

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0095191 (43) 공개일자 2014년08월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/15 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(21) 출원번호 10-2013-0007792	(72) 발명자 박정환윤 강원 춘천시 삭주로 89-6, 101동 101호 (후평동, 현대맨션)	
(22) 출원일자 2013년01월24일 심사청구일자 2013년01월24일	권규택 강원도 춘천시 봉의산길22번길 10, 305호 (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인태동	

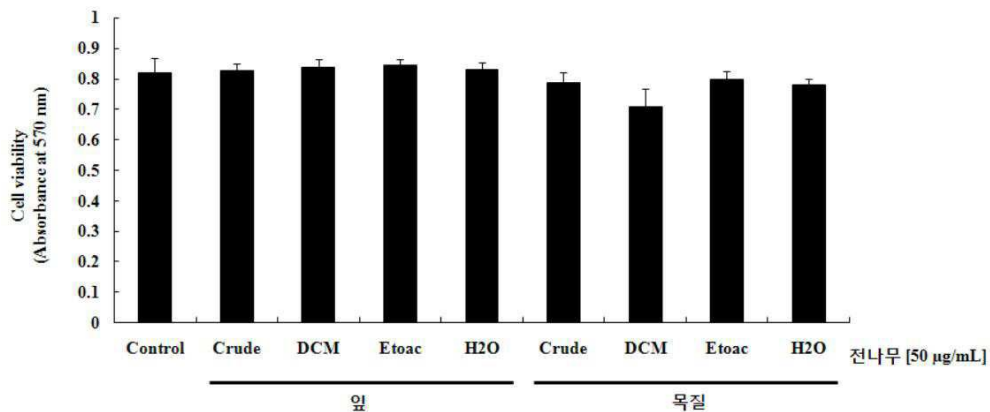
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 전나무 잎 추출물을 함유하는 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 항암 조성물에 관한 것으로, 전나무(*Abies holophylla* MAX) 잎 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암 조성물 및 전나무(*Abies holophylla* MAX) 잎 에탄올 추출물을 디클로로메탄으로 분획하여 수득된 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 함유하는 항암 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정재인

강원도 춘천시 남산면 햇골길 35

정유진

강원도 춘천시 퇴계로 167 주공1차아파트 106동 1801호

송혜림

강원도 춘천시 삭주로94번길 13-5

김민희

경기도 포천시 호국로 985-36, B동 102호

김진규

강원도 춘천시 승지골길16번길 47 퇴계뜨란채아파트 1005동 1103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345-110371

부처명 지식경제부

연구사업명 Berteroin의 항염증 효능평가

연구과제명 천연물유래 항산화 신소재 발굴 및 응용

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120000642

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터육성사업

연구과제명 식이성 비만에 의한 염증반응 조절기전 및 식이중재 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경북대학교 산학협력단

연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

전나무(*Abies holophylla* MAX)의 잎에 에탄올을 첨가하여 추출하는 단계 (a)를 포함하는 과정으로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 향암 조성물.

청구항 2

전나무(*Abies holophylla* MAX)의 잎에 에탄올을 첨가하여 추출하는 단계(a);

상기 단계 (a) 후, 에탄올을 제거하고, 물을 첨가하여 현탁한 후, 디클로로메탄을 첨가하여 분획하는 단계 (b); 및

상기 단계 (b) 후, 디클로로메탄 분획층을 수득하는 단계(c);를 포함하는 과정으로부터 수득된 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 향암 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은,

의약 조성물인 것을 특징으로 하는 향암 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은,

식품 조성물인 것을 특징으로 하는 향암 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 향암 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전나무 잎의 추출물을 함유하는 향암 조성물에 관한 것이다.

[0002]

배경기술

[0003] 현대인들의 변화된 생활환경과 식습관은 암, 뇌졸중, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병 등의 성인병 발병률을 증가시키는 결과를 초래하였다. 이런 성인병들 중 암은 사망 원인에 매우 크게 기여하며, 성인들의 건강에 대한 염려 1순위가 되었다. 실제로 30대 이상의 한국인들 중, 사망 원인 첫 번째는 암이라고 보고되어 있으며, 한국 사람들의 종류별 암 발병률을 살펴보면 폐암이 1위이고, 간암이 2위, 위암이 3위, 대장암이 4위를 차지하고 있다(2009년, 통계청).

[0004] 지금까지 암을 치료하기 위해 다양한 방법들이 시도되고 있으며, 암 치료법은 약물 요법, 수술 요법, 방사선 요법 등으로 대별할 수 있다. 그 중 약물 요법은 약물 치료시 항암제를 경구 또는 정맥 투여할 경우 약물이 일단 혈류를 통해 전신에 퍼졌다가 병소에 도달하게 되므로 병소에는 미량만이 집적되는 문제가 있다. 따

라서, 병소에 적정량을 집적시키기 위해서는 다량의 약물을 투여해야 하는데, 이는 심각한 부작용을 유발할 수도 있다.

[0005] 한편, 방사선 요법의 경우, 안전성이 담보되지 않은 문제가 있다. 예를 들어, 간암에 효과적이라는 홀뮴(Holmium)과 같은 물질은 키토산 복합체(Milican, 동화약품주식회사)로 제조되어 그 효과가 입증된 바 있으나, 그 부작용 또한 심각하여 여전히 문제가 제기되고 있다(Watterson, J. D. et al., J. Urol. 168:442-445, 2002; Peh, O. H. et al., Ann. Acad. Med. Singapore 30:563-567, 2001).

[0006] 이에 최근에는 항암 효과가 있는 천연물질이나 식품들을 찾는 연구가 집중되고 있다.

[0007] 한편, 전나무(*Abies holophylla* MAX)는 수고 40 m, 지름 1 m 정도로 자라고, 가지는 윤생하며, 수평으로 퍼져 원뿔 모양을 이룬다. 수피는 회색 또는 암갈색으로 거칠다. 겨울눈은 털이 없는 난형으로 약간의 수지가 있다. 잎은 길이 4 cm 정도로 선 모양이며, 가지에 촘촘히 달린다. 끝이 뾰족하고 뒷면에는 회백색의 숨구멍줄이 2개가 있으며, 횡단면에는 수지구가 있다. 암수한그루로 가지 끝의 잎겨드랑이에 원통형의 황록색 수꽃이 피고, 암꽃은 장타원형으로 2~3개가 서로 근접해 달린다. 민간에서는 잎 또는 싹이 붙은 어린 가지를 류마티스염, 괴혈병에 이용하고 있으며, 감기에 걸렸을 때에는 옥탕료로 이용하였다. 또한, 전나무 송진은 고약으로 만들어 상처 치료약으로 쓰이기도 하였다.

[0008] 현재 항암 활성이 있는 천연물 또는 그 추출물에 대해 많은 연구가 이루어지고 있지만, 전나무 추출물의 항암 기능을 탐색한 연구는 현재 미미한 실정이다. 이에, 본 발명에서는 천연 추출물인 전나무 추출물을 이용하여 암의 전이를 억제할 수 있고, 식품 또는 의약품에 용이하게 이용할 수 있는 소재를 개발하여 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0021409호(피부소양증을 완화시키는 전나무 잎 정유의 제조방법)에는 전나무 잎을 세척한 후, 분쇄하는 전나무 잎 전처리단계(제1단계); 상기 제1단계에서 전처리된 전나무 잎에 알코올을 중량대비 1 : 1의 비율로 혼합하는 알코올 혼합단계(제2단계); 상기 제2단계에서 알코올이 혼합된 전나무 잎 용액을 90~110℃에서 1~2시간 가열하여 정유를 함유한 수증기를 포집하는 수증기 포집단계(제3단계); 및 상기 제3단계에서 포집된 정유를 함유한 수증기를 0~20℃에서 1~2시간 냉각시켜 전나무 잎 정유를 얻는 냉각단계(제4단계)로 이루어진 것을 특징으로 하는 피부소양증을 완화시키는 전나무 잎 정유의 제조방법에 대해 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2010-0118171호(전나무 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 당뇨질환의 예방 및 치료용 조성물)에는 전나무 잎 추출물을 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약제, 당뇨예방 및 증상완화 일반식품 및 건강 기능식품에 대해 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 전나무(*Abies holophylla* MAX)로부터 항암 효과가 있는 추출물을 분리하여 항암 조성물로 개발하여 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1형태로 전나무(*Abies holophylla* MAX)의 잎에 에탄올을 첨가하여 추출하는 단계 (a)를 포함하는 과정으로부터 추출된 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항암 조성물을 제공한다.

[0012] 한편, 본 발명은 제2형태로 전나무(*Abies holophylla* MAX)의 잎에 에탄올을 첨가하여 추출하는 단계 (a); 상기 단계 (a) 후, 에탄올을 제거하고, 물을 첨가하여 현탁한 후, 디클로로메탄을 첨가하여 분획하는 단계

(b); 및 상기 단계 (b) 후, 디클로로메탄 분획층을 수득하는 단계(c);를 포함하는 과정으로부터 수득된 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 향암 조성물을 제공한다. 하기 본 발명의 실험예에 의하면 전나무 잎의 여러 분획물 중 디클로로메탄 분획층에서 향암 활성이 가장 우수하게 나타났다.

[0013] 한편, 본 발명에서 "유효성분으로 포함된다"는 의미는 향암 효과를 나타낼 수 있는 정도로 본 발명 제1형태의 에탄올 추출물 또는 제2형태의 디클로로메탄 분획물이 조성물에 첨가되는 것을 의미한다. 또한, 본 발명은 조성물의 형태가 약학 조성물인 경우, 약물전달 및 안정화 등을 위하여 다양한 성분을 부성분으로 첨가하여 다양한 형태로 포물레이션(formulation) 할 수 있고, 조성물의 형태가 식품 조성물인 경우, 다양한 제형을 제조하기 위해 제형 베이스 및 부형제를 첨가할 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명은 본 발명의 제1형태의 에탄올 추출물, 제2형태의 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 향암 식품 조성물을 제공하는데, 본 발명의 제1형태의 추출물 또는 제2형태의 디클로로메탄 분획물은 바람직하게 건조중량 대비 1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 조성물 중에 첨가되는 것이 좋다. 또한, 식품 조성물에 있어, 향암 조성물은 바람직하게 암 예방 조성물일 수 있다. 본 발명의 향암 식품 조성물은 일 예로, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반 음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있는데, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 한편, 본 발명은 본 발명의 제1형태의 추출물, 제2형태의 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 향암 약학 조성물을 제공한다. 약품 조성물에 있어, 향암 조성물은 바람직하게 암 치료용 약학 조성물일 수 있다.

[0016] 한편, 본 발명의 향암 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있다. 또한, 예방 및 치료제가 약제인 경우 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 있다.

[0017] 한편, 본 발명의 향암 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태로 제형화될 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제-INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 토크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0018] 한편, 본 발명 향암 약학조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 암 치료제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 하지만, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 다양하게 변화할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 의하면, 전나무(*Abies holophylla* MAX) 잎 에탄올 추출물을 유효성분으로 함유하는 향암 조성물을 제조할 수 있다. 또한, 전나무(*Abies holophylla* MAX) 잎 에탄올 추출물을 디클로로메탄으로 분획하여 수득된 디클로로메탄 분획물을 유효성분으로 함유하는 향암 조성물을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 전나무 잎과 목질부 분획물의 세포 사멸능 조사를 위한 MTT 어세이 결과이다.

도 2는 전나무 잎과 목질부 분획물이 전립선 암 세포인 DU145 세포의 이동성에 미치는 영향을 보여주는 결과이다.

도 3은 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물 농도에 따라 전립선 암 세포인 DU145에 미치는 영향을 보여주는 결과이다.

도 4는 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 MMP-9와 MMP-2의 활성화에 미치는 영향을 보여주는 결과이다.

도 5는 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 uPA의 활성화에 미치는 영향을 보여주는 결과이다.

도 6은 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 MMP-9와 VEGF의 활성화에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

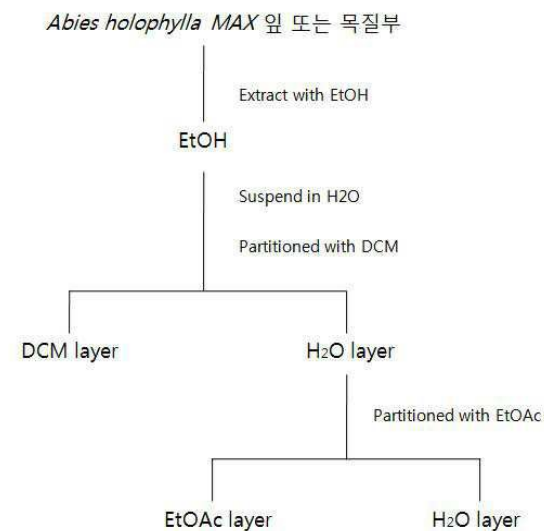
이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0022]

실시예 1: 시료의 준비

[0023]

건조된 전나무 잎과 목질부 시료 1 kg을 각각 80% 에탄올로 3일간 냉침 추출한 후 농축하여 에탄올을 제거하여 에탄올 추출물을 제조하였다. 제조된 에탄올 추출물에 물을 첨가하여 현탁한 후, 극성이 다른 용매인 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM), 에틸아세테이트(EtOAc)를 순차적으로 첨가하여 분획함으로써, 디클로로메탄(DCM) 층, 에틸아세테이트 층, 물 층을 각각 수득하였다.



[0024]

실험예 1: MTT 어세이를 통한 전나무 추출물 및 분획물의 세포 독성 조사

[0025]

본 실험예에서는 인간의 전립선암 세포인 DU145 세포에 전나무 잎과 목질부 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 MTT 어세이로 세포 사멸능(증식능)을 조사하고자 하였다.

[0027]

DU145 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토 마이신을 첨가한 배양액을 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 습윤한 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 70~80% 정도 차면 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후, 0.25% 트립신 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 세포를 계대 배양하였고, 배지는 2일마다 교환하였다.

[0028]

상기와 같이 배양한 DU145 세포는 10% FBS가 포함된 DMEM/F12 배지에 희석하여, 50,000 cells/well의

밀도로 24 웰-플레이트에 분주하였다. 24시간 배양한 후, 1% FBS가 포함된 SDM(serum-deprivation medium)으로 12시간 동안 추가 배양하였다. 이 후, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 전나무 잎과 목질부 분획물이 각각 포함된 SDM으로 교환하고, 4시간 경과 후, MTT 어세이 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

[0029] 실험결과, 전나무 목질부 디클로로메탄(DCM) 분획물에서 세포 생존이 약간 감소하였지만, 전나무 잎 분획물에서는 세포 생존에는 영향을 미치지 않았다(도 1).

[0030] 실험예 2: 세포 이동성 여부 조사

[0031] 본 실험예에서는 인간의 전립선암 세포인 DU145 세포에 전나무 잎과 목질부 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 세포의 이동성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

[0032] 먼저 트랜스웰 멤브레인(trans-well cell culture chamber)의 아래쪽을 0.1%타입 A 젤라틴(type A gelatin) 10 μl 로 코팅하였다. 트랜스웰 세포 배양 챔버의 아랫부분에 0.1% BSA를 첨가하고, 트랜스웰의 윗부분에는 세포와 전나무 잎과 목질부 분획물을 각각 첨가한 후, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이동하지 않은 필터 윗부분의 세포를 면봉으로 제거하고, 폴리카보네이트 필터(polycarbonate filter)를 통해 이동한 세포를 헤마톡실린-에오신 염색(hematoxylin-eosin staining) 방법으로 염색하였다. 이동된 세포의 수는 현미경($\times 100$)을 이용하여 정량하였다.

[0033] 실험결과, 세포의 이동이 전나무 잎과 목질부 분획물 중 잎의 디클로로메탄(dichloromethane; DCM) 분획물에서 효과가 가장 우수하였다(도 2).

[0034] 실험예 3: 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물의 농도에 따른 세포 이동성 여부 조사

[0035] 본 실험예에서는 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물을 농도별로 처리하여 세포의 이동성에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

[0036] 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물을 0, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여 세포를 배양하였다. 24시간 후에 배지를 모아서 'Amicon Ultra-15'를 이용하여 원심 한의 여과(centrifugal ultrafiltration) 방법으로 100배 농축시켰다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit를 이용하여 측정하였다.

[0037] 실험결과, 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물의 농도가 진할수록 세포의 이동이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0038] 실험예 4: 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 MMPs 활성화에 미치는 영향 조사

[0039] 본 실험예에서는 상기 실험예 3에서 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물이 세포의 이동을 감소시키는 것을 확인하였으므로, 이와 관련된 단백질인 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase) MMP-9, MMP-2의 활성을 gelatin zymography를 이용하여 측정하고자 하였다.

[0040] 농축된 배지를 0.2% 젤라틴이 포함된 SDS-PAGE에서 전기영동한 후, 리네처링 버퍼(renaturing buffer, 2.5% Triton X-100)로 30분씩 2번 씻은 후, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 , 0.02% Brij35를 포함하는 디벨러핑 버퍼(developing buffer)로 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 젤은 0.25% 쿠마시 브릴란트 블루 용액(coomassie Brilliant Blue solution)으로 12시간 동안 염색을 한 후, 탈색하여 젤라틴의 분해 정도를 관찰하였다.

[0041] 실험결과, 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물을 농도별로 처리하였을 때, MMP-9과 MMP-2의 활성이 감소하는 것을 관찰하였고, MMP-2 활성 부산물 역시 감소하였다(도 4).

[0042] 실험예 5: 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 uPA의 활성화에 미치는 영향 조사

[0043] 본 실험예에서는 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물이 uPA(uro-kinase type plasminogen activator)의 활성화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

[0044] 농축된 배지를 0.2% 피브리노겐과 10 NIH units 트롬빈이 포함된 SDS-PAGE에서 전기영동하고, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 2.5% Triton X-100를 포함하는 리네처링 버퍼(renaturing buffer)로 30분씩 2번 씻은 뒤, 3차 증류수로 10분씩 3번 씻은 후, 30 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.02% NaN₃를 포함하는 디벨러핑 버퍼(developing buffer)로 37℃에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 젤은 0.25% 쿠마시 브릴란트 블루 용액(coomassie Brilliant Blue solution)으로 10분 동안 염색을 한 후, 탈색하여 피브린의 분해 정도를 관찰하였다.

[0045] 실험결과, 하이 폴리클러 웨이트(high molecular weight) uPA 와 로우 폴리클러 웨이트(low molecular weight) uPA 모두 전나무 잎 디클로로메탄(DCM) 분획물 처리에 의해 감소하는 것을 관찰하였다(도 5).

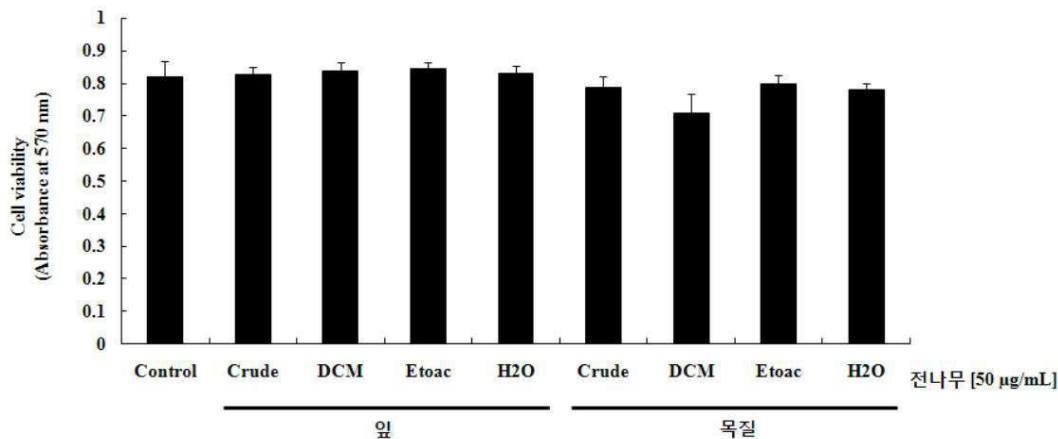
[0046] 실험예 6: 전나무 잎의 디클로로메탄 분획물이 MMP-9, VEGF 단백질 분비에 미치는 영향 조사

[0047] MMP-9, VEGF(vascular endothelial growth factor)의 단백질 수준을 조사하기 위하여 농축된 배지(50 μ g protein)를 4~20% SDS-PAGE(gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하여 PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인(membrane)으로 옮겼다. 얻어진 멤브레인(membrane)은 5% non-fat milk-TBST (20 mmol/L Tris·HCL, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 블로킹(blocking)한 다음 TBST로 10분간 3회 행구었다. 멤브레인(Membrane)에 MMP-9, VEGF, TIMP-2 항체(antibody)를 첨가하여 4℃에서 24시간 인큐베이션(incubation) 시킨 후, TBST로 10분간 3회 행구었다. 그 후 멤브레인(membrane)을 horseradish peroxidase (HRP)-linked 항-래빗(anti-rabbit)이나 마우스(mouse), 혹은 goat IgG를 첨가하여 1시간 인큐베이션(incubation)한 후, TBST로 10분간 3회 행구었다. 항체(antibody)에 결합한 단백질들의 시그널(signal)은 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate를 이용하여 밴드(band)를 가시화하였다.

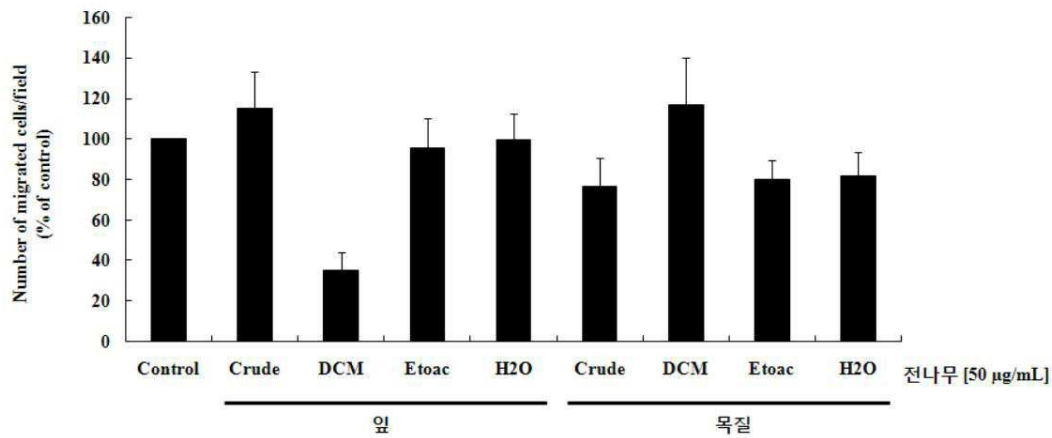
[0048] 실험결과, 전나무 잎의 디클로로메탄(DCM) 분획물 처리에 의해 MMP-9, VEGF(vascular endothelial growth factor) 단백질의 분비가 감소하는 것을 확인하였다(도 6).

도면

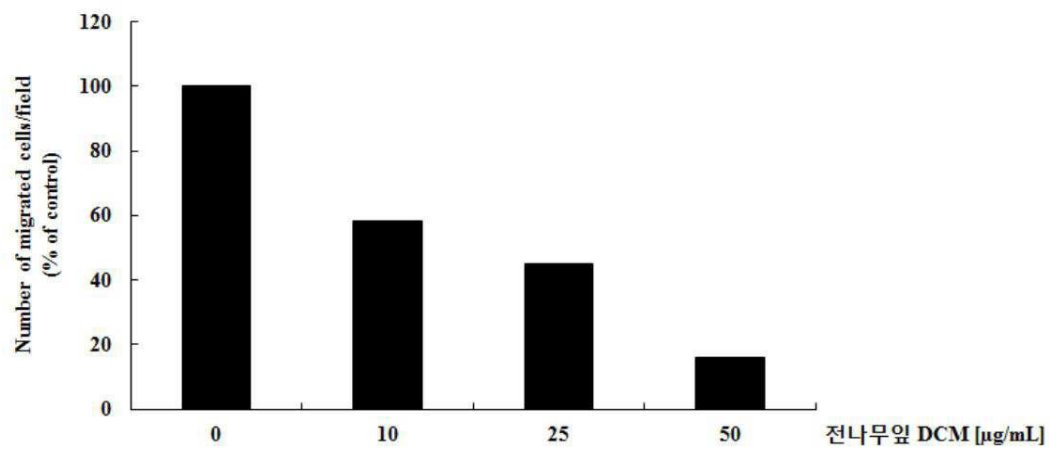
도면1



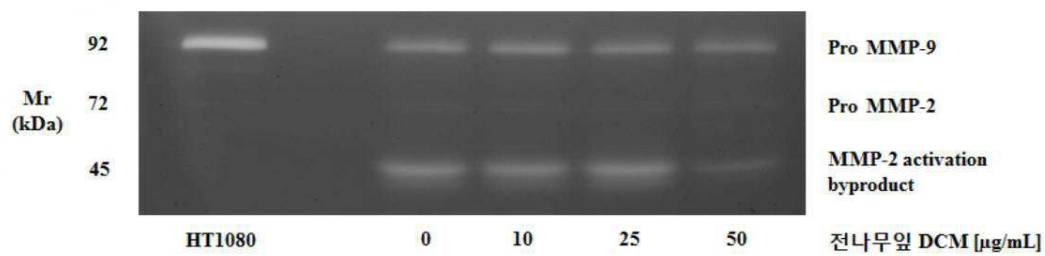
도면2



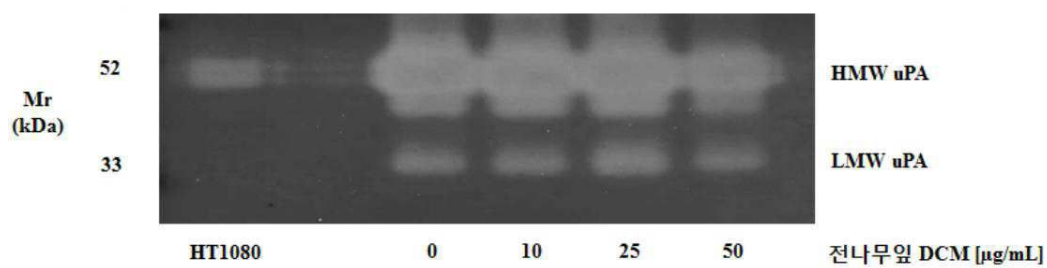
도면3



도면4



도면5



도면6

