



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0060893
(43) 공개일자 2018년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0030004
(22) 출원일자 2017년03월09일
심사청구일자 2017년03월09일
(30) 우선권주장
1020160158932 2016년11월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산광역시 남구 분포로 113, 201동 204호 (용호
동, 엘지메트로시티)
김민지
부산광역시 기장군 정관면 방곡로 39, 103동 205
호(가화만사성정관타워)
김꽃봉우리
부산광역시 사하구 승학로 221, 101동 1507호(괴
정동, 괴정한신A)
(74) 대리인
위병갑

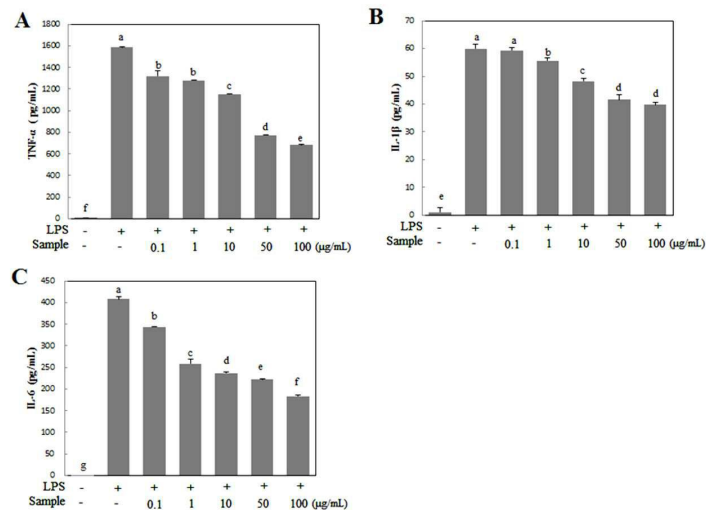
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 꽃지누아리 추출물을 함유하는 피부염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 꽃지누아리를 에탄올로 추출한 추출물에 대한 것이다. 본 발명의 꽃지누아리 에탄올 추출물은 염증 반응을 매개하는 NO 및 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 제어하는 것으로 나타났으며, NF- κ B 활성 억제와 더불어 MAPKs의 인산화를 효과적으로 억제하여, 염증억제 효과가 있으므로, 이를 염증성 질환의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 36/04 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525005360

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산기술지역특성화사업

연구과제명 부·울·경 인근해역 해조류를 이용한 염증억제 기능성소재 및 고부가가치 수산가공제품개

발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2016.03.01 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

꽃지누아리(*Grateloupia imbricata* Holme) 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 2

꽃지누아리 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 염증성 질환은 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진 및 다발성 경화증으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

- 1) 꽃지누아리를 건조하여 분말화하는 단계;
- 2) 꽃지누아리 건조 분말에 에탄올을 첨가하고 교반 추출하는 단계;
- 3) 원심분리하여 상층액을 취하는 단계;
- 4) 원심분리 후 남은 잔사에 에탄올을 가하여 교반 추출하는 단계; 및
- 5) 단계 3)의 상층액과 단계 4)의 잔사 추출물을 혼합하여 농축하는 단계를 포함하는 꽃지누아리 에탄올 추출물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꽃지누아리 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 꽃지누아리를 에탄올로 추출한 추출물의 항염증 효과에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 자가 면역질환으로 비 이상적인 면역관련 인자의 생성과 작용으로 발생한다. 지속적인 염증반응은 조직의 손상을 촉진하고 관절염, 당뇨병, 동맥경화 등과 퇴행성 면역질환의 원인이 된다. 특히, 만성적인 염증은 치료가 어려운 만성 및 퇴행성 질환의 원인이 되므로, 암, 심혈관 질환, 치매, 당뇨, 비만 등의 치료가 어려운 다양한 만성 및 퇴행성 질환 치료에 있어 '염증반응의 조절을 통한 접근'이 새로운 패러다임으로 부각되고 있다 (Aggarwal, et al., *Biochemical Pharmacology*, 72:1605-1621, 2006, Coussens, et al., *Nature*, 420:860-867, 2002, Hwang, et al., *Biochemical pharmacology*, 54:87-96, 1997, Turini, et al., *Annual Review of Medicine*, 53:35-57, 2002). 염증반응 시 IL-6(interleukin-6), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-1 β 등의 염증 매개 사이토카인의 생성은 염증반응에 관여하며, 염증반응을 조절하는 주요한 효소인 iNOS(inducible NOS) 및 COX-2(cyclooxygenase-2)가 NO(nitric oxide) 및 PGE2(prostaglandin E2)와 같은 다양한 염증매개들을

생산하여 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있고, 이들을 억제함으로써 염증질환을 억제할 수 있음이 보고되고 있다 (Moran EM. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 21(2):193-201. 2002). 또한, 이처럼 다양한 염증 매개체들의 발현은 전사인자인 NF- κ B(nuclear factor-kappaB), MAPK(mitogen-activated protein kinase)를 포함한 여러 가지 염증매개 신호 네트워크의 활성화를 통하여 외래인자의 탐식작용을 활성화시키고 염증반응에 관여하게 된다. 따라서 이들의 생성을 저해하고 조절할 수 있는 물질은 염증 질환을 치료하거나 예방하는 자원으로 활용될 수 있다.

[0003] 꽃지누아리는 제주의 바닷말 중 하나로, 식물계(Plantae), 홍조식물문(Rhodophyta), 홍조강(Rhodophyceae), 도박목(Halymeniales), 지누아리과(Halymeniaceae)에 속한다. 꽃지누아리는 적갈색 또는 황갈색으로 가죽질 또는 연골질이며 원기둥모양의 짧은 줄기에서 부채모양으로 넓게 펼쳐지며 한 두 번 두세 갈래로 갈라지고 끝 부분은 심하게 뒤틀린 모양을 하고 있고, 조간대 하부에서 자라는 특징이 있다 (제주의 바닷말, 아카데미서적).

[0004] 독성 위험이 적은 천연물 유래 활성 물질들에 대한 연구가 진행되는 추세에서, 염증성 질환 및 이와 관련된 질병을 억제하는 기능성 천연물질들을 발굴하기 위한 연구들이 진행되고 있으나, 아직까지 꽃지누아리에 대한 연구가 미비한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명에서는 꽃지누아리 추출물을 제조하고, 이의 염증 관련 인자들에 대한 억제 효과를 밝힘으로써, 이를 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 사용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 꽃지누아리 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 꽃지누아리 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0008] 아울러, 본 발명은 꽃지누아리 에탄올 추출물을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 꽃지누아리 에탄올 추출물이 염증 반응을 매개하는 NO, 염증성 사이토카인, iNOS 및 COX-2의 생성을 효과적으로 제어하는 것으로 나타났으며, NF- κ B 활성 억제와 더불어 MAPKs의 인산화를 효과적으로 억제하여, 염증억제 효과가 있으므로, 이를 염증성 질환의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 세포독성을 확인한 도이다:

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 2는 LPS 유도된 NO 생성량에 대한 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 억제 활성을 확인한 도이다:

LPS: lipopolysaccharide;

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 3은 LPS 유도된 염증성 사이토카인의 분비량에 대한 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 억제 활성을 확인한 도이다:

LPS: lipopolysaccharide;

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 4는 LPS 유도된 염증 관련 효소 (iNOS 및 COX-2)들의 발현에 대한 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 억제 활성을 확인한 도이다:

GIHEE: 꽃지누아리 에탄올 추출물;

LPS: lipopolysaccharide;

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 5는 LPS 유도된 염증 관련 NF- κ B 신호전달에 대한 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 억제 활성을 확인한 도이다:

GIHEE: 꽃지누아리 에탄올 추출물;

p-NF- κ B p65: 인산화된 NF- κ B p65;

LPS: lipopolysaccharide;

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 6은 LPS 유도에 따른 MAPKs 신호전달에 대한 꽃지누아리 에탄올 추출물의 농도별 억제 활성을 확인한 도이다:

GIHEE: 꽃지누아리 에탄올 추출물;

p-p38: 인산화된 p38;

p-ERK: 인산화된 ERK;

p-JNK: 인산화된 JNK;

LPS: lipopolysaccharide;

0.1: 0.1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

1: 1 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

10: 10 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물;

50: 50 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물; 및

100: 100 μ g/ml 농도의 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 7은 Croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 두께 (control)가 꽃지누아리 에탄올 추출물에 의해 감소되는 것을 확인한 도이다:

Control: Croton oil로 부종 유발된 마우스의 귀;

prednisolone: 양성대조군; 및

Grateloupia imbricata Holmes: 꽃지누아리 에탄올 추출물.

도 8은 Croton oil로 유발한 마우스 귀 부종반응에서 꽃지누아리 에탄올 추출물의 귀 조직의 경피 및 진피(내피)의 두께 감소 효과 (A); 및 조직 내의 비만 세포 (mast cell) 침윤 억제 (B) 효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명은 다양한 형태로 변경되어 구현될 수 있으며, 여기에 서 설명하는 구현예에 한정되는 것은 아니다.
- [0012] 일 측면에서, 본 발명은 꽃지누아리(*Grateloupia imbricata* Holme) 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 일 구현예에서, 상기 추출물은 물, 탄수소 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출된 추출물일 수 있으나, 에탄올로 추출된 추출물인 것이 더욱 바람직하다.
- [0014] 일 구현예에서, 상기 염증성 질환은 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬 유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예 컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결 막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진 및 다발성 경화증일 수 있으며, 피부염인 것이 가장 바람직하다.
- [0015] 본 발명에서 사용된 용어 "추출물(extract)"이란 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물 질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할수 있으며, 추출물의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출과정 을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다.
- [0016] 본 발명의 꽃지누아리 추출물은 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반 추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C₁-C₄의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있으나, 95% 에탄올 추출물이 더욱 바람직하다.
- [0017] 본 발명의 조성물은 꽃지누아리 뿐 아니라 이와 동일 또는 유사한 기능을 지닌 다른 유효성분을 추가로 함유하 거나, 또는 상기 성분들과 상이한 기능을 지닌 다른 유효성분을 추가로 함유함으로써, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 제조될 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 꽃지누아리 에탄올 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 염증성 질환 또는 이의 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에 서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0019] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부

터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효용성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정된 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0026] 일 측면에서, 본 발명은 꽃지누아리 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0027] 일 구현예에서, 상기 추출물은 물, 탄수소 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으나, 에탄올로 추출한 추출물인 것이 더욱 바람직하다.
- [0028] 일 구현예에서, 상기 염증성 질환은 당뇨병, 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글란딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진 및 다발성 경화증으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미

로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0030] 본 발명의 식품 조성물은, 비제한적으로 각종 음료, 껌, 차, 과자, 비타민 복합체, 건강 보조식품 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명의 식품 조성물의 바람직한 섭취량은 섭취자의 상태 및 체중, 증상의 정도, 식품 형태, 섭취 기간에 따라 다르며 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 유효 성분이 1일 0.2mg/kg 내지 200mg/kg으로 섭취되도록 하는 것이 최적의 효과를 위해 바람직하다.

[0032] 일 측면에서, 본 발명은 꽃지누아리 에탄올 추출물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 꽃지누아리 에탄올 추출물을 제조하는 방법은 1) 꽃지누아리를 건조하여 분말화하는 단계; 2) 꽃지누아리 건조 분말에 에탄올을 첨가하고 교반 추출하는 단계; 3) 원심분리하여 상층액을 취하는 단계; 4) 원심분리 후 남은 잔사에 에탄올을 가하여 교반 추출하는 단계; 및 5) 단계 3)의 상층액과 단계 4)의 잔사 추출물을 혼합하여 농축하는 단계를 포함할 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 꽃지누아리 분말에 첨가하는 에탄올은 95% 에탄올일 수 있으며, 이를 꽃지누아리 건조 분말 중량의 10배 중량으로 첨가할 수 있다.

[0036] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. 꽃지누아리 에탄올 추출물 제조

[0039] 부산 기장군 연화리에서 채취한 꽃지누아리(*Grateloupia imbricata* Holme)를 담수로 깨끗하게 수세한 후 동결건조하여 분말화하였다. 꽃지누아리 건조 분말에 10배의 95% 에탄올을 가하고, 교반기 (H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 동안 상온에서 교반하여 추출하였다. 원심분리기 (UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였고, 이후 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 37℃에서 감압농축기 (RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하였으며, 농축하여 건조된 시료는 -20℃에서 보관하여 이 후 실험에 이용하였다.

[0041] 실시예 2. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 세포 독성 확인

[0042] 꽃지누아리 에탄올 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. 구체적으로, Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포 (한국세포주은행, KCLB 40071)를 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서, 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다. 상기 RAW 264.7 세포를 1×10⁶ cells/mL 농도로 웰 플레이트에 분주하고 20시간 전배양한 뒤, 꽃지누아리 에탄올 추출물(GIHEE)을 0.1μg/mL, 1μg/mL, 10μg/mL, 50μg/mL 및 100μg/mL로 각각 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 22시간 본배양하였다. 본배양 후 5mg/mL의 MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 2시간 동안 재배양하였다. 이를 4℃, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 각 웰에 DMSO를 첨가하고 이를 마이크로플레이트 리더 (Model 550, Bio-rad, Richmond, VA, USA)를 이용하여 540nm에서의 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다. 세포증식능은 측정된 흡광도를 이용한 하기의 수학적 식 1에 의해 계산하였다.

수학적 식 1

$$proliferationIndex(\%) = (sample O.D. / control O.D.) \times 100$$

[0044] 그 결과, 모든 꽃지누아리 에탄올 추출물 처리 농도에서 세포의 생존율이 음성대조군과 유의적인 차이를 보이지

않았음을 확인하였다 (도 1). 따라서 꽃지누아리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에 독성을 보이지 않는 것을 알 수 있었다.

[0046] 실시예 3. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 염증 관련 NO(nitric oxide) 생성 억제 활성

[0047] 꽃지누아리 에탄올 추출물의 항염증효과를 확인하기 위하여 LPS를 이용하여 RAW 264.7 세포에 염증을 유도시켜 NO를 과량 생성하는 조건을 만들고 꽃지누아리 에탄올 추출물을 처리하여 NO 생성량을 확인하였다. 구체적으로, RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/mL 농도로 24웰 플레이트에 분주하고 20시간 전배양한 뒤, 5% CO₂ 인큐베이터에서 20시간 동안 전배양하였다. 상기 전배양한 세포에 1 µg/mL의 LPS와 꽃지누아리 에탄올 추출물(GIHEE)을 0.1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL 및 100µg/mL로 각각 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 본배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 동량의 griess 시약 (1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 NaNO₂(sodium nitrite)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

[0048] 그 결과, LPS 단독 처리군은 LPS를 처리하지 않은 처리군에 비해 NO 생성량이 약 84% 이상 증가하여 염증반응이 충분히 활성화가 된 것을 알 수 있었으며, LPS와 꽃지누아리 에탄올 추출물을 농도별 (0.1, 1, 10, 50 또는 100 µg/mL)로 함께 처리한 군에서는 NO 생성량이 감소하여 꽃지누아리 에탄올 추출물이 염증에 의한 NO 생성 억제 활성을 보이는 것을 알 수 있었다 (도 2). 특히, 꽃지누아리 추출물의 농도가 100µg/mL일 때, LPS 처리군과 비교시 NO 생성량이 약 25%까지 감소하는 것을 나타냈다.

[0050] 실시예 4. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 염증성 사이토카인 분비 억제 활성

[0051] 꽃지누아리 에탄올 추출물의 염증성 사이토카인 분비량 억제 활성을 확인하기 위하여, 세포배양액 내의 TNF-α, IL-6 및 IL-1β 사이토카인의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/ml로 조절한 후 24 웰 플레이트에 접종하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 1µg/mL의 LPS와 GIHEE를 0.1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL 및 100µg/mL로 각각 처리하여 12시간 동안 재배양하였다. 한편, ELISA 마이크로플레이트에 capture 항체로서 anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 코팅시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 블로킹(blocking)하였다. 이 후, PBST로 세척하고 각 마이크로플레이트에 상기 세포배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 PBST로 세척하고 희석한 biotinylated anti-mouse TNF-α, IL-6 및 IL-1β 검출 항체와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 분주하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 다시 PBST로 세척하고 OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 반응 종료를 위해 2N의 H₂SO₄를 분주한 뒤 마이크로플레이트 리더를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0052] 그 결과, LPS를 처리한 대조군에서는 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 분비량이 각각 1584.51, 59.95 및 407.78pg/mL로 높은 분비량을 보였으나 꽃지누아리 에탄올 추출물을 처리하였을 경우 그 분비량이 농도 의존적으로 감소함을 나타내었다 (도 3). 특히 꽃지누아리 에탄올 추출물 50 µg/mL 농도에서 TNF-α 및 IL-1β 분비량이 각각 약 51% 및 30% 이상 감소함을 보였으며, IL-6 분비량은 가장 높은 처리농도인 100 µg/mL에서 약 54% 이상의 분비량 감소를 나타내었다.

[0054] 실시예 5. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 염증 관련 인자 발현 억제 활성

[0055] 꽃지누아리 에탄올 추출물이 세포질 내에서의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 2에서와 같이 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 웰 플레이트에 분주하여 20시간 동안 전배양한 후, 1µg/mL의 LPS와 꽃지누아리 에탄올 추출물을 0.1µg/mL, 1µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL 및 100µg/mL로 각각 처리하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 (MCO-15AC,

Sanyo, Osaka, Japan)에서 22시간 동안 본배양하였다. 본배양한 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후, 세포질 파쇄 버퍼(cytosol lysis buffer) (50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100 및 0.1% NP-40)를 첨가하여 30분간 4℃에서 세포파쇄하였다. 세포파쇄물을 15,520×g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거한 후 BCA 단백질 분석 키트(protein assay kit) (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하고 30 μ l의 세포파쇄물을 Laemmli의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin 등의 방법을 이용하여 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시킨 뒤 5% 스킵 밀크가 포함된 TBSS (tris buffered saline, pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체인 anti-mouse iNOS 및 COX-2를 각각 1:500으로 희석하고 블로킹한 멤브레인과 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 멤브레인과 1시간 반응시킨 다음 TBSS로 3회 세정하고, 세정한 멤브레인을 ECL 기질과 1 내지 3분 동안 반응시켜 단백질 밴드를 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

[0056] 그 결과, RAW 264.7 세포에 LPS (1 μ g/mL) 처리한 경우 확연히 증가한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현량이 꽃지누아리 에탄올 추출물 처리에 의해 현저히 감소된 것을 확인하였다 (도 4). 실시예 3의 꽃지누아리 에탄올 추출물의 NO 생성 억제 기전이 iNOS의 발현 억제를 통해 이루어진 것으로 유추되었다.

[0058] 실시예 6. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 NF- κ B 신호전달 억제 활성

[0059] 꽃지누아리 에탄올 추출물에 의한 세포질에서의 인산화된 NF- κ B p65 및 핵내에서의 NF- κ B p65의 발현량 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml 농도로 웰 플레이트에 분주하고 20시간 동안 전배양 후, 1 μ g/mL의 LPS와 꽃지누아리 에탄올 추출물(GIHEE)을 농도별 (0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL, 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL)로 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 22시간 동안 본배양한 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 PBS로 3회 세척한 후, 세포핵 파쇄 버퍼(nucleus lysis buffer) (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA 및 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4℃에서 세포파쇄한 후 15,520×g에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 세포파쇄물을 BCA 단백질 분석 키트로 단백질을 정량하였으며, 30 μ l의 세포파쇄물을 상기 실시예 5에서와 같은 방법으로 단백질 분리, 전사 및 블로킹하였다. 블로킹한 멤브레인을 1:500으로 희석한 anti-mouse phospho-NF- κ B p65 및 NF- κ B p65와 각각 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG를 1:2,000으로 희석한 뒤 상기 멤브레인과 상온에서 1시간 동안 반응시키고 TBSS로 3회 세정하였다. 그 후, ECL 기질과 1 내지 3분간 반응시켜 각각의 단백질 밴드를 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)로 가시화하였다.

[0060] 그 결과, 인산화된 NF- κ B p65 및 NF- κ B p65는 LPS처리에 의해 증가되었으며. 꽃지누아리 에탄올 추출물 처리 시 농도 의존적으로 발현이 감소하였다 (도 5). 특히, 50 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 꽃지누아리 에탄올 추출물 농도에서 NF- κ B p65 단백질 발현이 현저하게 억제됨을 확인하였다. 이 결과를 통해 꽃지누아리 에탄올 추출물이 대식세포에서 LPS에 의해 활성화되는 NF- κ B 신호전달을 저해하고 전사인자로부터 증가되는 다양한 염증매개물들의 단백질 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 보인 것을 알 수 있다.

[0062] 실시예 7. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 MAPKs 신호전달 억제 활성

[0063] MAPKs(Mitogen-activated protein kinases)의 발현량을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/ml의 밀도로 18시간 동안 전배양하고 GIHEE를 처리하여 30분 동안 본배양한 뒤 상기 실시예 5 및 6과 동일한 방법으로 인산화된 p38(p38 protein kinase), 인산화된 ERK(extracellular signal-regulated kinase), 인산화된 JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38, ERK 및 JNK의 발현양을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다. 웨스턴 블롯에 이용한 항체는 anti-mouse p-p38, p-ERK, p-JNK, p38, ERK 및 JNK (Cell Signalling Technology Inc., Denvers, MA, USA) 항체이며, 이를 1:500으로 희석하여 1차 항체로 사용하였다.

[0064] 그 결과, LPS 처리군에서는 대조군에 비해 상기 단백질들의 발현량이 확연히 증가하였으나, LPS와 GIHEE를 함께 처리한 경우 LPS 처리군에 비해 MAPKs의 인산화가 GIHEE 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다 (도 6).

[0066] **실시예 8. 꽃지누아리 에탄올 추출물의 피부염 억제 효과 확인**

[0067] 6주령의 ICR 마우스에 꽃지누아리 에탄올 추출물을 10, 50 및 250 mg/kg · body weight 농도로 각각 200 μ l씩 경구투여하였다. 추출물 투여 한 시간 후, 오른쪽 귀에 25mg/mL 파두유(croton oil)를 20 μ l/ear 농도로 도포하였다. 파두유 처리 5시간 후, 마우스의 귀 두께를 측정하였으며, 파두유 처리에 의한 두께의 증가를 부종의 형성으로 간주하였다. 또한, ICR 마우스의 오른쪽 귀에 꽃지누아리 에탄올 추출물을 100mg/mL 농도로 20 μ l씩 도포하고 15분 뒤에 50mg/mL 파두유를 20 μ l씩 도포하였다. 파두유 도포 6시간 뒤, 디에틸에테르로 마우스를 마취시키고, 귀 조직을 절제하여 100mg/mL의 포름알데하이드로 72시간 동안 고정하였다. 조직 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin) 및 톨루이딘-블루(toluidine-blue)로 염색하여 조직을 관찰하였다.

[0068] 그 결과, 꽃지누아리 에탄올 추출물을 투여한 모든 처리군이 파두유만 처리한 대조군에 비해 피부 염증에 의해 증가한 귀 두께 (귀 부종) 감소한 것을 알 수 있었다 (도 7). 또한, 꽃지누아리 에탄올 추출물을 투여한 경우에, 파두유만 처리한 대조군에 비해 경피 및 진피의 두께가 얇아진 것을 알 수 있었으며, 조직 내 비만세포(mast cell)의 침윤이 현저히 억제된 것을 알 수 있었다 (도 8).

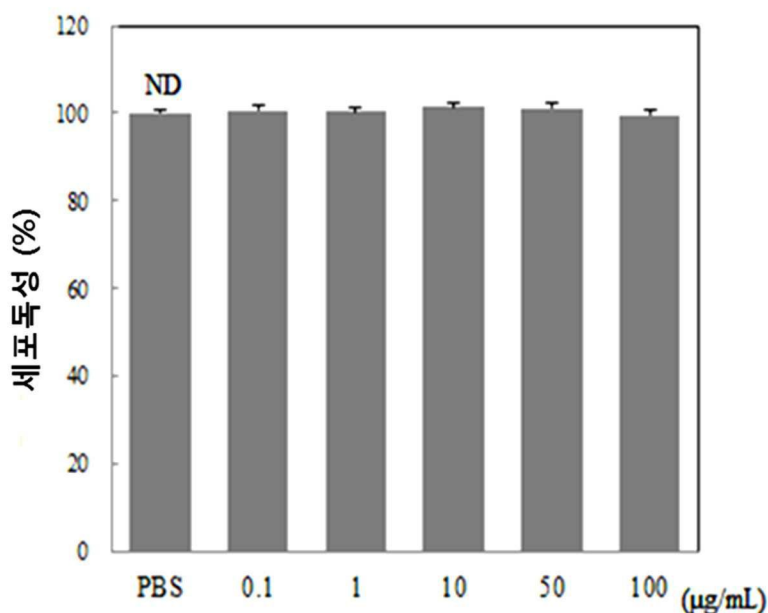
[0069] 이를 통해, 꽃지누아리 에탄올 추출물이 염증 질환들 중 특히, 피부염에 대한 억제 또는 치료 효과가 있음을 알 수 있다.

[0071] **실시예 9. 통계 처리**

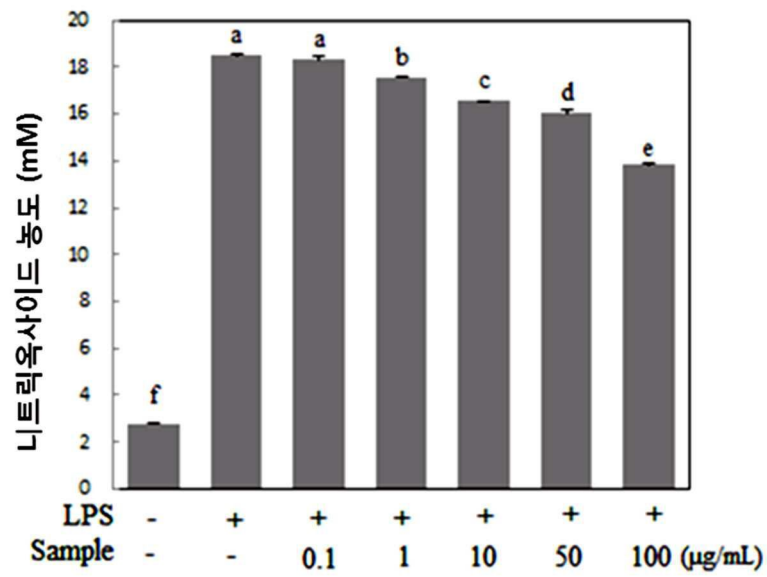
[0072] 본 발명의 실험 결과의 통계처리는 SAS program (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균값을 분산분석한 후, Duncan의 다중검정법으로 P<0.05 수준에서 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.

도면

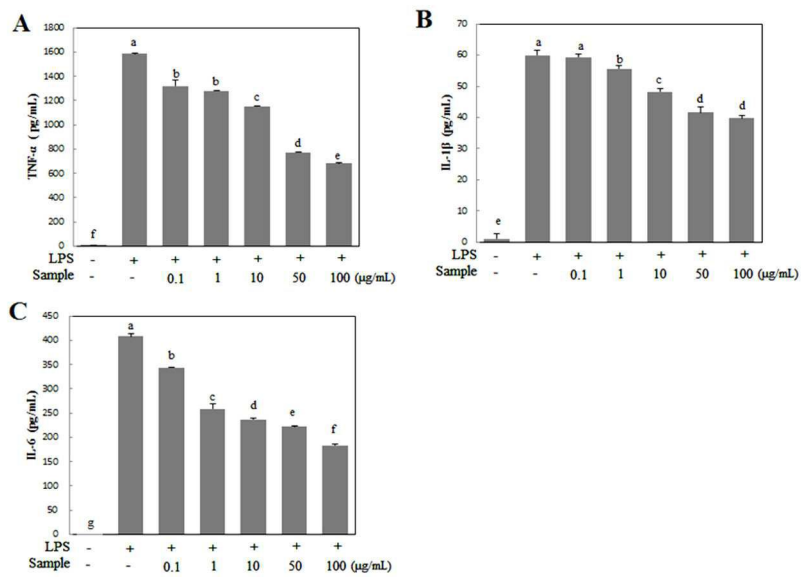
도면1



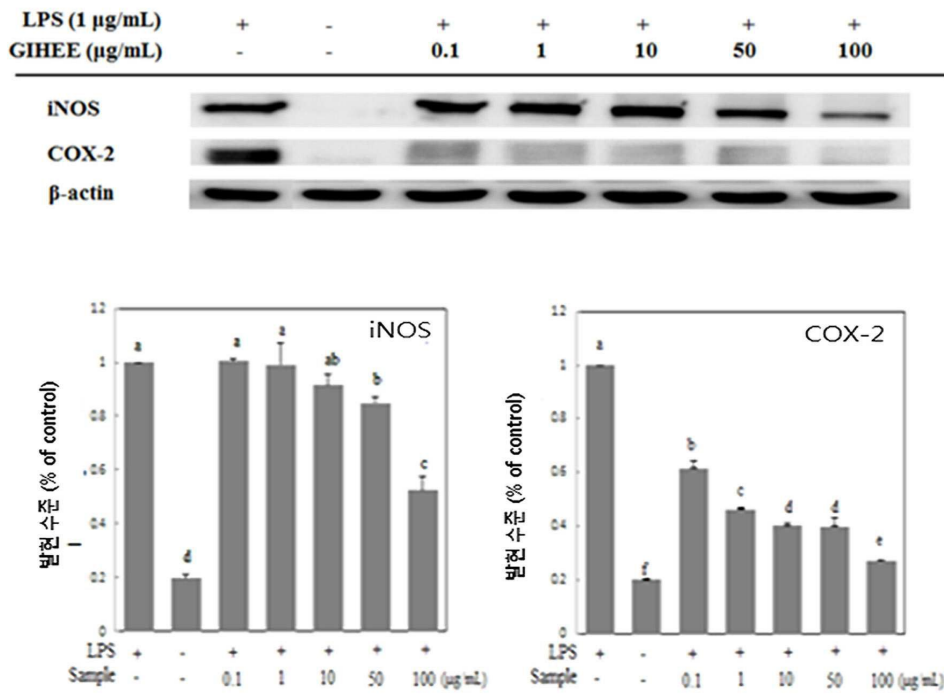
도면2



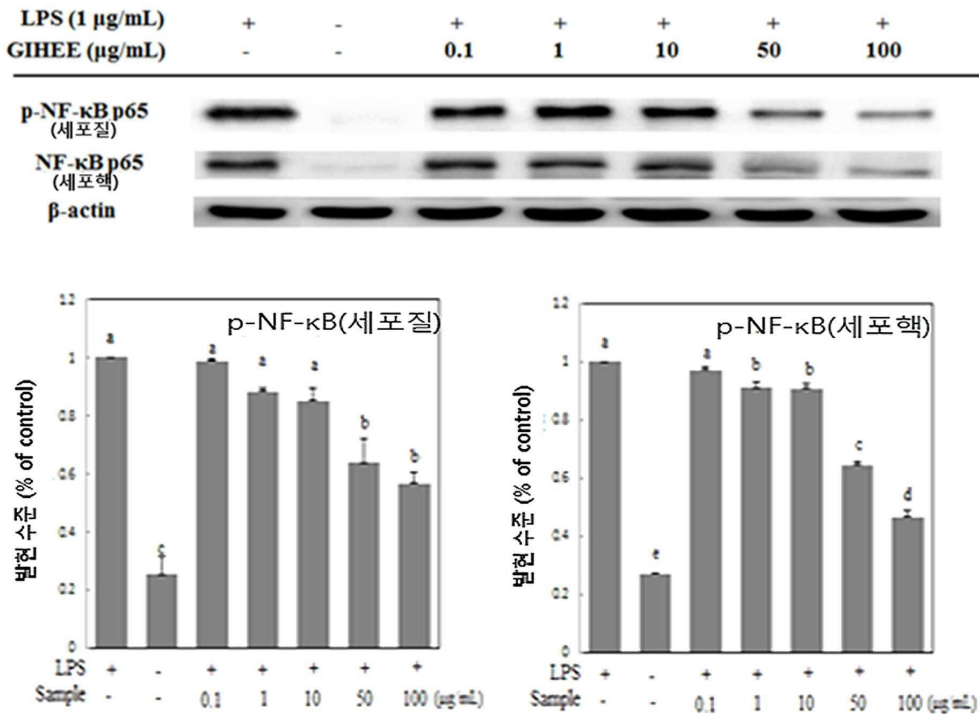
도면3



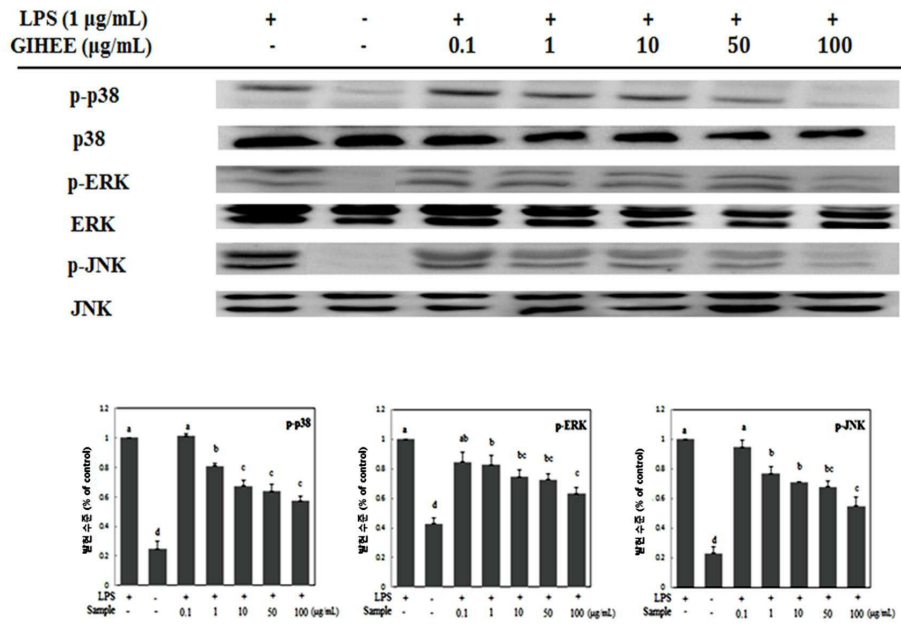
도면4



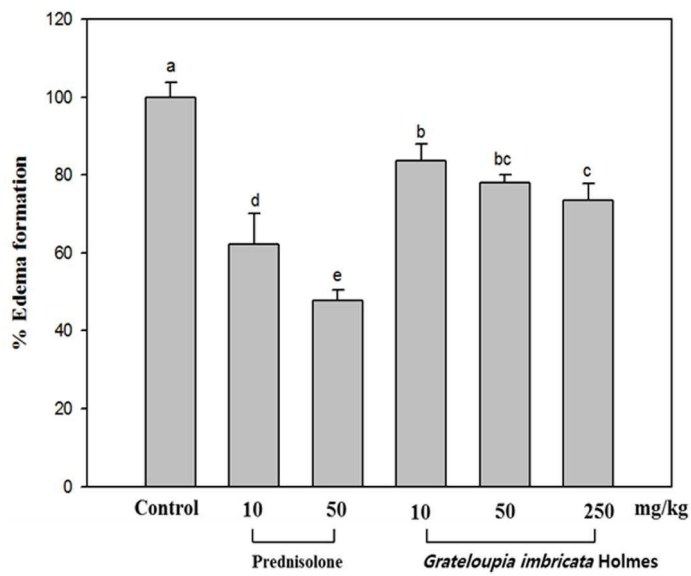
도면5



도면6



도면7



도면8

