

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0079421
(43) 공개일자 2011년07월07일

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0012585
(22) 출원일자 2010년02월10일
심사청구일자 2010년02월10일
(30) 우선권주장
1020090136405 2009년12월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102동 401호
권규택
강원도 춘천시 봉의동 89-2번지 305호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 5 항

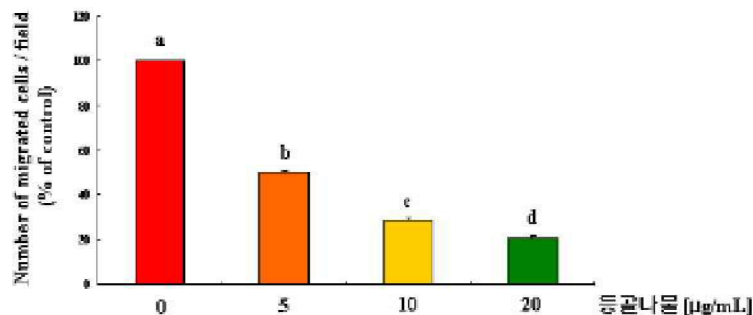
(54) 등골나물 추출물을 포함하는 항암 조성물

(57) 요약

본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 등골나물 추출물은 암세포를 이용하여 측정한 항암효과 즉, 암세포에 대한 세포사멸 효과가 있고, 암전이 저해 효과가 우수한 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 천연물 추출물이므로 부작용과 안전성 관련 문제가 거의 없고 실험결과 세포 독성도 없으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 약학 조성물은 암을 치료, 예방 또는 개선하기 위하여 사용될 수 있다.

대표도 - 도3a

MDA-MB-231 migration assay



(72) 발명자

우은영

강원도 춘천시 후평1동 현대1차아파트 103동 207호

권수진

경기도 남양주시 퇴계원면 성원아파트 106동 1805호

윤정환

강원도 춘천시 후평1동 846-1 현대맨션 101동 101호

김중대

강원도 춘천시 동산면 군자리 482번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 교육과학기술부 한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 지역거점연구단육성사업 / 의료, 바이오 신소재 융복합 연구사업단

연구과제명 천연물유래 항산화 신소재 발굴 및 응용

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃을 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 추출한 것인 항암 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃 에탄올 추출물에 헥산, 메틸렌클로라이드 및 에틸아세테이트로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 분획용매로 분획한 것인 항암 조성물.

청구항 4

제1항의 항암 조성물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5

제1항의 항암 조성물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암효과가 있는 식물 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 제어되지 않는 세포성장으로 특징 지어지며, 이러한 비정상적인 세포성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환군을 총칭한다.

[0003] 이러한 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있고, 의학 기술 또한 혁신적으로 발전하고 있음에도 불구하고, 암의 발생 및 암에 의한 사망은 계속 증가추세에 있다. 세계 보건 기구의 최근 통계 자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만 명 이상의 새로운 암환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서도 암은 가장 높은 사망원인으로 연간 약 십만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 암에 의해 사망하고 있다.

[0004] 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으며, 유전인자 또는 면역학적 요인 등의 내적 요인과 화학물질, 방사선 또는 바이러스 등의 외적 요인으로 구분되기도 한다. 특히, 최근 암 환자의 증가와 관련하여, 현대 사회에서 암이 발생하는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있는 것으로 알려져 있고, 특히 식생활에서 오는 발암물은 환경적 요인의 36%로서 매우 높은 것으로 알려져 있어서, 현대 사회에서의 생활환경이 근원적으로 변화되지 않는 이상 이러한 암의 발병률 및 암에 의한 사망자 수의 증가추세는 계속해서 유지될 것으로 보인다. 특히, 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료 보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다는 점에서 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 더욱 강조되고 있는 실정이다.

[0005] 최근에는 암의 발생과 전이, 암세포의 생리, 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암 효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제가 개발되고 있는 추세이다. 구체적으로, 종양의 혈액공급을 중단시키는 것을 목표로 한 약물인 혈관신생억제제(angiogenesis inhibitor)가 있다. 또한, 암세포의 성장 또는 암

세포가 다른 조직으로 퍼져 나가는 암전이에 필요한 산소와 영양분을 공급받기 위해, 혈관 형성(angiogenesis)이 요구되며, 이러한 혈관 형성에는 내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 또는 세포간 접착 분자(intracellular adhesion molecule, ICAM) 등이 밀접하게 관련되어 있다. 또한, 암의 전이(침윤)에는 유로키나제 플라스미노겐 활성화물(urokinase plasminogen activator, uPA)이 관련되어 있으며, 암의 전이과정에서 수반되는 암세포 부착에는 인테그린-알파(Integrin- α)가 관련되어 있다.

[0006] 보다 상세하게, 태아와 신생아 시기의 발달 동안 혈관 생성, 혈관발달 및 신생림프관 형성에 중요한 역할을 하는 VEGF는 암 성장 또는 암 전이와 관련하여, 현재 존재하고 있는 혈관으로부터 암세포로 새로운 혈관을 생성시키는 것과 밀접한 관련이 있으며, 상기 VEGF의 발현을 억제하는 것은 혈관신생억제를 통하여 암치료 효과가 있을 수 있으므로, 항 VEGF제는 혈관신생억제제 타입의 항암제로 개발되고 있다.

[0007] 암이 발병되어 진행이 계속될 경우 수술 등의 외과적 치료법과 함께 약물치방 등과 같은 화학적 치료법이나 방사선치료 등을 병행하여 집중적인 치료를 해야 하지만, 이와 같은 약물 치료 등과 같은 화학적 치료법에 사용되는 암세포 사멸제 등은 그 독성 등의 후유증을 배제할 수 없으므로, 안정성과 치료효과 모두를 담보하기 위하여, 이러한 다양한 접근방법에 기초한 암 치료제의 개발이 절실히 요구되고 있기 때문이다.

[0008] 암화(carcinogenesis)과정은 다단계로 이루어지는 것으로 예상되는데, 각 단계마다 특이적인 분자 또는 세포수준에서의 변화를 수반한다. 상기 암화 과정은 크게 (a) 발암물질에 의해 DNA에 돌연변이가 유도되는 개시단계, (b) 양성 종양 (benign tumor)이 나타나는 촉진단계, (c) 양성종양이 악성종양 (malignant tumor)으로 변환되는 진행단계와 (d) 악성 정도의 증가 및 전이로의 진행단계와 같이 다단계로 진행되는 것으로 추정된다.

[0009] 현재 보고된 항암제를 포함한 치료제는 주로 상기 악성종양으로 변환되는 진행단계에서 악성종양에 해당하는 암세포를 제거하기 위한 물질들이 주를 이루고 있다.

[0010] 그러나, 상기 암세포는 정상세포와 많은 면에서 그 성질이 유사하므로 정상세포에는 피해를 주지 않고 암세포만을 제거하는 것은 쉬운 일이 아니다.

[0011] 기존 암세포의 제거를 위해 사용되는 화학요법은 주로 항암물질을 환자에게 투여하는 방법으로, 종래 보고된 약 40여종의 화학물질은 강한 세포독성을 나타내 정상세포에 대해서도 강한 세포독성을 나타내므로, 많은 부작용을 유발하는 문제점이 있다. 특히, 암세포의 특징 중 하나인 유전적인 불안정성은 암세포 스스로가 화학요법에 대한 내성을 유도하는 원인으로 보고되어, 항암제 투여를 통한 암치료의 문제점으로 보고되어 있다.

[0012] 따라서, 암세포 자체에 대한 사멸효과를 강조하던 기존 항암 치료제에 대한 연구에 수술요법과 연관을 맺어 암세포의 전이를 막아 다른 기관으로 악성 종양이 전이되는 것을 차단하는 연구가 추가되고 있는 실정이다. 암세포의 전이를 차단할 경우, 유방암이나 위암 등과 같이 외과적 수술에 의해 해당 부위의 악성 종양을 제거함으로써 환자의 생존율을 현저하게 증가시킬 수 있기 때문이다. 이러한 접근방법으로 최근 암세포의 침윤이나 혈관신생을 억제하는 것을 목적으로 하는 항암제의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다.

[0013] 한편, 기존 화학요법에 사용되는 화학물질의 경우 강한 세포독성으로 인하여 많은 부작용이 유발되므로, 종래 천연물, 특히 식물 또는 식물 생약으로부터 항암제를 개발하려는 연구가 이루어지고 있다. 이러한 천연물 유래 항암제로 대표적인 것은 주목나무에서 분리한 택솔(Taxol; 파클리탁셀)이 있으나, 암세포 사멸뿐만 아니라 신체 내 다른 정상세포에도 작용하기 때문에 다른 질환을 유발할 수 있는 문제점을 안고 있으며, 물에 대한 용해도가 낮아서 독성 및 부작용이 심각한 것으로 보고되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 암세포 사멸효과 뿐만 아니라 암 전이를 차단할 수 있으면서도, 부작용이 문제되지 않는 천연물 유래 항암 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천연물 즉, 식물 유래 유효성분을 포함하는 항암 조성물을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 발명자들은 상기 등골나물 추출물은 인간의 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 이용하여 MTT 분석을 수행한 결과 암세포 사멸효과가 있고, 상기 MDA-MB-231 세포를 이용하여 migration assay 및 invasion assay를

수행한 결과 암세포의 전이 및 침윤을 효과적으로 제어할 수 있는 것으로 확인되었으며, 이와 관련된 단백질인 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현양을 확인한 결과, 암세포의 저축저해를 통해 암전이를 저해할 수 있는 것으로 보고된 메탈로프로테아제(Metalloproteinase)인 TIMP-2의 분비는 증가시키는 반면, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현은 억제하여, 암세포의 성장 및 전이를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 천연물로부터 유래된 것으로 부작용이 문제될 가능성도 낮고, MTT 분석 결과 세포 독성도 없다는 것을 확인하여, 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암 조성물에 관한 것이다.

[0019] 상기 등골나물(*Eupatorium japonicum*)는 국화과에 속하는 여러해살이풀로, 한국, 중국 및 일본 등지에 분포한다. 전체에 가는 털이 있고 줄기는 곧게 서며, 높이는 70cm 정도이다. 밑동에서 나온 잎은 작고 꽃이 필 때쯤이면 없어지며, 중앙부에 커다란 잎이 마주나고 짧은 잎자루가 있고, 상기 중앙부에 나는 잎은 난형 또는 긴 타원형으로, 가장자리에 톱니가 있다. 상기 등골나물의 꽃은 흰자주빛으로 두상꽃차례를 이루고 7 내지 10월에 핀다. 열매는 수과로 11월에 익는다. 예부터 식용으로 사용되었으며, 구체적으로 등골나물의 어린 순은 살짝 데쳐 양념에 무쳐 먹고, 목나물로 쓰기도 하며, 꽃을 그늘에 말린 뒤 차로 마시기도 하였다.

[0020] 상기 등골나물 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 일 예로 등골나물의 꽃, 잎, 가지, 뿌리, 열매 또는 껍질이나 이의 분쇄물, 바람직하게는 등골나물의 꽃에 추출용매를 가함으로써 제조하거나 추출용매로 추출하여 제조한 조추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조된 것일 수 있다.

[0021] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 상기 알코올 회석수 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있다. 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 알코올 회석수는 알콜을 50%(v/v) 내지 99.9%(v/v)로 물에 희석한 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 등골나물 추출물의 추출용매는 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올, 알코올 회석수 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 75 내지 99% 에탄올 수용액일 수 있다. 상기 추출과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 상기 추출시간은 특별히 한정되지는 않으나, 10분 내지 12시간일 수 있다.

[0023] 본 발명의 등골나물 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 구체적으로는 냉침추출법, 온침추출법, 열 추출법, 초음파 추출법 등일 수 있으며, 통상의 추출기기, 초음파분쇄 추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매, 바람직하게는 헥산, 메틸렌클로라이드 및 에틸아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매, 더욱 바람직하게는 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매, 더더욱 바람직하게는 헥산으로 분획과정을 더욱 실시할 수 있다. 상기 분획 시 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있다. 또한, 상기 분획과정은 일 예로, 4℃ 내지 120℃, 또는 50℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0025] 상기 제조된 추출물 또는 상기 분획과정을 수행하여 수득한 분획물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 상기 농축은 감압 농축기, 일 예로 회전 증발기를 이용하여 감압 농축할 수 있으며, 상기 건조는 일 예로 동결건조법으로 수행할 수 있다.

[0026] 본 발명의 등골나물 꽃 에탄올 추출물은 암세포에 대한 MTT 분석결과 24시간이 경과한 시점에서는 20 μ g/ml를 처리한 경우부터 암세포 사멸효과를 가지고, 48시간이 경과한 시점에서는 10 μ g/ml를 처리한 경우부터 암세포 사멸효과를 가지며, 암세포를 이용한 암세포 이동 및 침윤에 의해 확인한 결과, 5 μ g/ml를 처리한 경우에도 암세포의 이동 및 침윤에 대한 유의적 억제능을 가지고, 암세포 부착능의 경우 10 μ g/ml 이상을 처리한 경우에 암세포의 부착능에 대한 유의적 억제능을 가지며, 실험관 내 실험에 의해 확인한 결과 혈관신생, 암세포 이동, 암

세포 침윤 및 암세포 부착과 관련된 단백질인 VEGF, uPA 및 Integrin- α 2의 발현 억제능을 가지고, 상기 VEGF 및 uPA의 mRNA 전사 억제능을 가지며, 항암작용을 하는 TIMP-2에 대한 발현 유도효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, 등골나물 꽃 에탄올 추출물은 5 μ g/ml를 첨가한 경우, 등골나물 줄기 추출물이 암 전이 저해효과가 거의 없고, 등골나물 뿌리 추출물에 비하여 무첨가군에 비하여 약 10% 정도의 암 전이 저해효과가 있는 것에 반하여, 약 50%의 암세포의 전이를 저해할 수 있는 것으로 확인되어, 줄기 추출물에 비하여 약 5000%, 뿌리 추출물에 비해서도 약 250%의 암 전이 저해효과가 있으며, 20 μ g/ml를 첨가한 경우 전체 암 세포의 약 80%에 해당하는 세포의 암 전이를 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 등골나물 꽃 에탄올 추출물에 대한 분획물에 대하여 실험을 수행한 결과, 물 또는 부탄올을 분획용매로 실험을 수행한 경우, 오히려 추출물 보다 암 전이 저해 효과가 낮았으나, 헥산, 메틸렌 클로라이드 및 에틸아세테이트의 경우에는 추출물에 비하여 암 전이 저해 효과가 상승되었으며, 특히, 헥산 분획물의 경우에는 거의 모든 암세포의 암 전이를 저해할 수 있는 것으로 확인되어, 다른 분획용매에 비하여 현저하게 우수한 효과가 있는 것으로 확인되었다. 한편, 등골나물 꽃 에탄올 추출물은 MTT 분석결과 10 μ g/ml의 농도를 처리한 경우에도 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다.

- [0027] 상기 항암 조성물의 유효성분인 등골나물 추출물은 항암 활성이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연식물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하므로, 상기 항암 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 또는 암의 개선 또는 예방을 위한 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 치료 또는 예방용 조성물은 유효성분으로 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 암은 악성 종양(malignant tumor)이라고도 하며, 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리로 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 되는 질환을 의미하고, 상기 암은 암종(carcinoma)과 육종(sarcoma)을 포함하며, 일례로 유방암, 위암, 간암, 폐암, 대장암, 자궁경부암, 자궁내막암, 뇌척수종양, 두경부암, 흉선종, 식도암, 췌장암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병 및 다발성 골수종 등일 수 있다.
- [0030] 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0031] 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물은 상기 암 치료 또는 예방용 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [0032] 이 경우 상기 조성물 내 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물의 함량은 약학적으로 유효한 양 또는 바람직한 양으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0033] 상기 ‘약학적으로 허용되는’이란 생리학적으로 허용되고 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0034] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모

두 사용가능하다. 또한, 상기 암 치료 또는 예방용 조성물은 통상의 증진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 율활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항암제로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.

[0036] 상기 암 치료 또는 예방용 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0037] 또한, 상기 암 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술 분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0038] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0039] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0040] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 증정도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0041] 또한, 본 발명은 본 발명의 항암 조성물 또는 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다. 상기 본 발명의 항암 조성물 또는 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0042] 상기 등골나물 추출물은 등골나물 꽃 에탄올 추출물, 바람직하게는 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산, 메틸렌 클로라이드 및 에틸아세테이트로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 용매로 분획한 분획물, 더욱 바람직하게는 헥산 및 메틸렌클로라이드로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 용매, 더더욱 바람직하게는 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산 용매 분획물일 수 있다.

[0043] 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0045] 상기 항암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영양식 또는 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료, 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

- [0046] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능, 구체적으로 암 예방 또는 개선 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 향암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0048] 상기 외에 본 발명의 조성물은 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, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 상기 향암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- [0050] 상기 기능성음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 상기 향암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 향암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물을 유효성분으로 포함하는 암 개선 또는 예방용 식품 조성물에 있어서, 상기 향암 조성물 또는 상기 등골나물 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0052] 본 발명의 등골나물 추출물은 암세포에 대한 MTT 분석결과 암세포 사멸효과를 가지며, 암세포를 이용한 암세포 이동 및 침윤에 의해 확인한 결과, 암세포의 이동 및 침윤에 대한 유의적 억제능을 가지며, 암세포 부착능을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 정상세포에 대한 MTT 분석결과 세포 독성이 없으므로, 암 특히 암이 전이되기 전 단계에서는 치료가 용이하나, 암이 전이된 후에는 사망률이 현저하게 상승되는 유방암 또는 위암을 포함한 다양한 암의 치료, 개선 및 예방을 위하여 여러 방면으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, RAW264.7 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 세포독성을 MTT assay법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 CON은 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군을 나타내며,

가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이며, 가로축의 화살표로 표시된 실험군은 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)를 함께 처리하였다는 것을 의미한다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과를 MTT assay 법으로 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축의 수치는 등골나물 추출물을 첨가한 후, 배양한 시간을 나타내고, 세로축의 수치는 세포 생존 수를 상대적 수치로 나타낸 것이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과 즉, 암 전이(migration) 저해효과를 확인하기 위하여, 이동한 암세포 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이며, 세로축의 수치는 각 실험군에서 전이 즉, 이동을 한 세포의 수를 등골나물 추출물을 투여하지 않은 대조군에 대한 상대값으로 도 3a는 등골나물 꽃 추출물의 결과이고, 도 3b는 등골나물 뿌리 추출물의 결과이며, 도 3c는 등골나물 줄기 추출물의 결과를 나타낸 수치이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과 즉, 암 침윤(migration) 저해효과를 확인하기 위하여, 침윤된 암세포 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이며, 세로축의 수치는 각 실험군에서 침윤한 세포의 수를 등골나물 추출물을 투여하지 않은 대조군에 대한 상대값으로 나타낸 수치이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과 즉, 암세포 부착(adhesion) 저해효과를 확인하기 위하여, 부착된 세포의 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이며, 세로축의 수치는 각 실험군 별로 측정된 흡광도를 나타낸 수치이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과를 확인하기 위하여, TIMP-2, VEGF, uPA 및 Integrin- $\alpha 2$ 의 단백질 발현량을 웨스턴 블롯 분석법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 좌측 세로축의 수치는 단백질의 크기(kDa)를 나타내고, 우측 세로축은 해당 단백질의 종류를 나타내는 것이며, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이다. 도 6a는 TIMP-2, VEGF 및 uPA의 단백질 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 6b는 Integrin- $\alpha 2$ 의 단백질 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 추출물의 항암효과를 확인하기 위하여, VEGF 및 uPA의 mRNA 전사량을 RT-PCR법을 통하여 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 세로축의 수치는 GAPDH 또는 β -actin에 대한 상대적 발현량을 나타내고, 가로축의 수치는 등골나물 추출물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이다. 도 7a는 VEGF mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 7b는 uPA mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이며, 도 7c는 Integrin- $\alpha 2$ mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프, 도 7d는 ICAM mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이며, 도 7e는 MMP-9 mRNA 전사량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, MDA-MB-231 세포주를 이용하여, 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 분획물의 항암효과 즉, 암 전이(migration) 저해효과를 분획용매의 종류에 따라 확인하기 위하여 이동한 암세포수를 측정한 결과를 나타낸 그래프로, 상기 그래프에서 가로축의 수치는 등골나물 추출물 및 분획물의 투여량($\mu\text{g/mL}$)량을 나타내는 수치이며, 세로축의 수치는 각 실험군에서 전이 즉, 이동을 한 세포의 수를 등골나물 추출물 및 분획물을 투여하지 않은 대조군에 대한 상대값을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐으로 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으므로, 이는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] <실시예 1> 등골나물추출물의 제조

[0056] 등골나물(*Eupatorium japonicum*)을 부위별로 100g씩 에탄올 10L에 침지한 후, 온침 추출법으로 추출하였다.

[0057] 보다 구체적으로, 상기 등골나물 꽃, 줄기 및 뿌리 각 100g에 에탄올 10L를 가하여 상기 등골나물 꽃, 줄기 및

뿌리를 각각 추출용매에 완전히 침지시킨 후, 70℃에서 환류시키면서 추출하였다. 상기 추출을 통해 제조된 각 부위의 등골나물 추출액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하였다.

[0058] 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 분획물은 상기 조 추출물 30g을 10배의 증류수 즉, 300g의 증류수로 치환한 후, 헥산(hexane)을 첨가하고 분획하여 헥산 층만을 분리함으로써 헥산 분획액을 제조하고, 상기 헥산 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 메틸렌클로라이드(methylenechloride)를 첨가하고 분획하여 메틸렌클로라이드 층만을 분리함으로써 메틸렌클로라이드 분획액을 제조하고, 상기 메틸렌클로라이드 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 에틸아세테이트를 첨가하고 분획하여 에틸아세테이트 층만을 분리함으로써 에틸아세테이트 분획액을 제조하고, 상기 에틸아세테이트 층을 분리하고 남은 나머지 용액(물층)에 동일한 양의 부탄올(butanol)을 첨가하고 분획하여 부탄올 층만을 분리함으로써 부탄올 분획액을 제조하고, 나머지 용액을 물(water) 분획액으로 사용하였다. 상기 분획을 통해 제조된 각 용매별 등골나물 분획액을 각각 감압농축기를 이용하여 감압 농축한 뒤, -20℃에서 동결건조하여 분획물을 제조하였다.

[0059] 상기 수득한 추출물 및 분획물은 실험에 사용하기 전까지 냉동보관하였다.

[0060] <실시예 2> 세포 독성 실험

[0061] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물의 세포 독성을 측정하기 위하여, 쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 ATCC에서 구입하여 이용하였다.

[0062] 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), 페니실린-스트렙토마이신은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.

[0063] 상기 RAW264.7 세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 1% 페니실린 스트렙토마이신을 첨가한 배양액을 사용하여 배양하였고, 37℃ 습윤한 CO₂ 배양기(5% CO₂ 및 95% air 조건)에서 배양하였다. 상기 세포가 배양접시의 약 80%가 차게 배양된 후, PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어내 후세척하고, 0.25% 트립신 및 2.56 mmol/L EDTA를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다.

[0064] 상기 배양한 세포는, 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하여, 24시간 배양하였다. 상기 24시간 배양한 뒤, 1% charcoal stripped FBS가 포함된 serum-deprivation medium(SDM)으로 24시간동안 serum deprivation하였다. 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 다양한 농도의 상기 실시예 1의 등골나물 추출물을 함께 포함하는 SDM으로 교환한 후, 24시간에 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

[0065] 보다 구체적으로, MTT 분석이란 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포르마잔 크리스탈로 환원시키는 세포내 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. 상기 실시예 1의 등골나물 추출물을 녹이기 위한 용매로는 세포 생존에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 DMSO를 사용하였다. 상기 MTT 분석을 위하여, 각 시간대 별로 세포배양 배지를 제거한 후 MTT를 1 mg/ml로 포함하는 DMEM 배지를 웰 당 1 ml씩 처리하고, 37℃ 습윤한 CO₂ 배양기에서 3시간 더 배양하였다. 이후 배지를 제거한 후, 0.5 ml 이소프로판올을 첨가하여 포르마잔 크리스탈을 용해시키고, 마이크로 플레이트리더(BIO-RAD)에서 570 nm파장으로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다. 24시간 동안 등골나물 추출물로 처리한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0066] 상기 도 1에 나타낸 바와 같이, 24시간을 처리한 경우에도, 아무런 시료를 처리하지 않은 대조예와 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물을 다양한 농도로 처리한 경우 모두 세포의 증식에 별다른 영향을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 결과로부터 등골나물 추출물은 10 µg/ml까지는 세포독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0067] <실시예 3> 항암효과 측정1-암세포 사멸 효과

[0068] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물의 항암효과를 측정하기 위하여, 인간의 유방암세포인 MDA-MB-231 세포를 ATCC에서 구입하였다. 상기 세포의 배양(Cell culture)에 사용된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/ Nutrient Mixture Ham's F12), FBS(fetal bovine serum), L-glutamine, 페니실린-스트렙토마이신 및 인슐린(Insulin)은 Gibco/BRL(USA)에서 구입하였다.

- [0069] 상기 배양한 세포를, 50,000 cells/well의 밀도로 24 well-plate에 분주하여, 24시간 배양하였다. 상기 24시간 배양한 뒤, 1% charcoal stripped FBS가 포함된 serum-deprivation medium(SDM)으로 24시간동안 serum deprivation하였다. 24시간 경과 후, 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 다양한 농도의 상기 실시예 1의 등골나물 추출물을 함께 포함하는 SDM으로 교환한 후, 24시간 및 48시간에 MTT 분석(MTT assay) 방법으로 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 상기 MTT 분석은 실시예 2와 같은 방법으로 수행하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0070] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 24시간을 처리한 경우에는, 등골나물 추출물을 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 실험군에서 유의적인 암세포 사멸효과가 나타났고, 48시간을 처리한 경우에는, 등골나물 추출물을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 실험군에서 약16% 이상의 암세포가 사멸된 것으로 나타나, 본 발명의 등골나물 추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 유의하게 암세포 사멸효과가 있는 것으로 확인되었다.
- [0071] <실시예 4> 항암효과 측정2 - 암세포 전이(migration) 억제효과 측정
- [0072] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물의 암세포 전이 억제효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 배양한 MDA-MB-231 세포를 이용하였다.
- [0073] 상기 암세포 전이 억제효과는 Transwell cell culture chamber에서 상기 MDA-MB-231 세포의 이동을 조사하는 방법으로 수행하였다. 보다 상세하게는, Transwell membrane의 아래쪽을 0.1% type A gelatin(15 μL)으로 코팅한 후, Transwell cell culture chamber의 아랫부분에 BSA를 첨가하고 Transwell membrane의 윗부분에는 상기 세포와 상기 등골나물 추출물을 첨가하고, 37℃에서 4시간 동안 배양하였다.
- [0074] 상기 4시간 배양 후, Transwell membrane 윗부분의 이동하지 않은 세포를 면봉으로 제거하고, polycarbonate filter를 통해 이동한 세포를 hematoxylin-eosin staining 방법으로 염색하였다. 상기 이동된 세포의 수는 현미경($\times 100$)을 이용하여 정량하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0075] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물(도 3a)을 투여하는 경우, 농도의존적으로 전이된 암세포의 수가 감소하였고, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우 대조군의 약 50% 정도의 암세포 전이를 저해하는 것으로 확인되었다. 한편, 등골나물 줄기 추출물(도 3c)을 투여하는 경우, 암세포 전이 저해효과가 거의 없는 것으로 확인되었고, 등골나물 뿌리 추출물(도 3b)을 투여한 경우에는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우에는 거의 저해효과가 없었고, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우에 대조군의 약 30% 정도의 암세포 전이를 저해하는 것으로 확인되어, 암세포 전이 억제효과가 매우 낮은 것으로 확인되었다.
- [0076] 상기 결과로부터, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물이 암세포 전이 억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 상기 결과에 의해 항암효과가 가장 우수한 것으로 확인된 등골나물 꽃 추출물에 관하여 이후 실험을 진행하였다.
- [0077] <실시예 5> 항암효과 측정3 - 암세포 침윤(invasion) 억제효과 측정
- [0078] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물의 암세포 침윤 억제효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 배양한 MDA-MB-231 세포를 이용하였다.
- [0079] 상기 암세포 침윤 억제효과는 matrigel이 미리 코팅되어진 BD Matrigel Invasion Chamber를 사용하여 상기 실시예 4의 방법에 준하는 방법으로 조사하였다. 상기 이동된 세포의 수는 현미경($\times 100$)을 이용하여 정량하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0080] 상기 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물을 투여한 경우, 농도의존적으로 침윤된 암세포의 수가 감소하였고, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우 대조군의 약 60% 이상의 암세포 침윤을 저해하는 것으로 확인되었고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우 대조군의 약 10% 정도의 암세포만이 침윤된 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물은 암세포 전이 억제 효과가 우수한 것으로 확인되었다.
- [0081] <실시예 6> 항암효과 측정4 - 암세포 부착(adhesion) 억제효과 측정
- [0082] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물의 암세포 부착 억제효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 배

양한 MDA-MB-231 세포를 이용하였다.

- [0083] 상기 암세포 부착 억제효과는 human collagen type I이 미리 코팅되어진 CytoMatrix™ Cell Adhesion Strips(Cheicon)를 사용하여 측정하였으며, 상기 측정은 제조회사에서 제시하는 방법에 따라 수행하였다. 보다 구체적으로, 플레이트(plate)를 PBS에 첨가하여 상온에서 15분간 재수화한 후, 상기 재수화한 플레이트에서 PBS를 제거하고 상기 배양한 세포를 분리하고, 상기 분리된 세포를 다양한 농도의 등골나물 추출물이 첨가된 배양액에 1×10^5 cells/100 μ l의 밀도로 첨가하여 플레이트에 분주하였다. 상기 분주된 세포를 CO₂ incubator에서 45분간 배양한 후, Ca²⁺/Mg²⁺를 포함한 PBS로 플레이트를 씻어내고(wash), 0.2% crystal violet solution으로 상온에서 5분간 염색하였다. 상기 염색 후, PBS로 여러 번 씻어낸 후, solubilization buffer(0.1 mol/L NaH₂PO₄(pH 4.5): 50% EtOH(50:50))로 cell-bound stain을 완전히 용해시켰다. 상기 cell-bound stain을 용해시킨 플레이트에 대해 570 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포의 부착능에 대한 등골나물 추출물의 저해효과를 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0084] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물을 투여한 경우, 농도의존적으로 부착된 암세포의 수가 감소하였다. 상기 결과로부터, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물은 암세포 부착 억제 효과를 갖는 것으로 확인되었다.
- [0085] <실시예 7> 항암효과 측정5 - 관련 단백질 발현 저해효과 측정
- [0086] 상기 실시예 4 내지 6에서 확인된 암세포 전이효과 즉, 암세포 이동 억제효과, 침윤 억제효과 및 부착 억제효과를 다시 확인하기 위하여, 암세포의 이동, 침윤 및 부착과 관련된 단백질인 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현양을 웨스턴 블롯 분석법(Western blot analysis)을 통해 측정하였다.
- [0087] 보다 구체적으로, 우선 Total cell lyaste와 농축 배양액(Medium concentration)을 수득하였다. 우선, Total cell lyaste는 상기 실시예 3의 MDA-MB-231세포를 1×10^6 cells/dish의 밀도로 100 mm dish에 분주하고 24시간 동안 배양한 후, serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. Serum starvation 후, 상기 다양한 농도의 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물을 함께 첨가한 후, 상기 실시예 3의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 후, 상기 배양된 각각의 세포를 1 mmol/L iodoacetic acid와 1mmol/L phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)가 포함된 cold PBS로 행구고, scraper로 세포를 수집하여 2,000 rpm 및 4 °C의 조건에서 2분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리를 통해 얻은 펠렛(pellet)에 lysis buffer(20 mmol/L Hepes, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L iodoacetic acid, 0.2 mmol/L PMSF, 20 mg/L aprotinin, 10 mg/L antipain, 10mg/L lepeptin, 80 mg/L benzamidin HCl)를 첨가하여 4 °C에서 40분간 교반하여 세포를 용해(lysis)시킨 후, 원심 분리하여 상층액을 취하는 방법으로 Total cell lysate를 제조하고, 이를 -70°C에 보관하였다.
- [0088] 한편, 농축배양액은 상기 다양한 농도의 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물을 함께 첨가한 후, 상기 실시예 3의 방법으로 24시간 배양한 뒤, 상기 24시간 배양한 후의 배양액을 수집하였다. 상기 수집한 배양액을 Amicon Ultra-15을 이용하여 centrifugal ultrafiltration 방법으로 100배 농축시켰다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit를 이용하여 측정하였다.
- [0089] 상기 Total cell lyaste와 농축배양액을 이용하여 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현양을 확인하기 위한 웨스턴 블롯 분석법은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.
- [0090] 상기 Total cell lyaste(50 μ g protein)와 상기 100배 농축한 농축배양액(50 μ g protein)을 4 내지 20% gradient sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 법으로 분리하여, polyvinylodene fluoride(PVDF) membrane에 transfer하였다. 상기 단백질을 transfer시킨 PVDF membrane은 5% non-fat milk-TBST(20 mmol/L Tris·HCL, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking 한 다음 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 상기 TBST로 세척한 membrane에 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 항체(antibody)를 첨가하여 4°C에서 24시간 배양(incubation)시킨 후, 다시 TBST를 이용하여 10분간 3회 세척하였다. 그 후, 상기 TBST로 세척한 membrane을 horseradish peroxidase(HRP)-linked anti-rabbit이나 mouse 혹은 goat IgG를 첨가하여 1시간 incubation한 후 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 상기 항체(Antibody)들에 결합한 단백질들의 신호는 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate를 이용하여

band를 가시화하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0091] 상기 도 6a에 나타난 바와 같이, 암 세포의 이동 즉, 혈관신생과 관련된 VEGF의 발현량 및 암세포 침윤과 관련된 uPA의 발현량은 등골나물 추출물의 농도에 의존적으로 감소하였다. 특히, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 경우에는 VEGF 및 uPA의 발현량이 현저하게 감소되는 것으로 확인되었다. 한편, 항암 메카니즘과 밀접하게 관련되어, 항암작용을 하는 것으로 알려진 TIMP-2의 경우 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 경우에도 발현되며, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 경우에 그 발현량이 현저하게 증가하는 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터 본 발명의 등골나물 추출물은 암세포의 이동 및 침윤과 관련된 단백질의 발현을 저해하고, 항암작용을 유도하는 단백질의 발현을 촉진하는 것으로 확인되어, 결과적으로 등골나물 추출물은 항암작용이 우수한 것으로 확인되었다.

[0092] 또한, 상기 도 6b에 나타난 바와 같이, 암의 진행과 관련이 없는 β -actin의 경우 모든 실험군에서 유사한 정도의 밴드가 확인되어, 상기 밴드로부터 등골나물 꽃 추출물의 첨가가 세포 생존과 관련이 없으며, 암의 전이 또는 암의 발진과 관계없는 대부분의 단백질의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 상기 암세포의 부착과 관련된 Integrin- α 2 단백질 발현여부를 확인한 결과, Integrin- α 2 단백질의 발현이 감소하는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 등골나물 꽃 추출물을 첨가한 경우에는 암세포의 부착과 관련된 ICAM의 경우 현저하게 감소하여, 등골나물 꽃 추출물을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 경우부터 ICAM 단백질 발현량이 현저히 감소되는 것이 확인되었다.

[0093] 상기 결과로부터 등골나물 꽃 추출물은 암의 전이와 관련 단백질 특히, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현을 억제하여, 암세포의 이동, 침윤 및 부착을 현저하게 저해할 수 있을 뿐만 아니라, 항암작용과 밀접하게 관련되어 있는 TIMP-2의 발현량을 증가시켜, 상기 등골나물 추출물은 항암효과가 우수한 것으로 확인되었다.

[0094] <실시예 8> 항암효과 측정6 - mRNA 수준 측정

[0095] 상기 실시예 7에서 암세포의 이동, 침윤 및 부착과 관련된 단백질인 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2에 대한 발현억제효과를 다시 확인하기 위하여, 암세포의 이동, 침윤 및 부착과 관련된 단백질인 TIMP-2, VEGF, uPA, ICAM 및 Integrin- α 2의 발현에 영향을 미치는 각 단백질의 mRNA 전사정도 즉, mRNA 함량의 변화를 GADPH 및 β -actin의 mRNA 함량과 대위한 수치를 대조군과 비교하는 방법으로 확인하였다.

[0096] 상기 실시예 7에서 실시한 방법으로 상기 실시예 3의 MDA-MB-231 세포를 serum starvation medium으로 24시간 동안 배양하였다. Serum starvation 후, 상기 다양한 농도의 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물을 첨가한 후, 상기 실시예 3의 방법으로 12시간 배양한 뒤, 상기 배양된 세포로부터 Qiagen RNase mini kit(Qiagen, 독일)를 사용하여 RNA를 분리(RNA isolation)하였다. 상기 RNA 분리는 상기 kit에서 제공되는 방법(protocol)으로 수행하였다. 상기 방법으로 분리된 RNA 3 μg 에 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하고 42°C에서 1시간 45분 동안 incubation한 후, 70°C에서 15분 동안 incubation하여, cDNA를 수득하였다. 상기 수득한 cDNA는 real-time PCR법으로 정량하였다. 상기 real-time PCR을 수행하기 위한 Primer의 서열과 실험조건은 하기 표 1에 기재하였다.

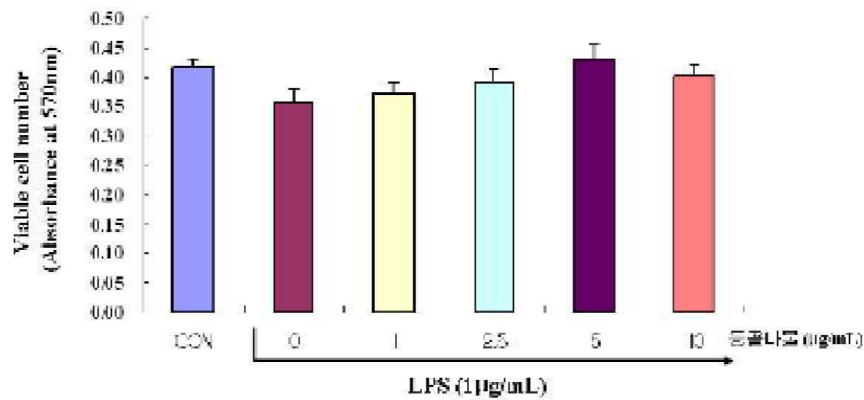
표 1

확인대상 mRNA	Primer sequence		Annealing Tm(°C)
VEGF	sense	ATGCCAAGTGGTCCCAGGCT	54
	anti-sense	CAGGGTCTCGATTGGATGGC	
uPA	sense	GCCATCTACACAGGAGGCACCG	54
	anti-sense	GGGTAATCAATGAAGCAGTGTG	
GADPH	sense	CATCAGCAATGCCTCCTGCA	54
	anti-sense	CTGTGGTCATGAGTCCTTCC	
ICAM	sense	GCCGCCAGCTTATACAAA	60
	anti-sense	CAATCCCTCTGTCCAGTCG	
Integrin- α 2	sense	GCACAGCAATGTGGGAATC	60
	anti-sense	GGCTGAGTTGCAGGTGAGA	
MMP-9	sense	GCTCTCCCTGGAGACCTG	60
	anti-sense	TTTCGACTCTCCACGCATC	
β -actin	sense	GAGCCGTGTTTCCTTCCAT	60
	anti-sense	GTCCCAGTTGGTGACGATG	

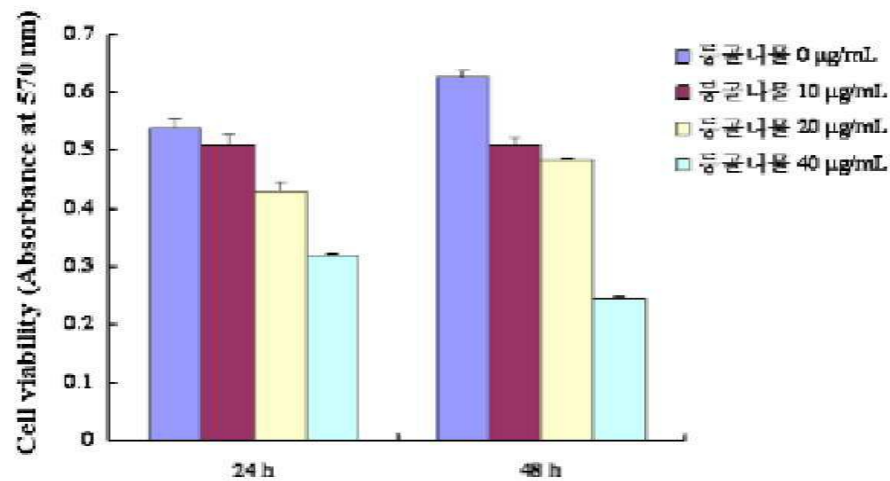
- [0098] 상기 real-time PCR 결과는 ROTOR-GENE 6000 Series software 1.7을 이용하여 GAPDH 대비 mRNA 양 또는 으로 환산한 후, 대조군 대비 함량으로 표시하여 도 7에 나타내었다.
- [0099] 상기 도 7에 나타낸 바와 같이, 암세포의 이동과 밀접하게 관련된 VEGF(도 7a) 및 암세포의 침윤과 관련된 uPA(도 7b)의 각각의 mRNA가 등골나물 추출물의 농도에 비례하여 농도의존적으로 감소되는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 암세포의 부착과 관련된 Integrin- α 2(도 7c)의 경우에도 농도의존적으로 mRNA 함량이 감소되었고, 특히 5 μ g/ml를 첨가한 경우 현저한 함량 감소가 확인되었다. 또한, 암세포의 부착과 관련된 ICAM(도 7d)의 경우 현저하게 감소하여, 등골나물 꽃 추출물을 5 μ g/ml를 첨가한 경우는 대조군에 비하여 약 20% 정도의 mRNA 함량이 확인되었다. 또한, 암전이와 관련된 MMP-9 단백질(도 7e)의 mRNA 함량도 농도의존적으로 감소하는 것이 확인되었다.
- [0100] 상기 결과로부터 등골나물 추출물은 암세포 사멸뿐만 아니라, 암의 진행과정에 필수적으로 수반되는 암세포의 전이, 침윤 및 부착을 효과적으로 저해하여 항암효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.
- [0101] <실시예 9> 항암효과 측정7 - 분획물의 암세포 전이(migration) 억제효과 측정
- [0102] 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 추출물의 분획용매별 분획물의 암세포 전이 억제효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 3에서 배양한 MDA-MB-231 세포를 이용하여, 상기 실시예 4의 방법으로 Transwell cell culture chamber에서 상기 MDA-MB-231 세포의 이동을 조사하는 방법으로 수행하였다. 상기 이동된 세포의 수는 현미경($\times 100$)을 이용하여 정량하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0103] 상기 도 8에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 1에서 제조된 등골나물 꽃 추출물의 경우 약 50%에 해당하는 암세포의 전이를 억제하는 것으로 확인되었다. 한편, 상기 에탄올 추출물의 물 분획물 및 부탄올 분획물의 경우 에탄올 추출물 보다 오히려 많은 수의 암세포가 전이되는 것으로 나타나, 암세포 전이 효과가 낮아지는 것으로 확인되었다. 또한, 에틸아세테이트 분획의 경우에도 에탄올 추출물의 약 60%가 넘는 암세포가 전이되는 것으로 나타나, 에탄올 추출물에 비하여 암세포 전이 억제효과가 상승되었으나, 그 상승정도가 현저하게 높지는 않은 것으로 확인되었다. 또한, 헥산 분획 및 메틸렌클로라이드 분획의 경우 에탄올 추출물에 비하여 현저하게 많은 암세포의 전이를 억제하는 것으로 확인되었다. 메틸렌클로라이드 분획의 경우 에탄올 추출물에 비하여 약 30% 정도의 암세포만이 전이되는 것으로 확인되었고, 헥산 분획의 경우 현저한 효과 상승으로 인해 거의 모든 암세포의 전이를 억제하는 것으로 나타났다.
- [0104] 상기 암세포의 전이는 암화과정에서 가장 마지막 단계인 악성 정도의 증가와 전이로의 진행 단계로, 암 환자의 질병 및 고통은 상기 암세포의 전이로 인해 신체의 여러 부위에 악성 종양이 형성되는 것과 밀접한 관련이 있다. 따라서, 암세포의 전이의 차단은 효과적인 암 치료에 있어서 매우 중요한 효능이며, 최근에 더욱 강조되는 것으로 상기 등골나물 꽃 에탄올 추출물의 헥산 분획의 경우, 현저하게 우수한 암 전이 억제 효과로 인해 다른 분획물에 비해 현저한 항암효과가 인정될 뿐만 아니라 암 치료, 개선 및 예방을 위해 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

도면

도면1

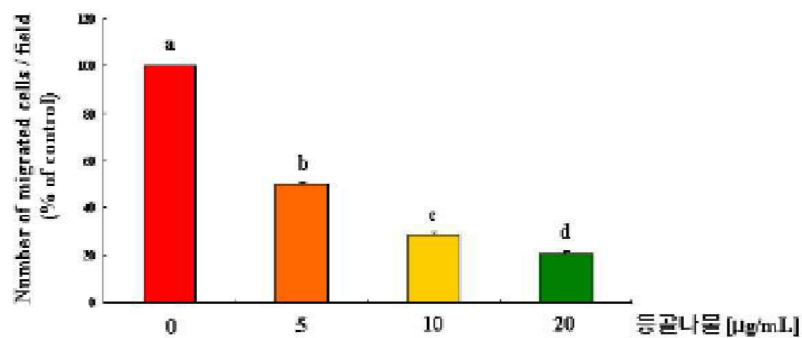


도면2

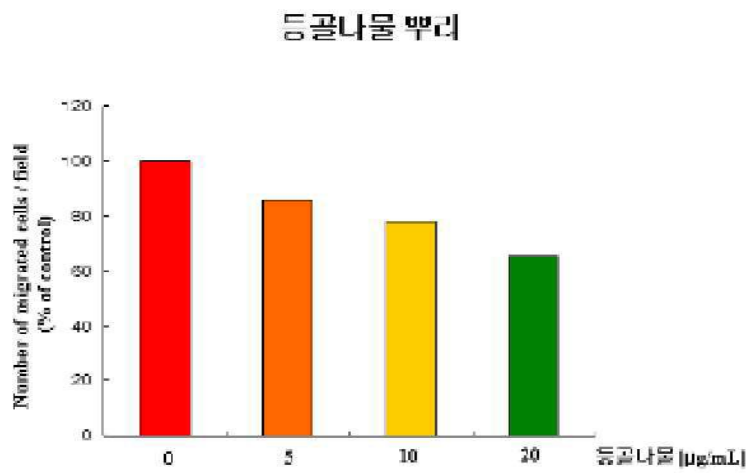


도면3a

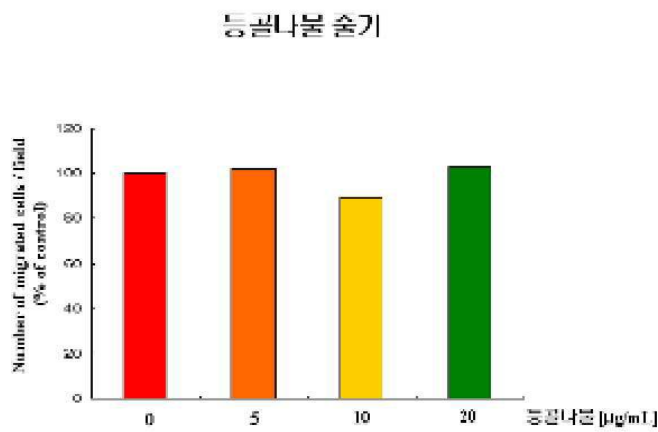
MDA-MB-231 migration assay



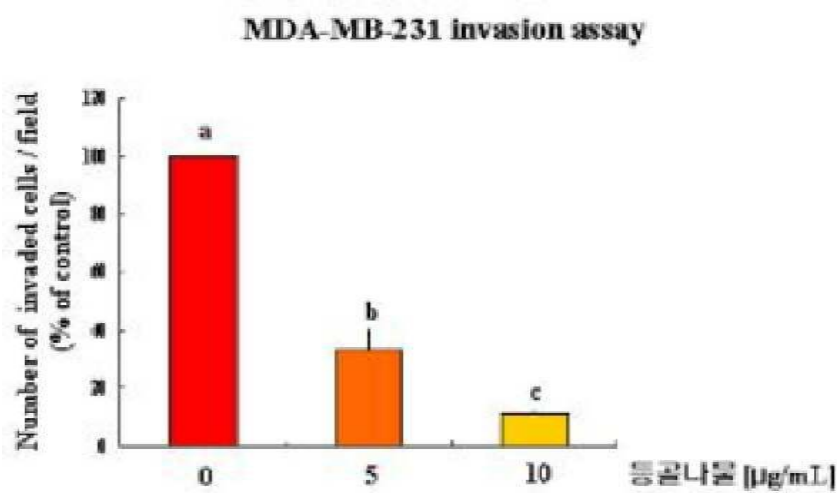
도면3b



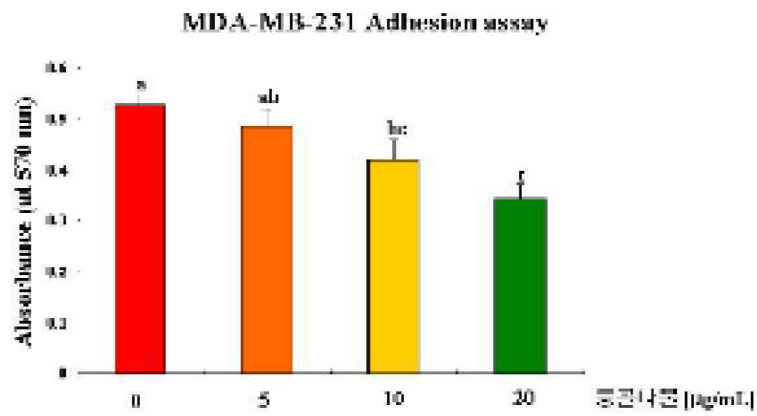
도면3c



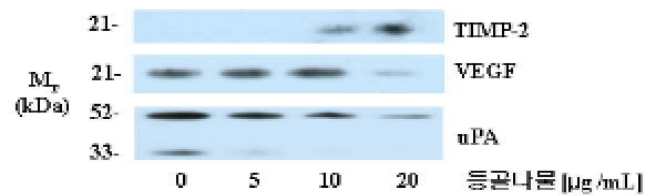
도면4



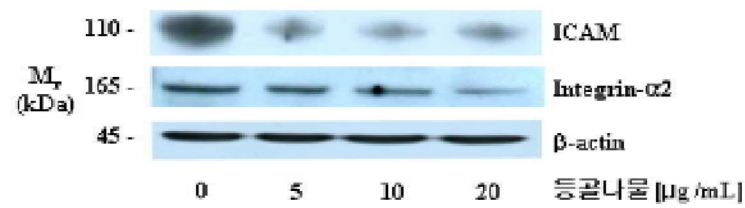
도면5



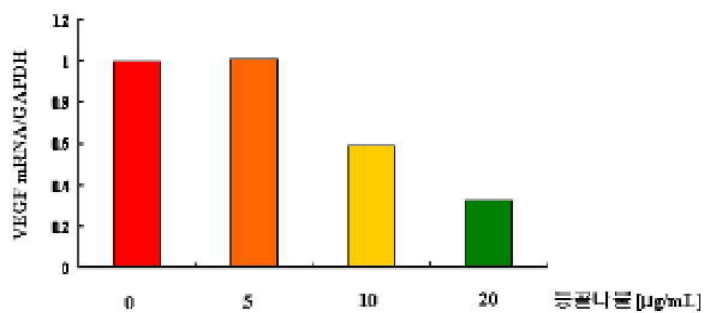
도면6a



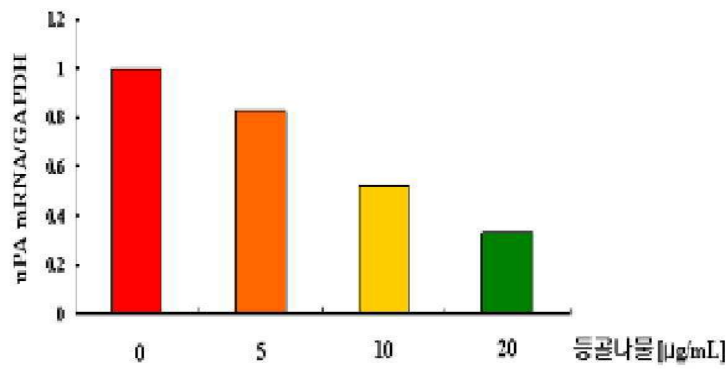
도면6b



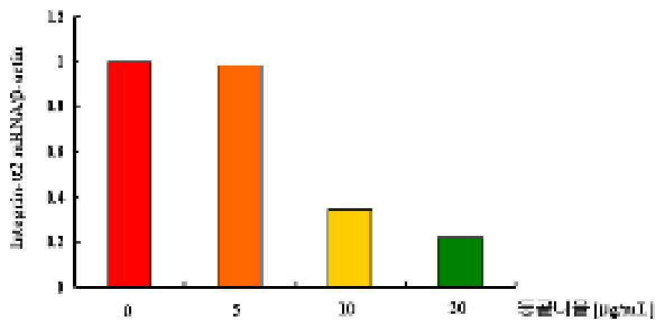
도면7a



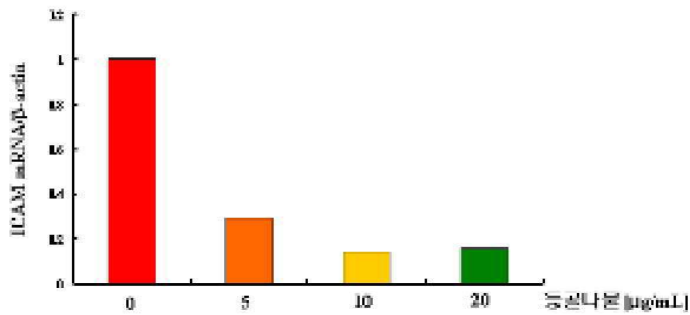
도면7b



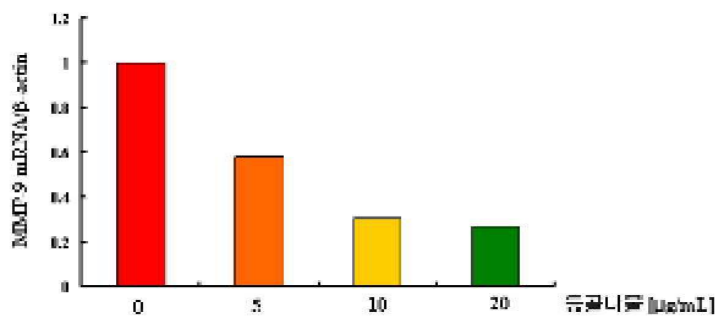
도면7c



도면7d



도면7e



도면8

