



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0014501
(43) 공개일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61P 1/16 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2024.05)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0094613

(22) 출원일자 2023년07월20일

심사청구일자 2023년07월20일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지프리에채아파트)

김예은

경기도 수원시 영통구 매영로398번길 14, 302호 (영통동)

(74) 대리인

특허법인태백

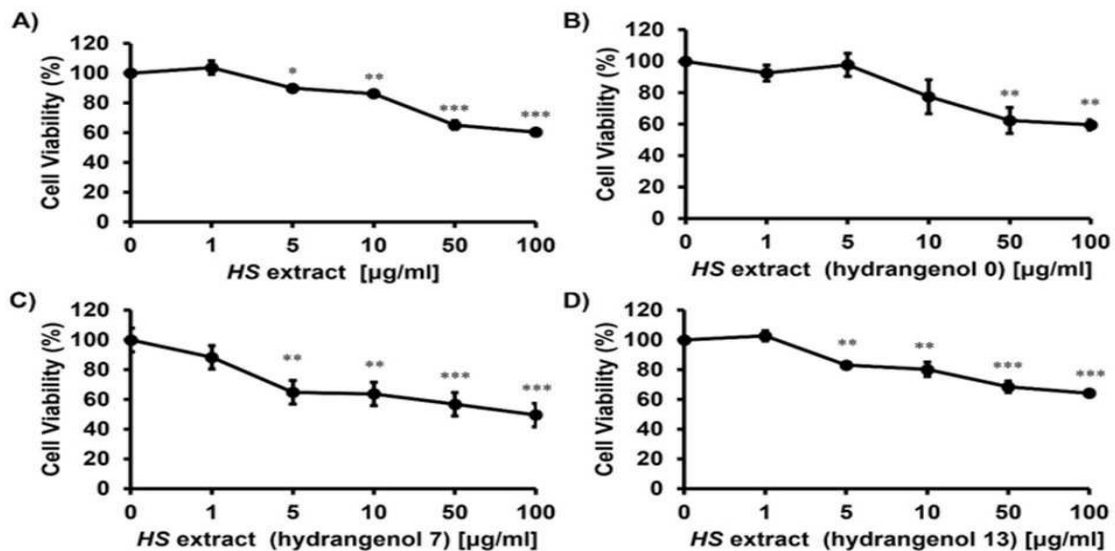
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 산수국 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 추출물이 간암세포의 스페로이드(speroid) 형성 억제; 세포주기 조절; 또는 세포사멸 유도를 통해 항암 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 간암 예방, 치료 또는 개선용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 간암세포의 스페로이드(speroid) 형성 억제;세포주기 조절; 또는 세포사멸 유도를 통해 항암 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

인간을 제외한 개체에 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 간암 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간암(Hepatoma)은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나로, OECD 국가 중 우리나라는 간암 발생률 1위로서 2011년 전체 사망자 중 27.8%가 암으로 사망하였고 이중 폐암은 22.2%로 1위, 간암은 15.3%로 2위를 기록하였다. 최근 간암에 대한 치료법(간절제술, 간이식 및 항암요법 등)이 괄목할만하게 발전하고 있음에도 불구하고 간암의 5년 생존율은 hepatocellular carcinoma, 폐암에 이어 세 번째로 낮은 것으로 보고되고 있고, 상대 생존율 변화를 보면 26.7%의 증가 추세를 보이고 있지만 수술 후 5년 내 재발률이 70% 이상으로 보고되고 있어 난치성 암으로 분류되고 있다.

[0003] 간암의 주요 원인은 B형 간염바이러스(HBV), C형 간염바이러스(HCV)에 의한 급성 및 만성 감염이며, 이들 바이러스에 의한 만성 감염의 결과 간경변증이 발생하고 장기간 염증이 진행하면서 간암으로 진행되는 경우가 대부분이다. 이외에도 알코올성 간질환, 혈색소증, 흡연, 아플라톡신(aflatoxin)과 같은 독소에 의한 간손상 등의 만성 간 질환이 모두 간암의 원인이 될 수 있다.

[0004] 간암은 진행 속도가 매우 빠르므로 조기 검진이 무엇보다 중요하다. 간암의 치료방법으로는 수술로 암 조직을 제거하는 방법, 경동맥 화학 색전술, 경피적 에탄올 주입술, 고주파 응고 치료를 이용하여 암세포를 사멸시키는 방법 등이 있으나, 이들 방법은 간암의 크기가 너무 크거나, 큰 혈관이 침범되어 있거나 다른 장기에 암이 전이되어 있는 경우 효과적이지 못하거나 값이 비싼 단점이 있다. 따라서 상기 치료법의 한계를 극복한 간암 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행 중인 상황이다.

[0005] 수국속(*Hydrangea*)은 아시아와 아메리카에 자생하는 75개종 이상의 속씨식물의 속이다. 중국, 한국, 일본 등 동아시아에서 가장 큰 종 다양성을 보이고, 대부분이 1~3미터 높이의 관목이지만 일부는 작은 나무이고, 그 밖에는 나무를 타고 올라가면서 최대 30미터에 다다른 덩굴나무이다. 낙엽성 또는 상록식물이지만 대개 경작되는

온난종들은 모두 낙엽성이다. 수국속 종류가 매우 다양하고, 크게 자생식물과 재배식물로 분류할 수 있다. 자생식물은 성넬수국(*Hydrangea luteovenosa*), 등수국(*Hydrangea petiolaris*), 산수국(*Hydrangea serrata*), 떡잎산수국(*Hydrangea serrata* (Thunb.) Ser. for. coreana (Nakai) T.B.Lee), 탐라산수국(*Hydrangea serrata* f. *fertilis* Nakai) 등이 있고, 재배식물은 수국(*Hydrangea macrophylla*), 나무수국(*Hydrangea paniculata*), 미국수국(*Hydrangea arborescens*), 떡갈잎수국(*Hydrangea quercifolia*) 등이 있다.

[0006] 수국속은 항염증, 항당뇨, 항비만 등 다양한 약리 활성이 보고된 바 있다. 그 중, 산수국(*Hydrangea serrata*)은 “산의 수국” 이라고도 불리우며 한국과 일본의 산에서 주로 자란다. 차로 달였을 때 자연적으로 단맛이 나기 때문에 “천국의 차” 라고도 불리었고, 한방에서는 생약명으로 칠엽담이라고 하여 만성기관지염, 지해, 거담, 소염해독 등의 치료에 예로부터 사용되었다. 최근 면역증진, 피부 개선, 모발 및 두피 개선 등 산수국의 다양한 활성이 보고되었으나, 간암 개선 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 KR 10-2308618(2021.09.28. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 인간을 제외한 개체에 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 간암 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체에 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 간암 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 산수국(*Hydrangea serrata*) 추출물이 간암세포의 스페로이드(speroid) 형성 억제; 세포주기 조절; 또는 세포사멸 유도를 통해 항암 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 간암 예방, 치료 또는 개선용 조성물로써 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 산수국 추출물(HS extract)(A) 및 산수국 추출물의 지표성분인 하이드랑게놀(Hydrangenol)의 농도에 따른(B-D)의 간암세포에 대한 항암 효과를 분석한 결과이다.

도 2는 산수국 추출물(HS extract)의 간암세포 스페로이드(speroid) 형성 억제 효과를 분석한 결과이다.

도 3은 산수국 추출물이 간암세포의 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포주기 관련 기전의 마커 발현을 분석한 결과이다.

도 4는 산수국 추출물이 간암세포 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 세포사멸 관련 기전의 마커 발현을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명은 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 추출물은 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이의 혼합용매로 추출한 것일 수 있고, 바람직하게는 물로 추출한 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 추출물은 간암세포의 스페로이드(speroid) 형성 억제; 세포주기 조절; 또는 세포사멸 유도를 통해 항암 효과를 나타낼 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0022] 상기 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, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0024] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 봉해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.
- [0028] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가

진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

- [0030] 또한, 본 발명은 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 간암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능 식품"이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0033] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0034] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0035] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0036] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0037] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 간암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0038] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 간암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0039] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 간암의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체에 산수국(*Hyrangea serrata*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는, 간암 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0045] **[실예 1] 산수국 추출물 제조**
- [0046] 제주도에서 확보한 산수국(*Hyrangea serrata*)의 줄기와 잎을 물에 세척하여 동결건조하고, 80℃에서 5시간 동안 물을 용매로 하여 추출하였다. 이후 분무 건조하여 건조 추출물을 획득하였다.

[0048] [실시예 2] 통계 분석

[0049] 데이터는 평균±표준편차(SD)로 나타냈고, 각 실험은 duplicate로 수행하였으며 적어도 3번 이상 반복하였다. One-way ANOVA(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)를 유의성 확인에 사용하였다.

[0051] [실시예 1] 간암세포에 대한 항암 효과 분석

[0052] 1-1. 산수국 추출물의 항암 효과 분석

[0053] 산수국 추출물의 간암세포에 대한 항암 효과를 확인하기 위해, MTT assay를 수행하였다. 96 웰 플레이트에 5×10^3 cell/well로 HepG2 세포(세포주 은행)를 분주(seeding)하고 24시간 동안 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후, 배지를 제거한 후 산수국 추출물을 농도별로(0, 5, 10, 50 및 100 µg/ml) 무혈청(serum free) 배지와 함께 24시간 동안 처리하였다. DMSO(dimethyl sulfoxide)가 결과에 영향을 미치지 않도록 DMSO는 동일한 모든 농도에서 동일한 농도를 유지하도록 하였다. 그 후 MTT 용액 0.5mg/ml을 처리하고 3시간 동안 37℃에서 배양한 후, 100 µl의 DMSO로 교체하고 포마잔 크리스탈(formazan crystal)을 녹였다. 빛이 차단된 환경에서 15분 동안 약간의 교반을 해주고, 540nm에서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0054] 그 결과, 도 1A와 같이, 산수국 추출물이 간암 세포 성장을 용량 의존적으로 유의하게 억제하였고, 구체적으로, 100 µg/ml 처리군은 간암 세포 성장을 약 43% 억제하였다.

[0056] 1-2. 하이드란게놀(Hydrangenol)의 항암 효과 분석

[0057] 산수국 추출물의 지표성분인 하이드란게놀(Hydrangenol)이 산수국 추출물의 항암 효과에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 실시예 1-1과 동일한 방식으로 하이드란게놀 양이 서로 다른(0, 7 및 13%) 산수국 추출물의 항암 효과를 분석하였다.

[0058] 그 결과, 도 1B~1D와 같이, 추출물별로 항암 효과에 대한 유의한 차이는 나타나지 않았다. 상기 결과로부터, 산수국 추출물의 간암세포에 대한 항암 효과는 하이드란게놀과 독립적으로 일어나는 것을 확인하였다.

[0060] [실시예 2] 간암세포 스페로이드(speroid) 형성 억제 효과 분석

[0061] 산수국 추출물이 간암세포 스페로이드(speroid) 형성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 3D culture assay를 수행하였다. 추출물은 10mg/ml의 농도로 DMSO에 녹인 후 사용하였다. HepG2 세포를 96 웰 SPL3D™ Cell Floater에 5×10^3 cell/well을 분주(seeding)하고, 24시간 동안 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 산수국 추출물(100 µg/ml)을 배지에 첨가하여 스페로이드 형성을 확인하였다. 3, 4 및 6일 후, camera-attached microscope(EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 스페로이드 사진을 촬영하고, Image J software를 사용하여 면적을 계산하여 수치화하였다.

[0062] 그 결과, 도 2와 같이, 대조군(DMSO 처리군; Control) 대비 산수국 추출물 처리군에서 스페로이드 형성이 유의하게 감소하였고, 6일째에는 산수국 추출물의 스페로이드 부피는 대조군의 스페로이드 부피의 약 56%로 나타났다. 상기 결과로부터, 산수국 추출물은 간암세포의 스페로이드 형성 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0064] [실시예 3] 항암 효과 기전 분석

[0065] 3-1. 세포주기에 미치는 영향 분석

[0066] 산수국 추출물이 간암세포의 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위해, qRT-PCR(Quantitative real-time PCR) 및 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 세포주기 조절 관련 기전의 마커 발현을 확인하였다.

[0067] qRT-PCR 수행을 위해, HepG2 세포를 6 웰 플레이트에 5×10^4 cell/well로 분주(seeding)하고 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 이후 무혈청(serum free) 배지와 함께 산수국 추출물을 농도별로(0, 5, 10 및 50 µg/ml) 처리하고 24시간 추가로 배양하였다. 이후 Trizol reagent(Life Technology, Thermo Fisher

Scientific, USA)를 이용하여 제조업체의 프로토콜을 따라 RNA를 분리하였다. 이후 1 µg의 total RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 QGreen 2X SybrGreen qPCR Master Mix(CellSafe, Korea)를 사용하여 수행하였다. 이때 사용된 primer sequence는 하기 표 1과 같다. GAPDH를 정량적 대조군으로 사용하였다. 이후 유전자 발현량은 fold change 값으로 계산하여 delta-delta Cq로 표현하였다.

표 1

[0068]

유전자	프라이머 서열(5'-3')	Annealing 온도(℃)
GAPDH	F: GTGAAGGTCGGAGTCAACG	57.1
	R: TGAGGTCAATGAAGGGGTC	55.3
CDK1	F: CAGGTCAAGTGGTAGCCATG	56.9
	R: ACCTGGAATCCTGCATAAGC	55.9
CDK2	F: TACTGCGTTCCATCCCGAC	58.6
	R: GTACGTGCCCTCTCCGATCTT	60.3
CDK4	F: CTGAGAATGGCTACCTCTCG	55.9
	R: CGAACTGTGCTGATGGGAAG	57.4
CDK6	F: CCGAAGTCTTGCTCCAGTCC	59.5
	R: GGGAGTCCAATCACGTCCAA	58.4
CDKN1B(p27)	F: AAGGTTTGAGAGCGGCTG	53.0
	R: GATCAAATGGACTGGCGAGC	52.8
CCNA2(Cyclin A2)	F: AGTAAACAGCCTGCGTTACC	59.1
	R: GAGGGACCAATGGTTTCTGG	57.1
CCNB1(Cyclin B1)	F: TAAGGCGAAGATCAACATGG	53.0
	R: GCTTCCTTCTTCATAGGCAT	52.8
CCND1(Cyclin D1)	F: CTGTGCTGCGAAGTGGAACC	60.6
	R: GACGATCTTCCGCATGGAC	57.3

[0069]

웨스턴 블롯 수행을 위해, qRT-PCR 수행 과정에서 샘플을 준비한 것과 동일하게 세포를 준비하고, 세포를 prep 하여 단백질 농도를 확인하기 위해 Bradford assay를 수행하였다. 세포 용해물(Cell lysate)로부터 나온 단백질을 30 µg/well을 로딩하였고, SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용하여 분리하였다. PVDF(polyvinylidene difluoride) 막(membrane)으로 transfer한 후 TBST buffer(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl 및 0.1% Tween 20, pH 7.6)에 녹여진 5% BSA를 이용하여 블로킹(blocking)하였다.

[0070]

이후 막(membrane)에 1차 항체 p-p53(sc-51690), BAX(sc-493), Bcl2(sc-7382), Caspase-9 p35(sc-8355), GAPDH(sc-25778), p38(sc-535), p-p38(sc-17852-R), JNK(sc-7345), p-JNK(sc-6254)(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), p53(9282s), Caspase-3(9662S), p44/42 MAPK(Erk1/2)(9102S) 및 p-p44/42 MAPK(p-ERK1/2)(9101S)(Cell Signaling Technology, MA, USA)를 4℃ 조건에서 밤새(overnight) 처리하였다. 2차 항체를 1시간 처리한 후 ECL reagent(Bio-Rad, USA)를 처리하여 UVITEC imaging system equipment(UVITEC Cambridge, UK)로 detection하였다. 웨스턴 블롯 band는 ImageJ software를 사용하여 수치화하였다.

[0071]

그 결과, 도 3A와 같이, CDKN1B(p27)의 상대적 mRNA 발현은 증가한 반면, CDK2의 상대적 mRNA 발현은 감소하였고, 도 3B와 같이, CDK1, CDK4, CCNA2(Cyclin A2), CCNB1(Cyclin B1) 및 CCND1(Cyclin D1)의 mRNA 발현은 유의한 변화가 나타나지 않은 반면, CDK6의 mRNA 발현은 유의하게 증가했다. 또한, 도 3C와 같이, p-p38, p-p53, JNK, pJNK, ERK1/2 및 pERK1/2의 단백질 발현은 유의한 변화가 나타나지 않은 반면, p38 및 p53의 단백질 발현은 용량 의존적으로 감소하였다. 상기 결과로부터, 도 3D와 같이, 산수국 추출물이 간암세포의 세포주기 정지 유도를 통해 항암 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0073]

3-2. 세포사멸 관련 기전 분석

[0074]

산수국 추출물이 간암세포 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, 상기 실시예 3-1과 동일한 방식으로 qRT-PCR(Quantitative real-time PCR) 및 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 세포사멸 관련 기전의 마커 발현을 확인하였다.

[0075]

그 결과, 도 4와 같이, BAX(Bcl-2-associated X protein)의 발현이 증가한 반면, Bcl-2의 발현은 약간 감소하여 BAX/Bcl-2 비율이 용량 의존적으로 증가했다. 또한, caspase-9의 발현이 유의하게 증가하였고, caspase-3의

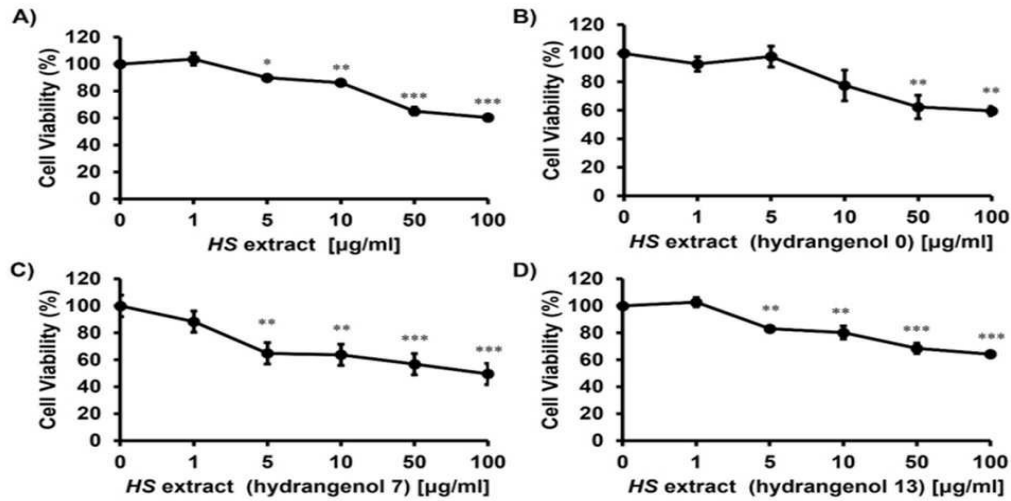
발현은 약간 증가하였다. 상기 결과로부터, 산수국 추출물은 간암세포의 세포사멸을 촉진하는 것을 확인하였다.

[0077]

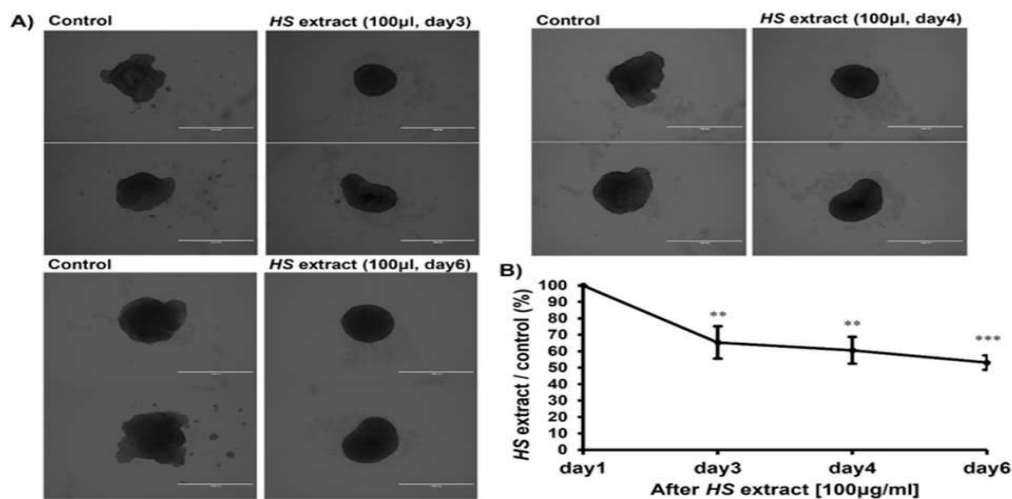
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

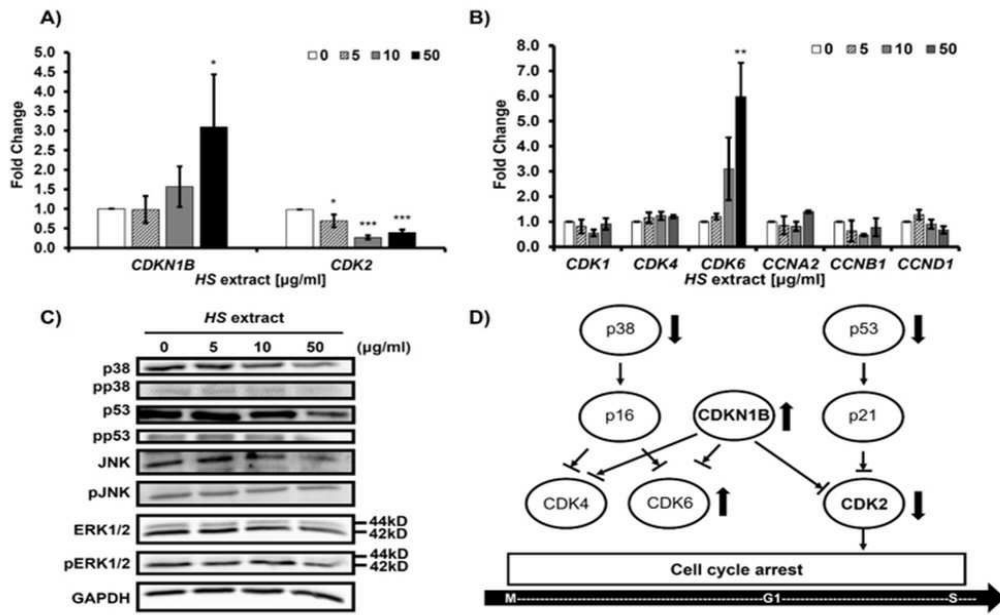
도면1



도면2



도면3



도면4

