



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0039833
(43) 공개일자 2011년04월20일

(51) Int. Cl.

A61K 36/85 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0096851

(22) 출원일자 2009년10월12일

심사청구일자 2009년10월12일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

서영완

경기도 안산시 상록구 사동 1346 월드아파트 707동 406호

남택정

부산 남구 문현1동 53-3번지 부광주택 B-101호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

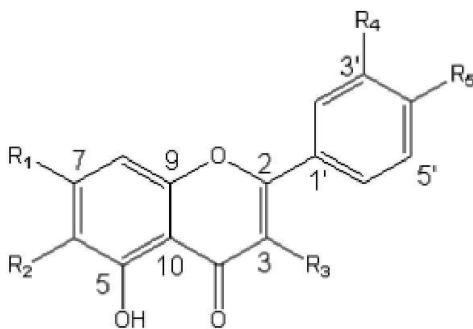
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 순비기나무 유래 플라보노이드계 화합물을 함유하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 순비기나무 추출물 또는 그로부터 유래한 하기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물을 제공한다.

<화학식 1>

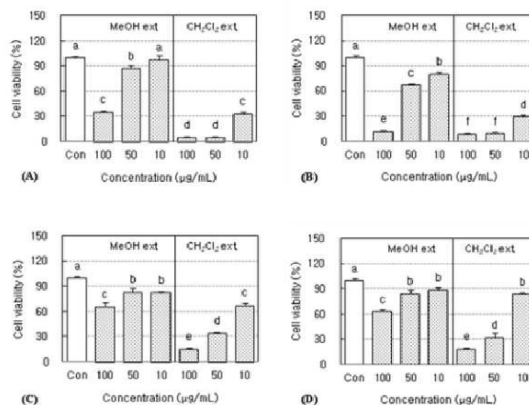


상기 식에서,

R1, R4 및 R5는 각각 OH 또는 OMe이며,

R2 및 R3는 각각 H 또는 OMe이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김유아

부산광역시 동구 초량동 829-39

이정임

경상남도 김해시 봉황동 회현아파트 107호

특허청구의 범위

청구항 1

순비기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 순비기나무 추출물은 메틸렌 클로라이드 추출물 또는 메탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물.

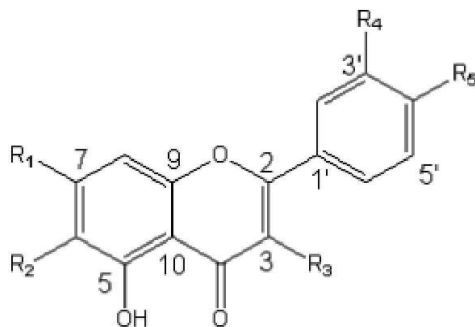
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 순비기나무 추출물은, 순비기나무 추출물의 H_2O , n -BuOH, 85% aq. MeOH 및 n -헥산 분획물인 것을 특징으로 하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물.

청구항 4

순비기나무 유래 하기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물.

<화학식 1>



상기 식에서,

R1, R4 및 R5는 각각 OH 또는 OMe이며,

R2 및 R3는 각각 H 또는 OMe이다.

청구항 5

제1항에 있어서 상기 암이 위암, 결장암, 섬유육종 또는 유방암인 것을 특징으로 하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물.

청구항 6

순비기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

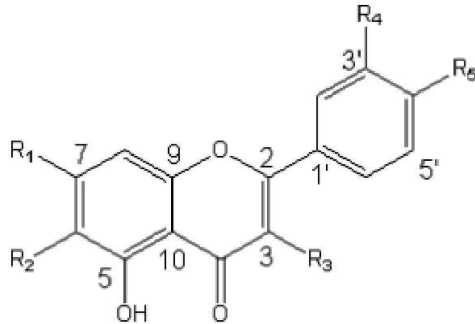
명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 순비기나무 유래 플라보노이드계 화합물을 함유하는 항암용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 순비기나무 추출물 또는 그로부터 유래한 하기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] <화학식 1>



[0003]

[0004] 상기 식에서,

[0005] R1, R4 및 R5는 각각 OH 또는 OMe이며,

[0006] R2 및 R3는 각각 H 또는 OMe이다.

배경 기술

[0007] 현대의학의 발전과 다양한 의약품의 개발에도 불구하고 인류에게 암은 여전히 해결되지 않는 위험 요소로 작용하고 있다. 특히, 독소루비신(doxorubicin)과 파클리탁셀(paclitaxel)(탁셀) 같은 항암제는 부작용이나 내성 등의 부정적인 면을 지니고 있어 이러한 면을 보완할 수 있는 의약품의 지속적인 개발이 요구된다.

[0008] 최근 들어서는 합성의약품을 주로 하는 서양의학에 반해 천연물의 약리효과를 근본으로 하는 동양의학에 관심이 높아지고 있다[Doll, 1992]. 하지만 동양의학의 효능을 입증할만한 생리학적 또는 천연물화학적 자료의 부족으로 인하여 과학적인 면에서 그 활용도가 부족한 실정이다. 이러한 이유에서 동양의 천연물질로부터 암이나 심혈관계 질환을 치료하고 예방하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 여러 가지 부작용을 줄일 수 있는 천연물 유래의 신규 생리활성물질 개발에 대한 관심이 고조되고 있다[Shur, 2004; Park and Pezzuto, 2002; Stan *et al.*, 2008].

[0009] 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 한국, 일본 등의 곳곳에서 해안가를 따라 분포하는 사구성 염생식물의 일종으로, 이러한 식물은 해수와 민물이 섞이는 독특한 환경에 서식하며 이에 적합한 적응기작을 발전시킴으로써 새로운 신물질 자원으로서 주목 받고 있다[Seo *et al.*, 2004; Ngetal., 2004; Kongetal., 2008]. 순비기나무는 입술 모양의 자줏빛 꽃과 전체에 회색빛을 띤 흰색의 잔 털이 있는 것이 특징이며, 한방에서는 그 열매를 만형자(蔓荊子)라고 하여 두통, 안질, 귓병 등의 질병의 치료에 사용한다[Lee, 2002]. 조(Jo) 등의 연구[2007]에 따르면 순비기나무 추출물이HT-29 인체 결장암세포에 대하여 항암 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 다수의 연구에 의해 플라보노이드류 및 테르페노이드류의 이차대사산물이 분리된 바 있으며, 이들의 생리활성효과 또한 보고되었다[Kondo *et al.*, 1986; Ono *et al.*, 1997; You *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 1998; Kawazoe *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2001; Ono *et al.*^{a, b}, 2001; Ono *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005].

[0010] 한편, 대한민국 등록특허 제10-0443268호 “A C A T의 활성을 저해하는 순비기나무 열매로부터추출한 퓨란성 락탄 디테르펜 화합물 및 이의 조성물”에는 특이적으로 아실-코에이:콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(ACYL-COA:CHOLESTEROL ACYLTRANSFERASE, ACAT)를 저해하여 고콜레스테롤혈증에 기인하는 고지혈증, 동맥경화 등의

심혈관 질환 예방과 치료에 유용하게 사용할 수 있는 푸란성 랩단 디테르펜(FURANIC LABDANE DITERPENE) 계열의 화합물인 로텐디푸란(ROTUNDIFURAN)과 6-에피-로텐디푸란(6-EPI-ROTUNDIFURAN), 이를 함유하는 조성물 및 순비기나무(VITEX ROTUNDIFOLIA L.)의 열매인 만형자(蔓荊子)로부터 푸란성 랩단 디테르펜 화합물을 분리하는 방법이 개시되어 있다.

[0011] 또한, 대한민국 특허출원 제10-2007-0033958호 “항산화 효과를 갖는 순비기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물”에는 순비기나무 추출물이 높은 폴리페놀 함량, 우수한 전자공여능, SOD 유사활성능, 아질산염 소거능, 크산틴 산화효소 저해능 및 티로시나아제 저해능을 지니므로, 피부노화방지 및 미백용 화장품으로 유용하게 이용될 수 있음이 개시되어 있다.

[0012] 상기와 같은 점을 감안하여 본 발명에서는 순비기나무를 이용하여 인체 암세포의 종류에 따른 생리활성효과의 특이성을 파악하고, 생리활성에 의한 발암물질의 생성방지 및 생체방어작용 그리고 더 나아가 항암 생리활성물질 탐색하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 순비기나무 유래 추출물 및 그로부터 유래한 플라보노이드계 화합물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적은 순비기나무로부터 추출물 및 분획물을 제조하고, 이로부터 분리된 3종의 플라보노이드 계열의 화합물을 이용하여 HT1080 인체 섬유육종 세포, AGS 인체 위암세포, MCF-7 인체 유방암세포 및 HT-29 인체 결장암세포에 대한 증식 억제 효과와 아포토시스와 관련된 여러 유전자의 mRNA 발현 정도를 확인함으로써 달성되었다.

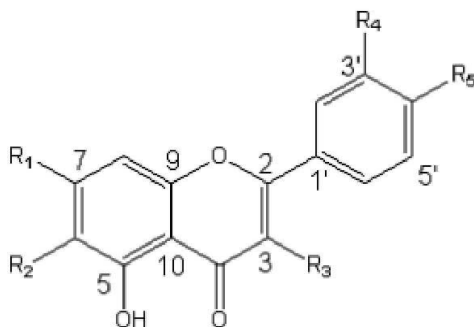
[0015] 본 발명은 순비기나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 따른 순비기나무 추출물은 바람직하게는 메틸렌 클로라이드 추출물 또는 메탄올 추출물이다.

[0017] 본 발명에 따른 순비기나무 추출물은 또한 상기 용매 추출물의 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH 및 *n*-헥산 분획물일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 순비기나무 유래 하기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암의 예방, 치료 또는 억제용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] <화학식 1>



[0020]

- [0021] 상기 식에서,
- [0022] R1, R4 및 R5는 각각 OH 또는 OMe이며,
- [0023] R2 및 R3는 각각 H 또는 OMe이다.
- [0024] 상기 본 발명에 따른 순비기나무 유래 플라보노이드계 화합물은 바람직하게는 루테올린(luteolin), 비텍시카르핀(vitexicarpin) 또는 아르테메틴(artemetin)이다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 플라보노이드계 화합물은 다음과 같이 제조된다.
- [0026] 우선, 순비기나무를 분쇄하여 메틸렌 클로라이드 용매로 추출하고, 남은 잔사에 다시 메탄올 용매를 가하고 동일과정으로 추출하여 추출물을 얻는다. 상기 두 종류의 용매 추출물을 합한 후에 n-헥산, 85% aq. MeOH, n-BuOH 및 H₂O층으로 순차적으로 분획하여 총 4 종의 분획물을 얻는다. 상기 분획물 중 n-BuOH 분획물을 역상 크로마토그래피하여 총 6개의 분획을 얻고, 상기 분획 중 분획 3을 역상 HPLC 하여 화합물 1을 얻는다.
- [0027] 이어서 85% aq.MeOH 분획물을 역상크로마토그래피하여 6개의 분획을 얻고, 이들 중 분획 4를 역상 HPLC하여 화합물 2와 3을 분리한다. 분리된 화합물은 분광학적 방법과 문헌 조사를 통하여 구조를 결정한 결과 상기 화학식 1의 화합물인 것으로 확인되었다,
- [0028] 본 발명에 따른 순비기나무 유래 추출물, 상기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 위압, 결장압, 섬유육종, 유방암 등을 포함하는 각종 인체 암의 예방, 치료 또는 억제를 위한 약제 활성 성분으로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물은 약제학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용가능한 염은 약제학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염을 포함한다. 상기 유리산으로는 무기산과 유기산을 모두 사용할 수 있으며, 사용되는 무기산은 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등이 있으며, 사용되는 유기산은 구연산, 초산, 젖산, 말레인산, 우마린산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콘산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 트리플루오로아세트산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산 및 아스파르트산 등이 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물은 생체 내 흡수를 증진시키거나 용해도를 증가시키기 위한 방편으로 프로드럭의 형태를 만들어 사용할 수 있으며, 또한 수화물, 용매화물의 형태로 사용할 수도 있다. 예를 들어, 생체에 흡수된 후 쉽게 이탈될 수 있는 기를 붙이거나 염의 형태로 만들어 사용할 수 있으며, 이러한 염의 형태는 하나 혹은 하나 이상의 수화물이나 용매화물의 형태가 될 수 있으며, 상기의 프로드럭, 염의 수화물 또는 용매화물 역시 본 발명의 범위에 속한다.
- [0031] 본 발명에 따른 치료학적 효과를 달성하는데 사용되는 순비기나무 유래 추출물, 상기 화학식 1의 쿠마린 계 화합물, 그의 수화물, 그의 용매화물 및 그의 약학적으로 허용되는 염의 양은 물론 특정 화합물, 투여 방법, 치료할 대상, 및 치료할 질환에 따라 달라지며, 통상적인 의학의 투여량에 의존하나, 보다 바람직하게는 상기 화학식 1의 플라보노이드계 화합물의 유효투입량은 하루에 0.1 내지 10 mg/kg(몸무게) 범위 내에서 투여된다. 또한 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입한다. 또한, 제형에 따라 경구투여, 비경구투여(주사) 또는 국소 투여용 모두 가능하다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 경구투여 경우 기존의 모든 다양한 형태로 제조가능하며 예를 들어 정제, 분말제, 건조시럽, 씹을 수 있는 정제, 과립제, 츄잉정, 캡슐제, 연질캡슐제, 환제, 드링크제, 설하정 등의 여러 가지 형태로 존재할 수 있다. 본 발명에 따른 정제는 유효량으로 생체이용성이 있는 임의의 형태 또는 방식, 즉, 경구경로로 환자에게 투여될 수 있으며, 치료 또는 예방하려는 질병 상태의 특성, 질병의 단계, 및 그 밖의 관련 사정에 따라 적합한 투여 형태 또는 방식을 용이하게 선택할 수 있으며, 본 발명에 따른 조성물이 정제인 경우 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있으며, 이러한 부형제의 비율 및 성질은 선택된 정제의 용해도 및 화학적 특성, 선택된 투여경로 및 표준 약제실무에 의해 결정될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적

으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0033] 또한 본 발명은 염주괴불주머니 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 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 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

효 과

[0035] 본 발명에 따른 순비기나무 추출물 및 이로부터 분리된 화합물, 특히 화합물 2는 p53과 p21의 조절을 통해 Bcl-2의 발현을 감소시킴으로써 아포토시스를 유도하는 역할을 하여 암세포의 증식능 및 세포 자멸사에 영향을 미치는 효과가 있어, 본 발명은 순비기나무 추출물 및 화합물을 이용한 유전자 단계 혹은 in vivo 단계의 생리활성 검증을 통해 항암활성 활성을 가진 건강기능성 식품 및 의약품으로서의 개발할 수 있는 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

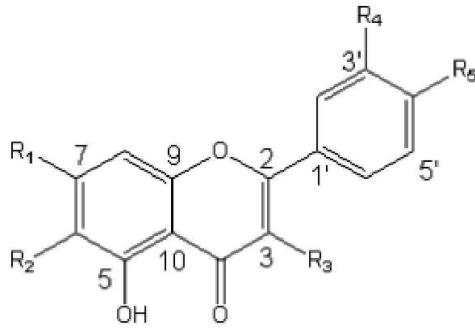
[0037] 실시예 1 : 순비기나무 추출물 및 분획물의 제조

[0038] 본 발명에서 사용한 순비기나무(*Vitex rotundifolia*)는 2003년 7월 전라남도 무안군 현경면 해안가에서 채집하여 음건한 후 -25℃에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 시료는 추출 직전 분쇄한 후, 메틸렌 클로라이드 용매를 이용하여 24시간씩 2회 반복 추출하고, 남은 잔사에 다시 메탄올 용매를 가하고 동일과정으로 2회 반복 추출하여 각각의 용매에 대해서 43.3g과 102.0g (총 145.3 g)의 추출물을 얻었다.

[0039] 상기 두 종류의 용매 추출물을 합한 후에 용매의 극성에 따라 n-헥산, 85% aq. MeOH, n-BuOH 및 H₂O층으로 순차적으로 분획하여, 40℃ 수욕 상에서 회전 진공 증발기(EYELA, N-N series)로 농축하고 각각 33.6 g, 21.0 g, 39.0 g 및 47.8 g의 분획물을 얻었다. 이어서, n-BuOH(15.0g) 분획물로부터 역상크로마토그래피 (C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography)를 이용하여 총 6개의 분획을 얻었으며, 각각에 사용된 용매는 50, 60, 70, 80 및 90% aq. MeOH, 및 100% MeOH였다. 상기 분획 중 분획 3은 67% aq. MeOH의 이동상으로 역상 HPLC (YMC ODS-A, 1 cm x 25 cm, S-5 μm, 2 mL/min)를 수행하여 화합물 1 (119 mg)를 얻었다.

[0040] 85% aq.MeOH 분획물 (21.0 g) 또한 n-BuOH 분획물과 동일한 방법으로 역상크로마토그래피를 수행하여 6개의 분획을 얻었으며, 이들 중 분획 4를 78% aq. MeOH의 이동상으로 역상 HPLC하여 화합물 2 (3 mg)와 3 (71.0mg)을 분리하였다. 분리된 화합물은 분광학적 방법과 문헌 조사를 통하여 구조를 결정하였으며, 그 결과 하기 화학식 1의 화합물인 것으로 확인되었다,

[0041] <화학식 1>



[0042]

[0043]

상기 식에서,

[0044]

R1, R4 및 R5는 각각 OH 또는 OMe이며,

[0045]

R2 및 R3는 각각 H 또는 OMe이다.

[0046]

상기 화학식 1의 화합물 중 R1, R4 및 R5가 OH이고, R2 및 R3가 H인 화합물은 루테올린(luteolin)(화합물 1)이고, R1 내지 R3와 R5가 OMe이고, R4가 OH인 화합물은 비텍시카르핀(vitexicarpin)(화합물 2)이며, R1 내지 R5가 OMe인 화합물은 아르테메틴(artemetin)(화합물 3)으로 알려진 화합물임을 확인할 수 있었다. 각각의 추출/분획물 및 화합물은 디메틸 술폭사이드(DMSO)에 희석하여 일정 농도로 만들어 실험에 사용하였다.

[0047]

실험예

[0048]

1. 사용 재료

[0049]

세포 배양에 필요한 DMEM 배지(Dulbeco's modified Eagle medium)는 하이클론사(Hyclone; USA)에서 구입하였으며, RPMI 1640 배지, FBS(fetal bovine serum), 페니실린-스트렙토마이신, PBS(phosphate buffered saline) 등은 킵코사(GIBCO; USA) 제품을 사용하였다. 암세포의 증식억제 효과를 실험하기 위한 시약으로 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]는 시그마사(Sigma; USA)로부터 구입하였으며, 그 외의 연구에 사용된 용매는 준세이사(Junsei)의 일급시약을 증류하여 사용하였다.

[0050]

2. 세포배양

[0051]

본 발명에 사용한 암세포주인 HT1080 인체 섬유육종 세포(HT1080 human fibrosarcoma cell), AGS 인체 위암세포(AGS human gastric cancer cell), MCF-7 인체 유방암세포(MCF-7 human breast cancer cell), HT-29 인체 결장암세포(HT-29 human colon cancer cell)는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다. HT1080 인체 섬유육종 세포와 MCF-7 인체 유방암세포는 100 units/mL의 페니실린-스트렙토마이신과 10%의 FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하였으며, AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암세포의 경우, 100 units/mL의 페니실린-스트렙토마이신과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기(FormaScientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 2-3일 간격으로 배지를 교환하고 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

[0052]

[0053]

3. 암세포 증식 억제효과 분석

[0054]

상기 실시예 1에서 제조한 순비기나무 추출물과 분획물 및 이로부터 분리한 화합물의 암세포 증식 억제효과 분석은 MTT 분석법을 이용하여 확인하였다. 생존하는 암세포의 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenase)의 효소작용에 의하여 황색의 수용성 물질인 MTT가 환원되어 보라색의 포르마잔 결정을 형성하고, 상기 포르마잔 결정의 형성 정도를 흡광도로 측정함으로써 암세포의 사멸 또는 증식억제 정도를 결정할 수 있다 [Hansen *et al.*, 1989].

[0055] 배양된 암세포는 웰 당 1×10^5 cells/mL가 되도록 96-웰 플레이트에 분주하여 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에 서 배양한 후, 시료를 DMSO에 녹여 농도별로 암세포주에 처리하였다. 대조군에는 시료 대신 인산염 완충 염수 (PBS)를 처리하였으며, 24시간동안 배양한 후 100 μL의 MTT 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4 시간 동안 더 배양하였다[Park *et al.*, 1990]. 생성된 포르마잔 결정은 100 μL의 DMSO에 녹여서 ELISA 리더기 (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포 증식억제율 (%)을 구하였다.

[0056] 대조구의 흡광도 - 시료처리구의 흡광도

[0057] 증식억제율 (%) = $\frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$

[0058] 대조구의 흡광도

[0059]

[0060] 4. 역전사 중합 연쇄 반응 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석

[0061] 상기 실시예 1에 분리한 3종의 화합물을 농도별로 각각 처리한 AGS 인체 위암세포를 대상으로 트리아졸 시약 (Invitrogen Co., CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 올리고 dT 프라이머 (oligo dT primer; GIBCO, USA)와 AMV 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 2 μg의 RNA에서 ss cDNA 를 합성하였다. 이 cDNA를 템플릿으로 사용하여 아포토시스와 관련된 Bax, Bcl-2, p53 및 p21 유전자를 PCR 방 법으로 증폭하였다(표 1 참조 1).

[0062] <표 1>

[0063] RT-PCR에 사용된 프라이머의 서열

[0064]

유전자		서열
Bcl-2	forward	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	reverse	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bax	forward	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	reverse	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
p53	forward	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	reverse	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	forward	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	reverse	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
GAPDH	forward	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	reverse	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

[0065] 이때 하우스키핑 유전자인 GAPDH 유전자를 내부 대조구로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% 아가로스겔을 이용 하여 전기영동하고 EtBr(Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

[0066] 5. 통계적 분석

[0067] 각각의 암세포에 대한 순비기나무의 증식억제 효과 측정 결과는 SAS 9.1.3 통계프로그램(SAS Inc., Cary, NC, USA)에서 ANOVA를 실시한 후, 던컨 다중 범위 테스트(Duncan's multiple range test)를 하여 p < 0.05 수준 에서 시료 평균간의 유의성을 검정하였다. 모든 실험결과는 3회 이상 실시하여 얻어진 평균(Mean) ± 표준편차 (Standard deviation, SD)로 표시하였다.

[0068]

[0069] 실험예 1 : 순비기나무(*V.rotundifolia*) 추출물의 인체 암세포 증식억제 효과

[0070] 염생식물인 순비기나무의 항암 생리활성 물질 검색을 위한 기초 연구로서 순비기나무의 추출물을 이용하여 HT1080 인체 섬유육종 세포, AGS 인체 위암세포, MCF-7 인체 유방암세포 및 HT-29 인체 결장암세포의 증식에 미 치는 영향을 관찰하였다.

[0071] 상기 암세포에 순비기나무의 용매 추출물을 10, 50 및 100 μg/mL 의 농도로 처리한 결과(도 1 참조), 시료 처 리 농도의 증가에 따라 농도 의존적으로 암세포의 증식 억제율이 증가하는 경향을 나타내었다. 메탄올과 메틸

렌 클로라이드 추출물을 HT1080 인체 섬유육종 세포에 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리 했을 때에 각각 2.1%와 66.2%의 효과로 추출물의 극성도에 따라 HT1080 세포의 증식억제율에 차이를 보였다. 동일 세포에 추출물의 농도를 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 높여 처리하였을 경우, 메탄올 추출물에서 각각 12.1%와 63.8%로 급격히 암세포 증식억제 효과가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 메틸렌 클로라이드 추출물은 동일한 농도 조건에서 각각 94.2%와 94.1%로 메탄올 추출물보다 훨씬 뛰어난 억제 효과를 나타내어 추출 용매에 따른 생리활성물질이 추출되는 정도를 추측케 하였다.

[0072] HT1080 세포의 증식억제 효과를 관찰하였을 때와 같이 AGS 인체 위암세포의 증식억제 실험에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 각각의 추출물을 AGS 세포에 처리한 결과, 메탄올 추출물에서는 각각 19.4%, 32.7%, 87.6%로 HT1080 세포에 대한 메탄올 추출물의 증식억제 효과보다 뛰어났으며, 메틸렌 클로라이드 추출물은 각각 70.8%, 90.5%, 90.9%로 HT1080 세포의 결과에서와 동일하게 메탄올 추출물보다 높은 암세포 증식억제 효과가 관찰되었다. 특히, HT1080과 AGS의 세포에 메틸렌 클로라이드 추출물을 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도로 처리하여도 암세포 증식을 60~70% 이상 억제 시키는 것으로 나타나 그 효과가 주목할 만 하였다.

[0073] 동일 조건하에서 MCF-7 인체 유방암세포와 HT-29 인체 결장암세포에 두 가지 추출물 시료를 처리한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 메탄올 추출물 농도에서 대조군에 비해 각각 33.5%, 36.9% 억제 활성을 나타냈으나, HT1080과 AGS 세포에 대한 결과에는 미치지 못하였다. MCF-7과 HT-29 세포에 메틸렌 클로라이드 추출물을 동일 농도에서 처리한 경우에는 각각 84.0%, 81.3%로 HT1080과 AGS 세포의 결과보다는 약하지만 추출 용매의 극성에 따른 효과는 뚜렷이 관찰되었다.

[0074] 전반적으로 순비기나무의 메탄올과 메틸렌 클로라이드 추출물을 4종의 암세포에 처리한 결과, 모든 세포에서 메틸렌 클로라이드 용매 추출물이 높은 활성을 나타내었으며, 이는 각각의 용매 추출물 내에 존재하는 여러 생리활성 물질들 중에 비교적 극성이 덜한 성분들이 암세포의 증식억제에 영향을 미치는 것으로 예상되었다.

[0075]

[0076] 실험예 2 : 순비기나무 (*V.rotundifolia*) 분획물의 인체 암세포 증식 억제효과

[0077] 순비기나무의 암세포 증식억제효과를 나타내는 물질의 특성을 확인하기 위하여 메탄올 및 메틸렌 클로라이드 용매 추출물을 합한 후에 극성도에 따라 H_2O , $n\text{-BuOH}$, 85% aq. MeOH 및 $n\text{-hexan}$ 순서로 용매 분획하여 그 분획물을 얻었으며, 각각의 분획물을 이용하여 인체 암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

[0078] 추출물에서와 유사하게 분획물의 암세포 증식억제 효과는 HT1080 인체 섬유육종 세포와 AGS 인체 위암세포에서 높은 암세포증식억제 효과를 나타냈다. HT1080 세포에 순비기나무 용매 분획물을 농도별(10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 암세포 증식억제 정도를 확인한 결과(도 3 참조), 85% aq. MeOH 층이 대조군에 비해 각각 74.0%, 93.3%, 93.8%의 강력한 암세포 증식억제 효과를 나타내었으며, $n\text{-hexan}$ 층은 각각 24.3%, 38.4%, 94.2%의 암세포 증식억제 효과를 나타내었다. 특히, 85% aq. MeOH 층은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 시료 처리 결과가 약 74%의 억제 효과를 나타내는 특징을 보였다. H_2O 층과 $n\text{-BuOH}$ 층의 경우, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 각각 42.1%, 64.0%의 억제율을 보여 다른 분획물에 비해 암세포 증식억제에 약한 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

[0079] 분획물에 대한 AGS 세포의 암세포 증식억제 효과는 HT1080 세포의 처리 결과와 유사한 경향을 나타냈다(도 3 참조). 특히, 85% aq. MeOH 층은 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리 농도에서 암세포 증식억제율이 각각 79.9%, 90.8%, 91.6%로 농도의존적으로 우수한 암세포 증식억제 효과를 보였다. 또한 동일 농도하에서 $n\text{-hexan}$ 층은 각각 26.8%, 65.6%, 90.9%의 효과를 보여 HT1080 세포의 결과를 뒷받침하였다. 또 한 가지 주목할 사항은 AGS 세포에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리 농도의 H_2O 와 $n\text{-BuOH}$ 층에서도 53.2%, 84.2%의 높은 억제율을 보여 AGS 세포에 탁월한 효과를 보이는 생리활성 물질이 존재할 것으로 예상되었다.

[0080] 동일 조건하에서 각각의 순비기나무 분획물을 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 MCF-7 인체 유방암세포에 처리하고 증식억제 효과를 확인한 결과(도 4 참조), 다른 인체 암세포와 같이 85% aq. MeOH 층에서 가장 높은 암세포 증식억제 효과를 가짐을 확인할 수 있었으며, 억제율은 농도의존적으로 나타나 각각 45.0% 77.3% 90.9%였다. $n\text{-hexan}$ 층에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리 농도에서 50% 이하의 효과를 보였으며, 그 외의 다른 층에서는 동일 농도에서 약 25%의 약한 억제 효과를 나타냈다.

[0081] 순비기나무 용매 분획물의 인체 암세포에 대한 증식억제효과를 HT-29 인체 결장암세포에서 확인한 결과(도 5 참조), 85% aq. MeOH 층과 $n\text{-hexan}$ 층에서 가장 뛰어난 효과를 보이며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 시료 처리 농도에서 각각 82.7%와 81.3%로 다른 세포에서와 유사한 경향이 나타났다. 뒤이어 $n\text{-BuOH}$ 과 H_2O 층이 동일 농도에서 41.8%,

29.0%의 약한 활성을 보였다.

[0082] 따라서 순비기나무 조추출물의 암세포 증식억제에 영향을 미치는 생리활성 물질들이 용매 분획에 의해 85% aq. MeOH 층으로 이동함을 확인 할 수 있었으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에도 HT1080과 AGS 인체 암세포들에서 약 74.0% 79.9 % 의 탁월한 증식억제효과를 보임을 관찰할 수 있었다.

[0083] 따라서 본 발명을 통해 순비기나무는 다양한 종류의 암세포주에 대해 강력한 암세포 증식억제 효과를 지니고 있음을 확인하였으며, 그 가운데에 암세포 증식억제 효과가 뛰어난 85% aq. MeOH 용매 분획물에서 활성성분의 분리 및 정제가 가능할 것으로 여겨졌다.

[0084]

[0085] **실험예 3 : 순비기나무 화합물의 인체 암세포 증식 억제효과**

[0086] 순비기나무의 n-BuOH와 85% aq.MeOH 분획물에서 플라보노이드 계열의 화합물 3종을 분리하여 이를 이용한 인체 암세포 증식 억제효과를 검토하였다.

[0087] 1, 5, 10, 25, 50 μM 의 농도로 AGS, HT-29, HT-1080, MCF-7세포에 각각의 화합물을 처리한 결과, 농도의존적으로 암세포 증식 억제효과를 보여주었으며, 특히 AGS 인체 위암세포에서 그 경향이 뚜렷하게 나타났다. 또한 3종의 화합물 가운데 화합물 2가 다른 화합물에 비해 우수한 암세포 증식 억제 효과가 있는 것으로 확인되었으며, 그 효과는 50 μM 의 시료 처리 농도에서 각각 AGS (58%), HT-29 (68%), HT-1080 (49%) 및 MCF-7 (32 %)였다. 특히, AGS 세포에 1 μM 농도의 화합물 2를 처리한 결과에서도 43%의 강한 암세포 증식 억제효과를 보여 항암제인 독소루비신 및 파클리탁셀(탁솔)과도 상응하는 결과를 보여주었다 (표 2 참조).

[0088] <표 2>

[0089] 독소루비신 및 파클리탁셀(탁솔)의 증식저해 효과

세포주	탁솔 (IC_{50})	독소루비신 (IC_{50})
AGS	7.61 ± 0.48	0.68 ± 0.02
HT-29	0.61 ± 0.07	6.38 ± 0.40
HT1080	33.18 ± 0.48	9.68 ± 0.46
MCF-7	18.28 ± 0.43	40.83 ± 0.86

[0091] 따라서 순비기나무로부터 분리된 3종의 화합물을 이용하여 아포토시스 관련 인자인 Bax, Bcl-2, p53 및 p21의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RNA 추출과 RT-PCR을 이용하여 AGS 인체 위암세포에서 검토하였다. 그 결과, AGS 인체 위암세포에 25 μM 의 농도로 3종의 화합물을 각각 처리했을 때 프로-아포토시스 프라이머인 Bax의 mRNA 발현 증가에는 효과를 보이지 않았으나, 항-아포토시스 프라이머인 Bcl-2의 mRNA 발현이 감소하는 것으로 관찰되었다 (도 7 참조). 3종의 화합물 가운데 암세포 증식 억제 효과와 마찬가지로 화합물 2가 효과가 가장 뛰어났으며, 25 μM 의 처리 농도에서 Bcl-2의 발현을 20%까지 낮추는 것으로 확인되었다.

[0092] 종양 억제 유전자인 p53과 p53의 하위효과기(downstream effector)인 p21의 mRNA 발현의 측정의 경우, 화합물 1과 3은 거의 효과를 보이지 않았으나, 화합물 2는 25 μM 의 처리 농도에서 눈에 띄게 발현량이 증가하는 것이 관찰되었다 (도 8 참조). 따라서 화합물 2의 암세포 증식 억제효과는 p53과 p21의 발현 증가로 인하여 항-아포토시스 프라이머 Bcl-2가 감소되면서 아포토시스가 유도된 것으로 사료된다.

[0093] 이 결과로부터 순비기나무에서 분리된 화합물, 특히 화합물 2가 p53과 p21의 조절을 통해 Bcl-2의 발현을 감소시킴으로써 아포토시스를 유도하는 역할을 하여 암세포의 증식능 및 세포 자멸사에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 추후 순비기나무 추출물 및 화합물을 이용한 유전자 단계 혹은 in vivo 단계의 생리활성 검증을 통해 항암 활성을 가진 건강기능성 식품 및 의약품으로서의 개발이 기대되어진다. 또한, 염생식물 중에서 식용 및 약용으로의 가치성을 인정받고 있는 함초, 나문재, 갯방풍 등과 함께 새로운 생리활성물질 소재군으로서의 가치를 기대해본다.

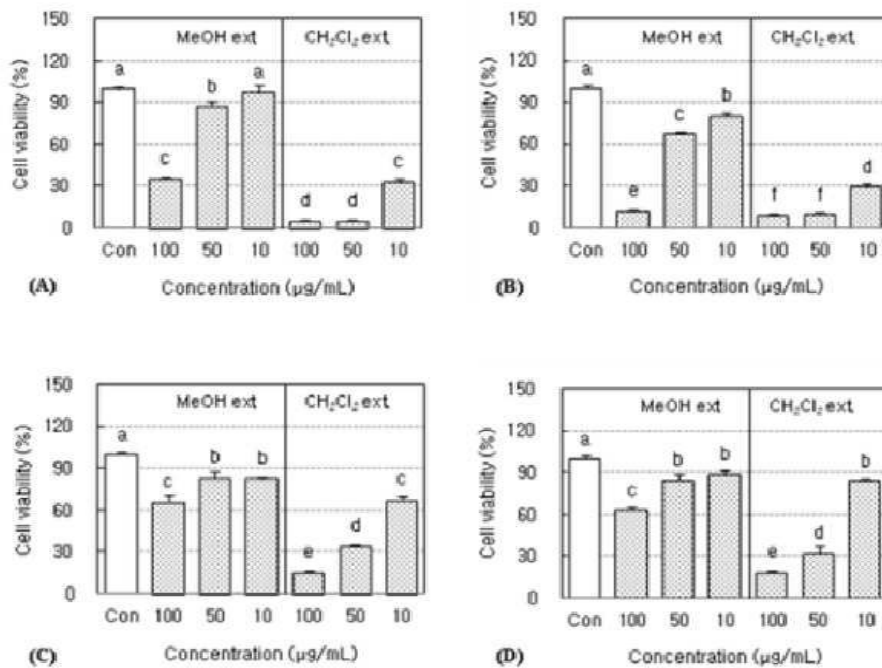
도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 (A) HT1080, (B) AGS, (C) MCF-7 및 (D) HT-29 인체 암 세포주의 성장에 대한 순비기나무 추출물의 저해 효과를 나타낸 그래프이다.

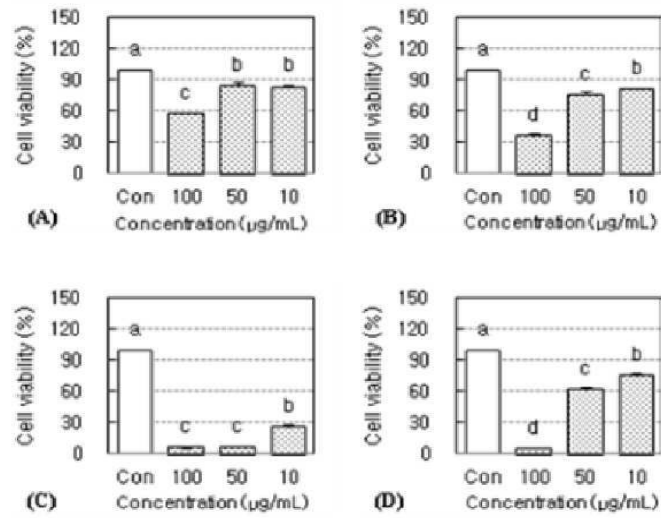
- [0095] 도 2는 HT1080 인체 섬유육종 세포에 대한 순비기나무 유래 용매 분획물 (A) H_2O , (B) n -BuOH, (C) 85% aq. MeOH 및 (D) n -헥산의 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0096] 도 3는 GAS 인체 위암 세포에 대한 순비기나무 유래 용매 분획물 (A) H_2O , (B) n -BuOH, (C) 85% aq. MeOH 및 (D) n -헥산의 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0097] 도 4는 MCF-7 인체 유방암 세포에 대한 순비기나무 유래 용매 분획물 (A) H_2O , (B) n -BuOH, (C) 85% aq. MeOH 및 (D) n -헥산의 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0098] 도 5는 HT-29 인체 결장암 세포에 대한 순비기나무 유래 용매 분획물 (A) H_2O , (B) n -BuOH, (C) 85% aq. MeOH 및 (D) n -헥산의 저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0099] 도 6은 (a) AGS, (b) HT-29 (c) HT-1080 및 (d) MCF-7세포에 대한 순비기나무 유래 화합물 1 내지 3의 증식저해 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0100] 도 7은 AGS 인체 위암 세포에서 (a) Bcl-2 및 (b) Bax의 mRNA 수준에 대한 순비기나무 유래 화합물 1 내지 3의 효과를 나타낸 도이다.
- [0101] 도 8은 AGS 인체 위암 세포에서 (a) p53 및 (b) p21의 mRNA 수준에 대한 순비기나무 유래 화합물 1 내지 3의 효과를 나타낸 도이다.

도면

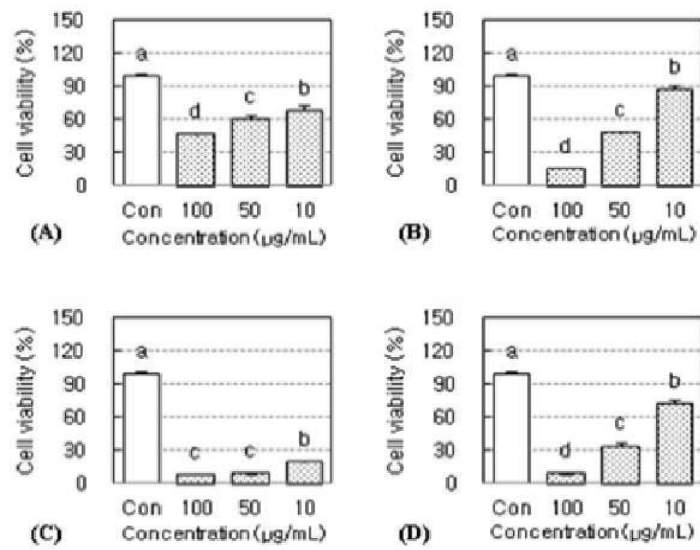
도면1



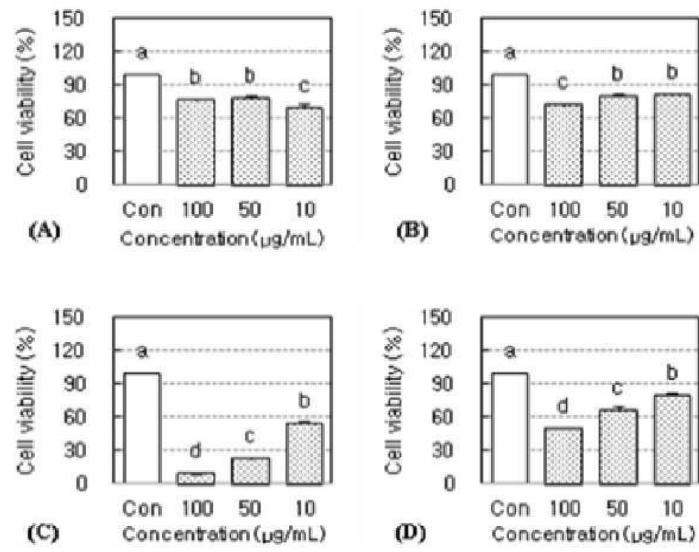
도면2



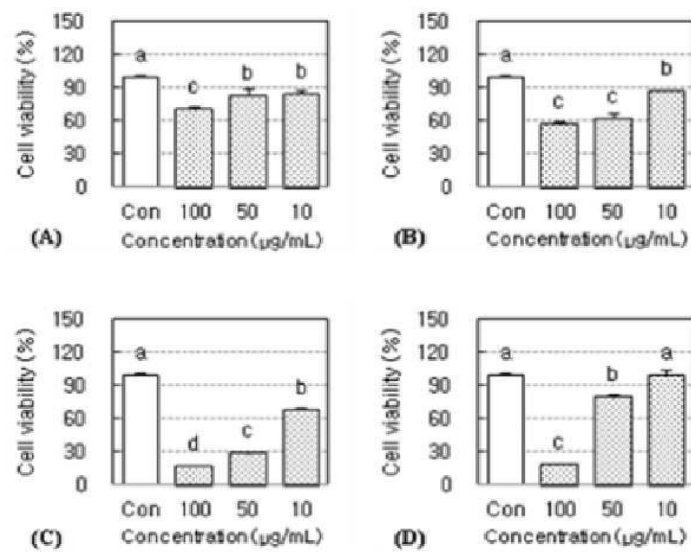
도면3



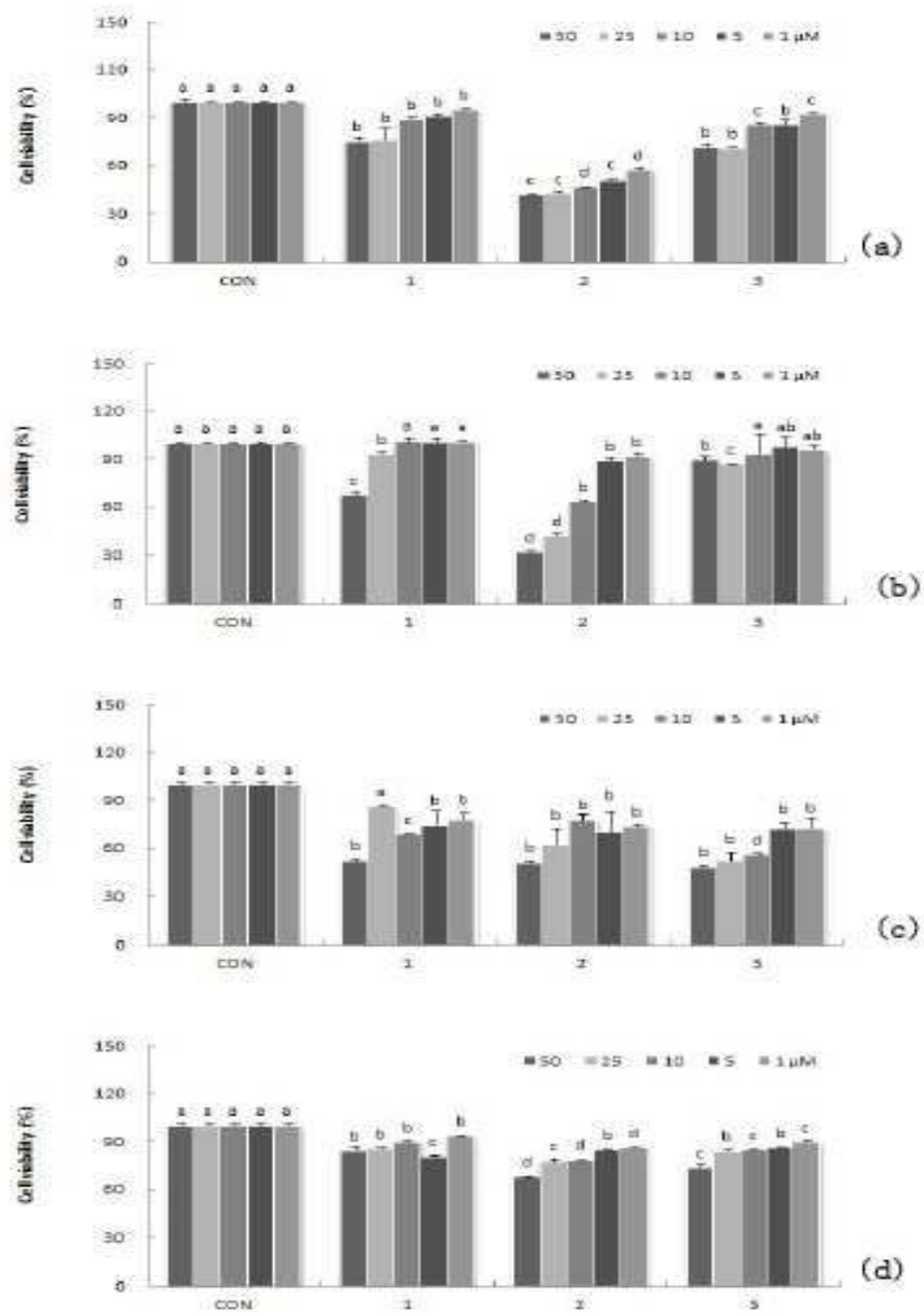
도면4



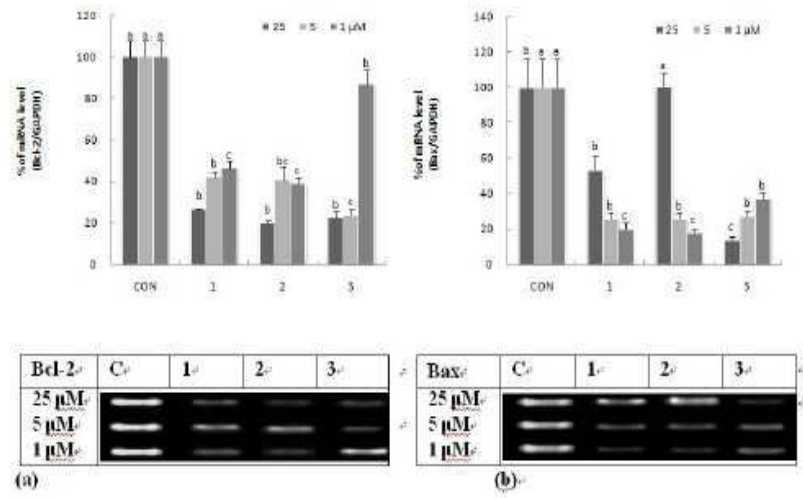
도면5



도면6



도면7



도면8

