(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0010646
(43) 공개일자 2010년02월02일

(51) Int. Cl.
A61K 36/87 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0071624
(22) 출원일자 2008년07월23일
심사청구일자 2008년07월23일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
이원섭
경상남도 진주시 주약동 한보은빛마을아파트 102동 802호
신성철
경상남도 진주시 평거동 평거한보아파트 101동 609호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

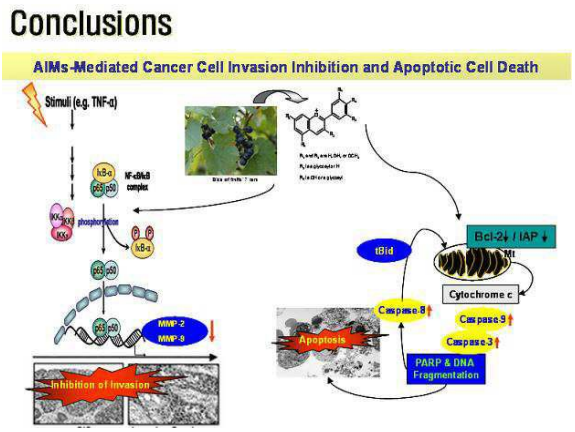
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 머루로부터 분리된 안토시아닌을 함유하는 간암 예방 및치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 머루로부터 분리된 안토시아닌을 함유하는 간암 치료용 조성물에 관한 것으로, 머루로부터 분리된 안토시아닌(델피니딘-3,5-디글루코사이드: 시아니딘-3,5-디글루코사이드: 페투니딘-3,5-디글루코사이드: 델피니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3,5-디글루코사이드: 페오니딘-3,5-디글루코사이드: 시아니딘-3-글루코사이드: 페투니딘-3-글루코사이드: 페오니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3-글루코사이드)이 간암세포에 대하여 항-증식, 항-침윤 효과를 갖으며 미토콘드리아 경로의 활성화 및 항-아폽토시스 단백질의 저해를 통하여 아폽토시스를 유도 및 강화하였다. 따라서 머루로부터 분리된 안토시아닌은 B형 간염 바이러스 유래 간암의 처치에 유용한 것이다.

대 표 도 - 도10



(72) 발명자

이성중

경상남도 김해시 대동면 예안리 56-1581번지

최영현

부산광역시 부산진구 양정동 45번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0820050
부처명	보건복지가족부
연구사업명	암정복 추진 연구 개발 사업
연구과제명	암의 예방 및 치료율 향상을 위한 연구 기반 구축- 암의치료율 향상을 위한 생물소재 개발
주관기관	경상대학교 병원
연구기간	2008년 06월 01일 ~ 2017년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

머루로부터 분리된 안토시아닌을 유효 성분으로 포함하는 간암 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 안토시아닌 분리는 상기 머루를 5 ℃에서 24시간동안 0.1% HCl을 함유하는 메탄올내에서 추출하고, 감압·농축후 추출물을 Ambrite XAD-7 흡착제 상에서 충분한 량의 물과 에틸 아세테이트로 씻은 다음 1%-HCl의 메탄올 용액으로 용리하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 델피니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3,5-디글루코사이드, 페투니딘-3,5-디글루코사이드, 델피니딘-3-글루코사이드, 말비딘-3,5-디글루코사이드, 페오니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3-글루코사이드, 페투니딘-3-글루코사이드, 페오니딘-3-글루코사이드 또는 말비딘-3-글루코사이드 및 그 혼합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 델피니딘-3,5-디글루코사이드 및 시아니딘-3,5-디글루코사이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 간암 세포상에서 항-증식, 항-침윤에 의해 간암을 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 미토콘드리아 경로의 활성화 및 항-아폽토시스 단백질의 저해를 통하여 아폽토시스를 유도하여 간암을 치료하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 간암은 B형 간염 바이러스 유래 간암인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 머루로부터 분리된 안토시아닌을 함유하는 간암 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 머루로부터 분리된 안토시아닌이 항-증식, 항-침윤 효과를 갖으며 미토콘드리아 경로의 활성화 및 항-아폽토시스 단백질의 저해를 통하여 아폽토시스를 유도할 수 있다는 것을 확인하고, 이를 유효성분으로 함유하는 B형 간염 바이러스 유래 간암의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간암은 전세계적으로 가장 일반적인 악성 종양의 일종이다.[1] 이들 질환의 처치를 위하여, 치료 효험있는 절제술이 자주 제한받는데, 이는 전이, 다양성 및 근본적인 간 경화로 인한 hepatic reservoirs 부재로 인해서이다. 덧붙여, 이들 질환에 효과적인 시스템적 화학요법 약제들이 드물다. 따라서 화학요법 혹은 화학적 암예방 약제의 개발이 시급한 실정이다.

[0003] 식물성 화합물 혹은 식품 인자들 중 일부는 안전하게 생리 기능을 조절하고 항암 활성을 나타내는 것으로 공지되어 있다.[2, 3]생태학적 이동의 증가로 인해, 천연 생성물이 암의 예방 혹은 처치에 보다 많이 쓰이게 되었다. 안토시아닌은 프라보노이드 류에 속하는 천연 색소이다.[4] 안토시아닌의 항암 활성의 세포 및 분자 기전이 아직까지 잘 설명되지 않았음에도 불구하고, 항종양 활성이 시험관내 및 생체내에서 항신생혈관 형성[5] 및 항암 활성[6,7] 에 대해 논의되고 있다. 안토시아닌은 래트(rat)내 1,2-디메틸하이드라진 및 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다조 [4,5-*b*]피리딘 (PhIP)으로 유도된 유방 발암현상[8] 에 대하여 효과적인 암예방 제제이다. 안토시아닌은 또한 몇몇 암 세포의 성장에 있어 저해 효과를 보였다.[6] 더욱이, 빌베리(bilberry) 추출물과 안토시아니딘이 아폽토시스 유도를 통하여 암세포 성장을 저해하는 것으로 확인되었다.[9]

[0004] 한편, 머루 (*Vitis coignetiae Pulliat*)는 포도과에 속하는 한국 고유의 덩굴식물의 일종으로서 직경 약 8mm의 작은 식용 검붉은 열매를 갖고, 이는 날로 먹거나 쥬스, 잼 혹은 와인으로 가공하여 사용한다. 이들 과일은 염증성 질환, 암, 혈류 개선, 기관지염 및 천식 등에 대한 민간요법 및 한방의 약재로써 사용되어 왔다. 상기 과일의 수성 추출물의 진한 붉은 색은 안토시아닌 안료 때문이다. 상기 안토시아닌은 후라보노이드의 일종으로서, 항산화 및 항염증 작용뿐 아니라 여러 종류의 암세포 주에서 항암 효과를 나타낸다. 그러나 항암 활성의 세포 및 분자 기전에 대하여는 거의 알려진 바 없다.

[0005] **REFERENCES**

[0006] 1. El-Serag, H.B., Mason, A.C. 1999.Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N. Engl. J. Med.* 340: 745-750

[0007] 2. Sandur, S.K., Ichikawa, H., Sethi, G, Ahn, K.S. and Aggarwal BB. 2006. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappa B activation and NF-kappa B-regulated gene products through modulation of p65 and I-kappa B alpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. J Biol Chem 281: 17023-17033,

[0008] 3. Park C, Jin C.Y., Kim, GY, Choi IW, Kwon TK, Choi BT, Lee SJ, Lee WH, Choi YH. 2007. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells through activation of JNK and ERK. Toxicol Appl Pharmacol.

[0009] 4. Middleton, JE. Kandaswami C.; Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751.

[0010] 5. Atalay, M.; Gordillo, G.; Roy, S.; Rovin, B.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C. K. Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS lett.* **2003**, 544, 252-257.

[0011] 6. Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X.Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. J Biol Chem. 2006 Jun 23;281(25):17359-68. 2006.

[0012] 7. Kamei, H.; Kojima, T.; Hasegawa, W.; Koide, T.; Umeda, T.; Yukawa, T.; Terebe, K. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Invest.* **1995**, 13, 590-594.

[0013] 8. Hagiwara, A.; Yoshino, H.; Ichihara, T.; Kawabe, M.; Tamano, S.; Aoki, H.; Koda, T.; Nakamura, M.; Imaida, K.; Ito, N.; Shirai, T.; Prevention bynatural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1- methyl-6- phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Toxicol. Sci.* **2002**, 27, 57-68.

[0014] 9. Katsube, N.; Iwashita, K.; Tsushida, T.; Yamaki, K.; Kobori, M. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 68-75.

[0015] 10. Meiers, S.; Kemeny, M.; Weyand, U.; Gastpar, R.; von Angerer, E.; Marko, D. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 958-962.

[0016] 11. Andersen ØM, Fossen T, Torskangerpoll K, Fossen A, Hauge U. Anthocyanin from strawberry (Fragaria ananassa) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. Phytochemistry. 2004 Feb;65(4):405-10.

[0017] 12. Lee JI, Choi DY, Chung HS, Seo HG, Woo HJ, Choi BT, Choi YH. beta-lapachone induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2 family and activation of caspases. Exp Oncol. 2006 , 28(1):30-5.

[0018] 13. Favot, L. Martin, S. Keravis, T. Andriantsitohaiha, R. Lugnier, C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **2003**, 59, 479-487.

[0019] 14. Favot, L.; Martin, S.; Keravis, T.; Andriantsitohaiha, R.; Lugnier, C. Involvement of cyclin-dependent pathway in the inhibitory effect of delphinidin on angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **2003**, 59, 479-487.

[0020] 15. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*. 2002, 2, 420-30.

[0021] 16. Kim R, Tanabe K, Emi M, Uchida Y, Toge T. Modulation of tamoxifen sensitivity by antisense Bcl-2 and trastuzumab in breast carcinoma cells. *Cancer*. 2005 ,103(10):2199-207.

[0022] 17. Kamei, H. Kojima, T. Hasegawa, W. Koide, T. Umeda, T. Yukawa, T. Terebe, K. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*. *Cancer Invest.* **1995**, 13, 590-594.

[0023] 18. Koide, T.; Kamei, H.; Hashimoto, Y.; Kojima, T.; Hasegawa, M. Antitumor effect of hydrolyzed anthocyanin from grape rinds and red rice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, 11, 273-277.

[0024] 19. Thornberry, N. A.; Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **1998**, 281, 1312-1316.

[0025] 20. Yeh CT, Yen GC. Induction of apoptosis by the Anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. J Agric Food Chem. 2005, 53,1740-9.

[0026] 21. Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. Mol Nutr Food Res. 2004 Sep;48(4):318-25.

[0027] 22. Gross, A.; McDonnell, J. M.; Korsmeyer, S. J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **1999**, 13, 1899-1911.

[0028] 23. N.B. Liabakk, I. Talbot, R.A. Smith, K. Wilkinson and F. Balkwill, Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer, Cancer Res. 56 (1996), 190-196.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0029] 이에 본 발명자들은 머루로부터 안토시아닌으로서 델피니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3,5-디글루코사이드, 페투니딘-3,5-디글루코사이드, 델피니딘-3-글루코사이드, 말비딘-3,5-디글루코사이드, 페오니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3-글루코사이드, 페투니딘-3-글루코사이드, 페오니딘-3-글루코사이드 또는

말비딘-3-글루코사이드를 추출해내고, 이들이 간암 세포상에서 효과를 갖는지에 대하여 연구를 계속하던 중 항-증식, 항-침윤 및 아폽토시스 효과를 갖는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결수단

[0030] 본 발명에 의하면, 머루로부터 분리된 안토시아닌을 유효 성분으로 포함하는 간암 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것을 일 특징으로 한다.

[0031] 또한, 본 발명에 의하면, 상기 머루로부터 안토시아닌 분리는 머루를 5 ℃에서 24시간동안 0.1% HCl을 함유하는 메탄올내에서 추출하고, 감압·농축후 추출물을 Amberlite XAD-7(Sigma-aldrich, South Korea)상에 흡착시킨 후 충분한 량의 물과 에틸아세테이트로 씻은 다음 1%-HCl 메탄올 용액으로 용리함으로써 정제시켜 얻어지는 것을 특징으로 한다.

[0032] 또한, 본 발명에 의하면, 상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 델피니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3,5-디글루코사이드, 페투니딘-3,5-디글루코사이드, 델피니딘-3-글루코사이드, 말비딘-3,5-디글루코사이드, 페오니딘-3,5-디글루코사이드, 시아니딘-3-글루코사이드, 페투니딘-3-글루코사이드, 페오니딘-3-글루코사이드 또는 말비딘-3-글루코사이드 및 그 혼합물인 것을 특징으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명에 의하면, 상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 델피니딘-3,5-디글루코사이드 및 시아니딘-3,5-디글루코사이드인 것을 특징으로 한다.

[0034] 또한, 상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 간암세포상에서 항-증식, 항-침윤 효과에 의해 간암을 치료하기 위한 것임을 특징으로 한다.

[0035] 또한, 상기 머루로부터 분리된 안토시아닌은 미토콘드리아 경로의 활성화 및 항-아폽토시스 단백질의 저해를 통하여 아폽토시스를 유도하여 간암을 치료하기 위한 것임을 특징으로 한다.

[0036] 나아가, 상기 간암은 B형 간염 바이러스 유래 간암인 것을 특징으로 한다.

[0037] 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

[0038] 우선, 머루로부터 안토시아닌을 분리해낸다. 구체적인 분리방법은 이에 한정하는 것은 아니나 하기 실시예에 규명된 방법에 기초하여 보면 다음과 같다: 상기 머루로부터 안토시아닌 분리는 머루를 5℃에서 24시간동안 0.1% HCl을 함유하는 메탄올내에서 추출하고, 감압·농축후 추출물을 Amberlite XAD-7(Sigma-aldrich, South Korea)상에 흡착시킨 후 충분한 량의 물과 에틸아세테이트로 씻은 다음 1%-HCl 메탄올 용액으로 용리함으로써 정제시켜 얻어지는 것을 특징으로 한다.

[0039] 이같이 분리된 안토시아닌의 종류는 다음과 같다: 델피니딘-3,5-디글루코사이드: 시아니딘-3,5-디글루코사이드: 페투니딘-3,5-디글루코사이드: 델피니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3,5-디글루코사이드: 페오니딘-3,5-디글루코사이드: 시아니딘-3-글루코사이드: 페투니딘-3-글루코사이드: 페오니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3-글루코사이드.

[0040] 또한, 하기 실시예에서 규명된 바와 같이, 그 함량비는 중량 기준으로 27(15-50):63(50-80):8.27(5-12):1(0.5-2):2.21(1-5):2.21(1-5):6.7(2-10): 1.25(0.5-10): 5.72(2-15): 1.25(0.5-5)이다. 또한, 상기 함량비에서 확인할 수 있듯이, 추출 안토시아닌중 가장 유효한 성분으로는 델피니딘-3,5-디글루코사이드 및 시아니딘-3,5-디글루코사이드의 2가지 종류를 들 수 있다. 참고로, 상기 2가지 성분은 Hep G_2 간암 세포에 대한 항암 효과까지 함께 뛰어난 것으로 확인되었다.

[0041] 또한, 상기 간암은 하기 실시예에서도 규명된 바와 같이, B형 간염 바이러스 유래 간암에서 만들어진 세포주로서 Hep B 세포에 대한 항암 기전을 확인하였는바, B형 간염 바이러스 유래 간암에 대하여 항암 효과가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0042] 상기 머루에서 추출해낸 안토시아닌에 대하여 하기 실시예를 통해 다음과 같은 사항들을 규명할 수 있었다:

[0043] 첫째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep3B 간암 세포의 증식을 억제한다.

[0044] 둘째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep3B 간암 세포내 아폽토시스를 유도한다.

[0045] 셋째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 캐스파제 활성 및 PARP의 후속 세포사멸 촉진을 유도한다.

[0046] 넷째, 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도된 아폽토시스는 치사 수용체-매개된 경로를 통해 수행되지 않는다.

[0047] 다섯째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 내부경로인 미토콘드리아 경로를 통해 아폽토시스를 유도한다.

[0048] 여섯째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도 아폽토시스도중 Bcl-2 및 IAP 패밀리 단백질을 조절한다.

[0049] 일곱째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep 3B 간암 세포의 이동과 침윤을 저해한다.

[0050] 여덟째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저해한다.

[0051] 아홉째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 B형 간염 유래 간암 처치에 유용하다.

[0052] 상기 결과로부터, 본 발명에서 머루로부터 분리해낸 안토시아닌은 암 세포주에서 침윤 억제 및 아폽토시스 세포 치사를 매개하는 것을 명백히 확인할 수 있었다(도 10 참조)

[0053] 즉, 본 발명에서는 간암세포상에서 항-증식, 항-침윤 및 아폽토시스 효과를 나타내는지를 조사한 결과, 안토시아닌은 간암 억제 효과는 IC_{50}는 200ug/ml에서 300 ug/ml 사이의 농도로 생각되며 400ug/ml에서 70%까지 세포 증식을 억제하는 등 본 발명의 머루로부터 분리된 안토시아닌은 항-증식, 항-침윤 효과를 갖으며 미토콘드리아 경로의 활성화 및 항-아폽토시스 단백질의 저해를 통하여 아폽토시스를 유도할 수 있다.

효 과

[0054] 본 발명에 따르면, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 간암 세포상에서 항-증식, 항-침윤, 세포독성 효과를 갖으며, 상기 세포독성은 미토콘드리아 경로 및 항-아폽토시스 단백질의 저해로부터 유도될 수 있다. 또한, MMP-2 및 MMP-9의 억제는 머루로부터 분리된 안토시아닌의 항-침윤 활성을 개선시키는데 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0055] **물질 및 방법**

[0056] ***세포 배양 및 화합물***

[0057] 인간 간암 세포, Hep3B 세포를 미국형 배양 Rockville로부터 구입하였고, 10% (v/v) 송아지 혈청(FBS)(GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA), 1 mM L-글루타민, 100 U/mL 페니실린과 100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA)내에서 37 ˚C에서 95% 공기 및 5% CO_2로 가습화된 분위기하에 배양시켰다. 캐스파제 활성 검정 킷트를 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)으로부터 수득하였다. 개선된 화학발광 (ECL) 킷트를 Amersham (Arlington Heights, IL)로부터 구입하였다.

[0058] ***안토시아닌 제조***

[0059] 머루를 지리산에서 2005년 9월 중순에 수집하고, 동결건조 및 분석할 때까지 -20 ℃에서 어두운 유리병 내에 보관하였다.

[0060] 안토시아닌 안료는 5 ℃에서 24시간동안 0.1% HCl을 함유하는 메탄올내에서 머루 100g을 해리시켜 추출하였다. 상기 추출 공정을 3회 반복하였다. 감압(Buchi R-124 Rotavapor, Switzerland)하에 농축후, 농축물을 Amberlite XAD-7(Sigma-aldrich, South Korea)상에 흡착시킨 후 충분한 량의 물과 에틸아세테이트로 씻은 다음 1%-HCl 메탄올 용액으로 용리함으로써 정제하였다.[11]

[0061] 상기 농축물을 에틸 아세테이트/물 분획화 및 adsorption 크로마토그래피를 사용하여 정제 공정에 따라 Amberlite XAD-7(Sigma-aldrich, South Korea)상에서 정제하였다.[11]

[0062] 상기 머루로부터 분리된 안토시아닌의 조성은 다음과 같다: 델피니딘-3,5-디글루코사이드:시아니딘-3,5-디글루코사이드: 페투니딘-3,5-디글루코사이드:델피니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3,5-디글루코사이드:페오니딘-3,5-디글루코사이드: 시아니딘-3-글루코사이드:페투니딘-3-글루코사이드: 페오니딘-3-글루코사이드: 말비딘-3-글루코사이드=27: 63: 8.27: 1:2.21:2.21: 6.7: 1.25: 5.72: 1.25.

[0063]

[0064] *세포 증식 검정.*

[0065] 세포 증식 및 세포독성을 트리판 블루로 조사하였다. Hep3B 세포를 24웰 플레이트상에서 RPMI+ 10% FBS내 5×10^4 세포/ml 농도로 seed하였다. 세포를 48시간동안 다수 농도의 머루로 배양하고, 현미경을 사용하여 바로 사진을 찍었다.

[0066]

[0067] *핵 염색*

[0068] 안토시아닌 처치후, 세포를 수집하고 포스페이트-완충 염수(PBS)로 수세하고 실온에서 10분간 PBS내 3.7% 파라포름알데히드(Sigma)로 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 수세하고 실온에서 10분간 2.5 μg/ml DAPI 용액으로 염색시켰다. 상기 세포를 PBS로 2회 수세하고 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다.

[0069] *Flow cytometry assay.*

[0070] 상기 세포를 세포 주기의 G0 상내에서 이들을 동기화시키도록 24시간동안 혈청-제거하였다. 머루로부터 분리된 안토시아닌으로 처치후, 세포를 수집하고 찬 PBS로 수세한 다음 원심분리하였다. 얻어진 펠릿을 1시간동안 4 ° C에서 75% (v/v) 에탄올로 고정화시켰다. 상기 세포를 일단 PBS로 수세한 다음 찬 암흑에서 30분간 PBS (pH 7.4)내 RNase A (0.1 mg/ml) 함유 찬 PI 용액 (50 μg/ml)내에서 재부유시켰다. Flow cytometry 분석을 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 수행하였다. sub-G1 개체군을 계산하여 아폽토시스 세포 개체군을 추정하였다.

[0071]

[0072] *웨스턴 블롯팅.*

[0073] 세포 융해체 단백질의 농도를 표준으로서 소 혈청 알부민을 사용한 Bradford 단백질 검정 (Biorad lab, Ricmond, CA, USA)에 의해 측정하였다. 단백질에 대한 분자 질량 마커를 Pharmacia Biotech (Saclay, France)로부터 구입하였다. XIAP, cIAP1, cIAP2, Bcl-2, Bax, $Bcl-_{XL}$, Bid, PARP, 캐스파제-3, 캐스파제-8, 캐스파제-9에 대한 항체를 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. 베타-액틴에 대한 항체는 Sigma사로부터 구입하였다. 퍼옥시다제-라벨화된 당나귀 항-토끼 및 양 항-마우스 면역글로불린은 Amersham로부터 구입하였다.

[0074] 단백질 30㎍을 전기영동에 의해 용해시키고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시킨 다음 일차 항체 및 퍼옥시다제와 컨쥬게이트된 항체에 의해 블롯팅하였다. 블롯은 ECL 검출 시스템으로 전개시켰다.

[0075] *캐스파제 활성도 측정.*

[0076] 캐스파제 활성은 제조업자 지시에 따라 캐스파제-3, 캐스파제-8, 및 캐스파제-9 활성화 킷트를 사용하여 색도 검정으로 측정하였다. 상기 킷트는 p-니트로아닐라이드로 라벨화된 합성 테트라펩타이드를 이용하였다. 간략하게, 상기 세포를 제공된 용해 버퍼내에서 용해시켰다. 상청액을 수집하고 디티오쓰레이톨과 기질을 포함하는 제공된 반응 완충액으로 37 ° C에서 배양시켰다. 상기 캐스파제 활성은 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 405nm 흡광도에서 변화를 관찰하여 측정하였다.

[0077] *미토콘드리아 막 포텐셜 (MMP) 검정.*

[0078] 간 세포내 MMP를 레이셔매트릭(ratiometric), 이중 방출 형광 염료인 친유성 양이온 프로브 JC-1으로 flow cytometry에 의해 측정하였다. 단량체 형태를 위한 527 nm (그린) 및 J-집합체 형태를 위한 590nm(레드)의 2가지 여기 파장이 있다. 그린 형광 시그날의 정량은 손상된 미토콘드리아의 양을 반영한다. Hep 3B 세포는 트립신화되었고, 세포 펠릿은 PBS 500 μl로 재부유시키고, 37 ° C에서 20분간 JC-1 10 μM로 처리 후, 세포를 찬 PBS로 1회 수세하고, 총 부피 500 μl로 부유시킨 다음 flow cytometry를 사용하여 분석하였다.

[0079] *RNA 추출 및 RT-PCR.*

[0080] 총 RNA를 RNeasy kit (Qiagen, USA)를 사용하여 1×10^5 Hep3B 세포 (처치 혹은 미처치)로부터 분리시켰

다. RNA 0.5㎍ 분획을 역전사를 위해 사용하였다. 단일-스트랜드 cDNA를 M-MLV 역전사효소 (Gibco BRL)를 사용하여 총 RNA 2 ㎍로부터 합성하였다. 상기 mRNAs were는 프라이머 셋트로 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭시켰다.[12] 상기 PCR 반응을 위한 조건은 1 x (94 ° C, 3분); 35 x (94 ° C, 45 초; 58 ° C, 45 초; 및 72 ° C, 1분) 및 1 x (72 ° C, 10분)이었다.

[0081] *상처 치유 검정*

[0082] 상처 치유 검정은 기 공지된 방법을 사용하여 수행하였다.[13] Hep3B 세포를 35 mm 접시 플레이트 상에서 100% 융합성 단일층이 되도록 성장시킨 다음 멸균 피펫 팁으로 스크래치하여 100-"상처"를 형성하였다. 그런 다음 상기 세포를 혈청-없는 배지내에서 24시간동안 머루로부터 분리된 안토시아닌의 존재 혹은 부재하에 배양하였다. Olympus photomicroscope를 사용하여 스크래치 12시간 및 24시간후 영상을 기록하였다.

[0083] *세포 침윤 검정.*

[0084] 세포 침윤 검정은 기 공지된 방법으로 수행하였다.[14] Hep3B 세포를 밤새 혈청-없는 배지내 배양시켰다. 세포 (5×10^4세포)를 미리 피복된 Matrigel 24-well 침윤 챔버 (BD Biosciences)상에서 머루로부터 분리된 안토시아닌의 존재 혹은 부재하에 적재시켰다. 그런 다음 5% 태아 송아지 혈청 배지 0.5 ml를 상기 플레이트의 웰에 첨가시켜 세포에 대한 chemoattractant로서 제공하였다. 상기 Matrigel 침윤 챔버를 24시간동안 배양시켰다. 침윤 세포를 10% 포르말린으로 고정하고, Harris 개질된 헤마톡실린(Fisher)으로 염색하고, 제조업자의 지시에 따라 분석하였다.

[0085] *젤라틴 자이모그라피(zymography).*

[0086] 컨디셔닝 배양배지내 매트릭스 메탈로-프로테나아제-2(MMP-2) 및 MMP-9의 gelatinolytic 활성을 4 ° C에서 젤라틴 1 mg/ml를 포함하는 10% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동에 의해 검정하였다. PAGE 겔을 120 V에서 수행하고, 2.5% Triton X-100에서 1시간동안 수세하고, 16시간동안 37 ° C에서 활성 버퍼(50 mM TrisHCl, pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$)로 처리하였다. 쿠마쉬 블루 (10% 빙초산, 30% 메탄올 및 1.5% 쿠마쉬 블루)로 23시간동안 염색한 다음, 겔을 10% 빙초산, 및 쿠마쉬 블루없는 30% 메탄올로된 용액으로 1시간동안 탈색시켰다. 젤라틴 분해를 지시하는 용해 영역은 쿠마쉬 블루 R-250로 염색하여 탈색된 부위를 확인하였다.

[0087] *통계.*

[0088] 각 실험은 3회 수행하였다. 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 현저한 유의성은 Student's *t* test를 사용하여 결정하였다. 통계학적 유의성은 $P<0.05$로서 정의하였다.

[0089] **결과**

[0090] ***첫째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep3B 간암 세포의 증식을 억제한다.***

[0091] 머루로부터 분리된 안토시아닌의 항-종양 활성을 더 조사하기 위하여, 본 발명자들은 인간 간암 세포주, Hep3B를 다수 농도의 머루로부터 분리된 안토시아닌으로 처치하였다.

[0092] 그 결과 도 1에서 보듯이, 안토시아닌은 Hep3B 간암 세포의 성장을 투여량-의존 방식으로 억제하였다. Hep3B세포 성장에 있어 억제 효과는 400 ug/ml의 농도에서 강한 것을 확인할 수 있었다. Hep3B에 대한 안토시아닌의 추정된 IC_{50} 값(50% 세포 치사를 유발하는 농도)은 200 ug/ml-300 ug/ml이었다.

[0093] ***둘째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep3B 간암 세포내 아폽토시스를 유도한다.***

[0094] 머루로부터 분리된 안토시아닌이 Hep3B 세포내에서 아폽토시스를 유도하는지를 결정하기 위하여, 본 발명자들은 48시간동안 지시된 농도의 머루로부터 분리된 안토시아닌으로 Hep3B 세포를 처리하고 flow cytometric 분석을 수행하였다.

[0095] 그 결과, 아폽토시스 DNA 저하를 경험하는 분획을 나타내는 Sub-G1 DNA content는 머루로부터 분리된 안토시아닌의 처치 후 투여량 의존 방식으로 24시간동안 증가하였다 (도 2A 및 2B 참조). 부가하여, 핵 내 응집된 크로마틴에 있어 표시된 변화가 머루로부터 분리된 안토시아닌 (200-400ug/mg)의 처치에 의해 관찰되었다 (도 1C 참조).

[0096] ***셋째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 캐스파제 활성 및 PARP의 후속 분열을 유도한다.***

[0097] 캐스파제는 아폽토시스의 공지된 중요한 매개체이고 세포가 비가역 세포 치사까지 아폽토시스를 경험케하는데 기여한다. 따라서, 본 발명자들은 캐스파제-3, 캐스파제-8 및 캐스파제-9의 활성 및 Hep3B 세포내 폴리 (ADP-리보오스) 폴리머라제 (PARP)의 후속 단백질가수분해 분열을 조사하였다.

[0098] 도 3A에서 보듯이, 웨스턴 블롯 분석 결과, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 procapases 및 PARP의 분열을 유도하였다. 시험관내 캐스파제 활성 테스트 결과, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 캐스파제-3, 캐스파제-8 및 캐스파제-9의 활성을 현저하게 증가시켰다 (도 3A 및 3B 참조). 이같은 발견은 머루로부터 분리된 안토시아닌이 캐스파제-의존 경로를 통해 아폽토시스 치사를 유도할 수 있음을 제시하는 것이다.

[0099] ***넷째, 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도된 아폽토시스는 치사 수용체-매개된 경로를 통해 수행되지 않는다.***

[0100] 머루로부터 분리된 안토시아닌에 의해 활성화된 아폽토시스 경로를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 치사 수용체의 발현 및 상응하는 프로-아폽토시스 리간드(DR4, DR5, Trail, Fas, Fas ligand)를 측정하였다.

[0101] 본 발명자들은 머루로부터 분리된 안토시아닌 처치 48시간후 발현 레벨에 있어 차이가 없음을 발견하였다(도 4A 및 4B 참조). 이같은 결과는 캐스파제-8 증가가 캐스파제-3 활성을 통해 피드백 경로에 연관될 수 있음을 제시하는 것이다.[15]

[0102] ***다섯째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 내부경로인 미토콘드리아 경로를 통해 아폽토시스를 유도한다.***

[0103] 미토콘드리아는 아폽토시스내 중심 역할을 수행한다. 아폽토시스의 초기 경우로서, 미토콘드리아의 탈분극을 형성한다. 따라서, Hep3B 세포의 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도 아폽토시스내 미토콘드리아의 역할을 나아가 미토콘드리아 막 포텐셜(MMP)를 측정함으로써 조사하였다.

[0104] MMP내 현저한 저감이 머루로부터 분리된 안토시아닌 처치후 관찰되었다(도 5B 참조). 캐스파제-3은 역 자극에 의해 유도된 아폽토시스의 말단, 실시상 내에서 중추적 역할을 수행하고, 또한 Bid 단백질의 활성화를 통해 캐스파제 8을 활성화하는 것으로 보여진다.[15]

[0105] 본 발명자들은 Bid 분열을 검토하고 피드백 경로를 검증하였다. 웨스톤 블롯 분석결과, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Bid의 활성화를 유도한다는 것을 확인하였다 (도 5A 참조).

[0106] ***여섯째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도 아폽토시스도중 Bcl-2 및 IAP 패밀리 단백질을 조절한다.***

[0107] Bcl-2 및 IAP 패밀리 단백질이 아폽토시스내 결정적 역할을 수행하고, BCl-2가 암 세포 약재 저항성을 conferring하는데 중추 역할을 수행하므로,[16] 본 발명자들은 머루로부터 분리된 안토시아닌이 아폽토시스도중 Bcl-2 및 IAP 패밀리 단백질을 조절하는지 여부에 대하여 조사하였다. 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석 결과, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 항-아폽토시스 단백질인 BCl-2, XIAP, cIAP-1 및 cIAP-2의 발현은 저감 유도하는데 반해, 프로-결손 단백질은 변화시키지 않았다(도 6A 및 6B 참조).

[0108] 부가하여, Bax/Bcl-2의 비 변경은 세포가 아폽토시스를 겪는지 여부를 결정하는데 결정적 역할을 수행한다. 상기 Bax/Bcl-2의 비가 아폽토시스를 위해 변경되었다. 따라서 항-아폽토시스 단백질 (Bcl-2, XIAP, cIAP-1, 및 cIAP-2)의 하방-제어는 머루로부터 분리된 안토시아닌이 Hep3B 세포내 아폽토시스를 증강시키는 것을 통해 다른 분자 기전일 수 있다는 것을 제시한다.

[0109]

[0110] ***일곱째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Hep 3B 간암 세포의 이동과 침윤을 저해한다.***

[0111] 암 세포 이동과 침윤이 전이에 있어 핵심 요소이므로, 본 발명자들은 나아가 시험관내 세포 이동 및 침윤에 머루로부터 분리된 안토시아닌이 미치는 효과에 대하여 추가 시험하였다. 그 결과, 400 ug/ml에서 머루로부터 분리된 안토시아닌은 상처 치유 검정내에서 Hep3B 세포 이동을 현저하게 저해하는 것을 보였다(도 7a내 (A) 참조). 머루로부터 분리된 안토시아닌은 Matrigel 침윤 검정에 의해 측정한 결과 400 ㎍/ml의 농도에서 세포 침윤을 약 75%까지 저해하였다(도 7a내 (B) 참조).

[0112] 부가하여, 머루로부터 분리된 안토시아닌이 콩껍질에서 분리된 안토시아닌에 비해 Hep 3B 간암 세포의 이동과

침윤을 더 강하게 저해하였다. (도 7b 및 7c 참조).

[0113] ***여덟째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저해한다.***

[0114] 아연-의존 엔도펩티다아제의 일군인 MMP는 암 침윤 및 전이내 포함되는 ECM(extracell matrix) 붕괴에 중추적 역할을 수행한다. 머루로부터 분리된 안토시아닌은 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 투여량-의존 방식으로 저감시킨다(도 8A 참조). 세포 밖으로 분비된 MMP-2 및 MMP-9의 발현의 억제가 gelatin zymography상에서 관찰되었다 (도 8B 참조).

[0115] ***아홉째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 NF-KB의 발현을 억제한다.***

[0116] *NF-KB*는 암의 성장, 전이 및 약제 내성 유전자들과 밀접한 관계가 있으며 MMP-2, MMP-9의 분비와도 밀접한 관계가 있다. 먼저 웨스턴 블롯팅과 루시퍼레리즈 활성 검사로 안토시아닌이 NF-KB를 억제하는 것을 확인하였다.(도 9a 참조). 그리고 *NF-KB*, MMP-2, MMP-9의 발현과의 연관 관계를 다시 확인하기 위하여 NF-KB를 활성화 한 경우 MMP-2, MMP-9의 발현이 증가하였으며 이를 다시 머루추출 안토시아니을 처리하니 증가된 MMP-2, MMP-9의 발현이 억제됨을 관찰하였다(도 9b참조).

[0117] ***열번째, 머루로부터 분리된 안토시아닌은 B형 간염 유래 간암 처치에 유용하다.***

[0118] 상기 결과로부터, 본 발명에서 머루로부터 분리해낸 안토시아닌은 암세포 침윤 억제 및 아폽토시스 세포 치사를 매개하는 것을 명백히 확인할 수 있었다(도 10 참조).

산업이용 가능성

[0119] 본 발명에 따르면, 안토시아닌이 B형 간염 바이러스 유래 간암의 처치에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0120] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 Hep3B 간암 세포의 증식을 억제함을 입증하는 도면이다.

[0121] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 Hep3B 간암 세포내 아폽토시스를 유도함을 입증하는 도면이다.

[0122] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 캐스파제 활성 및 PARP의 후속 분열을 유도함을 입증하는 도면이다.

[0123] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도된 아폽토시스는 치사 수용체-매개된 경로를 통해 수행되지 않음을 입증하는 도면이다.

[0124] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 미토콘드리아 경로를 통해 최소 부분적으로 아폽토시스를 유도함을 입증하는 도면이다.

[0125] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 머루로부터 분리된 안토시아닌-유도 아폽토시스도중 Bcl-2 및 IAP 패밀리 단백질을 조절함을 도시한 도면이다.

[0126] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 Hep 3B 간암 세포의 이동과 침윤을 저해함을 입증하고 콩껍질에서 분리된 안토시아닌에 비해 간암 세포주의 침윤 저해효과가 높음을 보여주는 도면이다.

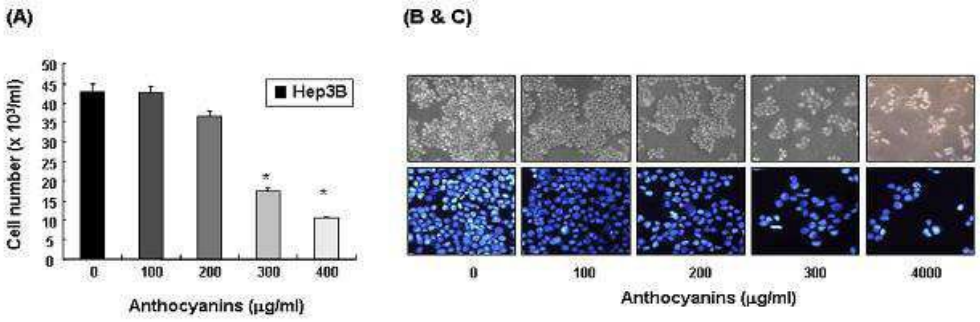
[0127] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저해함을 도시한 도면이다.

[0128] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리된 안토시아닌이 NF-KB의 발현을 저해하며 함을 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 저해와 관련이 있음을 도시한 도면이다.

[0129] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 의해 머루로부터 분리해낸 안토시아닌이 암세포 침윤 억제 및 아폽토시스 세포 치사를 매개하는 경로를 도시한 흐름도이다.

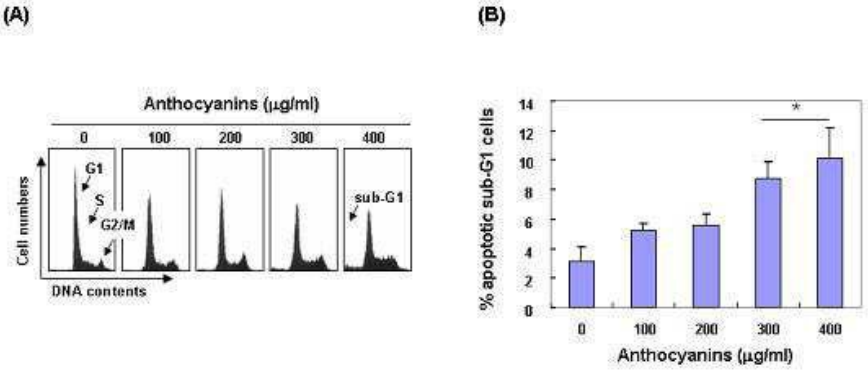
도면

도면1



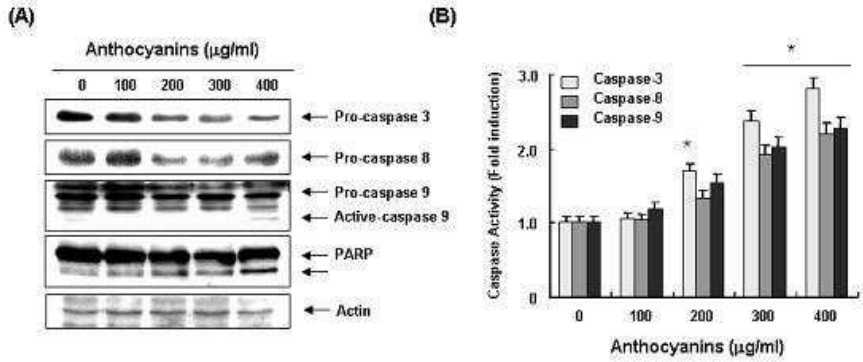
Hep3B cells were seeded at the density of 5 × 10^4 cells per ml. The cells were treated with indicated concentrations of the anthocyanins for 48 h. (A) Cell number was determined by Hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. The data are shown as mean ± SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$ compared with control values in the absence of the anthocyanins. (B) The cells were photographed by inverted microscope (Magnification, × 200). (C) After fixation, the cells were stained with DAPI solution. Stained nuclei were then observed under fluorescent microscope using a blue filter (Magnification, × 400).

도면2



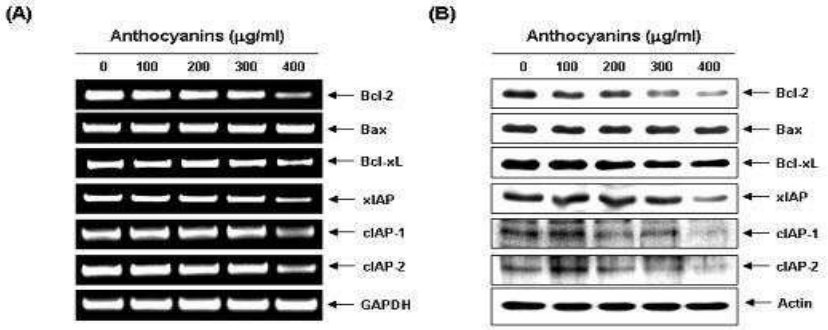
(A) Hep3B cells were treated with indicated concentrations of the anthocyanins for 48 h and flow cytometric analyses were carried out. To quantify the degree of the anthocyanins-induced apoptosis, sub-G1 DNA content, which represents the fractions undergoing apoptotic DNA degradation, was analyzed by flow cytometry. (B) Each point represents the mean ± SD in three independent experiments.

도면3



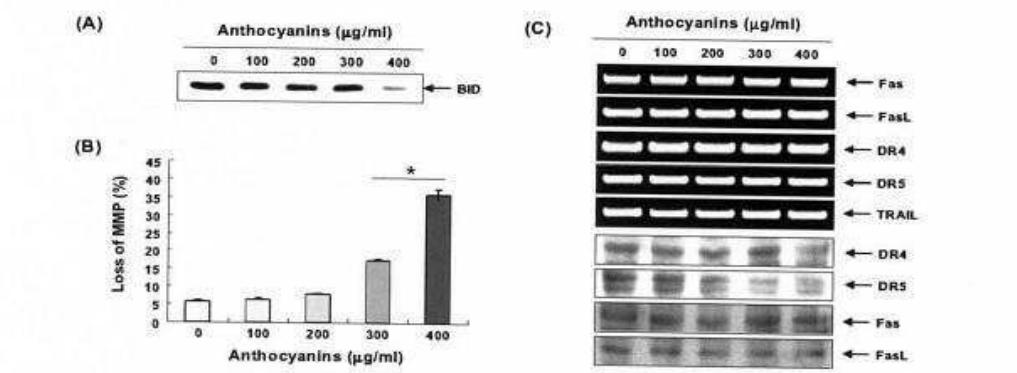
(A) After 48 h incubation with the anthocyanins, the cells were lysed and the cellular proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-caspase-3, anti-caspase-8, anti-caspase-9 and anti-PARP antibodies. The proteins were visualized using an ECL detection system. β-Actin was used as the internal control. (B) The cell lysates from the cells treated with piceatannol for 48 h were assayed for *in vitro* caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activity using DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA respectively, as substrates. The released fluorescent products were measured. Bar graph represents mean ± SD of three independent experiments.

도면4



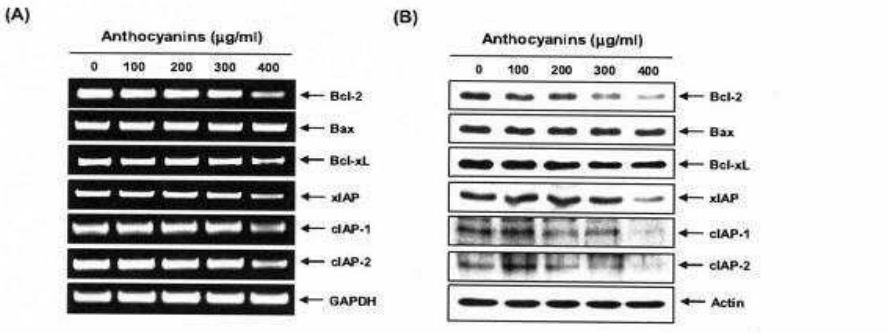
(A) The cells were incubated with indicated concentrations of the anthocyanins for 48 h, and the total RNA was isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by Ethidium Bromide staining. GAPDH was used as the internal control. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were lysed and equal amounts of the proteins were then resolved by SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and detected by ECL.

도면5



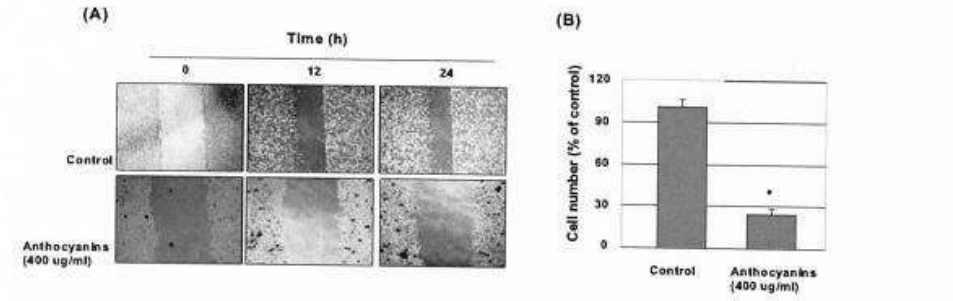
(A) Hep3B cells were treated with for 48, lysed and then the proteins were resolved using SDS-PAGE and then transferred onto nitrocellulose membranes. Bid proteins were then visualized using an ECL detection system. (B) Mitochondrial membrane potential was measured with lipophilic cationic probe, JC-1. The cells were incubated with 10 uM JC-1 at 37°C for 20 min. The JC-1 fluorescence intensity was detected by flow cytometry. Data are represented as mean ± SD of three independent experiments. (C) The cells grown under the same conditions as (A) and the total protein and RNA were isolated and RT-PCR and Western blotting were performed.

도면6



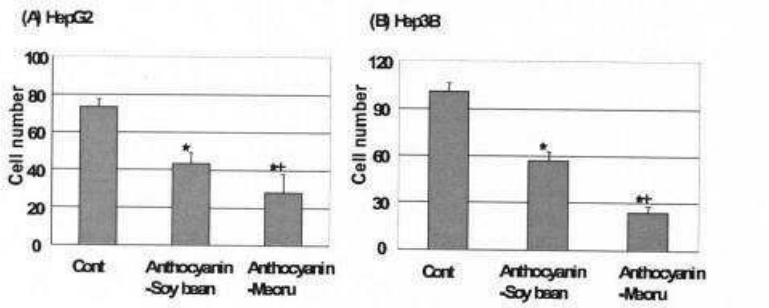
(A) The cells were incubated with indicated concentrations of the anthocyanins for 48 h, and the total RNA was isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with the indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel and visualized by Ethidium Bromide staining. GAPDH was used as the internal control. (B) The cells grown under the same conditions as (A) were lysed and equal amounts of the proteins were then resolved by SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies and detected by ECL.

도면7a



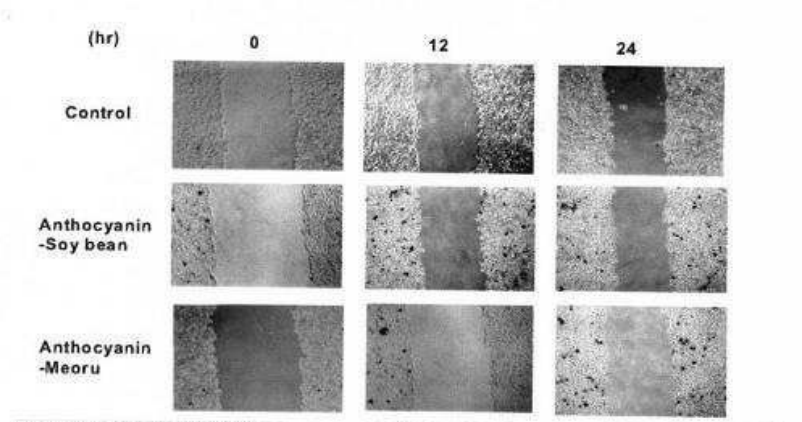
(A) Cells were grown to 100% confluency on 30-mm cell culture dishes coated with rat tail collagen and then treated without or with the anthocyanins for 24 h. A scratch was made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum-free media without or with the anthocyanins was added. Photographs of the wounded area were taken at the interval of 0, 12, and 24 h after the scratch to evaluate cell movement into the wounded area. (B) The cells were exposed to the anthocyanins for 6 h. The cells (5 x 10^4 cells) were loaded on pre-coated Matrigel 24-well invasion chambers (BD Biosciences) in the absence or presence of the anthocyanins. Medium containing 20% FBS was placed in the basolateral chamber to act as a chemoattractant. After 48 h, the cells on the apical side were wiped off using a Q-tip. Next, the cells on the bottom of the filter were stained using hematoxylin and then counted. The effect of anthocyanins are represented as a percentage of the values of control cells (% of control).

도면7b



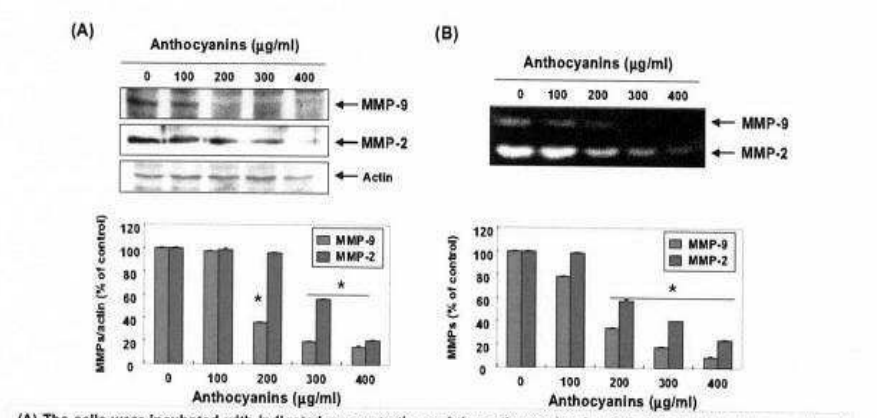
Effect of anthocyanin on HepG2 and HepG3B cell invasiveness : (A) HepG2, (B) HepG3B. Cells were grown on Biocoat Matrigel invasion chamber and treated with DMSO or 500ug/ml anthocyanin. After 24hrs, wipe off the cells on the apical side of transwells (inside), fixed with methanol, stained with Hematoxylin and then counted the cell numbers under the microscope. The data represents the mean ± s.d. of three independent experiments. The data were evaluated for statistic significance with t- test. The means with * was statistically different compared with Control and + compared with black soybean anthocyanin. A p value < 0.05 was considered significant..

도면7c



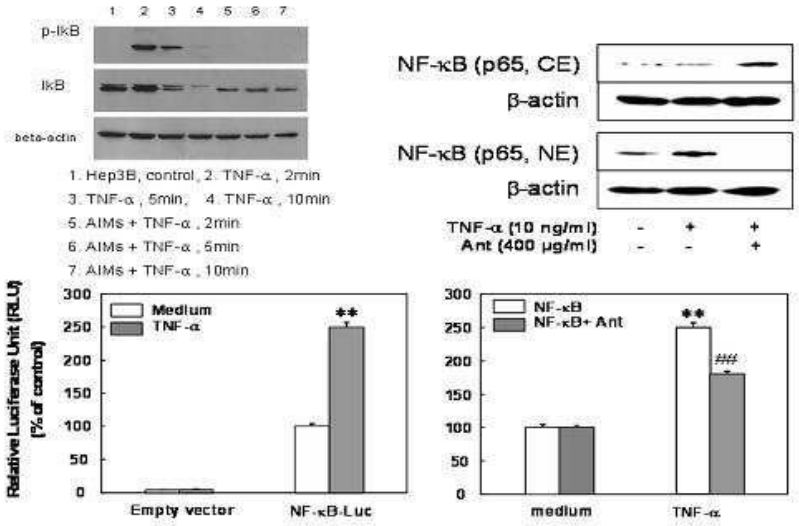
Wound healing test. (A) Cells were grown to 100% confluency on 30-mm cell culture dishes coated with rat tail collagen and then treated without or with the anthocyanins for 24 h. A scratch was made through the cell layer using a pipette tip. After washing with PBS, serum-free media without or with the anthocyanins was added. Photographs of the wounded area were taken at the interval of 0, 12, and 24 h after the scratch to evaluate cell movement into the wounded area.

도면8

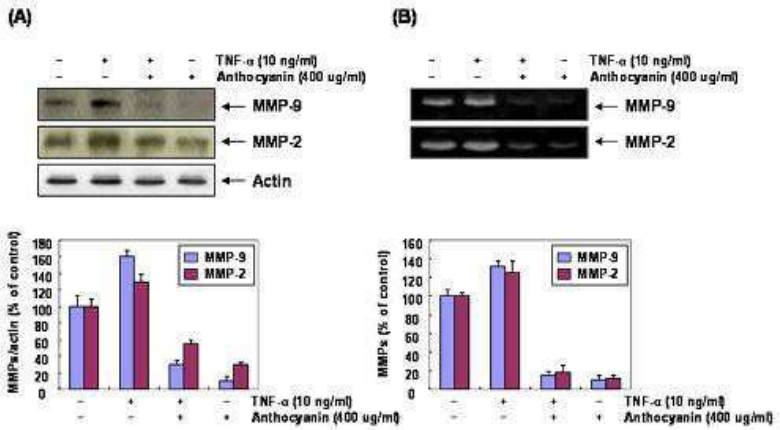


(A) The cells were incubated with indicated concentrations of the anthocyanins for 48 h, lysed and equal amounts of proteins were then separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2 antibodies and detected by ECL system. (B) Hep3B cells were incubated for 48 h without or with the anthocyanins (100–400 μg/ml). The gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 in the conditioning culture medium were assayed by electrophoresis on 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin at 4 °C. Values represent mean ± SEM of three independent experiments.

도면9a



도면9b



(A) Western blotting for the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-2.
(B) The gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 in the conditioning culture medium

도면10

