



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133482  
(43) 공개일자 2022년10월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/9062 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)  
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 36/9062 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0038634  
(22) 출원일자 2021년03월25일  
심사청구일자 2021년03월25일
- (71) 출원인  
경희대학교 산학협력단  
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자  
김기영  
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
- 김재구  
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 211동 904호(식사동, 위시티일산자이2단지아파트)
- (74) 대리인  
특허법인태백

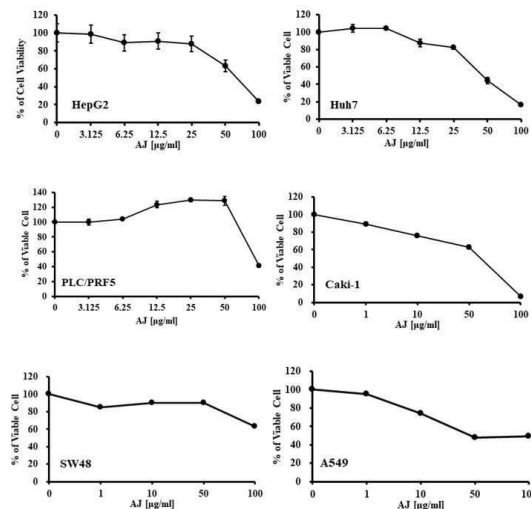
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 난치병 중의 하나인 암에 대해서 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물은 암세포 사멸과 암세포의 세포 주기 조절을 통한 항암효과를 나타내므로 암 치료용 의약품, 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 암 개선용 항암 보조제로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 꽃양하 추출물은 꽃양하의 지상부에서 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 꽃양하의 지상부는 잎, 열매 및 가지로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 부위인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 꽃양하 추출물은 정제수, (C1-C4)알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 꽃양하 추출물은 정제수를 넣은 후 50 내지 70℃에서 교반하여 추출하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 꽃양하 추출물은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출 및 초음파 추출 중 하나 이상의 추출 방법으로 추출한 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암은 신장암, 간암, 대장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 꽃양하 추출물은 세포사멸 또는 세포주기 조절을 통한 암세포 사멸 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 9

꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

#### 청구항 10

꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선용 항암보조제.

### 발명의 설명

#### 기술분야

[0001] 본 발명은 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

#### 배경기술

[0002] 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나인 암은 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 1위의 질병으로서 연간 약 10

만명 이상이 진단되고, 약 6만명 이상을 사망에 이르게 한다. 암은 진행초기 단계에서는 세포의 DNA 손상으로 돌연변이가 발생하고, 증식 단계에서는 돌연변이로 인한 비정상적인 유전자발현이 유도되거나 내지세포간의 신호전달과정 변화 등을 통하여 세포 증식이 증가, 세포사멸이 억제되며, 전이 단계에서는 이러한 이상 유전자 발현이 더욱 증가되어 암세포의 전이가 유도된다.

[0003] 현재 사용되고 있는 항암제들 중 효소, 백신 등의 생물학적 제제는 실용 단계에 있는 상태는 아니며, 화학 합성 의약품의 경우 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고 독성에 의해 많은 부작용의 위험이 있다. 이러한 이유로 아직 완전한 치료법은 개발된 것이 없으며, 비교적 효과적인 기존의 암 치료법인 외과적 수술 요법, 방사선 치료 요법을 병행하고 있으며, 따라서 화학 합성 의약품의 부작용이 없는 식물유래 천연 항암제의 개발이 요구된다.

[0004] 꽃양하(*Alpinia japonica*)는 중국 전통 약초로서 진통을 완화하는데 사용되어 왔다. 중국 남동부와 일본에 널리 분포하고 있으며 우리나라 전라남도과 제주도에서 분포하고 있으며, 특히 남부 제주도, 사수도등 섬의 숲 밑에서 난다.

[0005] 아직 꽃양하 추출물에 대한 항암 효능에 대해서는 어떠한 교시나 시사된 바가 없으며, 부작용이 적은 식물유래 천연 항암제 개발은 여전히 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 암 개선용 항암보조제를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0008] 본 발명은 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 암 개선용 항암보조제를 제공한다.

### 발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물은 암세포 사멸과 암세포의 세포 주기 조절을 통한 항암효과를 나타내므로 암 치료용 의약품, 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 또는 암 개선용 항암보조제로 유용하게 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 여러 조직의 암세포에 대한 독성 효과를 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 JC-1 염색법을 통한 세포 사멸을 평가한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 Annexin V/PI를 통한 세포 사멸을 평가한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 사멸과 관련된 유전자의 발현 변화에 대한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 사멸과 관련된 유전자의 단백질 발현 변화에 대한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 주기 변화에 대한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 주기와 관련된 유전자의 발현 변화에 대한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0012] 본 발명자들은 현재 항암제로 활용되고 있는 화학 합성 의약품의 부작용 문제를 해소할 수 있는 식물유래 천연 항암제의 개발을 위해 예의 노력한 결과, 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물이 암세포 사멸과 암세포의 세포 주기 조절을 통한 항암효과를 나타내는 것을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.
- [0013] 본 발명의 일 관점에 따르면, 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 꽃양하 추출물은 꽃양하의 지상부에서 추출하여 제조될 수 있으나, 바람직하게는 잎, 열매 및 가지로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 부위에서 추출될 수 있고, 바람직하게는 꽃양하의 잎에서 추출하여 제조될 수 있다.
- [0015] 상기 꽃양하 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다.
- [0016] 상기 꽃양하 추출물은 물, (C1-C4)알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 물을 사용할 수 있다.
- [0017] 상기 추출 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열수 추출을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 약학 조성물은 신장암, 간암, 대장암 및 폐암으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 암의 치료 효과가 우수하며, 바람직하게는 간암에 대한 항암효과가 보다 우수하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 꽃양하 추출물의 투여량은 이를 섭취하는 개체에 대한 항암효과를 제공하기에 충분한 양을 포함하며, 꽃양하 추출물은 천연물로서 생체 안전성이 우수하므로 당업자가 다양한 변수를 고려하여 양적 상한을 적절히 조정할 수 있다.
- [0020] 상기 꽃양하 추출물의 농도는 25 내지 110 mg/kg 인 것이 바람직하나, 가장 바람직하게는 50 내지 100 mg/kg 인 것이 가장 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일실시예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수

있다.

- [0026] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강 기능식품을 제공한다.
- [0027] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0028] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정 이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0030] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 먼류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.
- [0031] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 꽃양하 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 꽃양하(*Alpinia japonica*) 추출물을 포함하는 암 개선용 항암보조제를 제공한다.
- [0033] 이때, 상기 항암보조제는 항암제와 병용 투여되어 암을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 상기 항암보조제에 있어서, 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0036] **실시예 1: 꽃양하 추출물의 제조**
- [0037] 건조된 제주도를 산지로 하는 꽃양하의 잎과 줄기를 분쇄하여 추출 용기에 넣고 정제수를 15배수로 넣은 후 60℃에서 3시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출액은 여과지로 여과한 후 여액이 완전히 증발할 때까지 50℃에서 감압 농축하여 꽃양하 추출물을 제작하였다. 이에 따른 수율은 약 12.0%로 나타났다. 꽃양하 추출물은 10mg/ml의 농도로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 사용하였다.
- [0038] **실험예 1: 꽃양하 추출물에 의한 세포 활성 평가**
- [0039] 상기 꽃양하 추출물로 인간의 여러 조직의 암세포들에 대한 증식 억제 효과를 확인하고자, MTT 분석 방법을 이용하여 평가하였다.
- [0040] 다양한 암세포들(HepG2, Huh7, PLC/PRF5, Caki-1, SW48 및 A549)을 각각 96-웰 플레이트(96-well tissue culture plates (SPL))에  $1 \times 10^4$  cells/0.1ml의 농도로 분주하였다. 실시예 1에서 준비한 꽃양하 추출물을 DMSO에 농도별로 처리한 배지를 추가하고 48시간 동안 배양하였다. 대조군의 DMSO는 최대 농도가 1%를 초과하지 않도록 추가하였다. 배양 후 배지에 5mg/ml MTT(sigma Cat. M2128)를 투입한 후, 37℃에서 3시간 동안

반응하였다. 배지를 제거 후 0.1 ml의 DMSO를 투입하고 10분 동안 반응 후 microplate reader (BioTek Instruments, Korea)를 이용하여 540 nm 흡광도에서 세포 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다

[0041] 도 1과 같이, 간암세포인 HepG2, Huh7에 대해 25  $\mu$ g/ml 이상의 꽃양하 추출물에서 세포 활성이 줄어드는 것을 보였으며, 간세포인 PLC/PRF5에서는 50  $\mu$ g/ml에서 세포 활성이 크게 감소하였다. 신장암세포(Caki-1) 그리고 폐암세포(A549)에서 모두 50  $\mu$ g/ml 농도에서 세포 활성이 감소하였다. 대장 암세포인 SW48에서도 꽃양하 추출물을 통한 40% 정도의 세포 활성의 감소를 확인하였다.

[0042] 상기 결과를 통해 꽃양하 추출물이 간암세포를 포함하여 여러 조직의 암세포들에 대해 효과적인 세포 활성 저해 효과를 보이는 것을 확인하였다.

[0043] **실험예 2: JC-1을 이용한 꽃양하 추출물에 의한 세포 사멸 효과 확인**

[0044] 간암세포(HepG2)를 24-웰 플레이트(24-well tissue culture plates (SPL))에  $1 \times 10^5$  cells/0.5ml의 농도로 분주하였다. 실시예 1에서 준비한 꽃양하 추출물을 DMSO에 농도별로 처리한 배지를 추가하고 24시간 동안 배양하였다. 대조군의 DMSO는 최대 농도가 1%를 초과하지 않도록 추가하였다. 배지를 모두 제거하고 인산 완충 생리식염수(Phosphate Buffered Saline; PBS)로 씻어준다. 37°C에서 5  $\mu$ M의 JC-1을 30분간 반응시킨 뒤 PBS로 씻어주었다. PBS를 넣어준 뒤 형광현미경(EVOS FL Cell Imaging System, Thermo Fisher)을 이용하여 촬영하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다

[0045] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 꽃양하 추출물의 농도가 증가함에 따라 정상적인 미토콘드리아(mitochondria)가 나타내는 붉은 형광색이 줄어드는 것을 확인하였다.

[0046] 상기 결과를 통해 꽃양하 추출물이 HepG2의 미토콘드리아 활성에 영향을 끼치며 이를 통해 세포 사멸을 유발한다는 것을 확인하였다.

[0047] **실험예 3: Annexin V/PI를 이용한 꽃양하 추출물에 의한 세포 사멸 효과 확인**

[0048] 본 발명의 실시예에 따른 꽃양하 추출물의 농도별 HepG2에 대해 Annexin V/PI를 통한 세포 사멸을 평가하기 위하여, eBioscience Annexin V apoptosis detection kit APC(Thermo Fisher Scientific)을 이용하였다. HepG2를 24-웰 플레이트(24-well tissue culture plates (SPL))에  $1 \times 10^5$  cells/0.5ml의 농도로 분주하였다. 실시예 1에서 준비한 꽃양하 추출물을 DMSO에 농도별로 처리한 배지를 추가하고 24시간 동안 배양하였다. 대조군의 DMSO는 최대 농도가 1%를 초과하지 않도록 추가하였다. 배지를 모두 제거하고 PBS로 씻어주었다. Trypsine/EDTA를 처리하여 세포를 플레이트에서 떼어내고 800 $\times$ g에 5분간 원심분리하였다. 세포는 바인딩 버퍼(binding buffer)를 이용하여 현탁하며 Annexin V와 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide; PI)를 넣고 상온에서 15분간 가만 두었다. 해당 세포를 FACS 분석을 위해 BD Accuri C6 Plus System(BD Bioscience)를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0049] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 꽃양하 추출물 농도별 HepG2에 대해 Annexin V에 반응하는 세포(Q3-2+Q3-4의 차지 비율)가 증가하는 것을 확인하였고 이를 통해 추출물에 의한 HepG2의 세포 사멸 효과를 재확인할 수 있었다.

[0050] **실험예 4: 세포 사멸과 관련된 유전자의 실시간 PCR을 이용한 꽃양하 추출물에 의한 세포 사멸 효과 확인**

[0051] 본 발명의 일 실시예에 따른 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 사멸과 관련된 유전자의 실시간 PCR 변화를 다음과 같이 관찰하였다.

[0052] HepG2를 24-웰 플레이트(24-well tissue culture plates (SPL))에  $1 \times 10^5$  cells/0.5ml의 농도로 분주하였다. 실시예 1에서 준비한 꽃양하 추출물을 DMSO에 농도별로 처리한 배지를 추가하고 24 시간 동안 배양하였다. 대조군의 DMSO는 최대 농도가 1%를 초과하지 않도록 추가하였다. 배지를 모두 제거하고 TRIzol reagent(Invitrogen corporation)을 처리하여 세포 과쇄 및 RNA를 얻었다. HelixCript Thermo Reverse Transcriptase(Nanohelix)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 96-웰 플레이트(96-well PCR plates(Bio-rad))에 합성된 cDNA와 2XRT Pre-MIX kit(Biofact)를 넣고 CFX Connect Real-Time PCR Detection System(Bio-rad)에서 반응하였다. 실험에 사용한 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0053] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 세포 사멸을 유도하는 Bax의 유전자 발현양은 크게 변화가 없었지만 세포

사멸을 저해하는 Bcl-2의 발현양은 꽃양하 추출물의 농도가 증가함에 따라 크게 감소하였다. 이에 따라 세포 사멸을 측정하는 Bax/Bcl-2의 비율은 꽃양하 추출물 처리 농도에 따라 증가하였다. 또한 세포 사멸을 조절하는 p53의 발현양 또한 증가하는 것을 확인하였다.

[0054] 이를 통해 꽃양하 추출물로 인한 HepG2에 대한 세포 사멸이 증가한다는 것을 확인하였다.

## 표 1

| Genes | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') |
|-------|------------------------|------------------------|
| Bax   | TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAG | CTCCATGTTACTGTCCAGT    |
| Bcl-2 | TCCCTCGCTGCACAAATAC    | ACGACCCGATGGCCATAGA    |
| p53   | AGGCCTTGGAAGTCAAGGAT   | TTATGGCGGGAGGTAGACTG   |
| GAPDH | GTGAAGGTVGGAGTVAACG    | TGAGGTCAATGAAGGGGTC    |

[0056] 실험예 5: 웨스턴 블랏을 통한 꽃양하 추출물에 의한 세포 사멸과 관련된 단백질 발현의 변화 확인

[0057] 꽃양하 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 사멸과 관련된 유전자의 단백질 발현 변화를 다음과 같이 관찰하였다.

[0058] 꽃양하 추출물을 처리한 HepG2를 RIPA 버퍼를 이용하여 세포를 용해하였다. 동일한 양의 단백질을 10% 내지 15% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride(PVDF)로 옮겼다. 옮겨진 세포막을 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin; BSA)으로 블로킹 하였다. 이후 제1 항체가 포함된 5% BSA를 넣고 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 제1 항체 처리 후 TBST를 이용하여 씻어준 뒤에 제2 항체가 포함된 5% BSA를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. Enhanced ECL(Bio-Rad)을 세포막에 반응시킨 후 UVITEC imaging system(UVITEC Cambridge)을 이용하여 세포막을 촬영하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0059] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 Bax 단백질의 발현양은 꽃양하 추출물의 농도가 증가함에 따라 증가하였으나 Bcl-2 단백질의 발현양은 감소하였다. p53의 인산화 형태 단백질의 양 또한 증가하였다. 세포 사멸과 관련된 caspase-3 및 caspase-9의 단백질 발현양도 증가하였으며 caspase-9의 조각 단백질 또한 증가하여 도 4의 결과와 유사한 양상을 보였다.

[0060] 이를 통해 꽃양하 추출물로 인한 HepG2에 대한 세포 사멸과 관련된 유전자의 단백질 발현이 변화한다는 것을 확인하였다.

[0061] 실험예 6: 꽃양하 추출물에 의한 HepG2 세포 주기 변화 확인

[0062] 꽃양하 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 주기 변화를 다음과 같이 관찰하였다.

[0063] 앞선 실험과 동일하게 꽃양하 추출물을 처리한 HepG2를 10% 중성 완충 포르말린(Neutral buffered formalin; NBF)으로 고정시켰다. NBF를 제거하고 PI가 포함된 용액으로 염색하였다. 염색된 세포를 BD Accuri C6 Plus System(BD Bioscience)를 이용하여 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 6과 표 2에서 나타난 바와 같이 꽃양하 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 G0/G1 phase에 속하는 세포가 증가하였으며, S와 G2/M phase에 속하는 세포가 감소하였다. 50 µg/ml의 꽃양하 추출물을 HepG2에 처리하였을 때 DMSO 처리 세포 대비 G0/G1 phase의 세포가 13%가 증가하였으며 G2/M phase의 세포는 8% 감소하였다.

## 표 2

| 꽃양하 추출물<br>농도<br>(µg/ml) | % of 세포 군집(Cell Population) |       |       |
|--------------------------|-----------------------------|-------|-------|
|                          | G0/G1                       | S     | G2/M  |
| DMSO                     | 64.97                       | 12.45 | 15.66 |
| 5                        | 59.64                       | 13.42 | 17.12 |
| 25                       | 67.93                       | 12.59 | 12.82 |
| 50                       | 76.66                       | 7.83  | 7.87  |

[0066] 실험예 8: 꽃양하 추출물에 의한 HepG2의 세포 주기와 관련된 유전자 발현 변화 확인

- [0067] 꽃양하 추출물의 농도별 HepG2에 대해 세포 주기와 관련된 유전자의 실시간 PCR 변화를 다음과 같이 관찰하였다.
- [0068] 상기 실험에 4와 동일한 방법으로 RNA 추출, cDNA 합성 및 Real-Time PCR 실험을 진행하였으며 실험에 사용한 프라이머 서열은 표 3에 나타내었다.
- [0069] 그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이 G1 phase에 해당되는 CDK4, CDK6와 CDKN1B의 발현양은 증가하였으나 Cyclin D와 관련된 CCND1의 발현양은 줄어들었다. S/G2 phase에 해당되는 CDK2와 CCNE1은 감소하였으며 M phase의 CDK1과 CCNB1의 발현양 또한 감소하였다.
- [0070] 이를 통해 꽃양하 추출물에 의한 HepG2에 대한 세포 주기는 G0/G1 phase에서 억제된다는 것을 확인하였다.

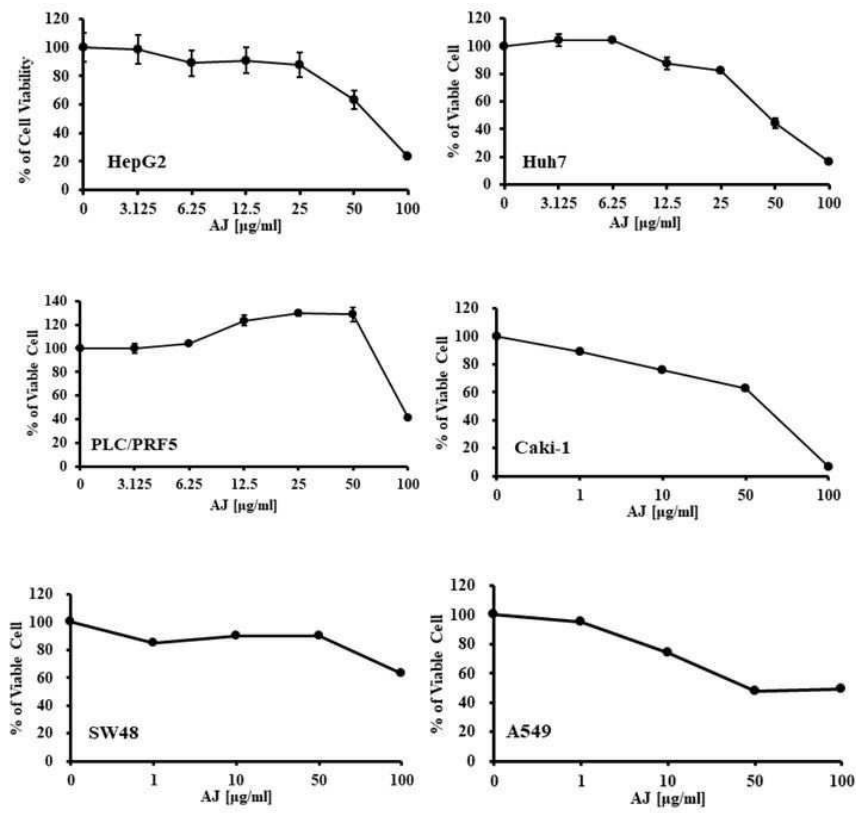
표 3

| Ge<br>ne<br>s  | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') |
|----------------|------------------------|------------------------|
| CD<br>K1       | CAGGTCAAGTGGTAGCCATG   | ACCTGGAATCCTGCATAAGC   |
| CD<br>K2       | TACTGCGTTCCATCCCGAC    | GTACGTGCCCTCTCCGATCTT  |
| CD<br>K4       | CTGAGAATGGCTACCTCTCG   | CGAACTGTGCTGATGGGAAG   |
| CD<br>K6       | CCGAAGTCTTGCTCCAGTCC   | GGGAGTCCAATCACGTCCAA   |
| CC<br>NA<br>2  | AGTAAACAGCCTGCGTTCACC  | GAGGGACCAATGGTTTTCTGG  |
| CC<br>NB<br>1  | TAAGGCGAAGATCAACATGG   | GCTTCCTTCTTCATAGGCAT   |
| CC<br>ND<br>1  | CTGTGCTGCGAAGTGGAAC    | GACGATCTTCGCATGGAC     |
| CC<br>NE<br>1  | ACACCATGAAGGAGGACG     | CACAGACTGCATTATTGTCCC  |
| CD<br>KN<br>1B | AAGGTTTGGAGAGCGGCTG    | GATCAAATGGACTGGCGAGC   |
| GA<br>PD<br>H  | GTGAAGGTVGGAGTVAACG    | TGAGGTCAATGAAGGGGTC    |

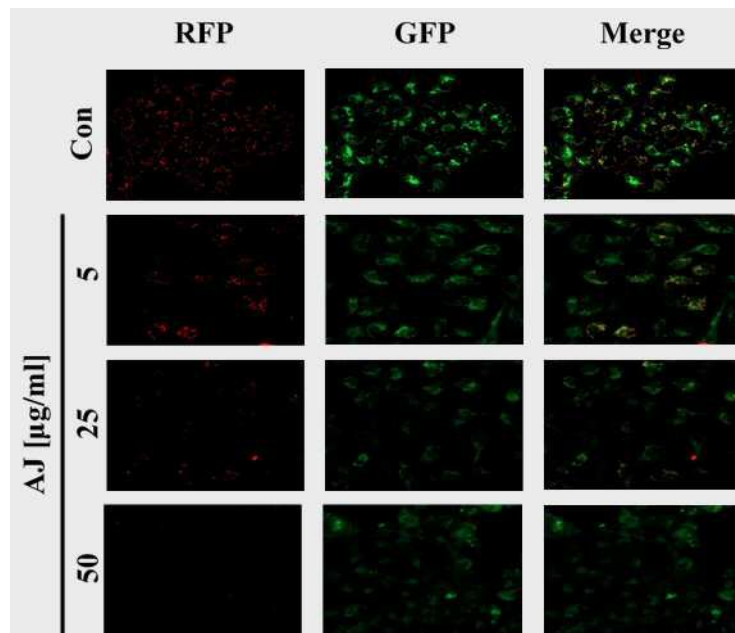
- [0072] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0073] 이 특허는 경기도가 지원하는 ' GRRC program (2020-kyunghee (B04)) '의 지원으로 개발한 결과물입니다.

## 도면

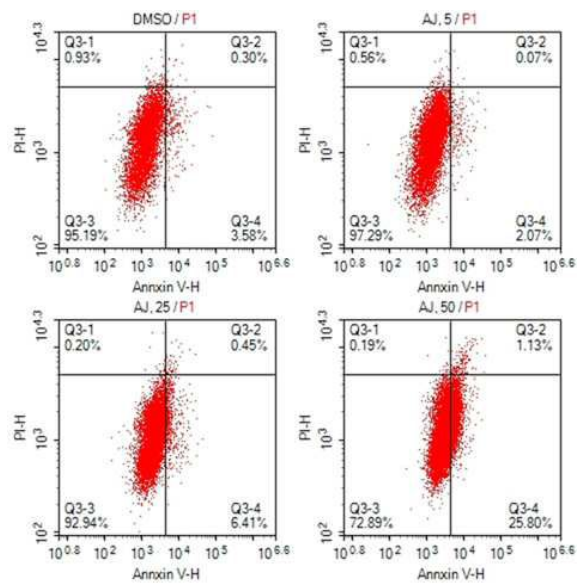
### 도면1



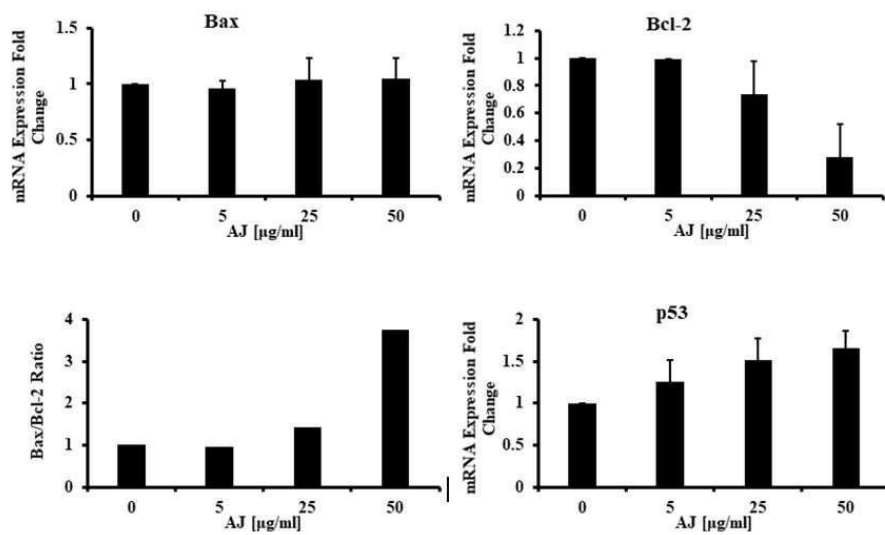
### 도면2



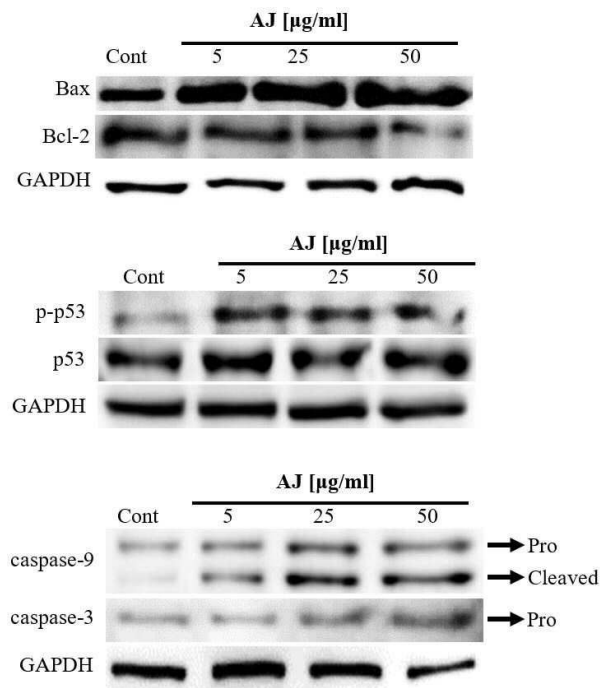
도면3



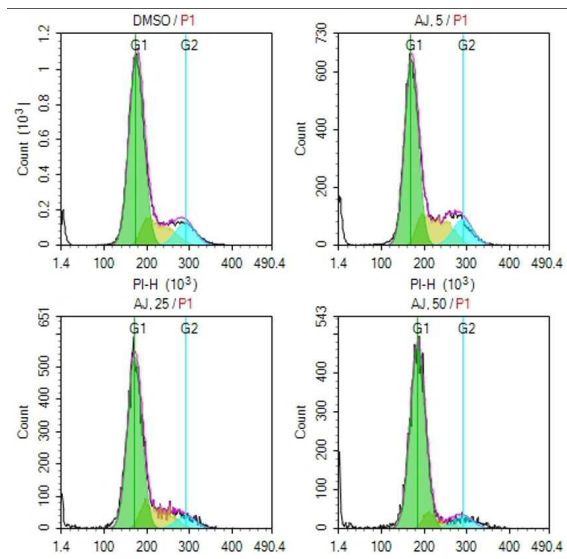
도면4



도면5



도면6



도면7

