(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월03일
(11) 등록번호 10-1793379
(24) 등록일자 2017년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0075792
(22) 출원일자 2016년06월17일
심사청구일자 2016년06월17일
(56) 선행기술조사문헌
논문1(인천대학교,2015)*
논문2(동신대학교,2011)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이승호
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대학교 29호관614호
류수진
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 인천대학교 29호관614호
(74) 대리인
차준용

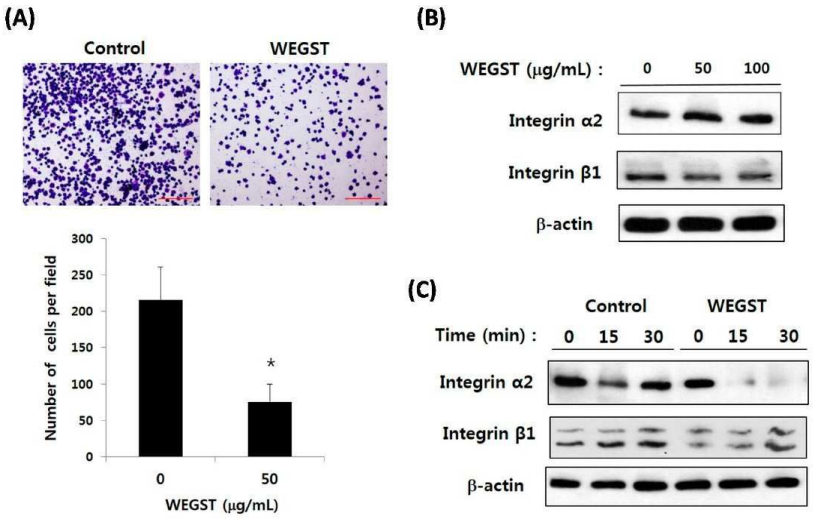
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 **조각자 가시 추출물을 함유하는 전립선암 전이 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 조각자 가시(*Gleditsia sinensis* thorn; GST) 추출물을 함유하는 전립선암(Prostate cancer) 전이(Metastasis) 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 조각자 가시의 물 추출물을 유효성분으로 적용함으로써, α2β1 인테그린(α2β1 integrin)의 발현을 선택적으로 저해하여 전립선 암세포 전이의 중요한 한 과정인 콜라겐(Collagen) 대응 부착(Adhesion) 및 이동(Migration) 과정을 특이적으로 약화시킴에 따라 세포독성을 유발하지 않는 낮은 투여량으로도 전립선 암세포의 전이를 효과적으로 억제할 수 있는, 조각자 가시 추출물을 이용한 전립선암 전이 억제용 조성물, 이를 포함하는 전립선암 전이 억제용 항암제 조성물, 및 전립선암 전이의 예방 및 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

조각자 가시(*Gleditsia sinensis* thorn; GST) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선암(Prostate cancer) 전이(Metastasis) 억제용 조성물로서,

콜라겐에 대한 수용체 분자인 α2β1 인테그린(α2β1 integrin)의 발현을 선택적으로 저해하여, 전이 대상세포의 세포외 기질(Extracellular matrix; ECM)인 콜라겐(Collagen)에 의해 매개되는 전립선 암세포의 부착(Adhesion) 및 이동(Migration)을 특이적으로 약화시킴에 따라, 전립선 암세포의 전이(Metastasis)를 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조각자 가시 추출물은 조각자 가시의 물 추출물(Water extract of GST; WEGST)인 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조각자 가시 추출물은 조각자 가시의 열수 추출물인 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 조각자 가시 추출물은 조각자 가시를 열수 추출하고, 상등액을 여과 및 농축한 후, 동결건조하여 수득되는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 전립선 암세포는 PC3 세포인 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 조각자 가시 추출물은 PC3 전립선 암세포의 콜라겐-매개 세포내 FAK(Focal adhesion kinase) 신호를 억제

하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 세포내 FAK 신호는 FAK의 인산화반응(Phosphorylation)인 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 콜라겐은 콜라겐 I(Collagen I)인 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 전립선암 전이 억제용 조성물은 조각자 가시의 물 추출물(WEGST)을 함유하는 것이며, 전립선암 환자에게 경구 투여(Oral administration)되는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 경구 투여되는 전립선암 전이 억제용 조성물은 조각자 가시 추출물을 30~200 μg/mL의 농도로 함유하는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 전립선암 전이 억제용 조성물은 세포에 대한 비-독성 수준(Non-toxicological level)으로 경구 투여되는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 경구 투여되는 전립선암 전이 억제용 조성물은 조각자 가시 추출물을 50 μg/mL의 농도로 함유하는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 경구 투여는 조각자 가시의 물 추출물(WEGST)을 25 mg/kg/day의 양으로 경구 투여하는 것을 특징으로 하는,

전립선암 전이 억제용 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는,

전립선암 전이 억제용 항암제 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는,

전립선암 전이의 예방 및 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조각자 가시(*Gleditsia sinensis* thorn; GST) 추출물을 함유하는 전립선암(Prostate cancer) 전이(Metastasis) 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 조각자 가시의 물 추출물을 유효성분으로 적용함으로써, α2β1 인테그린(α2β1 integrin)의 발현을 선택적으로 저해하여 전립선 암세포 전이의 중요한 한 과정인 콜라겐(Collagen) 대응 부착(Adhesion) 및 이동(Migration) 과정을 특이적으로 약화시킴에 따라 세포독성을 유발하지 않는 낮은 투여량으로도 전립선 암세포의 전이를 효과적으로 억제할 수 있는, 조각자 가시 추출물을 이용한 전립선암 전이 억제용 조성물, 이를 포함하는 전립선암 전이 억제용 항암제 조성물, 및 전립선암 전이의 예방 및 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전립선암(Prostate cancer)은 남성에 발병되는 일반적인 암으로서, 남성의 암 관련 사망을 유발하는 두 번째 주요 원인이다. 이에 전립선암 환자를 치료하기 위해 안드로겐 차단요법, 전립선 절제술 및 방사선 요법과 같은 방법들이 수행되고 있다.

[0003] 그러나, 이러한 치료법들은 전립선 암세포의 전이(Metastasis)를 효과적으로 억제할 수 없어 전립선암의 전이에 의한 사망률은 여전히 높은 편으로 확인되고 있다.

[0004] 암 전이는 암 세포의 극히 작은 모집단이 원발 종양으로부터 주변 조직으로 침윤(Invasion)한 뒤 혈관내 유입됨에 따라 개시된다. 전이 과정 중, 암 세포는 세포외 기질(ECM)과의 상호작용에 의해 다른 영역으로 이동하고 새로운 환경에 적응하게 된다.

[0005] 종래 대부분의 항암제들은 암 세포의 증식을 약화시키는데 초점을 두고 있다. 따라서 ECM로의 이동(Migration) 및 부착(Adhesion)과 같은 전이성 진행을 타겟으로 한 치료제가 개발된다면 전립선암 치료의 새로운 대안을 제시할 수 있을 것이다.

[0006] 인테그린(Integrin)은 암 전이에 있어 중심적인 역할을 하는 잘 알려진 트랜스멤브레인(막관통형) 단백질이다. 인테그린은 α 및 β 서브유닛의 2가지 종류 사슬로 구성되어 있으며, 이러한 18 α 및 8 β 서브유닛이 24개의

고유의 헤테로이합체(성) 인테그린을 구성하여, 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌 등의 ECM와 세포 상호작용을 한다. 각 인테그린은 특정 리간드와 결합할 수 있고, 인테그린 및 ECM 간의 상호작용에 의해 FAK(Focal adhesion kinase) 분자와 같은 Downstream signaling 분자와 인테그린의 클러스터 형성이 유도되어, 그 결과 라멜리포듐(Lamellipodium)이 형성되고 세포가 이동하게 된다.

[0007] 한편, 각각의 암은 서로 다른 인테그린 발현 패턴을 나타내는바, 암 세포의 특정 인테그린을 타겟으로 한 불활성화는 암세포 전이성을 조절하는 효과적인 수단이 될 수 있다.

[0008] 전립선암의 경우, 콜라겐에 대한 수용체인 α2β1 인테그린이 지배적으로 발현되어 PC3 세포의 침윤에 있어서 다른 종류의 인테그린보다 더욱 결정적인 역할을 하는 것으로 여겨진다.

[0009] 따라서, α2β1 인테그린의 기능을 약화시킬 수 있는 치료제가 개발될 경우, 전립선암의 전이를 매우 효과적으로 억제할 수 있을 것이다.

[0010] 조각자(*Gleditsia sinensis*; GS)는 동양 의학에서 종기, 종창, 피부 질환 등과 같은 다양한 질환을 치료하는데 활용되어 왔고, 화농, 종기 및 비만과 같은 일부 질환의 치료에 있어 GS의 서로 다른 부위(과실, 씨앗, 뿌리 및 뿌리피질)의 생물학적 특성이 논의되어 왔다.

[0011] 또한, 조각자 가시(*Gleditsia sinensis* thorn; GST)의 에탄올 추출물은 항-혈관신생(Anti-angiogenic) 효과를 지니는 것으로 여겨지며, GST의 위암, 대장암 및 폐암에 대한 항-종양 활성이 연구, 보고된 바 있다.

[0012] 그러나, 이러한 연구들은 세포주기 진행 및 세포 증식의 측면에 초점을 두고 GST의 억제 효과를 다룬 것으로서, 암세포 전이의 측면에서 GST의 억제 효과를 논의한 연구는 거의 전무하다. 또한 천연물 추출물을 이용한 항암제 시장에서 특정 단계를 특이적으로 억제하는 물질은 거의 개발되어 않지 않은 상황이다.

[0013] 이에, 이동(Migration) 및 부착(Adhesion) 등 전립선 암세포의 전이(Metastasis)와 관련된 과정을 타겟으로 삼아, 조각자 가시(GST) 추출물과 α2β1 인테그린 발현 간의 관계를 적극적으로 규명함으로써, 최소 투여량으로도 전립선 암세포의 전이를 특이적·효과적으로 억제할 수 있는 새로운 치료제에 대한 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Emsley, J.; Knight, C.G.; Farndale, R.W.; Barnes, M.J.; Liddington, R.C. Structural basis of collagen recognition by integrin α2β1. Cell 2000, 101, 47-56.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 종래의 요구를 충족시키기 위한 것으로, 조각자 가시 추출물의 전립선암 전이 억제에 있어서의 신규한 용도를 제공하는 것을 기술적 과제로 한다.

[0016] 본 발명자들은 예의 연구를 거듭한 결과, 조각자 가시 추출물을 통해 콜라겐을 이용하고자 하는 전립선 암세포의 부착 및 이동 현상을 특이적으로 억제할 수 있음을 처음으로 밝혔으며, 이에 관여하는 특이 분자(α2β1 인테그린)의 발현을 억제함에 따라 콜라겐에 의한 전립선 암세포의 부착 및 이동을 억제하게 되는 작용기작을 최초로 규명하였다.

[0017] 즉, 본 발명자들은 전립선 암세포의 이동 및 부착과 관련된 GST 추출물의 억제 효과 및 분자 메커니즘을 탐색하고, 담암(Tumor-bearing) 누드 마우스 모델을 이용하여 이러한 GST 추출물의 생체내 효능을 구체적으로 조사하였다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은

[0019] 조각자 가시(*Gleditsia sinensis* thorn; GST) 추출물을 유효성분으로 함유하는 전립선암(Prostate cancer) 전이(Metastasis) 억제용 조성물로서,

[0020] 콜라겐에 대한 수용체 분자인 α2β1 인테그린(α2β1 integrin)의 발현을 선택적으로 저해하여, 전이 대상세포의 세포외 기질(Extracellular matrix; ECM)인 콜라겐(Collagen)에 의해 매개되는 전립선 암세포의 부착(Adhesion) 및 이동(Migration)을 특이적으로 약화시킴에 따라, 전립선 암세포의 전이(Metastasis)를 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는,

[0021] 전립선암 전이 억제용 조성물을 제공한다.

[0022] 구체적으로, 본 발명은 콜라겐-매개 부착 및 이동과 같은 특정 단계에서 전립선암의 진행을 억제하는 조각자 가시 추출물(예컨대, WEGST)의 효능 및 이와 관련된 신규한 분자 메커니즘을 제시한 것으로서, 비-독성 수준의 WEGST가 전립선암 형성의 진행 억제에 효과적인지를 결정하고, 전립선 암세포(예컨대, PC3 세포) 이동 및 생체내(*in vivo*) 종양 형성 과정의 WEGST-매개 억제와 관련된 타겟 분자를 확인하기 위해 고안되었다.

[0023] 보이든 챔버 이동 분석(Boyden chamber migration assay)을 통해, 본 발명자들은 비-독성 수준의 WEGST가 혈청으로 코팅된 바닥 영역으로의 PC3 세포 이동을 약화시키지는 못한 반면, 콜라겐이 코팅된 바닥 영역으로의 이동은 크게 억제됨을 확인하였다.

[0024] 또한, 본 발명자들은 비-독성 수준의 WEGST가 콜라겐 대응 부착을 크게 약화시키는 점을 실험을 통해 확인하였다. WEGST의 이소성(Ectopic) 투여는 콜라겐의 수용체로 알려진 α2β1 인테그린의 발현에는 영향을 미치지 못했다. 그러나 콜라겐이 코팅된 플레이트로의 PC3 세포 부착에 있어, WEGST의 비-독성 수준 투여에 의해 α2 인테그린(≠ β1 인테그린)이 불활성화되고 그 발현이 크게 억제되었는바, 이는 FAK(Focal adhesion kinase) 인산화반응(Phosphorylation)의 억제와 관련된다.

[0025] 아울러, WEGST를 경구 투여(25 mg/kg/day)한 결과, PC3 세포-이종이식 종양의 크기가 상당히 감소하였다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 조각자 가시 추출물은 조각자 가시의 물 추출물(Water extract of GST; WEGST)인 것이 바람직하다.

[0027] 상기 WEGST는 뜨거운 물을 이용하여 당분야의 통상적인 열수 추출법을 통해 제조할 수 있다. 예를 들어 조각자 가시를 열수 추출하고, 상등액을 여과(예컨대, 감압 여과) 및 농축한 후, 동결건조하여 용매를 제거함으로써, 건조된 형태의 WEGST를 수득할 수 있다.

[0028] 즉, 본 발명에서의 조각자 가시 추출물은 통상적 방법으로 농축된 농축물과 통상적 방법으로 건조된 건조물을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[0029] 구체적으로, 본 발명에 있어서 상기 전립선 암세포는 PC3 세포일 수 있다. 이때 상기 조각자 가시 추출물은 PC3 전립선 암세포의 콜라겐-매개 세포내 FAK(Focal adhesion kinase) 신호, 즉 FAK의 인산화반응(Phosphorylation)을 억제하는 활성을 지닌다.

[0030] 본 발명에 있어서, 부착 대상세포의 세포외 기질인 상기 콜라겐은 콜라겐 I(Collagen I; Human collagen type I)일 수 있다.

[0031] 본 발명의 전립선암 전이 억제용 조성물은 유효성분인 조각자 가시 추출물 외에, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제; 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 전립선암 전이 억제용 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 이처럼 조성물을 제제화할 경우, 당분야에서 통상적으로 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 예를 들어 경구 투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 들 수 있으며, 이러한 고형 제제는 적어도 1가지 이상의 부형제 및/또는 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 들 수 있으며, 통상 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 더 포함될 수 있다. 한편 비경구 투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등을 들 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 전립선암 전이 억제용 조성물의 투여 방법(예컨대, 경구, 정맥, 근육, 피하주사 등)은 특별히 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 유효성분으로서 조각자 가시의 물 추출물(WEGST)을 사용하여 전립선암 전

이 억제용 조성물을 제조하고, 이를 치료가 필요한 전립선암 환자에게 경구 투여(Oral administration)하도록 한다.

[0034] 상기 전립선암 전이 억제용 조성물 내의 조각자 가시 추출물의 함량(추출 용매를 제거한 건조량 기준)은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예를 들어 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001~99.9 중량%, 더욱 상세하게는 0.001~50 중량% 정도 포함될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 일 구체예에서, 상기 경구 투여되는 전립선암 전이 억제용 조성물은 조각자 가시 추출물을 30~200 μg/mL, 더욱 상세하게는 50 μg/mL의 농도로 함유하는 것일 수 있다.

[0036] 즉, 본 발명은 세포에 대한 비-독성 수준(Non-toxicological level)인 50 μg/mL 정도로 유효 성분의 농도를 낮추면서도 전립선 암세포의 전이를 효과적으로 억제할 수 있는 장점이 있다.

[0037] 본 발명에 따른 전립선암 전이 억제용 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 진행 정도, 약물의 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 통상의 기술자가 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들어 유효성분인 조각자 가시 추출물을 기준으로 하루에 0.1~30 mg/kg 정도로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 조각자 가시의 물 추출물(WEGST)을 25 mg/kg/day의 양으로 환자에게 경구 투여할 수 있다.

[0038] 투여 주기는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회로 나누어 투여할 수도 있다. 또한 본 발명의 조성물은 동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 전술한 바와 같은 조각자 가시 추출물 내지 조성물을 포함하는 전립선암 전이 억제용 항암제 조성물과, 전립선암 전이의 예방 및/또는 개선용 식품 조성물이 제공된다.

[0040] 본 발명에서, 유효성분인 조각자 가시 추출물이 첨가되는 식품은 영양소를 1가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것으로서, 통용되는 각종 식품, 건강기능 식품, 건강보조 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 포함하는 의미로 사용된다.

[0041] 또한, 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 상기 식품 조성물에 있어서, 상기 조각자 가시 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001~50 중량% 정도로 포함될 수 있으며, 상기 식품 조성물이 음료인 경우 조각자 가시 추출물의 양은 식품 전체의 부피 100 mL를 기준으로 0.001~50 g, 예컨대 0.01~10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따른 조성물은 암 전이의 특정 단계인 부착(Adhesion) 및 이동(Migration) 단계를 특이적으로 억제하여 전립선암(Prostate cancer)의 전이(Metastasis)를 효과적으로 억제할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 세포 수준에서 독성이 없는 조각자 가시 추출물을 이용하여 세포독성을 유발하지 않는 낮은 투여량으로도 전립선암 전이 억제 효과를 구현할 수 있는 장점이 있다.

[0045] 또한, 본 발명에 따른 조각자 가시 추출물은 PC3 세포에 의해 유도된 생체내 종양의 크기를 감소시킬 수 있었다.

[0046] 요컨대, 본 발명은 전립선암 세포(예컨대, PC3 세포)를 규제하는 조각자 가시 추출물(예컨대, WEGST)의 약리학적 역할을 최초로 밝힌 것으로서, 독성 및 부작용이 적은 전립선암 전이 억제제 개발을 위한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이며, 전립선암의 예방 및 치료를 위한 다양한 제제를 비롯해, 암으로 인한 사망의 주된 원인인 전이 과정을 특이적으로 억제할 수 있는 기타 암 치료 관련 제제의 개발에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 조각자 가시의 물 추출물(WEGST)이 PC3 세포의 생존율에 미치는 영향을 나타낸 도면이다.

- PC3 세포를 다양한 농도의 WEGST(0~200 μg/mL)로 24시간 동안 처리함

- 세포 생존율은 WST-1 분석 키트를 이용해 측정함

- 각 수치는 3개 웰의 평균±표준편차(SD)로 나타냄

- 별표(*)는 대조군(미-처리)에 대한 통계적 차이를 의미함

- $^{*}p < 0.05$ 및 $^{**}p < 0.001$

도 2는 WEGST에 의해 약화된 콜라겐-매개 이동 현상을 나타낸 도면이다.

- PC3 세포를 WEGST(50 μg/mL)로 6시간 동안 전처리하고 챔버에 시딩함

- 챔버는 트랜스웰 멤브레인의 기저층에 코팅된 20% 혈청 (A) 및 콜라겐 I (B)를 포함함

- 트랜스웰 멤브레인의 기저부에 이동한 세포를 파라포름알데히드(4%, w/v)로 10분 동안 고정한 후, 크리스탈 바이올렛 용액(0.5%, w/v)으로 염색한 다음, 계수함

- 3개 독립적인 실험의 대표도를 2가지 서로 다른 배율(100× 및 200×)로 상단 패널에 나타냄

- 4개의 서로 다른 필드에서 세포의 수를 계수하고, 하단 패널에 도표화함

- 오차 막대는 평균의 SD를 의미함

- 막대 = 0.1 μm(200× 배율) 및 0.2 μm(100× 배율)

- $^{*}p < 0.05$, 미-처리 PC3 세포(0 μg/mL WEGST)와 비교시

도 3은 WEGST 처리가 세포 부착 및 α2 인테그린의 발현을 약화시킴을 나타낸 도면으로, PC3 세포 이동에 대한 WEGST의 억제 효과를 조사한 결과이다.

- 3개 독립적인 실험의 대표도를 상단 패널에 나타냄

- 4개의 서로 다른 필드에서 부착된 세포의 수를 계수하고, 하단 패널에 도표화함 (A)

- Semi-confluent PC3 세포를 WEGST로 처리함

- 웨스턴 블로팅에 의해 α2 및 β1 인테그린의 발현을 조사함 (B)

- PC3 세포를 WEGST로 전처리하고, 콜라겐이 코팅된 플레이트에 시딩함

- 소정의 다양한 시간대에서 PC3 세포에서 수확하고, 웨스턴 블로팅에 의해 α2 및 β1 인테그린의 발현을 조사함 (C)

- 나타낸 결과는 최소 3개의 독립적 실험을 대표하는 것임

- 오차 막대는 평균의 SD를 의미함

- 막대 = 0.2 μm

- $^{*}p < 0.05$, 대조군(미-처리)과 비교시

도 4는 WEGST 처리에 의해 FAK(Focal adhesion kinase)의 콜라겐-매개 활성화가 약화됨을 나타낸 도면이다.

- 정지 세포(Quiescent cell)를 WEGST(50 μg/mL)로 또는 WEGST 없이 사전-배양하고, 콜라겐이 코팅된 플레이트에 시딩한 후, 정해진 시간에 수확함

- 세포 용해물(Cell lysates)을 항포스포(Anti-phosphor) FAK 항체로 웨스턴 블로팅하고, 멤브레인을 리프루브한 후, 항-FAK 항체와 반응시켜 FAK 발현을 검출함

- 3개 독립적인 실험의 대표도 (A)

- 포스포 FAK(p-FAK)/총 FAK(t-FAK)의 활성화 비율을 하단 패널에 도표화함 (B)

- $^{*}p < 0.05$, 대조군과 비교시

도 5는 WEGST의 경구 투여가 종양 형성을 약화시킴을 나타낸 도면이다.

- PC3 세포를 피하 주사함

- PC3 세포를 접종한 날 이후부터 WEGST(25 mg/kg/day)를 WEGST 마우스 그룹(n = 7)에 매일 경구 투여함

- 4주 후에 모든 마우스들을 희생시킨 후, 종양을 제거하고 무게를 측정함

- 각 그룹의 7개 종양 (A)

- 7개 종양의 습 중량 (B) 및 크기 (C)

- WEGST-투여 마우스 그룹에서 종양의 중량 및 크기가 대조군 마우스 그룹 대비 크게 감소함

- PC3 세포를 다양한 농도(0~400 μg/mL)의 WEGST로 배양하고, 분절화된 DNA를 추출 및 1.2% 아가로스 겔에 용해시킴

- 3개 독립적인 실험의 대표도 ((D)의 좌측 패널)

- 3개 독립적인 실험의 분절화된 DNA 영역의 강도를 Image J software(Softonic international, SF, USA)를 이용해 측정한 후, 도표화함 ((D)의 우측 패널; 미-처리 세포(0 μg/mL WEGST)의 강도에 의해 정규화한 것)

- 적색 화살표는 분절화된 DNA를 나타냄

- 서로 다른 문자 (a, b)는 그룹 간의 상당한 차이($p < 0.05$)를 의미함

- $^{*}p < 0.05$, 대조군 마우스 그룹과 비교시

- Mann-Whitney U 테스트 사용

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예**

[0050] (1) WEGST의 제조

[0051] GST 100 g을 뜨거운 물 1 L로 추출하였다.

[0052] 상등액을 여과하고, 회전증발기(Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germany)로 농축한 후, 동결건조(Lyophilize)시켰다.

[0053] 건조된 추출물의 수율은 약 6.8 g/L였다.

[0054] (2) 세포 배양 및 세포독성(Cytotoxicity) 분석

[0055] PC3 전립선 암세포를 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)으로부터 입수하고, Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640에서 유지시켰다(* 10% 소태아 혈청(FBS; HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 μg/mL)).

[0056] PC3 세포를 96-웰 플레이트(5×10^3 cells/well)에 시딩하고, 24시간 동안 배양하였다.

[0057] 배양 배지에 다양한 농도(30~200 μg/mL)의 WEGST를 첨가하고, CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다.

[0058] 이어서, WST-1 용액(Corning, Corning, NY, USA)을 첨가하고, 2시간 동안 배양하였다.

[0059] 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 계산하였다.

[0060] (3) 콜라겐 대응 이동 분석

[0061] 8 μm 기공 크기의 Transwell Permeable Support(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용해 세포 이동을 분석하였다.

[0062] 트랜스웰 멤브레인의 바닥 부분을 PBS(Phosphate-buffered saline) 내 콜라겐 I(10 μg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) 또는 혈청(20% w/v)으로 4℃에서 밤새 코팅하였다.

[0063] 준비된 PC3 세포를 WEGST(50 μg/mL)로 6시간 동안 사전-배양한 후, 5 × 10^4 세포를 상부 챔버에 첨가하였다.

[0064] CO_2 인큐베이터에서 37℃로 2시간(콜라겐이 코팅된 트랜스웰) 또는 6시간(혈청이 코팅된 트랜스웰) 동안 더 배양한 후, 바닥층에 도달한 세포를 파라포름알데히드(4%, w/v)로 고정한 다음, 크리스탈 바이올렛(0.5%, w/v)으로 염색하고, 현미경 하에서 계수하였다.

[0065] (4) 세포 부착 분석

[0066] PC3 세포를 수확하고, WEGST(50 μg/mL)로 또는 WEGST 없이 사전-배양하였다.

[0067] 이어서, 2 × 10^5 세포를 콜라겐 I(10 μg/mL)가 코팅된 96-웰 플레이트에 시딩하였다.

[0068] 실온에서 15분 동안 더 배양한 후, 플레이트를 세척, 고정 및 5% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다.

[0069] 이어서, 현미경 하에서 부착된 세포의 수를 계수하였다.

[0070] (5) α2β1 인테그린의 콜라겐 대응 발현 분석

[0071] α2β1 인테그린의 콜라겐 대응 발현의 효과를 확인하기 위해, PC3 세포를 수확하고, WEGST(50 μg/mL)로 또는 WEGST 없이 30분 동안 전처리하였다.

[0072] 이어서, 3 × 10^5 세포를 콜라겐 I(10 μg/mL)이 코팅된 플레이트 위에 시딩하고, 정해진 다양한 시간대에서 수확하였다.

[0073] 상기 세포들을 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, Nonidet P-40(1%, w/v), 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM β-glycerophosphate, 및 protease inhibitor 혼합물(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 구성된 Lysis buffer에 용해시켰다.

[0074] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 동량의 세포 용해물(Cell lysates)을 분리하고, PVDF(Polyvinylidene difluoride) 멤브레인에 옮겼다.

[0075] 멤브레인을 단일클론 항-β1 인테그린 항체(sc-374429; Santa Cruz, CA, USA), 래빗 항-α2 인테그린 항체(Merck Millipore, Gibbstown, NJ, USA) 및 마우스 단일클론 항-β-액틴 항체(Santa Cruz, CA, USA)에 이은 HRP(Horseradish peroxidase)-컨쥬게이션 항-래빗 면역글로불린 G(IgG)로 따로따로 배양한 후, 증대된 화학발광(Enhanced chemiluminescence; ECL) 시약(Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)를 이용해 신호를 검출하였다.

[0076] (6) FAK 인산화반응 분석

[0077] Semi-confluent PC3 세포를 PBS로 2회 린스하고, 트립신/EDTA 용액(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)으로 처리하여 단일 세포로 분리하였다.

[0078] Glycine max soybean 유래의 트립신 억제제(Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 트립신을 불활성화시켰다.

[0079] 세포를 WEGST(50 μg/mL)로 또는 WEGST 없이 30분 동안 사전-배양하였다.

[0080] 이어서, 3 × 10^5 세포를 콜라겐 I(10 μg/mL)가 코팅된 플레이트 위에 시딩하고, 정해진 다양한 시간대에서 수확하였다.

[0081] 전술한 바와 같이, 각 세포로부터 모든 단백질을 추출하고, PVDF 멤브레인에 옮겼다.

[0082] 상기 멤브레인을 대상으로 먼저 Phospho-특이 항체(p-FAK; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용해 Phosphor-FAK 발현을 검출하고, 1 N NaOH로 실온에서 1~2분 동안 배양하여 얼룩을 제거하였다.

[0083] 이어서, TBS-T로 3회 세척하고, 마우스 항-FAK 항체(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용해 총 FAK(t-FAK)를 검출하였다.

[0084] FAK의 활성화 비율(p-FAK/t-FAK)은 Image J program을 이용해 평가하였다.

[0085] (7) DNA 분절화(DNA Fragmentation) 분석

[0086] Semi-confluent PC3 세포를 PBS로 2회 린스하고, 다양한 농도(0~400 μg/mL)의 WEGST로 37℃ CO_2 인큐베이터에

서 48시간 동안 배양하였다.

[0087] AccuPrep genomic DNA 추출 키트(Bioneer Co., Seoul, Korea)를 이용해 제조사의 프로토콜에 따라 전체 DNA를 추출하였다.

[0088] 아가로스 겔(1.2%, w/v) 전기영동을 통해 추출된 DNA를 분석하였다.

[0089] DNA를 에티디움브로마이드(EtBr)로 염색하고, NaBI gel documentation system(KoreaLabTech Co., Seoul, Korea)을 이용해 시각화하였다.

[0090] (8) 이종이식(Xenograft) 종양 분석

[0091] BALBc 누드(누드/누드) 마우스(6~8 주령 수컷)를 NARA Biotech(Seoul, Korea)으로부터 입수하여 피하 종양세포 주입에 사용하였다.

[0092] 마우스를 제어된 온도(23±3℃), 습도(55%±10%) 및 광주기(12시간 주기의 명기/암기)의 스테인레스 스틸 케이지에 넣고, 모든 마우스에 표준 마우스 푸드(Orient Bio, Seoul, Korea) 및 물을 자유식(*ad libitum*)으로 공급하였다.

[0093] 순응을 위해, 모든 마우스를 실험 개시 전 1주 동안 케이지 내에 보관하였다.

[0094] 모든 실험은 성균관대학교 동물연구위원회의 기준(SKKU CUC-20150037)에 따라 수행하였다.

[0095] 마우스(n = 14)를 2개의 그룹(대조군 및 WEGST)으로 나누고, Avertin으로 마취시킨 후, 2×10^6 PC3 세포를 RPMI 1640 배지 150 μL에 서스펜션하고, 피하 영역에 접종하였다.

[0096] PC3 세포 접종 다음날부터, WEGST(25 mg/kg/day)를 WEGST 마우스 그룹(n = 7)에 매일 경구 투여하였다.

[0097] 4주 후, 마우스를 희생시킨 다음, 종양을 제거하고 무게를 측정하였다.

[0098] 시편을 Neutral Buffered Formalin에 고정시켜 보존하였다.

[0099] (9) 통계 분석

[0100] 데이터는 평균±SD의 수치로 제공되었다.

[0101] XLSTAT 프로그램(Addinsoft, New York, NY, USA)의 ANOVA(One-way analysis of variance)를 이용해 데이터를 분석하였다.

[0102] 이어서, Student-Newman-Keuls 테스트를 실시하였다(* $p < 0.05$는 상당한 수치로 여겨짐).

[0103] **실험예**

[0104] (1) 비-독성 수준 GST 물 추출물(WEGST)의 PC3 전립선 암세포의 콜라겐-매개 이동에 대한 약화 효과

[0105] 먼저, GST 물 추출물(WEGST)의 PC3 세포에 대한 세포독성을 조사하였다.

[0106] 50 μg/mL 농도까지는 WEGST의 투여가 세포에 있어 세포독성을 나타내지 않았다.

[0107] 그러나, 100 μg/mL 농도 WEGST의 경우 PC3 세포의 생존율이 크게 감소하였다(도 1).

[0108] 이러한 결과에 기초하여, 비-독성 수준 WEGST의 PC3 세포에 대한 효과를 확인하고자, WEGST(50 μg/mL)의 PC3 세포 이동에 관한 효과를 분석하였다.

[0109] 암 세포의 부착 및 이동 과정은 ECM과의 상호작용에 의해 제어되는바, 보이든 챔버 분석을 이용해 비-독성 수준 WEGST가 혈청 및 콜라겐 대한 PC3 세포 이동에 미치는 영향을 평가하였다.

[0110] 도 2A는 비-독성 수준 WEGST(50 μg/mL)가 혈청으로 코팅된 멤브레인의 경우는 그 상부에서 하부 영역에 이르기까지 PC3 세포의 이동에 영향을 미치지 않음을 보여준다.

[0111] 그러나, 콜라겐으로 코팅된 멤브레인의 경우, WEGST(50 μg/mL)의 투여에 의해 PC3 세포의 하부 영역으로의 이동이 크게 약화되었다(도 2B).

[0112] 이러한 결과는 비-독성 수준 WEGST의 투여가 콜라겐으로의 전립선 암세포 이동과 같은 특정 단계에서 전립선 종양 형성을 억제하는 효과적 수단임을 의미한다.

[0113] (2) WEGST 투여에 의한 PC3 전립선 암세포에서의 α2 인테그린의 콜라겐-매개 발현 약화 효과

[0114] 비-독성 수준 WEGST는 PC3 세포의 콜라겐으로의 이동만을 억제함이 확인되었는바(도 2), 이어서 부착 분석을 통해 WEGST가 PC3 세포 및 콜라겐 간의 직접 상호작용에 미치는 영향을 조사하였다.

[0115] 도 3A는 비-독성 수준 WEGST가 PC3 세포의 콜라겐 상 부착을 현저하게 억제함을 보여준다.

[0116] 이러한 결과에 기초하여, PC3 세포의 콜라겐-매개 부착 및 이동에 있어 WEGST가 억제 효과를 발휘하는 타겟 분자에 대해 조사를 하였다.

[0117] α2β1 인테그린은 잘 알려진 콜라겐에 대한 수용체로서, PC3 세포의 세포 부착 및 이동을 촉진하는 주요 세포-표면 단백질인 것으로 보고되어 있다.

[0118] 따라서, 본 발명자들은 WEGST가 PC3 세포에서의 α2β1 인테그린 발현에 미치는 영향을 조사 목표로 하였다.

[0119] 도 3B는 100 μg/mL 농도까지는 WEGST의 투여가 PC3 세포에서의 α2β1 인테그린 발현 수준에 영향을 미치지 못함을 보여준다.

[0120] 그러나, WEGST(50 μg/mL)로 전처리한 경우, 콜라겐에 대한 부착 과정 중 α2 인테그린(≠ β1 인테그린)의 발현이 시간에 따라 점차 억제되었다(도 3B).

[0121] 이러한 결과는 비-독성 수준의 WEGST가 α2 인테그린의 발현을 약화시켜 PC3 세포 및 콜라겐 간의 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있음을 의미한다.

[0122] (3) WEGST 투여에 의한 PC3 전립선 암세포의 콜라겐-매개 세포내 FAK(Focal adhesion kinase) 신호 억제 효과

[0123] WEGST가 콜라겐에 대한 부착 및 이동을 제어하는 분자 메커니즘을 보다 명확히 확인하기 위해, 인테그린-매개 부착 및 이동에 있어 중추적 역할을 하는 FAK의 활성화 변화에 대해 조사하였다.

[0124] 예상대로, 콜라겐이 코팅된 플레이트에 일반적인 PC3 세포가 부착된 경우, FAK의 활성화/인산화반응이 증가하였다.

[0125] 반면, 비-독성 수준 WEGST로 처리된 PC3 세포의 경우, FAK의 인산화반응 수준이 약화되었다(도 4).

[0126] 이러한 결과는 부착 과정 중 PC3 세포가 콜라겐과 상호작용할 때, WEGST가 인테그린-매개 신호를 효과적으로 약화시킬 수 있음을 의미한다.

[0127] (4) WEGST 경구 투여의 생체내 종양 형성 억제 효과

[0128] WEGST의 항-종양 효과를 더욱 검증하기 위해, 누드 마우스의 피하 영역 내에 PC3 세포를 접종한 이틀 이후부터 WEGST의 경구 투여(25 mg/kg/day)를 실시하였다.

[0129] 도 5에서 보듯이, WEGST-투여 마우스 그룹의 경우 종양의 중량 및 크기가 대조군 마우스 그룹 대비 크게 감소하였다.

[0130] 그러나, 실험 종료시 대조군 및 WEGST 마우스의 체중에는 유의적인 차이가 없었다(대조군: 33.2±2.1 g, WEGST: 34.08±1.7 g).

[0131] 마지막으로, WEGST의 생체내 항-종양 효과를 뒷받침하기 위해, WEGST가 PC3 세포에 있어 프로그램 세포 사멸(Programed cell death)을 유도하는 능력이 있는지 여부를 조사하였다.

[0132] 저농도의 WEGST(50 μg/mL)를 투여한 경우 DNA 분절화가 유도되지 않은 반면, 고농도의 WEGST(200 μg/mL 이상; 도 5D)로 처리한 PC3 세포에서는 분절화된 DNA가 검출되었다.

[0133] 이러한 결과는 WEGST의 경구 투여가 PC3 세포 사멸을 유도하여 생체내 종양 형성을 부분적으로 억제하는데 효과적임을 의미한다.

[0134] **결과 검토**

[0135] GST는 세포주기 진행을 약화시켜 위암 및 대장암에 대해 항-증식 효과를 지니는 것으로 보고되고 있다.

[0136] 그러나, 암 세포 이동 및 부착과 관련된 GST의 효과를 뒷받침하는 분자 메커니즘에 대해서는 밝혀진 바가 없었다.

[0137] 이에, 본 발명자들은 비-독성 수준의 WEGST가 PC3 전립선 암세포에 대해 항암 효과를 갖는지 여부에 초점을 두

고 연구를 진행하였다.

[0138] 종래 다수의 항암제들은 상대적으로 높은 투여량을 적용해야만 세포 사멸을 동반한 충분한 증식 억제 활성을 발휘할 수 있었다. 그러나 화학요법에 의해 암 환자가 겪는 심한 부작용을 고려할 때, 항암 치료제의 최저 투여량에 따른 유효 범위를 결정하는 것은 매우 중요하다.

[0139] 본 발명에서는, WEGST의 비-독성 수준 투여에 의해 전립선암 PC3 세포의 콜라겐-매개 이동 및 부착을 크게 억제할 수 있었다. WEGST의 항-종양 활성은 α2 인테그린의 콜라겐-매개 발현 및 그 세포내 신호(FAK의 인산화반응)의 약화와 관련됨이 확인되었으며, 이러한 결과는 WEGST가 PC3 전립선 암세포에 있어 콜라겐(ECM 영역) 및 α2β1 인테그린 간의 상호작용을 효과적으로 억제할 수 있음을 의미한다.

[0140] α2β1 인테그린은 ECM에의 세포 부착을 유발하는 잘 알려진 세포-표면 단백질이다. 이러한 α2β1 인테그린의 발현 및 활성화/인산화반응 모두가 전립선암의 진행과 연관된다.

[0141] PC3 세포는 다른 어떤 ECM 단백질보다도 콜라겐 쪽으로 가장 활발하게 이동하고, α2β1 인테그린은 PC3 세포의 침윤(Invasion)에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다.

[0142] 이에, 본 발명자들은 콜라겐에 대한 관점에서 WEGST가 PC3 세포 이동 및 부착에 미치는 영향을 구체적으로 조사하였고, 그 결과 본 발명을 도출할 수 있었다.

[0143] 세포 부착 및 이동은 암 전이에 있어 중요한 단계이므로, α2β1 인테그린을 타겟으로 한 불활성화는 전립선암의 진행을 억제하는 전도유망한 방법이 될 수 있다.

[0144] 본 발명자들은 실험을 통해 WEGST가 α2 인테그린의 콜라겐-매개 발현을 약화시켜 항-종양 활성을 가짐을 구체적으로 확인하였다. 이러한 WEGST는 α2β1 인테그린을 발현하는 기타 종양 세포주의 이동 및 부착 약화에도 그 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0145] 전립선암 환자의 가장 일반적인 사망 원인은 전이(Metastasis)이고, 많은 전립선암 환자가 화학요법 약물의 부작용으로 인해 고통받고 있다. 이러한 점을 고려할 때, 낮은 투여량의 치료제 사용이 비록 전립선 암세포의 증식을 억제하는 데에는 효과가 덜 할지라도, 이러한 낮은 투여량이 전립선 암세포의 전이를 억제하는 데에는 효과적일 수 있는 것이며, 이는 전립선암 환자를 치료하는 매우 매력적인 수단이 될 수 있다.

[0146] 본 발명은 WEGST의 비-독성 수준 투여가 PC3 세포의 콜라겐 대응 이동 및 부착 억제에 효과적임을 확인하였으며, 이러한 WEGST는 종양의 초기 단계(증식)보다는 종양 말기의 진행(전이성)을 약화시키는데 더욱 효과적일 수 있다.

[0147] 종합적으로, 본 발명은 WEGST가 α2β1 인테그린의 불활성화를 통해 전립선암 PC3 세포의 콜라겐-매개 부착 및 이동을 억제한다는 점을 최초로 입증하였다.

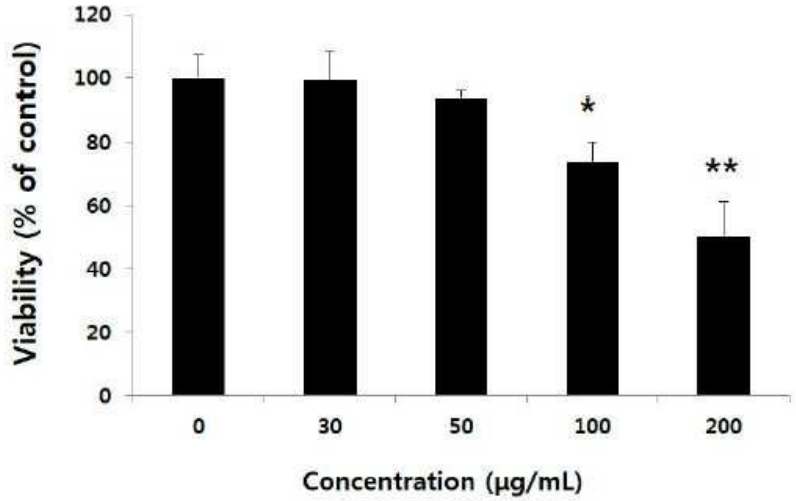
[0148] 아울러, WEGST를 PC3-세포 유래의 담암 누드 마우스 그룹에 경구 투여한 결과, 미-처리 담암 누드 마우스 그룹 대비 종양의 크기가 감소하였다.

[0149] WEGST가 생체내 종양 형성을 약화시키는 메커니즘과 관련된 상세한 생리학적 내지 분자적 파라미터와는 별개로, 본 발명이 전립선암 존재시 WEGST의 효능에 대한 생체내 데이터를 최초로 제시한 점은 그 자체로 의미가 크다.

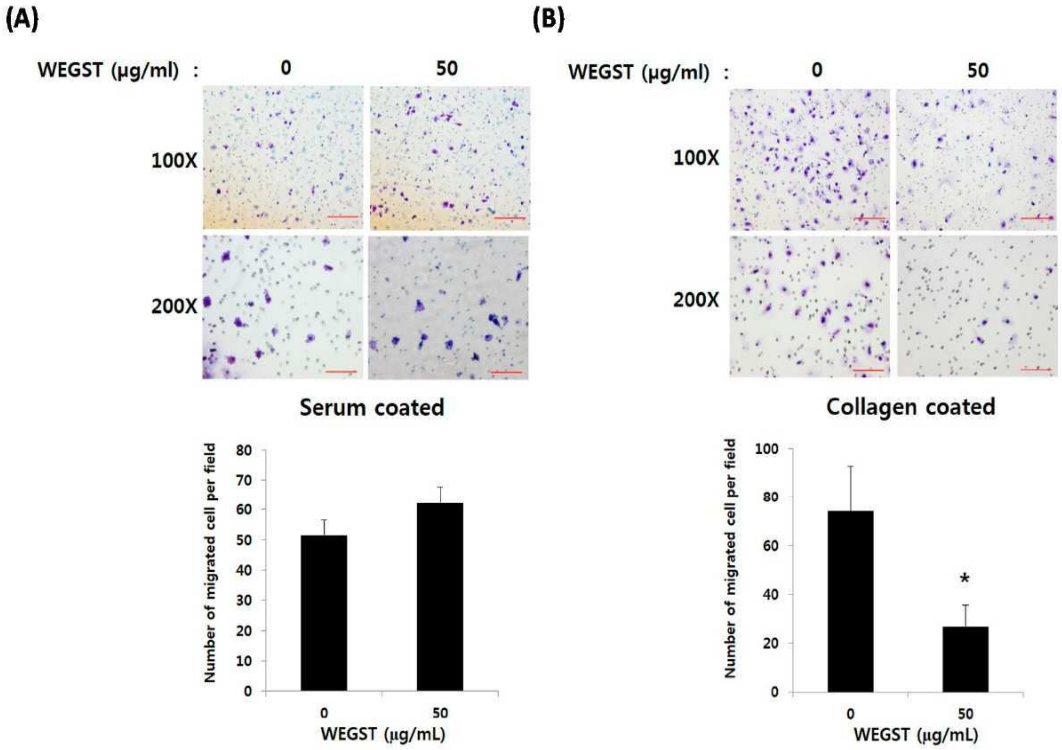
[0150] 요컨대, 본 발명은 전립선암 진행에 있어서 GST의 약리학적 효능에 대해 매우 중요한 단서를 제공하는 것이며, 이를 통해 GST를 이용한 전립선암 치료용 항암제의 개발 또한 가속화될 것으로 여겨진다.

도면

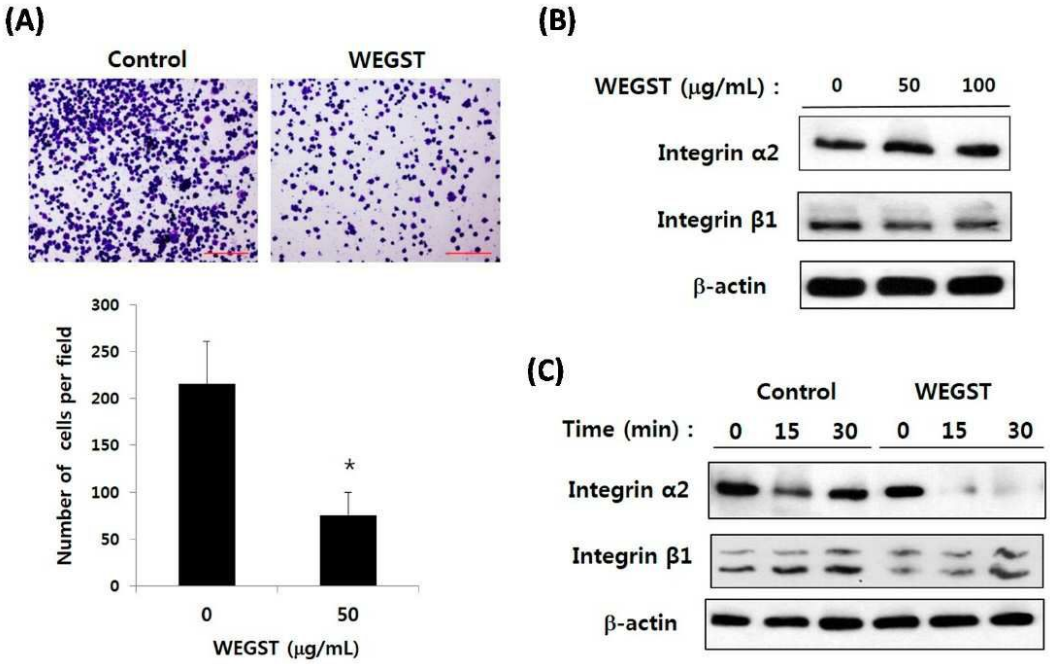
도면1


Viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
0
30
50
100
200
Concentration (μg/mL)

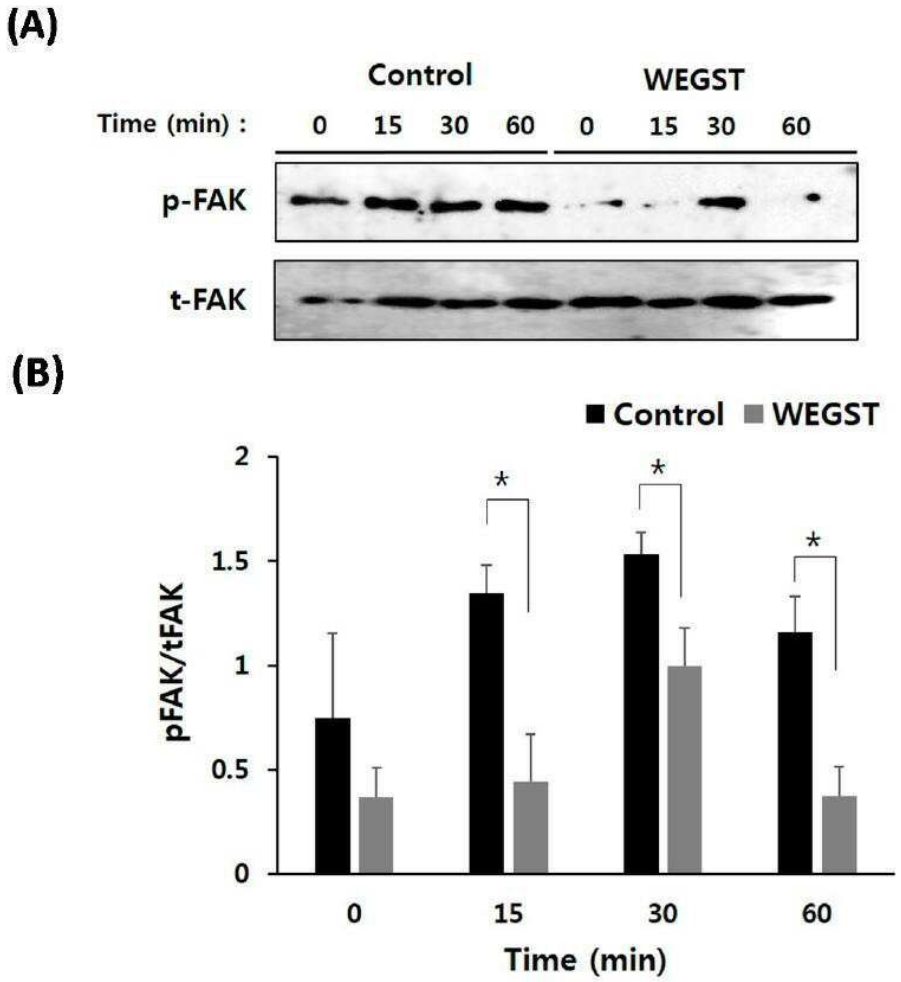
도면2


(A)
WEGST (μg/ml) :
0
50
100X
200X
Serum coated
Number of migrated cell per field
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
WEGST (μg/mL)
(B)
WEGST (μg/ml) :
0
50
100X
200X
Collagen coated
Number of migrated cell per field
100
80
60
40
20
0
*
0
50
WEGST (μg/mL)

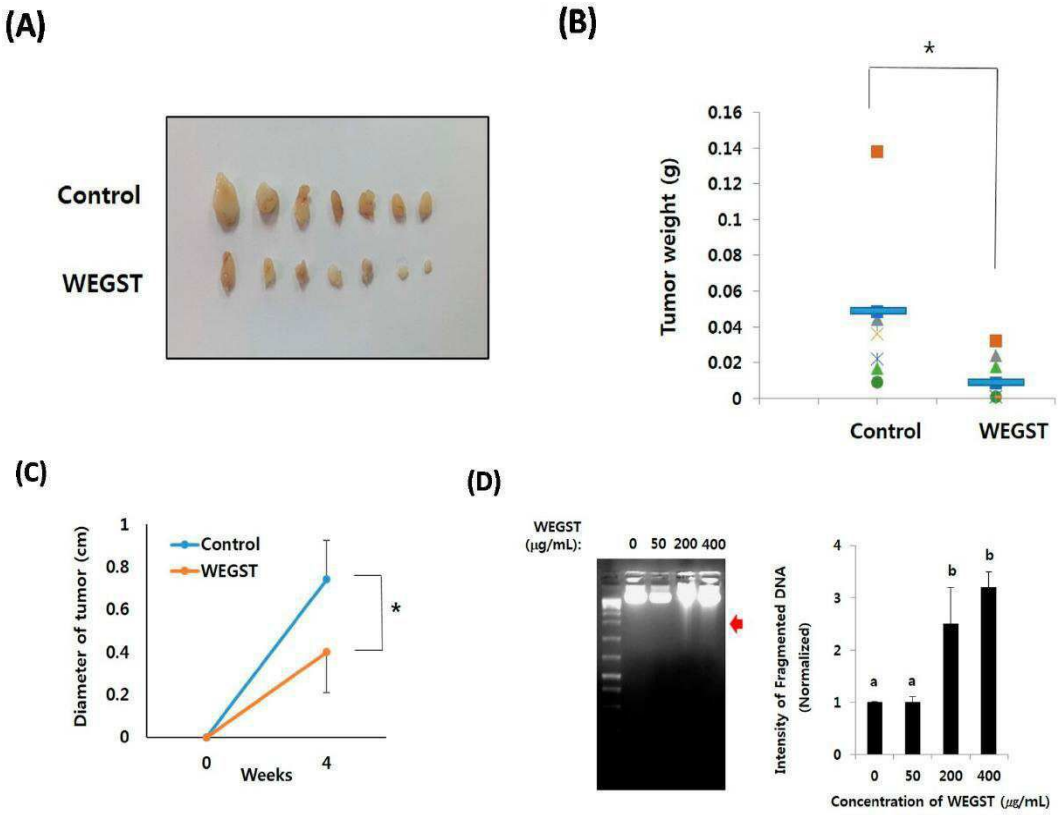
도면3


(A)
Control
WEGST
Number of cells per field
300
250
200
150
100
50
0
*
0
50
WEGST (μg/mL)
(B)
WEGST (μg/mL) :
0
50
100
Integrin α2
Integrin β1
β-actin
(C)
Control
WEGST
Time (min) :
0
15
30
0
15
30
Integrin α2
Integrin β1
β-actin

도면4


(A)
Control
WEGST
Time (min) :
0
15
30
60
0
15
30
60
p-FAK
t-FAK
(B)
Control
WEGST
pFAK/tFAK
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
0
15
30
60
Time (min)

도면5


(A)
Control
WEGST
(B)
Tumor weight (g)
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
*
Control
WEGST
(C)
Diameter of tumor (cm)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
WEGST
*
0
Weeks
4
(D)
WEGST (μg/mL):
0 50 200 400
Intensity of Fragmented DNA (Normalized)
4
3
2
1
0
a
a
b
b
0 50 200 400
Concentration of WEGST (μg/mL)