

해면 및 극피동물로부터 만성질환 치료제
산업화 기술개발

(Development of industrial technology
for treating chronic diseases from
marine sponge (porifera) and
echinodermata)

영남대학교 약학대학

농림수산식품자료실



0006954

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “해면 및 극피동물로부터 만성질환 치료제 산업화 기술개발에 관한 연구”
과제(세부과제 “해면 및 극피동물류 황산화 다당체의 고부가가치 산업화 기술개발에 관한
연구”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 9 월 25 일

주관연구기관명 : 영남대학교

주관연구책임자 : 장현욱

연 구 원 : 서석종

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 김철호

요 약 문

I. 제 목: 해면 및 극피동물로부터 만성질환 치료제 산업화 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 해양생물(극피동물)로부터 만성질환(순환기계 질환 포함) 개선을 위한 기능성 식품 개발하는데 있으며, 연구 필요성은 다음과 같다.

○ 기술적 측면

해면과 극피동물에는 다양한 생리기능성 물질이 풍부하게 존재하여 기능성 식품소재 및 의약품소재로의 고도 이용이 기대되는 것으로 최근의 연구에 의해 속속 밝혀지고 있으며, 해면과 극피동물 성분 중 1→3-결합 α -L-fucose를 골격으로하는 황산화후코스(Fucose) 다당류는 혈관평활근세포에 증식과 혈관협착을 감소시키는 기능을 갖고 있는 물질 군에 속하며 선행 기초연구 결과 혈관평활근세포에 증식과 혈관협착억제작용, 혈전생성 억제 및 기 형성된 혈전의 조기용해 가능성 등이 보고된바 있다.

극피동물류조직에서 아직 보고되지 않은 새로운 Sialic acid-glycosaminoglycan 함유 황산화 다당류 추출기술개발로 암전이억제, 혈관질환 예방, 치료기술을 개발할 필요가 있으며, 황산잔기를 손상시키지 않은 상태로 추출하여 경제성을 갖춘 기능성 식품 신소재화를 위한 연구 및 기술개발이 필요함.

○ 경제·산업적 측면

국내 연근해 수산물 중 해면과 극피동물의 지선 어민의 주요 소득원뿐만 아니라 주요 식품소재로서의 위치를 점하고 있으며, 해면과 극피동물에는 다양하고 강력한 생리활성 성분을 다량함유하고 있어 고부가가치 활용을 위해 기존의 식용 위주의 소비를 탈피하여 질병예방치료에 도움이 되는 새로운 기능성 식품 소재화 기술 개발, 관련 산업을 육성 발전이 필요함.

○ 사회·문화적 측면

해면과 극피동물의 현장 양식을 통한 오염 수역의 환경개선 효과, 환경 친화적 해양생물산업 발달의 기반 구축 및 해양생물의 생태계 및 해양생물 자원의 보존 관리측면에서 개발이 필요함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1차년도 (2007.9.20-2008.9.19)

염증 및 알러지성질환 개선 효능 규명

○ 해면과 극피동물을 이용하여 열수 및 유기용매 추출물제조

- 불가사리 조추출물의 항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색
- 해면 (예쁜이, 호박) 조추출물의 항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색

순환기계 혈관질환 개선용 활성 검색

- 사람의 동맥평활근세포 (HASMC)에 TNF- α 처리후 MMP-9분비와 동맥경화관련탐색에서 Zymography assay
- 동맥평활근세포(HASMC)에 대한 세포독성을 확인과 세포성장 저해 정도를 확인.
- 불가사리,해면의 EtOAc 분획의 유효성분중 당지질 ganglioside GM1, M3, lactosylceramide (LC)유사물질 존재확인

2차년도 (2008.9.20-2009.9.19)

염증 및 알러지성질환 개선 효능 규명

- 불가사리 대량 분획실시-협동기관에 재료 제공
- 불가사리 Butanol 분획을 다시 subfractionation을 하여 12종류의 분획을 획득
- Subfraction 중 비교적량이 많은 fr8 (4.43g)으로부터 활성물질 분리 및 구조결정
- 불가사리 조추출물의 항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색

순환기계 혈관질환 개선용 활성 검색

- Zymography로 확인된 불가사리 EtOAc 처리군의 MMP-9 저해능을 면역학적 방법으로 증명
- 불가사리 EtOAc에 의해 MMP-9이 transcription level에서 줄어드는 것을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시
- TNF- α 처리 후 p-ERK의 activation에 의해 MMP-9의 생산이 조절 받는 것을 증명하기 위해 p-ERK specific inhibitor, U0126을 사용하여 MMP-9의 활성을 측정
- 사람의 동맥평활근세포(HASMC)에 TNF- α 를 처리하였을 때 증가하는 세포의 이동도를 EtOAc 분획 처리로 저해할 수 있음을 증명
- TLC(thin layer chromatography)로 해면의 EtOAc 분획을 점적 후 분리된 각각의 물질을 회수한 후 zymography로 활성물질 확인
- 불가사리 EtOAc fraction에서 TLC로 분획된 4개의 물질들을 Maldi-Tof를 사용하여 각각의 물질의 순도와 이동도 peak를 측정하여 강글리오 사이드 표준물질과 비교
- 불가사리 EtOAc 추출물을 먹인 마우스의 혈중콜레스테롤수치와 중성지방의 함량조사

3차년도 (2009.9.20-2010-9.19)

- 불가사리 대량 분획실시: 협동기관에 제공
- 불가사리 Butanol 분획을 다시 subfractionation을 하여 비교적량이 많은 fr7 (1.8g)및 fr8 (4.43g)으로부터 활성물질 분리 및 구조결정
- 불가사리 조추출물의 항천식 작용효능 검색
- 호박해면 조추출물의 항염증작용효능 검색

순환기계 혈관질환 개선용 활성응용

- 불가사리 EtOAc 추출분획의 항비만 및 항염증관련 신호전달관련 ERK인산화 조절기전을 분자수준에서 확인
- 염증성 사이토카인인 TNF- α 로 활성화된 세포염증 및 이로 인한 비만관련성을 불가사리 EtOAc 추출분획의 억제기전을 규명. 이는 혈관평활근세포가 순환기계 혈관질환유발시 혈관협착을 유도하는 MMP-9생산을 전사와 번역단계에서 억제함을 규명.
- 순환기 혈관질환진행시 MMP-9유전자의 전사에 영향을 미치는 세포신호전달 단백질인 ERK활성 억제능을 Western-Blotting으로 확인.
- TNF- α 로 유도된 인산화 ERK의 증가는 불가사리 EtOAc 추출분획의 투여군에서 감소확인.
- 순환기계 혈관질환유발시 혈관협착을 유도하는 MMP-9 유전자 상류의 전사조절확인: 전사조절인자인 NF-kappaB의 혈관평활근 세포핵내의이동을 Western-Blotting으로 관찰.
- 혈관평활근 세포의 핵단백질을 추출하여 NF-kappaB의 양적변화를 확인: 불가사리 EtOAc 추출분획은 혈관평활근세포에서 NF-kappa의 핵내이동을 억제함을 확인.

IV. 연구개발결과

지금까지 실험에 사용한 아무르 불가사리 및 2종류의 해면 추출물을 이용한 실험결과를 정리하면 다음과 같다.

1차년도

- 불가사리 및 2종류 해면 (540; 예쁜이 해면, 440; 호박해면)으로부터 열수 및 유기용매를 이용한 분획 추출물 제조 (Methanol, Hexane, ethylacetate, butanol 용매분획)
- 쥐골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD2 및 LTC4의 생성량을 검토한 결과 불가사리 추출물에서는 유일하게 butanol 분획에서 활성이 검출되었음. LTC4 생성량의 IC50 값은 22.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 강한 저해활성. RAW264.7 macrophage에 LPS처리 시 생성되는 nitric oxide (NO)에 미치는 영향을 검토한 결과 hexane 분획 및 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성을 나타내었다.
- 아라키돈산 대사계의 율속효소인 PLA2의 저해활성을 검토한 결과 특히 염증성 PLA2로 알려진 type IIa, V에 대하여 강한 저해활성을 나타내었다.
- 비만세포 자극 시 탈과립반응의 지표로 사용되는 β -Hexosaminidase (β -Hex)효소 억제활성을 검토한 결과 Butanol 및 EtOAc분획에서 강한 활성을 나타내었다
- 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 에서 COX-2 의존적인 PGD2 생성을 억제.
- 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 에서 5-LOX 의존적인 LTC4 생성을 억제.
- 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 에서 비만세포로부터 탈과립 억제.
- RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 미치는 영향을 검토한 결과 해면440의ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성.,
- 불가사리, 해면 EtOAc fraction은 500-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도범위에서 MMP-9에 대한 저해 작용
- XTT 실험결과 불가사리, 해면의 EtOAc 분획0 - 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 범위 무독성
- 불가사리, 해면의 EtOAc 분획의 유효성분에 의한 작용여부를 동맥평활근세포에서 확인진행.

2차년도

- 불가사리를 유기용매로 분획한 후의 수율: Methanol층: 241g, Hexane층16.55g, Ethylacetate 6.83g, Nutanol층 34g, 물층 218.8g
- Butanol 분획을 다시 column chromatography로 12개 분획 분리
- 이들 분획 중 비교적 함량이 많은 Fr8 (4.43g)에서 7개 단일물질 분리 및 일부 구조결정
- 쥐 골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD2 및 LTC4의 생성량을 검토한 결과 불가사리 butanol추출물을 subfraction에서 얻어진 12개 분획에서 COX-2 의존적인 PGD2 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획7, 8에 비교적 강한 활성을 나타냄
- LTC4 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획 4,7,9,11,12 비교적 강한 활성을 나타내었음
- 탈과립 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 분획1,2,4에서 비교적 강한 활성을 나타내었음
- Butanol 분획이 항원-항체로 유도한 1형 알러지 동물모델인 PCA반응을 억제함으로써 항알러지 활성을 가지고 있음을 확인, IC50 값은67.5 mg/kg
- OVA/Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 호산구의 침윤 억제 작용으로 항천식 작용 가짐
- RAW264.7 macrophage에 LPS처리 시 생성되는 nitric oxide (NO)에 미치는 영향을 검토한 결과 불가사리 hexane 분획 및 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성을 나타내었으며, iNOS발현이 NF- κ B 억제에 의함.
- AW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 미치는 영향을 검토한 결과 해면440 (호박해면)의 EtOAc분획에서 저해활성을 나타내었으며 이 반응에는 iNOS 발현 억제의 함이 밝혀졌음
- LPS를 처리한 macrophage에서 TNF- α 생성억제 반응은 나타내지 않았음
- 불가사리의 EtOAc 는 동맥평활근세포의 MMP-9 생산을 농도 의존적으로 저해
- 불가사리 EtOAc는 동맥평활근세포의 MMP-9 mRNA 생산을 농도 의존적으로 저해
- U0126에 의해 TNF- α 로 activation 된 동맥평활근 세포의 MMP-9의 생산이 줄어들음을 Zymography를 통해 확인하였다
- 불가사리 EtOAc 분획은 동맥평활근 세포의 gelatin 막을 통한 이동을 1000 μ g/ml 농도에서 basal level 까지 저해함을 확인함
- 활성이 있는 2개의 분획중 한 개의 분획에서 단일 peak를 검출하였으며 NMR 분석진행중임 TLC를 사용하여 분리된 4개의 분획 중 2개의 분획에서 MMP-9 저해활성 확인
- 토탈콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 수치가 조금 감소

3차년도

- 불가사리 Butanol 분획 fr8 에서 7개 단일물질 분리 한 후 구조결정: 3종류의 신규화합물 발견 및 4종류의 기지 saponin 화합물 확인
- 불가사리 Butanol 분획 Fr7에서 아미노산 분리 및 구조결정: 5종의 아미노산 구조결정
- 분리된 saponin의 항 염증활성 검색
기지의 화합물 4 및 5에서는 용량 의존적으로 RAW264.7 macrophage에 LPS 처리 NO에 생성 억제활성 확인
- 신규 화합물 1은 COX-2 의존적인 PGD2 생성을 억제하였으며, 2와 3 혼합물에서는 탈과립 반응 억제
- 화합물 4에서 NO 생성억제와 동시에 탈과립 반응 억제작용을 나타내었으며, 화합물 6 및 7

에서는 COX-2 의존적인 PGD2 생성 억제

- OVA/ Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 IL-4, eotaxin 및 IgE 생성억제
- 해면 ethylacetate 분획 (ECC)이 RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 생성억제에서 iNOS 발현조절기구 해석: NF-κB 억제에 의하여 mRNA의 발현이 억제됨
- 불가사리 EtOAc 추출분획의 항비만 및 항염증관련 신호전달관련 ERK인산화 조절기전 확인
- EtOAc 분획에 의해 TNF-α로 activation된 세포염증 및 비만관련성을 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근 세포에서 유도된 MMP-9의 생산을 전사와 번역단계에서 억제함.
- MMP-9유전자전사에 영향을 미치는 세포신호전달 단백질인 ERK 활성이 억제됨.
- TNF-alpha로 유도된 인산화 ERK의 증가는 불가사리 EtOAc 추출분획의 투여군에서 현저히 감소함.
- 불가사리 EtOAc 추출분획은 신호전달관련 ERK인산화 조절함
- MMP-9 유전자의 상류에 위치하여 전사조절에 영향을 미치는 전사조절단백질의 하나인 NF-kappaB의 혈관평활근 세포핵내의 양적감소를 유도함.
- 핵내로 이동한 NF-kappaB는 혈관평활근 세포에서 불가사리 EtOAc 추출분획처리에 의해 혈관평활근 세포에서 NF-kappa의 핵내이동을 억제함.
- 불가사리 EtOAc 추출분획의 전사인자NF-kappaB의 핵내이동억제함
- 불가사리 EtOAc추출분획은 고지방성 식이 마우스 C57BL/6 (high-fat diet-fed C57BL/6 mice)에서 구강식이를 통해 체중감소 및 총지질함량 감소함.
- EtOAc 분획추출물을 대량으로 조제하여 실험용 생쥐에서 항염증-항혈관질환 메카니즘을 기초로 마우스의 체중감소를 유도함.
- 4주령 마우스의 6주동안 일반 식이군, 고지질 식이군, 고지질식이군 + EtOAc 분획추출물 식이군의 비교실험에서 혈중 콜레스테롤과 중성지질 Leptin등의 변화에서 효과입증.
- 6주간의 동물실험에서 복부의 총지방함량의 변화는 감소함. 해부후 복부의 지방덩어리는 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 명확하게 감소함. 간조직에서 고지질식이에 따른 지방간 피적이 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 명확하게 감소함.
- 불가사리 분획추출물의 동물식이시 체내지방합성억제, 지방축적의 억제 및 이들을 대사하는 간조직에서 지방간의 생성이 현저히 억제함.
- EtOAc분획추출물의 지방합성억제와 관련한 비만억제 활성은 심혈관계질환의 예방과 치료에 크게 기여함.
- 포피지질, 말초혈관 및 피하조직에서의 지질감소가 인정되며, 구강식이(10, 100 mg/kg의 투여량) 피하지방 및 복부비만의 지방함량이 감소함.
- EtOAc분획에서 활성 당지질은 monoglycoside-ceramide임을 확인.
- 당지질의 대량분리를 성공함.
- 분리한 당지질을 LC-MS/MS/MS분석을 실시하여 구조결정함 (12.5%W-10mMAF-5mMFA-Me(5)-1.25%W-10mMAF-5mMFA-50%PA-Me (20)(8); 20ml/min C30 (0.3 x 50mm).

V. 연구성과 및 성과활용 계획

지금까지 본 연구에서 얻어진 성과를 기술하면 다음과 같다.

1. 논문업적 : SCI 논문 3편 출간 , 1편 (accepted), 1편 투고 후 수정 후 재투고, 2편 투고 중
2. 특허 출원실적 : 불가사리 추출물을 이용한 특허 출원 3건, 해면 추출물 이용한 출원 2건
3. 학회 발표실적 : 3건

특히 본 연구에서 관목할 성과로는

1. 아무르 불가사리 추출물에서 항염증, 항 알러지 활성, 동맥경화 억제 활성 및 비만억제 활성을 최초로 발견한 점이라 할 수 있다.
2. 아무르 불가사리 추출물에 최초로 새로운 saponin 화합물 3종을 발견하였다.
3. 아무르불가사리는 국내 연안에 대량서식하고 있으며, 지금까지도 그 용도가 불분명하여 폐자원으로서 이용가치가 없었으나, 본 연구의 결과를 금후 사업화로 연계되면 그 파급효과는 상당하리라 사료된다.
4. 호박해면 및 예쁜이 해면에서 최초로 항염증, 항 알러지 활성 및 동맥경화 억제 활성을 가지고 있음을 확인하였다.
5. 산업화계획은 특허실시 및 기술이전에 관해서 산업계와 접촉할 계획이다.
6. 현재까지 알려진 항비만 식의약품 관련제품은 명확한 기전으로 인체적용가능한 것이 없으므로 산학협력단에서 관심을 가지고 기업화진행중임.

SUMMARY

(영문요약문)

The objective of this research is development of industrial technology for treating chronic diseases from marine sponge (porifera) and echinodermata. To archive our goal, we used one starfish, *Asterias amurensis* and two sponges, *Callyspongia elegans* and *Cliona celata* as materials.

Our results summarized as follows:

1. The steroidal saponins of starfish have been reported to have various bioactivities that include cytotoxic, hemolytic, antiviral, antibacterial, anti-inflammatory, and antifungal activities. We isolated, determined the seven asterosaponins from the *A. amurensis* and evaluated their anti-inflammatory activity using in vitro system. Among them, we found that three new asterosaponins and 4 known compounds. In addition, we isolated and determined 5 amino acids from the *A. amurensis*.
2. We also found that anti-allergic activity of butanol fraction of *A. amurensis* could be attributed at least in part to the inhibition of COX-2 dependent PGD₂, 5-LOX dependent LTC₄ generation as well as the inhibition of degranulation reaction.
3. We evaluated the ability of the ethylacetate fraction of marine sponge, *Cliona celata* (ECC) to regulate the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophage-like RAW264.7 cells. ECC dose-dependently inhibited both the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein and mRNA, resulting in decreased production of nitric oxide (NO). We found for the first time that ECC inhibits NF- κ B activation through the inhibition of I κ B degradation.
4. We also found that *Callyspongia elegans* extract showed anti-inflammatory activity through the inhibition of NO, PGD₂, LTC₄ and degranulation reaction.
5. Atherosclerosis is accompanied by the proliferation of human aortic smooth muscle cells (HASMC) and its movement into the intima. Many reports have indicated the involvement of gelatinases (MMP-9 and MMP-2) in this pathogenesis. The ethylacetate fractions from Starfish, *Asterias amurensis* (EFA) and *Cliona celata* (CEA), harvested from the Korean seaside have an inhibitory effect on MMP-9 and MMP-2 activities, as well as on the expression of MMP-9 in TNF- α induced HASMC in a dose-dependent manner. Also, they inhibited the migration of TNF-induced HASMC in transwells containing gelatin coated plugs. The cytotoxicity of EFA on HASMC was not detected in various doses (0 - 1 mg/ml).
6. For the mechanism(s) of anti-vascular diseases and anti-atherosclerotic activity in smooth muscle cells, we carried out the cellular and molecular experiments. In our analysis, it was revealed the phosphorylations of ERK in TNF- α induced cells were inhibited and NF- κ B

p65 level in nuclear extracts had decreased by EFA and CEA treatment. In addition, an ERK inhibitor U0126 treated cells exhibited the decreased MMP-9 activity in the zymographic assay.

7. From these results, it was found that the gelatinolytic activity was regulated 1) by enzymatic inhibition of both MMP-9 and MMP-2, as well as by the decreased production of MMP-9 via ERK pathways in EFA and CEA treated HASMCs. Taken together, it has been shown that EFA and CEA have a putative anti-atherosclerotic effect.

8. Effect of *Asterias amurensis* (EFA) with oral administration on lipid parameters and obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. We investigated the effect of dietary *Asterias amurensis* (EFA) to evaluate possible effects on the obesity in C57Bl/6J mice fed a high-fat diet (HD). In the HD-alone group, abdominal and back fat relative to total body weight were significantly higher compared with other groups including those fed normal diet (ND). Among the HD groups, final weight gains of the HD plus EFA group were lower compared with that of the control (HD-alone), especially in liver.

9. From the study on the activity-structure relationship, the acting compound was isolated and monohexose-ceramide has been determined by the TLC-LC-MS/MS/MS analysis.

10. The results showed that EFA exerts anti-obesity effects.

CONTENTS

Chapter 1	Summary of the subject of Research and Development -----	13
Chapter 2	Status of technical development on domestic and abroad-----	14
Chapter 3	Contents and results of the R&D's accomplishment-----	16
Chapter 4	Proportion of achievement on object and contribution to related fields -----	91
Chapter 5	Plan for applying of the results of R &D-----	92
Chapter 6	Information of the foreign scientific technologies collecting during research development-----	97
Chapter 7	References-----	97

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	16
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	91
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	92
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	97
제 7 장	참고문헌-----	97

제 1 장 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 목적

해양생물(극피동물)로부터 만성질환(순환기계 질환 포함) 치료제 개발에 필요한 후보물질 발굴을 연구의 최종 목적으로 하며 이를 위하여 다음과 같은 목표를 두고 연구를 수행한다.

1. 해양생물로부터 만성질환 치료제 개발을 위한 선행연구 결과 기술축적
2. 해양생물에서 분리한 황산화 다당류를 이용한 치료제 개발
3. 삶의 질 향상과 더불어 만성질환 환자의 증가로 부작용이 적고 장기간 복용 가능한 치료제나 식품의 개발 요구가 증대
4. 상대적으로 연구가 취약한 해양생물 이용한 만성질환 치료를 위한 식품의약품 개발요구 증대

1-2. 연구개발의 필요성

* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술
가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

○ 기술적 측면

- 유망 해양생물자원의 도출과 자원의 효율적 이용
- 해면과 극피동물의 sialyl 1→3-결합 α -L-fucose를 골격으로하는 황산화다당류의 추출기술개발
- 극피동물류조직에서 아직 보고되지 않은 새로운 Sialic acid-glycosaminoglycan함유 황산화 다당류 추출기술개발.
- 극피동물류 황산화 다당체 생체고분자의 건강기능성의 생물활성 응용화.
 - 해면과 극피동물에는 다양한 생리기능성 물질이 풍부하게 존재하여 기능성 식품소재 및 의약품 소재로의 고도 이용이 기대되는 것으로 최근의 연구에 의해 속속 밝혀지고 있음.
 - 해면과 극피동물 성분 중 1→3-결합 α -L-fucose를 골격으로하는 황산화후코스(Fucose)다당류는 혈관평활근세포에 증식과 혈관협착을 감소시키는 기능을 갖고 있는 물질 군에 속하며 선행 기초연구 결과 혈관평활근세포에 증식과 혈관협착억제작용, 혈전생성 억제 및 기 형성된 혈전의 조기용해 가능성 등이 보고.
 - 극피동물류조직에서 아직 보고되지 않은 새로운 Sialic acid-glycosaminoglycan함유 황산화 다당류 추출기술개발로 암전이 억제, 혈관질환 예방, 치료기술필요
 - 해면과 극피동물 함유 다당 중 1→3-결합 α -L-fucose를 골격으로하는 다당류의 생리기능성은 본 그룹이 선행 기초연구로서 밝혔으며, 황산잔기를 손상시키지 않은 상태로 추출하여 경제성을 갖춘 기능성 식품 신소재화를 위한 연구 및 기술개발이 필요하다. 즉, 기능성제제의 수요가 많고 함유 원료의 생산여건이 좋은 국내 여건을 감안할 때 집중적 연구개발

○ 경제·산업적 측면

- 유용 해면과 극피동물자원의 발굴을 통한 어민소득 증대 및 수산 양식업의 구조조정 효과
- 신 기능성 물질 대량생산의 기반 확립

- 고부가성 천연소재 기능성물질개발: 식품,
 - 지구환경문제해결: 폐기물처리, 지구 온난화 현상 해결
 - 극피동물류의 황산화 Sialic acid-Fucose함유 다당류의 무손상 추출기술개발
 - 극피동물류의 황산화 Sialic acid-Fucose함유 다당류의 기능성식품으로 재이용
- 보다 구체적으로는

■ 국내 연근해 수산물 중 해면과 극피동물의 지선 어민의 주요 소득원 뿐만 아니라 주요 식품소재로서의 위치를 점하고 있음.

■ 해면과 극피동물은 대부분 수분이 많고, 장기저장에 난점—주로 식용 소비에 국한된 특성. 새로운 부가가치 창출이 필요한 수산원료임.

■ 해면과 극피동물에는 다양하고 강력한 생리활성 성분을 다량함유하고 있어 이들 유효성분의 개발로 부가가치 창출을 기대 됨

■ 해면과 극피동물의 고부가가치 활용을 위해 기존의 식용 위주의 소비를 탈피하여 질병예방치료에 도움이 되는 새로운 기능성 식품 소재화 기술 개발, 관련 산업을 육성 발전.

○ 사회·문화적 측면

- 극피동물류의 황산화 Sialic acid-Fucose함유 다당류 무손상 추출기술개발로 자원 재이용. - 국내 해양 해면과 극피동물자원의 실체 구명
- 해양 해면과 극피동물을 통한 신 기능성 발굴에 예견적 정보 획득
- 개발 해양 해면과 극피동물의 현장 양식을 통한 오염 수역의 환경개선 효과
- 환경 친화적 해양생물산업 발달의 기반 구축
- 해양생물의 생태계 및 해양생물 자원의 보존 관리
- 기초 및 응용기술의 발전에 따른 생활수준의 향상과 자긍심 고양
- 한국은 물론, 세계 기술계의 개발과 발전에 선도적 역할

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

2-1 국내 기술개발동향

- 우리나라에서도 그 동안 해양 생물자원의 활용에 대한 연구는 꾸준히 해왔으나 주로 양식자원, 수산식량, 건강보조식품 등의 개발에 초점이 맞추어져 왔다.
- 이제는 선진국 수준의 고부가 가치 신물질 개발에 연구투자를 강화해야 할 필요성이 절실히 요구되는 시기 임
- 국내에서는 국내산 해면의 세포독성성분연구에 주력하여 그 동안 이 분야의 연구체계를(시료의 채집, 생물학적 분류, 활성성분 분리정제, 성분구조분석, 성분의 생리활성 검색 등을 위한 유기적인 협동연구체계) 확립하였으며 많은 연구 경험을 축적되었음.
- 해면*Petrosia* sp.,*Poecillastra*, *Jaspis* sp., *Stelletta* sp., *Homaxinella* sp., *Sarcotragus* sp., *Psammocinia* sp. 등으로부터 다양한 신규 암세포독성물질 및 항균, 항고지혈, 항바이러스물질을 분리하여 구조가 규명된바 있음.
- 국내의 경우는 기존 식품 첨가물로 이용되고 있는 알긴산, 카라기난 및 한천을 이용한 생리

기능성의 연구에 국한되어 있고 그 기능성도 거의 다이어트 기능 및 항 콜레스테롤 기능에 국한되어 있는 실정임

- 당지질당쇄의 다당류에 관한 연구는 (분리 및 이용) 전무한 실정임

- 따라서 국내에서 다량 생산되고 있는 해면과 극피동물에서 황산화 당지질당쇄다당류를 추출, 분리 및 수식을 통하여 생리 활성이 우수한 성분을 생산하여 기능성 식품 소재로 활용하는 것은 학술, 산업 및 경제적 차원에서 연구개발의 시의성 및 의의가 클 것으로 사료됨.

- 최근까지 불가사리 및 성계에 대한 특허관련자료를 보면 다음과 같다.

단백질분해효소 처리에 의한 불가사리 유래의 항균성, 항산화성, 피부미백용, 면역증강용, 항 콜레스테롤 조성물, 항혈전 조성물, 콜라겐을 제조하는 방법, 항고혈압성, 항들연변이성

- 성계 껍질의 에틸아세테이트 추출물을 포함하는 항혈전 조성물

2-2 국외기술동향

- 해양의학자원연구는 60년대부터 연구가 시작되었으나 육상천연물의 고갈됨에 따라 90년대 들어서야 본격적인 해양천연물로부터 의약활성물질의 개발이 이루어지고 있음.

- 아직까지 상용화된 것은 해면 *Tethya crypta* 및 *Eunicella cavolini*에서 처음으로 항암물질인 ara-T (spongothymidine), ara-U (spongouridine)등을 선도로하여 AZT, acyclovier, ara-C 등의 제3세대 항 virus제가 개발되어 임상에 사용되고 있다. 하지만 약 14,000종의 물질로부터 30여 가지가 임상실험중이며 10년 이내에 상업화될 것으로 예측

- 의학자원개발이 항생, 항암활성에서 노인성질환과 기작중심의 활성물질개발로 옮겨가고 있고, 유전체연구 단백질체연구 등으로 약제 작용점이 대폭 증가하고 있어 해양천연물에선는 약효검색 확율이 높아지고 있음.

- 해면동물의 30%가 의약활성물질을 갖고있는 것으로 알려져 있으며 지금까지 발견된 의약활성물질의 90%가 해면동물에서 발견되었음.

- 해양 유형동물로부터 분리한 GTS21은 신경세포의 사멸을 방지하는 것으로 치매치료제 개발을 위하여 연구되고 있고, 항암후보물질로 이끼벌레로부터 분리한 bryostatin, 군체멍게류로부터 분리한 didemnin B, 연체동물인 군소로부터 분리한 dolastatins, 군체멍게류로부터 분리한 ectenaisdin 743등은 임상실험 중에 있음.

- 해양생물로부터 의약활성물질을 찾으려는 연구는 90년대부터 연구가 시작되어 아직까지 제품으로 개발된 것은 없음

- 해양연구원에서 항암, 고지혈증 억제, 혈관신생억제효과가 있는 후보물질을 비롯하여 170여종의 신물질 발견.

- 동해안 해양생물자원 센터에서 불가사리 로부터 항암제를 연구하는 등 해양생물로부터 기능성물질을 개발하기 위한 연구가 진행중에 있음.

- 해면 (marine sponge)로부터 항염증제 개발이 10년 전부터 이루어지고 있음

-대표적으로 분리된 성분으로는 sestrepne 계열인 cacospongionolide B, petrosaspongionolide M 및 manolide가 있으며, 이들은 모두 염증반응에 깊이 관여하는 phospholipase A2 저해제로 동물모델에서도 그 효능이 입증되었음.

2-3 국내외기술개발 전망

- 현재와 향후의 기술 수요 전망 : 과거에 주요 사망원인 이었던 심장질환, 위장질환, 암 등은 질환에 대한 인식이나 치료제의 활발한 개발로 상황이 개선되고 있음
- 산업화와 밀접한 연관성을 지니고 있는 만성 염증성 질환(류마티스관절염, 알레르기 천식) 및 심혈관계 질환의 환자는 계속적으로 증가추세에 있음.
- 20년 사이에 환자 수가 3-4배 증가하고 치료약의 판매도 해마다 20% 증가하고 있음.
- 투자전망 : 우리의 삶이 선진국화되면서 성인성 질환에 대한 인식은 크게 달라지고 있음.
- 삶의 질을 높이기 위한 인간의 욕구는 계속적으로 증가하기 때문에 치사율은 낮지만 완치가 쉽지 않고 삶의 질에 커다란 영향을 미치기 때문에 이 분야는 투자가치가 유망한 산업임.
- 다음세기에 걸쳐 해양생물을 대상으로 한 화학적 생물학적 연구는 조직적이고 체계적으로 활발히 수행될 것으로 생각 됨.
- 극피동물류로부터 황산화 당지질다당류를 추출 및 분리, 해면과 극피동물류로부터 기능성 식품소재의 생산기술은 함유성분의 효능이 과학적으로 인정되고 경제성이 있을 경우 새로운 고 부가가치 산업으로서 급격한 발전을 이룰 것으로 기대 됨
- 만성질환은 병인에 따른 신호전달 체계 및 조절에 관한 연구는 기초연구를 바탕으로 하나 필연적으로 새로운 만성질환 치료제 개발과 연관되어 있기 때문에 많은 부분이 know-how로 구성되어 있어 외국으로부터 기술도입이 상당히 어려움. 반면 국내에는 아직 해양생물 부터 만성질환 치료제 개발 연구가 미미한 실정이지만 자원이 풍부한 해양생물로부터 선도물질을 창출할 가능성이 크며 기전연구를 바탕으로 정확한 target에 의한 신약개발 가능성이 큼.
- 극피동물류등 해양폐자원과 해면자원 개발은 국내의 지역성 생물산업임. 아직까지 국내외에 부분적 기초연구 수준에 머물러 있을 뿐 산업적 생산을 위한 분리, 정제, 효능 검정 및 산업적 생산공정 연구 등이 이루어지지 못함으로서 국외로부터 기술도입은 불가능하여 독자적 연구개발이 필요함. 따라서, 극피동물류등 해양폐자원과 해면의 지질-다당류 재이용기술개발은 경제성에 있어서 그 부가가치가 매우 높고, 자체기술의 개발 및 확보가 중요함.
- 특히 불가사리는 어패류의 생산량을 감소시키는 주된 원인으로, 불가사리의 유용자원으로서의 가치를 확인하고 해양폐자원 활용을 위한 방안들이 연구되어지고 있다. 이미 활용되고 있는 몇 가지 예로서 불가사리에 다량 함유된 탄산칼슘을 이용한 칼슘제재, 그리고 또한 마찬가지로 다량함유단백질인 콜라겐을 이용한 화장품 개발 등이 있다.

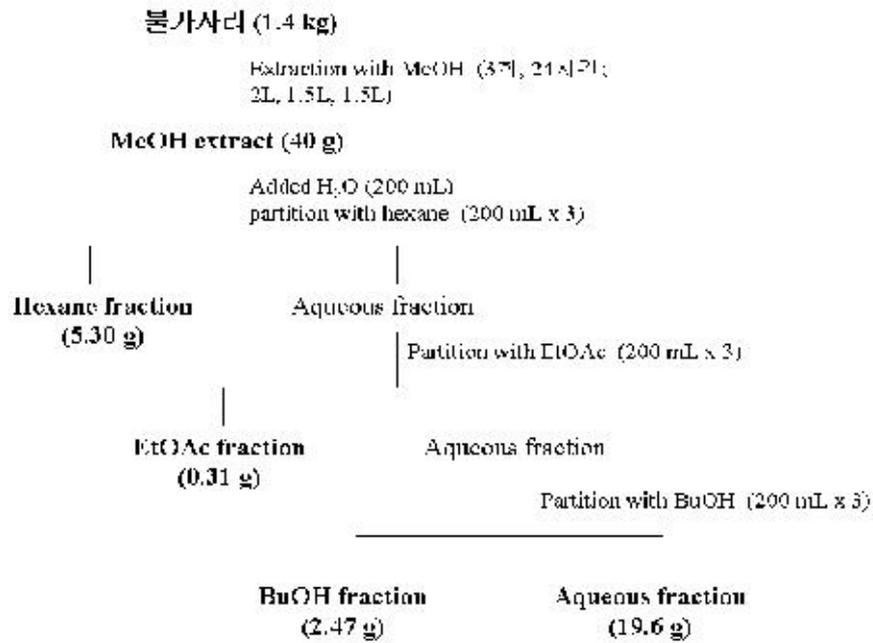
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

3.1. 연구수행 내용 및 결과

3-1-1 실험에 사용한 재료 및 유기용매 분획법

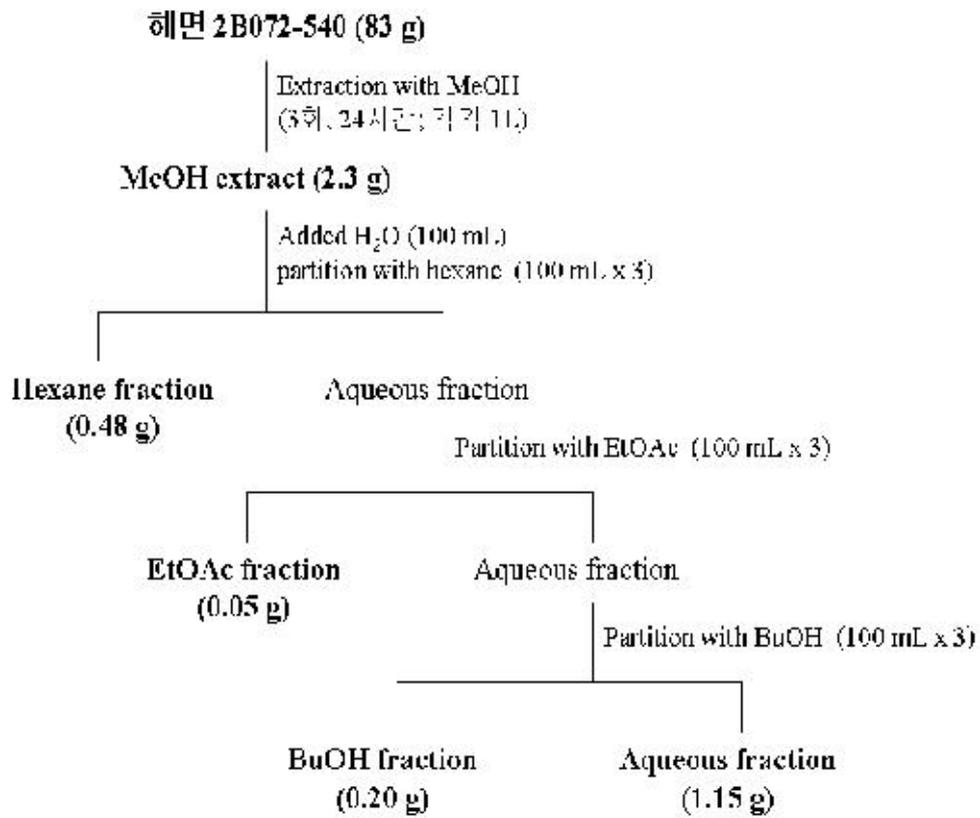
그림 1



아무르불가사리 (*Asterias amurensis*)



그림 2



예쁜이 해면 (*Callyspongia elegans*, 2B072-540)



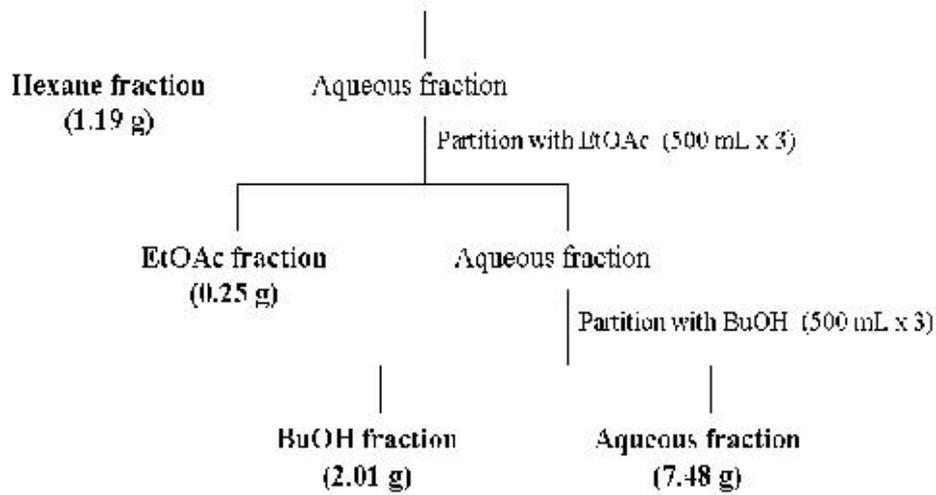
그림 3

해면 HR072-440 (260 g)

Extraction with MeOH
(39, 24시간; 2-7% IT)

MeOH extract (12.08 g)

Added H₂O (500 mL)
partition with hexane (500 mL x 3)



호박해면 (*Cliona celata*, HR072-440)



3-1-2 연구수행방법 및 연구내용

연구내용

(A) 류마티스 관절염 치료효능 검색

COX-2의 저해활성 검색

Mouse Bone Marrow Derived Mast Cell (BMMC)는 BALB/C mouse의 골수로부터 IL-3생산 세포인 50% WEHI-3 conditioned medium(10% FCS함유)으로 배양한다. 활성화에는 IL-10/IL-1 β /LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 8시간 후 PGD₂를 EIA assay kit 를 사용하여 COX-2의 저해활성을 검토

(B) 항 알러지 활성 검색

BMMC에 IL-10/IL-1 β /LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 30분 후 유리되는 β -Hexosaminidase 효소활성을 측정.

(C) 기관지 항천식 활성 검색

LTC₄ 생성량 억제 활성 검색

상기의 방법으로 조제한 BMMC에 IL-10/IL-1 β /LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 30분 후 배양 상청액중의 LTC₄량을 측정하여 저해활성을 검색한다.

RAW264.7 macrophage (대식세포)에 LPS를 자극했을 때 생성되는 Nitric oxide (NO)를 Griess 법으로 측정하였음

실험방법

(1) 세포 배양

Male Balb/c mice로부터 채취한 골수세포를 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 100 μ M MEM Non-essential amino acid solution가 포함된 RPMI1640 Medium에 IL-3(mouse spleen cell 상등액)를 final 10ng/ml되도록 넣은 배양액으로 약 3 주 정도 배양하여 90% 이상의 homogenous한 BMMC (Bone Marrow-derived mast cell) 를 얻었다. RAW264.7 세포는 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin 가 포함된 RPMI1640 Medium으로 배양하였다. 세포는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고 배양된 세포는 6-well 또는 12-well, BMMC의 경우 96-well에서 일정한 수의 세포를 분주하여 실험하였다.

(2) MTT assay

1 \times 10⁶ cells/ml 농도의 RAW264.7 cells에 일정농도의 propenon 유도체를 가하여 8시간 동안 preincubation 한 후, 약 0.5 mg/ml 농도의 MTT를 처리하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 20분간 배양하여 0.04 N-HCl/isopropanol을 가하여 완전히 cell을 용해 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Assay of PGD₂ generation

BMMC를 1 \times 10⁶ cells/ml 농도로 하여 자극제로는 100 ng/ml KL (*c-kit ligand*), 100 U/ml IL-10, 100 ng/ml LPS를 처리하며, propenone 유도체는 일정 농도로 하여 37 $^{\circ}$ C,

5% CO₂ 조건에서 8시간 동안 배양후 PGD₂의 생성량을 측정하여 COX-2 활성으로 판정하였다. 이때 COX-2의 효소활성은 미리 10µg/ml aspirin을 2시간 처리하여 COX-1을 불활성 시킨 후 실험을 행하였다. 반응이 끝난 후 120×g, 4℃에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 PGD₂ 생성량의 측정에 이용한다. PGD₂는 PGD₂ assay kit (Cayman 사)를 이용하여 측정하였다.

(4) Assay of LTC₄ generation

1×10⁶ cells/ml 농도의 BMMC에 일정 농도의 propenone 유도체를 가하여 30분간 37℃, 5% CO₂ 조건에서 preincubation 후 100 ng/ml인 KL (*c-kit ligand*)를 처리하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 20분간 배양하여 원심 분리한 후, 그 상등액을 취하여 배양 상등액내의 LTC₄를 LTC₄ assay kit (Cayman 사)를 이용하여 측정하였다.

(5) NO 생성 측정

NO 양은 배양된 상등액에서 아질산염을 분석함으로써 확인하였다. 100µl Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid)과 동량의 세포 배양액을 혼합하여 암실에서 10분 반응하였다. 반응 후 발색된 흡광도는 ELISA를 사용하여 570 nm 파장에서 측정하였다. 새로운 배양용 배지는 모든 실험에서 공 시료로 사용하였으며 아질산염의 농도는, NaNO₂ 반응으로부터 얻어진 표준 곡선으로부터 환산하였다.

(6) Western Blot 분석

전기 영동을 통하여 분리한 분리한 단백질은 20% 메탄올, 25 mM Tris, 192 mM glycine이 포함된 완충액을 사용하여 nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 Ponceau 용액으로 이동유무를 확인한 후, 5% non-fat dry milk 용액으로 30분간 실온에서 반응하여 차단하였다. 그리고 차단용 완충액으로 희석한 1차 항체와 막을 4시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffer saline (TTBS)을 사용하여 5분간격으로 6회 세척하였다. 계속하여 horse radish peroxidase가 부착된 2차 항체와 반응시키고 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 세척이 끝나면 증류수로 세척하고 ECL 용액으로 2분간 반응하고 필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

(7) Assay of TNF-α generation

RAW264.7 cells를 12-well plate에 5×10⁵개로 분주하고 6시간 이상 안정화시킨 다음 FPP-3를 30분 전처리 한 다음 LPS를 1시간 처리한 후 상등액 내의 TNF-α를 TNF-α assay kit (R&D사)를 이용하여 측정하였다.

3-1-3 1차년도 실험내용 및 결과

연구 내용	연구결과	연구수행 방법 (이론적·실험적 접근방법)	비고
- 해면과 극피동물 을 이용하여 열수 및 유기용매 추출물제조	불가사리 및 2종류 해면 (예쁘이 해면, 호박해면)으로부터 열수 및 유기용매를 이용한 분획추출물 제조 (Methanol, Hexane, ethylacetate, butanol 용매분획)	1. 통상적인 방법을 이용하여 검체 제작. 2. 모든 검체에 100% 메타놀을 가하여 3회 24시간 추출함. 그 후 건조시킨 검체에 물을 가하여 용해시킨 후 동량의 hexane을 가하여 3회 24시간 추출함. 다시 남아있는 수층에 ethylacetate를 동량을 가하여 3회 추출함. 최종적으로 남아있는 수층에 butanol을 동량 가하여 3회 추출하여 분획을 만들고 남아 있는 부분을 수층으로 하여 실험에 사용함. 3. 열수추출물은 11의 물을 가하여 90도에서 24시간 3회 추출하여 검체제작.	
불가사리 조추출물의 -항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색	1. 쥐 골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD2 및 LTC4의 생성량을 검토한 결과 불가사리 추출물에서는 유일하게 butanol 분획에서 활성이 검출되었음. LTC4 생성량의 IC50 값은 22.2 µg/ml 로서 강한 저해활성. 2. RAW264.7 macrophage에 LPS처리 시 생성되는 nitric oxide (NO)에 미치는 영향을 검토한 결과 hexane분획 및 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성을 나타내었다. 3. 아라키돈산 대사계의 속속 효소인 PLA2의 저해활성을 검토한 결과 특히 염증성 PLA2로 알려진 type IIA, V에 대하여 강한 저해활성을 나타내었다. 4. 비만세포 자극 시 탈과립반응의 지표로 사용되는 β-Hexosaminidase (β-Hex) 효소 억제활성을 검토한 결과 Butanol 및 EtOAc분획에서 강한 활성을 나타내었다.	류마티스 관절염 치료효능 검색 COX-2의 저해활성 검색: Mouse Bone Marrow Derived Mast Cell (BMMC)는 BALB/C mouse의 골수로부터 IL-3생산 세포인 50% WEHI-3 conditioned medium(10% FCS 함유)으로 배양한다. 활성화에는 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 8시간 후 PGD2를 EIA assay kit 를 사용하여 COX-2의 저해활성을 검토 항 알러지 활성 검색: BMMC에 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 30분 후 유리 β-Hexosaminidase 효소활성을 측정. 기관지 항천식 활성 검색 LTC4 생성량 억제 활성 검색: 상기의 방법으로 조제한 BMMC에 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 90분 후 배양 상정액중의 LTC4량을 측정하여 저해활성을 검색한다. RAW264.7 macrophage (대식세포)에 LPS를 자극했을 때 생성되는 Nitric oxide (NO)를 Griess법 측정	
해면 (540, 예쁘이해면, 440, 호박해면) 조추출물의 항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색	1. 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 COX-2 의존적인 PGD2 생성을 억제. 2. 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 5-LOX 의존적인 LTC4 생성을 억제. 3. 해면의 methanol 추출물 및 분획에서 비만세포로부터 탈과립 억제. 4. RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 미치는 영향을 검토한 결과 해면440의 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성.	상기와 같은 방법에 준하여 실험을 행하였음	

특히 불가사리는 어패류의 생산량을 감소시키는 주된 원인으로, 불가사리의 유용자원으로서의 가치를 확인하고 해양폐자원 활용을 위한 방안들이 연구되어지고 있다. 이미 활용되고 있는 몇 가지 예로서 불가사리에 다량 함유된 탄산칼슘을 이용한 칼슘제재, 그리고 또한 마찬가지로 다량함유단백질인 클라젠을 이용한 화장품 개발 등이 있다.

본 연구에서는 불가사리의 만성 염증성질환 및 질환동맥경화에 대한 약리작용을 확인하고자 실험을 계획하였으며 쥐 골수에서 분화배양 시킨 비만세포 (bone marrow-derived mast cell, BMMC) 및 사람의 동맥평활근세포를 활용하여 그 활성을 확인하였다. 그림 1에서는 불가사리의 유효성분을 획득하기위한 추출과정을 모식도로 나타내었으며, 또한 그림 2 및 3은 해면

을 이용하여 각각의 용매에 대한 추출법 및 수율을 나타내고 있으며, 각 분획물은 동결 건조하여 DMSO에 녹여서 실험에 사용하였다.

항염증, 항알러지 및 항천식 효능 검색

3-1-3-1. 쥐골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD₂ 및 LTC₄의 생성량을 검토한 결과 불가사리 추출물에서는 유일하게 butanol 분획에서 활성이 검출되었음

Table 1 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획의 PGD₂ 및 LTC₄ 생성에 미치는 영향

불가사리	Inhibition of COX 2 dependent PGE ₂ generation(%)	Inhibition of 5 L.O dependent LTC ₄ generation(%)
열수추출 총	-157.92	-62.12
H ₂ O 층	-113.46	-180.70
MeOH 층	25.52	-403.25
Hexane 층	-3.41	-345.23
BuOH 층	54.78	74.37
EtoAc 층	-12.41	-728.95

Final conc. 125 µg/ml

3-1-3-2. LTC₄ 생성량의 IC₅₀ 값은 22.15 µg/ml 로서 강한 저해활성을 나타내었음 (그림 1).

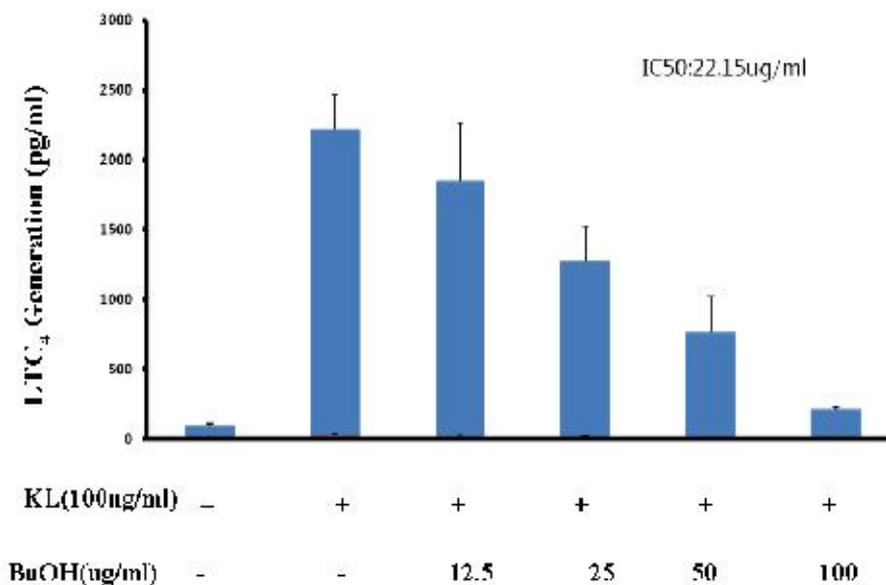


그림 1 불가사리 butanol 분획 (BuOH)의 LTC₄ 생성억제 용량의존성

3-1-3-3. 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 일어나는 탈과립 반응 (degranulation)에 미치는 영향을 검토한 결과 불가사리 추출물에서는 butanol 분획 및 ethylacetate (EtOAc)분획에서 강한 탈과립 억제활성을 나타내었음 (Table 2).

Table 2. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획의 비만세포에서 탈과립 반응에 미치는 영향

)-HEX release
열수추출 총	-1.81
H ₂ O 총	-8.33
MeOH 총	31.57
Hexane 총	14.04
BuOH 총	48.26
EtOAc 총	48.26

Final concentration 125µg/ml

3-1-3-4. RAW264.7에 LPS처리 시 생성되는 iNOS에 의해 합성되는 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 ethylacetate (EtOAc)분획에서 강한 저해활성을 나타내었음 (Table 3).

Table 3. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획의 RAW264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 영향

불가사리	LPS dependent NO generation in Raw 264.7 cells
열수추출 총	-21.436
H ₂ O 총	-3.176
MeOH 총	1.588
Hexane 총	69.867
BuOH 총	19.849
EtOAc 총	92.891

Final concentration 125µg/ml

3-1-3-5. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획이 아라키돈산 대사계 율속효소인 사람유래의 대표적인 염증성 PLA₂의 일종인 sPLA₂-IIA 활성에 미치는 영향을 Dole's method로 측정 한 결과, 열수뿐만 아니라 모든 분획에서 강한 활성이 검출되었다.

Table 4. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획이 사람유래의 분비성 PLA₂-IIA (sPLA₂-IIA) 활성에 미치는 영향

	Inhibition % of sPLA ₂ -IIA Enzyme Activity (%)
열수추출 증	6.1
H ₂ O 증	72.0
MeOH 증	68.7
Hexane 증	66.5
BuOH 증	82.3
EtoAc 증	57.8

Final concentration 50mg/ml

3-1-3-6. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획이 아라키돈산 대사계 유효효소인 사람유래의 염증성 PLA₂의 일종인 sPLA₂-V 활성에 미치는 영향을 Dole's method로 측정 한 결과, methanol (MeOH) 분획에서 강한 활성이 검출되었으며, MeOH 분획에서 추출한 나머지 분획에서도 강한 저해활성을 나타내었다.

Table 5. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획이 사람유래의 분비성 PLA₂-V (sPLA₂-V) 활성에 미치는 영향

	Inhibition % of sPLA ₂ -V Enzyme Activity (%)
열수추출 증	37.6
H ₂ O 증	2.3
MeOH 증	77.9
Hexane 증	87.0
BuOH 증	82.1
EtoAc 증	85.8

Final concentration 50mg/ml

3-1-3-7. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매부획이 쥐장유래의 지질분해소효소인 sPLA₂-1B 활성에 미치는 영향을 Dole's method로 측정 한 결과, 모든 분획에서 대단히 약한 저해활성만 나타내었다. 따라서 불가사리는 염증성 PLA₂에 대한 강한 저해활성을 나타내어 금후 추가적인 연구가 요구된다.

Table 6. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매분획이 사람유래의 PLA₂-1B (sPLA₂-1B) 활성에 미치는 영향

	Inhibition % of sPLA ₂ -1B Enzyme Activity (%)
열수추출물	12.6
H ₂ O 층	21.3
MeOH 층	5.1
Hexane 층	8.2
BuOH 층	21.8
EtoAc 층	15.3

Final concentration 50µg/ml

3-1-3-8. 쥐 골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD₂ 생성량을 검토한 결과 해면 540 및 440 추출물에서는 hexane 및 EtoAC 분획에서 저해 활성이 검출되었음 (Table 7).

Table 7. 2종류의 해면 열수추출물 및 유기용매분획의 PGD₂ 생성에 미치는 영향

Final con. : 125 µg/ml	Inhibition of PGD ₂ activity (%)	
	해면540	해면440
Control	0	0
열수 추출물	-6.9	12.3
H ₂ O 추출물	1.66	22.1
MeOH 추출물	-204.9	59.1
Hexane 추출물	73.2	72.4
BuOH 추출물	23.9	64.3
EtoAc 추출물	32.7	76.8

3-1-3-9. 쥐골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 LTC₄의 생성량을 검토한 결과 540에서 전체적으로 억제활성을 나타내었으나, 440 추출물에서는 열수, 수층, BuOH 및 EtoAC 분획에서 비교적 강한 저해활성이 검출되었음 (Table 8).

Table 8. 2종류의 해면 열수추출물 및 유기용매분획의 LTC₄ 생성에 미치는 영향

Final con. : 125 µg/ml	Inhibition of LTC ₄ generation (%)	
	해면540	해면440
Control	0	0
열수 추출물	70.0	74.9
H ₂ O 추출물	59.5	70.0
MeOH 추출물	85.8	-88.8
Hexane 추출물	89.8	-246.2
BuOH 추출물	77.2	79.3
EtoAc 추출물	90.7	87.6

3-1-3-10. 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 일어나는 탈과립 반응 (degranulation)에 미치는 영향을 검토한 결과 540에서 전체적으로 억제활성을 나타내었으며, 440 추출물에서는 열수, 수증, Hex, BuOH 및 EtoAC 분획에서 비교적 강한 저해활성이 검출되었음 (Table 9)

Table 9. 불가사리의 열수추출물 및 유기용매분획의 비만세포에서 탈과립 반응에 미치는 영향

Final con. : 125 µg/ml	Inhibition of β-hex release (%)	
	해면540	해면440
Control	0	0
열수 추출물	40.1	56.5
H ₂ O 추출물	16.1	33.4
MeOH 추출물	72.6	3.31
Hexane 추출물	-19.79	82.1
BuOH 추출물	69.31	62.6
EtoAc 추출물	35.9	47.8

3-1-3-11. 탈과립반응 억제 IC₅₀ 값은 87.5 µg/ml 및 92.3 µg/ml로서 강한 저해활성을 나타내었음 (그림 2).

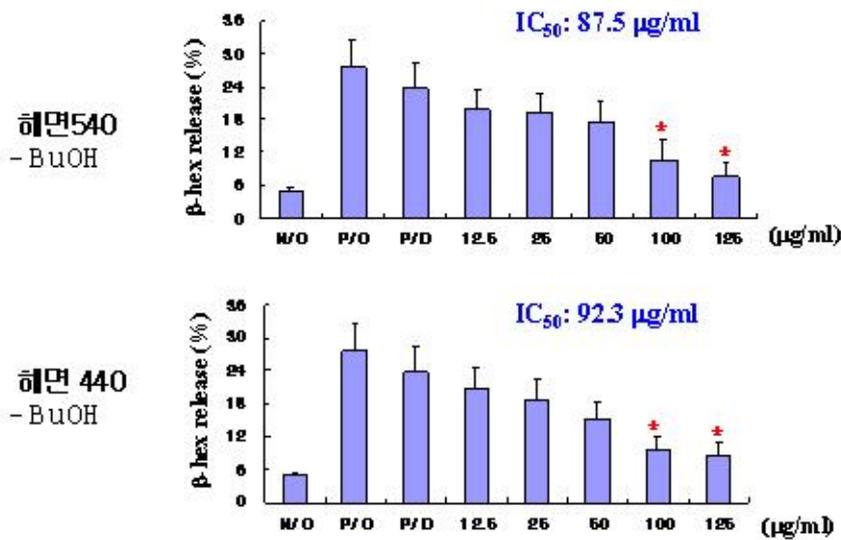


그림 2. 2 종류의 해면 butanol 분획 (BuOH)의 탈과립반응억제 용량의존성

3-1-3-12. MMP-1/9억제활성확인을 통한 항동맥경화성 심혈관 예방-치료활성 검증

사람의 동맥평활근세포(HASMC)는 cytokine의 하나인 TNF-α를 처리하였을때 MMP-9의 분비가 활성화 되고 이것이 동맥경화를 일으키는 주요 매개체의 하나로서 알려져 있다 (Cho et al., 2000). 따라서 MMP-9에 대한 직접적인 저해작용이 있는지를 확인하기 위해 TNF-α가 처리된 HASMC의 MMP-9이 포함된 media를 사용하여, 그림 1에서의 추출물들을 처리해보았다. 그 결과 그림 3의 Zymography assay와 같이 etylacetate fraction에서 MMP-9에 대한 직접적인 저해작용이 있는 것이 확인되었다.

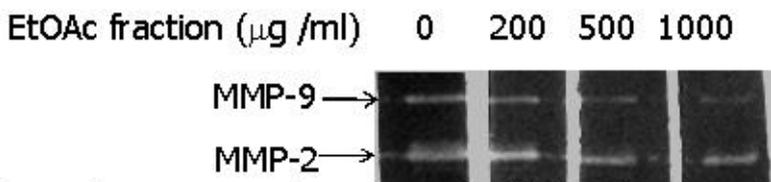


그림 3. In vitro Zymography Assay using EtOAc fractions. Supernatant of TNF-α induced serum free culture of HASMC was used for inhibition assay. MMP-9 and MMP-2 activity was decreased by EtOAc fraction.

13. 항동맥경화성 심혈관 예방-치료활성을 위한 세포독성 검증: 일정농도하에서의 독성없음을 확인하고 기능성식품자원으로서 기본 조건

불가사리의 EtOAc fraction은 500 - 1000µg/ml 의 농도범위에서 MMP-9에 대한 저해 작용이 나타나는 것으로 밝혀졌으며, 그러한 범위에서의 동맥평활근세포(HASMC)에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 0 - 2000 µg/ml 의 농도범위에서 추출물을 처리한후 XTT kit를 사용하여 세포성장 저해 정도를 확인하였다. 그림 4에서 XTT 실험결과 불가사리의 EtOAc 분획은 0 - 2000 µg/ml 농도 범위에서 전혀 세포독성을 나타내지 않았다.

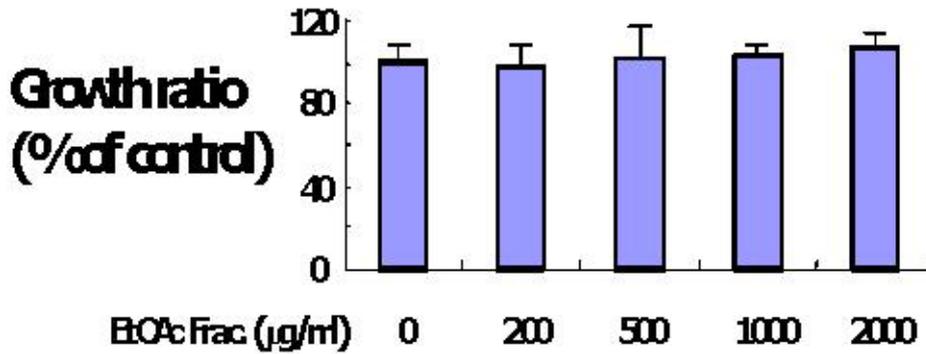


그림4. Growth inhibition profile of HASMC by EtOAc fraction. EtOAc fraction of starfish didn't show cytotoxic effect to HASMC culture from 0 to 2000 µg/ml concentrations. HASMC was plated onto a 96-well plate and grown to 70 - 80 % confluence followed by replacement in each well with serum-free media containing different concentrations of EtOAc fractions. The XTT solution was added after 20 h. After 24 h, the optical density was measured at 490 nm. The results are expressed as the mean ±SE from three triplicate experiments.

3-1-3-13. Sialic acid 함유 다당류의 최초발견과 신개념 심혈관 예방-치료활성 물질

불가사리의 EtOAc 분획의 유효성분을 확인해보기 위하여 EtOAc 분획을 chlormform:MeOH:H₂O = 30:60:8의 용매에서 전개하여 당지질과 같이 비교해본 결과 비슷한 위치로 전개되는 것을 확인할 수 있었으며 표준물질로 사용한 ganglioside GM1, GM3 그리고 Lactosylceramide(LC)등의 물질 혹은 유사물질이 존재하고 있는 것으로 추측할 수 있으며 추후 이들 물질에 의한 작용여부를 동맥평활근세포에서 확인해 볼 예정이다.

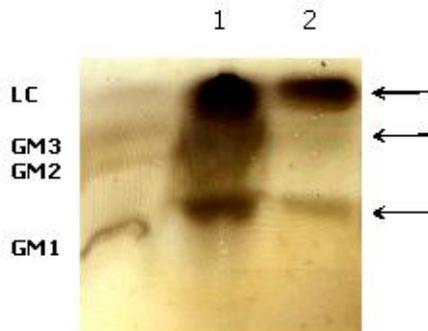


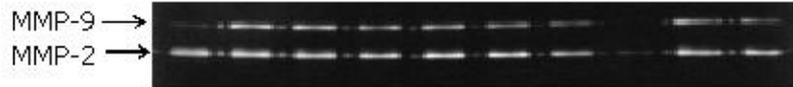
그림 5. EtOAc fractions of starfish was analyzed by thin layer chromatography. 1: starfish EtOAc frac. 100 ug, 2: starfish EtOAc frac. 10 ug

3-1-3-14. 해면에서 MMP-2/9의억제활성 검증

한편, 해면에서 추출된 각각의 분획은 DMSO에 100mg/ml 의 농도로 suspension하여 사용하였으며 동맥평활근세포(HASMC)에 직접처리했을 때 MMP-9 저해작용이 나타나는지 확인하기 위해 HASMC 에 직접 처리하여 그 결과를 보았다. HASMC를 80 % 정도의 confluency로 6 well plate 에서 culture한 뒤 serum-free 용액으로 바꾸어준 뒤 추출액을 처리하였다. 그 2시간 후에 TNF-α를 100 ng/ml 농도로 처리하여 24시간 배양하였고 그 배양액을 취하여

Zymography를 하여 결과를 확인하였다. 그림 6와 같이 Hexane과 Ethylacetate(EtOAc) fraction에서 MMP-9 band 가 줄어드는 것을 확인하였다.

440 H2O fraction (µg/ml)	-	-	500	1000	-	-	-	-	-	-
440 hot water fraction (µg/ml)	-	-	-	-	500	1000	-	-	-	-
440 Hexane fraction (µg/ml)	-	-	-	-	-	-	500	1000	-	-
440 Methnol fraction (µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	500	1000
TNF-α (100 ng/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+



440 Buthand fraction (µg/ml)	-	-	500	1000	-	-
440 EtOAc fraction (µg/ml)	-	-	-	-	500	1000
TNF-α (100 ng/ml)	-	+	+	+	+	+

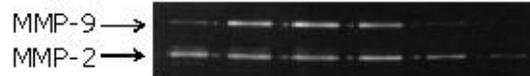


그림 6. Hexane and EtOAc fractions of sponge 440 inhibit MMP-9 and MMP-2 activities in zymography. several solvents were used for extracting and the fractions were lyophilized. The dried compounds dissolved in DMSO and used in this study.

3-1-3-15. 해면유래 활성분획의 무세포독성 범위 검정

해면의 Hexane과 EtOAc fraction은 500 - 1000 µg/ml 의 농도범위에서 MMP-9에 대한 저해 작용이 나타나는 것으로 밝혀졌으며, 그러한 범위에서의 동맥평활근세포 (HASMC)에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 0 - 1000 µg/ml 의 농도범위에서 추출 물을 처리한후 XTT kit를 사용하여 세포성장 저해 정도를 확인하였다. 그림7와 그림 8에서 XTT 실험결과 해면의 EtOAc 분획은 0 - 1000 µg/ml 농도 범위에서 전혀 세포독성을 나타내지 않았다.

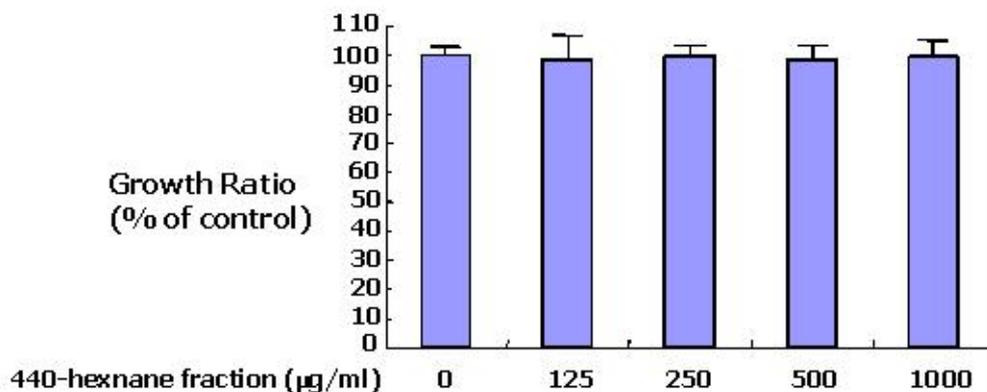


그림7. Growth inhibition profile of HASMC by Hexane fraction. Hexane fraction of sponge 440 didn't show cytotoxic effect to HASMC culture from 0 to 1000 µg/ml concentrations. HASMC was plated onto a 96-well plate and grown to 70 - 80 % confluence followed by replacement in each well with serum-free media containing different concentrations of Hexane fractions. The XTT solution was added after 20 h. After 24 h, the optical density was measured at 490 nm. The results are expressed as the mean ±SE from three triplicate experiments.

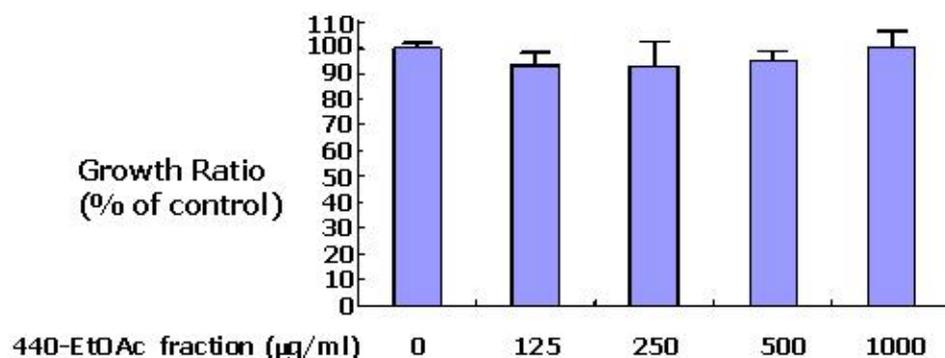


그림 8. Growth inhibition profile of HASMC by EtOAc fraction. EtOAc fraction of sponge 440 didn't show cytotoxic effect to HASMC culture from 0 to 1000 µg/ml concentrations. HASMC was plated onto a 96-well plate and grown to 70 - 80 % confluence followed by replacement in each well with serum-free media containing different concentrations of Hexane fractions. The XTT solution was added after 20 h. After 24 h, the optical density was measured at 490 nm. The results are expressed as the mean ±SE from three triplicate experiments.

3-1-4 2차년도 실험내용 및 결과

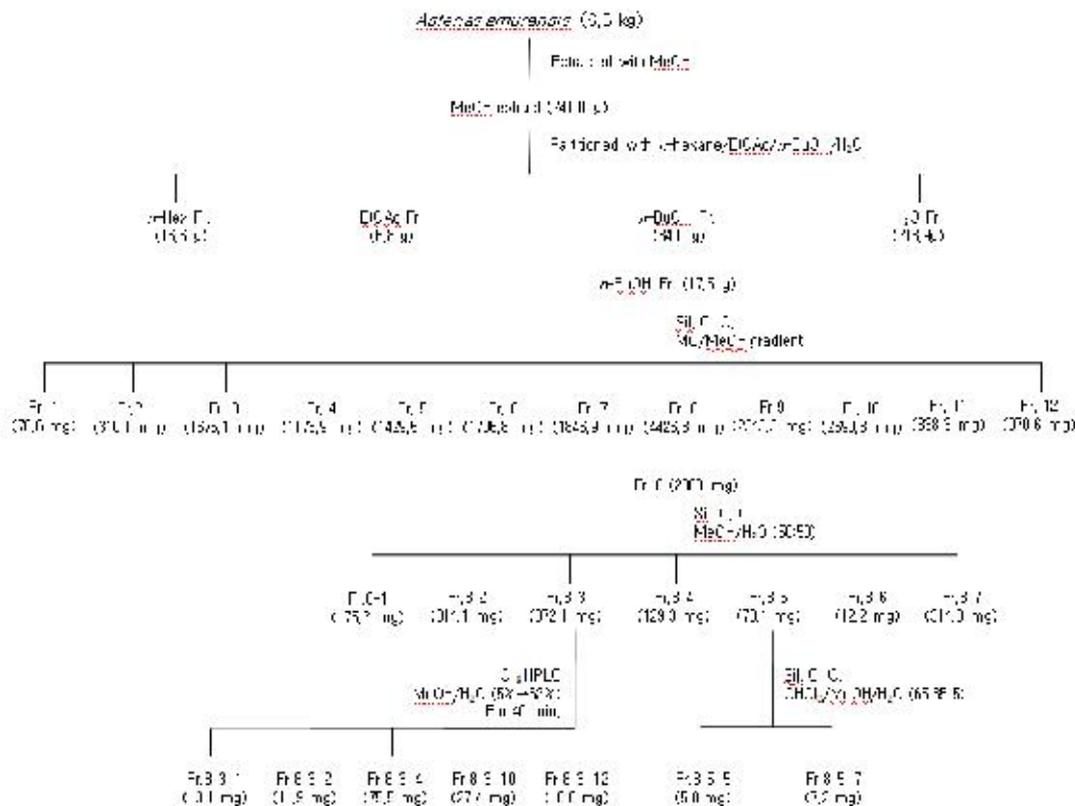
연구 내용	연구결과	연구수행 방법 (이론적·실험적 접근방법)	비고
<p>-불가사리 대량 분획 실시</p> <p>-불가사리 Butanol 분획을 다시 subfractionation을 하여 12종류의 분획을 획득</p> <p>- Subfraction 중 비교적 많이 많은 fr8 (4.43g)으로부터 활성물질 분리 및 구조결정</p>	<p>1.수출: Methanol층: 241g, Hexane층 16.55g, Ethylacetate 6.83g, Nutanol층 34g, 물층 218.8g</p> <p>2. Butanol 분획을 다시 column chromatography로 12개 분획 분리</p> <p>3. 이글 분획 중 비교적 함량이 많은 Fr8 (4.43g)에서 7개 단일물질 분리 및 일부 구조결정</p>	<p>1. 모든 검체에 100% 메타놀을 가하여 3회 24시간 추출함. 그 후 건조시킨 검체에 물을 가하여 용해시킨 후 동량의 hexane을 가하여 3회 24시간 추출함. 다시 남아있는 수층에 ethylacetate를 동량을 가하여 3회 추출함. 최종적으로 남아있는 수층에 butanol을 동량 가하여 3회 추출하여 분획을 만들고 남아있는 부분을 수층으로 하여 실험에 사용함.</p> <p>2. 구조결정: Silicagel column, TLC, HPLC, NMR, LC-mass등으로 구조결정</p>	
<p>불가사리 조추출물의 항염증, 항알러지 및 항천식 작용효능 검색</p>	<p>1. 쥐 골수에서 분리한 비만세포에서 cytokine으로 자극했을 때 유도되는 PGD2 및 LTC4의 생성량을 검토한 결과 불가사리 butanol추출물을 subfraction한 후 얻어진 12개 분획에서 COX-2 의존적인 PGD2 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획7,8에 비교적 강한 활성을 나타냄</p> <p>2. LTC4 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획 4,7,9,11,12 비교적 강한 활성을 나타내었음</p> <p>3. 탈과립 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 분획1,2,4에서 비교적 강한 활성을 나타내었음</p> <p>4. Butanol 분획이 항원-항체로 유도한 1형 알러지 동물모델인 PCA반응을 억제시켰으며, IC50 값은 67.5 mg/kg</p> <p>5. OVA/Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 호산구의 침윤 억제</p> <p>6. RAW264.7 macrophage에 LPS처리 시 생성되는 nitric oxide (NO)에 미치는 영향을 검토한 결과 불가사리 hexane분획 및 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성을 나타내었으며, iNOS 발현이 NF-κB 억제에 의함.</p>	<p>류마티스 관절염 치료효능 검색 COX-2의 저해활성 검색 Mouse Bone Marrow Derived Mast Cell (BMMC)는 BALB/C mouse의 골수로부터 IL-3생산 세포인 50% WEHI-3 conditioned medium(10% FCS함유)으로 배양한다. 활성화에는 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 8시간 후 PGD₂를 EIA assay kit를 사용하여 COX-2의 저해활성을 검토</p> <p>항 알러지 활성 검색 BMMC에 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 30분 후 유리되는 β-Hexosaminidase 효소활성을 측정.</p> <p>기관지 항천식 활성 검색 LTC₄ 생성량 억제 활성 검색 상기의 방법으로 조제한 BMMC에 IL-10/IL-1β/LPS/KL 혼합자극제를 처리하여 30분 후 배양 상정액중의 LTC₄량을 측정하여 저해활성을 검색한다. RAW264.7 macrophage (대식세포)에 LPS를 자극했을 때 생성되는 Nitric oxide (NO)를 Griess법으로 측정하였음</p>	
<p>해면 (예쁜이해면 및 호박해면) 조추출물의 항염증작용효능 검색</p>	<p>1. RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 미치는 영향을 검토한 결과 해면 호박해면의 ethylacetate (EtOAc)분획에서 저해활성을 나타내었으며 이 반응에는 iNOS 발현 억제의 함이 밝혀졌음</p> <p>2. TNF-α 생성억제 반응은 나타내지 않았음</p>	<p>상기와 같은 방법에 준하여 실험을 행하였음</p>	

연구 내용	연구결과	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	비고
Zymography로 확인된 불가사리 EtOAc 처리군의 MMP-9 저해능을 면역학적 방법으로 증명	불가사리의 EtOAc 는 동맥평활근세포의 MMP-9 생산을 농도 의존적으로 저해	농도별로 EtOAc 분획을 처리한 동맥평활근세포에 100 ng/ml의 TNF- α 처리하여 24 시간후 MMP-9 specific antibody를 사용하여 western blot으로 확인	
불가사리 EtOAc에 의해 MMP-9 이 transcription level에서 줄어드는 것을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시	불가사리 EtOAc는 동맥평활근세포의 MMP-9 mRNA 생산을 농도 의존적으로 저해	농도별로 EtOAc 분획을 처리한 동맥평활근세포에 100 ng/ml의 TNF- α 처리하여 24 시간후 MMP-9 specific primer를 사용하여 RT-PCR로 확인	
TNF- α 처리 후 p-ERK의 activation에 의해 MMP-9의 생산이 조절받는 것을 증명하기 위해 p-ERK specific inhibitor, U0126을 사용하여 MMP-9의 활성을 측정	U0126에 의해 TNF- α 로 activation 된 동맥평활근세포의 MMP-9의 생산이 줄어 들을 Zymography를 통해 확인하였다	U0126을 농도별로 처리한 동맥평활근 세포에 100 ng/ml의 TNF- α 처리하여 24 시간 후 MMP-9의 활성을 Zymography로 확인	
사람의 동맥평활근세포(HASMC)에 TNF- α 를 처리하였을때 증가하는 세포의 이동도를 EtOAc 분획 처리로 저해할 수 있음을 증명	불가사리 EtOAc 분획은 동맥평활근 세포의 gelatin 막을 통한 이동을 1000 μ g/ml 농도에서 basal level까지 저해함을 확인함	gelatin이 coating 된 8 μ m pore의 막을 격벽으로 하는 transwell을 사용하여 TNF- α 처리군과 TNF- α 와 동시에 EtOAc 분획을 처리한 군으로 나눠 막을 통해 이동한 세포의 수를 측정하였다.	
TLC(thin layer chromatography)로 해면의 EtOAc 분획을 점적 후 분리된 각각의 물질을 회수한 후 zymography로 활성물질 확인	TLC를 사용하여 분리된 4개의 분획중 2개의 분획에서 MMP-9 저해활성 확인	High performance TLC를 사용하여 EtOAc 분획을 점적 후 chlormform:MeOH:H ₂ O = 30:60:8의 용매로 분획하였으며 4개의 분리된 물질들을 획득하였고, 이들을 동맥평활근 세포에 처리하여 MMP-9 저해활성을 측정함	
불가사리 EtOAc fraction에서 TLC로 분획된 4개의 물질들을 Maldi-Tof를 사용하여 각각의 물질의 순순도와 이동도 peak를 측정하여 강글리오 사이드 표준물질과 비교	활성이 있는 2개의 분획중 한 개의 분획에서 단일 peak를 검출하였으며 NMR 분석진행중임	Maldi-Tof 를 사용하여 분획된 4개의 물질의 이동도를 강글리오사이드 표준물질과 비교함	
불가사리 EtOAc 추출물을 먹인 마우스의 혈중콜레스테롤수치와 중성지질의 함량조사	토탈콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 수치가 조금 감소	6주간 불가사리 추출물을 먹인 마우스의 혈중콜레스테롤과 중성지질 함량을 ELISA법으로 측정	

3-1-4-1 불가사리 BuOH의 subfraction : 12개 분획

불가사리 6.5 kg을 잘게 자른 후 MeOH (12 L)로 실온에서 7일간 2회 추출하였다. 여액을 감압농축하여 MeOH 추출물 241 g을 얻었고 이를 물에 현탁시킨 후 n-hexane, EtOAc, n-BuOH로 순차적으로 용매분획 하였다. 이 중 활성을 띄는 BuOH층을 silica gel VLC로 MC/MeOH gradient 이동상 조건을 이용하여 12개의 분획으로 나누었다. 그 중 활성을 나타내는 분획 8번을 역상(C18)컬럼크로마토그래피를 이용하여 하위분획 8-1부터 8-7까지 총 7개의 소분획으로 나누었다. 하위분획 8-3을 C18 preparative HPLC로 MeOH/H₂O 5%에서 시작하여 40분간 62%까지 증가시켜 5 종의 순수 화합물을 얻었다. 하위분획 8-5번에서는 silica gel 컬럼크로마토그래피법을 사용하여 CHCl₃/MeOH/H₂O(65/35/5)의 조건으로 정제하여 2 종의 순수 화합물을 얻었다.

Scheme 1 불가사리 추출물의 유기용매 분획법



3-1-4-2. 불가사리 BuOH의 subfraction : 12개 분획

불가사리 6.5 kg을 잘게 자른 후 MeOH (12 L)로 실온에서 7일간 2회 추출하였다. 여액을 감압농축하여 MeOH 추출물 241 g을 얻었고 이를 물에 현탁시킨 후 n-hexane, EtOAc, n-BuOH로 순차적으로 용매분획 하였다. 이 중 활성을 띄는 BuOH층을 silica gel VLC로 MC/MeOH gradient 이동상 조건을 이용하여 12개의 분획으로 나누었다. 그 중 활성을 나타내는 분획 8번을 역상(C18)컬럼크로마토그래피를 이용하여 하위분획 8-1부터 8-7까지 총 7개의 소분획으로 나누었다. 하위분획 8-3을 C18 preparative HPLC로 MeOH/H₂O 5%에서 시작하여 40분간 62%까지 증가시켜 5 종의 순수 화합물을 얻었다. 하위분획 8-5번에서는 silica gel 컬럼크로마

토그래피법을 사용하여 CHCl₃/MeOH/H₂O(65/35/5)의 조건으로 정제하여 2 종의 순수 화합물을 얻었다.

3-1-4-3. 화합물 Fr. 8-5-5의 화학구조는 그림 1과 같이

¹H-, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOESY 분석결과, AS-8-5-5는 steroidal saponin계 화합물인 것으로 예측되었다. 두 화합물은 특징적으로 sterol 모형의 9번과 11번 사이에 이중결합을 갖고 있으며 21번 위치에 hydroxyl group이 치환되어 있고 23번에 ketone group을 가지고 있다. 치환된 당의 종류는 ¹H-¹H COSY와 TOCSY data를 분석하여 결정하였다. NOESY data를 분석하여 일부 상대구조를 결정하여 아래와 같은 화합물로 추정하였다.

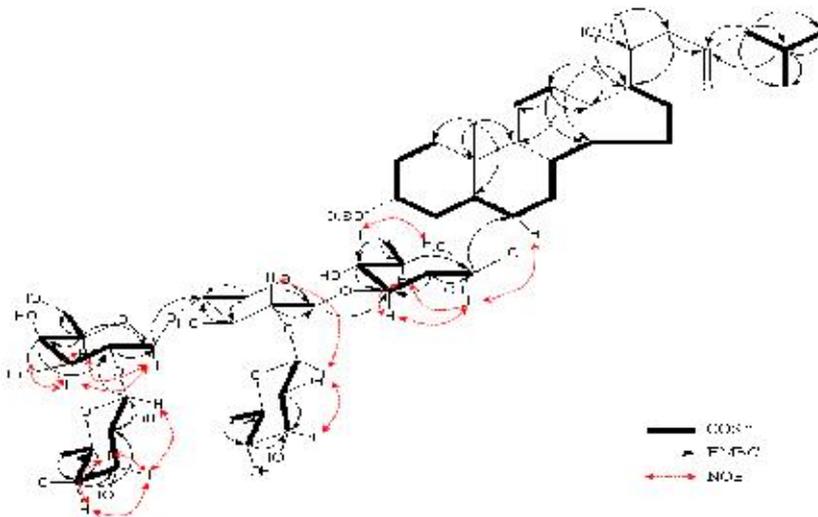


그림 1

3-1-4-4. 화합물 Fr 8-5-7의 화학구조는 그림 2와 같이

¹H-, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, NOESY data 분석결과, AS-8-5-7은 Fr8-5-5와 유사한 화합물로서 당이 하나 더 치환된 구조인 것으로 추정되었다.

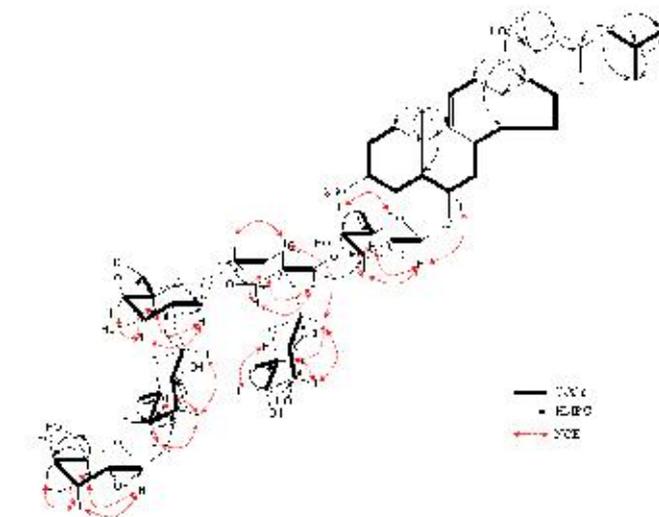


그림 2

3-1-4-5. 불가사리 BuOH의 탈과립반응에 미치는 영향

1차년도 실험결과에서 불가사리를 유기용매로 분획의 활성을 검토한 결과 butanol 층에서 가장 강한 활성이 있음을 확인한 후 2차년도에서는 butanol 분획을 다시 유기 용매로 12개 분획으로 재분획하여 활성을 확인하였다.

1차년도에서 확인 않된 butanol 분획을 쥐 골수에서 분화시킨 염증, 알러지 반응에 관여하는 주된 세포에인 비만세포에 KL(c-kit ligand)로 자극후 일어나는 탈과립반응 (지표물질: β -hexosaminidase, β -Hex)에 미치는 영향을 검토한 결과 그림3과 같이 butanol 분획은 용량 의존적으로 탈과립 반응을 억제하였으며 50% 억제에 필요한 용량은 134.8 μ g/ml 이었다.

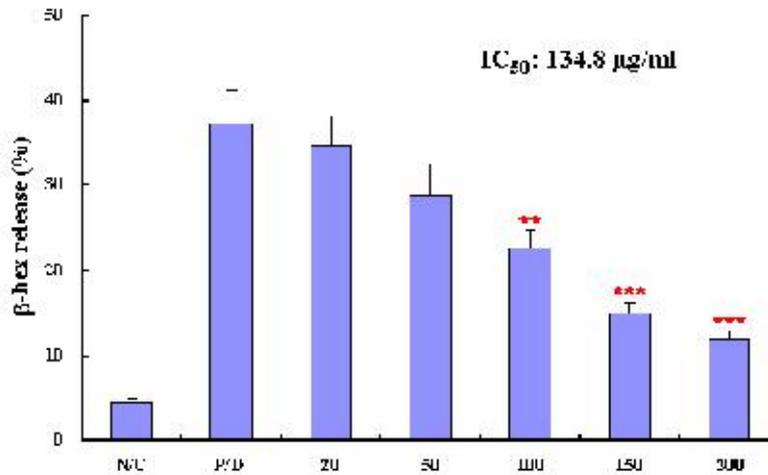


그림 3. 불가사리 BuOH의 탈과립반응에 미치는 영향

3-1-4-6. 불가사리 BuOH subfraction이 cyclooxygenase-2 (COX-2) 의존적인 prostaglandin D2 (PGD₂) 생성에 미치는 영향

재분획한 12개 분획을 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에 KL/LPS/IL-10으로 자극 후 생성되는 COX-2 의존적인 PGD₂ 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획7,8에 비교적 강한 활성을 나타내었다.

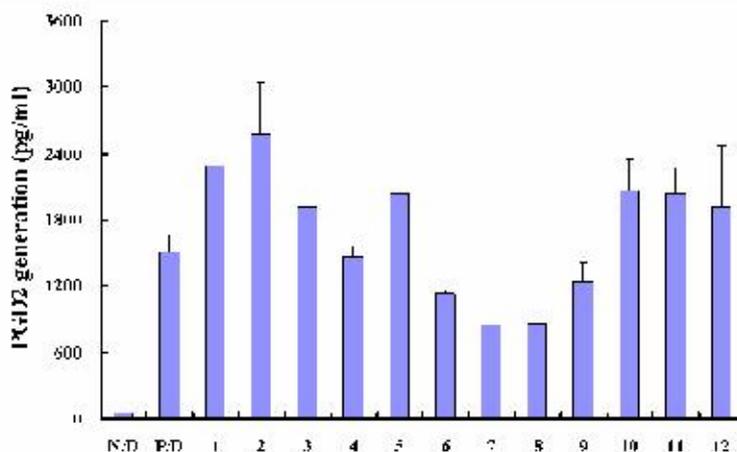


그림 4. 불가사리 BuOH subfraction이 COX-2 의존적인 PGD₂ 생성에 미치는 영향

3-1-4-7. 불가사리 BuOH sunfraction이 5-lipoxygenase (5-LOX) 의존적인 leukotrien C₄ (LTC₄) 생성에 미치는 영향

재분획한 12개 분획을 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에 KL/LPS/IL-10으로 자극후 생성되는 LTC₄ 생성에 대한 효과를 검토한 결과 분획 4,7,9,11,12 비교적 강한 활성을 나타내었다.

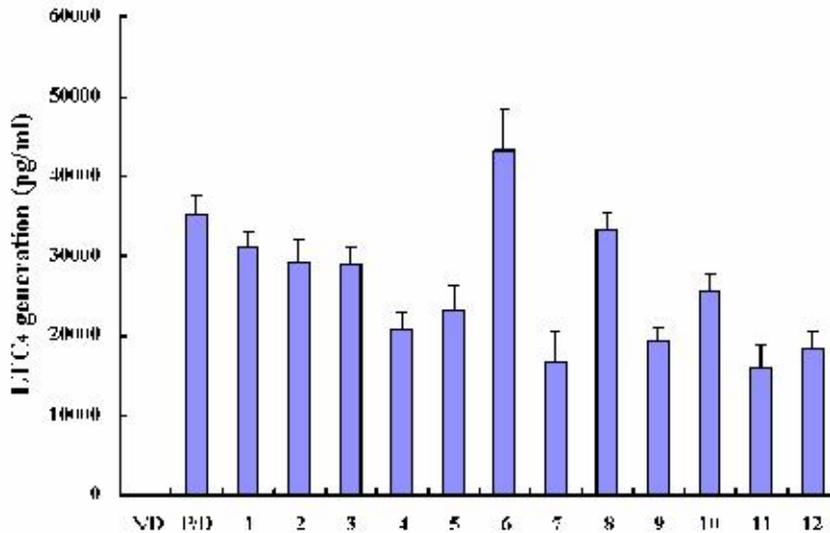


그림 5. 불가사리 BuOH sunfraction이 5-LOX의존적인 LTC₄ 생성에 미치는 영향

3-1-4-8. 불가사리 BuOH subfraction이 탈과립 반응에 미치는 영향

재분획한 12개 분획을 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에 KL/LPS/IL-10으로 자극후 비만세포의 탈과립 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 분획1,2,4에서 비교적 강한 활성을 나타내었다.

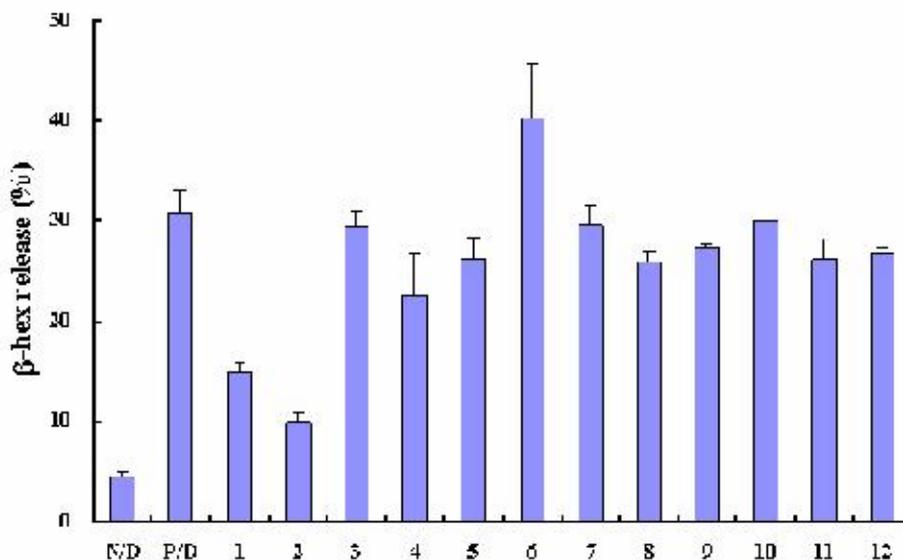


그림 6. 불가사리 BuOH subfraction이 탈과립 반응에 미치는 영향

상기 실험결과 정리하면 아래 표와 같다.

Table 1

불가사리 추출물 fraction	COX 2/PGD ₂ Inhibition(%)	LTC ₄ Inhibition(%)	β-Hex Inhibition(%)
1	-50.68	11.54	52.15
2	-69.49	16.74	68.18
3	-26.57	17.17	4.28
4	-0.47	40.55	27.59
5	-34.52	33.82	15.24
6	23.23	-22.34	-31.23
7	41.89	51.69	3.58
8	42.08	4.66	14.63
9	17.5	44.9	9.93
10	-36.61	27.0	1.85
11	-36.13	55.09	14.96
12	-22.11	47.61	12.47

3-1-4-9. 불가사리 BuOH분획의 알러지반응 억제 효능-동물모델에서 효능

시험관에서의 효능을 바탕으로 butanol 분획이 항원-항체로 유도한 1형 알러지 동물모델인 Passive Cutaneous Anaphylaxy Reaction (PCA reaction)에 대한 효능을 확인한 결과 용량 의존적으로 알러지 반응을 억제시켰으며, 50% 억제 필요한 용량은 67.5 mg/kg으로 강한 효능을 나타내었다.

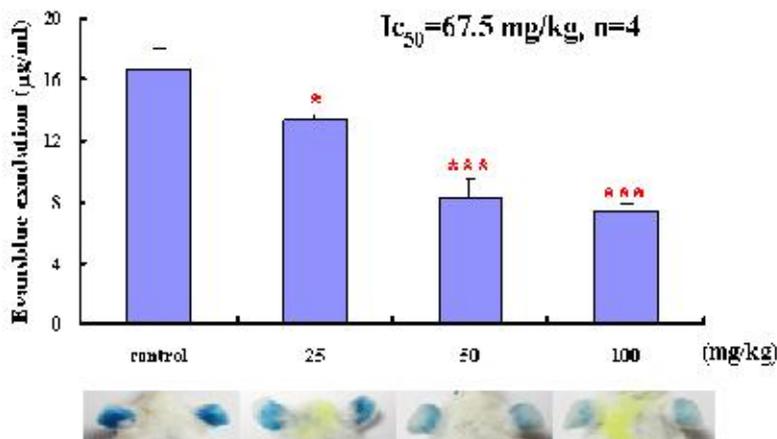


그림 7. 불가사리 BuOH분획의 알러지반응 억제 효능-동물모델에서 효능

3-1-4-10. 불가사리 BuOH분획의 항 천식작용

불가사리 BuOH분획이 기관지 세척액 중 호산구 침윤에 미치는 영향

Ovalbumin/Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 투여용량을 200 mg/kg으로 투여한 결과 천식반응에 관여하는 주된 세포인 호산구의 침윤을 억제하는 활성이 있음이 예상 된다. 3차년도에는 보다 구체적인 실험을 수행할 계획임.

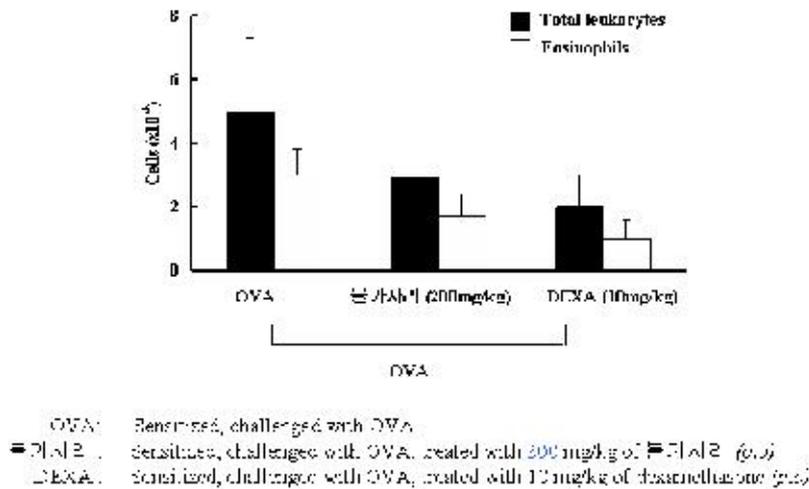


그림 8. 불가사리 BuOH분획이 항원-항체로 유도한 천식동물에서 호산구 숫자에 미치는 영향

3-1-4-11. 불가사리분획이 Nitric Oxide (NO) 생성에 미치는 영향

염증반응에 관여하는 화학매개체로 알려진 nitric oxide (NO)생성에 미치는 불가사리의 유기용매분획에 대한 저해활성을 대식세포인 RAW264.7 세포에 세균 세포벽의 구성 성분인 lipopolysaccharide (LPS)를 자극시키 후 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 만들어지는 NO 생성 억제능을 확인한 결과 hexane층 (HEX) 및 ethylacetate (EtoAC)층에서 강한 저해활성을 나타내었으며 그 결과는 그림 9에서와 같이 Hexane 층은 용향의존적으로 NO의 생성을 억제하였으며 이반응은 iNOS 단백질의 발현 억제에 의함이 밝혀졌다.

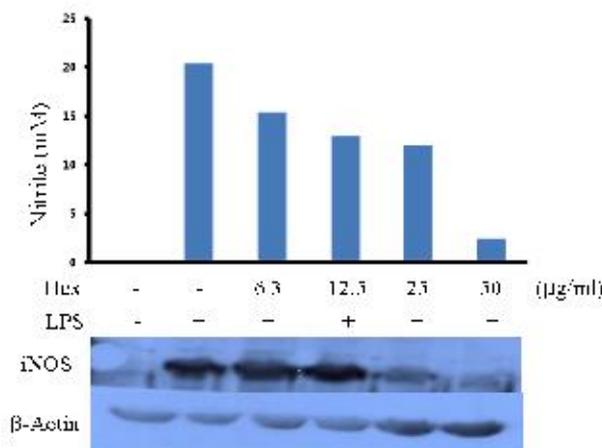


그림 9. 불가사리분획이 NO 생성에 미치는 영향

3-1-4-14. 호박해면 ethylacetate층이 RAW264.7 세포에서 NO 생성 및 iNOS protein 발현에 미치는 영향

EtoAC 층은 용량 의존적으로 NO의 생성을 억제하였으며 50% 억제에 필요한 농도 (IC₅₀)는 80.5 μg/ml 이었으며, 이 반응은 iNOS 단백질의 발현 억제에 의함이 밝혀졌다. 구체적인 작용기전은 3차년도에 실시할 계획이다.

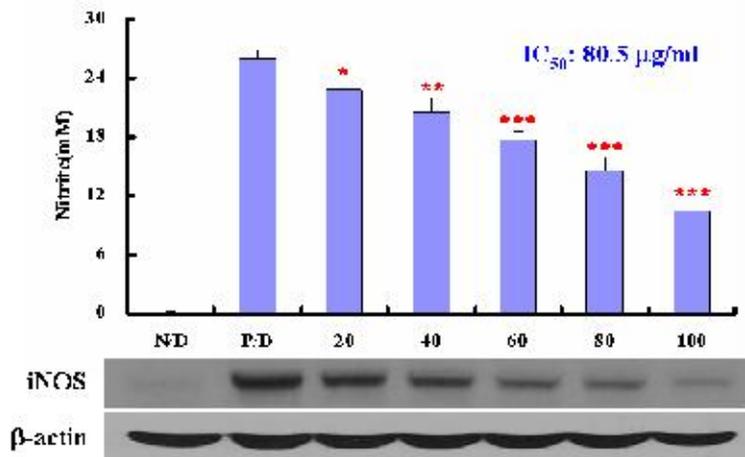


그림 11. 호박해면 ethylacetate층이 RAW264.7 세포에서 NO 생성 및 iNOS protein 발현에 미치는 영향

3-1-4-15. 호박해면추출물이 RAW264.7 세포에서 Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) 생성에 미치는 영향

EtoAC 층이 RAW264.7 세포에 LPS 처리 후 생성되는 proinflammatory cytokine인 TNF-α 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 억제 활성을 나타내지 않았다.

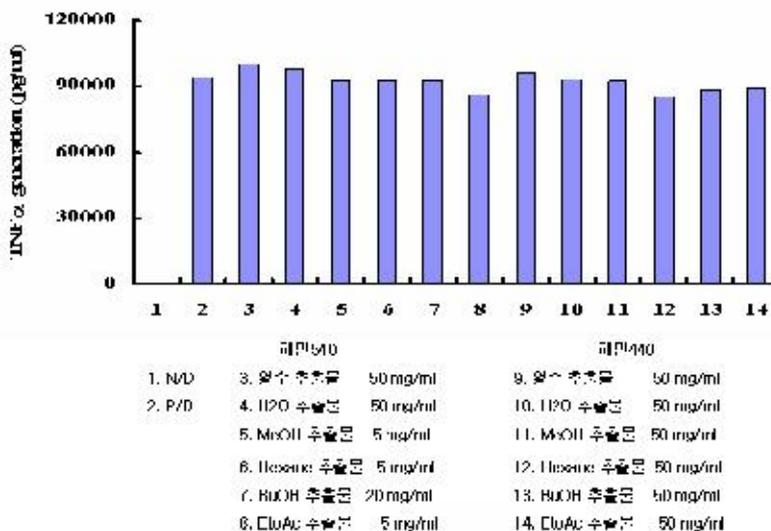


그림 12. 호박해면추출물이 RAW264.7 세포에서 TNF-α 생성에 미치는 영향

3-1-4-16. 예쁜이 해면 및 호박해면의 BuOH 분획이 탈과립 반응에 미치는 영향

2종류의 해면의 BuOH분획 쥐 골수에서 분화시킨 비만세포에 KL/LPS/IL-10으로 자극후 비만 세포의 탈과립 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 분획예쁜이 해면에서는 50% 억제 용량이 87.5 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 호박해면의 50% 억제 용량은 92.3 $\mu\text{g/ml}$ 이1,2,4에서 비교적 강한 탈과립 억제 활성을 나타내었다.

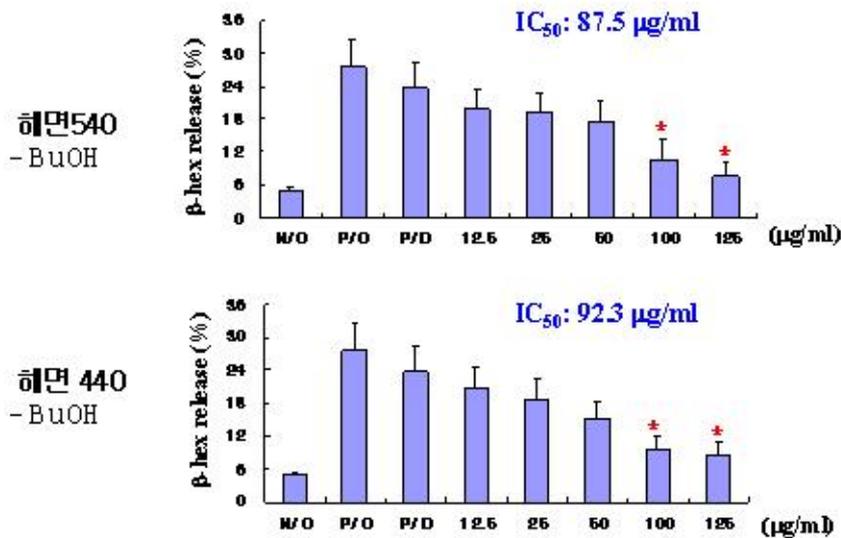


그림 13. 예쁜이 해면 및 호박해면의 BuOH 분획이 탈과립 반응에 미치는 영향

불가사리 추출물의 항동맥경화 활성에 대한 실험방법

(1) Zymography: gelatin zymography의 gel 조성은 다음과 같다 (29% acrylamide, 1% bisacrylamide 용액 0.5 M Tris (pH 6.8), 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, Ammonium Persulfate, TEMED). 준비된 sample을 gelatin이 들어간 SDS-PAGE gel에서 전기영동한 후 2.5 % tritonX-100 용액으로 15분간 2회 wash 한 후, Zymography incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 0.01% NaN_3)에서 24시간 incubation 하여 CBB (coomassie brilliant blue)로 염색한다.

(2) Western blotting: 면역학적 방법으로 시그널 단백질을 검출하기 위하여 MMP-9, p-ERK, ERK, p65, hnRNP (Santacruz co.) 등의 항체를 사용하였으며 단백질 추출을 위하여 Lipa buffer(Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4; NP-40: 1%; Na-deoxycholate: 0.25%; NaCl: 150 mM; EDTA: 1 mM; PMSF: 1 mM; Aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 microgram/ml each; Na_3VO_4 : 1 mM; NaF: 1 mM , 5mM) 를 사용하였다. 시료가 처리된 세포는 Phosphate buffered saline (PBS; NaCl 137mM, KCl 27mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 2mM)로 2회 wash하고 lipa buffer 에 lysis 한 후 단백질정량을 하였다. 정량된 샘플은 Nitrocellulose membrane(Amersham co.) 을 사용하여 blotting한 후 실험에 사용하였다.

(3) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): 혈관평활근 세포의 MMP-9

mRNA 양을 측정하기 위해 RT-PCR를 실시하였다. Total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen)를 사용하여 추출하였고, RNA LA PCR Kit (Takara)를 사용하여 cDNA를 만들었다. MMP-9 mRNA 검출에 사용한 primer는 다음과 같이 디자인하였다: MMP-9 (475 bp), 5'-GCGCTGGGCTTAGATCATTCTCA-3' (sense) and 5'-GCAGCGCGGGCCACTTGTC-3' (antisense); GAPDH (178 bp), 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAA-3'(sense) and 5'-TGTCATACCAGGAAATGAGC-3' (antisense). PCR로 증폭된 DNA 단편은 agarose gel을 이용하여 assay를 실시하였다.

(4) Migration assay: Gelatin invasion assay는 transwell system (Corning Inc.) 을 사용하여 실시하였다. 8 µm pore filter insert에 gelatin으로 coating 하여 사용하였으며 혈관평활근세포는 조직배양기에서 떼어내어 5×10^4 cells/well로 처리하였다. 각각의 well에 TNF-α 처리구, TNF-α + EtOAc 처리구 그리고 무처리구의 조건으로 24 시간 동안 배양하였으며, 배양이 끝난 후 filter를 통과한 세포를 fixation 하고, Hematoxylin과 eosin Y로 염색하였다. 염색이 끝난 후 현미경으로 염색된 세포의 개수를 측정하였다.

(5) Thin layer chromatography (TLC): 해면과 불가사리 EtOAc fraction을 TLC로 재 분석하기 위하여 Whatman 사의 HP-K silica gel (size 10 cm x 10 cm; thickness 200µ) 을 사용하였으며, EtOAc fraction을 전개용매 (chloroform(30):MeOH(60): Water(8)) 에 녹여 점적하였으며, 전개가 끝난 후 이동도에 따라 4개의 TLC fraction을 얻을 수 있었으며 이들을 다시 혈관평활근세포에 처리한후 TNF-α로 activation 시켜 24시간 후 MMP-9 저해능을 확인하였다.

3-1-4-17 불가사리 EtOAc 추출물의 MMP-9 활성저해효과를 사람의 혈관평활근세포에서 확인: a) 사람혈관평활근세포에서 염증성 사이토카인 TNF-α로 유발한 MMP-9효소생성과 활성억제 활성검정에서, 불가사리 EtOAc 분획 추출물을 혈관평활근세포주에 투여하고 MMP-9 단백질을 TNF-α로 유도하였다. 그 결과 그림 14 에서와 같이 0.5 - 1 mg/ml의 농도범위에서 MMP-9생성이 억제되었으며 결과적으로 MMP-9효소활성이 억제하고 있는 것을 발견하였다

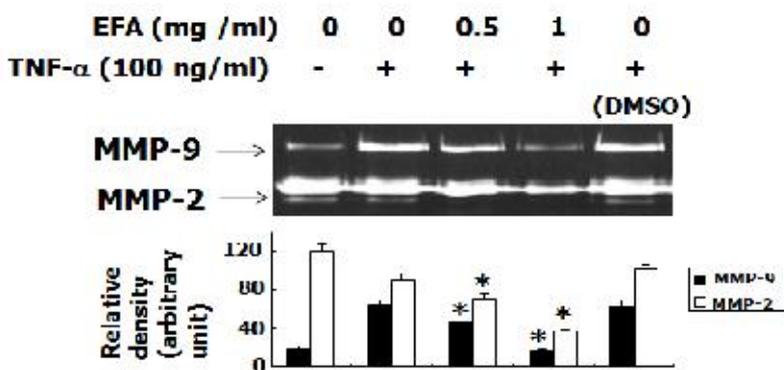


그림 14. EFA : 불가사리 EtOAc 추출분획의 TNF-α유발 MMP-9생성 및 효소활성억제 활성

b) EtOAc 분획추출물을 이용한 생성된 MMP-9/2효소 활성억제 검정에서, 불가사리 EtOAc 분

획 추출물을 혈관평활근세포주가 생성한 MMP-9/2효소활성을 직접적으로 저해하는지 검토하였다. EtOAc 추출물을 MMP-9/2효소에 직접 처리한 결과 그림 15에서와 같이 *in vitro* 에서의 MMP-9에 보다 효과적으로 활성저해 작용을 나타내며 MMP-2효소활성도 저해함을 알수 있었다.

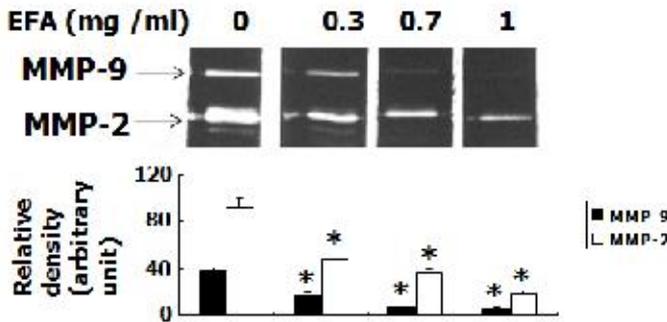


그림 15. EFA : 불가사리 EtOAc 추출분획의 MMP-9/2억제 활성

한편, 불가사리 EtOAc 추출물의 혈관평활근 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 Roche Co. 사의 XTT II kit 를 사용하여 혈관평활근 세포의 생육억제 정도를 측정하였다. 그림 16에서와 같이 불가사리 EtOAc 추출물은 0 - 1 mg/ml 의 농도 범위 내에서 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

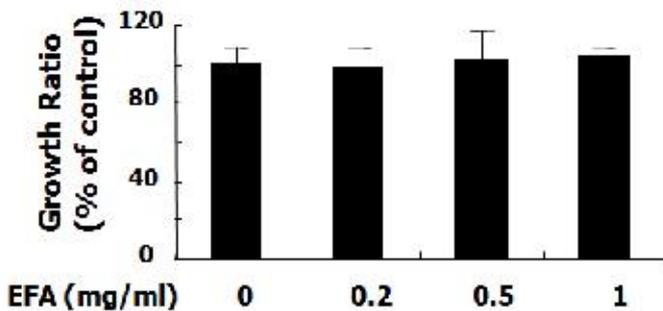


그림 16. EFA : 불가사리 EtOAc 추출분획의 성장억제영향

3-1-4-18 면역학적 방법으로 불가사리 EtOAc 분획의 MMP-9 단백질 생산 저해확인: 불가사리 EtOAc 분획을 80 % confluency로 자란 혈관평활근 세포에 300, 700, 1000 μ g/ml 농도구배로 처리한 후 TNF- α 로 activation 시키고 24 시간 후 cell을 lysis buffer에 녹여 western blotting 으로 MMP-9 단백질의 양을 측정하였다. 그 결과 그림 15에서 보는 바와 같이 MMP-9의 양은 EtOAc 분획의 양에 따라 농도 의존적으로 감소하는 것이 확인되었다. 불가사리 EtOAc 추출물은 혈관평활근 세포에 처리했을 시에도 MMP-9 저해활성을 나타내나 *in vitro* 에서도 MMP-9 저해활성을 가지고 있으므로 혈관 평활근 세포에서 MMP-9 단백질의 합성 저해능을 가지고 있는지 Western-Blotting 방법으로 실험하여 확인해본 결과 그림 17와 같이 불가사리 EtOAc 추출물은 혈관평활근 세포에 처리시에 MMP-9 단백질의 합성을 저해함을 발견하였다.



그림 17. EtOAc fraction inhibited MMP-9 protein production in TNF- α -induced HASMC. Western blot was performed with total protein extract of HASMCs as shown in above conditions. Cells were serum-free cultured with several concentrations of EFA as shown in this figure with or without TNF- α for 24 h.

한편, 전사단계에서 불가사리 EtOAc 분획에 의해 MMP-9 mRNA level 감소에서 불가사리 EtOAc 분획의 MMP-9의 전사단계에 미치는 영향을 보기 위하여 RT-PCR로 MMP-9의 mRNA level을 측정하였다. 불가사리 EtOAc 분획을 80 % confluency로 자란 혈관평활근 세포에 300, 700, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도구배로 처리한 후 TNF- α 로 activation 시키고 24 시간 후 cell을 Trizol로 처리하여 total RNA를 분리하여 실험에 이용하였다. 전술한 specific primer를 사용하여 RT-PCR를 실시한 결과 농도 의존적으로 MMP-9 mRNA의 양이 감소함을 확인하였다. 즉, 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근 세포의 MMP-9 정보를 가지고 있는 mRNA의 합성을 저해하는가를 조사하기 위하여 EtOAc 추출분획을 세포에 처리하고 TNF-alpha로 MMP-9 mRNA의 합성을 유도한 뒤, RT-PCR로 저해여부를 확인하였다. 실험 결과 그림 18 에서와 같이 불가사리 EtOAc 추출분획은 MMP-9 mRNA의 합성을 저해하고 있음을 확인하였다.

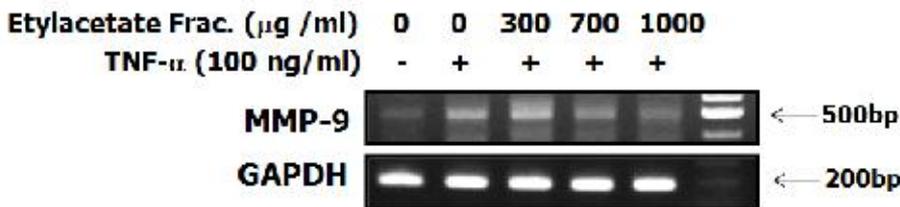


그림 18. EtOAc fraction inhibited MMP-9 mRNA levels in a dose-dependent manner. An RT-PCR using MMP-9 specific primers. HASMCs were treated with various concentrations of EFA (300, 700, 1000 mg/ml) in the presence or absence of TNF- α as indicated.

3-1-4-19 U0126에 의한 MMP-9 생산저해 확인: 전년 1차년도 실험에서 나타난 결과와 같이 EtOAc 분획에 의해 TNF- α 로 activation된 p-ERK의 활성이 줄어든다는 사실을 확인한 바 있으며 p-ERK의 활성과 MMP-9의 생성과의 연관성을 확인하기 위해 p-ERK specific inhibitor인 U0126을 동맥평활근 세포에 10, 20, 30 μM 의 농도별로 처리하였다. 다시 TNF- α 로 activation 시키고 24 시간 후 Zymography를 실시하여 MMP-9의 활성을 측정하였으며, 그림 19에서와 같이 MMP-9의 활성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 불가사리 EtOAc 추출분획이 세포신호전달단백질의 하나인 ERK의 활성화를 억제하는 것을 확인하였으므로, ERK 단백질의 활성화

와 MMP-9 단백질의 생산이 관계있는지를 확인하기 위하여 ERK 단백질 인산화의 저해제인 U0126를 사용하여 ERK의 인산화를 억제 한후 TNF-alpha로 MMP-9 단백질의 생산을 유도하여 U0126의 영향을 확인하였다. 그림 19에서 보는 바와 같이 ERK의 인산화 저해제로 사용한 U0126 처리군에서는 MMP-9 단백질의 생산이 저해됨을 Zymography를 통해 검정하였다. 따라서, 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근 세포에서의 MMP-9 억제능은 ERK의 활성화를 억제함으로써 나타나는 현상임을 추측할 수 있다.

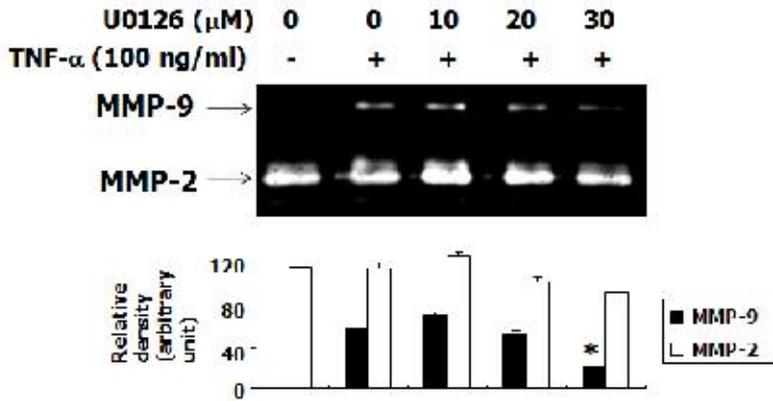


그림 19. TNF- α 로 자극유도된 HASMC에서 ERK저해제인 U0126의 MMP-9발현 억제 확인. U0126 was pretreated for 2 h and then, 100 ng/ml TNF- α was added to the serum-free conditioned medium. After 24 h, culture supernatant was subjected to Zymographic analysis.

3-1-4-20 동맥평활근 세포에서 불가사리 EtOAc 분획의 migration 저해작용: 동맥평활근 세포의 MMP-9의 생산에 의한 ECM(extracellular matrix) 분해와 migration이 동맥경화와 혈관협착등의 원인으로 알려져 있으며, TNF- α 의 자극에 의해서 동맥평활근 세포의 이동은 시작된다. Gelatin으로 코팅된 filter를 격막으로 가지는 transwell 을 사용하여 EtOAc 분획의 migration 저해정도를 측정하였다. 각각의 well에 500 μ l의 EtOAc와 TNF- α 가 첨가된 serum-free 배지를 첨가한 후 transwell을 설치하였다. 설치된 transwell에 동일하게 조절된 배지와 5×10^4 개의 혈관평활근 세포를 처리한 후 24시간 동안 세포배양기 안에서 정치하여 filter를 통해 세포가 이동하게 하였다. 이동된 세포의 수를 측정하기 위해 filter를 수거하여 뒷면에 이동한 세포를 methanol로 고정시킨 후 Hematoxylin과 eosin Y로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. TNF- α 로만 처리된 대조구에서는 아무것도 처리하지 않은 control에 비해 이동한 세포의 수가 수배 이상 증가하였으며, TNF- α 와 EtOAc가 동시에 처리된 sample에서는 control 과 비슷한 수준으로 이동된 세포의 수가 감소하였다. 즉, 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근세포의 migration에 대한 억제효과를 관찰하기 위하여 Coming Co. 사의 transwell system을 이용한 실험에서, transwell의 membran에 gelatin으로 coating 한 후, TNF- α 처리 군과 EtOAc 추출분획 + TNF- α 처리 군으로 나누어 처리된 혈관평활근 세포를 transwell에 투여한 후 incubator에서 24시간 배양하였다. 그 뒤 membran 뒤쪽으로 이동한 혈관평활근 세포를 eosin Y와 hematoxilyn으로 염색하여 이동한 세포의 수를 확인한 결과, 그림 20에서와 같이 불가사리 EtOAc추출분획 처리구는 TNF- α 만 처리한 대조구보다 이동한 세포가 현저히 줄어들었음을 관찰할 수 있었다.

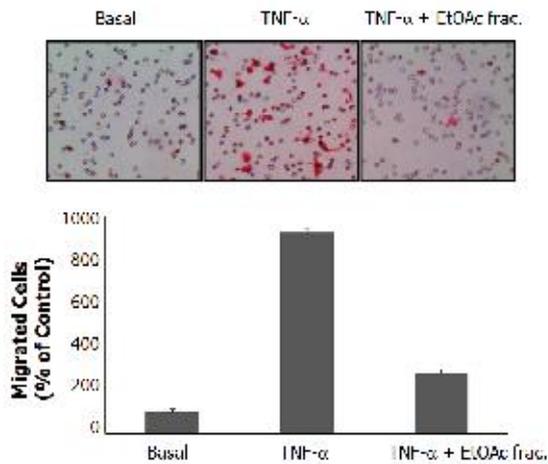


그림 20. EtOAc fraction의 TNF- α -유도 HASMCs 이주억제 활성. In the invasion assay, 500 μ l of serum-free media with or without TNF- α (100 ng/ml) was added to each well and Transwells with gelatin coated membrane were inserted. Next, 200 μ l of serum-free media containing HASMCs with 1000 μ g/ml EtOAc fraction in the presence or absence of TNF- α (100 ng/ml) were placed in the upside of Transwell as indicated in this figure. After 24 h of incubation, the downward of the membrane were stained with hematoxylin and eosin Y.

3-1-4-21 TLC로 재분획된 T1, T2, T3, T4를 Maldi-Tof를 이용하여 순수도를 검정하고 강글리오사이드 표준물질과 이동도 비교: Maldi-Tof 를 사용하여 분획된 4개 compound의 이동도를 강글리오사이드 표준물질과 비교였으며 활성이 나온 T1과 T2 중 T2가 순수분리된 것으로 확인 되었으며 (그림 21) 현재 NMR 분석을 진행중이다.

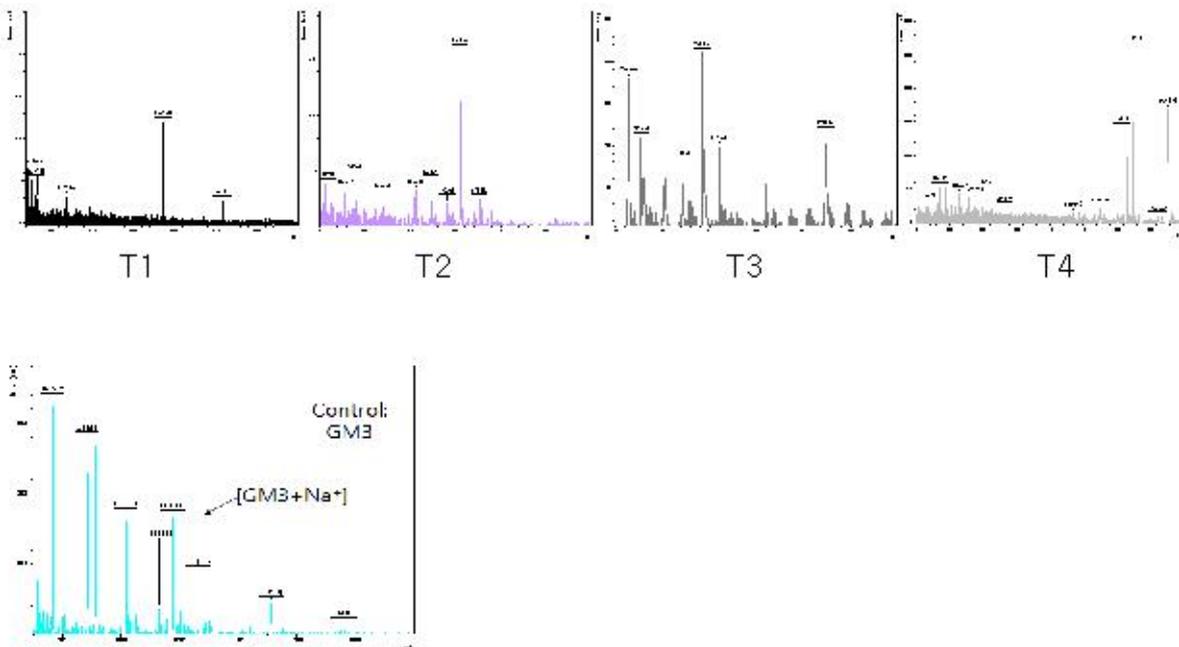


그림 21. MMP-9활성억제 활성을 갖는 T2 compound의 당지질 Ganglioside GM3 유사구조.

3-1-4-22 불가사리 EtOAc 추출물의 마우스식이 후 혈중 콜레스테롤과 중성지질의 변화: EtOAc 추출물에 의한 마우스 혈중 지질의 변화를 관찰하기 위하여 4주령 마우스에 6 주동안 일반 식이군, 고지질 식이군, 고지질식이군 + EtOAc 추출물 섭취군 으로 나누어 생육시킨 후

혈중 콜레스테롤과 중성지방 Leptin 등의 변화를 관찰하였다. 이들의 측정은 Asanpharmaceutical co. 등의 시약을 사용하여 ELISA 법으로 측정하였다.

토탈 콜레스테롤의 변화는 고지방군에 비해 조금 줄어드는 현상을 보였으며 HDL-콜레스테롤은 고지방군에 비해 EtOAc 섭취군이 조금 증가하였다 (Table 3). 또한 LDL-콜레스테롤도 고지방군에 비해 EtOAc 섭취군이 조금 줄어드는 것이 관찰되었다. 또한 중성지방의 양은 고지방군에 비해 차이가 거의 없는 것으로 나타났다 (그림 22). 따라서 불가사리 추출물의 동물식이 시 토탈콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤의 감소는 혈관계질환의 예방에 기여할 수 있을 것으로 추측된다.

Table 3 불가사리 EtOAc 추출물의 마우스 식이의 혈중콜레스테롤과 중성지방의 변화
ND; normal diet, HD; high fat diet

Lipid (mg/dL)	ND	HD + EtOAc Frac. (mg / kg)			
		EtOAc Frac. 0	EtOAc Frac. 1	EtOAc Frac. 10	EtOAc Frac. 100
HDL cholestreol	62.13±2.58	66.35±5.32	78.21±2.28	72.10±5.23	68.20±15.25
LDL-cholestreol	37.37±10.16	53.93±5.67	37.75±12.25	38.21±9.57	57.83±27.2
Total cholestreol	122.23±12.06	156.73±9.14	135.37±5.25	132.44±10.82	132.22±13.82
Triglycerides	61.35±3.52	83.23±15.43	81.15±5.58	75.18±9.35	87.38±25.74
HDL/TC	0.55±0.15	0.52±0.35	0.54±0.38	0.53±0.36	0.39±0.57
LDL/TC	0.29±0.7	0.36±9.08	0.20±0.29	0.29±0.87	0.39±1.22

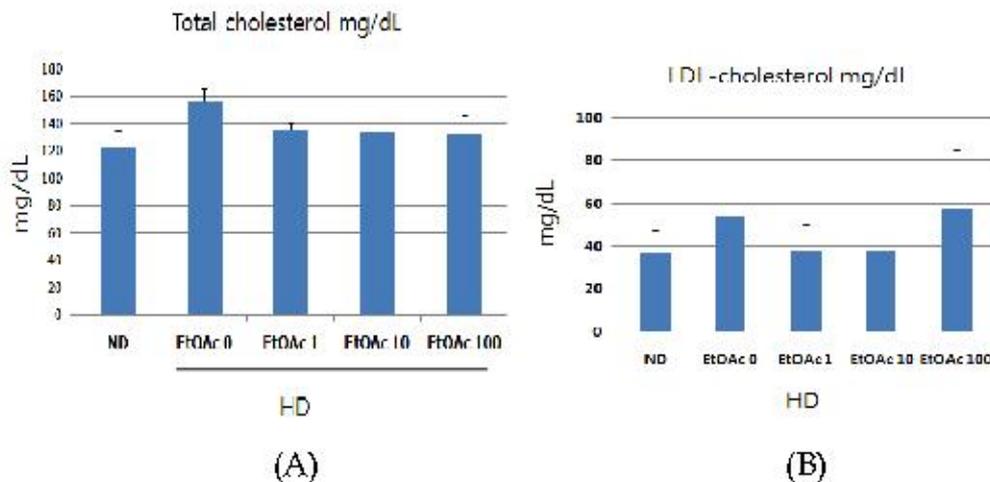


그림 22. 혈관total-cholesterol 및 LDL-cholesterol의 평가. (A) Total cholesterol (B) LDL-cholesterol ND; normal diet, HD; high fat diet

해면 추출물의 항동맥경화 활성

실험 방법

(1) Zymography: gelatin zymography의 gel 조성은 다음과 같다 (29% acrylamide, 1% bisacrylamide 용액 0.5 M Tris (pH 6.8), 1.5 M Tris (pH 8.8), 10% SDS, Ammonium Persulfate, TEMED). 준비된 sample을 gelatin이 들어간 SDS-PAGE gel에서 전기영동한 후 2.5 % tritonX-100 용액으로 15분간 2회 wash 한 후, Zymography incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ 0.01% NaN₃)에서 24시간 incubation 하여 CBB (coomassie brilliant blue)로 염색한다.

(2) 핵단백질 분리: 핵단백질 분리에는 Schreiber 등(1989)이 소개한 방법을 사용하였다, 충분히 자란 세포를 1ml의 PBS 완충액으로 2번 wash 한 후 0.5ml의 PBS를 처리한후 scraper로 긁어 EP tube로 옮긴다. sol. A는 (10mM HEPES (pH7.9), 10mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1mM EGTA) 에 사용직전 DTT(dithiothreitol) 1mM, PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride) 0.5mM, protease cocktail (appropriate concentration) 으로 첨가하여 사용하였으며, NP40와 혼합하여 세포막을 lysis 시킨후 원심분리 하여 핵을 분리하였다. 핵단백질을 녹이기 위해서는 sol. C (20mM HEPES (pH7.9), 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA)를 사용하였으며 사용직전 DTT 1mM, PMSF 1mM, protease inhibitor cocktail(appropriate concentration)를 첨가하여 사용하였고 추출된 핵단백질은 -70 ℃에 보관하였다.

(3) Western blotting: 면역학적 방법으로 시그널 단백질을 검출하기 위하여 p-ERK, ERK, p65, hnRNP (Santacruz co.) 등의 항체를 사용하였으며 단백질 추출을 위하여 Lipa buffer(Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4; NP-40: 1%; Na-deoxycholate: 0.25%; NaCl: 150 mM; EDTA: 1 mM; PMSF: 1 mM; Aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 microgram/ml each; Na₃VO₄: 1 mM; NaF: 1 mM , 5mM) 를 사용하였다. 시료가 처리된 세포는 Phosphate buffered saline (PBS; NaCl 137mM, KCl 27mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM)로 2회 wash하고 lipa buffer에 lysis 한 후 단백질정량을 하였다. 정량된 샘플은 Nitrocellulose membrane(Amersham co.)을 사용하여 blotting한 후 실험에 사용하였다.

(4) Thin layer chromatography (TLC): 해면과 불가사리 EtOAc fraction을 TLC로 재 분획하기 위하여 Whatman 사의 HP-K silica gel (size 10 cm x 10 cm; thickness 200μ) 을 사용하였으며, EtOAc fraction을 전개용매 (chloroform(30):MeOH(60): Water(8)) 에 녹여 점적하였으며, 전개가 끝난 후 이동도에 따라 4개의 TLC fraction을 얻을 수 있었으며 이들을 다시 혈관평활근세포에 처리한후 TNF-α로 activation 시켜 24시간 후 MMP-9 저해능을 확인하였다.

3-1-4-23 TLC (thin layer chromatography)로 하면 EtOAc fraction을 재분획하여 활성검정: HPTLC(high performance thin layer chromatography)를 이용하여 EtOAc fraction을 재분획하였다. chloroform : methanol : H₂O = 30 : 60 : 8 의 용매계를 이용하였으며, EtOAc fraction을 같은 용매에 녹여 점적한 후 이동도에 따라 4개의 compound로 분획하였다. 그림 23의 A와 같이 분획된 4개의 compound를 같은 용매로 녹여낸 후 spT1, spT2, spT3, spT4로 명명하고 evaporator를 사용하여 dry 시키고 DMSO에 녹여서 활성검정에 활용하였다. 동맥평활근세포에 spT1 - spT4의 compound를 treat하고 TNF- α 로 activation 시킨 후 24 시간뒤 Zymography로 활성검정한결과 그림 5의 B와 같이 spT1 과 spT2에서 MMP-9 inhibition activity를 확인할 수 있었다.

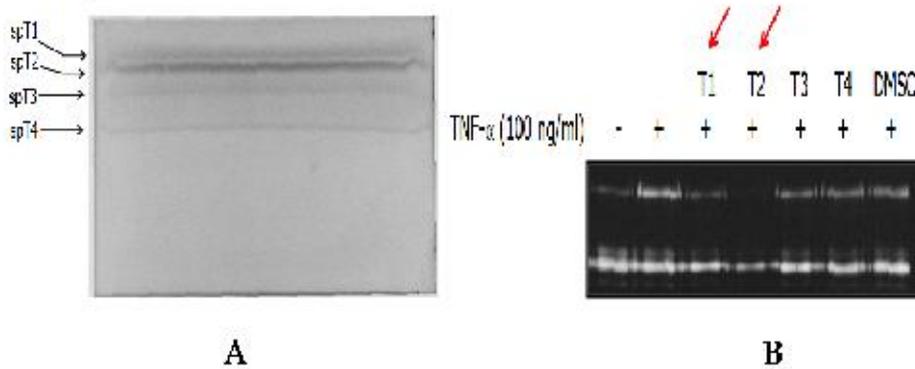


그림 23. TNF- α 유발 HASMC에서 ponce EtOAc fraction의 HPTLC에서 재분획 및 spT1 및 spT2의 MMP-9생성억제활성 확인. A: solvent (chloroform(30):methanol(60):water(8)) was used in TLC and the migrated compounds were scraped and eluted with the same solvent. Evaporated T1 - T4 compounds were dissolved in DMSO. B: spT1 - spT4 compounds were treated to the serum-free conditioned HASMC culture and 2 h later TNF- α was added to each wells. After 24 h, culture supernatant was subjected to Zymographic analysis.

3-1-5 3차년도 실험내용 및 결과

연구 내용	연구결과	연구수행 방법 (이론적·실험적 접근방법)	비고
<p>-불가사리 대량 분획 실시</p> <p>-불가사리 Butanol 분획을 다시 subfractionation을 하여 비교적 양이 많은 fr7 (1.8g) 및 fr8 (4.43g) 으로부터 활성물질 분리 및 구조결정</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. fr8 에서 7개 단일물질 분리 및 구조결정 2. Fr7에서 아미노산 분리 및 구조결정 3. 분리된 saponin의 항염증활성 검색 4. 신규 화합물 1은 COX-2 의존적인 PGD2 생성을 억제하였으며, 2와 3 혼합물에서는 탈과립 반응 억제 5. 화합물 4에서 NO 생성억제와 동시에 탈과립 반응 억제작용을 나타내었으며, 화합물 6 및 7에서는 COX-2 의존적인 PGD2 생성 억제 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 구조결정: Silicagel column, TLC, HPLC, NMR, LC-mass등으로 구조결정 2. 7개의 화합물에서 3종류의 신규 saponin 및 4종류의 기지 saponin 구조결정 3. 5종류의 아미노산 발굴 4. 분리된 saponin 화합물의 항염증활성 측정: RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 생성억제 효능 검색 및 BMMC에서 t-LOX 의존적인 LTC4 생성, COX-2 의존적인 PGD2 및 탈과립 (β-Hex) 억제 효능검색 	
<p>불가사리 조추출물의 항천식 작용효능 검색</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. OvA/Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 IL-4, eotaxin 및 IgE 생성억제 	<p>Ovalbumin/Alum으로 감작시켜 작성한 천식mouse에 불가사리 butanol 분획을 7회 경구투여 한 후 기관지 세척액 (BALF) 및 폐조직에서 cytokine 및 IgE 생성량을 EIA assay kit로 정량</p>	
<p>호박해면 조추출물의 항염증작용효능 검색</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 해면 ethylacetate (ECC)이 RAW264.7 macrophage에 LPS처리 NO에 생성억제에서 iNOS 발현조절기구 해석: NF-κB 억제에 의하여 mRNA의 발현이 억제됨 	<p>iNOS 발현억제기전 규명에는 Western blot 및 Real time PCR로 확인</p>	

연구 내용	연구결과	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	비고
EtOAc 분획에 의해 TNF- α 로 activation된 세포염증 및 비만관련성을 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근 세포에서 유도된 MMP-9의 생산을 전사와 번역단계에서 억제 연구	불가사리 EtOAc 추출분획의 항비만 및 항염증관련 신호전달관련 ERK인산화 조절기전 확인	MMP-9전사에 영향을 미치는 세포신호전달 단백질인 ERK의 활성화에 대한 억제능을 Western-Blotting으로 확인. TNF-alpha로 유도된 인산화 ERK의 증가는 불가사리 EtOAc 추출분획의 투여군에서 현저히 감소하는 것을 관찰	
혈관평활근세포의 핵단백질을 추출후 NF-kappaB의 양적변화확인. 불가사리 EtOAc 추출분획을 혈관평활근세포에 처리한 후 TNF-alpha를 처리하여 NF-kappaB의 핵내로의 이동을 유도	불가사리 EtOAc 추출분획은 혈관평활근세포에서 NF-kappa의 핵내이동을 억제함을 확인	MMP-9 유전자의 상류에 위치하여 전사조절에 영향을 미치는 전사조절단백질의 하나인 NF-kappaB의 혈관평활근 세포 핵내의 양적변화를 Western-Blotting으로 관찰	
불가사리 EtOAc추출분획을 이용한 고지방성 식이 마우스 C57BL/6 (high-fat diet-fed C57BL/6 mice)의 구강식이를 통한 체중감소 및 총지질함량 변화	6주간의 동물실험에서 복부의 총지방함량의 감소관찰됨. 해부후 복부의 지방덩어리는 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 명확하게 감소. 간조직에서 고지질식이에 따른 지방간 괴적이 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 감소. 동물식이시 체내지방함량 억제, 지방축적의 억제 및 이들을 대사하는 간조직에서 지방간의 생성억제.	EtOAc 분획추출물을 대량으로 조제하여 실험용 생쥐에서 항염증 항혈관질환 메카니즘을 이용하여 마우스의 체중변화를 추적. 2차년도 실험에서 지질 변화는 4주령 마우스의 6주동안 일반 식이군, 고지질식이 분획추출물 식이군으로 나누어 생육시킨 후 혈중 콜레스테롤과 중성지질 Leptin 등의 변화 관찰	
말초혈관 및 피하조직에서의 지질감소확인실험	EtOAc 분획추출물 식이한 결과, 피하지방 및 복부비만의 지방함량이 감소, 마우스 표피지질 및 복강지방 감소	EtOAc 분획추출물을 구강식이 과정에서 1, 10, 100 mg/kg의 투여량단위로 식이시킨후, 복부비만의 지방함량, 마우스 표피지질 및 복강지방의 관찰	
Starchfish의 ethylacetate EtOAc분획에서 활성 당지질분리	미니컬럼에서 분리조건을 확인하고 대량의 Silica Gel Chromatography를 실시하였다. 그 결과, 3-2, 3-5등 그림7에 단일밴드로 분리된 성분들의 LC-MS/MS/MS분석 구조결정	1:2:0.8로 녹인뒤, 일부(2ml)를 아세톤20ml와 혼합. 녹은 것은 vacuum건조후, 1ml의 2:1를 넣어 녹임. 침전물쪽은 잘 안 녹아 20분간 sonicate 함.sonicate해도 녹지 않고 뿌옇게 된바, 1:2:0.8로 하기로 하고, 먼저 1:2가 되도록 M (2:1)에는 C0.66+M0.33이므로, M을 0.99를 첨가후 0.52ml W첨가	
당지질 MS분석	구조결정 monohexose-ceramide확인	Shimadzu TOP-IT LC-MS). 분리 당지질을 다음조건에서 MS분석 실시.12.5%W-10mMAF-5mMFA-Me(5)-1.25%W-10mM AF-5mMFA-50%PA-Me (20)(8); 20ml/min C30 (0.3 x 50mm); DV=1.68 Sample -3 2ml/50ml	

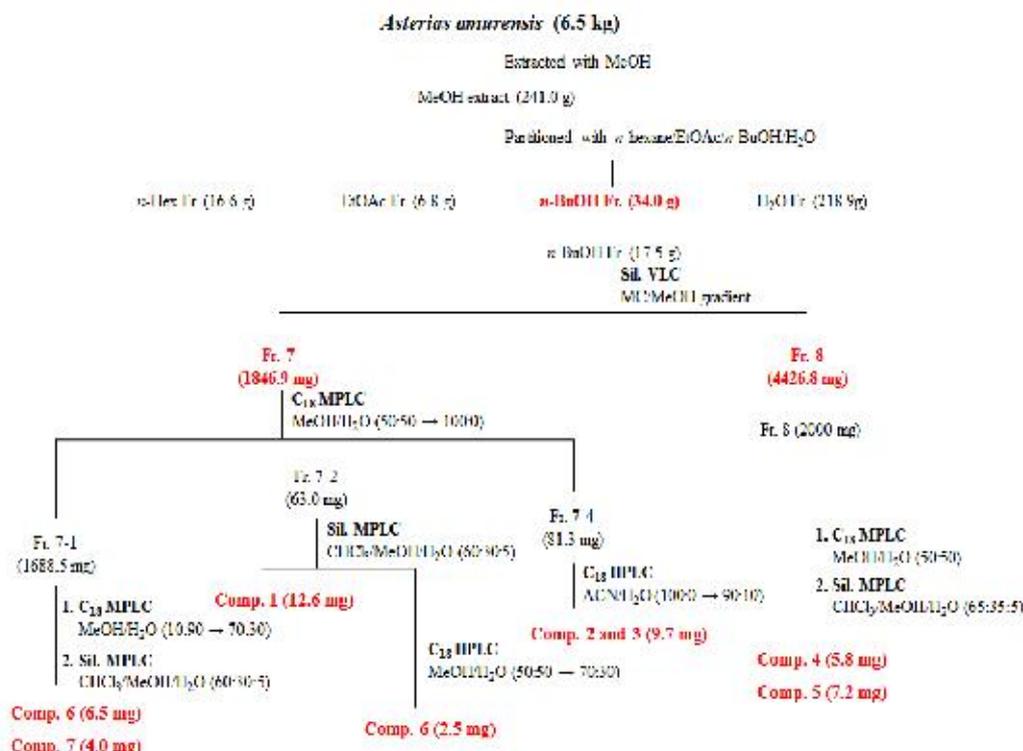
2차 년도에서 불가사리에 분리한 단일물질의 구조를 결정하기 위하여 3차 년도에서 최종적으로 결정하여 7종의 saponin 화합물과 5종의 아미노산 구조를 밝혔으며, 이중 3종의 saponin은 새로운 화합물임을 최초로 밝혔다.

3-1-5-1 아무르불가사리(*Asterias amurensis*) 추출물로부터 항염증활성 물질 분리 및 구조결정

▣ 아무르불가사리로부터 asterosaponin 화합물 분리

- 아무르 불가사리 6.5 kg을 MeOH로 실온에서 2주간 2회 추출하여 MeOH 추출물 241 g을 얻음 (Scheme 1).
- 이 추출물을 물로 현탁한 후 *n*-Hexane, EtOAc, *n*-BuOH를 이용하여 순차적으로 용매분획하여 각각의 용매분획물을 제조함 (Scheme 1).
- 항염증 활성 측정결과, *n*-BuOH 분획물의 활성이 가장 강한 것으로 나타남.
- Silica gel VLC : MC-MeOH gradient 용매를 이용하여 총 12개의 분획물을 얻음.
- Fr. 7, 8 분획물(각각 1.8 g, 4.4 g)에 대하여 C18 preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC) [MeOH-H₂O]를 실시하였고, 이로부터 얻은 소분획물에 대하여 반복적으로 silica gel column chromatography, C₁₈ MPLC 및 HPLC (C₁₈ column (21.5 × 250 mm), MeOH-H₂O or ACN-H₂O)를 실시하여 7 종의 화합물을 분리하여 구조를 결정한 결과 3 종류의 신규화합물과 기존에 보고된 4종의 saponin임을 확인하였다.

New compound: 1, 2, 3번 화합물



Scheme 1. Isolation of compounds 1 - 7 from the of *A. amurensis*

3-1-5-2 화합물 1의 구조분석

화합물 1 : NMR 및 MS data 분석결과 화합물 1의 화학구조는 6 α -O-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl]-5 α -chol-9(11)-en-23-one-3 β -yl sodium sulfate로 new compound임을 확인하였다.¹⁾

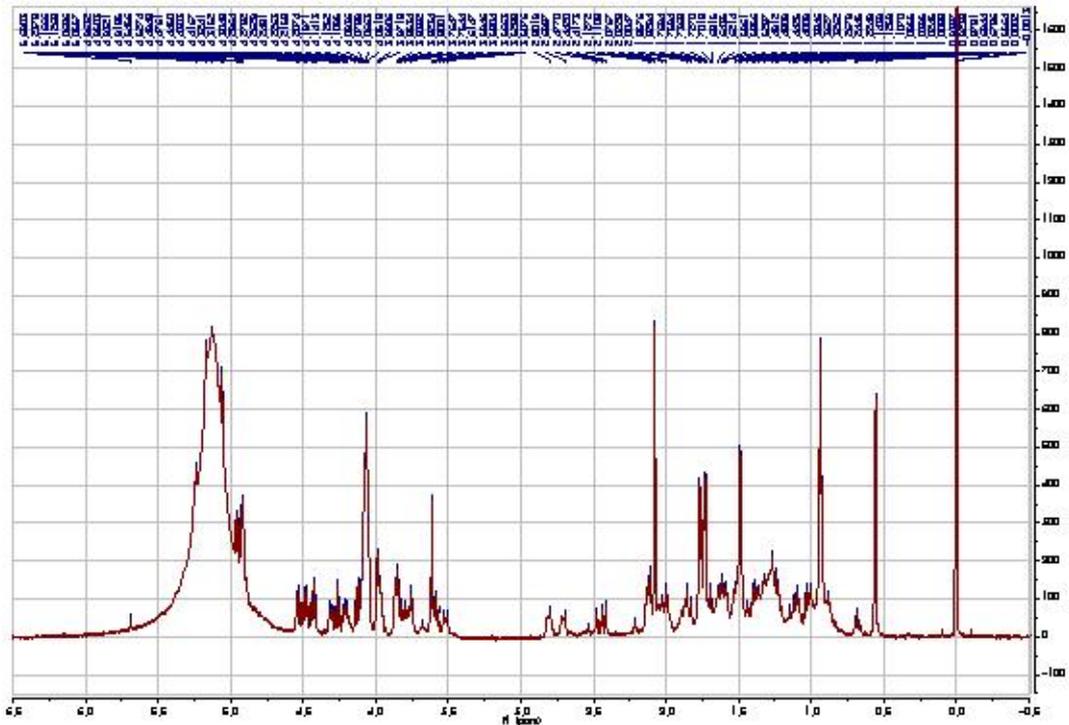
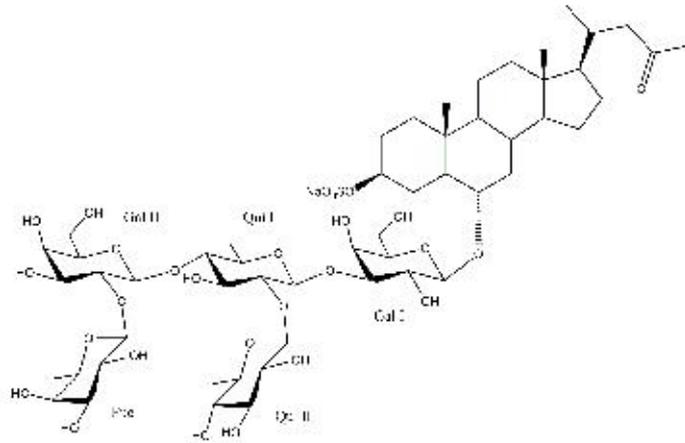


그림1. ¹H NMR Spectrum of Comp. 1 in Pyridine-*d*₅ (600 MHz)

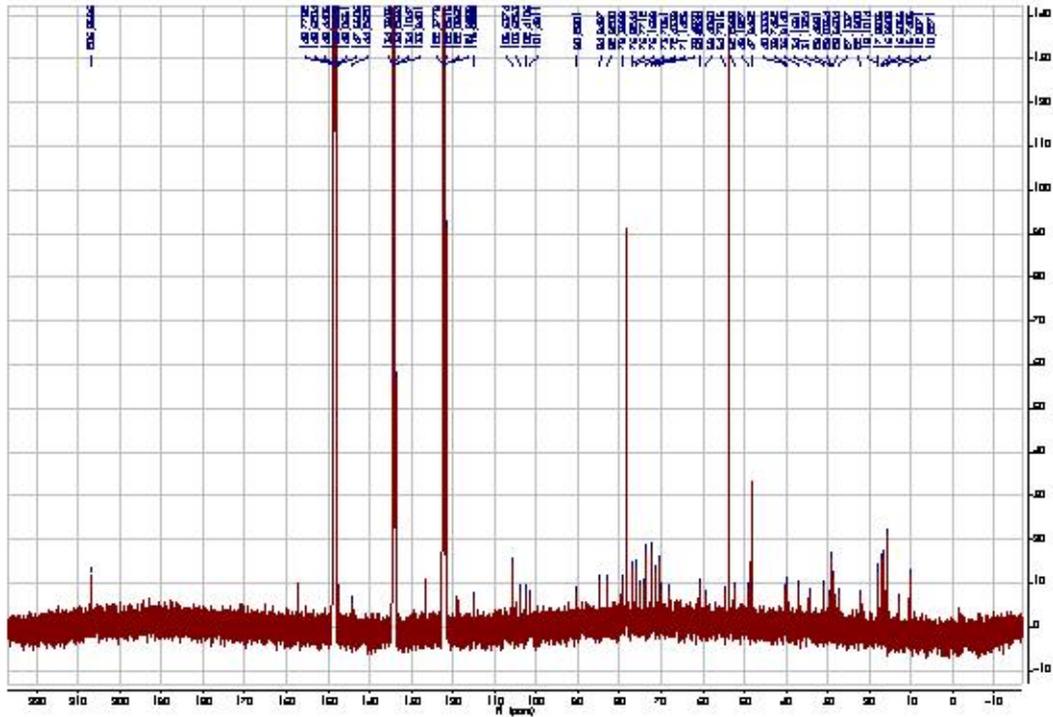


그림 2. ¹³C NMR Spectrum of Comp. 1 in Pyridine-*d*₅ (150 MHz)

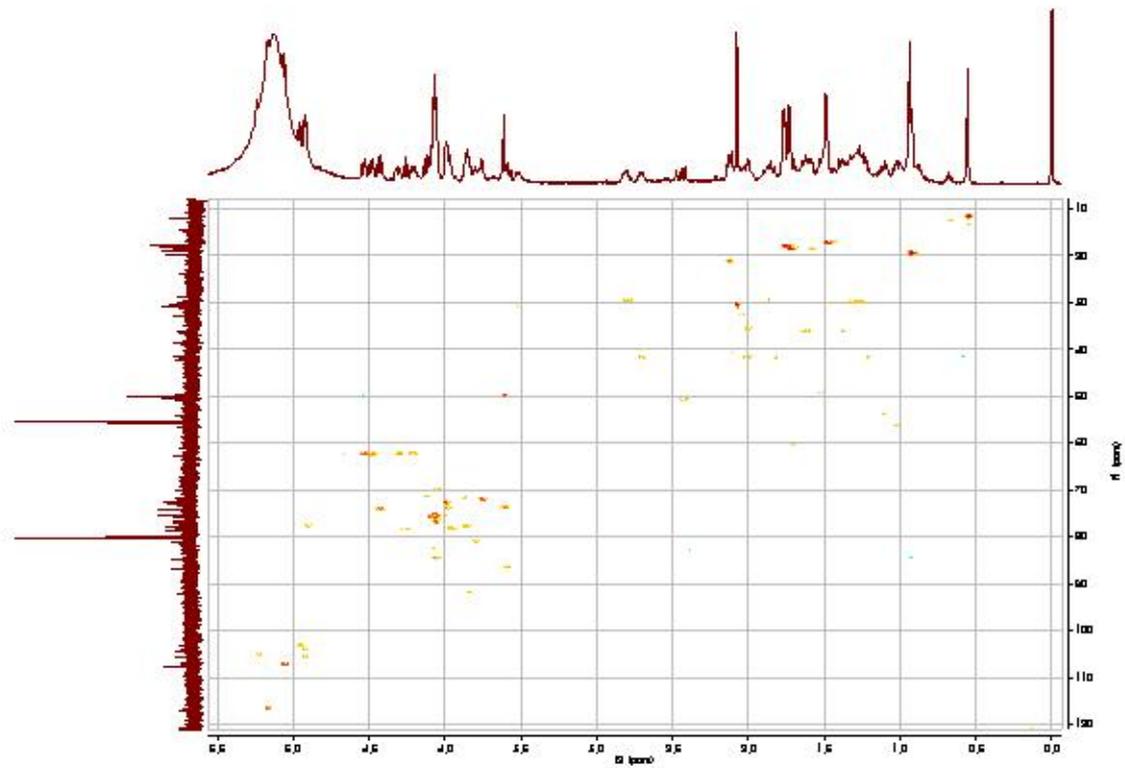


그림 3. HMQC Spectrum of Comp. 1 in Pyridine-*d*₅ (600 MHz)

3-1-5-3 화합물 2와 3의 구조 분석

NMR 및 MS data 분석결과 각각 화합물 2의 화학구조는 6 α -O-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl]-5 α -cholesta-9(11),24-dien-23-one-3 β -yl sodium sulfate로, 화합물 3의 화학구조는 6 α -O-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl]-5 α -cholest-9(11)-en-23-one-3 β -yl sodium sulfate로 new compound임을 확인하였다.

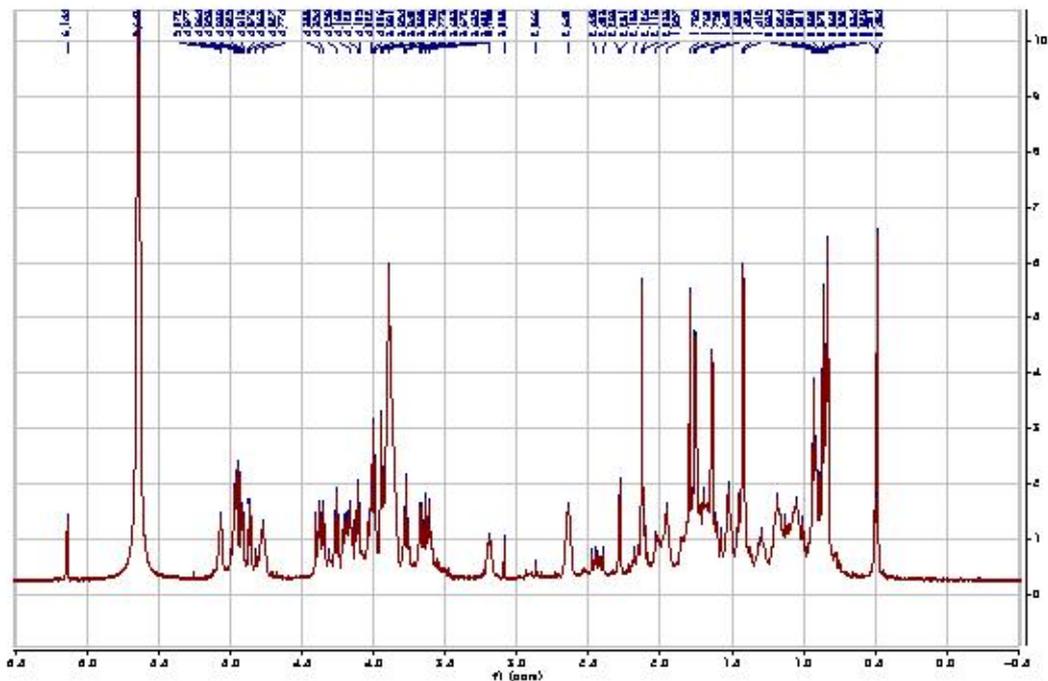
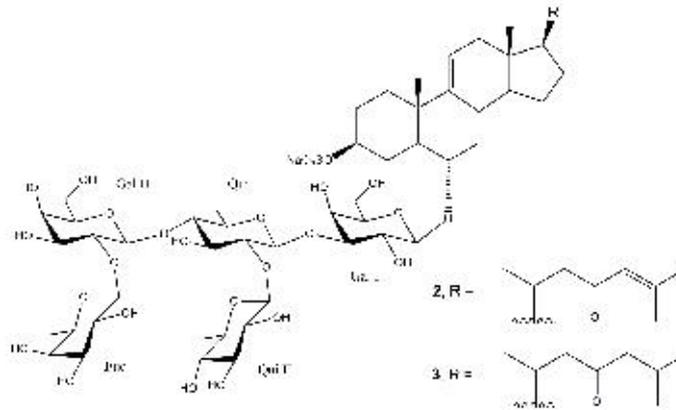


그림 6. ^1H NMR Spectrum of Comp. 2 and 3 in Pyridine- d_5 /D $_2$ O (600 MHz)

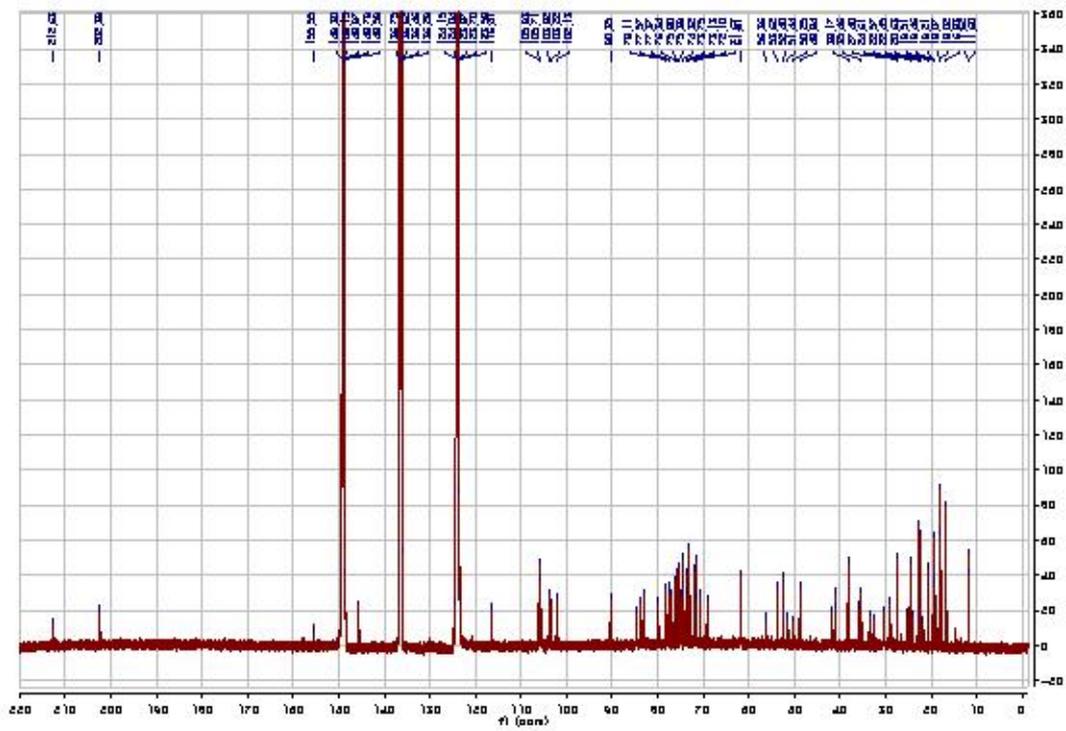


그림 7. ^{13}C NMR Spectrum of 2 and 3 in Pyridine- d_5 /D $_2$ O (150 MHz)

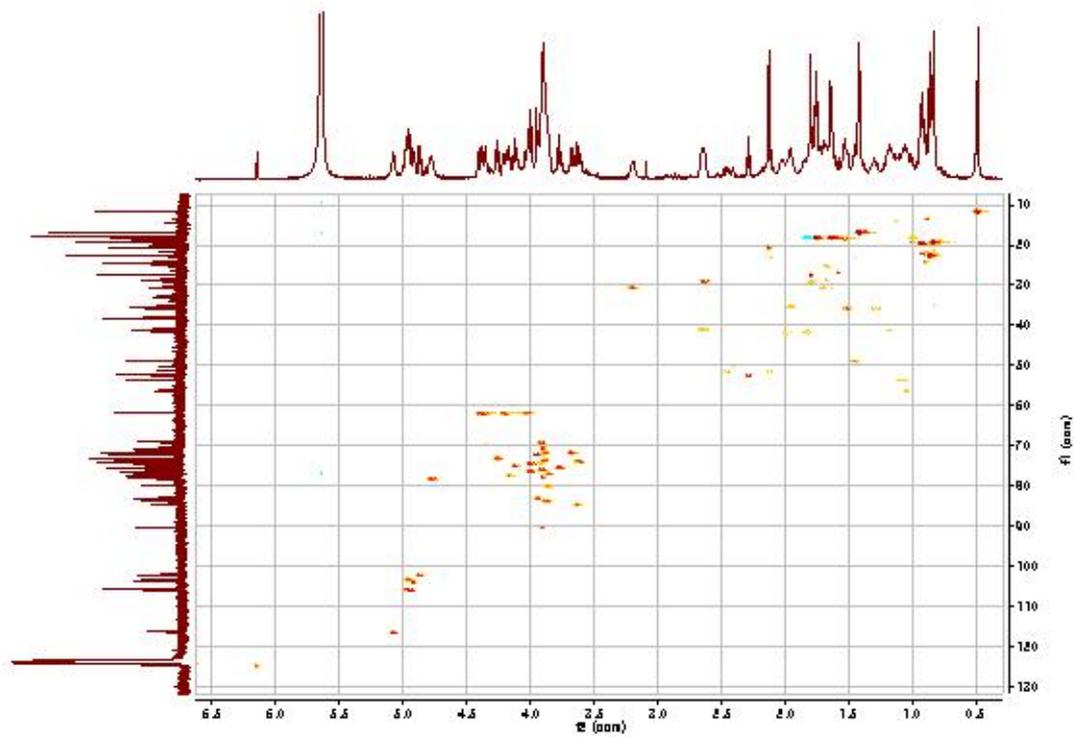


그림 8. HMQC Spectrum of 2 and 3 in Pyridine- d_5 /D $_2$ O (600 MHz)

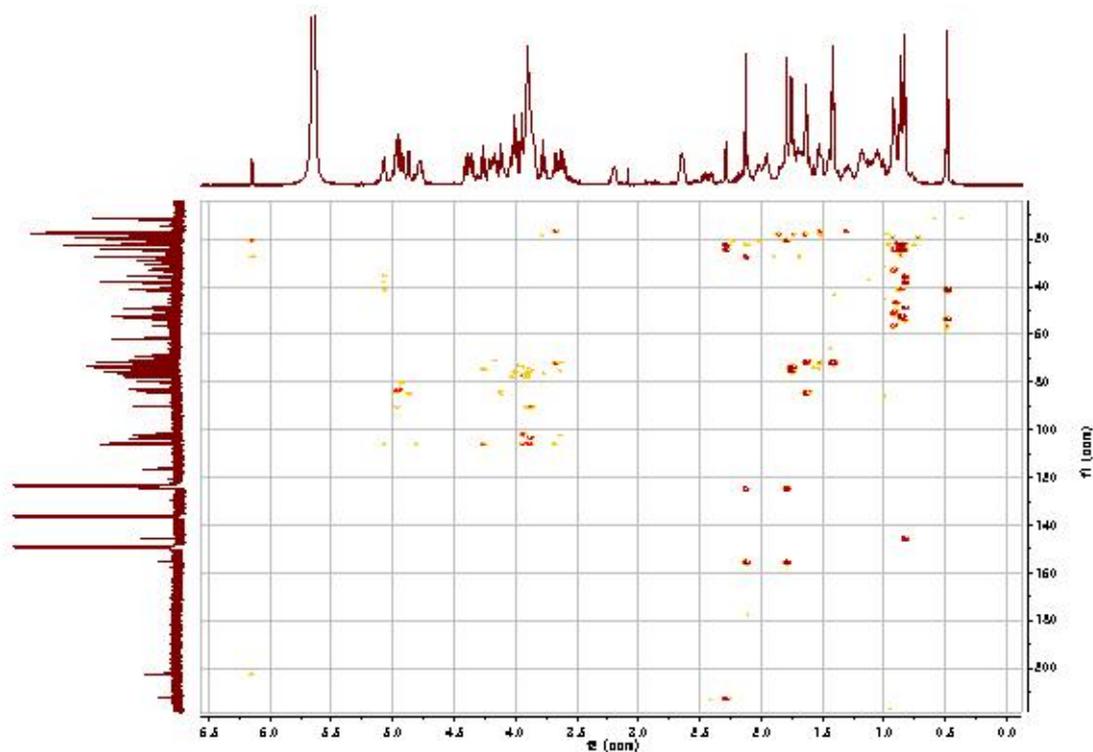


그림 9. HMBC Spectrum of 2 and 3 in Pyridine-*d*₅/D₂O (600 MHz)

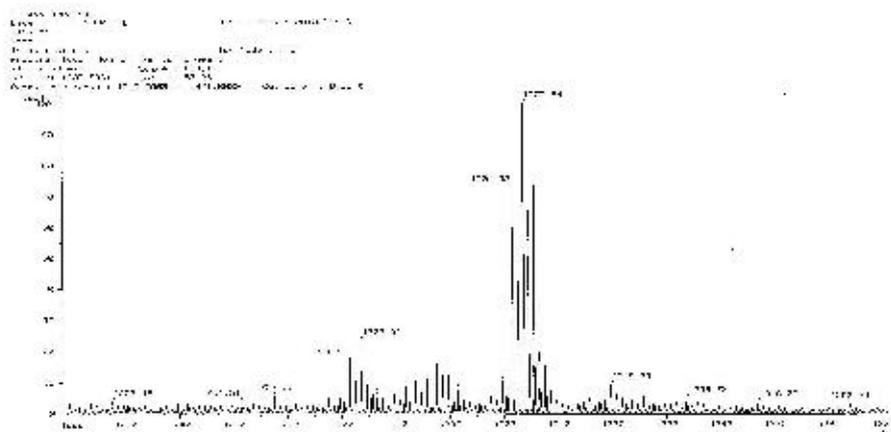


그림 10. High resolution FAB-MS result of Comp. 2 and 3

3-1-5-4 화합물 4의 구조 분석

화합물 4의 화학구조는 6 α -O-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl]-20-hydroxy-23-one-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -yl sodium sulfate 로 구조가 이미 발표된 thomasteroside A임을 확인하였다.²⁴⁾

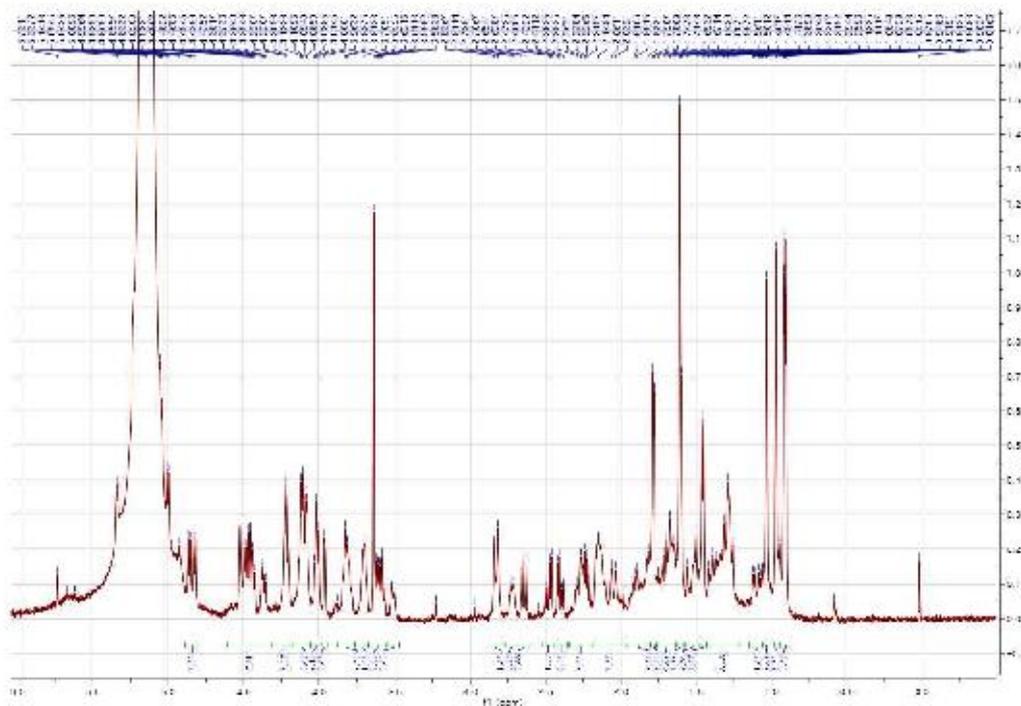
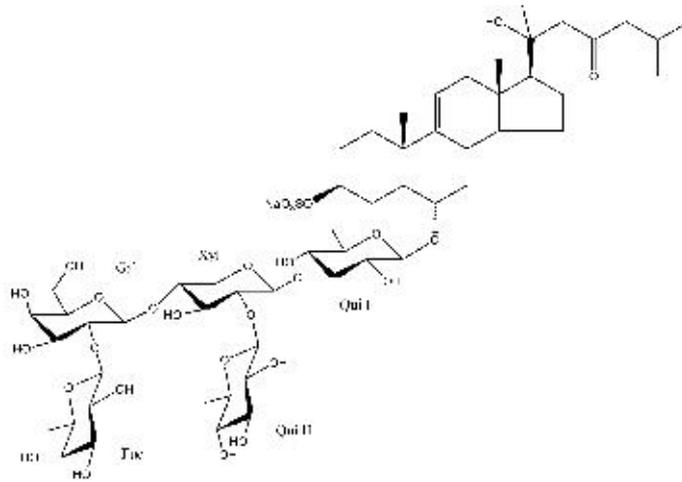


그림 11. ¹H NMR Spectrum of Comp. 4 in Pyridine-d₅ (600 MHz)

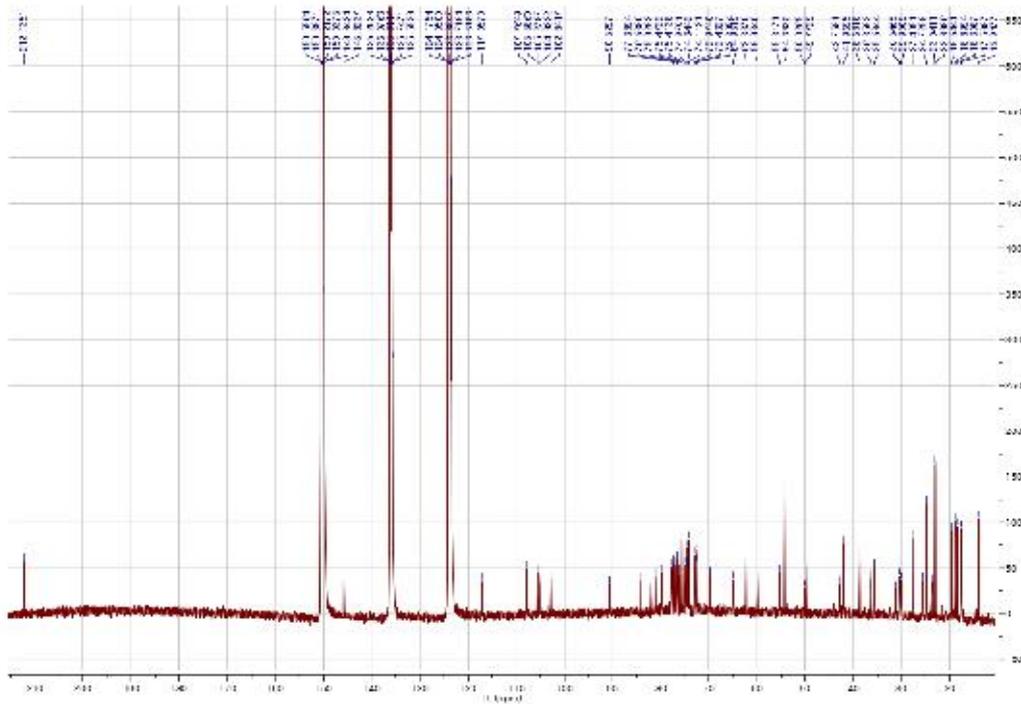
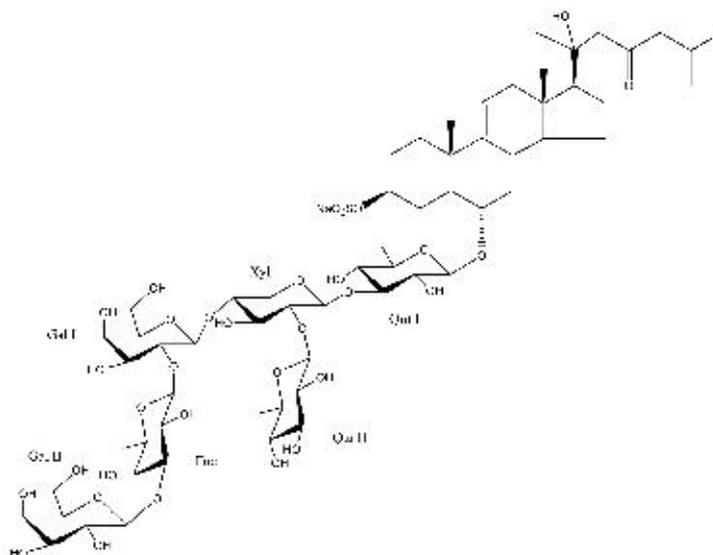


그림 12. ^{13}C NMR Spectrum of 4 in Pyridine- d_5 (150 MHz)

3-1-5-5 화합물 5의 구조 분석

NMR 및 MS data 분석결과 화합물 5의 화학구조는 6 α -O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl]-20-hydroxy-23-one-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -yl sodium sulfate로 구조가 이미 발표된 versicoside A임을 확인하였다.^{8,9)}



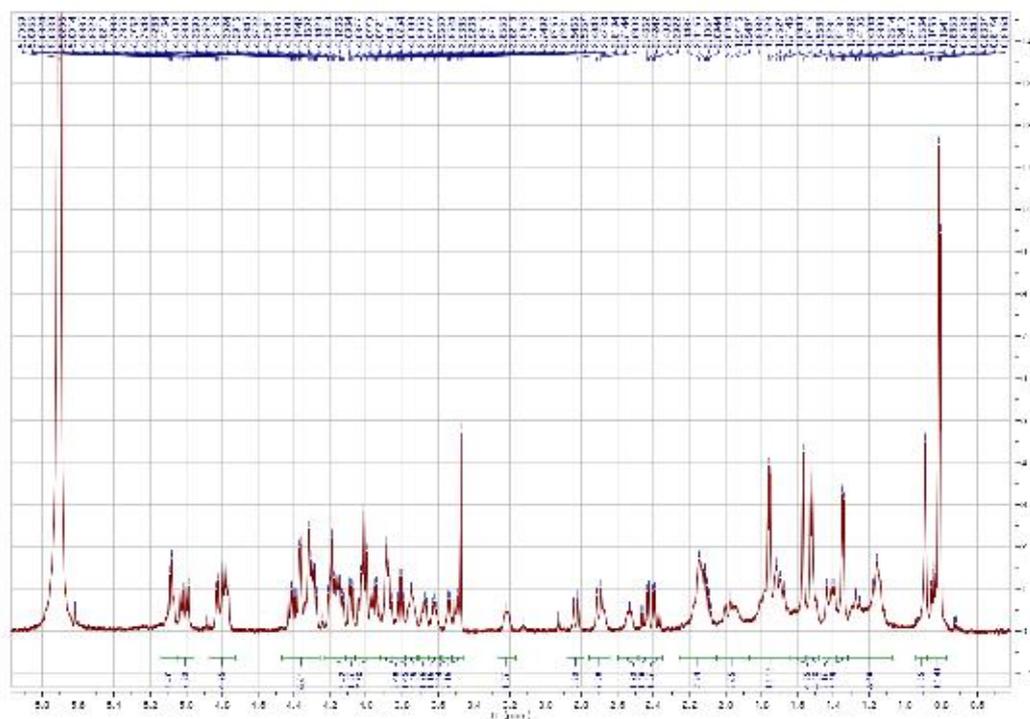


그림 13. ^1H NMR Spectrum of Comp. 5 in Pyridine- d_5 / D_2O (600 MHz)

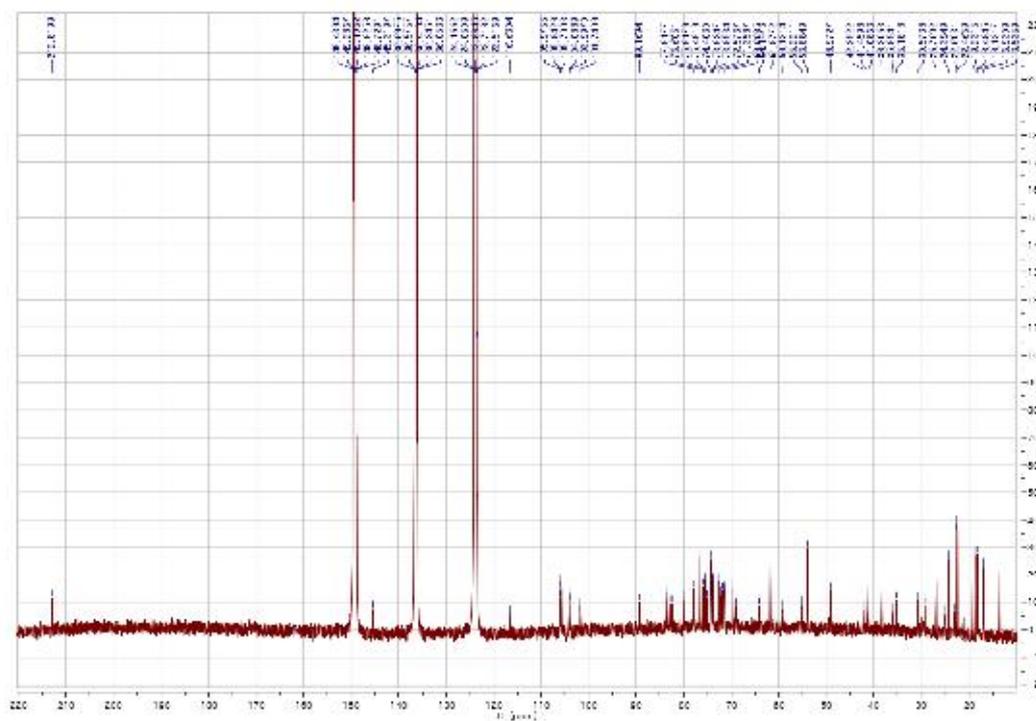


그림 14. ^{13}C NMR Spectrum of 5 in Pyridine- d_5 / D_2O (150 MHz)

3-1-5-6 화합물 6의 구조 분석

NMR 및 MS data 분석결과 화합물 6의 화학구조는 6 α -O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl]-5 α -pregn-9(11)-en-20-one-3 β -yl sodium sulfate로 구조가 이미 발표된 anasteroside B 임을 확인하였다.¹⁰⁾

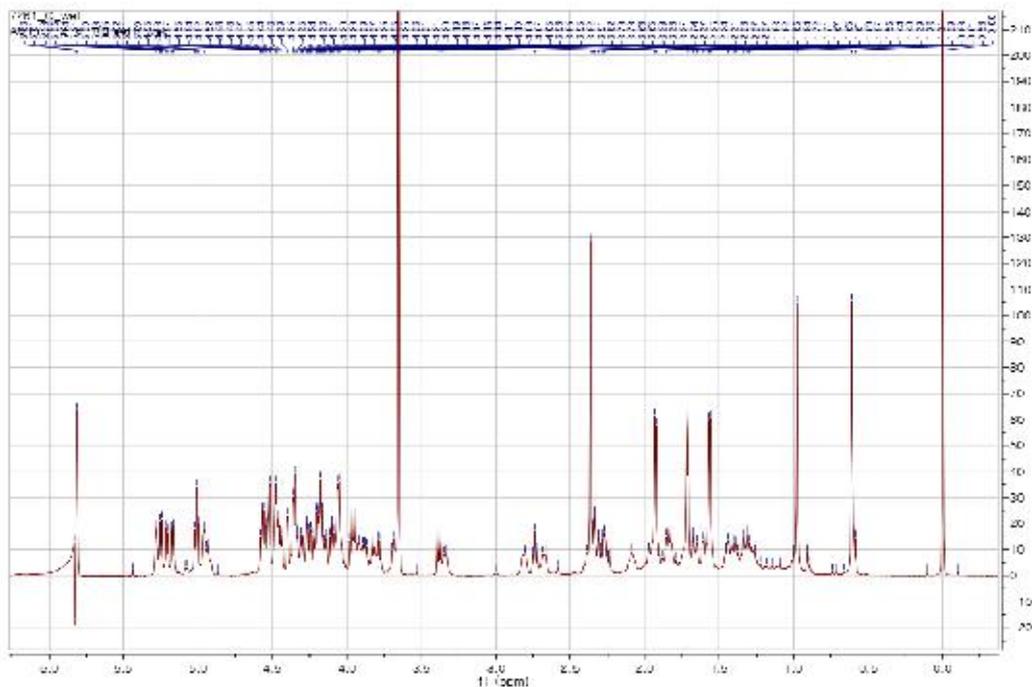
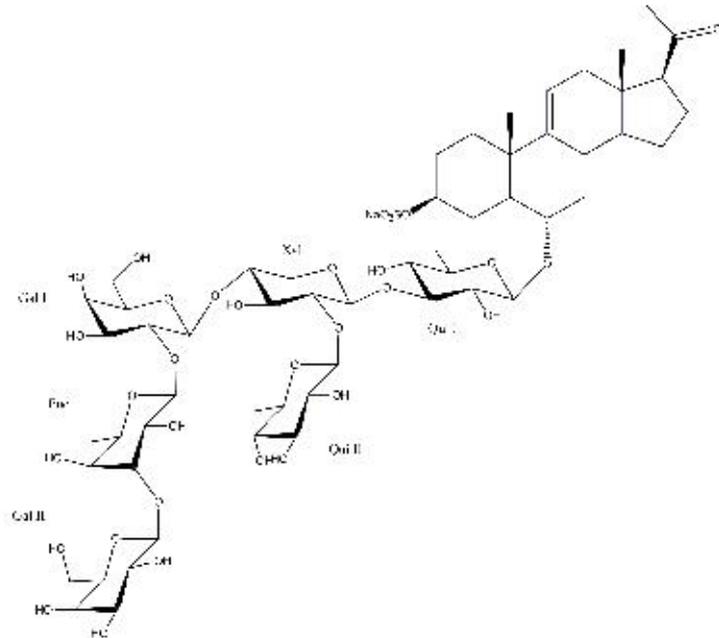


그림 15. ¹H NMR Spectrum of Comp. 6 in Pyridine-*d*₅/D₂O (600 MHz)

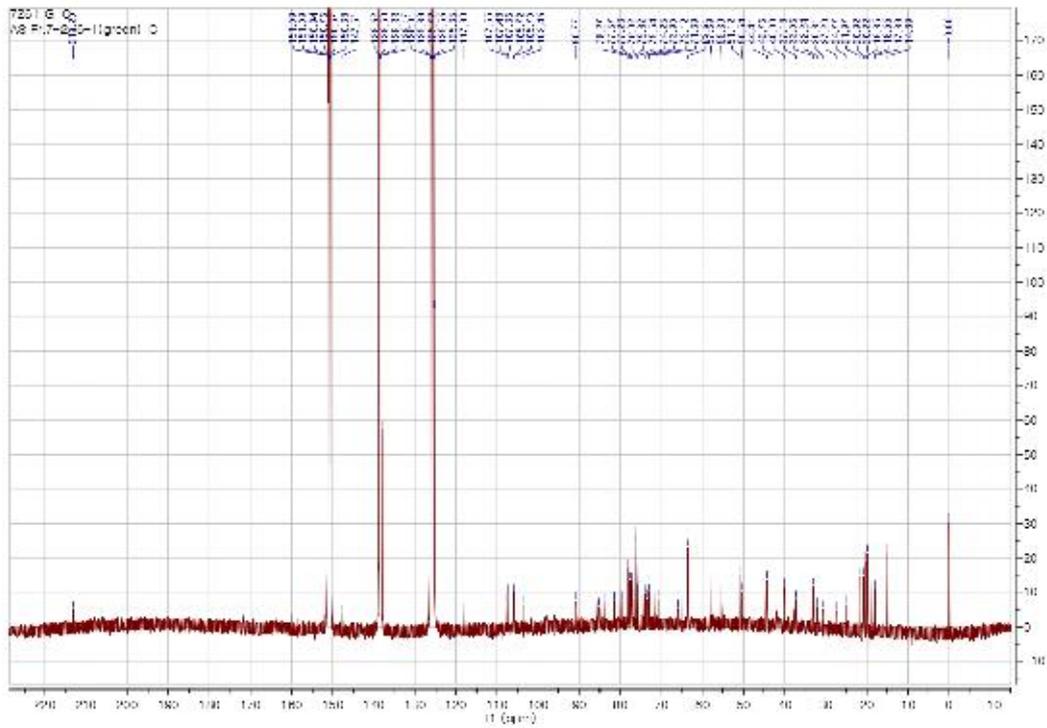
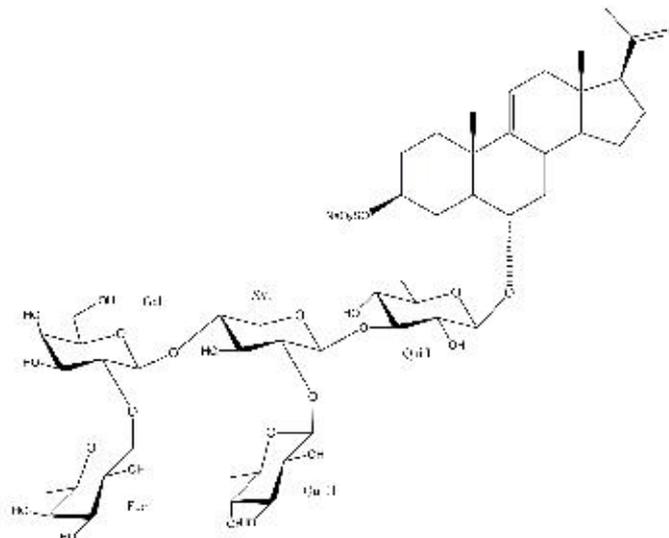


그림 16. ^{13}C NMR Spectrum of 6 in Pyridine- d_5 /D $_2$ O (150 MHz)

3-1-5-7 화합물 7의 구조 분석

NMR 및 MS data 분석결과 화합물 6의 화학구조는 6 α -O-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopyranosyl]-5 α -pregn-9(11)-en-20-one-3 β -yl sodium sulfate 임을 확인하였다.^{5,11)}



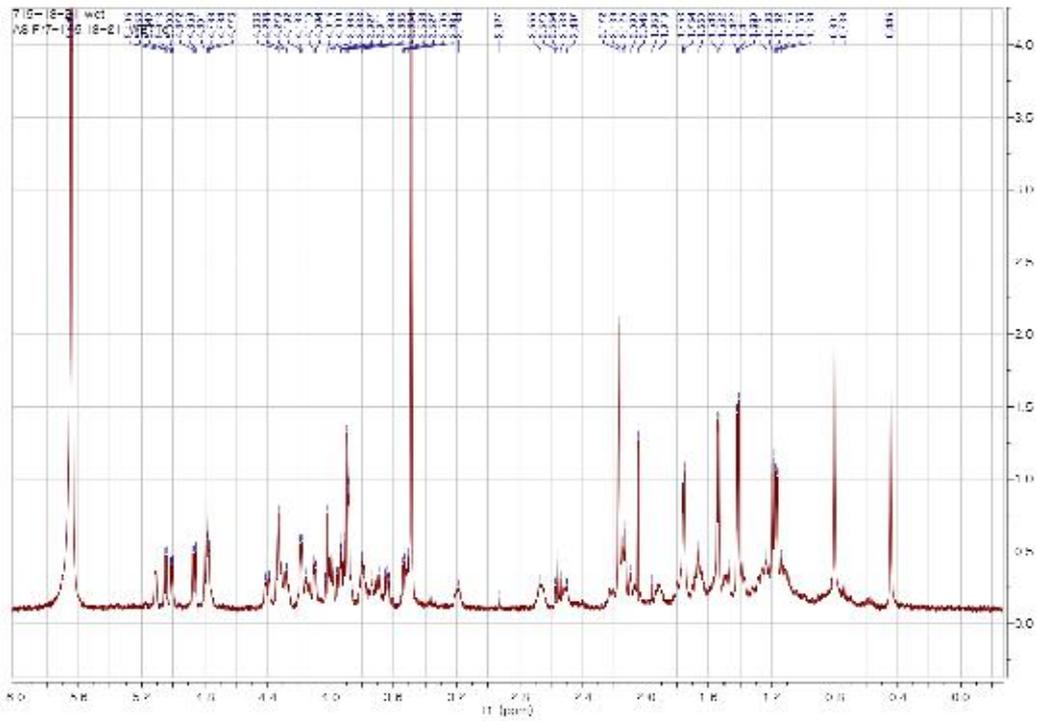


그림 17. ^1H NMR Spectrum of Comp. 7 in Pyridine- d_5 / D_2O (600 MHz)

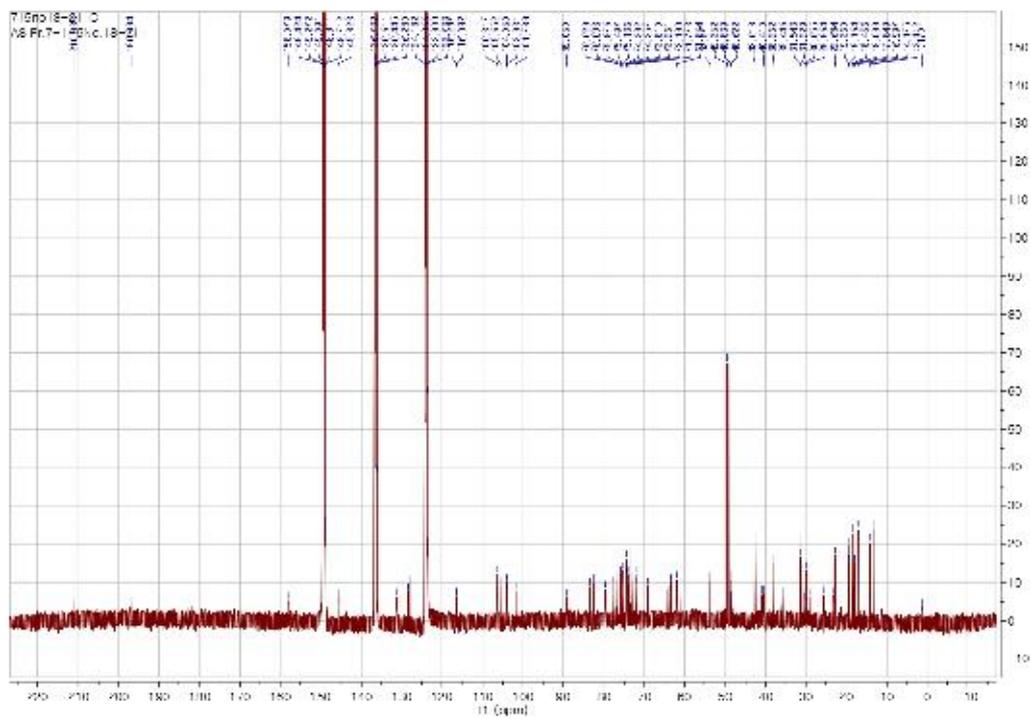


그림 18. ^{13}C NMR Spectrum of 7 in Pyridine- d_5 / D_2O (150 MHz)

Table 1. NMR data of compound **1** (pyridine-*d*₅) and mixture of **2** and **3** (pyridine-*d*₅/D₂O)

	1				mixture of 2 and 3	
	δ_C^a	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz) ^b	HMBC	NOE	δ_C^a	δ_H , mult. (<i>J</i> in Hz) ^b
1	36.02	1.38, m, 1.62, m			35.79	1.20, m, 1.53, m
2	29.58	1.89, m, 2.81, m			29.03	1.80, m ^c ; 2.64, br s
3	77.61	4.91 ^d		H-5	78.11	4.77, m
4	30.01	1.72, s ^e ; 3.51, br d (12.7)			30.53	1.72, m; 3.20, br d (10.8)
5	49.41	1.51, m		H-3	48.84	1.45, m ^c
6	80.97	3.82, m		H-1', 19	79.98	3.86, m ^c
7	41.76	1.24, m, 2.71, m			40.90	1.18, m, 2.64, br s
8	35.60	2.0, m		H-11, 18, 19	35.46	1.96, m
9	145.68	-			145.58	-
10	38.36				38.17	
11	116.48	5.17 ^f		H-8, 19	116.41	5.07, br s
12	41.76	1.86, m, 2.01, m			41.65	1.84, m ^c ; 1.96, m
13	41.16				41.05	
14	53.75	1.11, m		H-17	53.62	1.07, m
15	25.28	1.01, m, 1.54, m			25.16	1.04, m, 1.66, m
16	28.55	1.14, m, 1.62, m			28.52, 28.58 ^g	1.17, m; 1.66, m
17	56.23	1.03, m		H-14	56.36, 56.06	1.04, m
18	11.67	0.56, s	C-12, 13, 14, 17	H-8, 21	11.60, 11.62 ^h	0.48, s
19	19.55	0.94, s ⁱ	C-1, 5, 9, 10	H-6, 8, 11	19.21	0.83, s
20	33.57	2.05, m			33.20, 33.44	2.02, m
21	19.32	0.92, s ^j	C-17, 20, 22	H-18	19.46, 19.51	0.93, d 0.91, d
22	50.63	2.13, m ^k ; 2.43, brd (14.8)			51.44 50.25	2.13, m ^k ; 2.46, d (14.4) 2.18, m; 2.42, d (18.0)
23	208.24	-			202.39, 212.63	-
24	30.48	2.08, s	C-22, 23		124.70 52.40	6.14, s 2.29, d (7.2)
25					155.55 24.61	2.11, m
26					20.63, 22.57	2.13, s 0.87, d (5.0)
27					27.40, 22.43	1.80, s 0.85, d (5.0)
Gal 1-1'	105.45	4.92, d (8.2) ^l	C-6	H-6, 3', 5'	103.82	4.92, d (7.2)
2''	73.79	3.97, m	C-1'		73.63	3.89, m

3'	91.69	3.85, m		11-1', 4', 1"	90.35	3.90, m
4'	69.75	4.07, m	C-3'	H-3', 5'	69.18	3.91, m
5'	77.61	3.86, m		11-1', 4'	76.93	3.86, m
6'	62.35	4.31 dd (12, 5.7); 4.48, d (11.2)			61.81	4.36, m; 4.21, br d (12.0)
Qui I-1"	103.91	4.92, d (8.2)	C-3'	H-3', 3'', 5"	103.22	4.96, d (6.6)
2"	82.76	4.07, m		11-1'', 4"	83.67	3.88, m
3"	75.70	4.11, m	C-2"	H-1'', 5"	74.85	4.12, t (9.0)
4"	86.50	3.58, t (9.7)	C-5"	11-2'', 1'''	84.54	3.64, m
5"	71.61	3.85, m		H-1'', 3"	71.58	3.88, m
6"	18.44	1.73, d (5.9)	C-1'', 5"		18.07	1.64, d (6.0)
Qui II-1"	104.95	5.24, d (6.5)	C-2"	11-2'', 3'', 5"	105.71	4.97, d (7.8)
2'''	76.33	4.07, m			75.80	3.91, m
3'''	76.69	4.07, m		11-1'', 5'''	76.34	4.01, t (9.3) ^e
4'''	75.54	4.07, m		H-6'''	75.39	3.77, t (9.6)
5'''	73.50	3.62, m ^f		H-1'', 3'''	73.75	3.61, m
6'''	17.90	1.77, d (6.0)	C-1'', 5'''	H-1'''	18.02	1.76, d (6.0)
Gal II-1'''	102.98	4.96, d (7.7)	C-1'''	11-1'', 3'', 3'''	102.13	4.87, d (7.8)
2'''	84.37	4.07, m	C-1'''	11-1'''	83.10	3.95, m
3'''	78.27	4.26, t (9.0)	C-2'''	11-1'''	77.37	4.17, t (8.7)
4'''	71.30	4.13, t (9.5) ^e			70.70	3.90, m
5'''	78.21	3.97, m		H-1'''	77.57	3.90, m
6'''	62.26	4.21, dd (12.6, 6.2); 4.54, d (10.9)			61.81	4.03, m; 4.40, br d (11.4)
Enc-1'''	107.10	5.06, d (7.7)	C-2'''	11-2'', 3'', 5'''	105.93	4.95, d (8.4)
2'''	73.87	4.43, t (8.5)	C-1''', 3'''		73.13	4.26, t (8.7)
3'''	75.14	4.07, m		11-1''', 4''', 5'''	74.32	4.01, t (9.3) ^e
4'''	72.58	3.99, m		H-3''', 5'''	72.10	3.95, m
5'''	71.93	3.76, d (6.2) ^f		11-1''', 3''', 4'''	71.67	3.68, br d (5.6)
6'''	17.19	1.49, d (6.2) ^f	C-1''', 5'''		16.83	1.42, d (6.6)

^a Assignment based on HMQC and HMBC NMR data (150 MHz)

^b Assignment based on COSY, TOCSY, and HMBC NMR data (600 MHz)

^c Signals partially overlapped

^d Signals overlapped with solvent

^e Assignments may be interchanged

▣ 아무르불가사리로부터 amino acid 분리

Fr. 8의 소 분획물 중 Fr.8-3에 대하여 HPLC [C18 column (21.5 × 250 mm), MeOH-H₂O]를 gradient 용매조건 (MeOH 5 % → 62%, 40분)으로 실시하여 5 종의 amino acid를 분리하였다. (그림 19).

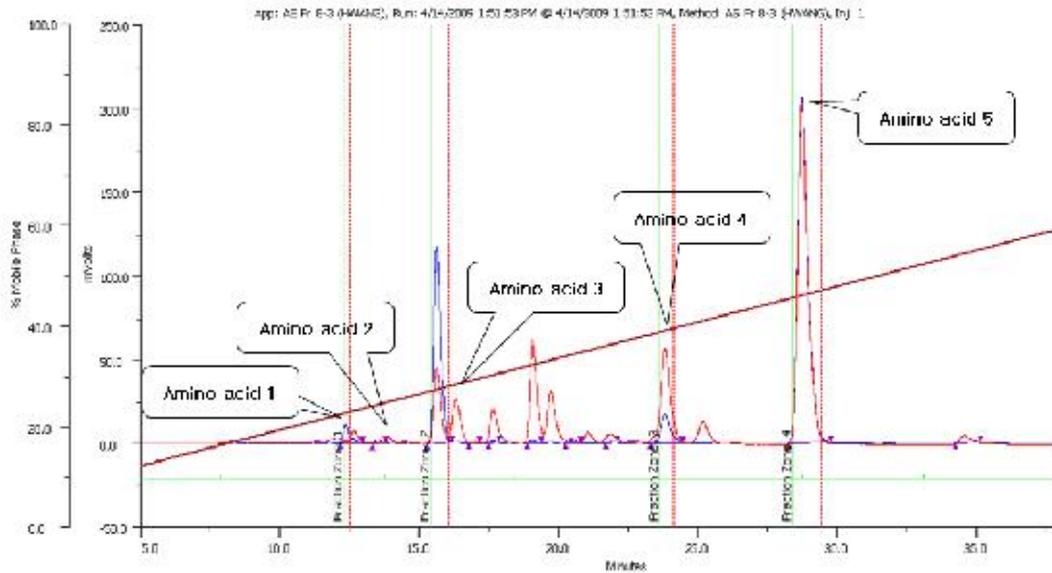


그림 19. HPLC chromatogram of Fr. 8-3

3-1-5-8 화합물 1의 구조 분석

Amino acid 1 : NMR 및 MS data 분석결과 화합물 1의 화학구조는 asterubine으로 밝혀짐.¹²⁾

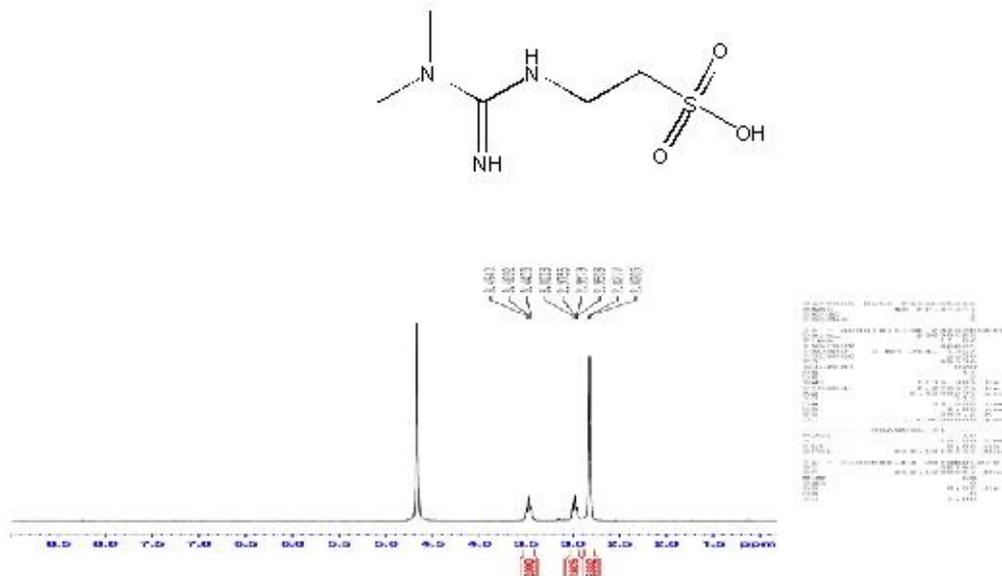


그림 20. ¹H NMR Spectrum of Amino acid 1 in D₂O (250 MHz)

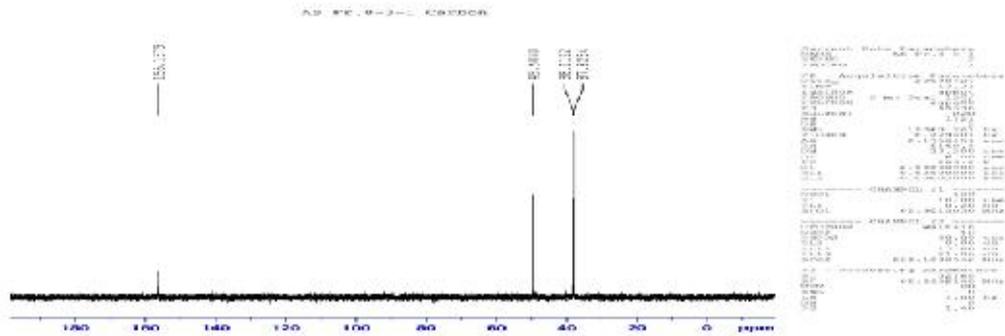


그림 21. ^{13}C NMR Spectrum of Amino acid 1 in D_2O (63 MHz)

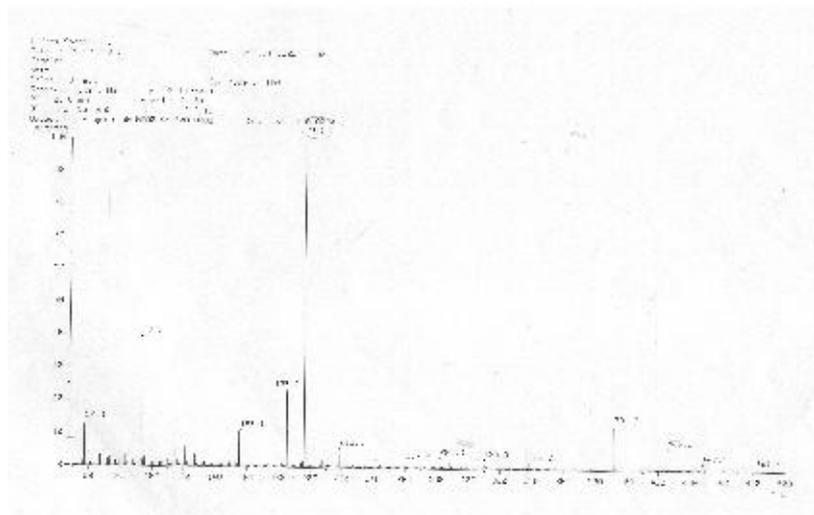
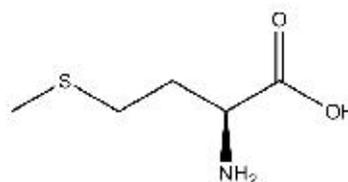


그림 22. Mass Spectrum of Amino acid 1

3-1-5-9 화합물 2의 구조 분석

Amino acid 2 : NMR 및 Marfey's analysis 결과 화합물 2의 화학구조는 L-methionine으로 밝혀짐.



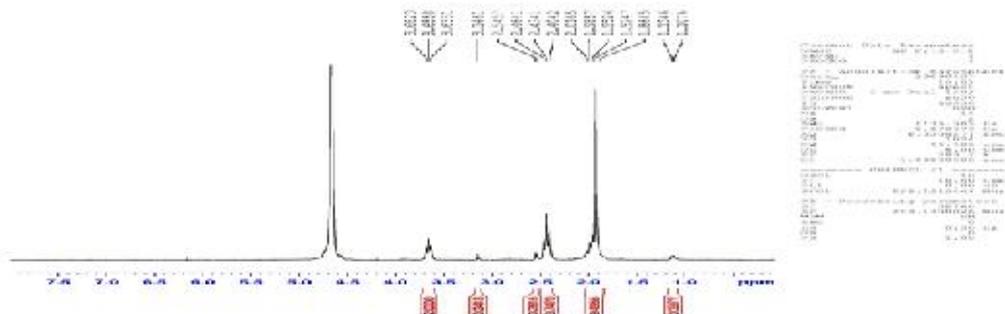


그림 23. ^1H NMR Spectrum of Amino acid 2 in D_2O (250 MHz)

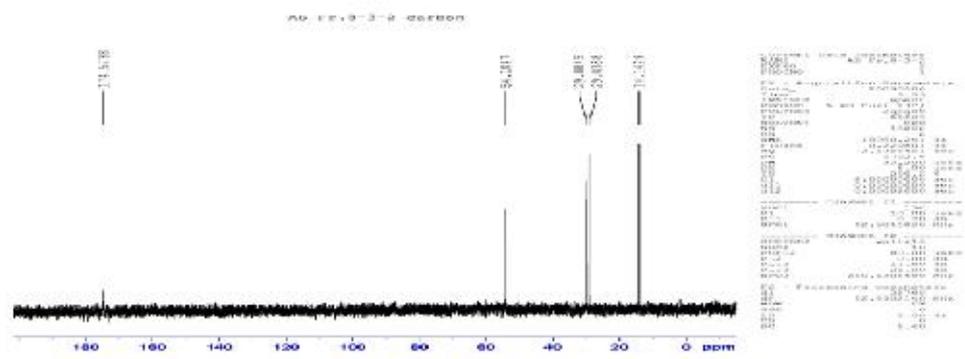
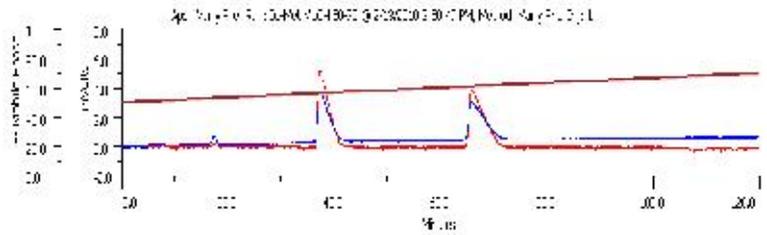
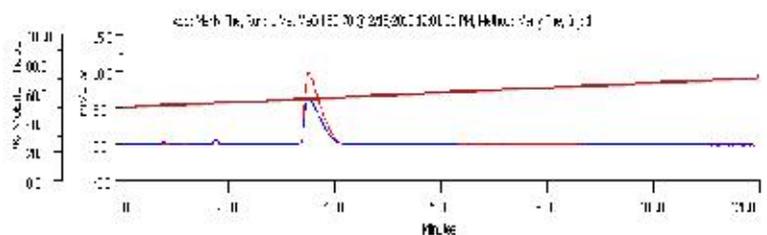


그림 24. ^{13}C NMR Spectrum of Amino acid 2 in D_2O (63 MHz)

< DL-Met standard >



< L-Met standard >



< Isolated Met from *A. amurensis* >

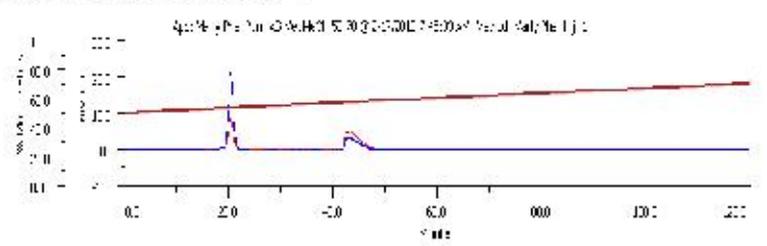


그림 25. Marfey's analysis of Amino acid 2

3-1-5-10 화합물 3의 구조 분석

Amino acid 3 : NMR 및 Marfey's analysis 결과 화합물 2의 화학구조는 L-Leucine으로 밝혀짐.

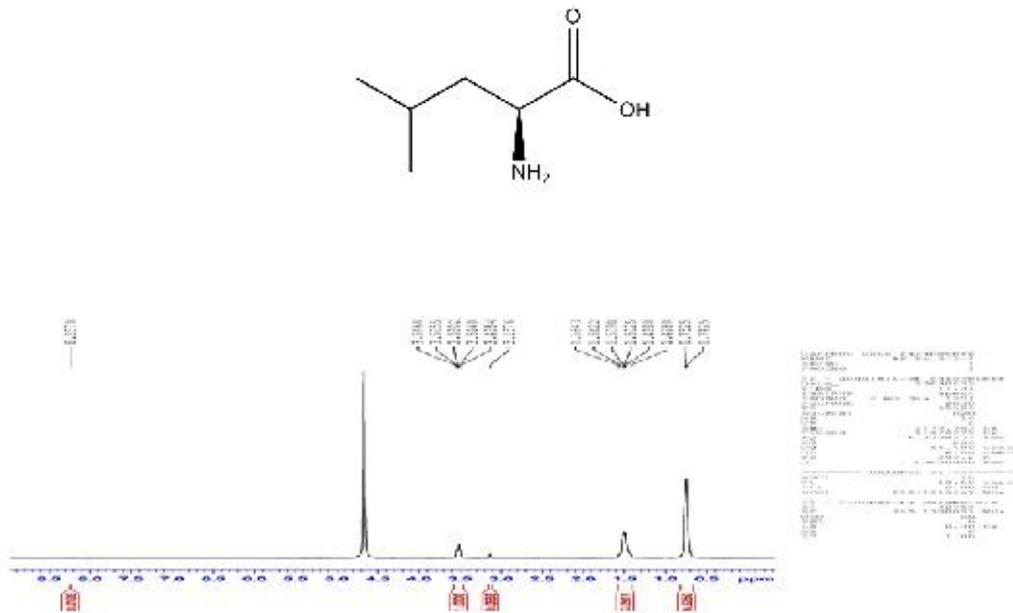


그림 26. ^1H NMR Spectrum of Amino acid 3 in D_2O (250 MHz)

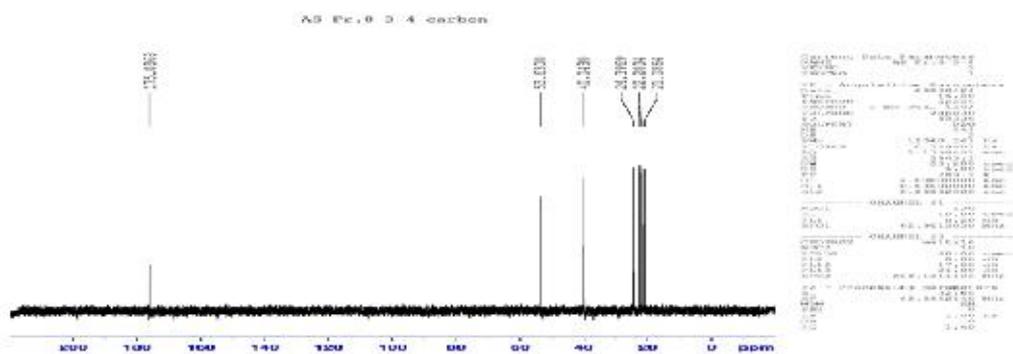
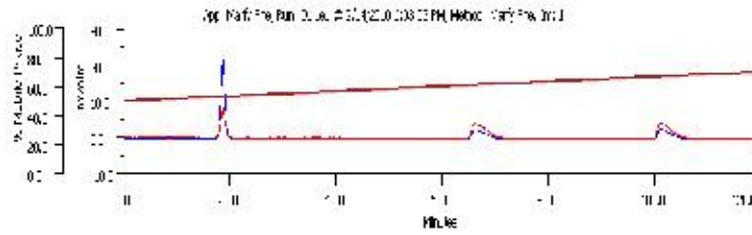
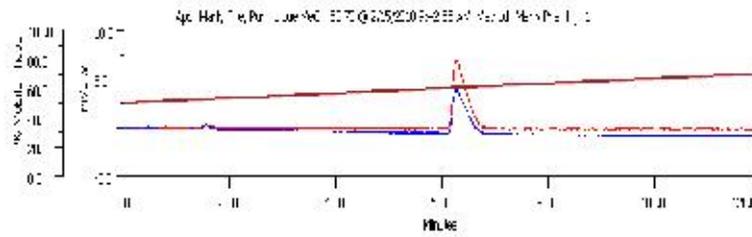


그림 27. ^{13}C NMR Spectrum of Amino acid 3 in D_2O (63 MHz)

< DL-Lue standard >



< L-Lue standard >



< Leu isolated from *A. amurensis* >

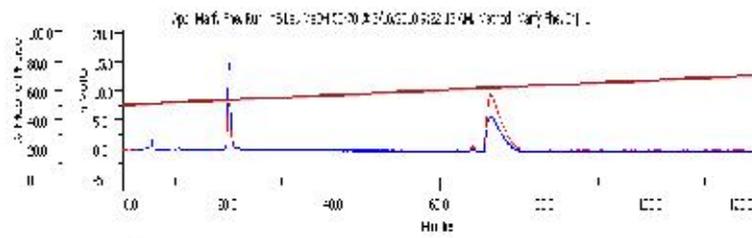


그림 28. Marfey's analysis of Amino acid 3

3-1-5-11 화합물 4의 구조 분석

Amino acid 4 : NMR 및 Marfey's analysis 결과 화합물 2의 화학구조는 L-phenylalanine으로 밝혀짐.

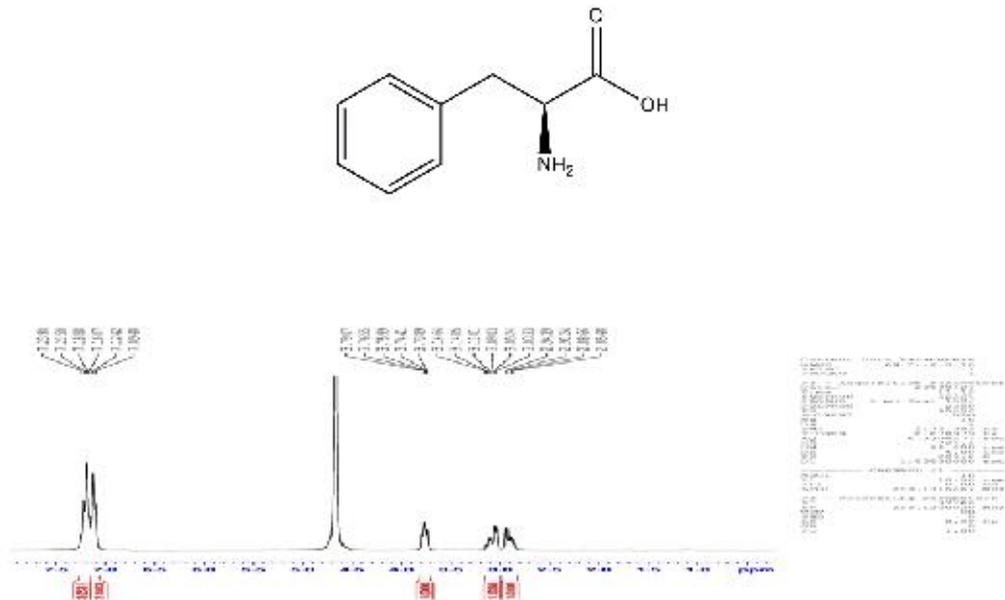
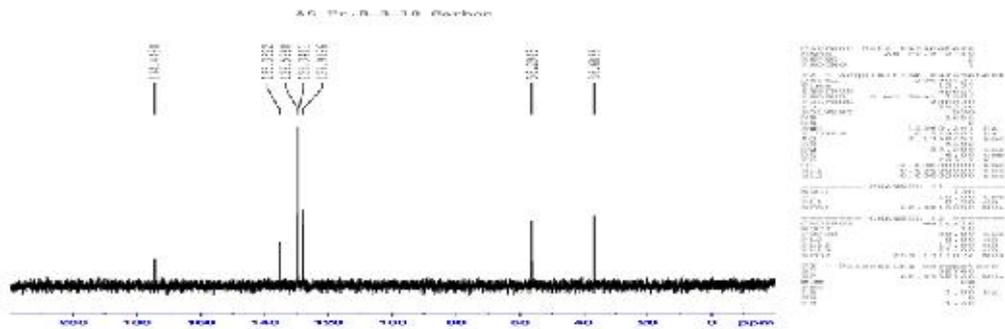
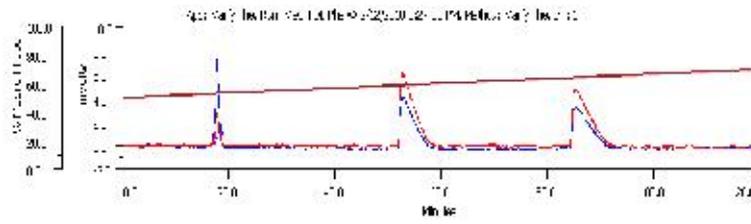


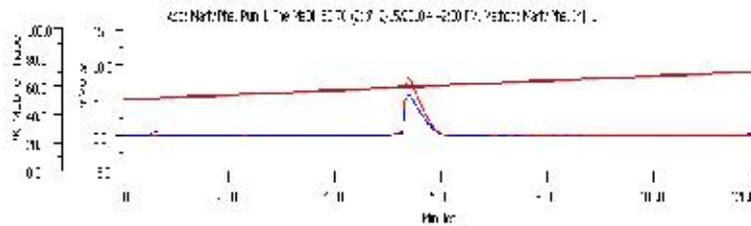
그림 29. ^1H NMR Spectrum of Amino acid 4 in D_2O (250 MHz)



< DL-Phe standard >



< L-Phe standard >



< Isolated Phe from *A. amurensis* >

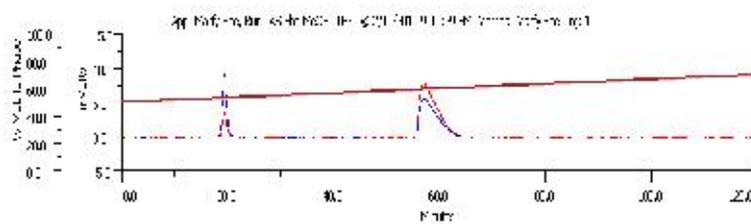


그림 31. Marfey's analysis of Amino acid 4

3-1-5-12 화합물 5의 구조 분석

Amino acid 5 : NMR 및 Marfey's analysis 결과 화합물 5의 화학구조는 L-tryptophan으로 밝혀짐.

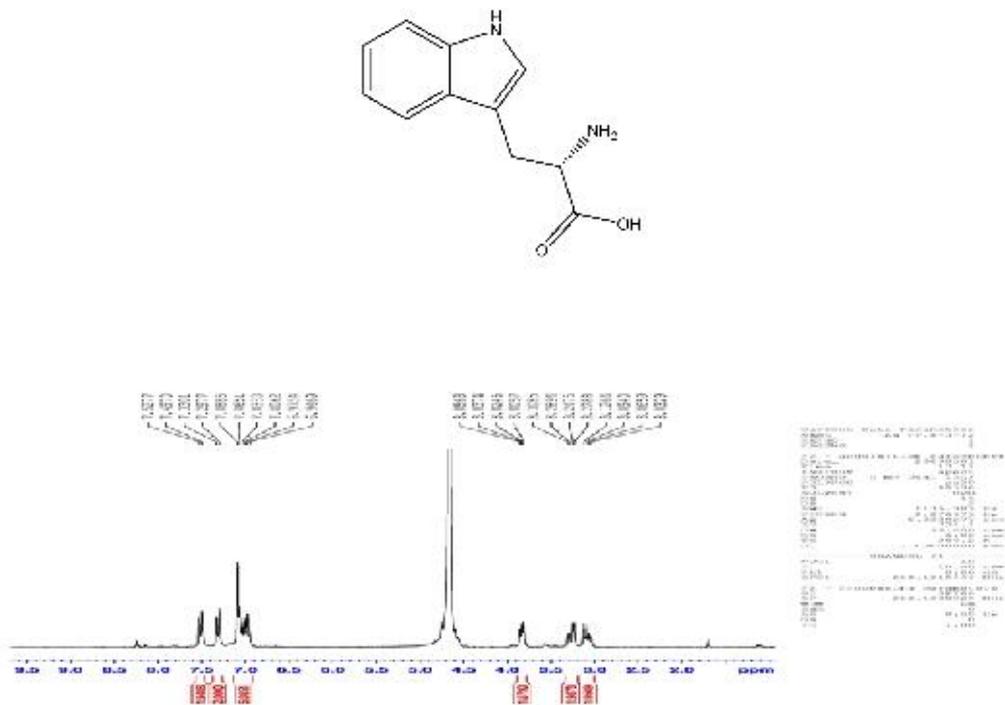


그림 32. ¹H NMR Spectrum of Amino acid 5 in D₂O (250 MHz)

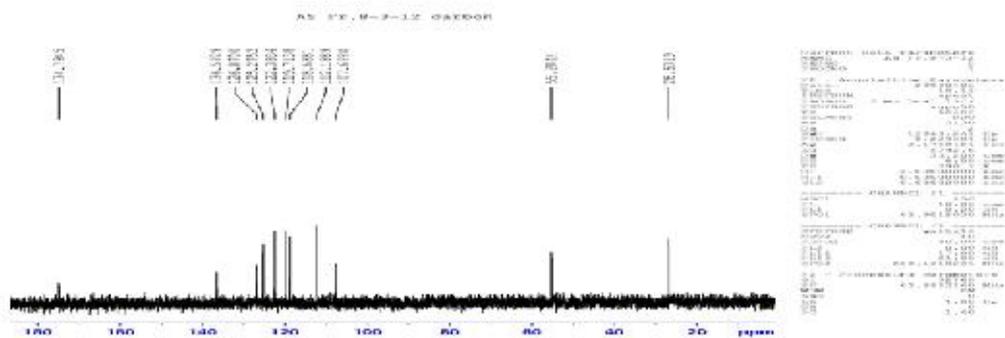
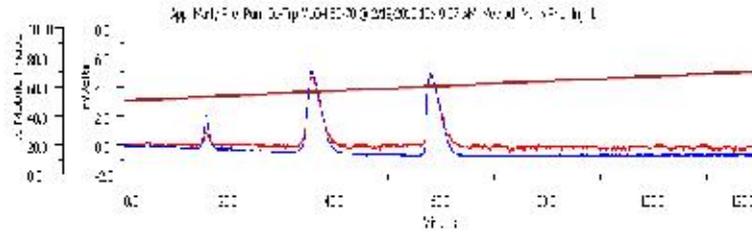
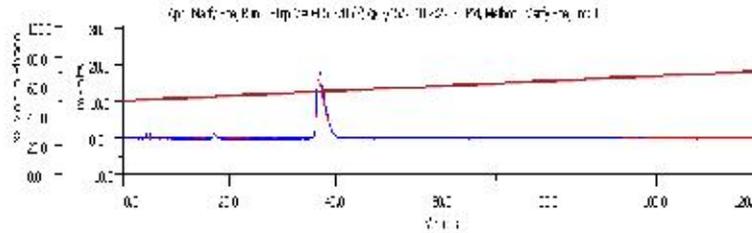


그림 33. ¹³C NMR Spectrum of Amino acid 5 in D₂O (63 MHz)

< DL-Trp standard >



< L-Trp standard >



< Isolated Trp from *A. amurensis* >

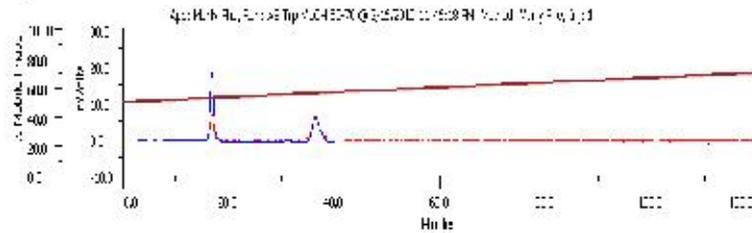


그림 34. Marfey's analysis of Amino acid 5

3-1-5-13 불가사리에서 분리한 단일성분의 RAW264.7 세포에서 NO 생성에 미치는 영향 구조 결정 후 남아 있는 검체 중 화합물 4 및 5의 활성을 검토한 결과 2종류 화합물 모두 용량 의존적으로 NO 생성을 억제함을 알 수 있었다.

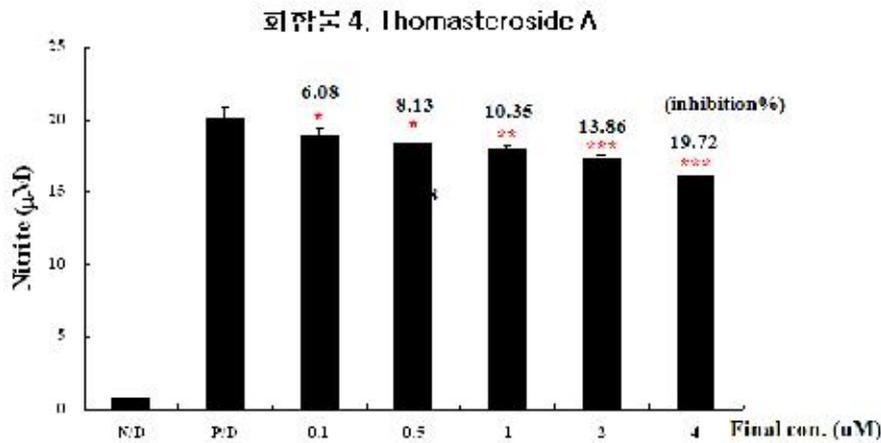


그림 35. 화합물 4의 NO 생성에 미치는 영향

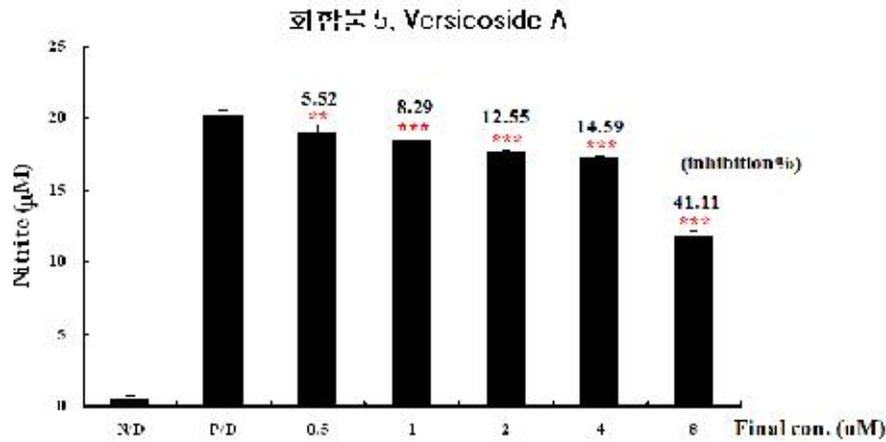


그림 36. 화합물 5의 NO 생성에 미치는 영향

다음은 불가사리에서 분리한 단일물질의 비만세포에서 LTC₄, PGD₂ 및 탈과립 (β-Hex)반응 억제 효능에 관한 실험한 결과는 Table 1과 같다.

검체	LTC ₄ 생성 (최종농도 20 µM) inhibition %	PGD ₂ 생성 (최종농도 20 µM) inhibition %	β-Hex 유리 (최종농도 20 µM) inhibition %
불가사리 comp 1	-10.34	42.92	-4.61
불가사리 comp 2&3	-42.18	-84.79	33.41
불가사리 comp 4	-15.92	-36.94	69.78
불가사리 comp 6	-3.46	20.44	-8.99
불가사리 comp 7	-2.06	45.24	-3.34

즉, 사용 가능량이 확보된 화합물을 대상 (최종 농도 20 µM) 으로 실험한 결과 신규 화합물 1은 COX-2 의존적인 PGD₂ 생성을 억제하였으며, 2와 3 혼합물에서는 탈과립 반응 억제 효과를 나타내었다. 그리고 기존에 보고된 화합물 4에서 NO 생성억제와 동시에 탈과립 반응 억제 작용을 나타내었으며, 화합물 6 및 7에서는 COX-2 의존적인 PGD₂ 생성 억제 작용을 나타내었다. 따라서 2차년도에서 알려진 동물모델에서 항알러지 효능을 나타내는 이유는 적어도 일부는 이들 화합물에 의한 것이리라 사료된다.

3-1-5-14 호박해면 ethylacetate층이 RAW264.7 세포에서 NO 생성 및 iNOS protein 발현 조절 기전 규명

2차년도에서 호박해면의 NO 생성억제가 세포독성에 의한 것인지 확인하기 위하여 MTT assay를 한 결과 실험에 그림 37에서처럼 100 µg/ml 농도까지는 세포 독성이 없음을 알 수 있었다.

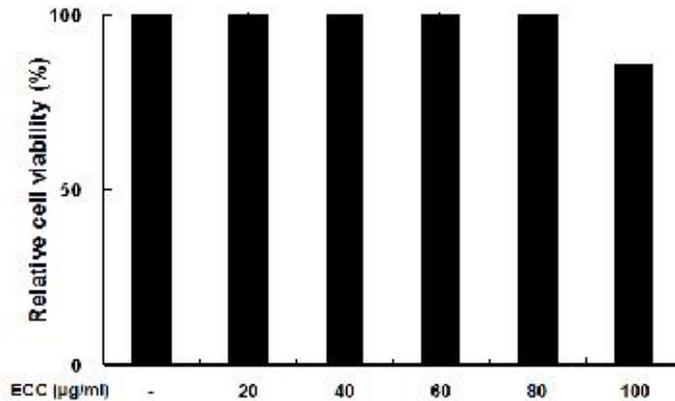


그림 37. 호박해면의 세포독성에 미치는 영향

3-1-5-15 호박해면이 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

호박해면의 ethylacetate 분획(ECC)에 의한 NO 생성 억제가 iNOS 단백질 발현을 억제하기 때문인지, 아니면 유전자 발현에 의한지를 확인하기 위하여 Real-time PCR을 한 결과 ECC는 강력하게 iNOS 유전자 발현을 억제하는 효과를 나타내어 NO 생성이 iNOS mRNA 발현을 억제함에 의한다는 결과를 얻었다.

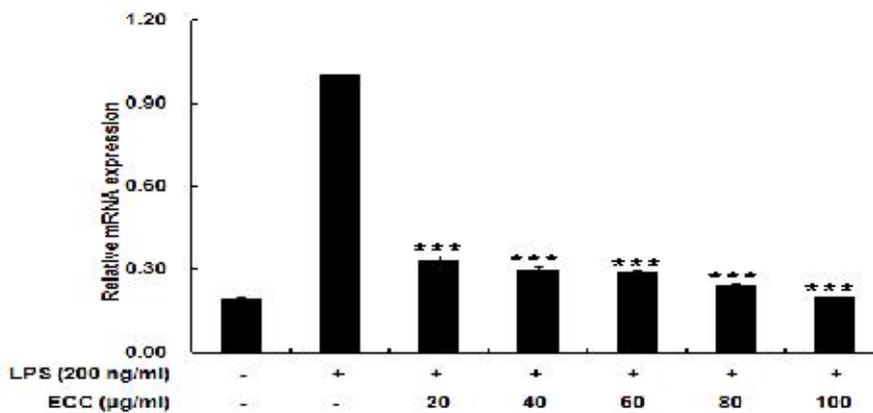


그림 38. Effects of ECC on LPS-Induced the expressions of iNOS mRNA in RAW 264.7 Cells. Expression of mRNA transcripts for iNOS was detected by real-time PCR. The data represent the mean \pm S.D. of three different samples ECC. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control.

3-1-5-16 호박해면이 iNOS생성억제가I κ B- α 의 인산화 및 분해에 미치는 영향

iNOS의 유전자를 조절하는 전사인자인 NF- κ B는 세포질에서 이들의 저해단백질인 I κ B- α 와 결합한 채로 불활성화 상태로 있지만, 세포가 자극을 받게되면 I κ B- α 가 IKK에 의해 인산화된 후 분해면 세포질에서 핵내로 translocation 하여 DNA와 결합함으로써 iNOS 유전자가 발현하게 된다. 따라서 ECC가 I κ B- α 분해 및 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과 그림 39B에서처럼 ECC 용량의존적으로 인산화 및 분해를 억제한 것을 알 수 있었다

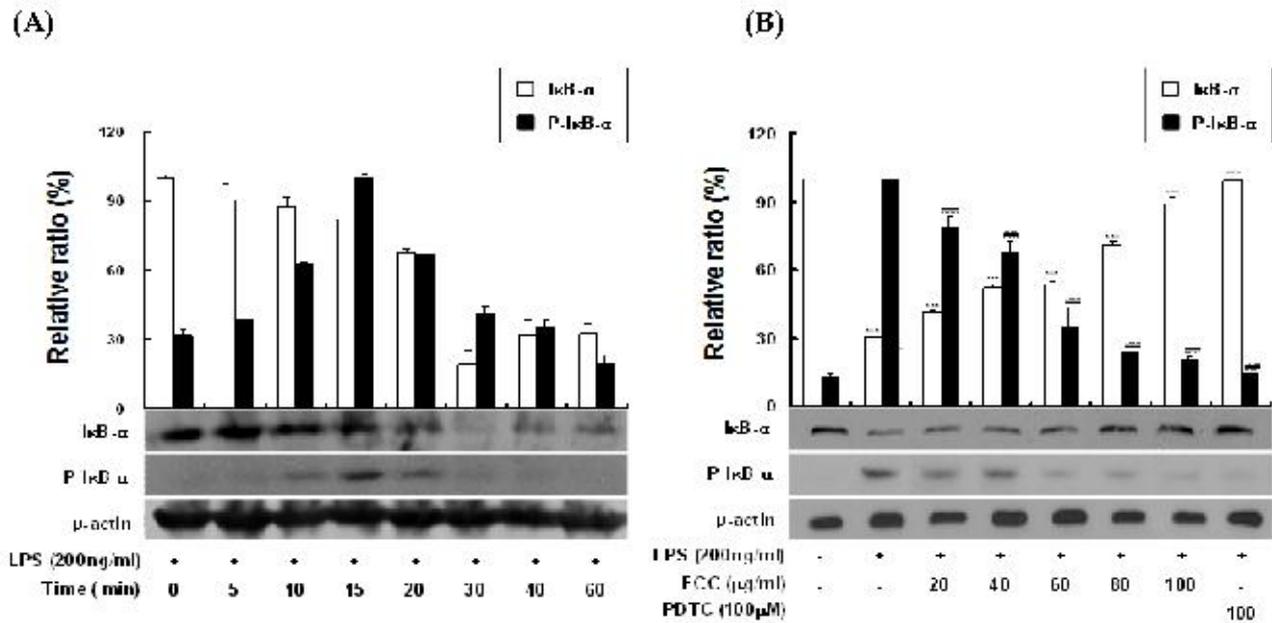


그림 39. Time course and concentration effects of fECC on LPS-stimulated the phosphorylation and degradation of IκB-α. (A) Time course of IκB-α phosphorylation and degradation. Cells were treated with LPS (200 ng/ml) indicated time, total cell lysates were prepared for a Western blot analysis for the content of IκB-α and p-IκB-α protein. After 15 min activation, phosphorylated IκB-α was detected by an anti-phospho (Ser 32)-specific IκB-α antibody. (B) Cells were treated with LPS(200ng/ml) with pretreatment by FCC or PDTc (10^{-4} M) for 30 min, and the cytosolic fraction was subjected to Western blot analyses for IκB-α, p-IκB-α and β-actin. Relative ratio of IκB-α/β-actin (□) and relative phospho-IκB/IκB protein levels (■) was determined by measuring immunoblot band intensities by scanning densitometry. Data represent the mean±S.D. of three separate experiments (significant compared to the LPS-treated group for IκB-α and $^{***}p < 0.001$; significant compared to the LPS-stimulated group for phospho-IκB-α and $###p < 0.001$)

3-1-5-17 호박해면이 iNOS 전사인자인 NF-κB의 핵내 translocation에 미치는 영향

그림 40에서처럼 NF-κB 저해단백질인 IκB-α의 인산화 및 분해를 ECC가 억제하였기 때문에 ECC가 NF-κB의 subunit인 p65의 세포질에서 핵내로 translocation억제 효능을 확인하기 위하여 실험결과 그림40에서처럼 ECC는 세포질에서 핵내로 translocation을 용량의존적으로 억제하는 사실을 확인하였다.

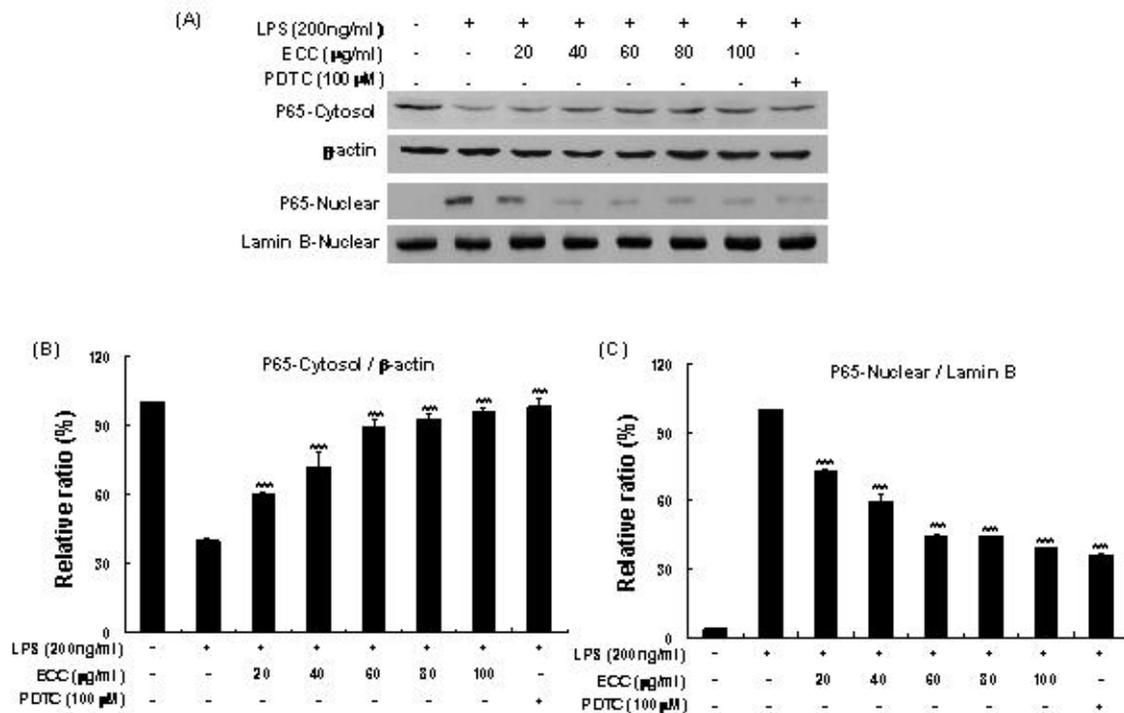


그림 40. Effects of ECC on LPS-induced p65 nuclear translocation in RAW264.7 cells.

(A) Cells were pretreated with ECC (20 or 100 μ M) for 30 min and treated with LPS (200 ng/ml) for 30 min. Nuclear extracts and cytosolic extracts were then prepared as described manufacturer's instructions (Panomics AY2002, Redwood City, CA) and subjected to Western blot analysis. Relative cytosol p65/ β -actin (B) and nuclear p65/lamin B (C) protein levels were determined by measuring immunoblot band intensities by scanning densitometry. Data represent the mean \pm S.D. of three separate experiments (significant compared to the LPS-treated group and *** $p < 0.001$)

3-1-5-18. ECC가 RAW264.7 세포에서 NF- κ B 가 DNA결합에 미치는 영향

ECC의 iNOS 발현 억제는 전사인자인 NF- κ B가 DNA에 결합을 억제함으로써 이루어짐이 밝혀졌다.

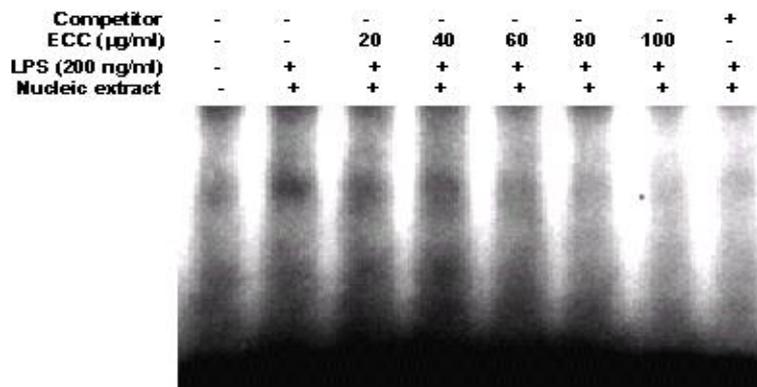
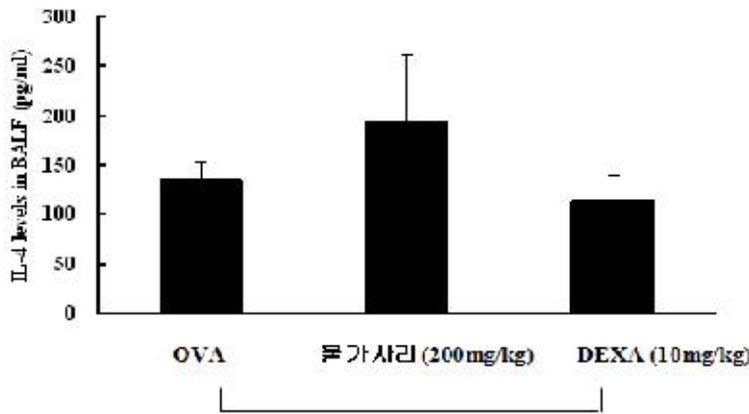


그림 41. Effects of ECC on LPS-induced DNA-binding activity.

Cells were pretreated with ECC or a competitor (non-radiolabeled oligonucleotide probes) for 30 min and then treated with LPS (200 ng/ml) for 1 h. Nuclear extracts were then prepared and analyzed by EMSA for activated NF- κ B using radiolabeled oligonucleotide probes.

3-1-5-19. 불가사리 BuOH분획의 항 천식작용

2차년도에서 불가사리 BuOH분획 (Butanol fraction of *Asterias amurensis*, BFA) 이 기관지 세척액 중 호산구 침윤을 억제하는 활성을 확인하여 항천식작용이 있음을 보고한바 있다. 3차년도에서도 계속하여 천식 동물 모델 (group 당 5마리) 에서 그 효능을 확인하기 위하여 추가 실험을 실시하였다. Ovalbumin/Alum으로 유도한 천식 동물모델에서 200 mg/kg으로 투여하여 BFA가 천식반응에 관여하는 Th2 cytokine인 IL-4 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 효과가 없음이 나타났다.

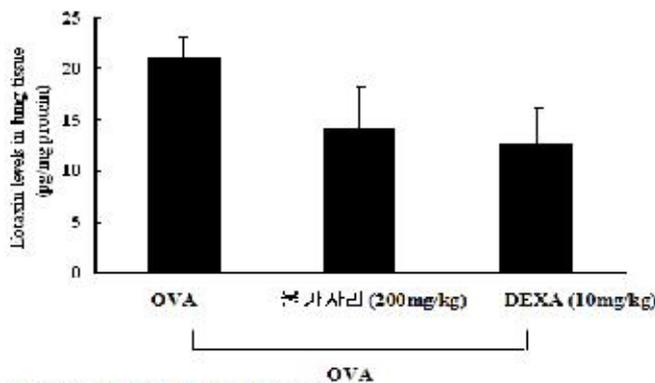


OVA : Sensitized, challenged with OVA
 불가사리 : Sensitized, challenged with OVA, treated with 200 mg/kg of 불가사리 (p.o)
 DEXA : Sensitized, challenged with OVA, treated with 10 mg/kg of dexamethasone (p.o)

그림 42. BFA did not reduced Th2 cytokine, IL-4 level was measured by ELISA, and are expressed as pg/mg of total protein contents.

3-1-5-20. BFA가 eotaxin 생성에 미치는 영향

Eotaxin은 염증 부위에 eosinophil (호산구)를 불러 모으는 효능을 가지고 있는 chemokine의 일종이다. 2차년도에서 BFA가 이 기관지 세척액 중 호산구 침윤을 억제하는 활성을 나타내었기 때문에 확인하여 eotaxin 생성량에 미치는 영향을 검토한 결과 BFA는 강한 억제활성 나타내었다. 따라서 호산구 침윤의 억제는 일부는 eotaxin 생성억제에 있음이 예측된다.



OVA : Sensitized, challenged with OVA
 불가사리 : Sensitized, challenged with OVA, treated with 200 mg/kg of 불가사리 (p.o)
 DEXA : Sensitized, challenged with OVA, treated with 10 mg/kg of dexamethasone (p.o)

그림 43. BFA reduced eotaxin level was measured by ELISA, and are expressed as pg/mg of total protein contents.

3-1-5-21. BFA가 IgE 생성 생성에 미치는 영향

알러지 반응이 일어나면 혈청 중에 IgE 량이 상당히 증가하는 현상이 나타난다. 따라서 BFA사 혈청 중의 IgE 생성에 미치는 영향 검토한 결과 그림 44에서처럼 BFA는 강한 억제 활성을 나타내었다.

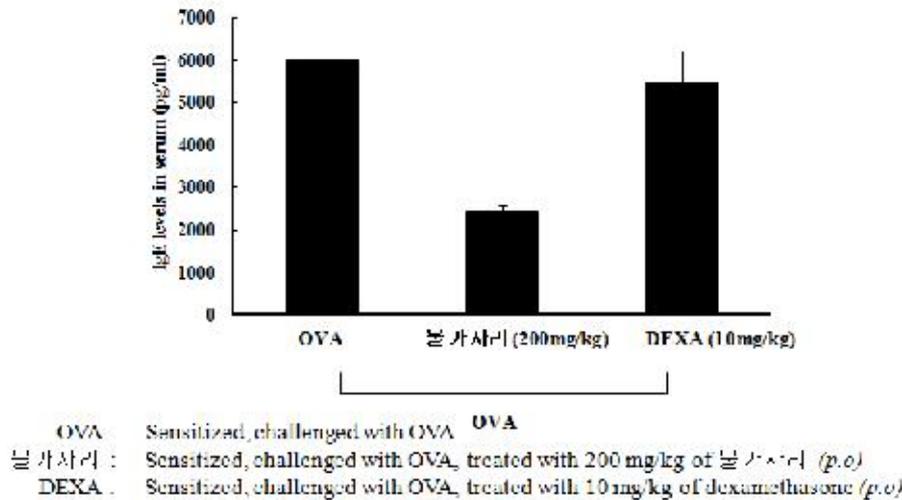


그림 44. BFA strongly reduced serum IgE level was measured by ELISA, and are expressed as pg/mg of total protein contents.

결론적으로 불가사리의 butanol 분획에는 제1형 알러지 동물모델에서는 항알러지 활성은 PGD₂, LTC₄ 및 탈과립반응 억제에 기인함이 예상된다. 그러나 ovalbumin/alum으로 유도한 천식모델에서 항천식 경향은 나타내고 있으나, positive control로 사용한 dexametasone의 억제 효능이 일정치 않기 때문에 금후 불가사리 butanol 분획의 항천식 작용에 관해서는 추가 실험이 이루어진 후 최종적으로 효능을 판단을 할 수 있으리라 사료된다.

3-1-5-22 불가사리 EtOAc 추출분획 (EFA)의 항염증 및 항염증관련 신호전달관련

ERK인산화 조절기전 확인:

전년 1,2차년도 실험에서 나타난 결과와 같이 EtOAc 분획에 의해 TNF- α 로 activation된 세포염증 및 비만관련성을 불가사리 EtOAc 추출분획의 혈관평활근 세포에서 유도된 MMP-9의 생산을 전사와 번역단계에서 억제하고 있는것을 확인하였다. MMP-9단백질의 전사에 영향을 미치는 세포신호전달 단백질인 ERK의 활성화에 대한 억제능을 Western-Blotting으로 확인하였다. 그림 45. 에서와 같이 TNF-alpha로 유도된 인산화 ERK의 증가는 불가사리 EtOAc 추출분획의 투여군에서 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있다.

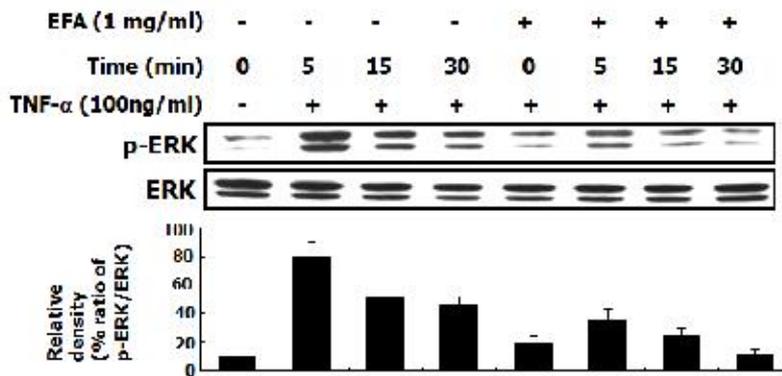


그림 45. EFA : 불가사리 EtOAc 추출분획의 신호전달관련 ERK인산화 조절

다음으로 MMP-9 유전자의 상류에 위치하여 전사조절에 영향을 미치는 전사조절단백질의 하나인 NF-kappaB의 혈관평활근 세포핵내의 양적변화를 Western-Blotting으로 관찰하였다. 불가사리 EtOAc 추출분획을 혈관평활근세포에 처리한 후 TNF-alpha를 처리하여 NF-kappaB의 핵내로의 이동을 유도하였다. 그리고 처리된 혈관평활근 세포의 핵 단백질을 추출하여 NF-kappaB의 양적변화를 확인한 결과, 그림 46에서와 같이 불가사리 EtOAc 추출분획은 혈관평활근세포에서 NF-kappaB의 핵내이동을 억제함을 확인할 수 있었다.

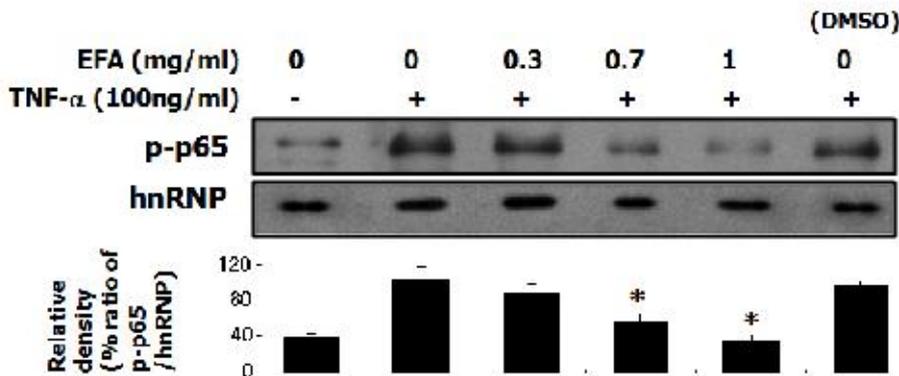


그림 46. EFA : 불가사리 EtOAc 추출분획의 전사인자NF-kappaB의 핵내이동억제 활성

3-1-5-23 불가사리 EtOAc추출분획을 이용한 고지방성 식이 마우스 C57BL/6 (high-fat diet-fed C57BL/6 mice)의 구강식이를 통한 체중감소 및 총지질함량 변화 (Effect of Ethylacetate fraction from *Asterias amurensis* based on oral administration in C57BL/6 mice fed a high-fat diet)

EtOAc 분획추출물을 대량으로 조제하여 실험용 생쥐에서 항염증-항혈관질환 메카니즘을 이용하여 마우스의 체중변화를 추적하였다. 2차년도 실험에서 지질변화는 4주령 마우스의 6주동안 일반 식이군, 고지질 식이군, 고지질식이군 + EtOAc 분획추출물 식이군 으로 나누어 생육시킨 후 혈중 콜레스테롤과 중성지질 Leptin등의 변화에서도 유의한 변화를 관찰되었다.

6주간의 동물실험에서 복부의 총지방함량의 변화는 감소하는 경향이 관찰되었다. 즉, 해부후 복부의 지방덩어리는 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 명확하게 감소하였다. 또한, 간조직

에서 고지질식이에 따른 지방간 괴적이 고지질군에 비해 EtOAc 섭취군에서 명확하게 감소되는 것이 관찰되었다 (그림 47).

따라서 불가사리 분획추출물의 동물식이시 체내 지방합성억제, 지방축적의 억제 및 이들을 대사하는 간조직에서 지방간의 생성이 현저히 억제되는 현상이 확인되었다. 따라서, EtOAc분획추출물의 지방합성억제와 관련한 비만억제 활성은 심혈관계질환의 예방과 치료에 크게 기여할 수 있을 것으로 예측되며, 향후 그 기전연구에 대한 보완이 필요로 한다.

Effect of EFA In C57BL/6 mice fed a high-fat diet

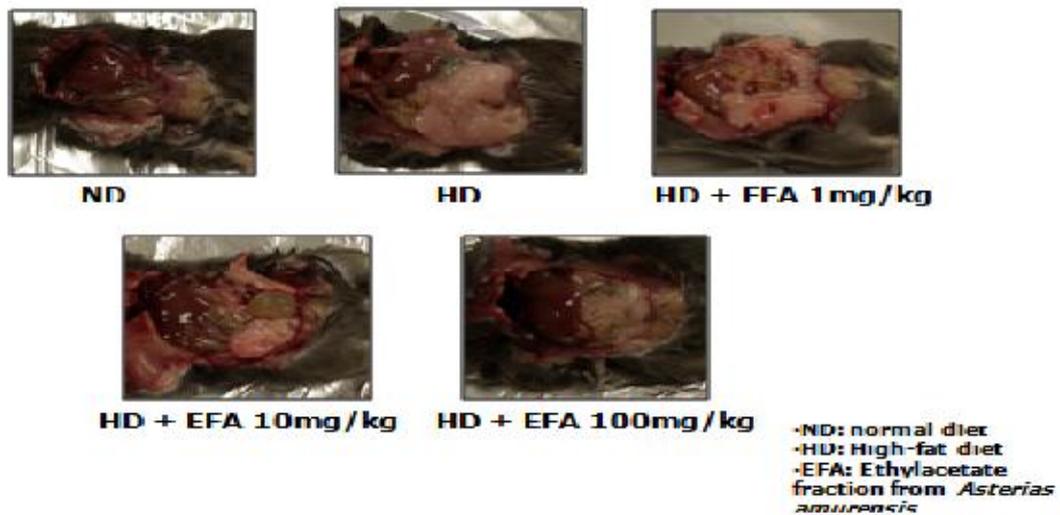


그림 47. 불가사리 EtOAc 분획추출물의 마우스 식이시의 체중 총지질함량 감소와 지방간의 개선효과. ND; normal diet, HD; high fat diet, EFA; 불가사리 에틸아세테이트 분획

3-1-5-24 불가사리 EtOAc추출분획을 이용한 고지방성 식이 마우스 C57BL/6 (high-fat diet-fed C57BL/6 mice)의 구강식이를 통한 체중감소 (Body weight in C56BL/6 fed a high-fat diet for 6 weeks in C57BL/6 mice fed a high-fat diet)

위에 실시한 방법과 동일한 방법으로 EtOAc 분획추출물을 대량으로 조제하여 실험용 생쥐에서 마우스의 체중변화를 관찰하였다. 4주령 마우스를 6주동안 일반 식이군, 고지질 식이군, 고지질식이군 + EtOAc 분획추출물 식이군 (1, 10, 100 mg/kg mouse, daily)으로 나누어 구강식이를 실시하고, 체중변화를 관찰하였다. 6주간의 동물실험에서 체중변화는 감소하는 경향이 관찰되었다. 즉, 일반식이를 실시한 대조군은 6주에 걸친 사육기간동안 약 개체당 25 g의 체중까지 증가하였으며, HD식이군의 체중은 34g까지 체중이 증가하였지만 10 mg/kg과 100 mg/kg의 EtOAc분획추출물 식이군의 경우에는 대조군과 거의 유사한 체중인 25 g정도의 정상 체중을 유지하였다. 이는 EtOAc분획추출물 식이가 명확하게 체중증가를 감소시키는 생리활성을 나타내는 것이다. 따라서, 앞선 실험에서 얻은 불가사리 분획추출물의 동물식이시 체내 지방합성억제, 지방축적의 억제를 통한 체중증가와 직접 연관이 있음을 확인하였다(그림 48). 따라서, 동물실험에서 EtOAc분획추출물의 지방합성억제와 관련한 비만억제 활성은 심혈관계질환의 예방-치료와 직접 관련됨을 시사하며 향후, 그 응용성이 기대된다. 본 결과는 2개의 특허출원을 실시하여 지적재산권을 보고하였다.

Body weight in C56BL/6 fed a high-fat diet for 6 weeks

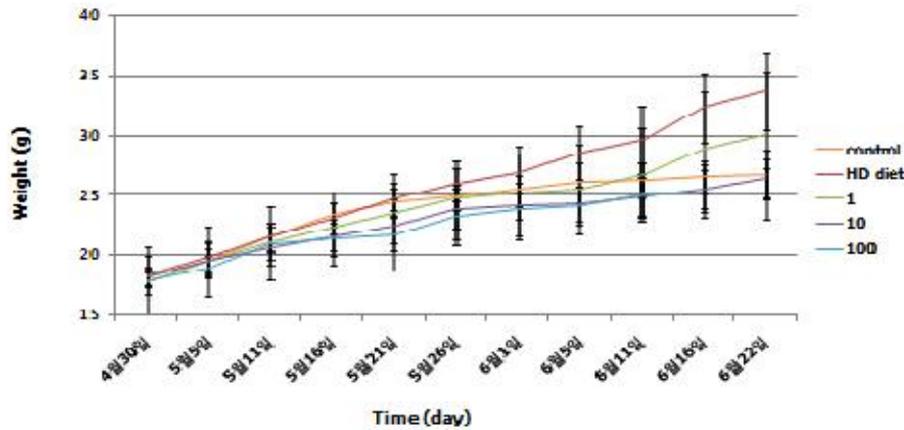


그림 48. 체중변화의 관찰 (Evaluation of body weight changes during administration period with HD diet and EtOAc fraction (1, 10 and 100 mg/kg mouse daily) of starfish in HD and normal diet-feeding mice for 6 weeks).

3-1-5-25 불가사리 EtOAc추출분획을 이용한 고지방성 식이 마우스 C57BL/6 (high-fat diet-fed C57BL/6 mice)의 구강식이를 통한 체중감소 (Body weight in C56BL/6 fed a high-fat diet for 6 weeks in C57BL/6 mice fed a high-fat diet).

한편, 각 EtOAc 분획추출물을 구강식이과정에서 1, 10, 100 mg/kg의 투여량단위로 식이 한 결과, 초기에 18.27±0.71g의 마우스는 0 mg/kg을 섭취시에 18.41±1.59 g, 1 mg/kg을 섭취 시에 17.71±3.00 g, 10 mg/kg을 섭취시에 18.17±0.70 g, 100 mg/kg섭취시에 17.98±0.58 g이었 으나, 6주후에 각각 26.73±2.05g, 33.74±3.20g, 30.10±5.32g, 26.44±1.63g 및 25.22±2.16 g으로 체 중이 변화하였다. 따라서 6주후 각 대조군 및 식이군의 체중획득은 8.46±1.34g, 15.33±1.61g, 12.39±2.32g, 8.27±0.93g 및 7.24±1.58g으로 확실한 체중획득감소가 인정되었다

Table 2. 체중획득의 차이의 관찰.

(Body weight and food intake in mice fed diets for 6 weeks. Evaluation of body weight gain during administration period with HD diet and EtOAc fraction (1, 10 and 100 mg/kg mouse daily) of starfish in HD and normal diet-feeding mice for 6 weeks).

Body weight and food intake in mice fed diets for 6 weeks

Variable	ND	HD + EFA (mg / kg)			
		EFA 0	EFA 1	EFA 10	EFA 100
Initial weight (g)	18.27±0.71	18.41±1.59	17.71±3.00	18.17±0.70	17.98±0.58
Final weight (g)	26.73±2.05	33.74±3.20	30.10±5.32	26.44±1.63	25.22±2.16
Weight gain (g/day)	8.46±1.34	15.33±1.61	12.39±2.32	8.27±0.93	7.24±1.58

3-1-5-26 말초혈관 및 피하조직에서의 지질감소. (Lipid weight in mice fed diets for 6 weeks in C56BL/6 fed a high-fat diet)

한편, 각 EtOAc 분획추출물을 구강식이과정에서 1, 10, 100 mg/kg의 투여량단위로 식이한 결과, 피하지방 및 복부비만의 지방함량이 감소하였다 (그림 49),

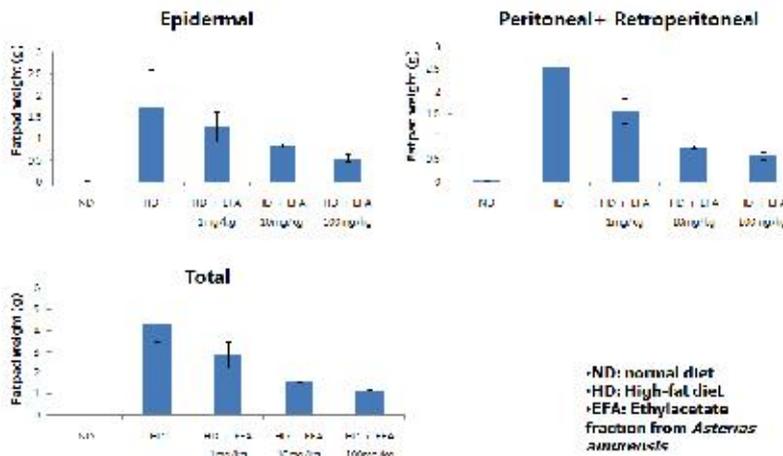


그림 49. 마우스 표피지질 및 복강지방의 감소의 관찰 (Evaluation of Epidermal and Peritoneal+Retroperitoneal fat weight changes during administration period with HD diet and EtOAc fraction (1, 10 and 100 mg/kg mouse daily) of starfish in HD and normal diet-feeding mice for 6 weeks).

3-1-5-27. Starfish의 ethylacetate EtOAc분획에서 활성 당지질분리

한편, 불가사리ethylacetate분획: 1:2:0.8로 녹인뒤, 일부(2ml)를 아세톤20ml에 집어넣어 침전물과

녹은액으로 나눔, 녹은 것은 vacuum으로 건조하여, 각각 1ml의 2:1를 넣어 녹임. 침전물쪽은 잘 안녹아 20분간 sonicate함.

(Acetone: 당지질은 아세톤에 녹지 않음. 다른 지방질들은 잘 녹아 여기서 분리가 어느정도 가능함). sonicate해도 녹지 않고 뿌옇게 된바, 1:2:0.8로 하기로 하고, 먼저 1:2가 되도록 M (2:1에는 C0.66+M0.33이므로, M을 0.99를 먼저 넣고, 0.52ml의 W를 나중에 넣음)

1) star-fish 획분 Silica gel chromatography: no 2, No, 3: Open column, C/M 10/0에서 loading, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8, 1/9로 용출gkrh, Silica gel을 Chloroform으로 충전하여 C로 washing함. Loading 및 전개는 Chloroform/Methanol 10/0 또는 9/1조건에서 Sample 충전후 washing을 C 100% 으로하고 시료가 Methanol에 녹는쪽이면 C/M 9/1로 washing함.

그후, C/M을 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6, 3/7, 2/8, 0/10으로 점차 C농도를 줄여가며 elution해감. 이들을 각각 N2 gas 또는 Vacuum으로 어느 정도 농축하여 TLC로 분석함. 실제 진행한 시료의 TLC분리 조건 및 진행.

- 1) 최종 남은 crude EtOAc분리: 유기용매로 분획후 남은 것들을 합한 것 포함:
원래하듯이 C/M을 10/0에서 charge후, 2/8까지 용출후, 0/10으로 최종 용출.
- 2) EtOAc분획의 C/M/W 1/2/0.8의 Acetone첨가후 upper phase (상층): 소수성이 많은 지방층이 강하므로 8/2-0/10으로 진행.
- 3) EtOAc분획의 C/M/W 1/2/0.8의 Acetone첨가후 lower phase (아래층): 친수성이 많은 층이 강함. 8/2-0/10으로 진행.
- 4) EtOAc분획의 C/M/W 1/2/0.8에 Hexane첨가후 upper phase (상층): 친수성이 많은 층이 강하므로.9/1-7/3-5/5-0/10으로 진행.
- 5) EtOAc분획의 C/M/W 1/2/0.8에 Hexane첨가후 lower phase (하층): 소수층이 강하므로.9/1-7/3-5/5-0/10 이후-M/Water(2/1)으로 진행

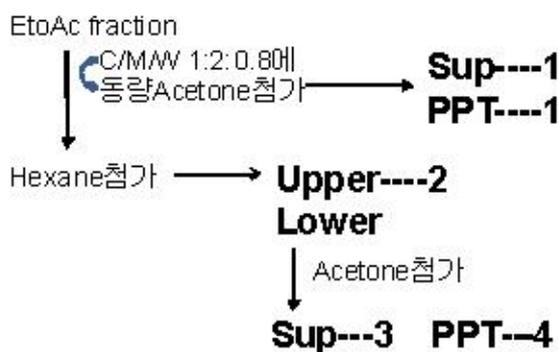


그림 50. 당지질분리를 위한 TLC 진행과정 (TLC procedure for Glycolipids from EtOAc fraction).

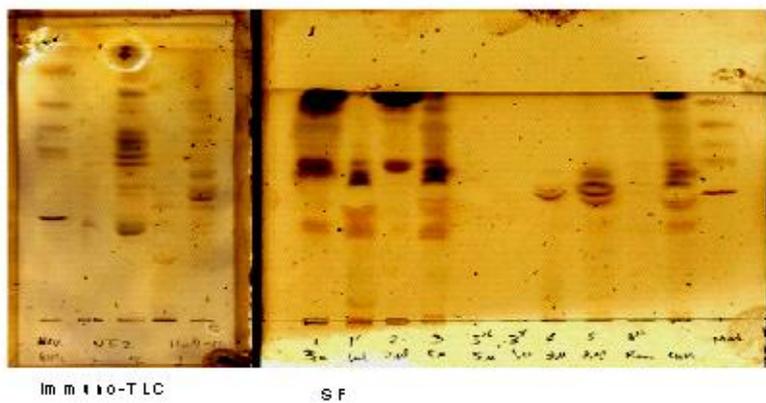


그림 51. 당지질분리를 위한 1차 TLC분석 (1st TLC analysis of the partially isolated Glycolipids from EtOAc fraction).

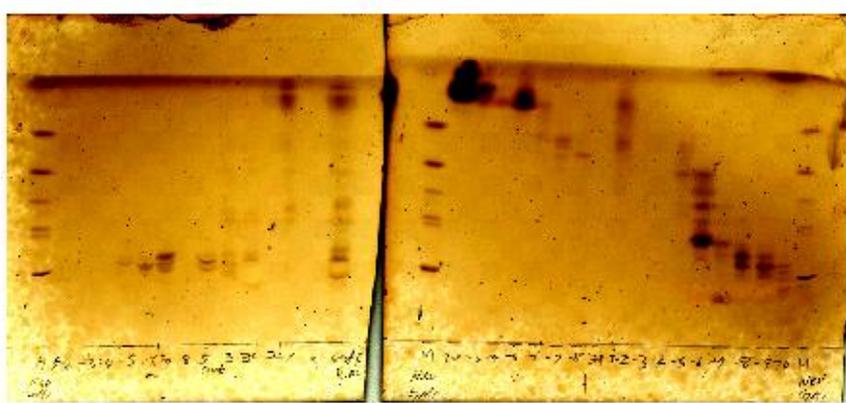


그림 52. 당지질분리를 위한 silica gel chromatography용출분의 2차 TLC분석 (2nd TLC analysis of the Glycolipids from Silica Gel chromatography).

3-1-5-28 Starfish glycolipid대량 TLC

상기에서 미니컬럼에서 분리조건을 확인하고 대량의 Silica Gel Chromatography를 실시하였다. 그 결과, 3-2, 3-5등 그림7에 단일밴드로 분리된 성분들의 LC-MS/MS/MS분석을 실시하였다.

Starfish 20100723

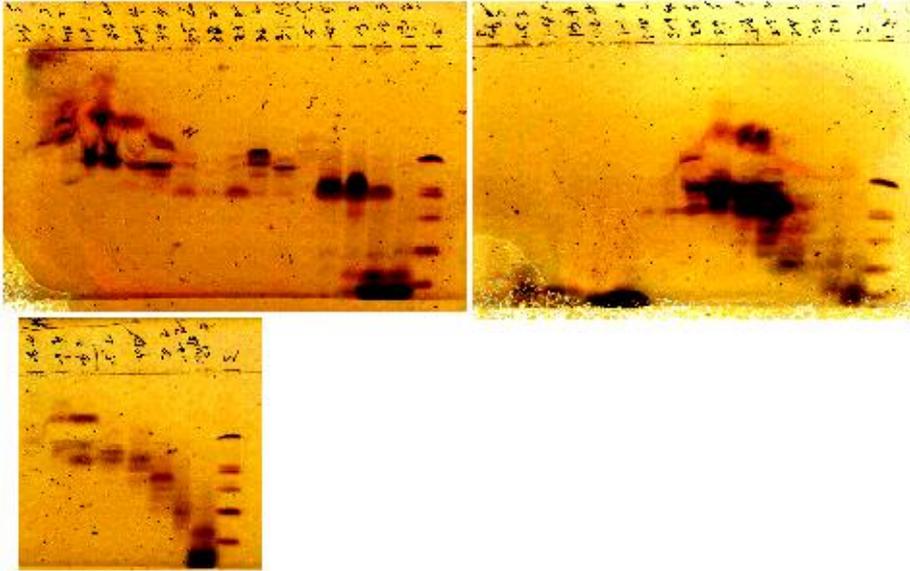
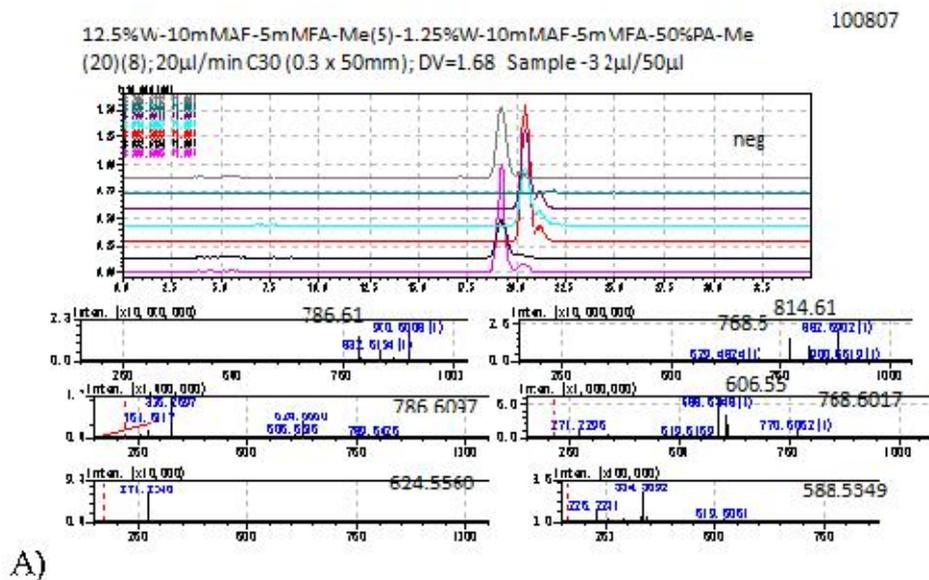


그림 53. 당지질분리를 위한 2nd silica gel chromatography용출분의 3차 TLC분석 (3rd TLC analysis of the Glycolipids from 2nd Silica Gel chromatography).

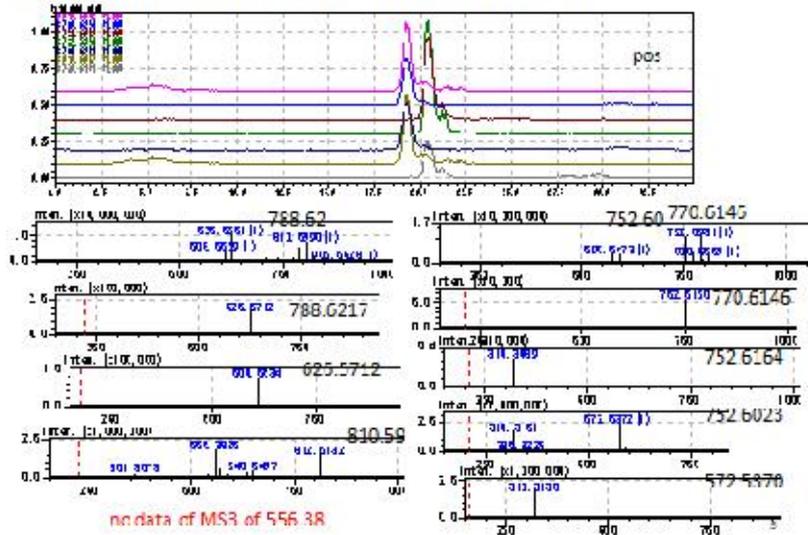
3-1-5-29 Starfish glycolipid LC-MS/MS/MS분석을 통한 구조결정

위의 대용량Silica Gel Chromatography에서 얻은 성분들을 LC-MS/MS/MS분석을 실시하였다 (Shimadzu TOP-IT LC-MS). 분리된 당지질들을 다음조건하에서 MS분석을 실시하였다. 12.5%W-10mMAF-5mMFA-Me(5)-1.25%W-10mMAF-5mMFA-50%PA-Me (20)(8); 20ml/min C30 (0.3 x 50mm); DV=1.68 Sample -3 2ml/50ml



12.5%W-10mMAG-5mMFA-Me(5)-1.25%W-10mMAG-5mMFA-50%PA-Me
 (20)(8); 30 μ l/minC30(0.3 x 50mm); DV=1.58 Sample-41 μ l/50 μ l

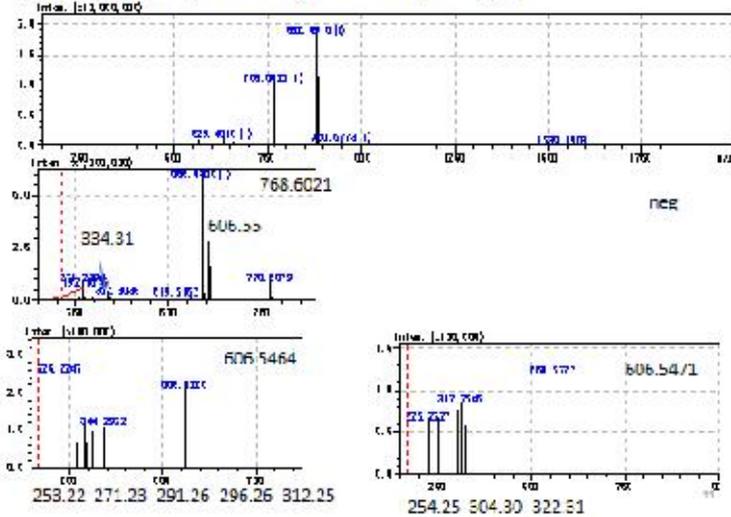
100807



B)

12.5%W-10mMAG-5mMFA-Me(5)-1.25%W-10mMAG-5mMFA-50%PA-Me
 (20)(8); 20 μ l/minC30(0.3 x 50mm); DV=1.68 Sample-32 μ l/50 μ l

100809



C)

그림 54. 분리 당지질들의 LC-MS/MS/MS분석 . A) Negative B) Positive MS C) MS/MS/MS

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

구분	연도	세부연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도 (%)	기술발전 기여도 (%)
1차 년도	2007	활성검색계 확립 후보물질 도출을 위한 기반 연구	항염증 활성물질 탐색	100	100
			항종양, 항혈관협착활성 탐색	100	100
			기능성물질 생산 해양 해면 및 극피동물류 엑스의 조제	100	100
2차 년도	2008	유효성분의 분리 및 작용 기전 규명	정제 및 분획 다당의 in vitro, in vivo 효능 확인 여부	100	100
			기능성식품 개발을 위한 유효성분의 효능 검증	100	100
			특허출원 여부	100	100
3차 년도	2009	소재의 상업화 및 소재화의 가능성	기능성 후보물질 분리정제, 다당의 기능성식품 소재화 가능성 검토	100	100
			기능성 다당의 안전성 및 기능 해석 여부	100	100
			특허출원 여부	100	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

5-1 실용화·산업화 계획

해면 및 극피동물로부터 기능성소재발굴을 위한 접근이 다수 일부 존재하였으나 (예, 콜라겐 이용등) 본 연구개발은 예비실험에서 발굴한 새로운 개념에서 접근하여 기대하지 않았던 새로운 항비만, 항염증, 항천식등의 활성이 인정되었으며 지적소유권을 출원한 것이다. 객관적으로는 대학교 차원에서 기업기술이전홍보를 2010년 10월23일 삼성의료원에서 실시하며 본 기술이 해당기술로 선정되어 진행된다. 이 시점을 기점으로 하여 산업화적용이 대기업등을 통하여 이루어진다면 본 해양관련 평가원의 큰 성과로 기록 될 것이다.

KDRA 한국신약개발연구조합 연구개발중심 혁신형 제약기업 대표단체 **제약산업기술거래센터(PTBC)**

(137-060) 서울특별시 서초구 방배동 474-15 화산빌딩 4층/☎(02)525-3106/F.(02)525-3109
www.kdra.or.kr

문서번호 조 합 10 - 456
시행일자 2010. 11. 11
수 신 회원사 대표이사
참 조 연구소장, 기술거래위원, 개발담당
 임원, 기술이전/라이센싱담당부서장

선 결			지 시		
접 수	일 자		결 재 · 공 람		
	시 간				
번 호					
처 리 과					
담 당 자					

제 목 "2010 성균관-가톨릭 Bio Techno-Fair" 개최 안내

1. 귀 사의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 우리조합은 회원사의 국내외 오픈 이노베이션 역량강화를 통한 국제경쟁력 확보를 위해 제약산업 및 바이오 기술분야 국내외 산·학·연·벤처보유 유망기술 및 사업에 관한 설명회 개최 등 각종 협력사업을 전개하고 있습니다.

3. 그 일환으로 성균관대학교 및 가톨릭대학교와 공동으로 동대학 보유 제약/바이오분야 사업화 유망기술에 대한 기술이전과 산·학 공동연구를 위한 회원사와의 교류의 장을 마련하기 위해 "2010 성균관-가톨릭 Bio Techno-Fair" 를 개최하오니 동 상담회 참가를 희망하시는 회원사 관계자께서는 아래 및 별첨 기술설명서를 참조하시어 2010년 11월 22일(월)까지 참가신청 해주시기 바랍니다.

가. 행사개요

- 1) 행사명 : 2010 성균관-가톨릭 Bio Techno-Fair
- 2) 일 시 : 2010년 11월 23일(화) 10:00 ~ 15:00
- 3) 장 소 : 삼성서울병원 암센터 B2 증강의실 / B3 PBL-A실
(서울 강남구 일원동 소재, 약도 및 교통편 별첨)
- 4) 주 관 : 성균관대학교 산학협력단, 가톨릭대학교 산학협력단
- 5) 후 원 : 한국신약개발연구조합, 경기테크노파크, 경기바이오센터
- 6) 프로그램

시 간	내 용	장 소
10:00~10:30	등록 및 자료집 배포	-
10:30~12:00	제약/바이오분야 연구성과물 발표 (6개 기술, 기술당 15분 발표)	B2 증강의실
12:00~13:00	Break Time	-
13:00~15:00	기술이전 상담 (개별 기술발표 후 상담 가능)	B3 PBL-A실

나. 이전대상 기술리스트

No.	기술명	연구책임자
성균관대학교 보유기술		
1	로기닌 또는 그의 염을 포함하는 치매 파킨슨씨 질환 스트레스, 노화, 뇌졸중 및 헌팅톤 질환과 같은 퇴행성뇌질환 치료 및 예방용 조성물	장춘곤
2	불가사리 추출물을 유효성분으로 하는 항 비만용, 항 염증 또는 알러지질환의 예방 및 치료용 조성물	김철호
3	세포 내 전달능이 증가된 다중 작은 간섭 RNA 복합체 및 다기능성 핵산구조 복합체	이동기
가톨릭대학교 보유기술		
4	난백알부민을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료제	김수환
5	펩타이드를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 약제	조영애
6	뇌졸중 진단용 마커로서 VEGFR-3의 용도	이문용

※ 기술설명서 별첨 참조

다. 참가신청안내

- 1) 신청방법 : 별첨 참가신청서 작성 후 이메일 또는 팩스전송
- 2) 신청접수 : 가톨릭대학교 산학협력단

Fax. 02-2258-7746, E-mail. faith_81@catholic.ac.kr

3) 참 가 비 : 무료(교재제공)

라. 문의 : 가톨릭대학교 산학협력단 양진영 / Tel. 02-2258-7125

마. 기타 : 주차권이 제공되지 않으니 대중교통 이용 요망

첨 부 : 1. 기술소개서 각1부.

2. 참가신청서 1부.

3. 개최장소 및 교통편 안내 1부.

(끝)

한 국 신 약 개 발 연 구 조 합 이 사 장



2010 성균관-가톨릭 Bio Techno-Fair 참가 신청서

- ◆ 신청기한 : 2010.11.22(월)까지
- ◆ 신청방법 : 참가신청서를 FAX(02-2258-7746) 및 E-mail(faith_81@catholic.ac.kr)로 송부
- ◆ 담당자 : 가톨릭대학교 산학협력단 양진영(02-2258-7125)
- ◆ 참가자정보

회사명			주 소	
참석자명			부서 및 직위	
연 락 처	전 화		팩 스	
	휴대폰		E-mail	

◆ 신청기술리스트

구분	No.	기술명	연구책임자	상담신청여부
성균관 대학교 기술	1	로가닌 또는 그의 염을 포함하는 치매, 파킨슨씨 질환, 스트레스, 노화, 뇌졸중 및 헌팅톤 질환과 같은 퇴행성뇌질환 치료 및 예방용 조성물	장춘곤	<input type="checkbox"/>
	2	불가사리 추출물을 유효성분으로 하는 항 비만용, 항 염증 또는 알러지질환의 예방 및 치료용 조성물	김철호	<input type="checkbox"/>
	3	세포 내 전달능이 증가된 다중 작은 간섭 RNA 복합체 및 다기능성 핵산구조 복합체	이동기	<input type="checkbox"/>
가톨릭 대학교 기술	4	난백알부민을 유효성분으로 포함하는 알레르기 질환 예방 및 치료제	김수환	<input type="checkbox"/>
	5	펩타이드를 포함하는 혈관신생 억제용 조성물 및 약제	조영애	<input type="checkbox"/>
	6	뇌졸중 진단용 마커로서 VEGFR-3의 용도	이문용	<input type="checkbox"/>

위와 같이 참가를 신청합니다.

2010 년 11 월 일

가톨릭대학교 산학협력단장 귀하

교통편 및 약도

- 주 소 : 서울시 강남구 일원동 50번지 삼성서울병원 암센터
- 지하철 3호선 일원역 하차 1번출구 (도보로 5분거리, 셔틀버스 이용가능)
- 삼성서울병원 홈페이지 참조 (<http://www.samsunghospital.com>)
- 약도



※ 주차권은 지급하지 않으니 대중교통을 이용하여 주시기 바랍니다.

5-2 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

해양수산자원으로부터 새로운 접근방법을 통하여 순환기계 심혈관질환을 일으키는 인자들의 효과적인 억제 활성과 이 활성에 근거한 항비만-지방억제 활성물질 발굴에 대한 어업인, 중소 기업 등에 홍보 및 기술 확산 예정.

5-3 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

순환기계 심혈관질환을 일으키는 인자들의 효과적인 억제 활성과 이 활성에 근거한 항비만-지방억제 활성에 대한 물질특허출원완료

5-4 추가연구, 타연구에 활용 계획

기술이전기업이 정해지면 실용화 추가연구가 필요할 것으로 보임. 즉, 효율적 추출 등에 대한 연구개발이 예정됨

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구에 사용한 자료에 관한 새로운 실험결과에 대한 발표 및 특허는 전부의 실정임.

제 7 장 참고문헌

- 1) Fusetani N., Kato Y., Hashimoto K., Komori T., Itakura Y., Kawasaki T., *J. Nat. Prod.*, **47**, 997-1002 (1984).
- 2) Chludil H. D., Seldes A. M., Maier M. S., *J. Nat. Prod.*, **65**, 153-157 (2002).
- 3) Bruno L., Minale L., Riccio R., *J. Nat. Prod.*, **52**, 1022-1026 (1989).
- 4) Kitagawa I., Kobayashi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1864-1873 (1978).
- 5) Riccio R., Greco O. S., Minale L., *J. Nat. Prod.*, **48**, 97-101 (1985).
- 6) Komori T., Matsuo J., Itakura Y., Sakamoto K., Ito Y., Taguchi S., Kawasaki T., *Liebigs Ann. Chem.*, 24-36 (1983).
- 7) Minale L., Riccio R., Greco O. S., Pusset J., Menou J. L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**, 113-118 (1985).
- 8) Maier M. S., Centurión R., Muniain C., Haddad R., Eberlin M. N., *ARKIVOC*, **vii**, 301-309 (2007).
- 9) Iorizzi M., Minale L., Riccio R., *J. Nat. Prod.*, **56**, 1786-1798 (1993).
- 10) Findlay J. A., Jaseja M., Burnell D. J., Brisson J. R., *Can. J. Chem.*, **65**, 1384-1391 (1987).
- 11) Tang H. F., Yi Y. H., Li L., Sun P., Zhou D. Z., Liu B. S., *Chin. Chem. Lett.*, **16**, 619-622 (2005).
- 12) Findlay J. A., Agarwal V. K., *J. Nat. Prod.*, **46**, 876-880 (1983)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 수산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.