후 추가 분획화를 위해 증류수에 다시 용해시켰다. 4개의 분획(헥산, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올)을 용매 구획 크로마토그래피 기술을 사용하여 수득하였다. 이 단계를 3회 반복하였다. 각 분획의 수율을 계산하고 모든 분획을 추가 분석 때까지 -20 ℃에서 저장하였다.

[0020] **실시예 2. 세포 배양 및 세포 생존도 분석**

[0021] 마우스 복막 대식세포주인 RAW264.7 세포를 5% 열-불활성 우태아혈청(FBS), 100 ㎍/ml 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린을 보충한 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM)내에서 95% 공기, 5% CO_2 대기에서 유지시켰다. RAW264.7 세포를 주 2회 계대배양(passage)을 통해 유지시키고 세포를 70-80% 컨플루언시에서 실험에 사용하였다. 세포 생존도를 Hansen 등의 문헌 (Hansen, M.B., Nielson, S.E., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J. Immunol. Methods. 119, 203-210)에 기재된 바와 같이 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브로마이드 (MTT) 환원 검정으로 측정하였다. 포르마잔으로의 MTT의 미토콘드리아 환원을 통해 MTT를 세포 생존도의 척도로서 사용하였다(Rajapakse et al., 2008). 간단하게, 세포를 웰 당 $1x10^4$ 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 밤새 전배양한 후 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline; PBS)로 세척하였다. 세포를 다양한 농도(10, 50 및 100㎍/ml)의 4개 분획(헥산, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올)로 24시간 동안 처리하고 100 ㎕의 MTT를 첨가하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 상청액을 제거한 후에 결과적으로 생성된 암청색 결정을 DMSO에 용해시켰다. 흡광도 수치를 ELISA 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH)를 사용하여 540nm에서 측정하였다. 상대적 세포 생존도를 비처리 대조군의 흡광도와 비교하여 계산하였다.

[0022] 헥산, 클로로포름, 아세트산에틸 및 부탄올 분획의 세포-적합성(cyto-compatibility)을 RAW264.7 세포에서 MTT 세포 생존도 검정을 사용하여 세 농도 10, 50 및 100㎍/ml)에서 실험하여 평가하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 4개의 모든 분획이 모든 실험 농도에서 24시간 처리 후에 RAW264.7 세포에서 유의성있는($p < 0.05$) 세포 독성을 나타내지 않았다. 10 내지 100 ㎍/㎖ 범위의 비-독성 농도를 추가 분석을 위해 모든 분획으로부터 선택하였다. 그러나 클로로포름 및 부탄올 분획은 낮은 농도에서 세포 증식에서 상당한 증가를 보였다.

[0023] **실시예 3. 페놀 함량의 분석**

[0024] 페놀의 총 함량을 공지된 Folin-Ciocalteau 방법(Kaur, G., Alam, M.S., Jabbar, Z., Javed, K., Athar, M., 2006. Evaluation of antioxidant activity of Cassia siamea flowers. J. Ethnopharmacol. 108, 340-348)을 변형하여 갈산(gallic acid) 등가물과 같이 평가하였다. 10 mg/ml 농도의 네 분획 모두 (0.1 ml)를 0.5 ml Folin-Ciocalteau 시약과 혼합한 후 0.6 ml의 Na_2CO_3 (200 g/l) 용액을 첨가하여 이 혼합물을 빛으로부터 보호하면서 30℃에서 90분 동안 배양하였다. 배양 후에 각 튜브로부터 0.3 ml씩 96-웰 플레이트로 옮기고 ELISA 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria GmbH)에서 750nm에서의 흡광도를 측정하였다. 결과를 갈산 표준 곡선(10-0.001 mg/ml)와 비교하고 갈산 등가물로서 나타냈다 (mg 갈산/g 첨가 추출물). 상기 분석을 3회 반복 실시하였다.

[0025] 추출에 사용된 용매의 효율은 중요한 인자로서, 이는 각 용매에 의해 추출된 이차 대사산물이 이들의 극성의 차이로 인해 달라져 생물학적 활성에서의 유효성 또한 달라지기 때문이다. 그러므로 용매 추출된 네 분획들을 상기와 같이 이들의 총 페놀 함량을 실험하여 해당 데이터를 이들의 추출 수율과 함께 나타냈다. 헥산에 의한 추출 수율(0.062%)이 가장 높으며 그 다음이 부탄올 (0.039%), 클로로포름 (0.039%) 및 아세트산에틸 (0.0054%) 순이었다(표 1 참조). 추출 수율이 제일 낮았지만, 아세트산에틸 분획(SCEA-F; sea cucumber ethyl acetate fraction)이 다른 분획에 비해 가장 높은 폴리페놀 함량 (1 g의 건조 SCEA-F에서 20.38mg의 총 페놀 함량)을 포함하고 있다.

표 1

[0026]

	수율(%)	총 페놀 함량(mg/g)[1]
헥산 분획	0.062	9.00524±0.695
클로로포름 분획	0.039	3.53112±0.091
아세트산에틸 분획	0.0054	20.3781±0.687
부탄올 분획	0.039	11.0937±0.578

[0027] [1] 건조 분획 1g 내 총 페놀 함량 mg. 총 페놀 함량은 3회의 독립 실험을 평균내어 계산하였다.

[0028] **실시예 4. RT(Reverse transcription)-PCR 분석**

[0029] iNOS, COX-2 및 사이토카인(TNF-α 및 IL-1β)의 mRNA 발현을 검출하기 위해 RT-PCR을 실시하였다. LPS (1㎍/ml) 처리한 후 RAW264.7 세포로부터 총 RNA를 추출하고 다른 농도의 SCEA-F(10, 50 및 100㎍/ml)를 18시간 동안 처리하였다. 세포를 Trizol?로 용균시키고 클로로포름을 첨가한 후 at 25 ℃에서 15분간 12,000rpm에서 원심분리시켰다. 상청액을 분리하고 여기에 이소프로판올을 1:1 비율로 첨가하였다. 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, RNA 펠렛을 수득하였다. 에탄올로 세척한 후, 추출된 RNA를 디에틸 피로카르보네이트-처리 RNase-유리수에 용해시키고 GENios? 마이크로플레이트 리더기 (Tecan Austria GmbH)를 사용하여 260nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다. 결과적으로 생성된 RNA (1㎍)를 1 x RT(reverse transcriptase) 완충용액, 1mM dNTPs, 500 ng의 올리고 (dT) 15 프라이머, 140U의 MMLV(murine Moloney leukaemia virus) 역전사효소 및 40U의 RNase 저해제를 포함하는 마스터믹스에서 42℃에서 45분간 cDNA로 역전사시켰다. PCR(Polymerase chain reaction)을 자동 Whatman thermocycler (Biometra, Kent, UK)에서 실시하여 iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β 및 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA를 증폭시켰다. 각 전사물을 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)를 제조업자의 지시에 따라(Promega, Madison, WI, USA)사용하여 확인하였다. GAPDH 발현은 내부의 하우스키핑 유전자 조절로서 포함된다. 원하는 cDNA를 증폭시키는데 사용되는 프라이머 서열은 다음과 같다: iNOS 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' 및 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3' ; COX-2 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-GGGGTACCTTCCAGCTGTCAAAATCTC-3' 및 5'-GAAGATCTCGCCAGGTACTCACCTG TATG-3', 및 G3PDH 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' 및 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'. 증폭 사이클 조건은 95 ℃에서 30초, 55 ℃에서 30초 및 72 ℃에서 1분의 35 사이클이다. PCR 후에 산물을 100V 하에서 1x TAE 완충용액에서의 1.5% 아가로스 겔 상에서 30분 동안 전기영동시키고 AlphaEase? 겔 이미지-분석 소프트웨어(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 사용하여 EtBr(ethidium bromide) 염색으로 시각화시켰다.

[0030] **실시예 5. 웨스턴 블롯 분석**

[0031] RAW264.7 세포를 다른 농도의 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)로 처리한 후 LPS (1㎍/ml)으로 18시간 동안 처리하고, 50mM 트리스-HCl (pH 7.5), 0.4% Nonidet P-40, 120mM NaCl, 1.5mM MgCl2, 2mM 페닐메틸술포닐플루오라이드, 80㎍/ml 류펩틴(leupeptin), 3mM NaF 및 1mM DTT를 포함하는 용균 완충용액에서 4℃에서 30분간 용균시키는 표준 과정을 웨스턴 블롯팅을 위해 실시하였다. 원심분리한 후 상청액을 급냉시켜 세포 파편을 제거하였다. 단백질 농도를 Lowry 방법(Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 265-275.)을 사용하여 측정하였다. 세포 용균물 (대략 20㎍의 총 단백질)을 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분리하고 니트로셀룰로스 맴브레인으로 전기-블롯팅하였다. 맴브레인을 10% 탈지유로 차단한 후 다른 항체들 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)과 함께 배양하였으며, 상기 항체들은 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences)를 제조업자의 지시에 따라 사용하여 상대적인 단백질을 검출하는 데 사용되는 것이다. 웨스턴 블롯을 LAS3000? Luminescent image analyzer를 사용하여 시각화시키고 단백질 발현을 Multi Gauge V3.0 software (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량하였다.

[0032] **실시예 6. 산화질소 생산 검정**

[0033] 배양 상청액에서의 산화질소(Nitric oxide; NO) 수준을 Coker 및 Laurent의 문헌(Coker, R.K., Laurent, G.J., 1998. Pulmonary fibrosis: cytokine in the balance. Eur.Respir. J. 11, 1218-1221)에 기재된 Griess 반응으로 측정하였다. 간략하게, RAW264.7 세포를 웰 당 $1x10^4$ 세포의 밀도로 페놀 레드 없이 DMEM을 사용하여 96-웰 플레이트에서 밤새 전배양시킨 후 각기 다른 농도(10, 50 및 100㎍/ml)의 해삼의 네 분획을 1시간 동안 처리하였다. 그런 다음, LPS (1㎍/ml 최종 농도)를 첨가하여 NO 생산을 자극하고 48시간 동안 배양하였다. 각 시료로부터 50㎕의 배양 상청액을 동일 부피의 Griess 시약[1% 술파닐아미드/0.1% N-(1-나프틸)-에틸렌디아민 디히드로클로라이드/2.5% 인산]과 혼합한 후 15분간 배양하였다. ELISA 마이크로플레이트 리더기(Tecan Austria

GmbH)에서 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정된 수치를 DMEM에 용해된 아질산나트륨의 표준 농도의 흡광도와 비교하고, 처리된 세포의 시료의 조건 배지에서의 아질산 농도를 계산하였다. 처리된 네 분획 중에서 가장 높은 NO 저해 활성을 갖는 분획을 추가 실험을 위해 선택하였다.

[0034] LPS로 자극시킨 RAW264.7 세포는 비-자극 블랭크 군에 비해 세포내 아질산 수준이 유의성있게 증가함을 나타냈다(도 2). 모든 해삼 분획을 이러한 LPS 자극 NO 생산을 저해하는 이들의 능력에 대해 실험하였다. 아질산염은 LPS 자극 세포에 의해 방출 NO의 전환된 안정한 산물이다. 도 2에 도시된 바와 같이, SCEA-F는 LPS 자극 RAW264.7 세포에서 NO 생산을 저해하는 가장 높은 가능성을 보이며 저해는 투여량 의존성을 나타낸다. 가장 높은 농도의 SCEA-F (100㎍/ml)에서 NO 생산은 비자극 세포보다 약간 높거나 약간 낮았다 헥산 분획 또한 유의할 만한 NO 저해 활성을 나타냈다. 세포-적합성, 총 페놀 함량 및 NO 생산 저해능을 근거로, SCEA-F를 추가 실험을 위해 선택하였다.

[0035] SCEA-F 저해 NO 생산 및 저해의 모든 실험 농도는 투여량에 따라 달라진다. LPS 자극 NO 생산의 저해의 원인인 활성 메카니즘을 실험하기 위해, iNOS의 단백질 및 mRNA 발현 수준을 조사하였다. 웨스턴 블롯 분석에서, LPS 처리는 비처리 세포에 비해 iNOS 단백질 발현을 충분히 증가시킨다(3배)(도 3a 및 3b). 이러한 자극된 iNOS 단백질 발현 수준은 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)로 18시간 동안 처리하였을 때 분명히 감소하였다. RT-PCR 분석은 mRNA 발현 수준에서 SCEA-F의 효과를 알아보기 위해 실시한 것으로 도 3a 및 3b에 도시된 바와 같이 18시간 동안 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)를 처리한 것이 iNOS mRNA의 LPS 자극 발현을 저해하였다. 이러한 데이터의 집합적 분석(collective analysis)은 LPS 자극 RAW264.7 세포의 SCEA-F 처리에 의한 iNOS 단백질 및 m-RNA 발현의 발현 저해에 의한 것임을 보여준다.

[0036] **실시예 7. PGE_2의 효소 면역 검정**

[0037] PGE_2 (ProstaGlandin-E2) 합성을 시판되는 PGE2 EIA(emzyme immunometric assay) 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)를 사용하여 추출 또는 정제 없이 효소 면역검정을 실시하여 평가하였다. RAW264.7 세포를 다른 농도의 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)로 1시간 동안 처리하고 LPS (1_g/ml)로 18시간 동안 자극시켰다. 제조업자의 지시사항에 따라 PGE_2-EIA(PGE_2 enzyme immune-metric assay)를 실행하기 위해 조건 배지를 수집하였다. PGE_2의 농도를 EIA 키트의 PGE_2 표준 용액을 사용하여 표준 커브로부터 얻어진 식에 따라 계산하였다.

[0038] PGE_2의 생산을 저해하는 SCEA-F의 가능성을 측정하기 위해, 방출된 PGE_2 농도를 항-PGE_2-코팅 ELISA 플레이트를 사용하여 LPS 자극 RAW264.7 세포에서 측정하였다. SCEA-F 처리는 투여량 의존 방식으로(10, 50 및 100㎍/ml) 모든 농도에서 자극된 PGE_2 생산을 유의적으로($p < 0.05$) 저해하였다 (도 4a). PGE_2의 저해에 관련된 분자 메카니즘을 조사하기 위해, COX-2 단백질 및 COX-2 mRNA 발현에서 SCEA-F의 효과를 웨스턴 블롯팅 및 PCR 분석으로 각각 분석하였다. 도 4b에서 LPS 자극 RAW264.7 세포에서 SCEA-F를 18시간 처리한 후의 COX-2 단백질 및 mRNA 발현을 도시하였다. 이는 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)의 처리에 의해 단백질 및 mRNA 발현이 저해됨을 분명하게 나타내고 있다. 이는 PGE2 생산이 SCEA-F에 의해 감소되는 상기 결과와 일치하는 것이다.

[0039] **실시예 8. TNF-α 및 IL-1β의 효소 면역 검정**

[0040] 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-1β의 생산에서 SCEA-F의 저해 효과를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다. 세포를 다른 농도의 SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)로 1시간 동안 처리하고 LPS (1㎍/ml)를 18시간 동안 처리하였다. 마우스 사이토카인-특이 BiotralTM ELISA 키트 (Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)를 제조업자의 권장사항에 따라 사용하여 조건 배지를 분석하였다. TNF-α 및 IL-1β의 농도를 ELISA 키트에서의 각각의 재조합 사이토카인을 사용한 표준 곡선에 따라 계산하였다.

[0041] 염증성 사이토카인은 염증의 핵심 성분이므로, TNF-α 및 IL-1β의 생산 수준에서 SCEA-F의 효과를 ELISA를 사용하여 조사하였다. SCEA-F (10, 50 및 100㎍/ml)의 처리에 의해, TNF-α 및 IL-1β의 LPS-유도 생산이 농도에 따라 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소함이 나타났다(도 5). 이러한 결과를 보강하기 위해, TNF-α 및 IL-1β의 전사 수준을 RT-PCR로 분석하였다. 도출된 결과를 SCEA-F로 18시간 동안 처리한 후의 TNF-α 및 IL-1β mRNA 발현 수준을 감소시킴을 나타내는 상기 데이터와 비교하였다(도 6a). 이러한 결과는 SCEA-F 처리가 LPS-유도 RAW264.7 세포에서 이들의 전사 수준에서 염증성 사이토카인의 생산을 억제하는데 효과적임을 확실하게 제시한다.

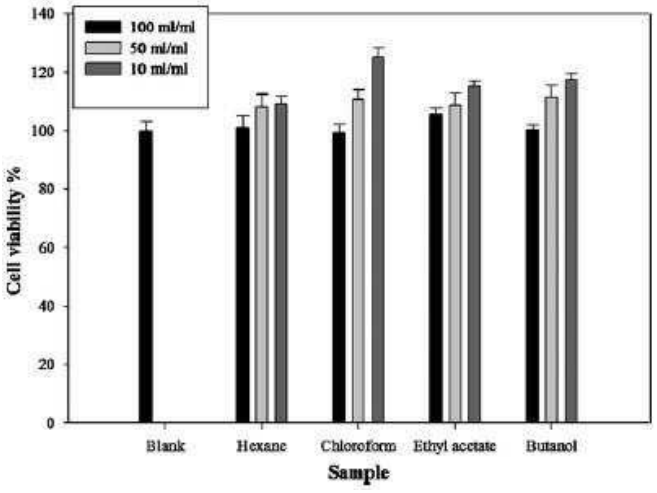
[0042] **실시예 9. MAPK 단백질 발현의 저해**

[0043] 염증은 다른 신호 경로에 의해 유도될 수 있다. MAPK(mitogen-activated protein kinase) 경로는 염증 반응을 매개하는 주요 신호 경로 중 하나이다. 상술된 바와 같은 SCEA-F에 의한 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 저해에 관련되었을 가능성이 있는 경로를 찾기 위해 3개의 다른 MAPK 분자 p38MAPK, JNK(Jun N-terminal kinase) 및 ERK(extracellular signal-regulated kinase)의 인산화를 분석하였다. LPS는 ERK, JNK 및 p38 MAPK의 급격한 인산화를 유도하며, 이러한 인산화의 유도가 LPS 처리시 10-30분 안에 이루어진다는 것이 보고되었다(Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H., Park, Y.K., 2009a. Flower extract of Panax notoginseng attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory response via blocking of NF-κB signaling pathway in murine macrophages. J. Ethnopharmacol. 122, 313-319 ; Yun, K.J., Kim, J.Y., Kim, J.B., Lee, K.W., Jeong, S.Y., Park, H.J., Jung, H.J., Cho, Y.W., Yun, K., Lee, K.T., 2008. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. Int. Immunopharmacol. 8, 431-441). 그러므로, 웨스턴 블롯을 위한 세포를 SCFA-F를 1시간 동안 처리한 후 LPS(1 ㎍/㎖)로 15분 동안 자극시킨 후에 수집하였다. ERK, p38 및 JNK의 인산화는 SCEA-F 처리에 의해 저해되었다 (도 7a 및 7b). 이러한 저해 작용은 TERK 및 p38 인산화에서 투여량에 따라 달라졌으며(도 7a) JNK 인산화의 저해는 투여량과 관련이 없었다. 그러므로, 이러한 결과는 iNOS 및 COX-2 저해가 LPS 자극 RAW264.7 세포에서 MAP 키나아제 매개 경로를 통해 신호 전달 저해에 의해 매개된 것임을 나타낸다.

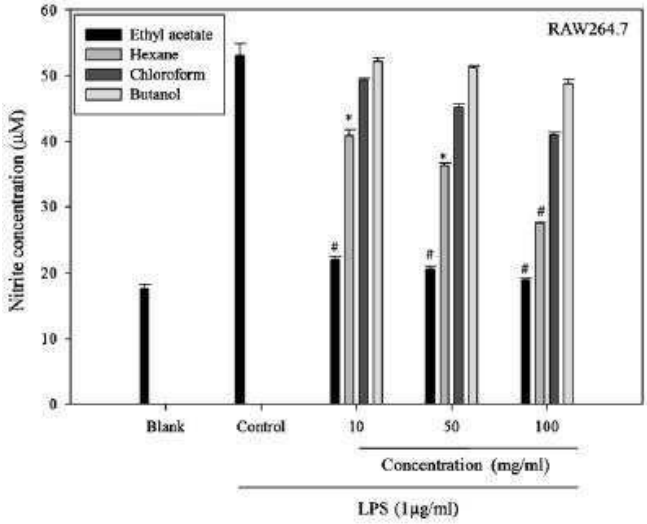
[0044] 본 발명의 해삼 유기용매 분획 추출물, 특히 아세트산에틸 분획 추출물은 ERK 및 p38MAPK와 같은 MAPK를 통해 iNOS, COX-2 및 염증성 사이토카인의 LPS-유도유전자 및 단백질 발현을 저해함이 규명되었으며, 이러한 항-염증 활성이 해삼의 아세트산에틸 분획 추출물의 고함량 페놀에 의한 것임을 알 수 있었다. 이에 본 발명의 해삼의 아세트산에틸 분획 추출물이 항-염증 치료에 효과적으로 사용가능함을 확인할 수 있었다.

도면

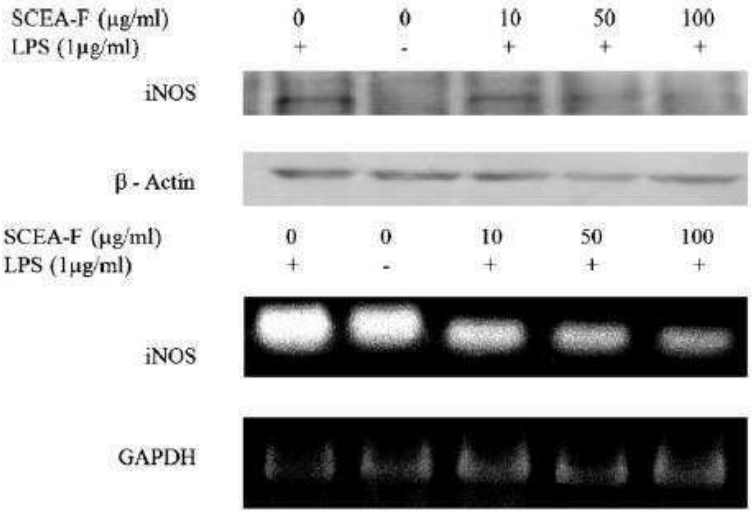
도면1



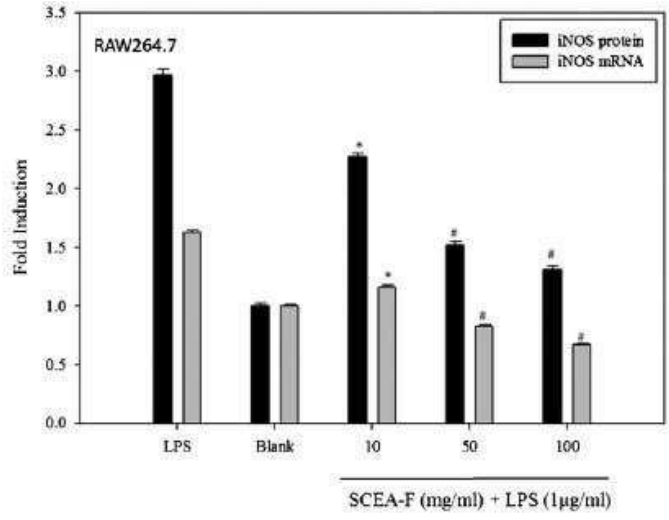
도면2



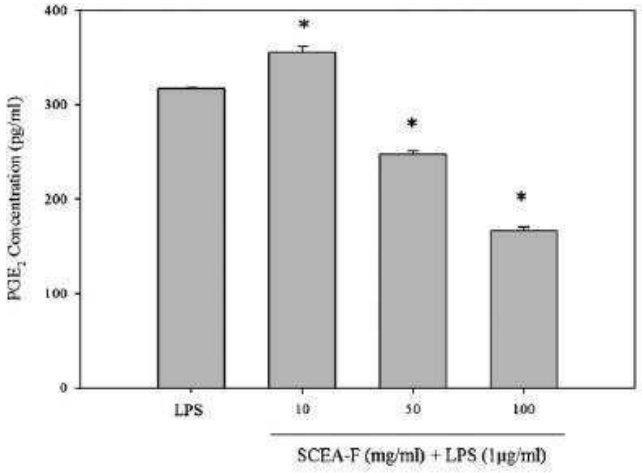
도면3a



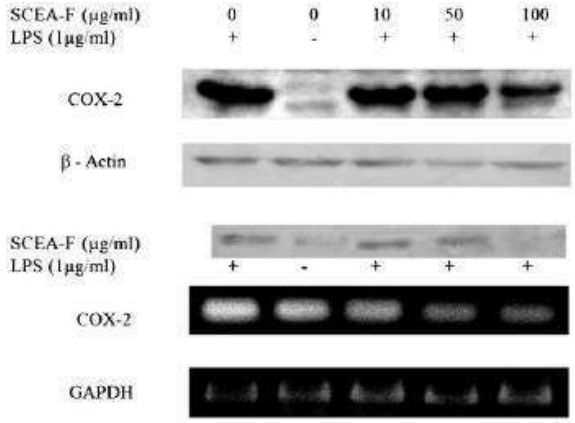
도면3b



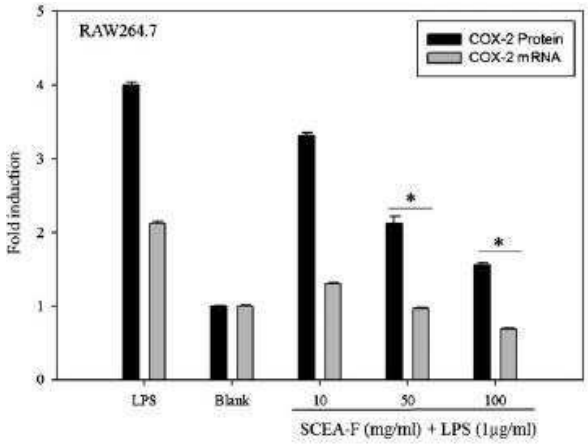
도면4a



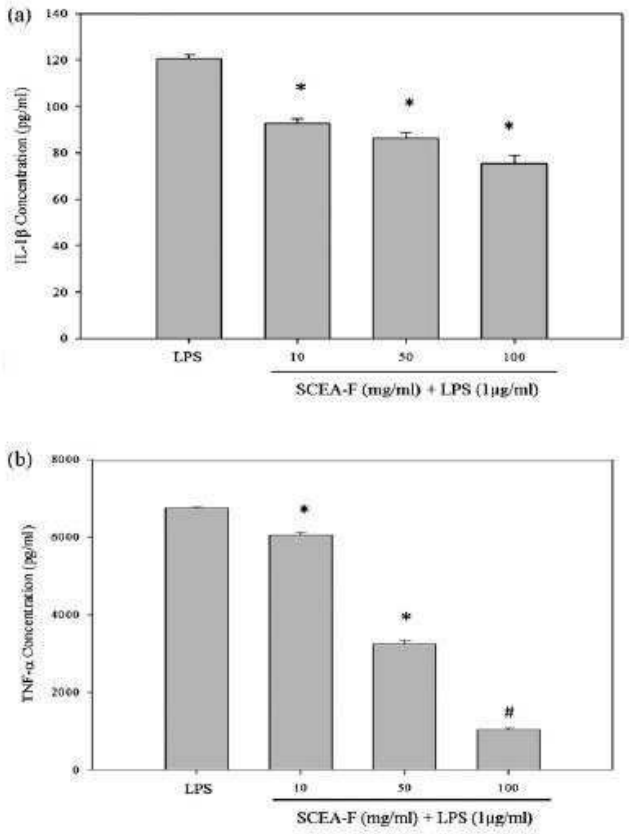
도면4b



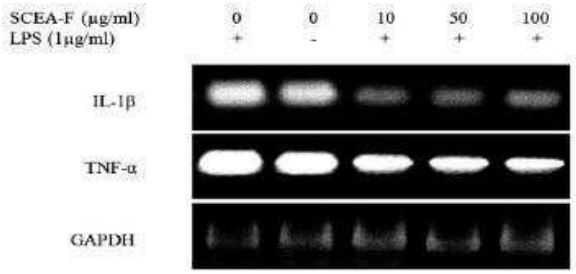
도면4c



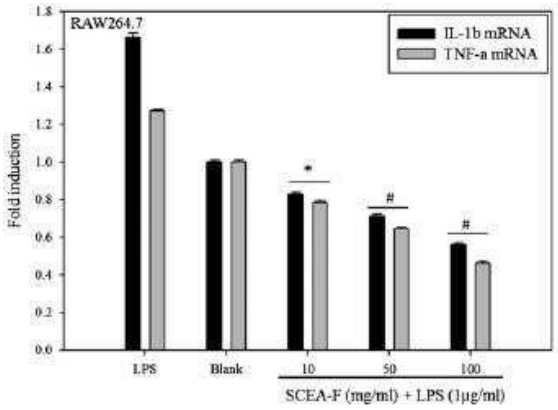
도면5



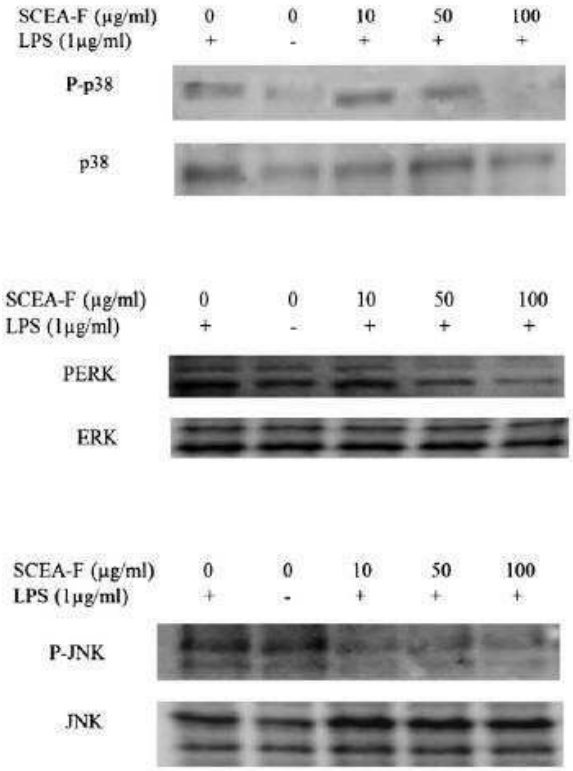
도면6a



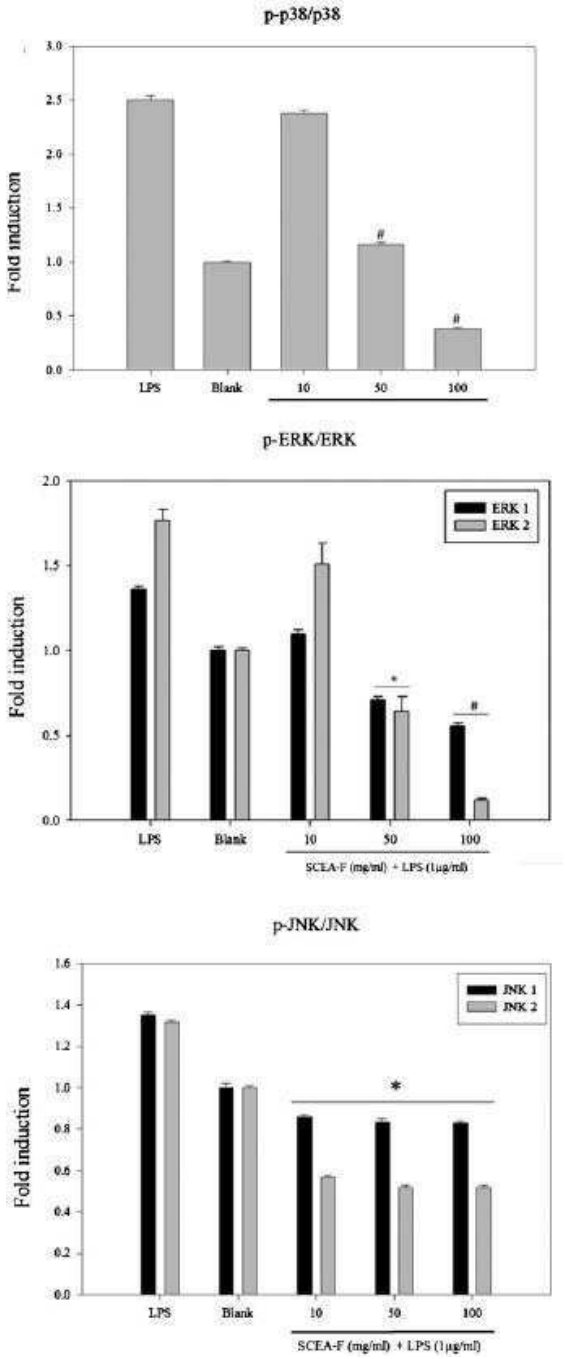
도면6b



도면7a


SCEA-F (μg/ml) 0 0 10 50 100
LPS (1μg/ml) + - + + +
P-p38
p38
SCEA-F (μg/ml) 0 0 10 50 100
LPS (1μg/ml) + - + + +
PERK
ERK
SCEA-F (μg/ml) 0 0 10 50 100
LPS (1μg/ml) + - + + +
P-JNK
JNK

도면7b


p-p38/p38
Fold induction
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
LPS
Blank
10
50
100
#
#
p-ERK/ERK
Fold induction
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ERK 1
ERK 2
*
#
LPS
Blank
10
50
100
SCEA-F (mg/ml) + LPS (1μg/ml)
p-JNK/JNK
Fold induction
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
JNK 1
JNK 2
*
LPS
Blank
10
50
100
SCEA-F (mg/ml) + LPS (1μg/ml)