



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0048431  
(43) 공개일자 2010년05월11일

(51) Int. Cl.

A61K 35/60 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0107579

(22) 출원일자 2008년10월31일

심사청구일자 2008년10월31일

(71) 출원인

재단법인 제주하이테크산업진흥원

제주 제주시 아라1동 4-8번지

제주특별자치도

제주특별자치도 제주시 연동 312-1 제주특별자치도청

(72) 발명자

박수영

제주특별자치도 제주시 오등동 1653-1 영도그린빌라 C/308

고형범

제주시 일도이동 대유대림아파트 302동 501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동진, 강경찬, 박경찬

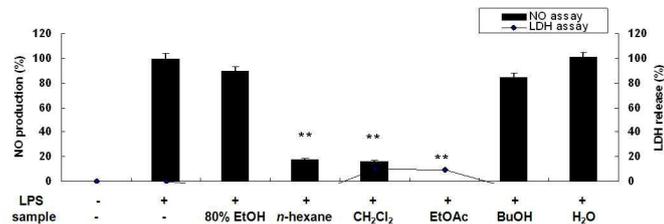
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 항염증제 조성물 및 항암제 조성물

(57) 요약

본 발명은 항염증제 조성물 및 항암제 조성물을 개시한다. 구체적으로 본 발명은 홍해삼 추출물을 이용한 항염증제 조성물 및 항암제 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



The effect 80% EtOH and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on cell viability and nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions of *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

(72) 발명자

**함영민**

제주특별자치도 서귀포시 강정동 178번지 현대2차  
205동 105호

**윤원종**

제주특별자치도 제주시 노형동 1047-10

**김길남**

제주특별자치도 제주시 연동 290-2 학산맨션 403호

**정용환**

제주특별자치도 서귀포시 서홍동 446-13 화신빌라  
A동 201호

**이육재**

충청북도 청주시 흥덕구 개신동 개신푸르지오아파  
트 408동 504호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항염증제 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 홍해삼 추출물은 추출 용매로서 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물인 특징으로 하는 항염증제 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 홍해삼 추출물은 추출 대상으로 홍해삼을 사용하고 추출 용매로서 에탄올 또는 에탄올과 물의 혼합 용매를 사용하여 얻어진 것을 특징으로 하는 항염증제 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은, 추출 대상으로서 홍해삼을 사용하고 추출 용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻어진 추출물로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물, 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 그 추출물을 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물 또는 그 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물인 것을 특징으로 하는 항염증제 조성물.

### 청구항 5

홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 iNOS 억제제 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 추출물은, 상기 홍해삼 추출물은 추출 용매로서 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물인 특징으로 하는 iNOS 억제제 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 추출물은, 추출 대상으로서 홍해삼을 사용하고 추출 용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻어진 추출물로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물, 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 그 추출물을 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물 또는 그 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물인 것을 특

징으로 하는 iNOS 억제제 조성물.

#### 청구항 8

홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 COX-2 억제제 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 추출물은, 상기 홍해삼 추출물은 추출 용매로서 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물인 특징으로 하는 COX-2 억제제 조성물.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,

상기 추출물은, 추출 대상으로서 홍해삼을 사용하고 추출 용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻어진 추출물로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물, 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 그 추출물을 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물 또는 그 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물인 것을 특징으로 하는 COX-2 억제제 조성물.

#### 청구항 11

홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암은 혈액암 또는 대장암인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

#### 청구항 13

제11항에 있어서,

상기 홍해삼 추출물은 추출 용매로서 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물인 특징으로 하는 항암제 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 항염증제 조성물 및 항암제 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 해삼 추출물을 이용한 항염증제 조성물 및 항암제 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [0002] 염증은 외부의 물리·화학적 자극, 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염에 대한 생체의 방어 반응이다.
- [0003] 염증 반응은 선천성 면역 반응의 일부이며, 다른 동물에서처럼 인간의 선천성 면역 반응은 대식세포가 병원체에 특이적으로 존재하는 세포 표면의 패턴을 통해 비자기(non-self)로 인식하고 공격함으로써 시작된다. 염증 반응 시에는 염증 부위에 혈장이 축적되어 세균이 분비한 독성을 희석시키며, 혈류가 증가하고, 홍반, 통증, 부종, 발열 등의 증상이 수반되게 된다.
- [0004] 이러한 염증 반응에는 다양한 생화학적 현상이 관여하는데, 특히 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)와 다양한 프로스타글란딘(prostaglandins, PG)의 생합성과 관련되는 사이클로옥시제나제(cyclooxygenase, COX)가 염증 반응의 중요한 매개체로 알려져 있다.
- [0005] NOS는 세 가지 이성질체가 존재하는데, 칼슘이나 카모돌린 의존성인 eNOS(내피성 NOS)와 nNOS(신경성 NOS), 그리고 LPS(lipopolysaccharide)와 같은 세균의 내독소나 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12과 같은 여러 염증성 사이토카인에 의해 유도되는 iNOS(유도성 NOS)가 있으며, L-아르기닌(L-arginine)으로부터 산화질소(NO)를 생성한다.
- [0006] eNOS나 nNOS에 의해 생성되는 NO는 혈압 조절 작용, 신경 전달 작용, 학습, 기억 등과 관련된 다양한 생리 반응을 수행함으로써 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하지만, iNOS에 의해 생성되는 NO는 관절염, 패혈증, 조직이식거부반응, 자가면역질환, 신경세포의 사멸 등 다양한 염증성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Moncade S. et al, Pharmacol. Rev., 1991, 43, 109; Nature Medicine, 2001, 7, 1138; Mu, M. M., J. Endotoxic Res. 7, p341, 2001).
- [0007] COX 효소는 COX의 기능과 함께 하이드로퍼옥시다제(hydroperoxidase, HOX) 활성을 가지고 아라키돈산으로부터 중간체인 PGG<sub>2</sub>와 PGH<sub>2</sub>를 합성하며, 이들 화합물로 PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, 프로스타시클린 및 트롬복신A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>)를 만든다. COX의 기능 중 PGH 합성효소의 기능은 PGE<sub>2</sub>의 합성을 통해 통증과 염증 반응에 관여한다.
- [0008] COX에는 두 가지 아형이 있고 COX-1은 대부분의 조직에 항상 발현되는데 비해, COX-2는 염증성 사이토카인에 의해 신속히 발현이 유도되어 염증 반응에서 중요한 역할을 한다.
- [0009] 따라서 염증성 사이토카인 생성 억제제, PGE<sub>2</sub>의 생성 억제제, iNOX 억제제 및/또는 COX-2 억제제는 염증성 질환 치료제로서 활용될 수 있다.
- [0010] 한편 암이란 일반적으로 인체 조직을 이루고 있는 세포의 주기에 이상이 생겨 세포가 정상적으로 분화하지 않고 성장을 조절할 수 없이 커진 것 중 악성인 것을 말한다.
- [0011] 최근에는 암에 의한 사망자의 수가 늘어나면서, 암이 사망원인의 대표적인 질병으로써 사람들에게 두려움을 주고 있다. 그 결과 암을 치료하기 위한 투여 약물이나 방법은, 날로 발전을 거듭하고 있으나, 암을 치료하는 결정적인 투여 약물이나 방법은 아직 확립되어 있지 않으므로, 암을 예방하고, 암의 발생을 억제하는 것이 가장 중요하다.

- [0012] 암은 개시(initiation), 촉진(promotion) 및 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는데, 환경이나 음식물 속에 포함된 발암 물질에 의해 세포 돌연변이가 일어나고 이러한 세포들이 발암 물질의 지속적인 자극을 받으면서 비정상적인 증식을 계속하여 암 조직을 형성하는 것으로 알려져 있다.
- [0013] 암을 치료하기 위한 항암제의 연구 방법에는 암세포에 대한 직접적인 세포 독성 물질을 탐색하는 방법, 생체의 면역 능력을 조절하는 물질을 탐색하는 방법, 암세포의 전이를 억제하는 물질을 탐색하는 방법, 최근에 주목되고 있는 혈관신생을 억제하는 물질을 탐색하는 방법 등이 있다.
- [0014] 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소 제제나 백신 등의 생물학적 제제, 화학 합성 의약품, 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이 중 효소, 백신 등의 생물학적 제제는 실용 단계에 있는 상태는 아니며, 화학 합성 의약품은 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고(Gillman., et al., Maxwell Macmillan. , 18, pp 1202, 1986), 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타나기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다(Chung., et al., J. Wonkwang Medical Sci. , 3 , pp 13-34, 1987).
- [0015] 근래에는 세포 배양 기술이 급격히 발달함에 따라 각종 세포를 배양한 후, 여러 독성 물질을 투여함으로써 이들의 세포 독성에 대한 기전을 세포 수준에서 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 부작용을 최소화하고 치료 효과를 높이기 위하여 천연물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다.
- [0016] 본 발명은 천연물로서 홍해삼 추출물의 항염증 활성 및 항암 활성을 개시한다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

- [0017] 본 발명의 목적은 항염증제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적은 항암제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0019] 본 발명의 기타의 목적이나 구체적인 양태 등은 이하에서 제시될 것이다.

**과제 해결수단**

- [0020] 일 측면에 있어서, 본 발명은 항염증제 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되듯이, 본 발명자들은 홍해삼(*Stichopus japonicus*, Orange)을 80% 에탄올로 추출하고, 그 에탄올 추출물을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 분획하고 그 추출물과 분획물의 NO(Nitric Oxide) 생성 억제 활성, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 생성 억제 활성, PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성, iNOS 생성 억제 활성, 및 COX-2 생성 억제 활성을 살펴보았는데, 위 추출물 및 분획물 모두 활성의 정도에는 차이가 있었지만 대체로 위 활성들을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0022] 본 발명의 항염증제 조성물은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로서, 본 발명의 항염증제 조성물은 홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함함을 특징으로 한다.
- [0023] 본 명세서에서 "홍해삼"은 학명이 *Stichopus japonicus* Orange인 해삼을 가리킨다. 구체적으로는, 체색(體色)이 적색에 황갈색 또는 암적갈색의 반문이 있고 복부는 적색이며, 폴리씨낭(Polian vesicle)이 가늘고 길며 선단이 뾰족하고, 수축성이 심해서 체형이 구형 비슷하며, 알에 두께 25 $\mu$ m 내외의 젤라틴 피물을 가진 해삼으로 정의될 수 있다.
- [0024] 또 본 명세서에서, "항염증"이란 아래에서 정의되는 염증성 질환의 개선 활성으로서 정의된다.
- [0025] 또 본 명세서에서, "염증성 질환"이란 외부의 물리·화학적 자극 또는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염에 대한 국부적 또는 전신적 생체 방어 반응으로 특정되는 어떠한 상태로 정의될 있다. 이러한 반응은 각종 염증 매개 인자와 면역세포와 관련된 효소(예컨대 iNOS, COX-2 등) 활성화, 염증 매개 물질의 분비(예컨대, NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE<sub>2</sub>의 분비), 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등의 일련의 복합적인 생리적 반응을 수반하며, 홍반, 통증, 부종, 발열, 신체의 특정 기능의 저하 또는

상실 등의 증상에 의해 외적으로 나타난다. 상기 염증성 질환은 급성, 만성, 궤양성, 알레르기성 또는 괴사성을 띠 수 있으므로, 어떠한 질환이 상기와 같은 염증성 질환의 정의에 포함되는 한 그것이 급성이든지, 만성이든지, 궤양성이든지, 알레르기성이든지 또는 괴사성이든지 불문한다. 구체적으로 상기 염증성 질환에는 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편두통, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티즘성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염, 습진, 다발성 경화증 등이 포함될 것이다.

- [0026] 또 본 명세서에서, "개선"이란 염증성 질환이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 및 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 포함하는 의미이다.
- [0027] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0028] 또 본 명세서에서 "홍해삼 추출물"은 추출 대상으로 홍해삼을 사용하고 추출 용매로서 물, 부탄올, 이소프로판올, 에탄올, 메탄올 등을 포함한 탄소수 1 내지 5의 알콜, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 벤젠, n-헥산을 포함한 탄소수 5 내지 10의 n-알칸, 또는 이들이 혼합 용매를 사용하여 얻어진 추출물을 의미하며, 그 추출물을 극성에 차이가 있는 상기 두 가지 이상의 용매로 분획하여 얻어진 분획물을 포함한다.
- [0029] 상기 용매는 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 에테르, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 벤젠, 및 n-헥산 순으로 극성이 낮아진다.
- [0030] 따라서 극성에 차이가 있는 두 가지 이상의 용매를 사용하여 얻어진 분획물로서는, 예컨대 어떠한 추출물을 물과 헥산으로 분획하여 얻어진 물층의 분획물과 헥산층의 분획물, 어떠한 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획하여 얻어진 물층과 메틸렌클로라이드층의 분획물 등을 예시할 수 있다.
- [0031] 상기 홍해삼 추출물은 바람직하게는 아래의 실시예가 보여주듯이, 비극성이거나 극성이 약한 용매로 추출되거나 비극성 방향으로 분획된 분획물을 의미한다. 그것은 아래의 실시예 및 실험예가 미지의 지표물질 즉 항염증 활성을 나타내는 지표물질이 비극성일 것임을 예측케하기 때문이다.
- [0032] 비극성이거나 극성이 약한 용매로 추출된 것으로서는 알콜, 알콜과 물의 혼합용매(알콜 함량이 물보다 많은 혼합 용매), n-알칸, 메틸렌클로라이드, 또는 에틸아세테이트로 추출된 것을 들 수 있다. 비극성 방향으로 분획된 분획물은 극성이 다른 두 개의 용매로 분획할 때, 극성이 약한 층의 용매층의 분획물을 의미하는데, 예컨대 알콜 추출물을 물과 헥산으로 분획할 때는 헥산층의 분획물을 의미하며, 또 알콜 추출물을 알콜과 헥산으로 분획할 때에도 헥산층의 분획물을 의미하며, 또 알콜 추출물을 물과 메틸렌클로라이드로 분획할 때는 메틸렌클로라이드층의 분획물을 의미한다.
- [0033] 가장 바람직하게는 아래의 실시예 및 실험예에서 확인되듯이 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물(바람직하게는 80% 에탄올)로서 용매를 제거하여 얻어진 고형상의 추출물과 그 추출물을 물과 헥산으로 분획하였을 때 얻어지는 헥산층의 분획물, 물과 에틸아세테이트로 분획하였을 때 얻어지는 에틸아세테이트층의 분획물 또는 물과 메틸렌클로라이드로 분획하였을 때 얻어지는 메틸렌클로라이드층의 분획물을 의미한다.
- [0034] 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 극성의 강약, 극성 용매와 비극성 용매를 확인·판별할 수 있다. 본 명세서에서 극성 용매 및 비극성 용매의 의미, 그리고 극성이 강한 용매 및 극성이 약한 용매의 의미는 당업계의 통상적인 의미를 따른다.
- [0035] 한편 추출 용매를 사용하여 상기 추출물을 얻을 때 열수, 가온, 냉침, 초음파 방사, 교반, 이들을 혼합한 방법 등의 임의의 방법이 사용될 수 있다. 실제 본 발명자들은 아래의 실시예 및 실험예로 개시하지는 않았지만 헥산으로 추출할 때 가온하여 추출한 경우나 초음파를 방사하여 추출한 경우에도 모두 항염증 활성을 가짐을 확인한 바 있다.
- [0036] 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 iNOS 억제제 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 전술하였지만, iNOS의 억제제는 NO의 생성을 억제시켜 염증성 질환의 개선을 가져올 수 있다.

- [0038] 본 발명의 아래의 실시예는 홍해삼 추출물이 NO의 생성을 억제하고 iNOS 유전자 및 단백질 수준에서의 발현을 억제함으로써 보여주고 있으며, iNOS의 발현을 유도하는 것으로 알려진 사이토카인의 생성을 억제함을 보여주고 있다.
- [0039] 본 명세서에서, "iNOS 억제"의 의미는 iNOS 유전자의 발현 억제 및 iNOS 생성 억제를 포함하는 의미이며, 중간 기작이 어떠한 NO의 생성의 억제 및/또는 감소를 포함하는 의미이다.
- [0040] 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 추출물을 유효성분으로 포함하는 COX-2 억제제 조성물에 관한 것이다.
- [0041] 전술하였지만, COX의 억제도 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제시켜 염증성 질환의 개선을 가져올 수 있다.
- [0042] 본 발명의 아래의 실시예는 홍해삼 추출물이 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제하고 COX-2 유전자 및 단백질 수준에서의 발현을 억제함으로써 보여주고 있으며, COX-2의 발현을 유도하는 것으로 알려진 사이토카인의 생성을 억제함을 보여주고 있다.
- [0043] 본 명세서에서, "COX-2 억제"의 의미는 COX-2 유전자의 발현 억제 및 COX-2 생성 억제를 포함하는 의미이며, 중간 기작이 어떠한 PGE<sub>2</sub>의 생성의 억제 및/또는 감소를 포함하는 의미이다.
- [0044] 한편 다른 측면에 있어서, 본 발명은 홍해삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 아래의 실시예 및 실험예는 홍해삼의 80% 에탄올 추출물 및 그 메틸렌클로라이드 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 그리고 물 분획물 모두 혈액암 세포주인 HL-60 세포주 및 대장암 세포주인 HT-29 세포주의 증식 억제 활성을 가지고 있음을 보여준다.
- [0046] 본 명세서에서 "항암"이란 혈액암 또는 대장암의 개선 활성으로서 정의되며, "개선"이란 혈액암 또는 대장암이 가지는 병리적 증상의 개선, 치료 및 그러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 포함하는 의미이다.
- [0047] 기타 유효성분의 의미, 홍해삼의 의미, 그 추출물 등의 의미와 관련하여서는 전술한 바가 그대로 유효하다.
- [0048] 한편 본 발명의 조성물(즉 염증성 질환 개선제 조성물, iNOS 억제제 조성물, COX-2 억제제 조성물 및 항암제 조성물을 말함; 이하 같음)은 그 유효성분인 홍해삼 추출물을 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 치료를 의도하는 염증성 질환 또는 혈액암/대장암의 개선 활성을 나타낼 수 있는 한 임의의 양(유효량)으로 포함할 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 15 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다.
- [0049] 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사람에게서, 염증성 질환 또는 혈액암/대장암의 개선, 치료, 또는 이러한 병리적 증상의 발병 억제/지연을 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물이 적용(치방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 사람이며, 특히 사람인 경우가 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효물질인 홍해삼 추출물을 이외에 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 등을 포함하여, 경구용 제형(정제, 현탁액, 과립, 에멀전, 캡슐, 시럽 등), 비경구용 제형(멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액), 국소용 제형(용액, 크림, 연고, 젤, 로션, 패치) 등으로 제조될 수 있다.
- [0053] 상기에서 "약제학적으로 허용되는" 의미는 유효성분의 활성을 억제하지 않으면서 적용(치방) 대상이 적응가능한 이상의 독성(충분히 낮은 독성)을 지니지 않는다는 의미이다.
- [0054] 약제학적으로 허용되는 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 전분(예컨대 옥수수 전분, 감자 전분 등), 셀룰로오스, 그것의 유도체(예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 등) 맥아, 젤라틴, 탈크, 고체 윤활제(예컨대 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 등), 황산 칼슘, 식물성 기름(예컨대 땅콩 기름, 면실유, 참기름, 올리브유 등), 폴리올(예컨대 프로필렌 글리콜, 글리세린 등), 알긴산, 유화제(예컨대 TWEENS), 습윤제(예컨대 라우릴 황산 나트륨), 착색제, 풍미제, 정제화제, 안정화제, 항산화제, 보존제, 물, 식염수, 인산염 완충 용액 등을 들 수 있다. 이러한 담체는 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적당한 것을 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다.
- [0055] 부형제도 본 발명의 약제학적 조성물의 제형에 따라 적합한 것을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 본 발명의

약제학적 조성물이 수성 현탁제로 제조될 경우에 적합한 부형제로서는 나트륨 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 히드로프로필메틸셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐피롤리돈 등의 현탁제나 분산제 등을 들 수 있다. 주사액으로 제조되는 경우 적합한 부형제로서는 링거액, 등장 염화나트륨 등을 들 수 있다.

- [0056] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 경우에 따라서는 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약제학적 조성물은 그 1일 투여량이 통상 0.001 ~ 150 mg/kg 체중 범위이고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중, 환자의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되는 것이므로 상기 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.
- [0058] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로 이용될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 식품 조성물은 껌류, 비타민 복합제, 건강 보조식품, 특수 영양 보충용 식품, 기능성 음료 등으로 제조될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 식품 조성물에는 유효성분인 홍해삼 추출물이 포함되는 것 이외에, 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 감미제, 사과, 레몬, 감귤 등의 과일이나 녹차잎, 등굴레, 대잎 등의 차류에서 얻어진 풍미제, 카테킨, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤 등의 생리활성 성분, 갈슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물 등의 미네랄 등이 또한 첨가될 수 있으며, 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

**효 과**

- [0061] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 항염증제 조성물과 항암제 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 항염증제 조성물 및 항암제 조성물은 약제학적 조성물 및/또는 식품 조성물로 활용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- [0062] 이하 본 발명은 참조예, 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0063] <참조예> **홍해삼 분말 제조**

- [0064] 제주도 해안가 일대에 자생하고 있는 홍해삼(*Stichopus japonicus*, Orange)을 2007년 3월경에 채집하여 증류수로 2~3회 수세한 뒤 물기를 제거하여 동결건조 후 마쇄기로 분쇄하여 하기 추출용 시료로 사용하였다.

[0065] <실시예> **홍해삼 추출물 및 분획물의 제조**

- [0066] 에탄올 추출물 및 순차적 분획물의 제조는 80% 에탄올(EtOH) 및 분획용 헥산(n-hexane), 디클로로메탄(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 에틸아세테이트(EtOAc) 그리고 부탄올(BuOH)을 사용하여 용매의 극성을 이용한 순차적 추출법을 사용하였다. 즉 분말 건조된 시료에 80% 에탄올로 추출한 후 여과하여 얻어진 추출액을 감압 농축하여 동결건조기로 완전 건조시켰다. 상기 얻어진 에탄올 추출물에 10배량의 증류수와 동량의 헥산을 첨가하여 분획한 후 감압·농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 동일한 방법으로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 그리고 물 층을 분획하여 각각의 순차 분획물을 얻었다.

[0067]

[0068] <실험예> **홍해삼 추출물의 기능성 평가**

- [0069] <실험예 1> **홍해삼 추출물의 항염 활성 평가**

[0070] <실험예 1-1> **세포 및 시약**

- [0071] 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 KCLB(Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 3~4일 간격으로 계대 배양하면서 실험을 수행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* serotype 0111:B4)는 Sigma로부터 구입하여 실험에 사용하였다.
- [0072] <실험예 1-2> 세포 독성 평가(LDH assay)
- [0073] RAW264.7 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)를 DMEM 배지에 상기 추출물 시료(50µg/ml)와 LPS(1µg/ml)를 동시 처리하여 24시간 배양 한 후 배양 배지를 얻어 3,000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. LDH(lactate dehydrogenase) assay 는 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega)를 이용하여 측정했으며, 96 well plate에 원심 분리하여 얻은 배양 배지 50µl와 reconstituted substrate mix를 50µl를 넣고, 실온에서 30분 반응시킨 후 50µl의 stop solution을 넣은 후 microplate reader(Bio-TEK Instruments Inc., Vermont, WI, USA)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(LDH control, 1:5000)의 흡광도 값과 비교하여 세포 독성을 평가하였다.
- [0074] 결과를 <도 1>에 나타내었다. <도 1>의 결과를 참조하여 보면 추출물의 시료는 50µg/ml 농도에 거의 세포 독성을 나타내지 않았음을 알 수 있다.
- [0075] <실험예 1-3> NO 생성 억제 활성 평가
- [0076] RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1.0 \times 10^5$  cell/ml로 조절한 후 48 well plate에 접종하고, 상기 추출물 시료 50µg/ml과 LPS(1µg/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100µl와 Griess시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100µl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였는데 이는 세포배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 측정하였으며 생성된 NO의 양은 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 비교하였다.
- [0077] 결과를 <도 1>에 나타내었다. <도 1>를 참조하여 보면, LPS의 단독 처리군의 경우는 NO가 과량 생성되는 것을 알 수 있으나 상기 추출물의 시료를 동시에 처리한 처리군의 경우는 대체로 NO 생성이 감소함을 알 수 있다. 추출물의 시료 중 특히 핵산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 경우가 NO 생성 억제 효과가 뛰어났다.
- [0078] <실험예 1-4> TNF-α 와 IL-1β 그리고 IL-6 생성 억제 활성 평가
- [0079] TNF-α와 IL-1β 그리고 IL-6 정량은 murine macrophage cell line인 RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5 % CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 50µg/ml로 조제된 시험물질 50µl와 450µl의 LPS(1µg/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 6시간 후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다(이 상층액을 TNF-α 및 IL-6을 정량에 이용).
- [0080] IL-1β의 정량을 위하여 시험 약물을 처리하고 6시간 배양 후 150 mM염화나트륨(NaCl), 50 mM 트리스 염산(Tris HCl)(pH 7.6), 1.0 mM PMSF, 그리고 0.25 % 노니덱(Nonidet) P-40을 포함하는 1 ml의 lysis buffer를 이용하여 4 °C에서 10 분 방치 후, 원심분리(12,000 rpm에서 2 분)하여 상층액을 얻었다. 모든 시료는 정량 전까지 -20 °C 이하에 보관하였다.
- [0081] 염증성 사이토카인의 정량은 mouse ELISA kit(R & D Systems, Inc.)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r<sup>2</sup> 값은 0.99 이상이었다.
- [0082] 결과를 <도 2> 내지 <도 4>에 나타내었다. LPS 단독 처리군에 대해 추출물의 시료를 함께 처리한 경우 대체로 염증성 사이토카인의 생성이 억제됨을 알 수 있다. 추출물의 시료 중 80% 에탄올 추출물, 핵산 분획물, 메틸렌 클로라이드 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 경우가 염증성 사이토카인의 생성 억제 효과가 뛰어났다.
- [0083] <실험예 1-5> Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 생성 평가

- [0084] RAW264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub>향운 기에서 18시간 전 배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 50 $\mu$ g/ml 추출물 시료 50 $\mu$ l와 450 $\mu$ l의 LPS(1 $\mu$ g/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전배양과 동일 조건에서 배양하였다. 24시간 후 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. PGE<sub>2</sub>의 측정은 PGE<sub>2</sub> ELISA kit(R & D Systems, Inc.)를 이용하여 정량하였으며 standard 에 대한 표준곡선의 r<sup>2</sup>값은 0.99 이상이었다.
- [0085] 결과를 <도 5>에 나타내었다. <도 5>는 추출물의 시료가 대체로 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제함을 보여준다. 추출물의 시료 중 80% 에탄올 추출물, 헥산 분획물, 메틸렌클로라이드 분획물 및 에틸아세테이트 분획물의 경우가 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제 효과가 뛰어났다.
- [0086] <실험예 1-6> iNOS 및 COX 발현 억제 활성 평가
- [0087] RAW264.7 세포( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)를 18 시간 전 배양하고 상기 추출물 시료 (50 $\mu$ g/)와 LPS(1 $\mu$ g/)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 TRI-reagent(MRC)를 이용하여 total RNA를 분리하였다.
- [0088] 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심 분리(15000 rpm, 15분)시켰다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심 분리(12000 rpm, 8분)시켜 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 에탄올을 첨가하여 원심 분리(10000 rpm, 5 분)시킨 후, 건조시켜 DEPC가 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, 260 nm에서의 흡광도와 280 nm에서의 흡광도 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free 조건하에서 이루어졌다.
- [0089] 1 $\mu$ g의 total RNA를 oligo(dT)<sub>18</sub> primer, dNTP(0.5  $\mu$ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase(2 U)로 70 $^{\circ}$ C 5분, 25 $^{\circ}$ C 5분, 37 $^{\circ}$ C 60분, 그리고 70 $^{\circ}$ C에서 10분 heating 시킴으로서 반응을 증시시켰다. Polymerase chain reaction(PCR)은 합성된 cDNA로부터 각각의 primer을 증폭시키기 위하여 2  $\mu$ l cDNA, 4  $\mu$ M의 5' 과 3' primer(서열은 아래의 <표 1> 참조), 10x buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 250  $\mu$ M dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit Taq polymerase(Promega, USA)를 섞고 distilled water 로 전체를 25  $\mu$ l로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C/20 초, 55~62 $^{\circ}$ C/30 초, 72 $^{\circ}$ C/40 초, 30 cycle이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

**표 1**

[0090] 실험에 사용된 프라이머 서열

구분	F/R	프라이머 서열	서열 ID
iNOS	F	5`-CCCTTCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3`	1
	R	5`-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3`	2
COX-2	F	5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'	3
	R	5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'	4
$\beta$ -Actin	F	5'-GTGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	5
	R	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	6

- [0091] 결과를 <도 6>에 나타내었다. <도 6>의 결과는 상기 각 추출물의 시료가 대체로 유전자 수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함을 보여준다.
- [0092] 이처럼 유전자 수준에서 상기 추출물의 시료가 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함을 확인하고 단백질 수준에서도 상기 추출물의 시료가 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하는가를 웨스턴블롯을 통해 확인하였다.
- [0093] 상기에서 세포배양이 끝난 후 세포를 수집하여 2 ~ 3 회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척 후 1 ml의 lysis buffer을 첨가, 30 분~1 시간 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20 분간 원심하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(Bovine serum albumin)을 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 30 ~ 50  $\mu$ g의 lysate를 8 ~ 12 % mini gel SDS-PAGE(Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)로 변

성 분리하여, 이를 PVDF membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 Membrane의 blocking은 5 % skim milk가 함유된 TTBS (TBS + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. iNOS의 생성 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS (1: 1000) (Santa-Cruz)을 COX-2의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 anti-mouse COX-2 (1: 1000) (Cell Signaling)을 TTBS 용액에서 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3 회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (Horse Radish Peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Co.)를 1 : 5000으로 희석하여 상온에서 30 분간 반응시킨 후, TTBS로 3 회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Co.)과 1 ~ 3분 간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.

[0094] 결과를 <도 7>에 나타내었다. <도 7>의 결과는 <도 6>의 결과와 비슷하게 상기 추출물의 시료가 대체로 단백질 수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함을 보여준다.

[0095] <실험예 2> 홍해삼 추출물의 항암 활성 평가

[0096] 급성 전골수성 백혈병 환자에서 유래한 세포주인 HL-60(혈액암) 및 고형암 세포주인 HT-29(대장암)를 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin(GIBCO, Grand Island, NY, USA)과 10%의 fetal bovine serum(FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA)이 함유된 RPMI 1640 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한 번씩 시행하였다.

[0097] 상기 추출물 시료의 사람 암세포에 대한 증식억제 효과는 MTT assay법(Carmichael 등, 1987)을 이용하여 알아보았다. 각 세포(2.0~5.0×10<sup>4</sup>/mL)를 96 well plate의 각 well에 넣고, 상기 각 추출물의 시료(100µg/ml)를 첨가하고 3 일간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 µg을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA) 150 µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader(Bio-TEK instrumenis. Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군(추출물의 시료를 첨가하지 아니한 경우)의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식억제 정도를 조사하였다.

[0098] 결과를 <도 8>에 나타내었다. <도 8>를 참조하여 보면, 상기 추출물의 시료는 혈액암과 대장암 세포주에 대해서 모두 그 증식 억제 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

[0099] 통계분석

[0100] 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% 및 99%(p<0.05, p<0.01)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

### **도면의 간단한 설명**

[0101] 도 1은 홍해삼 추출물이 50µg/ml 농도에 세포 독성을 나타내지 않음과 NO 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

[0102] 도 2 내지 도 4는 홍해삼 추출물이 염증성 사이토카인의 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

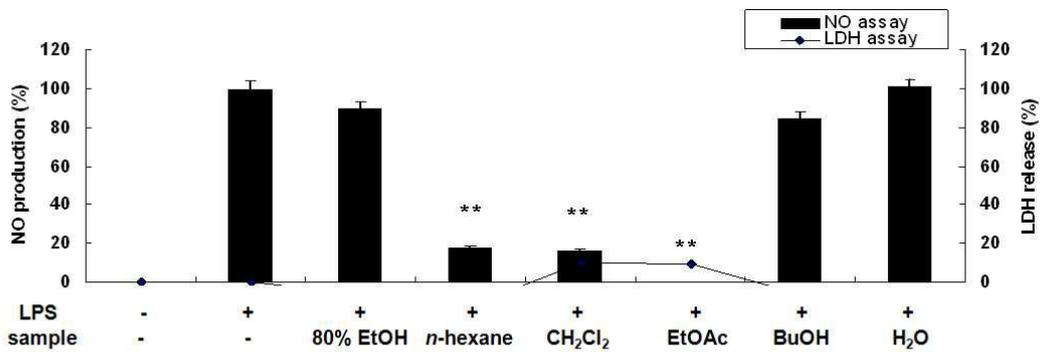
[0103] 도 5는 홍해삼 추출물이 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제함을 보여주는 결과이다.

[0104] 도 6 및 도 7은 홍해삼 추출물이 유전자 수준 및 단백질 수준에서 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제함을 보여주는 결과이다.

[0105] 도 8은 홍해삼 추출물이 혈액암 및 대장암 세포주의 증식 억제 효과를 보여주는 결과이다.

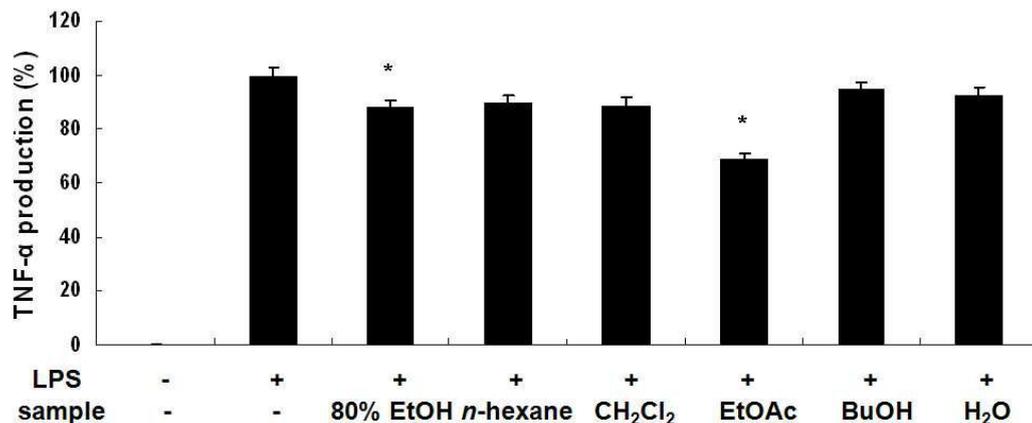
도면

도면1



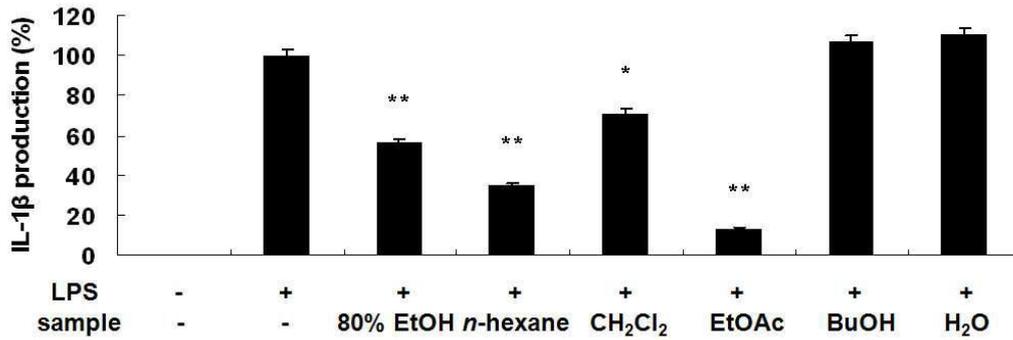
The effect 80% EtOH and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on cell viability and nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The production of nitric oxide was assayed in the culture medium of cells stimulated with LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions of *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Cytotoxicity was determined using the LDH method. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*, $P < 0.05$ ; \*\*, $P < 0.01$

도면2



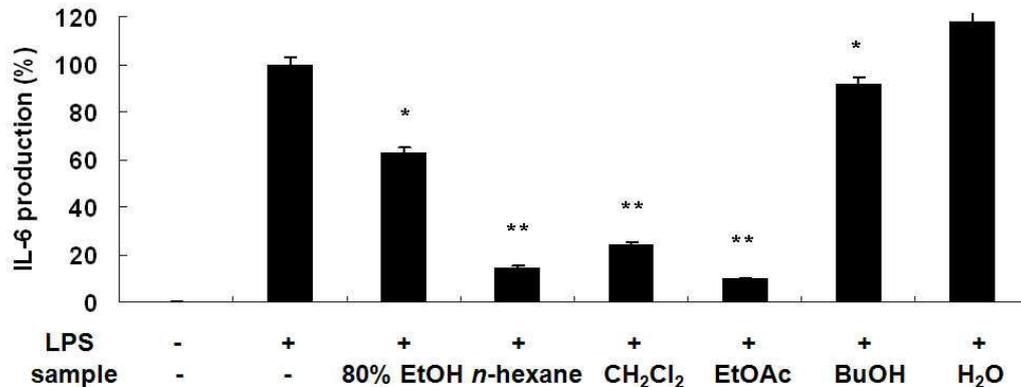
Inhibitory effect of the 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 cells. Cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated by LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions from *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Supernatants were collected, and the TNF- $\alpha$  concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*, $P < 0.05$

도면3



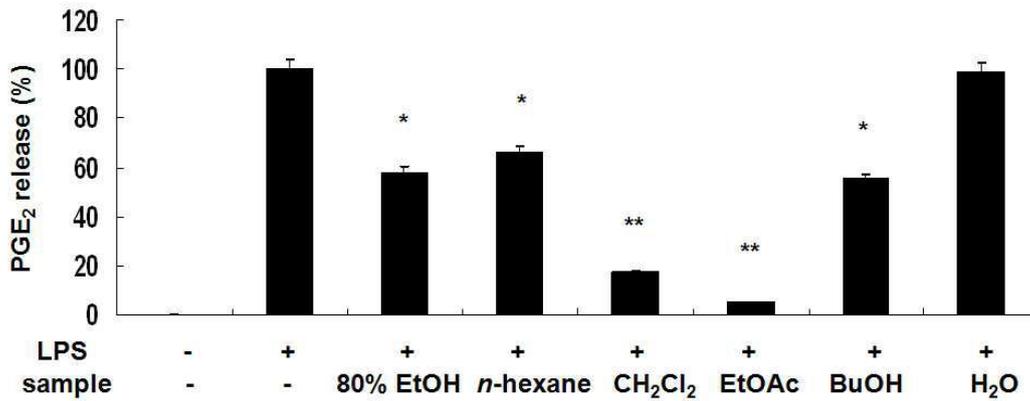
Inhibitory effect of the 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on IL-1β production in RAW 264.7 cells. Cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated by LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions from *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Supernatants were collected, and the IL-1β concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

도면4



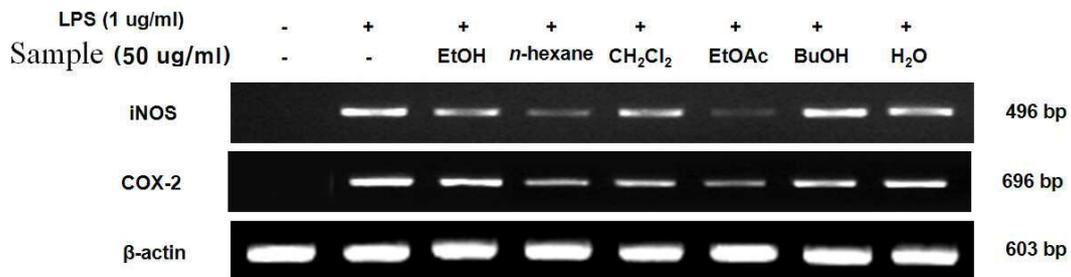
Inhibitory effect of the 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on IL-6 production in RAW 264.7 cells. Cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated by LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions from *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Supernatants were collected, and the IL-6 concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

도면5



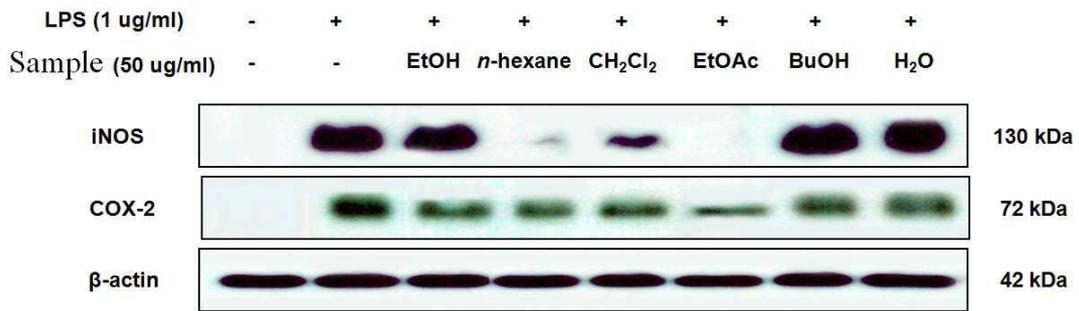
**Inhibitory effects of the 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells.** Cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated by LPS (1 ug/ml) for 24 h in the presence of the 80% EtOH extract and the solvent fractions from *Stichopus japonicus* (50 ug/ml). Supernatants were collected, and the PGE<sub>2</sub> concentration in the supernatants was determined by ELISA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate experiments. \*,  $P < 0.05$

도면6



**Inhibitory effect of 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the iNOS and COX-2 mRNA expression were determined from 24 hr culture of cells stimulated with LPS (1 ug/ml) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* (50 ug/ml).

도면7



Inhibitory effect of 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* on the protein level of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) were pre-incubated for 18 hr, and the cells were stimulated with LPS (1 ug/ml) in the presence of 80% EtOH extract and solvent fractions of *Stichopus japonicus* (50 ug/ml) for 24 hr. iNOS and COX-2 protein levels were determined using immunoblotting method.

도면8

