



등록특허 10-2990389



(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년07월14일
(11) 등록번호 10-2990389
(24) 등록일자 2026년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/64 (2015.01) A23K 10/20 (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61P 37/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/64 (2013.01)
A23K 10/20 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0169351
(22) 출원일자 2023년11월29일
심사청구일자 2023년11월29일
(65) 공개번호 10-2025-0082121
(43) 공개일자 2025년06월09일
(56) 선행기술조사문헌
CN110013489 A*
Sang-Deok Ji et al., Journal of Asia-Pacific
Entomology, 2016, vol. 19, pp.1027-1033
JP6019505 B2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김성렬
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
김기영
전라북도 완주군 이서면 농생명로 166
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 5 항

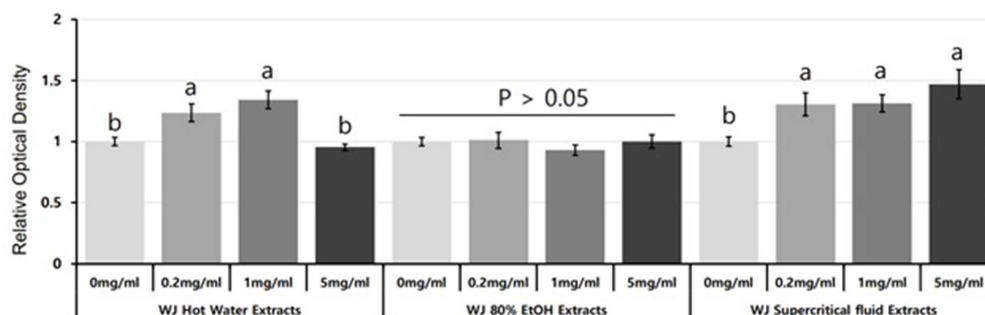
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 대식세포의 증식 및 병원체 포식 능력을 증진시키는 홍잠 추출물을 포함한 조성물

(57) 요약

본 발명은 대식세포의 증식 및 병원체 포식 능력을 증진시키는 홍잠 (弘蠶, Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 추출물을 포함한 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 국산 누에 (silkworm, *Bombyx mori* L.) 숙잠을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 면역증강용 조성물의 유효성분으로서의 홍잠 또는 홍잠 추출물은 대식 세포의 증식 및 활성을 나타내고 미토콘드리아의 기능을 증진시켜서, 세포 내의 ATP의 양을 진시켜 주고, 면역관련 유전자들의 발현을 조절하므로 면역증강용 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 홍잠 또는 홍잠 추출물은 식용으로 사용되어 독성을 나타내지 않으며 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용이 가능한 형태로 조제할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 제약 산업 및 식품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)

A61P 37/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

(72) 발명자

강상국

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

김성완

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

이지혜

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

박종우

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

고영호

서울시 영등포구 버드나루로 55 도현연구센터
1005C

김윤희

서울시 영등포구 버드나루로 55 도현연구센터
1005E

반 트린 엔 빈

서울시 영등포구 버드나루로 55, 1005E

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395077685

과제번호 RS-2022-RD010366

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 농업정책지원기술개발사업

연구과제명 홍삼의 기능성분 구명 및 ICT 기반 안정생산 체계 구축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2025.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

백옥잠 유래 홍잠 초임계 CO₂ 추출물을 유효성분으로 함유하는, 면역증강 및 항염용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것을 특징으로 하는, 면역증강 및 항염용 조성물.

청구항 5

백옥잠 유래 홍잠 초임계 CO₂ 추출물을 유효성분으로 함유하는, 면역증강 및 항염용 건강기능식품.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 9

백옥잠 유래 홍잠 초임계 CO₂ 추출물을 유효성분으로 함유하는, 면역증강 및 항염용 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 대식세포의 증식 및 병원체 포식 능력을 증진시키는 홍잠 (弘蠶, Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 추출물을 포함한 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 국산 누에 (silkworm, Bombyx mori L.) 숙잠을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 누에(Bombyx mori L.)는 알, 누에, 번데기, 나방의 4단계를 거치는 완전 탈바꿈 곤충으로서, 통상 누에라 함은 "누에나방과(Bombycidae)에 속하는 누에나방의 유충"을 말한다. 누에 유충은 평생 뽕잎을 먹으며 빠르게 성장하며 동시에 대량 사육이 가능하여 예로부터 잠사곤충, 식용곤충, 약용곤충으로 사용되어 왔다. 최근에는 자세한 유전정보가 알려지면서, 다양한 유전 실험과 생리 실험에 사용되고 있다.
- [0004] 누에 유충 및 누에 번데기는 단백질, 유리 아미노산, 단일불포화지방산 또는 다가불포화지방산, 미네랄 및 섬유질 등이 풍부하여 영양학적으로 우수하다고 알려져 있으며, 국내에서는 이미 식품원재료로 등록되어 있다.

또한, 우리나라 동의보감, 본초강목 등의 고서에서는 누에 효능이 기록되어 있으며, 민간에서는 영양실조, 폐결핵, 풍사, 익징, 중풍 등에 사용되어 왔다. 최근에는 항당뇨 활성 성분(deoxynojirimycin)이 보고되면서 기능성 식품 소재로도 각광받고 있으며, 생명과학 기술의 발달로 인해 화장품 및 의료용 소재로도 개발되고 있다.

[0005] 현재까지 국산 누에 품종은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 백옥잠, 주황잠, 연녹잠, 골든실크 등 250여종이 알려져 있으며, 잠사산업 뿐만 아니라, 관광, 체험, 화장품소재 및 약용 목적으로 지속적으로 새로운 품종들이 개발되고 있는 실정이다.

[0006] 누에의 생활사를 보면, 누에의 경우 알에서 5령을 거쳐 성장하며 5령 말까지의 유충기간 일수는 품종이나 환경에 따라 일정하지 않으나, 보통 20일 내외로 알려져 있다. 령은 잠과 잠 사이로 나누는 용어이며, 5령 누에는 4번 자고 일어난 누에를 말한다. 누에의 1령 누에를 개미누에라 부르는데 처음 크기는 2mm 이하로 매우 작으나, 5령이 되면 약 8cm 정도가 되어 개미누에의 약 8,000~10,000배의 크기로 성장하게 된다. 특히 누에는 5령 때 가장 많은 뽕잎을 먹으며 빠르게 성장하게 되는데, 통상 5령 3일 이후부터는 고치를 짓기 위해 실샘이 발달하며, 5령 7일이 지나면 더 이상 뽕잎을 먹지 않고 고치를 짓게 된다. 이때의 누에가 유충으로는 가장 큰 상태가 되며 이를 "숙잠"이라고 한다.

[0007] 고치를 짓기 직전의 누에인 숙잠은 몸속에 견사단백질이 가득 차서 맑고 투명하게 보이는 누에 상태이며, 숙잠내 견사 단백질은 건조시 매우 딱딱한 구조로 변화되어 씹을수도 없으며, 만약 무리하게 씹다가는 치아가 손상되는 섭취 불가능한 상태로 존재한다. 따라서, 기존에는 5령 3일 이전의 누에 만을 식용 누에로 사용하였다. 그러나, 5령 3일보다 2배 이상 크기가 크며 영양성도 우수한 숙잠을 식용으로 제조하기 위해, 농촌진흥청에서 다년간 연구 끝에 숙잠을 식용할 수 있도록 하였으며, 그 방법은 누에를 빠르게 찢어 익힌 후 이를 동결건조하여 소화흡수가 용이한 분말 상태로 제조하는 방법이며, 이렇게 제조된 누에를 "홍잠(弘蠶)"이라 명명하였다.

[0008] 따라서 홍잠이란 명칭은 5령 7일 이 후부터 견사선을 분비하기 전의 숙잠 누에를 수증기로 찢 다음 동결건조한 '찢어 익히고 말린 숙잠'을 말하며, 2017년 농촌진흥청에서 대국민 공모를 통해 결정된 이름으로 '넓고 다양한 기능성으로 인간을 이롭게 하는 누에'라는 의미를 가지고 있다.

[0009] 현재까지 전임상 실험과 임상 실험을 수행하여 밝혀진 누에 내지 홍잠의 건강 기능 증진 효과는 기억력 개선 효과, 파킨슨병 발병 예방 및 치료 효과, 근감소증 예방 및 치료 효과, 위장관 보호 효과, 간 기능 증진 효과, 간암 전이 억제 효과, 간의 알콜 분해 증진 효과, 피부 미백 효과 및 발모 촉진 효과 등이 알려져 있으나, 홍잠의 면역력 증진 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Ji S. D. et al, 2019. J. Asia-Pacific Entomology 22: 969-974; 홍잠의 영양성분 분석
(비특허문헌 0002) 이현태, 2019. Kor. J. Seric. Sci. 55. 40-43; 홍잠의 건강 기능성

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 홍잠 (Steamed/freeze-dried Mature Silkworm) 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 등을 포함한 모든 국산 누에 품종으로 이

루어진 균으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.

- [0016] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0017] 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것이 바람직하다.
- [0018] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강기능식품을 제공한다.
- [0019] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 등을 포함한 모든 국산 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.
- [0020] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0021] 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것이 바람직하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명의 면역증강용 약학적 조성물 및 건강기능식품의 유효성분으로서의 홍잠 또는 홍잠 추출물은 대식 세포의 증식 및 활성을 나타내므로 면역증강용 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 상기 홍잠 또는 홍잠 추출물은 식용으로 사용되어 독성을 나타내지 않으며 추출액, 분말, 환, 정 등의 다양한 형태로 가공되어 상시 복용이 가능한 형태로 조제할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 제약 산업 및 식품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 3가지 추출 방법에 따른 4품종의 누에로 제조된 홍잠 분말의 추출 효율을 나타낸 것이다.
- 도 2는 3가지 추출 방법에 따른 다양한 농도의 백옥잠 추출물의 대식세포 RAW264.7 세포에 대한 증식 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 3가지 추출 방법에 따른 다양한 농도의 백옥잠 추출물의 RAW264.7 세포에서 NO 생성 억제 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 LPS와 HJ-SCE를 단독 또는 동시에 처리한 BMDM의 증식 효과를 나타낸다.
- 도 5는 LPS와 HJ-SCE를 단독 또는 동시에 처리한 RAW264.7 세포의 증식 효과를 나타낸다.
- 도 6은 LPS와 HJ-SCE를 단독 또는 동시에 처리한 BMDM의 NO 생성량 변화를 나타낸다.
- 도 7은 LPS와 HJ-SCE를 단독 또는 동시에 처리한 RAW264.7 세포의 NO 생성량의 변화를 나타낸다.
- 도 8은 HJ-SCE에 의한 BMDM의 Phagocytosis activity 증진 효과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 HJ-SCE에 의한 RAW264.7 세포의 Phagocytosis activity 증진 효과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 다양한 농도의 HJ-SCE로 배양된 BMDM의 50 nm 크기의 latex particle에 대한 pinocytosis 활성 증진 효과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 다양한 농도의 HJ-SCE로 배양된 RAW264.7 세포의 50 nm 크기의 latex particle에 대한 pinocytosis 활성 증진 효과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 다양한 농도의 LPS와 HJ-SCE를 처리한 BMDM의 neutral red uptake의 양이 농도 의존적으로 증가함을 나타낸 것이다.
- 도 13은 다양한 농도의 LPS와 HJ-SCE를 처리한 RAW264.7 세포의 neutral red uptake의 양이 농도 의존적으로 증가함을 나타낸 것이다.
- 도 14는 100 ng/ml 또는 10 ng/ml의 LPS와 여러 농도의 HJ-SCE를 혼합 처리한 RAW264.7 세포에서의 neutral red uptake의 양이 농도 의존적으로 증가함을 나타낸 것이다.

도 15는 RAW264.7 세포의 미토콘드리아 활성이 홍잠 추출물에 의하여 증진됨을 보여주는 결과이다.

도 16은 BMDM 대식세포의 미토콘드리아 활성이 홍잠 추출물에 의하여 증진됨을 보여주는 결과이다.

도 17은 RAW264.7 세포와 BMDM 대식 세포에서 홍잠 추출물이 ATP의 양을 증진시켜줌을 보여주는 결과이다.

도 18은 홍잠 추출물의 농도에 따른 CR3, Dectin-1, LY96 및 TLR-4 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 결과이다.

도 19는 홍잠 추출물의 농도에 따른 TNF-alpha, IL-18, IL-6, IFN-gamma 및 NF-kB 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 결과이다.

도 20은 홍잠 추출물의 농도에 따른 CCL3, MCP-1, 및 MIP-2 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 결과이다.

도 21은 홍잠 추출물의 농도에 따른 COX-2, 및 iNOS 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 결과이다.

도 22는 홍잠 추출물의 농도에 따른 PTGIS 및 MKP-1 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명의 발명자들은 홍잠의 면역증강 효능을 검정하기 위하여, 일정방법으로 재배된 4종 품종의 누에(숙잠)를 수증기로 찌고 동결건조하여 홍잠 분말을 준비하고, 이를 대상으로 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물을 제조한 후 이들의 면역증강 활성을 평가하였다. 상기 면역증강 활성을 갖는 홍잠 추출물은 면역증강용 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 활용될 수 있다.
- [0029] 구체적으로, 본 발명자들은 민간에서 당뇨, 혈관계 및 순환계, 소화계, 신진대사계 등의 다양한 질환에 효과가 있다고 알려진 누에를 이용하여 면역증강용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 개발하기 위하여, 유충 중 가장 크기가 크고 영양성이 우수한 숙잠을 홍잠으로 제조하고, 이를 대상으로 다양한 추출물을 조제하여, 이들의 면역증강 활성을 대식 세포를 통하여 평가한 결과, 우수한 면역증강 활성이 있음을 확인하였다.
- [0030] 따라서, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.
- [0032] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것이 바람직하다.
- [0034] 또한, 본 발명은 홍잠 또는 홍잠 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 건강기능식품을 제공한다.
- [0035] 상기 홍잠은 도담누에, 금옥잠, 금강잠, 대백잠, 장춘잠, 부농잠, 은백잠, 다광잠, 대성잠, 세광잠, 삼광잠, 양추잠, 용강잠, 부농잠, 연녹잠, 백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크로 이루어지는 군으로부터 선택되는 누에 품종 기원인 것이 바람직하다.
- [0036] 상기 홍잠 추출물은 열수 추출물, 에탄올 추출물 및 초임계 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 면역증강은 대식 세포의 증식 또는 활성화에 의한 것이 바람직하다.
- [0038] 이하에서는, 본 발명의 홍잠 추출물의 제조 방법 및 효능 실험 등을 보다 구체적으로 설명한다.
- [0039] 본 발명의 발명자들은 5령 7일 사육한 4종 누에 유충(백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크 품종)을 회수하고, 상기 4종 누에 유충을 수증기로 찌고 동결건조하여 얻은 홍잠(Steamed/freeze-dried Mature Silkworm cultured for 5-instar 7-days) 분말로부터 다양한 추출법을 통해 추출물을 조제하고, 상기 추출물의 면역 활성을 평가하였다.
- [0040] 본 발명의 조성물에 포함되는 "홍잠 추출물"은 5령 7일 사육한 4종의 누에 유충을 수확한 후 건조하고, 이를

100℃의 수증기로 15~30분 동안 찌고, 이후 동결건조하여 분말로 제조한 후, 다음의 다양한 추출법에 따라 제조하였다.

- [0041] 구체적으로, 열수 추출법은 홍잠 분말에 약 10배의 증류수를 첨가하여 고온 고압 멸균기를 이용하여 121℃에서 1시간 동안 추출을 진행한다. 추출된 용액은 원심분리를 하여 상등액을 확보한 후, 동결 건조시킨다.
- [0042] 또한, 80% 에탄올 추출법은 홍잠 분말에 약 10배의 80% 에탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출을 진행한다. 0.45mm glass filter를 장착한 vaccum funnel을 이용하여 추출액을 분말과 분리를 한 후, vaccum evaporator를 이용하여 수분을 제거하여 추출액을 제조한다.
- [0043] 또한, 초임계 추출물(Supercritical fluid extracts)은 초임계 추출기(Supercritical fluid extractor; Suflux 1L SC-CO2 Extraction system Model: ISA-SCCO-S-1000-500, ILSHIN autoclave, DaeJeon Korea)를 이용하여 추출한다. 추출 온도는 reservoir 22~25℃, extractor 58~62℃, separator 39~41℃, heater 160℃, heater 260℃ 일 수 있다. 추출 압력은 reservoir 50~52 bar, extractor 345~355 bar, separator 49~51 bar일 수 있으며, 용매가 흐르는 속도는 0.02~0.04 L/Min일 수 있다. 추출시간은 100g의 분말당 1.5시간을 진행하며, 추출 후에 남아있는 홍잠 분말은 완전히 건조된 상태로 정유 성분이 제거되었음을 확인한다.
- [0044] 본 발명의 상기 홍잠 추출물은 대식 세포와 같은 면역 세포의 증식 및 활성화에 농도의존적으로 효과를 나타낸다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 유효성분은 면역증강용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 유효 성분을 포함하는 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0047] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.
- [0048] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0049] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0050] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 유효 성분은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0052] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 유효성분의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라

질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 5,000mg, 바람직하게는 100 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0053] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [0055] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0056] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 면역증강에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 유효성분을 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 유효성분은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 건강기능식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0059] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.
- [0060] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시리히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 유효성분 100중량부 당 0.01 내지 약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0061] 또한, 본 발명은 홍삼 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강용 사료 조성물을 제공한다.
- [0062] 상기 홍삼 추출물은 상기 약학 조성물이나 건강기능식품의 경우와 동일하게 준비될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 홍삼 추출물은 면역 기능의 향상으로 인하여 전체적인 면역 증가 효과를 나타내므로 동물이나 가축의 면역 기능 촉진제로서 사료 조성물에 포함될 수 있다.
- [0064] 구체적으로 본 발명에 따른 홍삼 또는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에서 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하며, 바람직하게는 농후사료, 조사료 또는 특수사료가 포함될 수 있다.
- [0065] 농후사료에는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자 열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분, 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류 등이 있다.
- [0066] 조사료에는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초 사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초,

목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎 등이 있다.

[0067] 특수사료에는 폐각, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료 원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제 등이 있다.

[0068] 본 발명에 따른 사료 조성물은 면역 기능의 향상으로 인하여 전체적인 면역 증강을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 상기 개체는 동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류 (예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스 (cynomolgus) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다. 상기 개체는 축산용 동물 (예를 들면, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완동물 (예를 들면, 개 또는 고양이)이다.

[0069] 본 발명에 따른 사료 조성물의 복용량은 동물의 종(species), 크기(size), 무게(weight), 나이(age)와 같은 다수의 요인들에 좌우될 것이다. 원칙적으로, 전형적인 복용량은 동물/일 당 0.001 내지 10 g의 범위일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예의 범위로 한정되는 것은 아니다

[실시예]

[0073] 1. 실험 방법

[0074] 1.1. 홍잠 제조 방법

[0075] 국립농업과학원 잠실에서 누에를 숙잠까지 뿔나무 잎을 가지고 사육을 하였다. 고치를 분비하기 바로 전의 숙잠을 수확을 하고 바로 수돗물에 담가서 세척을 하면서 마취가 되게 하였다. 세척 과정에서 마취된 누에를 바로 압력이 걸리지 않는 찜기(금성)에서 130분 동안 수증기로 찜다. 익힌 숙잠은 홍잠이라고 불리고, 보관의 편의를 위하여 급속 냉동하여 보관을 하거나, 동결 건조기로 수분을 제거한 후, 천연돌 롤러밀로 분말화하였다.

[0076] 1.2. 홍잠 추출액 제조 방법

[0077] 4가지 다른 색의 고치를 만드는 품종 누에로 제조된 홍잠(백옥잠, 주황잠, 대황잠 및 골든실크)의 기능성을 확인하기 위하여, 홍잠 분말에서 기능성 물질을 확보하기 위하여 열수 추출법과 80% 에탄올 추출법과 초임계 추출법을 이용하였다.

[0078] 열수 추출법은 10g의 홍잠 분말에 증류수를 첨가하여 100g으로 만든 후, 고온 고압 멸균기를 이용하여 121℃에서 1시간 동안 추출을 진행하였다. 추출된 용액은 원심분리를 하여 상등액을 확보한 후, 동결 건조를 완료하였다. 최초의 중량과 건조물의 중량을 비교하여 추출효율을 계산하였다.

[0079] 80% 에탄올 추출법은 10g의 홍잠 분말에 80% 에탄올을 첨가하여 100g으로 만든 후, 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출을 진행하였다. 0.45mm glass filter를 장착한 vaccum funnel을 이용하여 추출액을 분말과 분리를 한 후, vaccum evaporator를 이용하여 수분을 제거하여 추출액을 제조하였다. 최종 수분이 제거된 추출액의 무게를 측정한 후, 최초 분말의 무게를 비교하여 추출효율을 계산하였다.

[0080] 초임계 추출물(Supercritical fluid extracts)은 초임계 추출기(Supercritical fluid extractor; Suflux 1L SC-CO2 Extraction system Model: ISA-SCCO-S-1000-500, ILSHIN autoclave, DaeJeon Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출 온도는 reservoir 22~25℃, extractor 58~62℃, separator 39~41℃, heater 160℃, heater 260℃였다. 추출 압력은 Reservoir 50~52 bar, extractor 345~355 bar, separator 49~51 bar였고, 용매가 흐르는 속도는 0.02~0.04 L/Min이었다. 추출시간은 100g의 분말 당 1.5시간을 진행하였다. 추출 후에 남아있는 홍잠 분말은 완전히 건조된 상태로 정유 성분이 제거되었음을 확인하였다.

[0081] 1.3. macrophages 배양 방법

[0082] 다양한 홍잠 추출물들의 면역력 증진 효과를 비교 연구하기 위하여 쥐 macrophage 세포 주인 RAW264.7 cell과 Bone marrow-derived macrophage를 이용하여 연구를 수행하였다. RAW264.7 cell은 Korean Cell bank에서 분양 받은 후, 10% FBS와 Penicilin/Streptomycin을 포함한 DMEM high-glucose complete media를 이용하여 37℃, 5% CO2 조건에서 배양하였다. 모든 실험은 동일한 passage의 세포들을 이용하여 진행하였다.

[0083] Bone marrow-derived macrophage(BMDM)는 8~10주된 C57BL/6J 쥐의 뒷다리 femur와 tibia에서 haematopoietic

stem cells를 분리한 후, RBC lysis buffer로 monocyte만을 남겨 둔 후에, 1mg Macrophage colony-stimulating factor(MCSF)/ml과 10% FBS와 1 x Penicilin/Streptomycin을 포함한 complete DMEM을 이용하여 배양하였다. 배양시작 3일 후에 새로운 배지를 추가를 하면 7일 후에는 대부분의 세포들이 BMDM으로 분화되었다. 분화된 세포를 Trypsin-EDTA를 이용하여 분리를 한 후, 다양한 연구에 사용하였다.

[0084] 1.4. 홍잠 추출물의 세포 증식 효과 비교

[0085] 홍잠 추출물의 대식세포 세포주 증식 효과를 연구하기 위하여 RAW264.7 세포 주 또는 BMDM를 104 cells/ml로 96 well plate에 세포를 분주하고 24시간 동안 배양 후, 다양한 농도의 Lipopolysaccharide (LSP)와 홍잠 추출물을 단독 또는 혼합하여 처리하였다. 48시간 동안 배양된 RAW264.7 세포들에 대하여, cell proliferation assay를 BIOMAX사의 Quanti-Max™ WST-8 Cell Viability Assay Kit를 이용하여 측정하였다. 세포 배양액 총량의 1/10에 해당하는 WST-8 solution을 추가한 후, 1시간 동안 37℃, 5% CO2 조건에서 유지하였다. 세포 증식력을 계산하기 위하여 450 nm와 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 600 nm에서의 흡광도는 각각 처리군의 탁도를 나타내었다. 450 nm의 흡광도에서 600 nm의 흡광도를 빼면 실제 세포 증식 효과를 계산할 수 있는 보정된 흡광도였다.

[0086] 1.5. 홍잠 추출물의 Nitric oxide 생성 억제 효과

[0087] RAW264.7 세포주와 BMDM를 104 cells/ml로 96 well plate에 세포를 분주하고 24시간 동안 배양 후, 다양한 농도의 Lipopolysaccharide (LSP)와 홍잠 추출물을 각각 또는 혼합하여 처리하였다. 48시간 동안 배양된 세포들이 생성한 NO의 양을 측정하기 위하여 NO2-와 NO3-의 양을 동시에 측정할 수 있는 PicoSens™ Total Nitric Oxide Assay Kit (BIOMAX)를 이용하였다.

[0088] 1.6. 홍잠 추출물에 의한 대식세포 phagocytotic activity 증진 효과

[0089] RAW264.7 세포주와 BMDM을 이용하여 HJ-SCE의 phagocytotic activity 증진 효과에 대한 연구를 진행하였다. 1 x 105 개의 RAW264.7 세포와 BMDM를 8 well chamber slide의 하나의 well에 접종한 후, 48시간 동안 다양한 농도의 홍잠 추출물을 포함한 배지를 이용하여 배양하였다. DPBS로 1/100으로 희석된 FITC conjugated E. coli (K-12 strain) BioParticle (ThermoFisher)를 접종한 후, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 4% Paraformaldehyde (0.1M PB)로 상온에서 20분간 고정을 한 후, PBS로 10분 간격으로 4회 세척을 진행하여 phagocytosis가 일어나지 않은 FITC-conjugated E. coli BioParticle을 제거한 후, Vectashield를 이용하여 slide를 제작하였다. Fluorescence image용 digital camera를 장착한 Olympus BH2 fluorescence microscope를 이용하여 대식세포들의 사진을 촬영한 후, phagocytosis가 일어난 FITC-conjugated E. coli BioParticle의 수를 확인하였다.

[0090] 1.7. 홍잠 추출물에 의한 대식세포 pinocytotic activity 증진 효과

[0091] RAW264.7 세포주와 BMDM을 이용하여 홍잠 추출물의 virus와 같이 작은 particle들에 대한 pinocytotic activity 증진 효과에 대한 연구를 진행하였다. 1x105 개의 RAW264.7 세포와 BMDM를 8 well chamber slide의 하나의 well에 접종을 한 후, 48시간 동안 다양한 농도의 WJ-SCE를 포함한 배지를 이용하여 배양하였다. DPBS로 1/100으로 희석된 Fluoresbrite carboxylate microspheres (50 nm particle size, 2.5% aqueous solution, 3.64x1014 particles/ml, Polysciences, <https://www.polysciences.com/default/fluoresbrite-yo-carboxylate-microspheres-005-m>)를 접종한 후, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 4% Paraformaldehyde (0.1M PB)로 상온에서 20분간 고정을 한 후, PBS로 10분 간격으로 4회 세척을 진행하여 pinocytosis가 일어나지 않은 Fluoresbrite carboxylate microspheres를 제거한 후, Vectashield를 이용하여 slide를 제작하였다. Fluorescence image용 digital camera를 장착한 Olympus BH2 fluorescence microscope를 이용하여 대식세포들의 사진을 촬영한 후, 대식세포에서 pinocytotic vacuoles의 존재 여부와 수를 확인하였다.

[0092] RAW264.7 세포주와 BMDM를 이용하여 홍잠 추출물이 용매에 용해되어 있는 작은 분자량의 용질들에 대한 pinocytotic activity 증진 효과에 대한 연구를 neutral red uptake assay로 진행하였다. RAW264.7 세포주와 BMDM 세포를 1x106 cells/ml로 96 well plate에 접종한 후, 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도의 LPS와 홍잠 추출물을 단독 또는 혼합하여 세포에 처리하고 동시에 Neutral red의 최종 농도가 0.0075%가 되게 첨가를 한 후, 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후, 남아있는 Neutral red를 PBS로 두 번 세척하였다. 0.1 ml의 Cell lysate buffer (ethanol과 0.01% acetic acid의 비율 = 1:1)를 넣어준 후, 상온에서 밤새 보관을 한 후, 540 nm와 600 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 540 nm의 흡광도에서 600 nm의 흡광도를 제거한 수치가 보정된 pinocytosis activity이다.

[0093] 1.8. **홍잠 추출물에 의한 대식세포 마이토콘드리아 기능 증진 효과**

[0094] 대식세포의 마이토콘드리아 컴플렉스 1 ~ 4 (MitoCom I~IV)의 활성을 측정하기 위하여 위에 언급된 방법으로 배양된 RAW264.7 세포 주와 BMDM 세포를 이용하였다. 마이토콘드리아 추출 완충액(0.25 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, and 1% BSA, pH 7.4)을 이용하여 세포를 파괴한 후, 4℃에서 150×g로 5 분간 원심분리하여 상등액을 확보한 후, 다시 900×g에서 원심분리하여 마이토콘드리아 침전물을 확보하였다. 마이토콘드리아 침전물은 200 μ l 마이토콘드리아 추출 완충액과 혼합해준 후, 2개로 나누었다. 하나의 튜브에는 MitoCom I~III을 측정하기 위하여 155 μ l를 넣어 주고, 45 μ l가 있는 다른 튜브에는 MitoCom IV를 측정하기 위하여 5 μ l의 10 mM n-D- β -D maltoside를 첨가해 주었다. 모든 MitoCom I~IV의 활성은 HJ-SCE가 추가되지 않은 대조군을 이용하여 비교하였다.

[0095] 1.9. **홍잠 추출물에 의한 대식세포 ATP의 양 증진 효과**

[0096] 위에 언급된 방법으로 배양된 대식세포들을 2.5% HClO4 (DaeJung Chemicals & Metals Co.) 용액에서 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화를 진행하였다. 2.5 M KOH를 추가한 시료는 강하게 섞어 준 후, 4℃, 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 확보하여 ATP의 정량에 활용하고, 나머지 침전물은 단백질의 양 측정에 활용하였다. ATP 정량을 위하여 ATP 표준물질과 시료를 ATP 측정 완충액 (50 μ M Luciferin, 1.25 μ g/ml of Luciferase, 1 mM DTT, 20.875 mM Tricine, 4.175 mM MgSO4, 0.835 mM EDTA, 0.835 NaN3, Merck KGaA)과 혼합해 주었다. 시료와 ATP 표준 용액의 Luminescence를 Victor Nivo™ multimode plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정한 후, ATP 표준 용액으로 제조된 표준 곡선으로 시료 안의 ATP의 양을 정량한 후, 단백질 농도로 보정을 해주었다.

[0097] 1.10. **Total RNA 추출, cDNA 합성 및 real time-quantitative PCR 실험 수행**

[0098] 위에 언급된 방법으로 배양된 대식세포들에서 TRIzol을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA의 수준 검사를 A260/A280의 비율과 28S rRNA/18S rRNA의 비율로 확인하였다. DNase I을 이용하여 genomic DNA를 제거한 후, Superscript IV를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 다양한 cytokines, chemokines, phagocytosis receptor와 활성화 유전자들의 발현 변화를 ARIA MX RT-PCR machine 과 software (Agilent, Santa Clara, CA, United States)를 이용하여 수행하였다. 목표 유전자들의 발현 변화는 2- $\Delta\Delta$ CT method 방법으로 비교 및 정량하였다. 본 발명에 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다

표 1

[0100]

유전자		프라이머 서열
beta-actin	F	GGGATGTTTGCTCCAACCAA (서열번호 1)
	R	GCGCTTTTGACTCAGGATTTA (서열번호 2)
CR3	F	CCATGACCTTCCAAGAGAATGC (서열번호 3)
	R	ACCGGCTTGCTGTAGTC (서열번호 4)
Dectin-1	F	ACAGTACACCAGACACAGGG (서열번호 5)
	R	TGGCCAGACAGCATAAGGAA (서열번호 6)
LY96	F	AATACCATTCTCTTCGAGG (서열번호 7)
	R	CTTTCTTCAGTATCCCCA (서열번호 8)
TLR-4	F	TTGCTGCCAACATCATCCAG (서열번호 9)
	R	GGTCCAAGTTGCCGTTTCTT (서열번호 10)
TNF-alpha	F	CCCTCAGCTCAGATCATCTCT (서열번호 11)
	R	GCTACGACGTGGGCTACAG (서열번호 12)
IL-18	F	ACTGTACAACCGCAGTAATACGG (서열번호 13)
	R	AGTGAACATTACAGATTTATCCC (서열번호 14)
IL-6	F	CCGGAGAGGAGACTTCACAG (서열번호 15)
	R	CAGAATTGCCATTGCACAAC (서열번호 16)
INF-gamma	F	CACCCAAAGTGCTTCAGTCA (서열번호 17)
	R	CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG (서열번호 18)
NK-kB	F	GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC (서열번호 19)
	R	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG (서열번호 20)
CCL3	F	TGCCCTTGCTGTCTCTCTCT (서열번호 21)
	R	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG (서열번호 22)
MCP-1	F	ACTGAAGCCAGCTCTCTCTCCTC (서열번호 23)
	R	TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC (서열번호 24)

MIP-2	F	GAACAAAGGCAAGGCTAACTGA (서열번호 25)
	R	AACATAACAACATCTGGGCAAT (서열번호 26)
COX-2	F	AGGAGACATCCTGATCCTGGT (서열번호 27)
	R	GTTCAGCCTGGCAAGTCTTT (서열번호 28)
iNOS	F	CCTCCTCCACCCTACCAAGT (서열번호 29)
	R	CACCCAAAGTGCTTCAGTCA (서열번호 30)
PTGIS	F	CAGACGACCACTCTCCCACAG (서열번호 31)
	R	GGAAGAGGAGGAGGCGGT (서열번호 32)
MKP-1	F	GCATCCCTGTGGAGGACAACC (서열번호 33)
	R	TCCAGCATCCTTGATGGAGTCTATG (서열번호 34)

[0102] 2. 실험 결과

[0103] 2.1. 다양한 추출방법에 따른 홍잠 분말 추출 효율 비교

[0104] 홍잠 분말의 면역력 증진 효과에 대한 연구와 기능성 물질을 확인하는 연구를 진행하기 위하여, 3가지 다른 방법으로 4가지 품종으로 조제된 홍잠 분말로 부터 추출액을 제조하였다. 가장 추출 효율이 높았던 추출법은 열수 추출법(Hot water extraction)이었다 (도 1의 A). 백옥잠 홍잠(White Jade HongJam, WJ)의 열수 추출 효율은 $31.2 \pm 1.28 \%$, 주황잠 홍잠(Juhwang Jam HongJam, HJH)의 열수 추출 효율은 $29.2 \pm 1.59 \%$, 대황잠 홍잠(Daehwang Jam HongJam, DHJ)의 열수 추출 효율은 $28.3 \pm 2.32 \%$, 골든실크 홍잠(Goldensilk HongJam, GS)의 열수 추출 효율은 $31.2 \pm 1.67 \%$ 였다. 품종 간에 열수 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P > 0.01$).

[0105] 이에 비하여 80% 에탄올 주정을 이용하여 추출한 경우에는 WJ의 경우는 $10.3 \pm 0.54 \%$, HJH의 경우는 $13.0 \pm 0.98 \%$, DHJ의 경우는 $11.35 \pm 0.88 \%$, GS의 경우는 $9.55 \pm 0.79 \%$ 였다(도 1의 B). 품종 간에 80% 에탄올 주정 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P > 0.01$).

[0106] 초임계 추출기를 이용한 홍잠 분말의 추출효율을 보면, WJ의 추출 효율은 $11.4 \pm 0.43 \%$, HJH의 추출 효율은 $12.5 \pm 0.33 \%$, DHJ의 추출 효율은 $13.2 \pm 0.76 \%$, GS의 추출 효율은 $13.3 \pm 0.53 \%$ 였다(도 1의 C). 품종 간에 초임계 추출 효율은 통계적으로 유의한 차이는 없었다($P > 0.01$).

[0107] 2.2. 다양한 WJ 추출물의 면역세포 RAW264.7의 세포 증식 효과

[0108] 홍잠의 면역력 증진 효과를 연구하기 위하여 3가지 다른 WJ 추출물을 이용하여 선천성 면역에서 중요한 역할을 담당하는 대식세포(대식세포)에 대한 증식효과를 확인하였다. 동일한 양의 WJ 추출물을 처리한 후, macrophage 세포주인 RAW264.7 세포들의 증식 여부를 확인하였다(도 2).

[0109] 그 결과를 보면, WJ 열수 추출물(WJ hot water extracts)은 1mg/ml까지는 대식세포의 증식을 도와주었지만, 최고 농도에서는 증식 효과가 관찰되지 않았다. WJ 80% 에탄올 추출물(WJ 80% EtOH Extracts)의 경우는 RAW264.7 세포 증식 효과가 관찰되지 않았다. 하지만, WJ 초임계 추출물(WJ Super-critical fluid Extracts, WJ-SCE)의 경우는 가장 낮은 농도에서도 RAW264.7 세포 증식 효과가 있었고, 동시에 가장 높은 농도에서는 더 높은 증식 효과가 있었다.

[0110] 3가지 다른 추출물 중에서 백옥잠 초임계 추출물(White Jade HongJam Super-critical fluid Extract, WJ-SCE)이 가장 뛰어난 RAW264.7 세포 증식 효과가 있었다.

[0111] 2.3. 다양한 WJ 추출물의 NO 생성 억제 효과

[0112] 염증은 손상된 조직이나 외부에서 침투한 병원균에 대한 방어를 하기 위하여 나타나는 정상적 생리 현상이지만, 만성적인 염증은 알츠하이머, 치매, 천식, 암 등의 중요한 원인으로 밝혀지고 있다. 만성 염증 질환은 면역 세포들이 배출하는 Nitric oxide(NO)에 의하여 진전된다고 알려져 있으므로, LPS에 의하여 유도된 RAW264.7 세포의 증가된 NO의 양이 WJ 추출물의 처리로 감소하는지에 대한 연구를 진행하였다.

[0113] 도 3에서 볼 수 있듯이 3가지 다른 백옥잠 추출물에서 전부 NO 생성 억제 효과가 나타났다.

[0114] 2.4. 두 가지 다른 종류의 대식세포들에 대한 LPS와 WJ-SCE를 단독 또는 병합 처리에 따른 활성화

[0115] Bone marrow-derived 대식세포(BMDM)에 LPS를 처리를 하면 세포가 활성화된다고 알려져 있으므로, LPS를 처리한 후 BMDM의 증식 여부를 확인하는 연구를 진행하였다. BMDM은 LPS나 HJ-SCE에 노출이 되면, 농도 의존적으로

증식이 증가함을 확인하였다(도 4). BMDM가 LPS와 HJ-SCE에 동시에 노출이 되어도 세포 증식에 상승효과가 있었다.

[0116] RAW264.7 세포는 낮은 농도의 LPS에 처리시 세포 증식 효과가 있었지만, 1 mg/ml이상의 농도에서는 증식 효과가 관찰되지 않았다(도 5). HJ-SCE도 1 mg/ml까지만 세포 증식 효과가 농도 의존적으로 증가하였다. LPS와 HJ-SCE를 동시에 처리한 경우에는 HJ-SCE를 1 mg/ml 또는 5 mg/ml을 처리한 경우 증가되는 경향이 보였다.

[0117] 다음으로, LPS를 처리하면 면역 세포들의 NO 생성이 증가된다고 알려져 있으므로, LPS와 HJ-SCE를 단독 또는 동시에 처리한 후, NO의 양을 측정하는 연구를 진행을 하였다. BMDM에 LPS를 단독으로 처리하면 100 ng/ml까지는 NO 생성이 증가되지 않고, 1000 ng/ml의 처리 시에만 유의하게 증가하였다(도 6). HJ-SCE를 단독으로 처리한 경우에는 농도 의존적으로 NO의 양이 감소하였다. 1000 ng/ml의 LPS에 HJ-SCE를 처리한 경우 농도 의존적으로 NO의 양이 감소함을 확인하였다.

[0118] RAW264.7 세포에 LPS를 단독으로 처리한 경우, 100 ng/ml과 1000 ng/ml에서만 NO의 양이 유의하게 증가하였다. RAW264.7 세포에 HJ-SCE를 단독으로 처리하면 0.1 mg/ml에서부터 NO의 생성량이 유의하게 감소하였다. LPS의 처리로 증가된 RAW264.7 세포의 NO 생성량은 HJ-SCE를 처리하면 감소됨을 확인하였다(도 7).

[0119] 2.5. HJ-SCE에 의한 대식세포들의 Phagocytosis 기능 증진 효과

[0120] Innate immunity에서 대식세포의 가장 중요한 기능 중의 하나는 체내로 침투한 병원균들을 인식하여 제거하는 기전이다. 그러므로, 우리는 HJ-SCE가 BMDM과 RAW264.7 세포의 phagocytic activity에 영향을 미치는지에 대한 연구를 진행하였다. FITC-labeled E. coli를 1시간 동안 BMDM 세포에 처리를 하면, 매우 적은 양의 FITC-labeled E. coli가 phagocytosis되지만, 다양한 농도의 HJ-SCE를 처리하면 농도 의존적으로 phagocytosis된 FITC-E. coli의 수가 증가함을 확인하였다 (도 8).

[0121] 또한, RAW264.7 세포에 다양한 농도의 HJ-SCE를 처리한 후, FITC-E. coli의 phagocytosis를 측정한 결과, BMDM 세포와 비슷하게 RAW264.7 세포의 phagocytosis 능력이 HJ-SCE의 농도에 의존적으로 증가함을 확인하였다 (도 9).

[0122] 2.6. HJ-SCE에 의한 대식세포의 50 nm 크기의 latex particle에 대한 pinocytosis 기능 증진 효과

[0123] Macrophage를 포함한 다양한 면역 세포는 다양한 종류의 endocytosis 기전을 이용하여 면역기능을 수행하고 있다. 그 중의 하나가 pinocytosis로 크기가 200 nm 이하의 particle들을 제거하는 기전이다. 다양한 농도의 HJ-SCE로 배양된 BMDM에 50 nm 크기의 latex particle을 처리하면, latex particle을 pinocytosis하여 형성된 pinosome들이 명확하게 관찰이 되었다 (도 10). Pinosome을 가지는 BMDM의 비율은 HJ-SCE의 농도에 의존적으로 증가함을 확인하였다.

[0124] 또한, 다양한 농도의 HJ-SCE로 배양된 RAW264.7 세포에 50 nm 크기의 latex particle을 처리한 후, 생성되는 pinosome을 관찰하는 연구를 수행하였다 (도 11). Pinosome을 가지고 있는 RAW264.7 세포의 수와 비율이 처리한 HJ-SCE의 농도에 의존적으로 증가함을 확인하였다.

[0125] 한편, HJ-SCE를 BMDM에 처리하면 용액에 용해된 용질의 pinocytosis activity도 증가시키는가를 확인하기 위하여 Neutral red를 이용한 연구를 진행하였다. 그 결과를 보면, 다양한 농도의 LPS나 HJ-SCE를 처리하면 BMDM의 neutral red uptake가 농도 의존적으로 증가함이 확인되었다 (도 12).

[0126] 또한, HJ-SCE를 RAW264.7 세포에 처리하면 용액에 용해된 용질의 pinocytosis activity도 증가시키는가를 확인하기 위하여 Neutral red를 이용한 연구를 진행하였다. 그 결과를 보면, 다양한 농도의 LPS나 HJ-SCE를 처리하면 RAW264.7 세포의 neutral red uptake가 농도 의존적으로 증가함이 확인되었다 (도 13).

[0127] LPS 100 ng/ml과 10 ng/ml을 다양한 농도의 HJ-SCE와 혼합하여 처리한 경우에는 RAW264.7 세포의 neutral red uptake는 HJ-SCE의 농도에 의존적으로 증가함을 확인하였다 (도 14).

[0129] 2.6. HJ-SCE에 의한 대식세포의 미토콘드리아 컴플렉스 기능 향상

[0130] RAW264.7 대식세포는 HJ-SCE로 배양이 되면, 농도 의존적으로 MitoCom I~III의 기능이 증진됨을 확인하였다 (도 15). MitoCom IV의 경우 통계적인 유의성은 없으나 대조군 대비 증진되는 경향이 있었다.

[0131] BMDM 대식세포는 HJ-SCE로 배양이 되면, 농도 의존적으로 MitoCom I ~ IV의 활성이 증진됨을 확인하였다 (도 16).

[0132] 상기 결과를 통해 HJ-SCE가 대식세포의 미토콘드리아 기능을 증진시킴을 알 수 있다.

[0133] 2.7. HJ-SCE에 의한 대식세포의 ATP의 양 증가

[0134] HJ-SCE로 배양된 두 종류의 대식세포에서 미토콘드리아의 기능이 향상되었으므로, 대식세포에 존재하는 ATP의 양을 측정하는 연구를 진행을 하였다. 그 결과를 보면, RAW264.7 세포는 처리된 HJ-SCE에 농도의존적으로 ATP의 양이 증가됨을 확인하였다 (도 17). 그리고 BMDM 대식세포 또한 농도의존적으로 ATP의 양이 증가됨을 확인하였다 (도 18). 이러한 결과는 HJ-SCE가 대식세포의 미토콘드리아의 기능을 활성화시켜서 대식세포의 다양한 기능을 증진시킴을 보여주고 있다. 그러므로, HJ-SCE에 의한 대식세포의 미토콘드리아 기능 증진이 면역력 증진 효과의 분자세포 생물학적인 기본임을 보여주고 있다.

[0135] 2.8 대식작용과 chemokine과 cytokine과 anti-inflammatory반응관련 유전자 발현변화

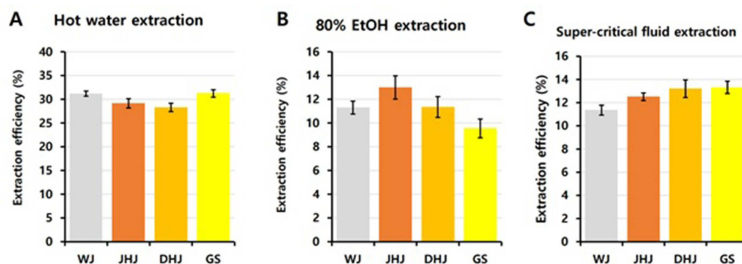
[0136] 위에 언급된 방법으로 배양된 RAW264.7 세포 주에서 대식작용, chemokine, cytokine 및 anti-inflammatory 반응 관련 유전자 발현 변화를 연구하였다.

[0137] 그 결과, Phagocytosis receptor인 CR3와 Dectin-1과 LY96과 TLR-4의 발현이 HJ-SCE 처리군에서 유의하게 증가됨을 확인하였다 (도 18). Cytokine인 TNF-alpha, IL-18, IL-6, IFN-gamma와 이의 발현을 조절하는 NFkB의 발현이 HJ-SCE 처리군에서 증가됨을 확인하였다 (도 19). 그리고 Chemokine인 CCL3, MCP-1, MIP-2의 발현도 증가됨을 확인하였다(도 20). 항 염증 유전자인 PTGIS와 GPR120의 경우는 발현이 감소되고, MKP-1은 증가됨을 확인하였다 (도 21).

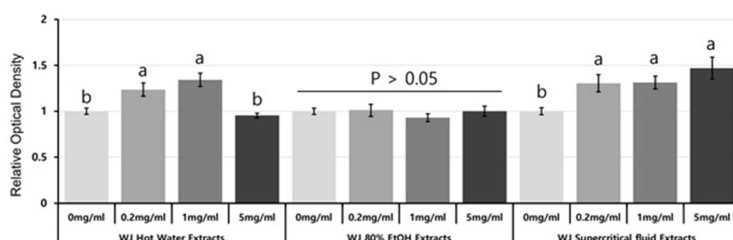
[0138] 이러한 결과를 통해 HJ-SCE가 대식작용 유전자, cytokines, chemokines, 및 항 염증 유전자들의 발현을 조절하여 면역력을 증진시켜 줌을 확인할 수 있었다.

도면

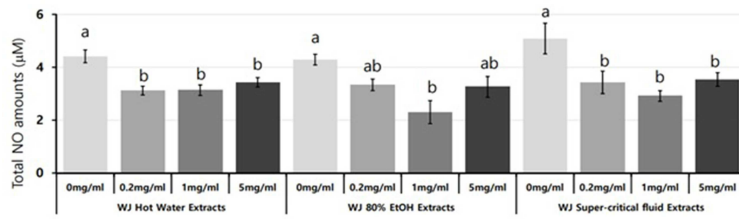
도면1



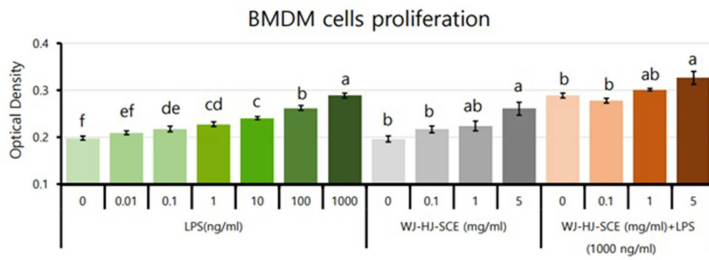
도면2



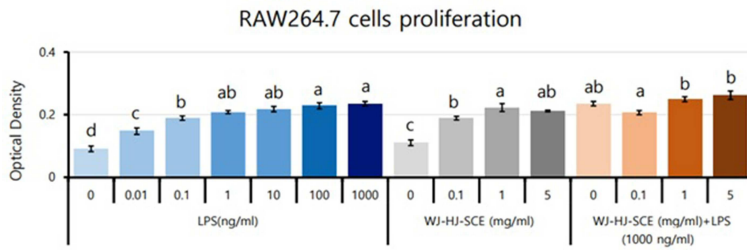
도면3



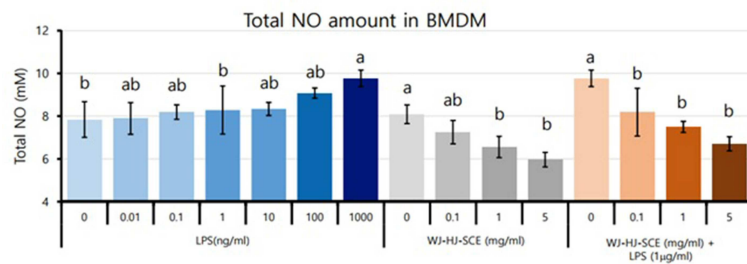
도면4



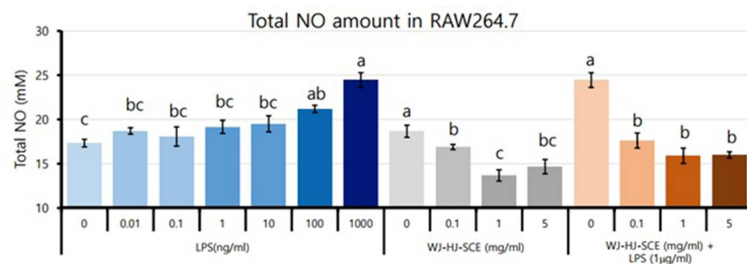
도면5



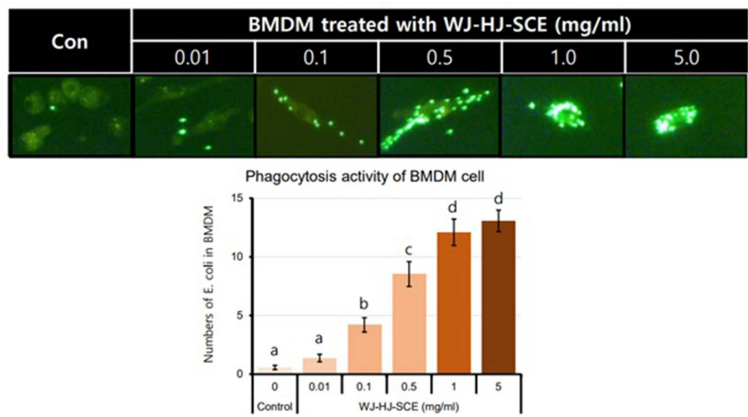
도면6



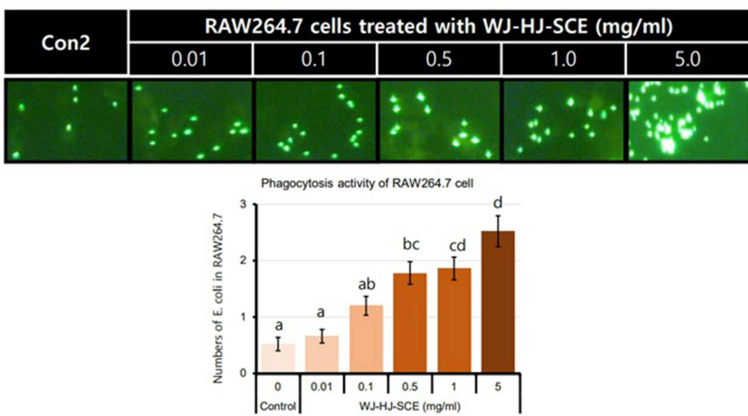
도면7



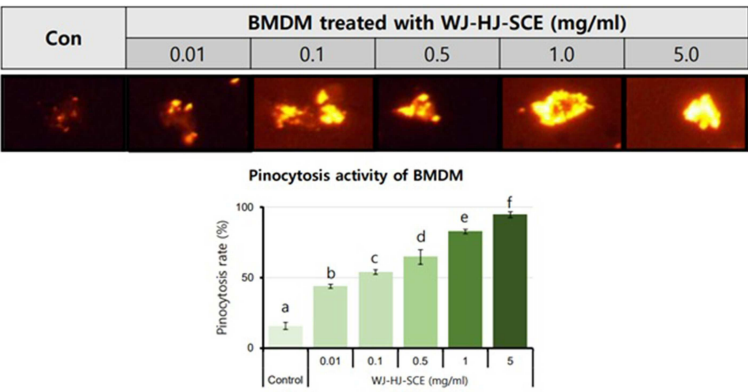
도면8



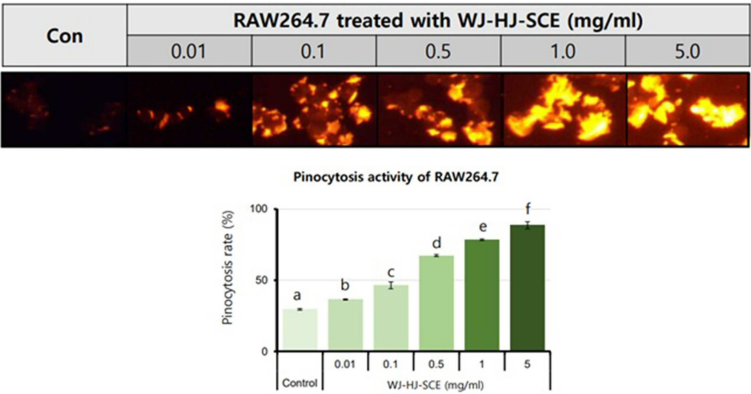
도면9



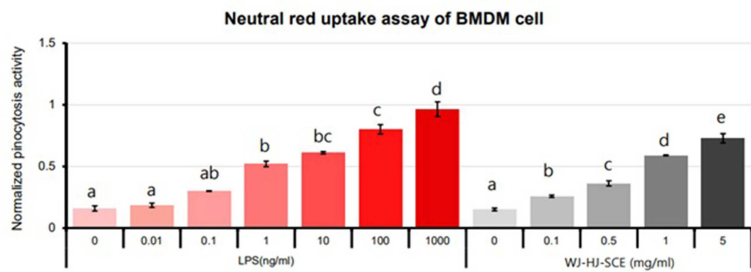
도면10



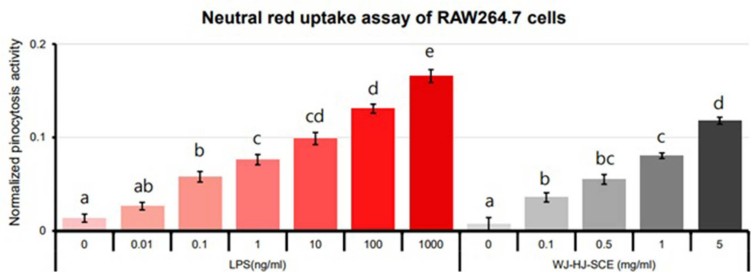
도면11



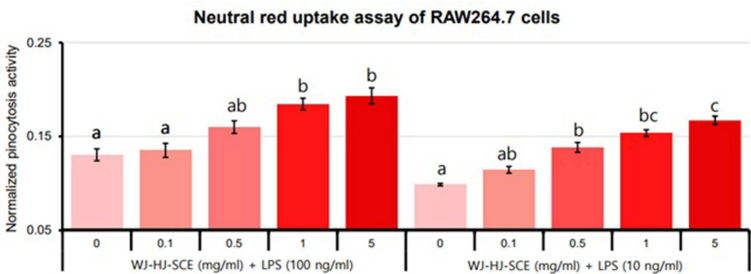
도면12



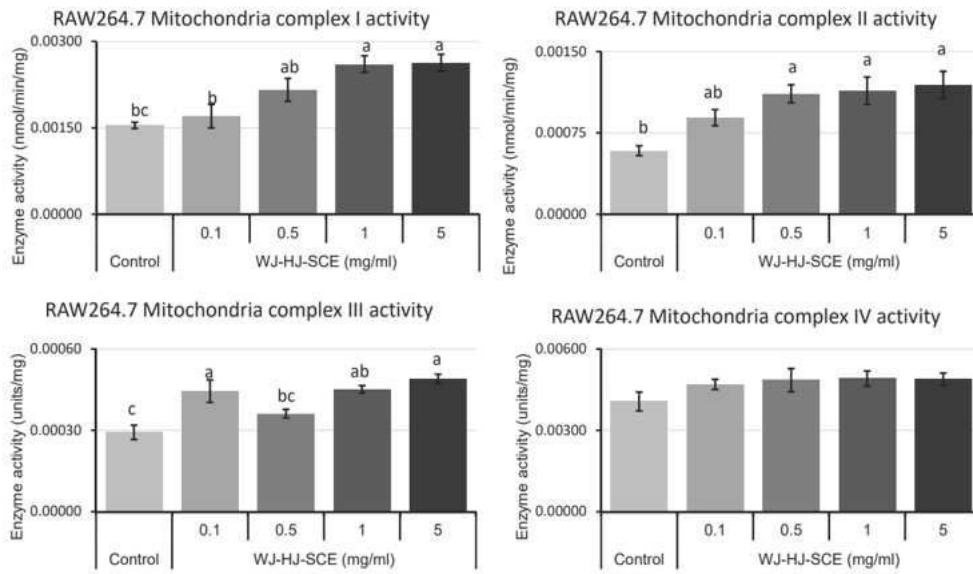
도면13



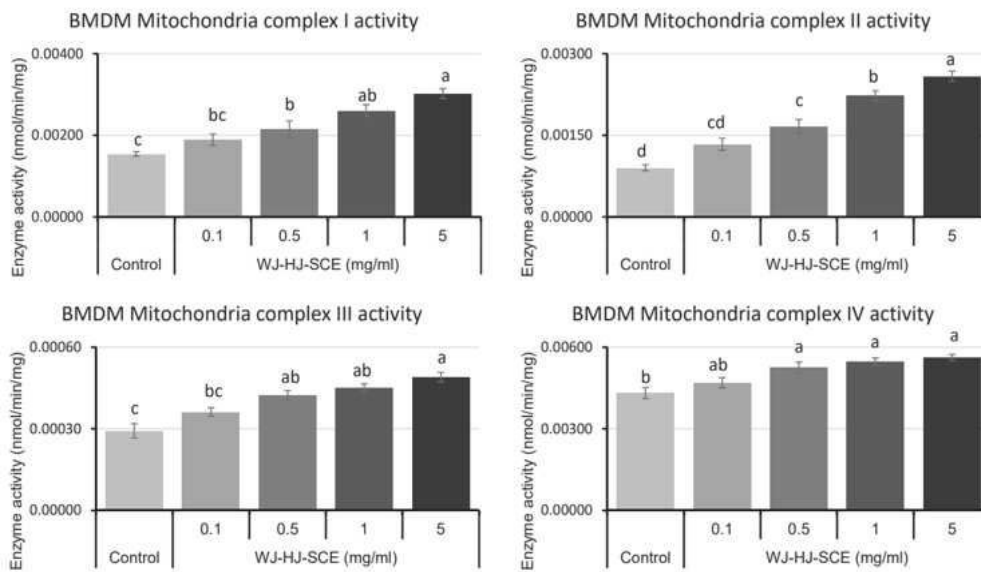
도면14



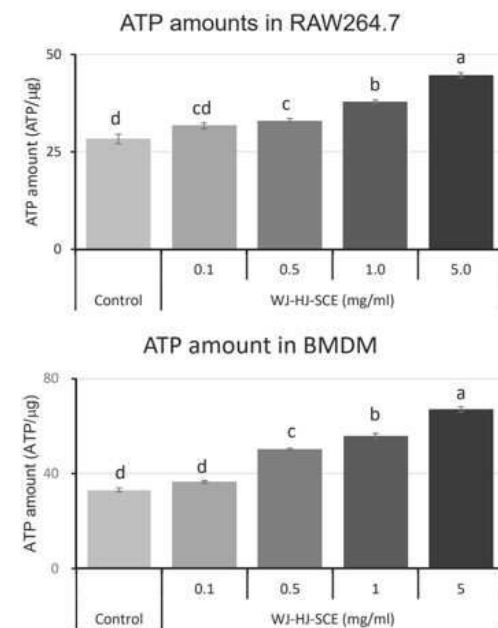
도면15



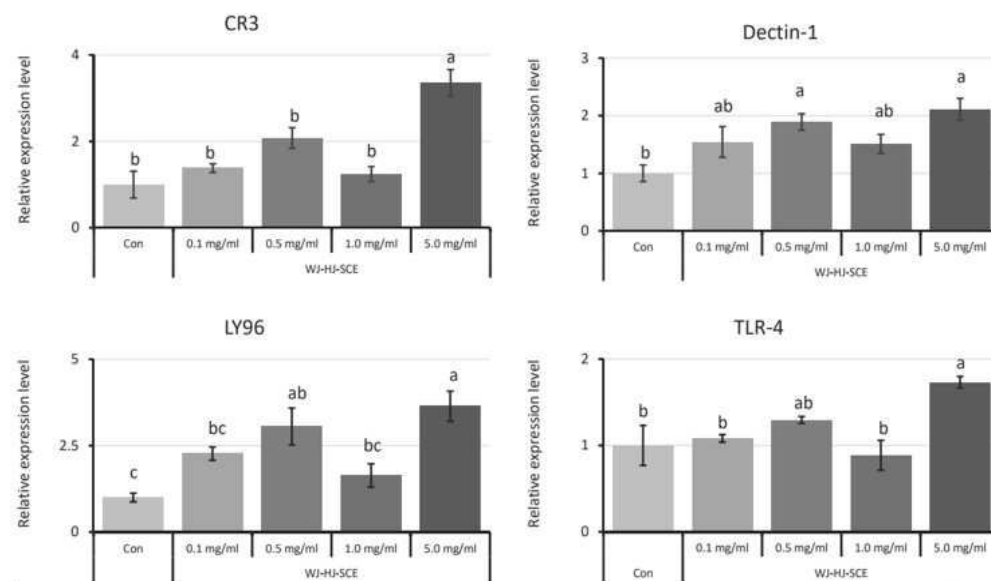
도면16



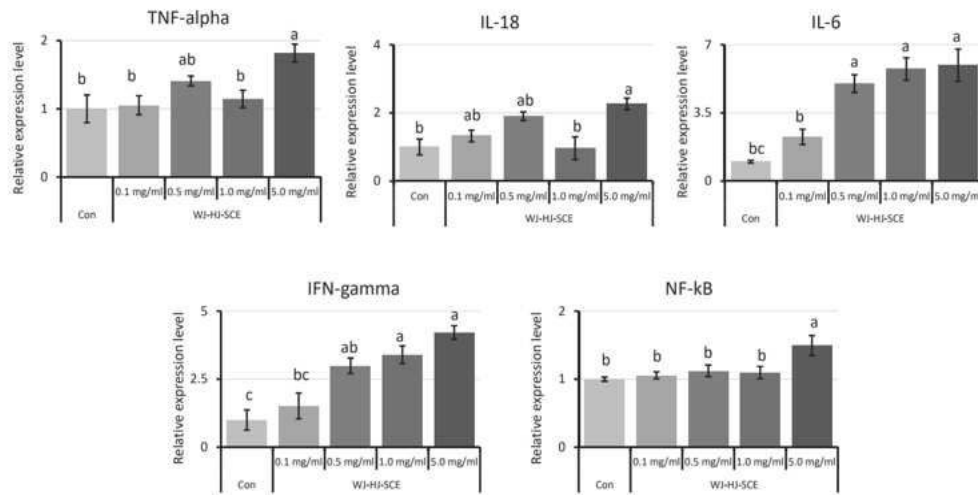
도면17



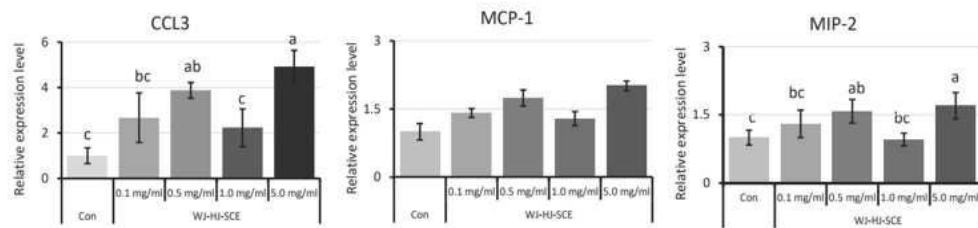
도면18



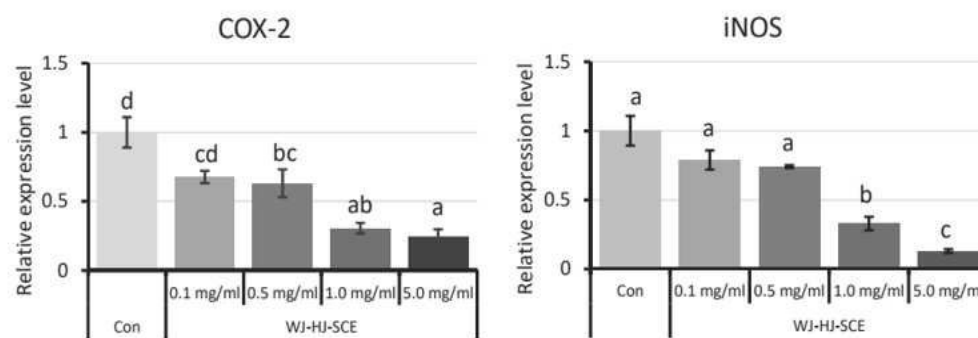
도면19



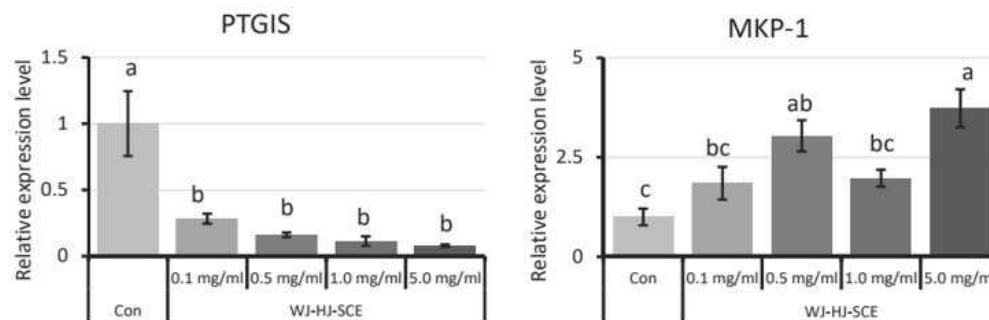
도면20



도면21



도면22



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.