

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0004582

(43) 공개일자 2020년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/616 (2014.01) *A61P 11/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/616 (2013.01)*A61P 11/06* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-0077623

(22) 출원일자 2018년07월04일

심사청구일자 2018년07월04일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

강석중

경상남도 통영시 용남면 대곡길 12, 103동 1503호

정우철

경상남도 창원시 마산합포구 월영남12길 12, 104동 1904호

아니수자만 엠디

경상남도 통영시 천대국치길 38, 309호 (경상대학교 해양과학대학 해양생물교육연구센터)

(74) 대리인

한윤호

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선물질의 분리방법

(57) 요약

본 발명은 해삼 자숙액에 혼합 유기용매를 처리하여 천식 개선물질을 다량 함유하고 있는 지질 분획물만을 효율적으로 분리하는 분리방법을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20150297

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 천식개선물질을 함유하는 해삼생산을 위한 사료개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.08 ~ 2018.06.07

명세서

청구범위

청구항 1

해삼 자숙액에 n-헥산(n-hexane), 에탄올(ethanol) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3)으로 구성되는 혼합 유기용매를 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계;

상기 혼합물을 교반 후 증발조에서 전처리하는 단계;

전처리된 혼합물을 원심분리하여 다분획층으로 분리하는 단계; 및

상기 다분획층에서 지질 분획층만을 수득하는 단계를 포함하는 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선 효과가 있는 지질 분획물의 분리방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 해삼 자숙액은 50~80 중량부, n-헥산 5~20 중량부, 에탄올 5~20 중량부, 및 탄산나트륨(Na_2CO_3) 5~20 중량부인, 분리방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 전처리의 온도는 35 내지 40℃인, 분리방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 다분획층은 4단 분획층인, 분리방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 4단 분획층은 맨 위로부터 순차적으로 지질 분획층, 단백질 분획층, 알코올 분획층 및 찌꺼기 층인, 분리방법.

청구항 6

제1항의 분리방법으로 분리된 지질 분획물을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물.

청구항 7

제1항의 분리방법으로 분리된 지질 분획물로 부터 추가로 분리된 당지질을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선물질의 분리방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선물질인 지질 분획만을 효율적으로 분리하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 돌기해삼(Japanese sea cucumber)은 영양이 풍부하고 건강에 좋은 보양 음식으로서 중국에는 대규모 시장이 조

성되어 있으며 최근 경제 발전과 더불어 그 수요가 계속 증가 하고 있다. 이에 따라 중국의 해삼 양식의 생산량은 2015년에는 20만 톤 이상으로 대부분 중국이나 동남아시아에 거주하고 있는 화교에 의하여 주로 소비된다. 중국은 돌기해삼의 자체 생산량은 수요량의 25% 정도에 지나지 않기 때문에 부족한 물량을 수입에 의존하고 있다. 이러한 배경으로 우리나라 해양수산부는 해삼을 수산물 10대 수출전략품목의 하나로 선정하여, 고부가가치를 갖는 고품질 기능성 제품개발을 통하여 수출을 증대하는 전략을 펴고 있다. 따라서 국내의 연구 동향도 이를 반영하여 국책사업 연구개발 과제도 과거의 종묘생산 기술 개발, 양식 기술 개발 및 사료 개발로부터 최근에는 고품질 해삼 가공 기술 및 기능성 해삼 제품을 개발하는 방향으로 나가고 있고 대표적으로 해삼을 주원료로 하는 항당뇨 복합경육고의 개발, 해삼의 신기능성 물질 발굴을 통한 고부가가치 제품개발 사업 등 많은 연구가 이루어지고 있다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2016-0146406호는 해삼 자숙액 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 그러나 상기 선행기술은 해삼 자숙액으로부터 미백 및 주름개선에 효능이 있는 화장료 조성물을 제공하는 것으로 해삼 자숙액으로부터 천식 개선에 효능이 있는 물질의 분리방법에 대한 기술은 아직 존재하지 않는다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 해삼 자숙액으로부터 천식 개선에 효능이 있는 지질 분획만을 효율적으로 분리하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 해삼 자숙액에 n-헥산(n-hexane), 에탄올(ethanol) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3)으로 구성되는 혼합 유기용매를 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 혼합물을 교반 후 증발조에서 전처리하는 단계; 전처리된 혼합물을 원심분리하여 다분획층으로 분리하는 단계; 및 상기 다분획층에서 지질 분획층만을 수득하는 단계를 포함하는 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선 효과가 있는 지질 분획물의 분리방법이 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 분리방법으로 분리된 지질 분획물을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 분리방법으로 분리된 지질 분획물로부터 추가로 분리된 당지질을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 본 발명의 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선물질의 분리방법은 해삼 자숙과정 후 폐기되는 자숙액을 혼합 유기용매를 이용하여 천식에 효능이 있는 물질을 생산하는 효과를 구현 할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 해삼 자숙액에 혼합유기용매를 처리하여 교반 및 원심분리후에 4단 분획층의 모습을 나타내는 사진이다. 최상부는 헥산층으로 지질분획층이고 그 아래의 두 번째층은 고형물 덩어리층으로 단백질 잔사를 많이 함유하고 있으며 세 번째층은 알코올층으로 사포닌을 많이 함유하고 있고 바닥층은 해삼 체벽의 구성성분인 골편 및 염을 많이 함유하고 있다.

도 2는 본 발명의 해삼 자숙액으로부터 지질 분획층을 수득하는 과정을 개략적으로 나타내는 공정도이다.

도 3은 본 발명의 해삼 자숙액의 4단 분획층 추출물을 마우스에게 경구투여 후 비장세포에서 IL-10 발현을 시간에 따라(2, 4, 6, 및 8시간) 분석한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 상의 지방산 분포를 확인한 가스 크로마토그래피이다.

도 5는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 따른 알레르기성 기도 염증 개선 여부를 평가하기 위해 마우스에서 알레르기성 기도 염증을 유발하기 위한 타임 스케줄이다. 1일 간격으로 10 mg의 n-헥산 상 또는 PBS(총 7 회)를 투여한 후, 마우스를 OVA+명반 또는 PBS(대조군)를 복강 내 주사하여 14, 15, 21 및 22일에 감

작시켰고 29, 30, 36, 37일째에 OVA를 마우스에게 비강 내 투여하였다.

도 6은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 따른 알레르기성 기도 염증 개선 여부를 평가한 것으로 메타콜린(methacholine)의 일시 중지(Penh)를 분석한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 따른 항-경련 효과(antiasthmatic effect)를 조사한 것으로 폐 조직을 염색한 현미경 사진이다.

도 8은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 따른 항-경련 효과를 조사한 것으로 염증 점수를 분석한 그래프(A)이고 PAS-양성 세포를 분석한 그래프이다(B).

도 9는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 의한 마우스 비장에서 분리된 림프구의 사이토카인 농도를 분석한 그래프이다.

도 10은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 의한 마우스 비장에서 분리된 림프구의 사이토카인 농도를 분석한 그래프이다.

도 11은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 의한 폐 배액 림프절(LLN)의 Treg 세포 집단과 폐의 Treg 관련 사이토카인 유전자 발현을 분석한 그래프이다.

도 12는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 의한 폐 배액 림프절(LLN)의 Treg 세포 집단과 폐의 Treg 관련 사이토카인 유전자 발현을 분석한 그래프이다.

도 13은 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산 투여에 의한 폐에서의 IL-10과 Foxp3의 발현을 분석한 그래프이다.

도 14는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산(n-hexane)층의 지질성분 분획을 구성하는 비극성지질층, 트리글리세롤(triacylglycerol), 디아실글리세롤(diacylglycerol), 당지질(glycolipid), 인지질(Phospholipid)의 IL-10의 발현을 분석한 그래프이다.

도 15는 본 발명의 해삼 자숙액 추출물의 n-헥산(n-hexane)층의 지질성분 분획을 구성하는 비극성지질층, 트리글리세롤, 디아실글리세롤, 당지질, 인지질의 정량분석 결과를 나타내는 겔 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

용어의 정의:

[0011]

본 문서에서 사용되는 용어 "해삼(*Apostichopus japonicus*)"은 돌기해삼이라고 불리고 있으며 생물학적 분류 체계에 따르면 극피동물문(Echinodermata), 해삼강(Holothuroidea), 해삼과(Stichopodidae) 여자삼속(*Apostichopus*)에 속한다. 건강 기능성물질인 사포닌과 콘드로이친을 다량 포함하고 있으므로 예로부터 바다의 인삼이라 부른다.

[0012]

발명의 상세한 설명:

[0013]

본 발명의 일 관점에 따르면, 해삼 자숙액에 n-헥산(n-hexane), 에탄올(ethanol) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3)으로 구성되는 혼합 유기용매를 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 혼합물을 교반 후 증발조에서 전처리하는 단계; 전처리된 혼합물을 원심분리하여 다분획층으로 분리하는 단계; 및 상기 다분획층에서 지질 분획층만을 수득하는 단계를 포함하는 해삼 자숙액으로 부터 천식 개선 효과가 있는 지질 분획물의 분리방법이 제공된다.

[0014]

상기 분리방법에 있어서, 상기 해삼 자숙액은 50~80 중량부, n-헥산 5~20 중량부, 에탄올 5~20 중량부, 및 탄산나트륨(Na_2CO_3) 5~20 중량부일 수 있고 상기 전처리의 온도는 35 내지 40℃일 수 있으며 상기 다분획층은 4단 분획층일 수 있고 상기 4단 분획층은 맨 위로부터 순차적으로 지질 분획층, 단백질 분획층, 알코올 분획층 및 찌꺼기 층일 수 있다.

[0015]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 분리방법으로 분리된 지질 분획물을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물이 제공된다.

[0016]

본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 분리방법으로 분리된 지질 분획물로부터 추가로 분리된 당지질을 유효성분으로 함유하는 천식 치료용 조성물이 제공된다.

[0017]

이때 상기 당지질은 하기의 공정을 통해 상기 지질 분획물로부터 분리될 수 있다:

- [0018] 상기 지질 분획물을 극성 물질 흡착 크로마토그래피 칼럼에 적재하고 클로로포름을 전개용매로 하여 중성 지질을 용출시키는 공정 및 아세톤을 전개용매로 하여 용출된 용출물을 회수하는 공정.
- [0019] 전 세계적으로 약 3억 명 인구가 천식의 고통을 겪고 있으며, 이로 인한 사망자는 연간 약 25만 명으로 그 숫자는 계속 증가하고 있다. 또한 천식은 간접흡연, 미세먼지, 황사, 식습관 및 어린이 면역 체계 약화 등의 요인이 되어 발병 연령이 점차 낮아지는 양상을 나타내어 세계보건기구(WHO)의 관심이 증대되고 있는 질환중의 하나이다. 돌기해삼은 예로부터 관절염, 고혈압, 상처치유 및 외과 수술 후 건강회복에 사용해 왔으며, 특히 천식 질환 개선에 있어 특효 약제로 사용해 왔다. 최근 연구에 의하면 해삼에서 추출한 지질 분획을 마우스에게 경구 투여하였을 때 조절 T세포가 활성화 되면서 폐로 이동하여 알레르기 호흡 질환을 예방하고 천식이 개선된 결과가 보고되었다. 특히 해삼의 지질조성은 어류와 같은 수산동물에서는 없고 해조류에서만 볼 수 있는 당지질(glycolipid)을 가지는 것이 특징이며, 이 성분이 천식개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 지방산이 천식의 예방과 개선에 효과가 있다는 것은 선행 연구를 통하여 이미 많이 알려져 있는데 즉 n-6 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)은 천식 발병률을 증가시키는 원인으로 될 수 있는 반면에 n-3 PUFA는 어린이의 천식 증상을 효과적으로 개선하고 예방할 수도 있다. 임상 실험에서 어린이가 장기적으로 n-3 PUFA/n-6 PUFA 비율이 높은 음식을 섭취하면 천식 발병률을 효과적으로 감소시키는 결과를 나타냈다. 또한 분지 지방산(branch chain fatty acid, BCFA)을 섭취하였을 때 체내의 염증 조절 인자인 interleukin-10(IL-10)의 증가를 통해 알레르기성 호흡질환을 완화시킬 수 있다. 그래서 해삼의 지방산은 천식 개선에 있어 아주 중요한 역할을 하고 있다.
- [0020] 본 발명자들은 당지질과 오메가-3 지방산을 함유하는 원료와 혼합비를 결정하여 종래의 양식산 보다 높은 함량의 천식 개선물질을 포함하는 해삼을 생산하였으나 중국은 건해삼이 유통되는 음식문화를 갖고 있기 때문에 대중수출을 위해서는 반드시 자숙과정이 필요한데 상기 자숙과정에서 천식개선에 효능을 갖는 지질성분을 포함한 여러 유용성분 특히 당지질이 많이 유실되고 자숙액은 대부분 폐기되는 상황에서 동일공정으로 상기 자숙액을 분획별로 수득하는 것은 현재까지 기술적 한계로 남아 있음을 인지하여 예의노력한 결과 해삼 자숙액에 혼합 유기용매를 첨가하여 4단 분획층을 제조하고 이 중에서 천식 개선물질을 다량 함유하고 있는 지질 분획만을 효율적으로 분리하는 분리방법을 개발하였다. 건해삼 가공 과정에서 발생하는해삼 자숙액에 혼합 유기용매를 처리하여 교반 및 원심분리하면 명확하게 분리된 4단 분획층을 볼 수 있는데 상부는 핵산층으로 지질분획층이고 두 번째층은 고형물덩리층으로서 단백질잔사를 많이 함유하고 있으며 세 번째층은 알코올층으로서 사포닌을 많이 함유하고 있고 하부는 해삼체벽의 구성성분인 골편 및 염을 많이 함유하고 있다(도 1).
- [0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [0022] **실시예 1: 해삼 추출물 준비 및 분류**
- [0023] 본 발명의 해삼(*A. japonicus*) 자숙액은 SJ-Bio Hatchery(Tongyeong, Korea)부터 수득하였고 해삼 추출물은 총 30 g 질량의 반응 시스템에서 해삼 추출물, n-핵산, 에탄올 및 탄산나트륨을 혼합하는 3액상 염석 추출법(three-liquid-phase salting-out extraction method)으로 분획하였다. 먼저, 해삼 추출물 15.5 g을 마개가 있는 50 ml 눈금 원심 분리 튜브에 넣고 2.6 g의 에탄올 및 3.5 g의 탄산나트륨(sodium carbonate)을 첨가하여 21.6 g(반응 시스템의 총 질량의 72 %)의 총 질량(total mass)을 산출하였다. 그 후, n-핵산 8.4 g(반응 시스템 전체 질량의 28 %)을 첨가한 후, 염을 용해시키기 위해 와류 교반 혼합기(whirlpool vortex mixer)를 사용하여 교반하였고 37℃의 중탕조에서 30분 동안 배양하였으며 4단계(상부, 중간, 고체 및 하부 단계) 형성을 위해 5000 g로 5분 동안 원심분리 하였다(도 2).
- [0024] 그 결과, 상부는 핵산층으로 지질분획층이고 두 번째층은 고형물덩리층으로서 단백질잔사를 많이 함유하고 있으며 세 번째층은 알코올층으로서 사포닌을 많이 함유하고 있고 하부는 해삼체벽의 구성성분인 골편 및 염을 많이 함유하고 있는 4상 분획층을 수득하였다(도 1).
- [0025] **실시예 2: 지방산 조성 분석**
- [0026] 해삼 추출물의 총 지질(total lipids)은 상부 n-핵산 상(n-핵산 추출물)을 회수함으로써 분리하였고 상기 추출된 총 지질 100 mg을 캡 튜브에 넣고 0.5 N NaOH-메탄올 용액 1.5 mL을 첨가하였다. 그 후, 상기 샘플을 볼텍싱(vortexing)하여 혼합하였고 비누화(saponification)를 위해 100℃에서 8분간 가열하였으며 냉각 후, 삼불화 붕소/메탄올(boron trifluoride/methanol) 용액으로 메틸화를 수행하여 지방산 메틸 에스테르(fatty acid methyl

esters)를 제조하였다. 이어서 상기 샘플을 2 mL의 이소옥탄(iso-octane)에 용해시키고, 지방산을 capillary column(Omegawax[®]-320, 30 m x 0.25 mm 내경, Supelco Co. Bellefonte, PA, USA)을 사용하여 가스 크로마토그래피(Claruss 600, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)로 분석하였다. 작동 파라미터(parameters)는 하기와 같다 : 캐리어 가스 = 헬륨; 화염 이온화 검출기 온도 = 270℃; 사출 온도 = 250℃; 컬럼 온도 = 180℃에서 8분, 3℃/분에서 230℃까지 증가하도록 프로그램되어 최종 보유 시간 10분; 주입 = 1:50 비율로 분할. 또한 멘헤이덴(Menhaden) 오일을 표준으로 사용하였고 각 지방산 메틸 에스테르 피크는 알려진 표준을 참조하여 등가 사슬 길이(equivalent chain length)를 결정함으로써 동정하였다.

[0027] 실시예 3: 마우스 실험 디자인

[0028] 본 발명자들은 동물 실험을 위해 6주령 C57BL/6 암컷 마우스를 오리엔트 바이오(성남, 한국)에서 구입하였고 병원이 없는 동물 시설에서 번식을 수행하였다. 동물 연구 프로토콜은 부산대학교 동물성 관리 및 사용위원회(PNU-2016-1061)의 승인을 받았다. PBS 및 PBS에서만 대조군인 100 mg/mL의 유상 추출물 200 μ l를 마우스에게 2일 간격으로 7회 경구투여하였다. 각 추출물을 투여한 후 종래 OVA(난백알부민, Ovalbumin)/명반(alum) 방법을 일부 변형하여 알레르기성 기도 염증(allergic airway inflammation)을 유도하였다. 이는 14일, 15일, 21일 및 22일에 200 μ l 볼륨의 75 μ g OVA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 2 mg의 수산화알루미늄(Sigma-Aldrich)을 마우스 복강 내 주입하고 상기 추출물 투여 후 29, 30, 36 및 37일째에, 50 μ l PBS의 500 μ l OVA를 마우스의 비강 내로 투여하였다. 마지막 비강 내 투여 24시간 후, 비 침습성 전신 체중 측정법(Allmedicus, Seoul, Korea)을 사용하여 의식이 없는 무제한 마우스에서 AHR(Airway hyperresponsiveness)을 측정하였다. 즉, 마우스를 plethysmography 챔버에 놓고 에어로졸(aerosol)에 의해 0, 12.5, 25, 50 mg/mL의 메타콜린(methacholine)에 10분간 노출시켰다. 그 후, 일시 중지(enhanced pause)는 각 단계의 시간과 결합된 흡기(inspiration) 및 만료(expiration) 동안 plethysmography 챔버에서 생성된 평균 압력을 기반으로 자동으로 계산하였고 3분 간격 동안 계산된 개선된 중지값의 평균을 산출하였다.

[0029] 실시예 4: 폐 조직 병리학(Lung histopathology)

[0030] 본 발명자들은 조직학적 분석을 위해 상기 실시예 3의 마우스의 소장 조직을 4% 포름알데히드로 고정(fix)시키고 파라핀으로 세팅하였다. 그 후 파라핀 블록은 얇게 절편하여 헤마톡실린(Hematoxylin), 에오신(Eosin) 및 파요오드산-쉬프(Stewal Acid-Schiff) 염색을 수행하였고 염색된 부분을 현미경으로 관찰하였다. 상기 각 절편의 염증 상태는 하기의 척도에 따라 평가되었다: 0 = 검출할 수 없는 염증; 1 = 가끔 염증 세포로 둘러싸임; 2 = 대부분의 기관지나 혈관이 1~3 개의 세포로 둘러싸여 있음; 3 = 대부분의 기관지나 혈관이 4~5 개의 세포로 둘러싸여 있음; 4 = 대부분의 기관지 혈관은 5개 이상의 세포로 둘러싸여 있음. 또한 배상세포(goblet cell) 과형성(hyperplasi)을 정량화하기 위해 8-10개의 마우스 당 조직 절편에서 상피세포의 파요오드산-쉬프(Stewal Acid-Schiff) 양성 세포의 백분율을 조사하였다.

[0031] 실시예 5: 기관지폐포세척액에서의 분화 세포 계수

[0032] 본 발명자들은 기관지폐포세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 얻기 위해 알레르기성 기도 염증 유발 마우스의 기관을 후두(larynx) 바로 아래에서 노출시키고 절개하였다. 폴리우레탄 연성 튜브(외경 0.4 mm, 길이 4 cm, 블런트 24 게이지 바늘이 결합[Bowin Medical Co., Seoul, Korea])를 기관(trachea)에 삽입하였고 폐는 멸균된 따뜻한 PBS 800 μ l로 세척하였다. 그 후 BALF 샘플을 4℃에서 500 g으로 5분간 원심분리 하였고 상등액은 사이토카인의 측정을 위해 즉시 -20℃에서 동결시켰다. 이어서 세포 펠렛을 PBS에 재현탁하고 혈구 계수기(hemocytometer)를 사용하여 총 세포 수를 계수하였다. 마지막으로 상기 BALF 세포는 기존의 형태학적인 기준에 따라 존재하는 세포 유형을 결정하기 위해 cytopsin 장치를 사용하여 슬라이드 당 1×10^5 세포를 유리 슬라이드 위에 도말하고 Diff-Quik 용액(Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 염색하였다

[0033] 실시예 6: 사이토카인 생산(cytokine production)

[0034] 본 발명자들은 사이토카인 생산을 위해 마우스를 희생시킨 후, 비장을 분리한 다음 분열시켰고 적혈구의 용해를 위해 비장 파쇄액(homogenate)을 24℃에서 2분 동안 암모늄/염화물/칼륨 저장성 용해 용액(hypotonic lysis solution, Sigma-Aldrich)과 함께 배양하였다. 그 후, 상기 세포를 100 μ m 세포 여과기(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 통해 여과하였고 상기 세포를 10% 우태아혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 Roswell Park Memorial Institute 1640 배지에서 48-웰 플레이트의 1×10^6 세포/mL로 플레이팅하였다. 이어서 항-CD3 항체(0.5 μ g/mL, BD Biosciences)를 CD3 자극을 위해 각 웰에 첨가하였고, 상기 플레이트를 37℃, 5% CO₂

의 대기 조건에서 72시간 동안 배양하였으며 배양 상등액을 수득하여 -20℃에서 보관하였다. 또한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 자극된 비장세포 및 BALF의 상층액에서 마우스 IL-4, IL-5, IL-13, IL-17A, TGF- β , 및 IL-10의 농도를 측정하였다. 아울러 분석은 제조사의 지침에 따라 포획 항체(capture antibody)를 96-웰 플레이트에 코팅하고 밤새 4℃에서 배양하였고 상기 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin)으로 차단하였으며 표준 및 희석된 혈청 또는 자극된 상등액을 2 μ l씩 첨가 후 4℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 상기 플레이트를 0.1 % Tween 20을 함유한 200 μ l로 6회 세척하였고 100 μ l의 바이오틴-결합 항-마우스 검출 항체를 개별적으로 첨가하였으며 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 플레이트를 0.1 % Tween 20을 함유하는 200 μ l PBS로 6회 세척하고, 아비딘-접합된 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)를 첨가하였다. 상기 플레이트를 어두운 곳에서 실온 조건으로 30분 동안 배양하였고 발색을 위해 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine)을 기질로 첨가하였고 반응은 0.5 볼륨의 H₂SO₄ 용액(Merck, Darmstadt, Germany)으로 중단하였고 450 nm에서의 흡광도를 플레이트 판독기로 측정하였다.

[0035] **실시예 7: 정량적 실시간 PCR**

[0036] 본 발명자들은 IL-10과 Foxp3 유전자 발현을 결정하기 위한 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 구체적으로 비장 세포에서 IL-10 유전자 발현에 미치는 해삼 추출물의 3상(3 phases) 효과를 평가하기 위하여 24-웰에서 마우스 비장 세포(5×10^6 세포/웰)에 각 단계(최종 농도 1 μ g/mL) 10 μ l를 첨가하였고 2, 4, 6, 및 8 시간 후 총 RNA 추출을 위해 세포를 수득하였고 마우스 실험 후, 희생된 마우스로부터 폐를 수득하여 RNA 분리에 사용하였다. 총 RNA는 제조사의 지침에 따라 QIAzol- 시약(Qiagen, Venlo, Netherlands)를 사용하여 분리하였고 제조사의 지침에 따라 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 총 2 μ g의 총 RNA를 전사하였다. 또한 IL-10 및 Foxp3의 발현은 Light Cycler- 96 Real-Time PCR System(Roche Life Science, Penzberg, Germany)을 사용하여 정량적 실시간 PCR로 결정하였다. 상기 정량적 실시간 PCR에 사용한 프라이머에 대한 정보를 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

프라이머 정보

프라이머	핵산 서열(5'-->3')	서열 번호
GAPDH F	TAC CCC CAA TGT GTC CGT	1
GAPDH R	AAG AGT GGG AGT TGC TGT TGA AG	2
IL-10 F	GCT ATG CTG CCT GGT CTT ACT	3
IL-10 R	TCC AGC TGG TCC TTT GTT TG	4

[0038] **실시예 8: 형광-활성화 세포 분류 분석**

[0039] 본 발명자들은 n-핵산 처리에 의해 유도된 Treg 세포의 모집을 결정하기 위해, 폐 배수 림프절(LLN) 세포를 OVA-유도 알레르기성 기도 염증 마우스 모델 및 n-핵산 처리 OVA-유도 알레르기성 기도 염증 마우스 모델로부터 분리하였다. 또한 림프구를 phorbol-12-myristate-13-acetate 및 ionomycin과 함께 4시간 동안 배양하였고 상기 세포는 제조사(BD Biosciences)의 지침에 따라 항-CD25-APC(0.2 mg/mL), 항-CD4-FITC(0.5 mg/mL), 항-Foxp3-퍼시픽 블루(0.2 mg/mL) 및 항-IL-4-PEcy7(0.2 mg/mL)로 염색하였다.

[0040] **실시예 9: 총지질의 분획**

[0041] 본 발명자들은 본 발명의 해삼 자숙액의 총 지질에서 Sep-Pak Silica plus long cartridge (Waters, USA)를 이용하여 중성지질(neutral lipid, NL), 당지질(glycolipid, GL) 및 인지질(phospholipid, PL) 분획을 수득하였다. 먼저 클로로포름(chloroform) 15 mL를 카트리지(cartridge)에 통과시켜 세척하였고 추출한 총 지질 80 mg을 카트리지에 채운 후 다시 클로로포름 15 mL를 카트리지에 통과시켜 둥근 플라스크에 받은 다음 회전증발기(rotary evaporator)로 건조한 후 정량하여 중성지질(NL)을 수득하였다. 이어서 아세톤(acetone) 15 mL를 카트리지에 통과시켜 용출되어 나온 것을 상기와 동일한 방법으로 건조한 후 정량하여 당지질(GL)을 수득하였고(Stephane *et al.*, *Journal of Chromatography A*, Volume 1047, Issue 1, Pages 77-83, 2004) 메탄올(methanol) 30 mL를 카트리지에 통과시켜 용출되어 나온 것을 회전증발기로 건조한 후 정량하여 인지질(PL)을 수득하였다. 상기 과정을 여러 번 반복해서 분석에 필요한 시료를 확보하여 사용하였다.

[0042] **실시예 10: 지질의 정성 및 정량분석**

[0043] 본 발명자들은 중성지질의 class는 박층크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)을 이용하여 분획하였다. 먼저 중성지질 100 mg을 클로로포름 1 mL에 용해시켜 시료 농도를 조절하였고 TLC 플레이트(20 x 20 mm, 플레이트 실리카겔 60 F254, Merck)는 2.3% 붕산(boric acid)/에탄올 용액에 담근 후 105℃에서 60분간 건조시켜 실험에 사용하였다. 준비된 시료와 표준품을 TLC 플레이트에 점적한 후 전개용매 헥산/에틸에테르/아세트산 (70/30/1, v/v/v)으로 전개시킨 후 N2를 통과시킨 후 건조하였으며(Liu *et al.*, *Clin Infect Dis.* 1:52(3):e18-55, 2011) TLC 스캐너(CAMAG, TLC Scanner 4, USA)를 이용하여 정성 및 정량 분석을 하였다.

[0044] 또한, 당지질 100 mg을 클로로포름 1 mL에 용해시켜 시료 농도를 조절하였고 TLC 플레이트를 105℃로 설정한 드라이오븐(dry oven)에 넣어 60분간 활성화시킨 후 데시케이터(desiccator)에서 방냉하여 실험에 사용하였다. 준비된 시료를 표준품과 같이 TLC 플레이트에 점적한 후 전개용매 클로로포름/아세톤/물(30/60/2, v/v/v)이 포화된 전개조에서 전개시켰다. 상기 전개시킨 TLC 플레이트를 N2를 통과시켜 건조시킨 후 TLC 스캐너를 이용하여 정성 및 정량 분석을 하였다(Pongmuangmul *et al.*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Volume 6, Issue 3, Pages 192-197, 2016).

[0045] 아울러, 인지질 100 mg을 클로로포름 1 mL에 용해시켜 시료 농도를 조절하였고 TLC 플레이트를 105℃로 설정한 dry oven에 넣어 60분간 활성화시킨 후 데시케이터에서 방냉하여 실험에 사용하였다. 준비된 시료를 표준품과 같이 TLC 플레이트에 점적한 후 전개용매 클로로포름:메탄올:물 (65:35:6, v/v/v) 포화된 전개조에서 전개시켰다(Nasopoulou *et al.*, *Food Chemistry* Volume 100, Issue 2, Pages 560-567, 2007). 상기 전개시킨 TLC 플레이트를 N2를 통과시켜 건조시킨 후 TLC scanner를 이용하여 정성 및 정량 분석을 하였다.

[0046] **실험예 1: 해삼 추출물의 n-헥산 상에 의한 IL-10 발현의 증가**

[0047] 본 발명자들은 해삼 추출물 중 알레르기성 기도 염증(allergic airway inflammation)을 억제할 수 있는 성분을 결정하기 위해 해삼 추출물을 액상 염색 추출법을 이용하여 4상(4 phases)으로 분획하였다. 상기 수득한 4상은 상부(n-헥산 추출물; 지방산-풍부; 0.0436±0.001 g), 중간(알코올 추출물; 탄수화물-풍부; 0.28 g±0.05 g), 하부(고체 추출물; 단백질 및 다당류-풍부; 1.24 g±0.06 g) 및 찌꺼기 상으로 분류하였다. 또한 n-헥산 상으로 처리한 비장세포는 실험한 모든 시점에서 IL-10 발현의 유의한 증가를 보인 반면 다른 3상에서는 IL-10 발현에 영향을 미치지 않았다(도 3). 상기 해삼 자숙액의 추출물 분류 결과를 하기 표 2에 요약하였다.

표 2

[0048] 해삼 자숙액의 추출물 분류

해삼 자숙액	15.552 g
헥산층 (hexane phase) 총지질	0.0436 ± 0.001 g
단백질층 (solid phase)	1.24± 0.06 g
알코올층 (Saponin Carbohydrate)	0.28± 0.05 g

[0049] **실험예 2: n-헥산 상의 지방산 분포**

[0050] 본 발명의 일 실시예에 따라 해삼 추출물의 가스 크로마토그래피 분석은 Menhaden 오일을 표준으로 사용하여 각각 다른 지방산을 나타내는 47개의 피크를 나타내었다(도 4). 총 지방산의 5% 이상을 나타내는 개별 지방산은 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-7, 20:4n-6, 및 20:5n-3로 나타났다. 가장 풍부한 지방산은 16:1n-7(총 지방산의 15.22%), 20:5n-3(전체 지방산의 11.46%, EPA)로 나타났고 분지 사슬 지방산(BCFA)은 전체 지방산의 약 5.06%를 차지하였다. 또한 n-3 PUFAs(19.36 %)가 n-6 PUFA(11.96 %)보다 유의하게 더 많이 분포하고 있는 것을 확인하였다. 상기 해삼 추출물의 n-헥산 상 지방산 조성을 하기 표 3에 요약하였다.

표 3

[0051] 본 발명의 해삼 추출물의 n-헥산 상 지방산 조성

지방산	함량	지방산	함량
12:0	0.08	18:2n-6c	1.20
iso-13:0a	0.03	18:2n-4	0.27
13:0	0.40	18:3n-6c	2.64

iso-14:0a	0.55	18:4n-3b	0.65
14:0	2.09	20:0	1.09
iso-15:0a	2.10	20:1n-9	2.48
anteiso-15:0a	1.04	20:1n-7	0.65
15:0	1.03	20:2n-6c	0.79
iso-16:0a	0.42	20:3n-6c	0.30
16:0	11.35	20:4n-6c	6.44
16:1n-9	0.07	20:4n-3b	0.19
16:1n-7	15.22	20:5n-3b	11.46
TME-16:0a	0.92	22:0	0.76
16:1n-5	0.63	22:1n-13	0.12
16:2n-9	0.43	22:1n-11	0.56
16:2n-4	1.14	22:1n-9	0.91
17:0	0.92	22:1n-7	1.46
16:3n-4	2.40	21:5n-3b	0.60
16:3n-3b	0.22	23:1n-9	2.48
16:3n-1	0.19	22:5n-6c	0.59
16:4n-3b	2.59	b22:5n-3	0.58
16:4n-1	0.21	22:6n-3b	3.07
18:0	8.41	Σ BCFA	5.06%
18:1n-9	2.85	Σ n-3 PUFA	19.36%
18:1n-7	5.42	Σ n-6 PUFA	11.96%

[0052] **실험예 3: 알레르기성 기도 염증 개선**

[0053] 본 발명자들은 n-헥산 상 해삼 추출물의 알레르기성 기도 염증 개선 여부를 평가하였다. 먼저 n-헥산 단계의 항-염증 효과를 평가하기 위해 본 발명자들은 마우스에 n-헥산 상을 7회 투여한 후 OVA-alum 마우스에서 알레르기성 기도 염증을 유도하였다(도 5). 그 결과, AHR은 PBS 처리군과 비교하여 n-헥산 처리군에서 유의하게 감소하였다(도 6).

[0054] 또한 폐 조직병리학 분석 결과 PBS 처리군에서 염증세포의 명백한 침윤(infiltration)은 관찰되지 않았으나, PBS 처리군의 기관지 및 혈관 주변에서 더 많은 호산구가 관찰되었다(도 7). 또한, 배상세포(goblet cell)의 수와 크기는 PBS 처리군에서 알레르기성 기도 염증으로 증가하였으나, 이러한 기도 주위의 증식(hyperplasia)은 n-헥산 그룹에서 유의하게 감소하였다(도 8).

[0055] **실험예 4: 사이토카인 생산 수준**

[0056] 본 발명자들이 비장세포 및 BALF에서의 사이토카인 생산 수준을 관찰한 결과 Th2-관련 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13) 및 Th17-관련 사이토카인(IL-17)의 농도는 n-헥산 투여군의 비장 및 BALF에서 유의하게 감소하였고 Treg 세포와 관련된 TGF- β 및 IL-10은 BALF 및 n-헥산 투여군의 비장세포 배양액에서 유의하게 증가하였다(도 9 및 10). 또한 LLN에서 Foxp3 양성 세포의 집단은 n-헥산 추출물 투여군의 LLN에서 유의하게 증가하였고 Treg 세포 특이적 전사 인자로 알려진 Foxp3은 n-헥산 투여군에서 유의하게 증가했다(도 11 및 12).

[0057] 또한, 본 발명자들은 Treg 세포 모집(cell recruitment)을 결정하기 위해 폐에서 IL-10과 Foxp3(Treg 세포 특이적인 전사 인자를 암호화하는 유전자)의 발현을 평가한 결과 천식 유발 전의 n-헥산 투여군은 PBS+OVA 투여군보다 IL-10과 Foxp3의 발현이 유의하게 높게 나타났다(도 13).

[0058] 아울러 n-헥산(n-hexane)층의 지질성분 분석을 구성하는 비극성지질층, 트리글리세롤(triacylglycerol), 디아실글리세롤(diacylglycerol), 당지질(glycolipid), 인지질(Phospholipid) 중에서 IL-10의 발현 및 이에 대한 정량을 확인한 결과, 전식 개선 효능물질은 당지질층에서 가장 높은 천식 효능물질을 포함하고 있는 것으로 나타났다(도 14 및 15).

[0059] 결론적으로, 본 발명의 해삼 자숙액 추출물은 알레르기 호흡성 질환인 천식에 효과가 있고, 이러한 효과는 해삼 자숙액에 n-헥산(n-hexane), 에탄올(ethanol) 및 탄산나트륨(Na_2CO_3)으로 구성된 혼합 유기용매를 이용한 다분획층 분리방법을 통하여 제조한 n-헥산층의 지질성분에 의한 효과임을 확인하였다.

[0060] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식

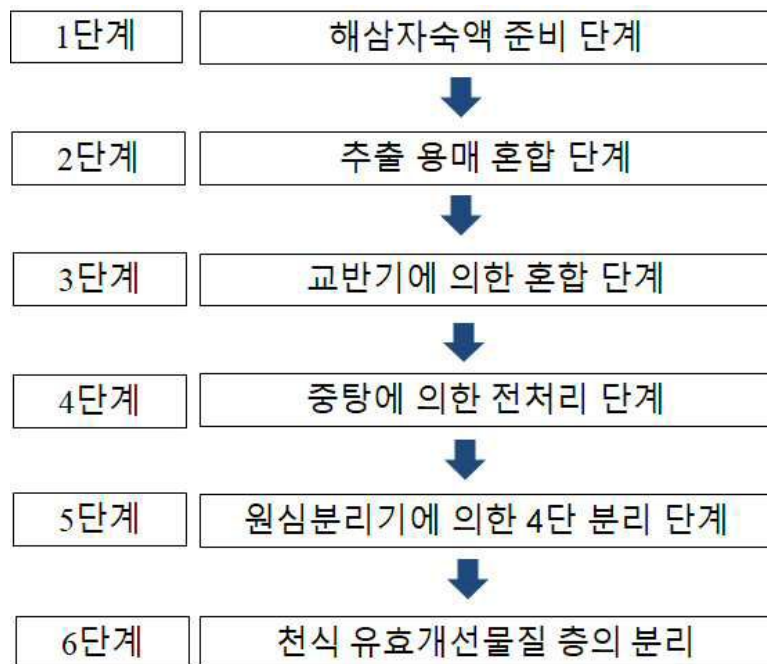
을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

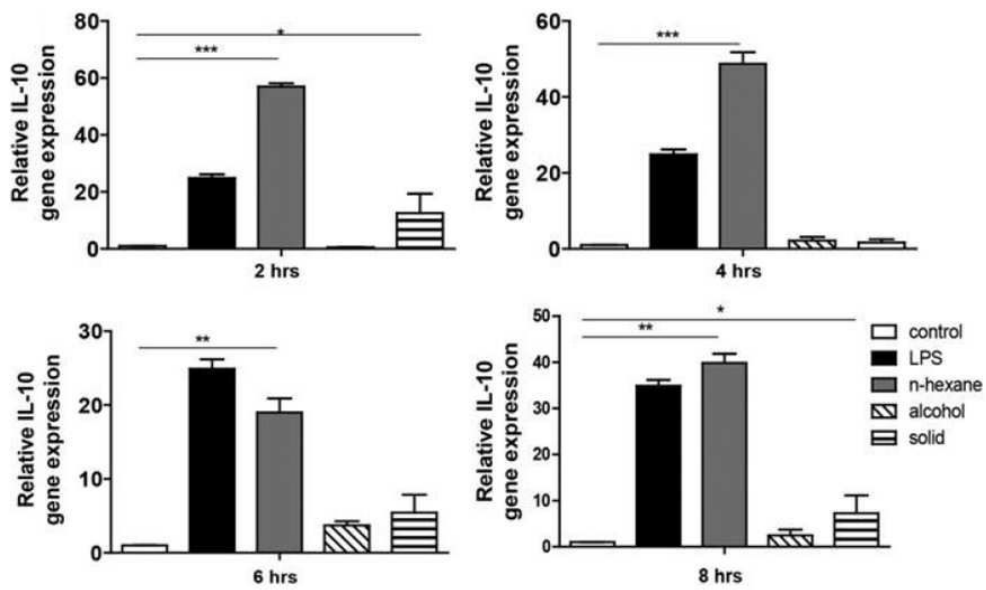
도면1



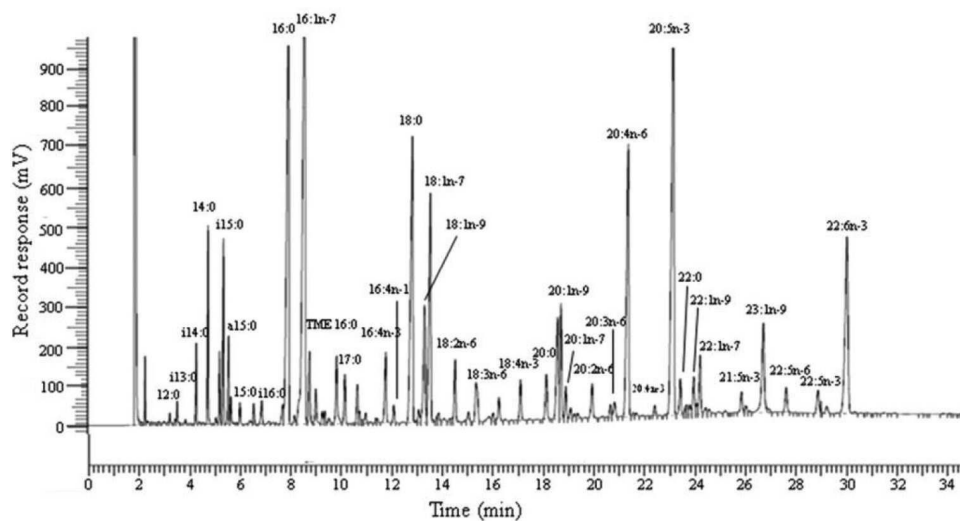
도면2



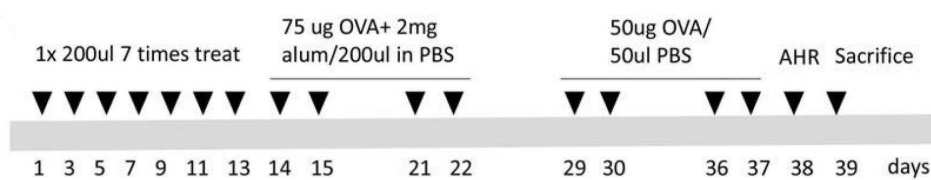
도면3



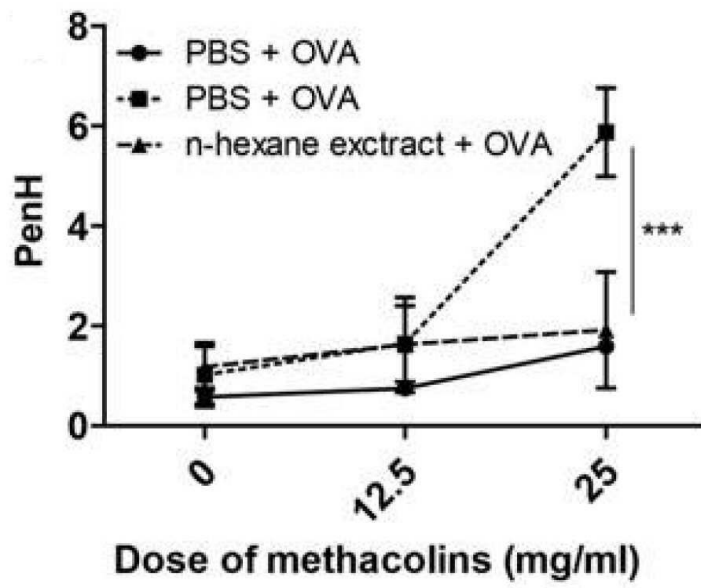
도면4



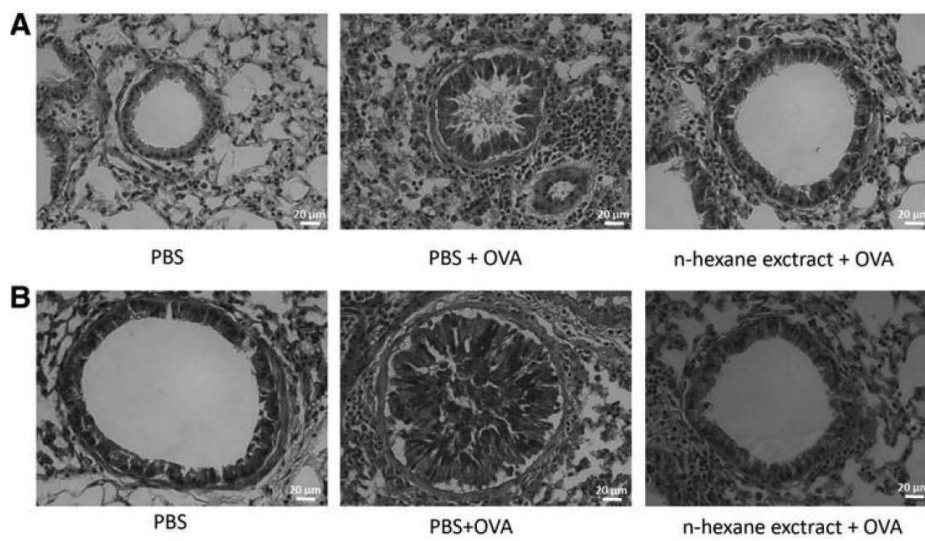
도면5



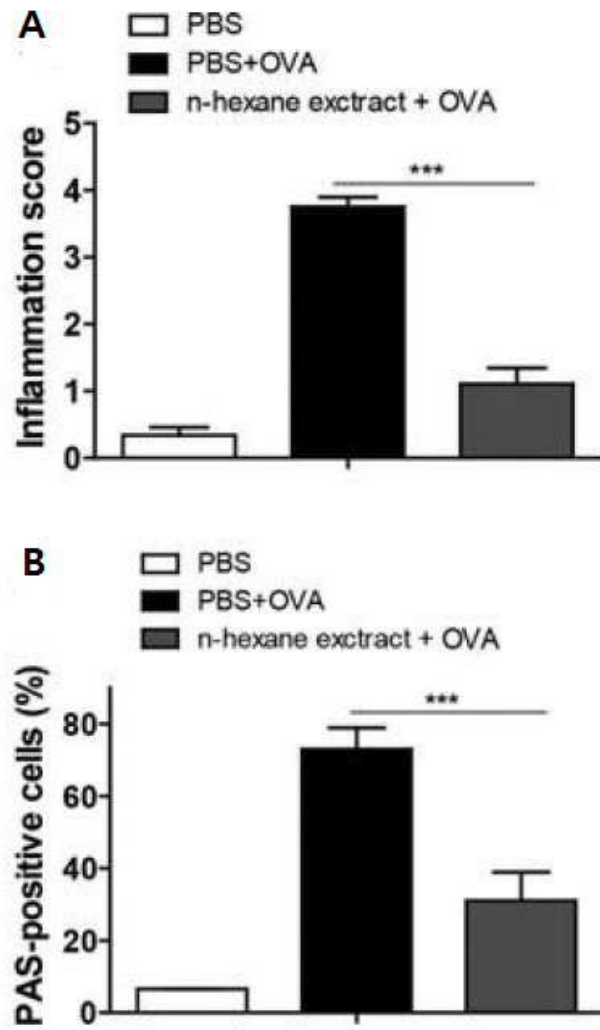
도면6



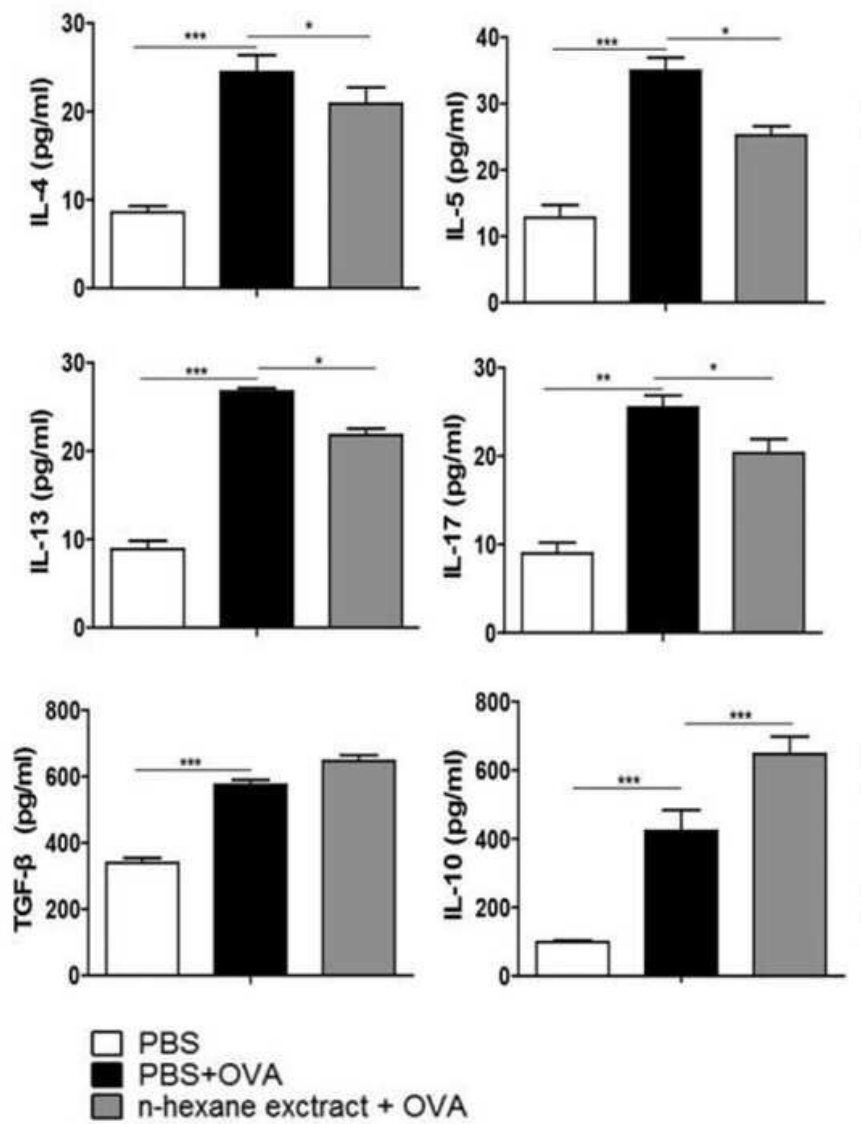
도면7



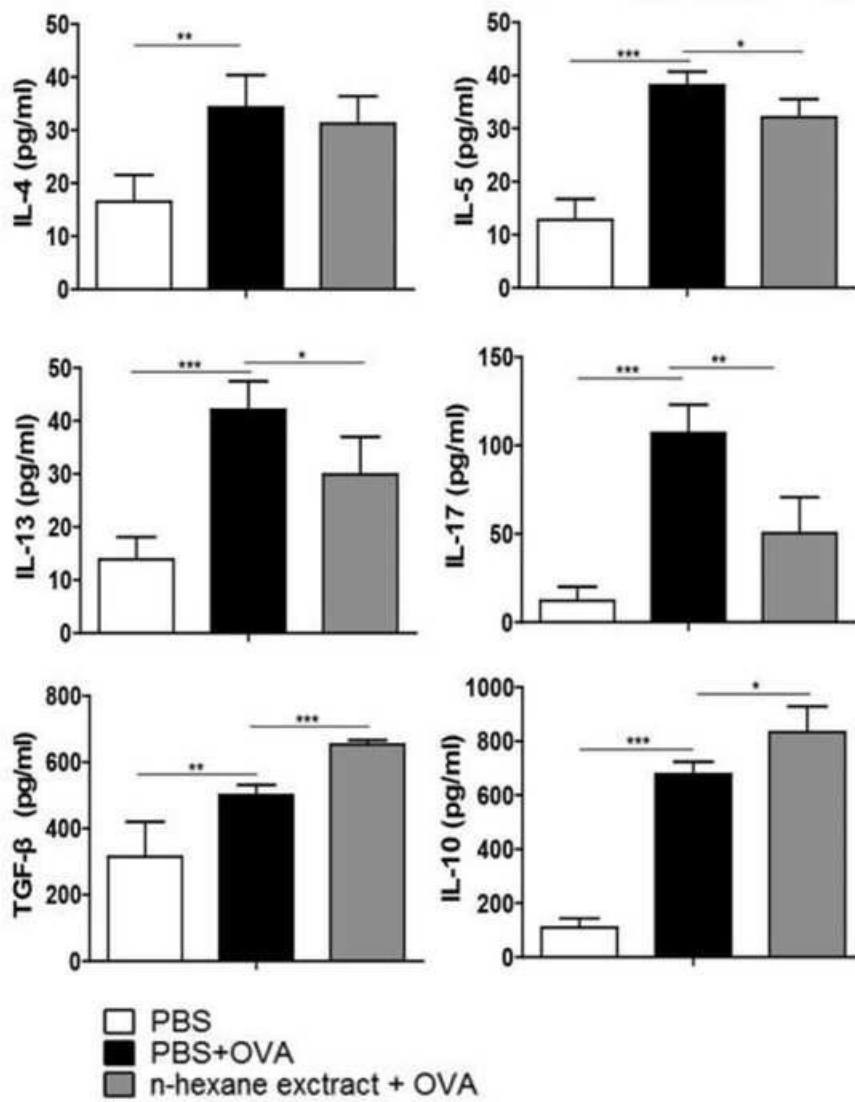
도면8



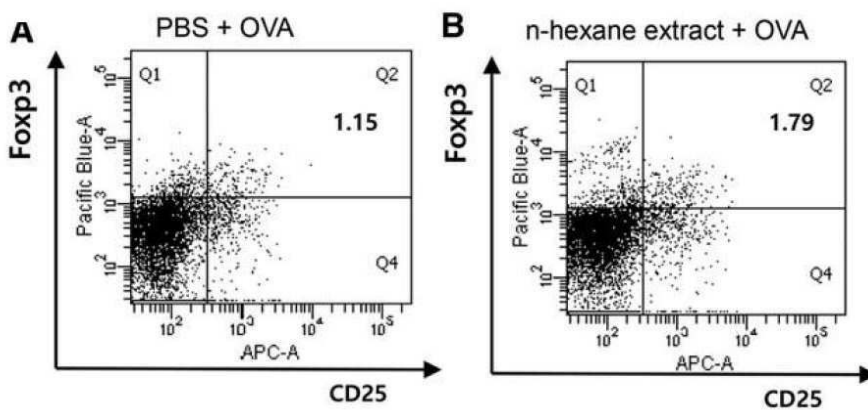
도면9



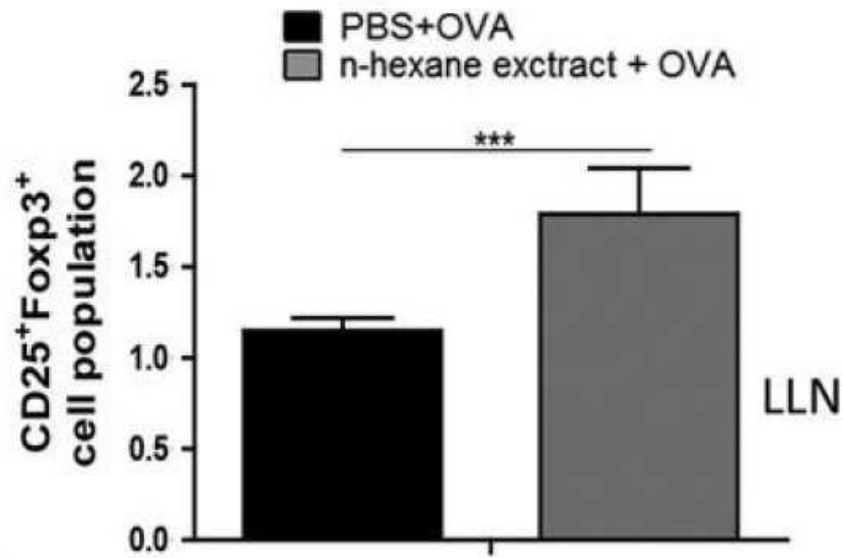
도면10



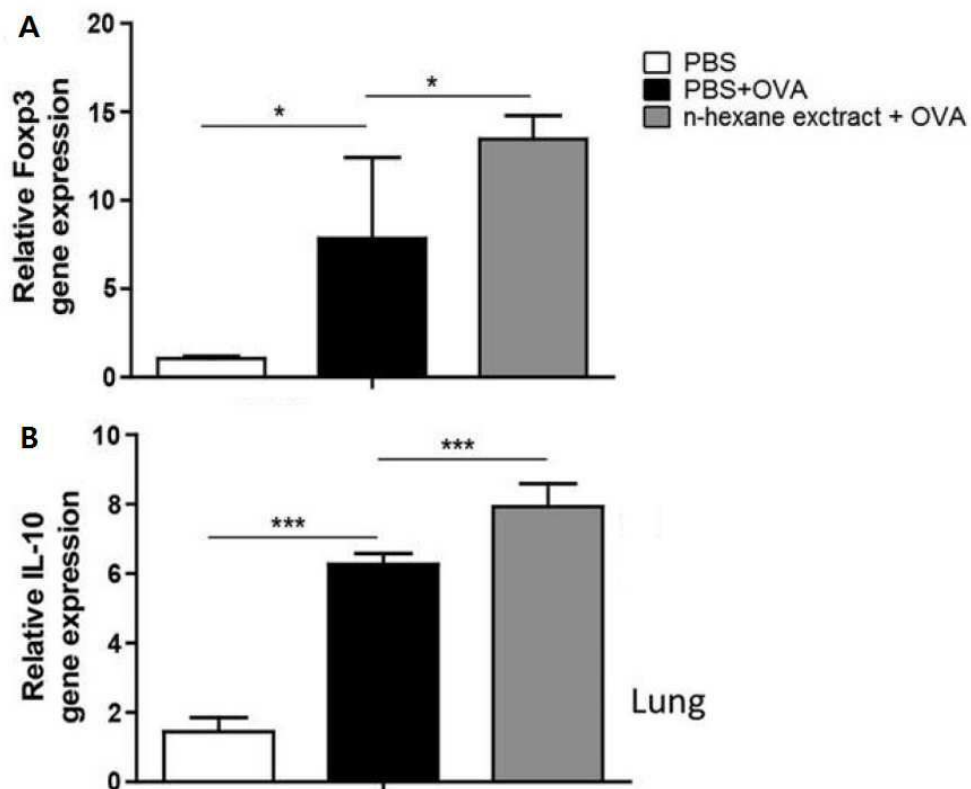
도면11



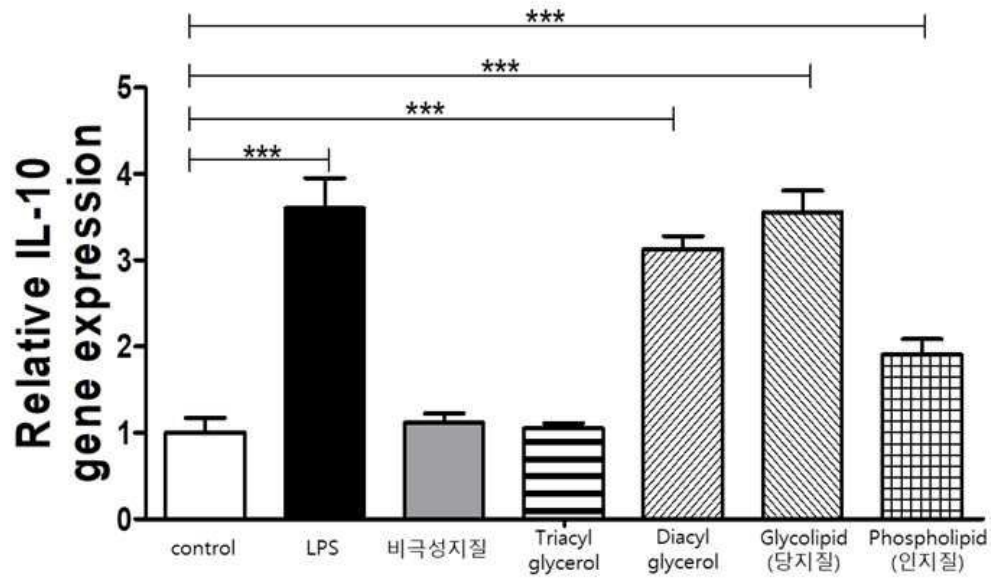
도면12



도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Isolation method for asthma improving substance from sea cucumber
steaming juice

<130> PD18-5661

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH F

<400> 1

taccccccaat gtgtccgt

<210> 2

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	GAPDH R	
<400>	2	
	aagagtggga gttgctgttg aag	23
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-10 F	
<400>	3	
	gctatgctgc ctggtcttac t	21
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-10 R	
<400>	4	
	tccagctggg cctttgtttg	20