

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0111645 (43) 공개일자 2012년10월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/61 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0030255 (22) 출원일자 2011년04월01일 심사청구일자 2011년04월01일		(71) 출원인 제주대학교 산학협력단 제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교) 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 김소미 제주특별자치도 제주시 대원길 82-5 (오등동) 안광석 서울특별시 성북구 장위로2길 67, 106동 1307호 (하월곡동, 꿈의숲푸르지오) (74) 대리인 김승진, 양부현

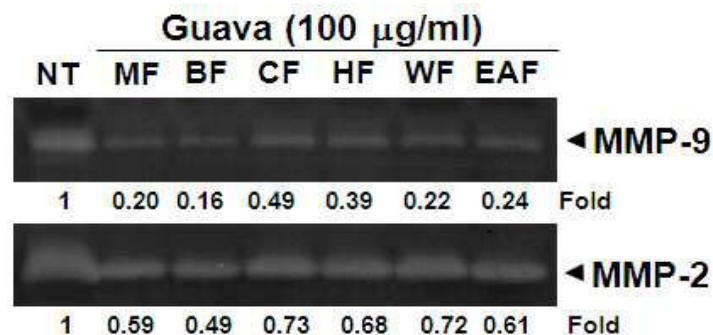
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 구아바 (*P. cattleianum* Sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분 구아바 잎 추출물은 암세포에서 암의 전이 및 침윤에 필수적으로 요구되는 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제함으로써 암세포의 항-전이 및 항-침윤 효능을 나타낸다. 본 발명의 구아바 잎 추출물은 암의 전이 또는 침윤 억제 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 물, 탄소수 1-4 개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 또는 1,3-부틸렌 글리콜의 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 상기 용매 추출물의 메탄올, 부탄올, n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 물을 용매로 사용하여 얻은 추가 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 MMP(matrix metalloproteinase)-2 및 MMP-9의 활성 억제 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 또는 mRNA 발현 수준을 억제하는 효능을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 암은 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암 또는 골수암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 암의 전이 또는 침윤 억제용 약제학적 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 암의 전이 또는 침윤 억제용 기능성 식품 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전이(metastasis)는 1차 종양세포가 그 원래 발생부위에서 원거리의 다른 부위로 이동하여 이식되고, 그 이식된 부위에서 증식을 지속하여, 결국에는 대부분의 암환자에게 사망을 초래하는 상태를 의미한다. 전이가 진전되려면, 전이 과정은 종양세포가 행하는 연결되고, 연속적인 단계를 거쳐야 하며, 전이성 세포들은 침윤 및 폐색, 혈액순환과정에서의 생존, 원거리의 모세혈관계에서의 정지, 및 기관 유조직안으로의 분출 및 증식을 포함하는 복잡한 과정을 초래한다[1]. 추가적으로, 악성종양세포의 침윤(invasion) 및 전이(metastasis)가 발생되기 위해서는 기저막(basement membrane)과 세포외기질(ECM, extracellular matrix)이 분해되어야만 한다[2]. ECM의 분해는 종양세포침윤에 관여하는 상이한 타입의 세포에 의해 분비되는 단백질분해효소에 의해 개시되고, 알려진 모든 종류의 단백질분해효소의 발현 또는 활성화는 종양세포의 악성 및 침윤성과 관련되어 있다[3]. 이러한 효소들중에서 ECM의 대부분의 구성성분들을 분해할 수 있는 MMPs (matrix metalloproteinases)는 종양세포의 침윤 및 전이에서 매우 중요한 역할을 수행한다[4]. MMPs는 단백질분해효소이며, 단백질의 분해 작용의 기본적인 메카니즘은 종양생물학과 관련하여 다양한 세포의 행동을 조절한다. 대부분의 MMPs는 치모젠(zymogen) 형태인 (pro-MMP)으로 생성되어, 촉매활성을 위해서는 활성화가 필요하다. 이들은 암세포 성장, 분화, 세포사(apoptosis), 이동, 및 침윤, 및 종양 혈관신생 및 면역 감시의 조절을 포함한다. MMPs는 21개 이상의 인간 MMPs 및 다른 종들에서 유래되는 수많은 유사체로 구성되는 아연-의존성 엔도펩티다아제 패밀리를 구성한다[4, 5]. 이전까지 보고된 인간 MMPs 중에서, 젤라티나아제 A (72 kDa type VI collagenase, MMP-2) 및 젤라티나아제 B (92 kDa type VI collagenase, MMP-9)가 타입 IV 콜라겐 및 피브로넥틴을 분해할 수 있으며, 종양세포의 침윤 및 전이와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다[6, 7].

[0003] MAPK (mitogen-activated protein kinase) 경로가 종양의 발달 및 침윤에서 주요한 역할을 수행하고, MAPK 신호전달을 억제하면 종양의 침윤을 감소시킨다고 보고되어 있다[8-10]. MAPKs는 기저막을 분해하는 단백질분해효소의 조절에 관련되어 있다는 것이 알려져 있다. 전이성 세포에서, ERK1/2 활성이 비-전이성 암세포와 비교할 때 더 증가되어 있다는 것이 보고되어 있다[8, 9, 11]. ERK1/2의 인산화는 AP-1(activating protein-1)을 포함하는 전사인자의 활성화를 통해서 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 조절한다[12]. 이들 단백질 분해효소는 종양 침윤 및 전이를 매개하는데, MAPK 신호전달경로가 단백질분해효소-유도, 세포이동 및 세포사(apoptosis)와 같은 암세포 전이과정의 조절에서 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다. 항암제로 알려진 몇몇의 천연물은 종양 전이 및 침윤의 억제에 있어서 매우 효과적인 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 식용식물에 포함된 다양한 플라보노이드는 MMP-9 및 MMP-2 효소활성을 억제함으로써 항-전이 및 항-침윤 효과를 나타낸다[15, 16].

[0004] 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine)는 도금양과(Myrtaceae family)에 속하며 매력적인 잎과 과일을 가지고 있다. 전통적으로, 시디움(*Psidium*)속에 속하는 식물들은 항세균, 저혈당 작용, 항염작용, 진통제, 해열작용, 진경작용, 및 중추신경계 억제작용을 포함한 다양한 용도를 가지고 있어, 민간의약으로도 이용되어 왔다[17]. 종래의 연구결과에 의하면, 구아바(*Psidium cattleianum*)의 잎 및 과일오일로부터 플라보노이드, 이소플라보노이드, 트리테르페노이드, 에센셜오일, 탄닌, 및 휘발성 화합물 등이 검출되었다[18 - 23]. 잎 추출물은 항미생물[24-26], 항염증[27], 및 정자보호능[28]의 효과를 나타낸다고 보고되었다. 최근에는 암세포에서 성장저해 및 세포사를 유도한다는 것이 밝혀졌다[29-32].

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 천연물로부터 암의 전이 및 침윤을 억제할 수 있는 물질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 구아바(*Psidium cattleianum*, Sabine)의 잎 추출물이 암세포의 전이 및 침윤에 필수적인 MMP-9 및 MMP-2

의 활성 및 발현을 억제하고, 암세포의 부착능을 저해함으로써 암의 전이 및 침윤을 억제할 수 있음을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 구아바(*Psidium cattleianum*, Sabine)의 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0008] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 구아바 잎 추출물이 암세포에서 암의 전이 및 침윤 과정에 필수적인 MMP-9 및 MMP-2 효소의 활성 및 발현을 억제한다는 사실을 발견한 것에 기초한다.

[0011] 본 발명의 조성물은 다양한 구아바 종(species) 중에서 스트로베리 구아바(strawberry guava)로도 알려진 "*Psidium cattleianum* Sabine" 구아바의 잎 추출물을 유효성분으로 한다.

[0012] 본 발명에서 구아바 잎 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.

[0013] 본 발명의 구아바 잎 추출물을 추출하기 위한 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 예를 들어 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 상기 본 발명의 추출물은 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올 또는 물로 추출한 것이다.

[0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 구아바 잎 추출물은 상기 용매 추출물의 메탄올, 부탄올, n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 물을 용매로 사용하여 얻은 추가 분획물이며, 보다 더 바람직하게는 부탄올 분획물이다.

[0015] 본 발명의 구아바 잎 추출물은 암세포의 전이 또는 침윤 작용에 필수적으로 요구되는 효소 MMP(matrix metalloproteinase)-9 및 MMP-2의 활성을 억제하고, 이들 효소의 발현을 억제함으로써, 결국 암의 전이 또는 침윤을 억제한다.

[0016] MMPs(matrix metalloproteinases) 패밀리에 속하는 효소들은 배아발달과정, 착상, 기관형성, 신경성장, 배란, 자궁확장, 뼈의 형성, 상처치유, 재생 및 조직리모델링과 같은 정상적인 생리학적 과정에서 세포외기질(extracellular matrix)의 분해를 담당하는 효소로 알려져 있으며, 최근에는 관절염 및 암의 전이와 같은 질병 발달 과정에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Nagase, H., and Woessner, J.F.Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem. 274, 21491-21494). 대부분의 MMPs 단백질은 불활성의 전구체 형태로 분비된 후 세포외 단백질 분해효소의 작용에 의해 활성형의 형태로 변환된다. MMP-2 단백질은 기저막(basement membrane)의 주요한 구성성분인 type IV 콜라겐을 분해하는 활성을 가지며, MMP-9 단백질은 type IV 및 type V 콜라겐을 분해하는 활성을 갖는다. MMP-9 및 MMP-2는 암세포의 전이, 이동 및 침윤에 필수적으로 요구되는 효소로 알려져 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 구아바 잎 추출물은 ERK(extracellular signal-regulated kinase)1/2를 통한 신호전달과정을 저해함으로써, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제한다. ERK 1/2의 인산화는 AP-1(activating protein-1)을 포함하는 세포내 전사인자들을 활성화시켜 결국 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 상향조절(up-regulation)한다.

[0018] 한편, 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본 발명의 구아바 잎 추출물은 암세포의 부착(adhesion) 활성을 억제하였고, 세포의 이동성(motility)도 저해하였으며, 암세포의 침윤능도 억제하는 결과를 보였다.

[0019] 본 발명에서 전이 또는 침윤 억제 대상 암은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립

선암, 기관지암 또는 골수암이고, 가장 바람직하게는 폐암이다.

- [0020] 본 발명의 조성물은 암의 전이 또는 침윤 억제용 약제학적 조성물 형태로 제공될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약제학적 조성물에는 유효성분으로서 구아바 잎 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0023] 본 발명의 약제학적 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. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.
- [0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 구아바 잎 추출물의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 암의 전이 또는 침윤 억제용 기능성 식품 조성물 형태로 제공될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서 구아바 잎 추출물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0030] (i) 본 발명은 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물의 암 전이 또는 침윤 억제에 관한 신규한 용도에 관한 것이다.
- [0031] (ii) 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암세포의 전이 또는 침윤에 필수적으로 관여되는 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제함으로써 암세포의 항-전이 및 항-침윤 효능을 갖는다.
- [0032] (iii) 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암의 전이 또는 침윤 억제용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명은 구아바 (*P. cattleianum* Sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 암의 전이 또는 침윤 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분 구아바 잎 추출물은 암세포에서 암의 전이 및 침윤에 필수적으로 관여되는 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제함으로써 암세포의 항-전이 및 항-침윤 효능을 나타낸다. 본 발명의 구아바 잎 추출물은 암의 전이 또는 침윤 억제 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034]

도 1a는 폐암세포주인 H1299 세포내에서 젤라틴 분해 활성에 미치는 다양한 구아바 잎 분획물의 영향을 측정한 결과이다. 세포들을 구아바 잎의 6가지 분획물[메탄올분획(MF), 부탄올분획 (BF), 클로로포름분획(CF), n-헥산 분획(HF), 수용성분획(WF), 및 에틸아세테이트분획(EAF)]으로 24시간 처리하였다. MMP-2(72 kDa) 및 MMP-9(92 kDa)의 활성은 젤라틴 자이모그래피(gelatin zymography)를 사용하여 평가하였다. 밴드의 밀도값은 비처리 (non-treated, NT) 세포의 값(1.0)과 비교하여 표시하였다.

도 1b는 H1299 세포내에서 세포 생존율에 미치는 구아바 잎 분획물의 영향을 측정한 결과이다. 5×10^3 세포를 96-웰 플레이트상에 접종한 후에, 구아바 잎의 다양한 분획[메탄올 분획(MF), 부탄올분획 (BF), 클로로포름 분획(CF), n-헥산분획(HF), 수용성분획(WF), 및 에틸아세테이트분획(EAF)]을 $100 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24 시간 동안 H1299 세포에 처리하였다. 세포 생존율은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다.

도 1c는 구아바 부탄올분획물(GBF)이 MMP-2 및 MMP-9의 활성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 세포를 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하였다. GBF가 MMP-2(72 kDa) 및 MMP-9 (92 kDa)의 활성에 미치는 영향은 젤라틴 자이모그래피를 사용하여 평가하였다. 밴드의 밀도값은 비처리(NT) 세포의 값(1.0)과 비교하여 나타내었다.

도 1d는 GBF가 H1299 세포의 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 세포들을 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하였다. 세포 생존율은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. 비처리군(NT)과 비교한 경우 $***P < 0.001$.

도 2a는 GBF가 H1299 세포에서 세포-매트릭스(cell-matrix)간 상호작용에 미치는 영향을 측정한 결과를 보여준다. 2×10^4 세포들을 Matrigel-코팅된 96-웰내에 접종하고, 4 시간 동안 인큐베이션한 후에, 비-부착성 세포들을 제거하고, 부착성 세포는 MTT 분석법에 의해 정량하였다.

도 2b는 GBF가 H1299 세포의 세포 침윤능에 미치는 영향을 평가한 결과이다. 침윤능 분석은 48-웰 보이든 챔버 (Boyden chamber)를 사용하여 수행하였다. 실험을 수행하고, 무작위로 선택한 챔버 영역을 100X 배율의 광학현 미경하에서 사진 촬영하였다.

도 2c는 GBF가 H1299 세포의 세포 침윤능에 미치는 영향을 정량적으로 나타낸 결과이다. 침윤된 세포의 수를 측정하였다. GBF가 농도 의존적 방식의 세포의 침윤을 억제하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SD으로 표시하여 나타내었다. GBF 및 대조군 사이의 통계학적으로 유의한 차이는 Student's test에 의해 산출하였다($***P < 0.001$).

도 3은 H1299 세포에서 MMP-2, MMP-9, 및 uPAR의 발현에 대한 GBF의 영향을 측정한 결과, MAPK 및 AKT 신호 전달 경로에 미치는 GBF의 영향을 측정한 결과를 보여준다.

패널 A: 세포를 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하였다. $20 \mu\text{g}$ 의 단백질을 포함하는 세포 용해액을 젤상에서 분리하고, 니트로셀룰로오스막으로 이전시키고, MMP-2 및 MMP-9에 대한 항체로 탐침하였다.

패널 B: 세포를 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하였다. MMP-2 (970 bp), MMP-9 (380 bp), 및 uPAR (253 bp)의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR 분석에 의해 측정하였다.

패널 C: 세포용해물을 젤상에서 분리하고, 니트로셀룰로오스막으로 이동시키고, CXCR4에 대한 항체를 사용하여 탐침하였다. β -액틴은 로딩 대조군으로 사용하였다.

패널 D 내지 패널 G는 MAPK 및 AKT 신호전달 경로에 미치는 GBF의 영향을 측정한 결과이다. H1299 세포들을 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 처리하였다. 이어서, 동일한 양의 용해물을 phospho-ERK, ERK에 대한 항체(패널 D), phospho-p38, p38에 대한 항체(패널 E), phospho-JNK, JNK에 대한 항체(패널 F), phospho-AKT, AKT에 대한 항체(패널 G)를 사용하여 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다. 밴드의 밀도값은 이들의 총 형태에 기초하여 수정하였고, 비처리세포의 것(1.0으로 설정)과 비교하여 나타내었다.

도 4a는 GBF가 H1299 세포의 이동성(motility)에 미치는 영향을 측정한 결과이다. H1299 세포를 컨플루언트 단 일층이 형성될 때까지 완전 배지내에서 6-웰에 접종하였다. 세포를 $200 \mu\text{l}$ 의 틱을 사용하여 긁어내고 상처를

가하였다. 이어서, 세포를 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하였다. 대표 영역을 100x 확대비율로 사진촬영하였다.

도 4b는 GBF가 H1299 세포의 이동성에 대해 미치는 영향을 정량적으로 표시한 그래프이다. 데이터는 평균±SD 으로서 표시하였고, n = 3웰이다. 비처리군과 비교하여 **P < 0.01 및 ***P < 0.001이다.

도 5는 LC-MS/MS SIM 분석에 의해 구아바 잎의 부탄올 분획에서 확인된 화합물에 관한 것이다. 패널 A는 280 nm에서 주요 피크의 HPLC-PDA 스펙트럼을 보여준다. 패널 B-E는 각각 화합물 1, 7, 3, 및 4에 대한 선택 이온에 대한 ESI+ MS 스펙트럼이다.

도 6은 GBF의 주요 화합물에 대한 ESI+ MS 및 UV 스펙트럼을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0036] 실시예

[0037] 실험재료 및 방법

[0038] 1. 구아바 재료

[0039] 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎은 제주 농장으로부터 수집하였다. 붉은 빛의 어린 잎과 녹색의 성숙한 잎으로 구성되어 있었다. 증거 표본(16/2010)은 제주대학교에 기탁하였다.

[0040] 2. 추출물의 제조

[0041] 공기 건조된 구아바 잎을 분말화시키고 간헐적인 초음파 분쇄와 함께 80% 메탄올로 상온에서 3 일간 추출하였다. 추출물을 여과한 후, 감압조건하에서 진공 로터리 증발기로 농축시키고 동결건조하였다. 메탄올 추출물들을 물에 현탁하고, 4 종류의 상이한 용매를 사용하여 계단식 단계를 거쳐 추가 분획하였다. 수득한 분획은 다음과 같았다: n-헥산 분획(HF), 클로로포름 분획(CF), 에틸아세테이트 분획(EF), n-부탄올 분획(BF), 및 수용성 분획(WF)이다. 추출물 분말은 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹이고, PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4)으로 희석하여 최종 농도로 제조하였다.

[0042] 3. 화합물

[0043] MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]는 Sigma(St. Louis, MO)으로부터 구입하였다. MMP-2(matrix metalloproteinase-2), MMP-9(matrix metalloproteinase-9), β-액틴, 및 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)으로부터 구입하였다. Phospho-ERK1/2, ERK, phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38, phospho-AKT (Ser473), AKT 항체들은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)으로부터 구입하였다.

[0044] 4. 세포 배양

[0045] 폐암세포주 H1299 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린(100 units/ml) 및 스트렙토마이신(100 μg/ml)이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂ 및 95% 공기의 습화된 분위기내에서 37℃ 온도에서 배양하였다. 세포배양과 관련된 모든 실험은 세포를 접종하고 하루 후에 행하였다.

[0046] 5. MTT 분석

[0047] 세포 생존율은 NADH-의존성 디히드로게나아제(NADH-dependent dehydrogenase) 활성을 검출하는 MTT 분석에 의

해 측정하였다. 1xPBS(phosphate-buffered saline)에 용해시킨 50ml의 MTT 용액(5 mg/ml)을 세포에 직접 가하고, 4 시간 동안 인큐베이션하여 MTT가 포르마잔(formazan)으로 대사되도록 하였다. 흡광도는 570 nm의 파장에서 자동화된 분광학적 플레이트 리더를 사용하여 측정하였다. 세포의 생존율은 비처리 대조군과 비교하여 상대 백분율로 정상화하였다.

6. 젤라틴 자이모그래피(Gelatin Zymography)

젤라티나아제(gelatinase)활성은 공지된 프로토콜을 사용하여 젤라틴 자이모그래피에 의해 측정하였다. H1299 세포를 구아바 잎으로부터 얻은 다양한 분획물로 24 시간 동안 처리하였다. 배양배지를 수집하고, 1ml을 취하여 제조사의 지시에 따라 Amicon Ultra concentrators (Millipore)를 사용하여 농축하였다. 농축된 샘플을 비-환원 샘플 버퍼와 함께 0.1% 젤라틴을 포함하는 10% SDS-PAGE상에 로딩하고, 전기영동을 수행하였다. 젤을 2.5% Triton X-100 용액으로 30 분간 2회 세척하고, 10 mM Tris-HCl 버퍼(pH 8.0)로 진탕과 함께 30분간 세척하여 SDS를 제거한 후에, 젤을 0.5 mM CaCl₂ 및 0.1 μM ZnCl₂을 포함하는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 내에서 37°C에서 18 시간 동안 인큐베이션하여 MMPs를 활성화시켰다. 활성화된 젤을 10% 메탄올 및 5% 아세테이트내에서의 1% Coomassie Blue R-250으로 염색하고, 이어서, 10% 메탄올 및 5% 아세테이트 용액으로 탈염색하였다. 각 젤라티나아제의 젤라틴 분해 활성은 파란색 배경에 대한 깨끗한 밴드를 확인하여 검출하였다.

7. 세포-매트릭스 부착 분석(Cell-matrix adhesion assay)

96웰-플레이트를 Matrigel(100 μg/웰; BD, San Jose, CA)으로 코팅하고 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 비-특이적 결합 부위를 PBS내의 0.1% BSA (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA)를 사용하여 37°C에서 1 시간 동안 블로킹한 후, PBS로 세척하고, 공기로 건조하였다. H1299 세포를 무혈청 RPMI 1640 배지내에서 다양한 농도의 구아바 잎 부탄을 분획물(GBF)으로 30분간 전처리하고, 코팅된 웰에 2 X 10⁴ 세포/웰의 농도로 가하였다. 37°C에서 10분간 인큐베이션한 후에, 비-부착성 세포들은 PBS으로 세척하여 제거하였다. 부착성 세포는 MTT 분석을 행하여 정량하였다. 50 μl의 MTT/PBS 용액을 각 웰에 가하고, 37°C에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 흡광도는 570 nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 측정하였다.

8. 침윤 분석(Invasion Assay)

인 비트로 침윤 분석은 48-웰 마이크로 화학주성 보이든 챔버(Boyden chamber; Nuero Probe, Cabin john, MD)를 사용하여 행하였고, 폴리카보네이트 막(8 μm pore size, Corning, NY, NY)를 사용하여 세포를 화학유인물질로부터 분리하였다. 폴리카보네이트 막은 Matrigel(0.5 mg/ml; BD, San Jose, CA)으로 코팅하고 건조시켰다. 하부 챔버 웰은 화학유인원으로서 0.1% BSA를 포함하는 H1299 세포의 24시간 배양물로부터의 무혈청 조건화 배지로 채우고, matrigel-코팅된 막으로 덮었다. H1299 세포(2 X 10⁴ 세포/웰)을 무혈청 배지내에 지시된 농도로 포함된 GBF으로 전처리하고, 이어서 30 μl의 세포현탁액을 상부 챔버 웰안으로 첨가하였다. 세포들을 37°C에서 8 시간 인큐베이션한 후에, 막의 상부에서 침윤되지 않은 세포들을 면봉으로 닦아내고, 막을 통과하여 침윤한 세포들은 고정한 후에 Diff-Quick (Merck Corp., Darmstadt, Germany)으로 염색하였다. 염색된 세포들은 광학 현미경하에서 무작위로 선택된 필드내에서 계수하였다.

9. RT-PCR(Reverse Transcriptional Polymerase Chain Reaction)

H1299 세포(5 X 10⁵ 세포/웰)는 다양한 농도의 구아바 부탄을 분획물(GBF)으로 24 시간 동안 처리하고, 총 RNA는 TRI 시약(Invitrogen)을 사용하여 분리하였다. 총 RNA는 oligo (dT)₁₅ 프리믹스(Intron, Korea)를 사용하여 cDNA으로 역전사하였다. 다음의 전방향 및 역방향 프라이머 서열을 사용하였다:

MMP-2: 5' -TATGGCTCTGCGCTGAGAC-3' 및 5' -TCCAACTTCACGCTCTCA-3' ;

MMP-9: 5' -TTGAGGAGCGGCTCTCCAAG-3' 및 5' -CGGTCCTGGCAGAAATAGGC-3' ;

GAPDH: 5' -TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' 및 5' -CACAAATGCCGAAGTGGTCGT-3' ;

[0059] uPAR: 5' -CATGCAGTGTAAACACCAACGGGA-3' 및 5' -AATAGGTGACAGCCCGCCAGAGT-3' .

[0060]

[0061] **10. 웨스턴 블로팅 분석**

[0062] H1299 세포를 지시된 농도의 구아바 부탄을 분획물(GBF)으로 처리한 후, 세포를 용해시키고 총 단백질 농도는 Bradford 시약(Bio-Rad, Hercules, CA)으로 측정하였다. 동등한 양의 세포 용해물을 SDS-PAGE상에서 분리하여, 니트로셀룰로오스막으로 이전시키고, 니트로셀룰로오스막은 0.1% Tween 20 및 5% 탈지유를 포함하는 1xTBS으로 블로킹하였다. 블로킹한 후에, 막은 각각의 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 2회 세척하고, HRP(horseradish peroxidase)-컨쥬게이트된 2차 항체(1:10000)와 함께 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 3회 세척한 후에, 막을 ECL(enhanced chemiluminescence) kit (Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 검출을 행하였다.

[0063] **11. 상처 치유 이동 분석(Wound Healing Migration Assay)**

[0064] H1299 세포(5×10^5)를 웰 플레이트상에 접종하고 CO₂ 인큐베이터내에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 컨플루언트 세포는 200 μ l 텡으로 긁어내었다. 상처입은 세포들을 지시된 농도의 구아바 부탄을 분획물(GBF)에 노출시켰다. 24 시간 동안 인큐베이션한 후에, 세포들을 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 현미경하에서 분석하였다.

[0065] **12. HPLC-PDA-ESI-MS/MS 분석**

[0066] 잎 추출물의 GBF (1 mg)을 아세토니트릴/물 (50/50, v/v) 혼합물에 용해시키고, PTFE 0.20- μ m 시린지 필터 (Advantec, Tokyo, Japan)를 통과시켜 여과하고, 2 μ l를 HPLC 컬럼에 주입하였다. HPLC-PDA-ESI-MS 분석은 Thermo Scientific Surveyor HPLC와, 40℃에서 전자분무화이온화(electrospray ionization) (ESI; Bruke esquire 3000 plus)와 함께, 280 nm에 세팅된 photodiode-array detector (PDA)와 커플링된, LTQ linear ion trap 질량분석기(Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. UV 스펙트럼은 200-700 nm 범위에서 스캔하였다. 크로마토그래피 분리는 용리액 A (H₂O + 0.05% TFA) 및 용리액 B (아세토니트릴 + 0.05% TFA)을 사용하여 200 μ l/분의 유속으로 Hypersil GOLD C18 컬럼(100 X 2.1 mm; I.D., 1.9 μ m)상에서 다음의 용출 농도구배에 따라 수행하였다: 0-5 분, 95% A; 5-15 분, 85% A; 15-28 분, 40% A; 28-33 분, 20% A, 및 33-40분, 95% A. ESI 실험은 포지티브 및 네가티브 모드로 수행하였다. 세팅은 다음과 같았다: 측정 질량 범위 m/z 150-1000; 이온 트랩 온도, 275℃; Em, 5.0 kV; 건조 N₂, 10 ml/분; 분무 N₂, 30 psi; 쉬스 (sheath)가스 흐름, 30 units; 모세관 전압, 9 V; 및 충돌 가스, 헬륨. 1차 정량분석을 수행하기 위해, 관찰된 모든 피크의 피크 영역 조사를 행하였다. 잠정적인 구조 확인 작업은 각 화학종의 선택된 이온 크로마토그램과 함께 관심의 이온을 질량선택함으로써 수행하였다. MSⁿ 스펙트럼은 오토 MS² 모드(베이스 피크의 생성 이온을 다음 단계 MS에 대한 전구체 이온으로서 자동으로 선택함)에서 얻었고 추가의 구조적인 정보가 제공되었다. 기계 조작 및 데이터 수집은 상업적 구입 가능한 소프트웨어 Xcalibur (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) 사용하여 행하였다.

[0067] **13. 통계학적 분석**

[0068] 모든 수치값들은 평균 $\pm$ SD으로 표시하였다. 비처리 대조군과 비교한 데이터들의 통계학적 유의성은 Student unpaired t-test를 사용하여 결정하였다. 유의성은 P < 0.05으로 정하였다.

[0069] **실험결과**

[0070] **1. 구아바 잎의 다양한 추출 분획물은 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제한다.**

[0071] 세포의 침윤(invasion)는 세포 매트릭스(matrix) 구성성분의 분해가 요구되므로, 젤라틴 자이모그래피(gelatin

zymography)에 의해 구아바 잎의 6가지 분획물[메탄올 분획(MF), 부탄올분획(BF), 클로로포름분획(CF), n-헥산 분획(HF), 수용성분획(WF) 및 에틸아세테이트 분획(EAF)]이 H1299 세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 분비에 미치는 영향을 조사하였다. H1299 세포를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 각 분획으로 24 시간 동안 처리하고, MMP-2 및 MMP-9의 활성화에 미치는 영향을 측정된 결과, 6가지 분획 모두는 MMP-2 및 MMP-9 활성을 강력하게 억제하였다(도 1a 참조). 한편, 젤라틴 자이모그래피 밴드의 밀도 측정값으로부터, H1299 세포에서 상기 분획물중에서도 구아바 부탄올분획물(GBF)이 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 가장 강력하게 억제하였음을 확인하였다. 따라서, GBF를 선택하여 암세포의 항-전이활성(anti-metastatic activity)을 평가하였다.

2. GBF는 암세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는다.

구아바 부탄올분획(GBF)에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제하는 것이 세포 사멸에 기인한 결과가 아니라는 것을 입증하기 위해, 제주 구아바 잎의 6가지 분획물의 암세포에 대한 세포독성 효과를 측정하였다. 세포독성 측정은 MTT 분석을 사용한 세포 생존율을 평가하여 행하였다. 실험결과, n-헥산 분획(HF) 및 에틸아세테이트 분획(EAF)을 제외한, 메탄올분획(MF), 부탄올분획(BF), 클로로포름분획(CF), 및 수용성분획(WF)은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 암세포 H1299의 세포독성을 일으키지 않았다(도 1b 참조).

3. GBF는 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 가장 강력하게 억제한다.

GBF가 MMP-2 및 MMP-9 활성을 억제하는지를 조사하였다. H1299 세포를 다양한 농도의 GBF으로 24 시간 동안 처리하고, 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. 실험 결과, GBF는 용량-의존적 방식으로 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 억제하였다(도 1c 참조). 이러한 억제 활성은 GBF 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으나, GBF는 150 - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의성 있게 세포독성을 나타내었다(도 1d 참조).

4. GBF는 암세포의 세포 부착(cell adhesion)을 억제한다.

세포-매트릭스(cell-matrix) 상호작용은 종양세포의 이동(locomotion) 및 단백질분해효소의 발현에 영향을 미치기 때문에 암세포의 침윤에 있어서 매우 중요한 요소이다. 따라서, 암세포에서 세포-매트릭스 상호작용에 대한 GBF의 영향을 조사하였다. 실험결과, GBF가 농도의존적 방식으로 Matrigel에 대한 암세포의 부착을 감소시킨다는 것이 확인되었다(도 2a 참조).

5. GBF는 암세포의 침윤(invasion)을 억제한다.

GBF가 암세포 H1299 세포의 침윤 활성을 억제하는 효능이 있는지 평가하기 위해 보이든 챔버(Boyden chamber) 분석을 행하였다. 이 분석방법은 Matrigel 코팅된 막상에서 세포외기질(extracellular matrix) 시트를 통과하는 세포의 능력을 측정하는 방법이다. 도 2b 및 도 2c의 결과에서 보여지는 바와 같이, GBF는 용량 의존적 방식으로 H1299 세포의 침윤을 억제함을 확인하였다.

6. GBF는 MMP-2 및 MMP-9 단백질 및 이들의 mRNA 수준을 하향조절한다.

GBF가 암세포(H1299)에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 도 3의 패널 A에서 보여지는 바와 같이, GBF으로 전처리한 경우 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현 수준이 용량 의존적 방식으로 억제되었다. MMP-2 및 MMP-9의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR 분석을 행하였다. 도 3의 패널 B에서 보여지는 바와 같이, H1299 세포를 GBF으로 전처리한 경우, MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 수준이 용량 의존적 방식으로 억제되었다.

7. GBF는 uPAR의 mRNA 수준을 하향 조절한다.

uPA(urokinase plasminogen activator) 및 이의 수용체(uPAR)에 의해 매개되는 신호전달은 다양한 종류의 암에 있어서, 종양세포의 침윤, 생존 및 전이와 밀접하게 관련되어 있다. 따라서, GBF의 암세포 침윤 및 전이에 미

치는 영향을 알아보기 위해, GBF가 H1299 세포내에서 uPAR 유전자 발현을 억제하는지에 대해서 조사하였다. 실험결과, GBF가 uPAR의 mRNA 발현 수준을 용량 의존적 방식으로 억제함을 확인하였다(도 3의 패널 B 참조).

[0084]

8. GBF는 CXCR4 발현에는 유의한 영향을 미치지 않는다.

[0085]

케모카인 수용체 CXCR4 및 이의 리간드 SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) 경로는 종양 세포의 전이성 운명을 결정하는데 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다. 따라서, GBF가 세포내에서 CXCR4 단백질 수준을 억제하는지 여부를 조사하였다. 도 3의 패널 C에서 보여지는 바와 같이, GBF는 각 지시된 농도에서 CXCR4 단백질의 발현을 억제하지 않았다. 이는 GBF의 항-전이 효능이 MMP-2 및 MMP-9 활성의 억제를 통한 결과이며, CXCR4/SDF-1 경로 억제에 의한 결과가 아님을 암시한다.

[0086]

9. GBF는 MAPK 신호전달 경로를 조절한다.

[0087]

GBF에 의한 MMP-2 및 MMP-9 활성의 억제가 H1299 세포상에서 MAPK 및 AKT 경로에 관련되어 있는지를 조사하였다. GBF는 ERK(extracellular signal-regulated kinase)1/2의 인산화를 약화시켰으나(도 3의 패널 D 참조), 반면, GBF 처리에 의해 p38 및 JNK에서의 인산화는 농도 의존적 방식으로 증가되었다(도 3의 패널 E 및 패널 F 참조). 또한, GBF는 AKT의 인산화에 영향을 미치지 않았다(도 4의 패널 G 참조).

[0088]

10. GBF는 암세포에서 세포 이동(cell migration)을 억제한다.

[0089]

세포 이동을 모니터링하기 위해, 상처 치유 이동 분석(wounding healing migration assay)을 행하였다. H1299 세포들을 200 μ l 틱으로 긁은 후에, GBF를 처리하였다. 그 결과, GBF가 스크래치된 부위 내부의 세포 이동을 용량 의존적 방식으로 유의성 있게 억제하였음을 알 수 있었다(도 4a 참조). 세포의 이동을 스크래치된 부위에서 세포의 강도를 측정함으로써 정상화하여 그래프로 나타내었다(도 4b 참조). 이상의 실험 결과들을 종합하면, GBF가 암세포의 부착, 침윤 및 이동을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0090]

11. GBF 분획물의 LC-PDA-ESI-MS/MS를 사용한 화학적 분석결과

[0091]

GBF의 활성성분에 대한 정보를 얻기 위해 비-타겟 LC-PAD-MS/MS 화학분석을 행하였다. 도 5은 280 nm의 UV에서의 GBF의 주요 피크들에 대한 HPLC 스펙트럼을 보여준다. 화합물들은 모분자 이온, UV 값, 머무름시간(retention time), 및 용출순서와 함께 문헌들에서 기술된 단편화 패턴을 참고하여 잠정적으로 확인하였다. LC/UV에 의해서는 분획물내에서 확인된 화합물들의 정확한 정량적 분석이 어려웠는데, 이는 대응하는 표준 화합물이 없었을 뿐만 아니라 피크가 서로 겹치고 광범위하게 위치하였기 때문이었다. 따라서, 잠정적으로 확인된 화합물들의 상대적 피크 영역의 백분율을 사용하여 부탄올 분획물을 구성하는 성분들의 상대적인 양을 추정하였다. D-글루쿠론산(d-glucuronic acid), 퀘르세틴-3-글루쿠로나이드(quercetin-3-glucuronide), 로가닌(loganin), 크산티레틴(xanthyletin), 몇몇의 쿠마린(coumarin) 유도체 및 몇 개의 알려지지 않은 화합물들이 확인되었다(표 1 참조).

표 1

Peak No.	RT (min)	UV data	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	compound	% of RA
1	1.37	225,273	195.25		D-glucuronic acid	14.7
2	7.91	214,290		465.23	unknown	3.6
3	10.10	255,353	479.12		Quercetin-3-glucuronide	25.2
5	11.31	265,346	391.45		Loganin	2.9
6	13.79	214,274		683.12	unknown	2.8
7	28.33	228,277	229.24		Coumarin Derivative	1.7
8	29.78	228,277	229.23		Xanthyletin	3.1
9	30.85	229,280		613.25	Coumarin Derivative	1.7

[0092]

[0093] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

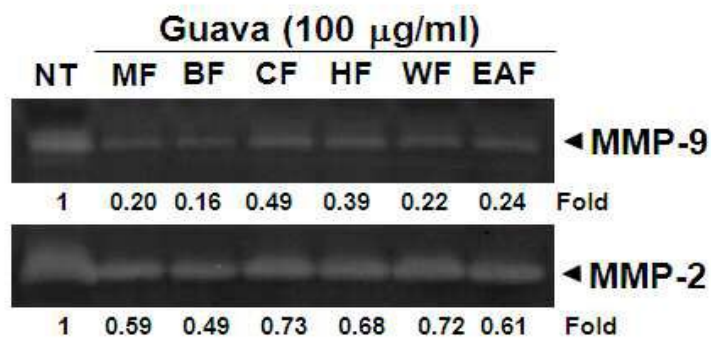
[0094] 참고문헌

- [0095] [1] Cytometry 1989;10:673-80.
- [0096] [2] Virchows Arch 1999;435:566-73.
- [0097] [3] Faseb J 1999;13:781-92.
- [0098] [4] Cell 1991;64:327-36.
- [0099] [5] Mol Cell Biochem 2003;253:31-40.
- [0100] [6] Anticancer Res 2001;21:4207-19.
- [0101] [7] Nat Rev Cancer 2002;2:161-74.
- [0102] [8] Oncogene 2001;20:4209-18.
- [0103] [9] J Clin Invest 1997;99:1478-83.
- [0104] [10] Int J Cancer 2000;89:384-8.
- [0105] [11] J Biol Chem 1999;274:4347-53.
- [0106] [12] J Biol Chem 1996;271:10672-80.
- [0107] [13] Clin Exp Metastasis 1998;16:205-15.
- [0108] [14] Cancer Metastasis Rev 2003;22:395-403.
- [0109] [15] Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2006;6:17-24.
- [0110] [16] Clin Chim Acta 2007;381:69-77.
- [0111] [17] Phytochemistry 2002;61:399-403.
- [0112] [18] J Appl Microbiol 2006;101:487-95.

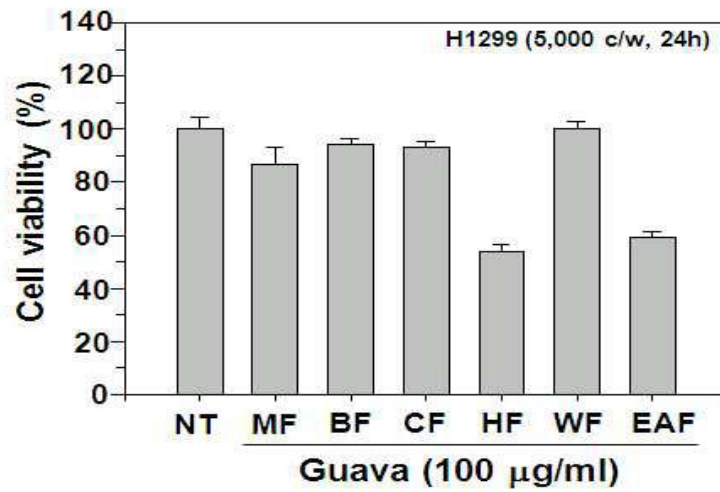
- [0113] [19] Biochemical Systematics and Ecology 2005;33:983-992.
- [0114] [20] Phytochemistry 1974;13:2015-2016.
- [0115] [21] Zhong Yao Cai 1999;22:78-80.
- [0116] [22] Chem Pharm Bull 1992;40:2092-2098.
- [0117] [23] J Agric Food Chem 2001;49:5883-7.
- [0118] [24] Am J Chin Med 2005;33:197-204.
- [0119] [25] J Ethnopharmacol 2004;90:135-43.
- [0120] [26] Caries Res 2008;42:148-54.
- [0121] [27] Phytother Res 2008;22:1030-4.
- [0122] [28] Niger Postgrad Med J 2007;14:273-6.
- [0123] [29] Cancer Lett 2006;235:114-20.
- [0124] [30] J Agric Food Chem 2009;57:6114-22.
- [0125] [31] Nutr Cancer 2010;62:260-70.
- [0126] [32] Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2009;80:239-45.

도면

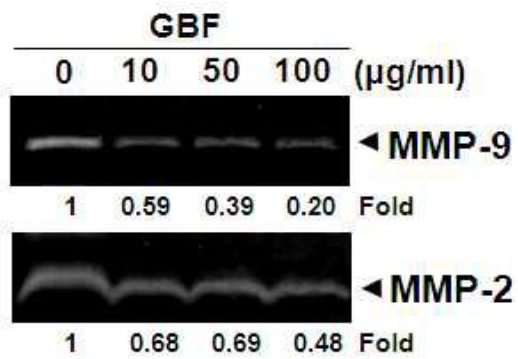
도면1a



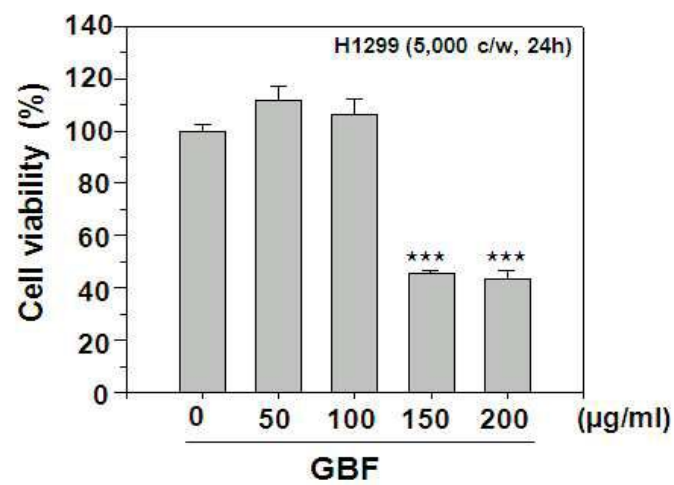
도면1b



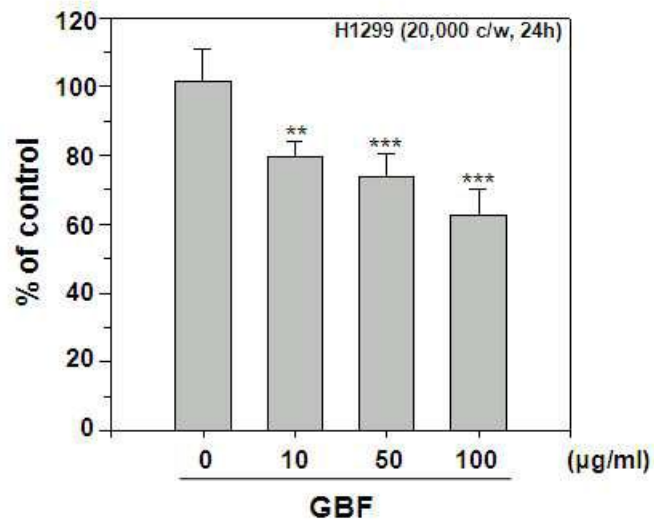
도면1c



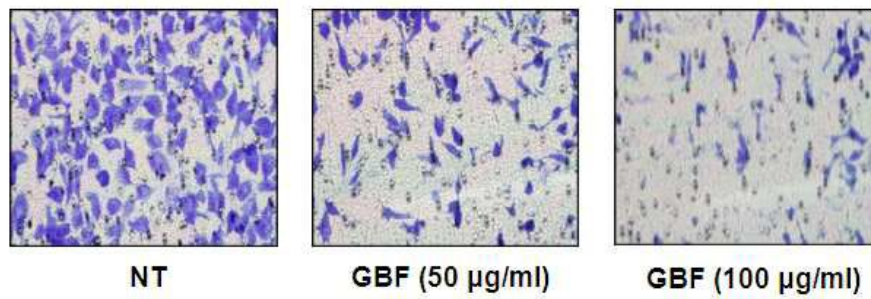
도면1d



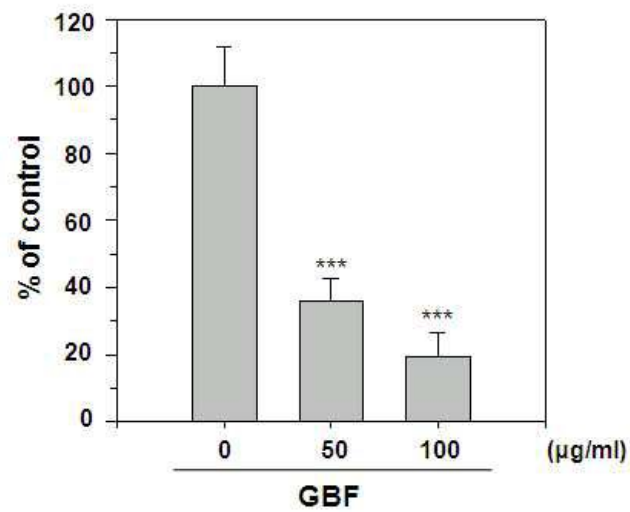
도면2a



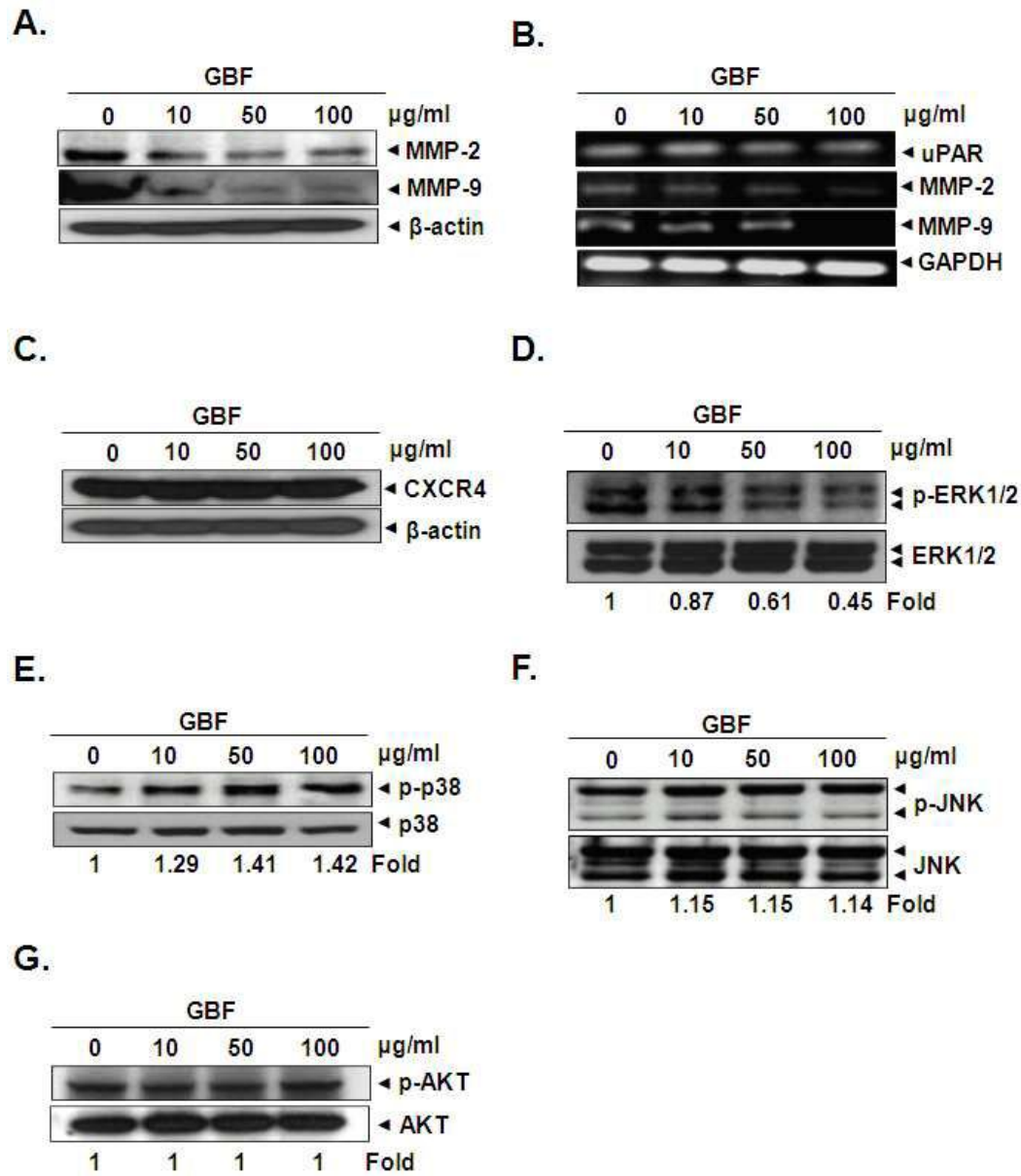
도면2b



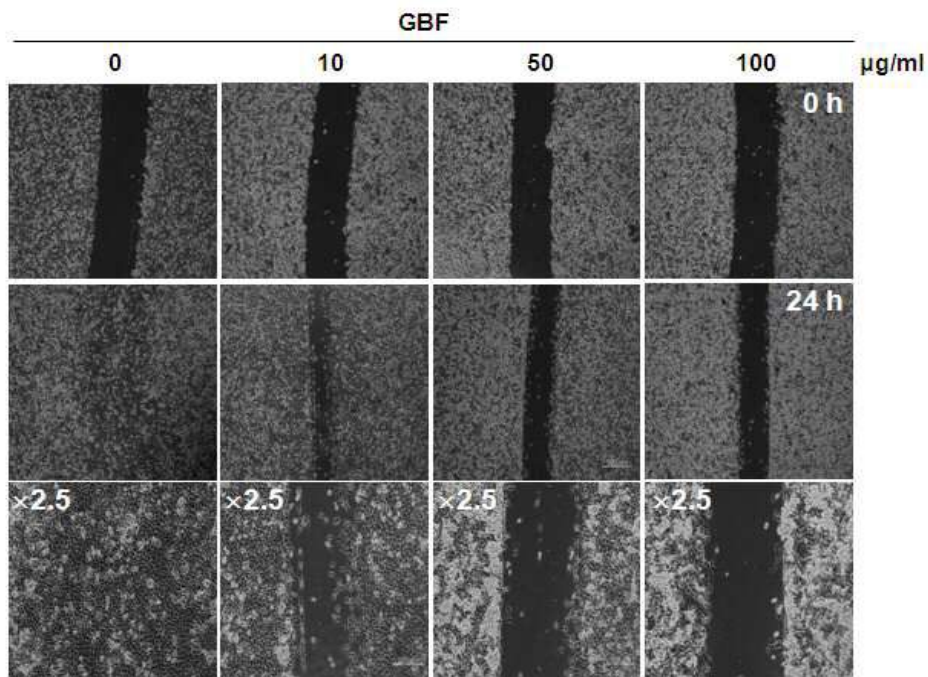
도면2c



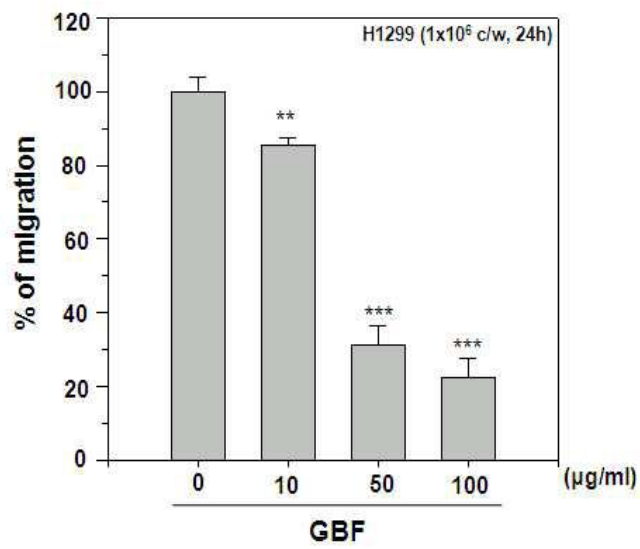
도면3



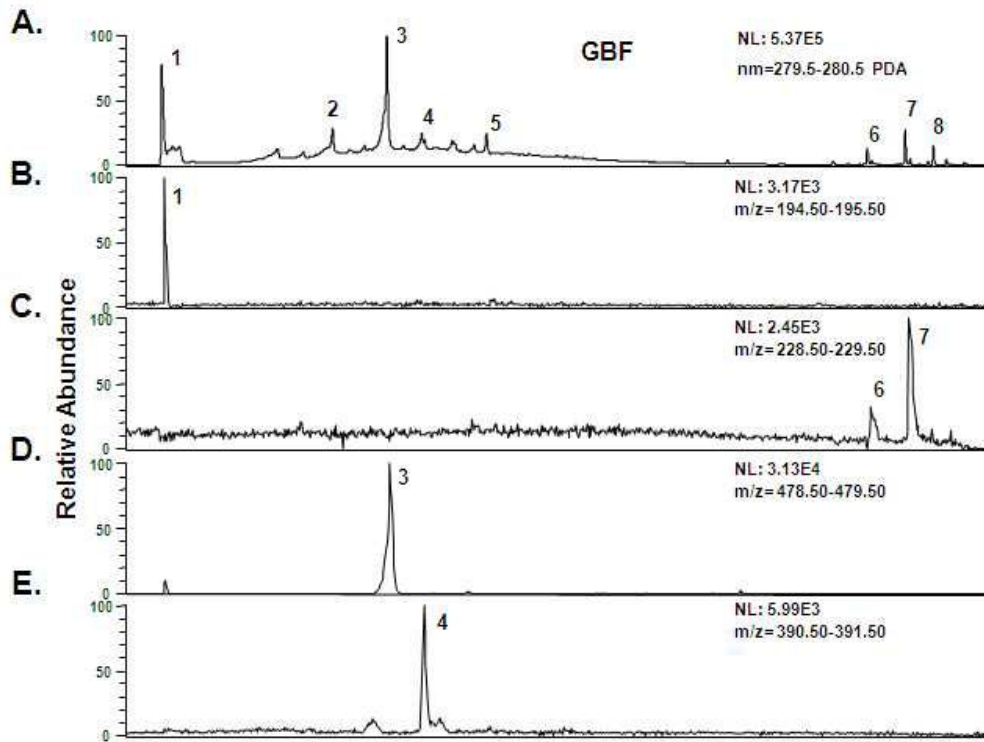
도면4a



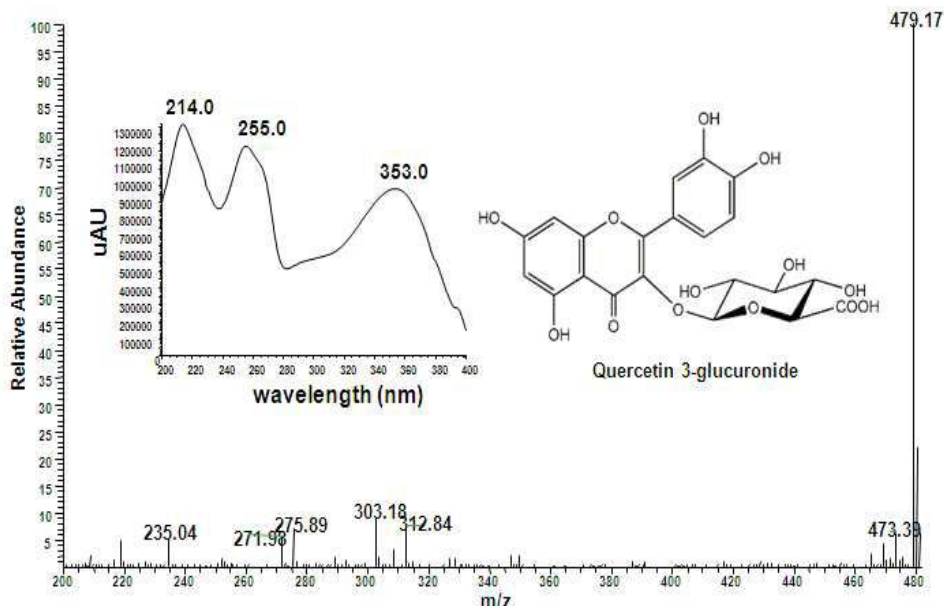
도면4b



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Jeju National University
Industry-Academic Cooperation Foundation Kyung Hee University
- <120> Composition for Inhibiting Metastasis or Invasion of Cancer
Comprising Extract from Leaf of Psidium cattleianum As Active
Ingredient

<160> 8
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 1
 tatggcttct gccctgagac 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 2
 tccaaacttc acgctcttca 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 3
 ttgaggagcg gctctccaag 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCR primer
 <400> 4
 cggtcctggc agaaataggc 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	5	
	tcaccatctt ccaggagcga	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	6	
	cacaatgccg aagtggcgt	20
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	7	
	catgcagtgt aagcaccaac gggga	25
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	8	
	aataggtgac agcccgcca gagt	24