



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월18일
(11) 등록번호 10-2351651
(24) 등록일자 2022년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/135 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0141977
(22) 출원일자 2019년11월07일
심사청구일자 2019년11월07일
(65) 공개번호 10-2021-0055859
(43) 공개일자 2021년05월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190075791 A
JOURNAL OF LIFE SCIENCE 제29권 제5호, 545_55
4쪽, 2019년 05월 30일.
인터넷 기사('허은선의 우리약초 이야기(62)
취', 농민신문, 2015년 03월 11일)
KR101969906 B1

(73) 특허권자
주식회사 에치와이
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정운희
경기도 용인시 기흥구 공세로 226
라제현
경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20
(뒀면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 7 항

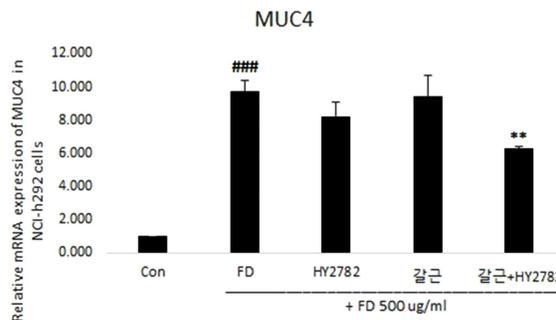
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 천연 유래 복합물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 천연 유래 복합물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 뮤신 유전자의 자극에 따른 점액의 과다 분비를 개선할 수 있어, 미세먼지의 자연적인 배출을 촉진할 수 있으므로, 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/747 (2013.01)

A61K 36/488 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/314 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

정승희

인천광역시 연수구 송도국제대로 261

강희립

서울특별시 영등포구 도림로102길 3-6

박수동

경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 33

남보라

경기도 용인시 수지구 현암로

남 우

서울특별시 영등포구 도림로55길 7-1

최일동

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63

심재현

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 카제이 HY2782 균주 (기탁번호 : KCTC13438BP) 및 같은 추출물을 포함하는 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된 것인 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 MUC4, MUC5ac 및 MUC16로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 뮤신 유전자의 발현을 감소시키는 것인 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주는 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 (기탁번호 : KCTC13438BP), 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물인 것인 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

락토바실러스 카제이 HY2782 균주 (기탁번호 : KCTC13438BP) 및 같은 추출물을 포함하는 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 질환은 호흡기 염증성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 급만성기관지염, 폐기종, 폐렴, 천식, 기관지염, 기관지 확장증, 인후염, 편도염 및 후두염으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것인 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주는 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 (기탁번호 : KCTC13438BP), 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물인 것인 미세먼지 자극에 의해 발생하는 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 천연 유래 복합물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세먼지란 공기 중에 장기간 떠다니는 미세한 입자상 물질을 말한다. 미세먼지는 석탄, 석유 등의 화석연료의 연소 및 공장, 자동차 등의 배출가스 등에서 주로 발생하며, 최근들어 계절적 요인에 따라 중국에서 유입되는 미세먼지가 큰 문제로 인식되고 있다. 미세먼지를 이루는 성분은 그 미세먼지가 발생한 지역이나 계절, 기상조건 등에 따라 달라질 수 있는데, 일반적으로는 대기오염물질이 공기 중에서 반응하여 형성된 덩어리 및 화석연료의 연소 과정에서 발생하는 탄소류와 그을음, 지표면 흙먼지 등에서 생기는 광물 등으로 구성된다.

[0003] 미세먼지는 사람의 머리카락 지름보다 약 1/5 내지 1/30에 불과할 정도로 작기 때문에, 호흡기를 거쳐 폐 등에 침투하거나 혈관을 따라 체내로 이동할 수 있으며, 피부를 통해 인체 내에 그대로 침투할 수 있어 건강상에 해로운 영향을 나타낼 수 있다. 구체적으로, 10 μ m 이하의 크기를 갖는 미세먼지는 호흡을 통해 기관지까지 침투하여 천식, 만성폐쇄성 폐질환 등 각종 호흡기질환을 유발하고, 피부나 안구 등 대기에 노출되는 신체 부위에 각종 염증을 일으킬 수 있다. 미세먼지는 뇌졸중, 편두통, 치매 등의 뇌혈관질환, 심혈관질환, 우울증, 장기능 장애, 생식 기능 장애 및 태아 성장 장애와도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, 미세먼지는 체내로 한번 흡수되면 쉽게 배출되지 않고 축적되어 암을 유발하거나 유전적 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있어 시급한 대책 마련이 요구되는 실정이다.

[0004] 한편, 현재까지 미세먼지의 체내 독성 감소 및 미세먼지에 의해 발생하는 질환의 치료를 위한 연구가 주로 진행되고 있으나, 미세먼지의 체외 배출을 촉진하여 이와 같은 질환 및 증상을 감소시키기 위한 연구에 대해서는 거의 이루어지지 않은 실정이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 미세먼지의 체외 배출 촉진을 통한 미세먼지 자극에 의해 발생하는 질환을 개선하기 위한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2019-0043996호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 및 갈근 추출물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 및 갈근 추출물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양상은 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 및 갈근 추출물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 정상 기도 점액(mucus)은 대부분의 물과 약 3%의 점소(mucin), 비점소성 단백, 지질, 그리고 세포의 조직파편(debris) 등을 포함하는 고형물로 구성되어 있다. 기도 점액은 기도 점막에서 생산되며 호흡기 기도의 상피를 덮고 있는 물질로 호흡으로 유입되는 이물질들을 물리적/화학적으로 제거하고, 기도와 폐의 습도를 적절하게 유지시키는 보호막 역할을 한다. 그러나, 미세먼지에 의한 자극에 의하여 기도의 염증반응이나 알레르기 비염, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환 등과 같은 호흡기 질환이 생기게 되면, 점액의 분비를 조절하는 점액유전자(mucin gene)를 자극하게 되어, 점액이 과다 분비되고 점액의 점성이 높아져 분비물의 자연 배출이 어려워지게 된다.

[0011] 본 발명의 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 및 갈근 추출물 복합물은 미세먼지를 처리하여 뮤신관련 유전자의

발현량이 높아진 인간유래 폐 점막세포에서 뮤신 유전자의 발현량을 효과적으로 감소시킬 수 있으므로, 미세면지의 자연 배출을 촉진시킬 수 있으므로, 미세면지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

- [0012] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 용매로 추출된 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 갈근 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다. 건조된 갈근을 적당한 크기로 분쇄하여 추출용기에 넣고, 갈근의 중량 대비 1:2 내지 1:20 바람직하게는 1:10의 추출 용매를 첨가한다. 갈근은 통상의 추출용매를 이용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는, (a) 탄소수 1~4의 무수 또는 함수 저급 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸 아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르, (i) 부틸아세테이트 (j) 클로로포름-메탄올 또는 (k) 물을 이용하여 추출할 수 있고, 바람직하게는 50℃ 내지 90℃에서 물로, 더욱 바람직하게는 85℃에서 물로 추출할 수 있다. 추출시간은 10 내지 24시간, 바람직하게는 12 내지 18시간 동안 추출할 수 있다. 추출 후, 여과지를 이용하여 여과할 수 있으며, 여과된 추출액은 55℃ 내지 65℃에서 감압농축한 다음 동결건조 및 분쇄하여 분말화할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 락토바실러스 카제이 HY2782 및 갈근 추출물 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0016] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 식품 조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜릿, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 또는 그 밖의 건강기능식품 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 MUC4, MUC5ac 및 MUC16로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 뮤신 유전자의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 식품 조성물은 미세면지에 의해 발현이 증가된 뮤신 유전자인 MUC4, MUC5ac 및 MUC16의 발현을 효과적으로 감소시킬 수 있으므로, 체내 흡입된 미세면지의 자연적인 체외 배출을 증가시킬 수 있으므로, 미세면지 자극 호흡기 질환의 예방 또는 개선에 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주는 락토바실러스 카제이 HY2782 균주, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 양상은 락토바실러스 카제이 HY2782 균주 및 갈근 추출물을 포함하는 미세면지 자극 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 전술한 내용과 중복되는 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 약제의 제조에 통상적으로 이용되는 것으로써, 락토오스, 텍스트로스, 슈크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있

다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington: the science and practice of pharmacy* 22nd edition (2013)에 상세히 기재되어 있다.

- [0024] 본 발명의 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 미세먼지 자극 호흡기 질환의 치료에 활성을 나타내는 물질과 함께 투여될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따른 약학적 조성물은 미세먼지 자극 호흡기 질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 시술, 호르몬 치료, 약물치료 및/또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기재 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 떨어뜨리지 않는 범위 내에서 비이온 계면활성제, 실리콘 폴리머, 체질안료, 향료, 산화 안정화제, 유기 용매, 이온성 또는 비이온성 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트(emollient), 실리콘, α -히드록시산, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 향료, 보존제, 계면활성제, 소염제, 물질 P 길항제, 충진제, 중합제, 추진제, 염기성화 또는 산성화제, 또는 착색제 등 공지의 화합물을 더 포함하여 제조될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.001~1000mg/kg일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 시 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 환제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 고형제제 형태로 투여될 수 있으며, 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물을 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태로 제형화할 경우, 이의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 예를 들어, 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 규산칼슘, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및/또는 광물유가 사용될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 제제화에 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함하여 조제될 수 있으며, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 질환은 호흡기 염증성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 급만성기관지염, 폐기종, 폐렴, 천식, 기관지염, 기관지 확장증, 인후염, 편도염 및 후두염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환일 수 있다.
- [0031] 미세먼지의 흡입에 의하여 호흡기 염증성 폐질환, 만성 폐쇄성 폐질환, 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 급만성기관지염, 폐기종, 폐렴, 천식, 기관지염, 기관지 확장증, 인후염, 편도염 및/또는 후두염 질환이 발생 또는 증상이 악화될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 미세먼지의 체외 배출을 촉진할 수 있으므로, 이와 같은 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 락토바실러스 카제이 HY2782 균주는 락토바실러스 카제이 HY2782 균주, 이의 파쇄물, 이의 배양액, 상기 균주의 추출물, 상기 파쇄물의 추출물 또는 상기 배양액의 추출물일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 천연 유래 복합물을 포함하는 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 따르면, 뮤신 유전자의 자극에 따른 점액의 과다 분비를 개선할 수 있어, 미세먼지의 자연적인 배출을 촉진할 수 있으므로, 미세먼지 자극 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 미세먼지 처리에 의해 발현이 증가한 MUC4에 대한 락토바실러스 카제이 HY2782 및/또는 갈근 추출물 복합물의 처리에 따른 발현 감소 효과를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 미세먼지 처리에 의해 발현이 증가한 MUC5ac에 대한 락토바실러스 카제이 HY2782 및/또는 갈근 추출물 복합물의 처리에 따른 발현 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 미세먼지 처리에 의해 발현이 증가한 MUC16에 대한 락토바실러스 카제이 HY2782 및/또는 갈근 추출물 복합물의 처리에 따른 발현 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. 갈근 추출물의 제조**

[0038] 시판되는 국내산 건조 갈근을 구입하여 시료로 사용하였다. 갈근에 중량 대비 1:10의 물 가한 후, 85℃에서 12 내지 18시간 동안 추출하고 여과지를 이용하여 한 번 내지 두 번 여과하였다. 여과된 추출액은 60℃에서 감압농축한 다음 동결건조 후, 분쇄하여 분말화하였다.

[0040] **실시예 2. 락토바실러스 카제이 HY2782 및 갈근 추출물 복합물의 미세먼지에 의해 증가된 뮤신 유전자에 대한 발현 억제 효과 분석**

[0041] 2-1. 세포 배양

[0042] 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제를 포함한 RPMI 배지(Gibco, USA)에서 인체유래 폐세포(NCI-h292)와 RPMI를 1:4의 중량비율로 5% CO₂의 37℃ 조건에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하여 사용하였다.

[0043] 구체적으로, 계대배양을 위하여 RPMI 배지를 제거하고 PBS 4ml로 1회 세척한 후, Trypsin-EDTA Solution 1X(1XTE, Sigma)를 2ml 처리하여 배양기에 5~10분 동안 넣었다. 인체유래 폐세포(NCI-h292)의 부착이 떨어진 것을 확인한 후, RPMI 배지 6~8ml를 넣어 인체유래 폐세포(NCI-h292)를 회수하였다. 회수된 인체유래 폐세포(NCI-h292)를 1,200rpm으로 3분 동안 원심분리를 한 후, 상등액을 조심스럽게 제거하고, RPMI 배지 1ml를 넣어 세포 펠렛을 풀어 주었다. 인체유래 폐세포(NCI-h292)와 RPMI 배지를 1:4의 중량비율로 회석한 후 75T 세포배양접시에 넣고 잘 혼합한 후 배양기에서 2~3일간 배양하여 사용하였다.

[0045] 2-2. 락토바실러스 카제이 HY2782 및 갈근 추출물 복합물, 및 미세먼지 처리

[0046] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) HY2782 균주(KCTC13438BP)는 한국생명공학연구원에서 분양받았다.

[0047] 실시예 2-1에서 배양한 인체유래 폐세포(NCI-h292)를 6웰에 웰당 1×10^6 cells로 접종하여 24~48시간 동안 배양한 후, FBS를 함유하지 않는 RPMI 배지로 1회 세척하고, ERM-CZ100(다환방향족탄화수소, Sigma)와 ERM-CZ120(중금속, Sigma)이 각각 100µg/ml의 농도로 존재하는 미세먼지를 500µg/ml의 농도로 처리하였다. 미세먼지가 처리된 세포에 2×10^6 CFU/웰 농도의 락토바실러스 카제이 HY2782 및/또는 25µg/ml 농도의 실시예 1에서 제조한 갈근 추출물을 처리한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 한편, 음성대조군으로는 인체유래 폐세포(NCI-h292)에 아무것도 처리하지 않은 것을 제외하고는 동일한 방법으로 미세먼지를 처리하였다.

[0049] 2-3. 미세먼지에 의해 증가된 뮤신 유전자의 발현 억제 확인

[0050] 실시예 2-2에서 미세먼지와 락토바실러스 카제이 HY2782 및/또는 갈근 추출물 처리한 인체유래 폐세포(NCI-h292)의 상층액을 제거하고, easy-spin™ lysis buffer(iNtRON, USA) 1ml를 넣고 세포를 용해한 다음, RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다.

[0051] 구체적으로, 모든 RNA는 easy-spin™ total RNA Extraction kit(iNtRON, USA)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 분리되었다. RNA 순도와 분해정도는 ND-1000 Spectrophotometer(NanoDrop, Wilmington, USA)와 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)로 확인되었다. 분리된 RNA는 Omniscript reverse transcription kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 cDNA로 합성되었다. RNA 발현을 평가하기 위하여, Taqman gene expression master mix(Taqman, USA) 및 QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System(Applied biosystems, USA)을 사용하여 분석 및 정량하였다. RNA 발현의 평가에 사용한 프라이머(primer)는 GAPDH(Hs03929097_g1), MUC4(Hs00366414_m1), MUC5ac(Hs01365616_m1) 및 MUC16(Hs01065175_m1)로써, Taqman사를 통해 주문하여 사용하였다. 증폭된 DNA의 양을 Delta delta Ct method를 이용하여 정량하고, 각 시료에 대해 GAPDH의 발현량으로 보정하여 증폭된 DNA의 양을 정량적으로 비교하였다

[0052] 그 결과, 미세 먼지 처리시, MUC4, MUC5ac, MUC16의 발현량이 유의적으로 증가하였으나, 미세먼지만 처리한 군 대비, 락토바실러스 카제이 HY2782 및 갈근 추출물 복합물을 처리한 군에서 특히 MUC4(도 1), MUC5ac(도 2) 및

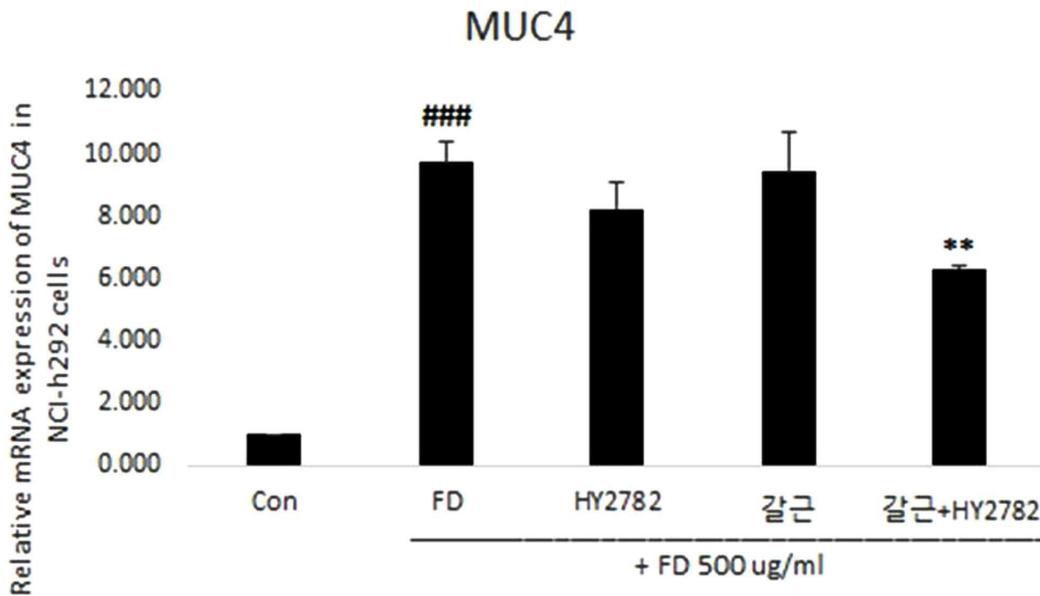
MUC16(도 3)의 발현량이 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다.

[0054] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 락토바실러스 카제이 HY2782 및 갈근 추출물 복합물은 미세먼지를 처리하여 뮤신관련 유전자의 발현량이 높아진 인간유래 폐 점막세포에서 해당 유전자의 발현량을 효과적으로 감소시키는 효과를 나타내므로, 뮤신 유전자의 자극에 따른 점액의 과다 분비를 개선할 수 있어, 미세먼지의 자연적인 배출을 촉진할 수 있음이 확인되었다.

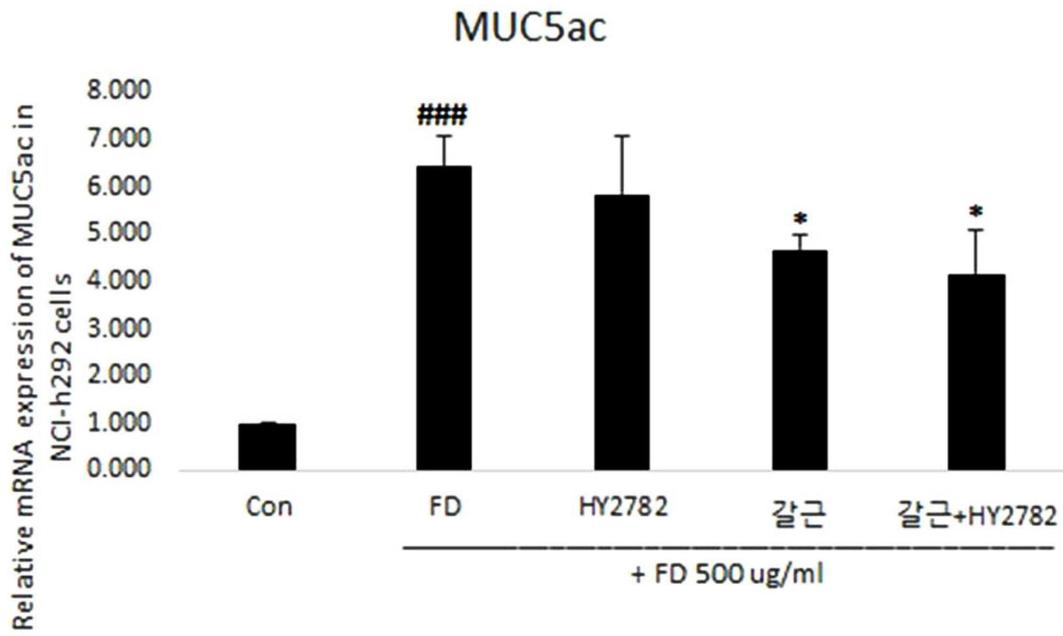
[0056] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

