



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045127

(43) 공개일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/15 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0124384

(22) 출원일자 2013년10월18일

심사청구일자 2013년10월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이효정

서울 성북구 아리랑로5길 85, 102동 501호 (돈암동, 돈암동더샵아파트)

이민호

경기 용인시 수지구 심곡로 16, 509동 1701호 (상현동, 금호베스트빌5차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

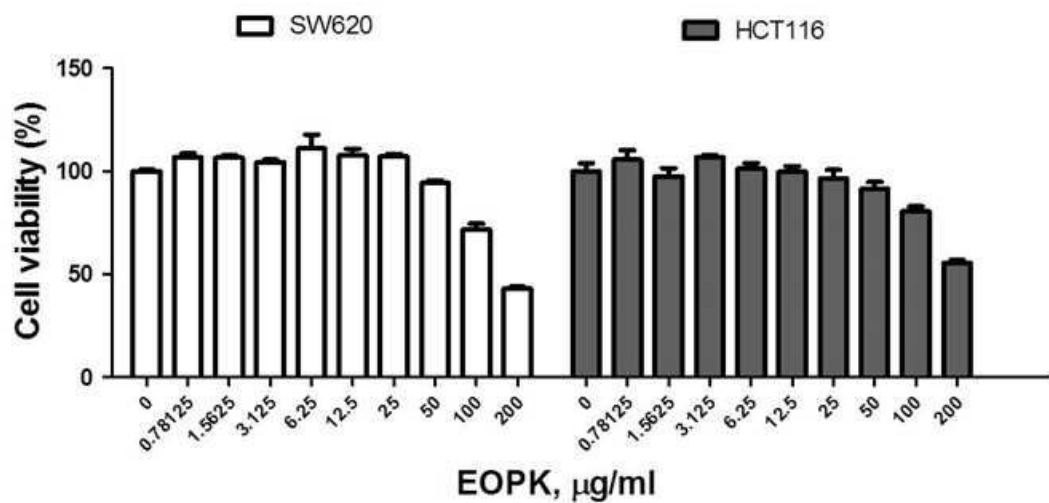
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **잣나무잎 추출물을 함유하는 항암 조성물**

(57) 요약

본 발명은 잣나무잎 추출물을 함유하는 항암 조성물을 제공한다. 본 발명의 잣나무잎 추출물은 암세포의 증식을 억제하여 항암 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

조선미

서울 동대문구 회기로19길 9, 2층 305호 (회기동)

김성훈

서울 강남구 언주로30길 57, E동 2405호 (도곡동,
타워팰리스)

명세서

청구범위

청구항 1

갯나무잎 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갯나무잎 추출물은 수증기증류추출법에 의하여 얻어지는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 갯나무잎 추출물은 무색투명한 오일인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암은 소화기암인 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 소화기암은 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 담낭암, 대장암 및 항문암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 소화기암은 대장암인 약학적 조성물.

청구항 7

갯나무잎 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 천연물 추출물을 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 갯나무잎 추출물을 함유하는 항암 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

일반적인 암의 치료법으로는 수술, 항암화학요법, 방사선치료가 있다. 수술의 경우는 목적에 따라서 진단적 수술, 근치적 수술, 예방적 수술, 완화적 수술로 구분된다. 종양의 분류와 유형을 알기 위해서 진단적 수술을 시행하며 근치적 수술은 초기단계의 암을 치료하는 방법으로 종양을 둘러싼 림프절과 원발병소 모두를 제거하는 방법이다. 예방적 수술은 전암성 병변으로 알려진 일부 폴립 등을 미리 제거함으로써 암 예방을 도움을 주는 방법이며 완화적 수술은 종양의 크기를 감소시킴으로써 암의 증상을 완화하는 방법이다. 우리 몸의 정상세포의 성장과 분화는 엄격하게 조절되어 있으나, 암세포의 경우 세포성장 조절에 이상을 보이며 계속적으로 증식하는 형태를 보이는 비정상적 패턴을 보인다. 그러므로 암세포 증식 억제가 중요한데 항암화학요법이 그 중 하나이다. 암세포를 파괴하여 재발하지 못하도록 하는 암의 치료 목적으로 사용되며 완치가 가능하지 못한 암에 있어서는 암의 성장이나 암세포가 퍼지는 것을 억제하여 생명을 연장하는 목적으로 사용한다. 적용되는 약물에는 알킬화 약물과 항대사물질 등이 사용된다. 알킬화 약물은 DNA에 직접 결합하여 DNA 분자 자체를 파괴하고 동일 나선 혹은 이중 나선 구조에 손상을 주어 암세포의 성장 및 분열을 억제한다. 대표적인 약물은 백금 화합물의 종류인 시스플라틴(Cisplatin), 카보플라틴(Carboplatin) 등이 있고, 니트로젠 머스타드(Nitrogen mustard)계 약물은 메클로레타민(Mechlorethamine, nitrogen mustard), 사이클로포스파마이드(Cyclophosphamide) 등이 있다. 항대사물질은 정상세포의 DNA복제에 필요한 대사물질들과 유사한 구조를 가지므로 퓨린(Purine)과 피리미딘(Pyrimidine)의 생합성 효소에 정상 대사물질들과 경쟁적으로 결합하여 그 작용을 방해함으로 항암효과를 나타

낸다. 대표적인 예로는 피리미딘(Pyrimidine) 유도체로 플루오로우라실(Fluorouracil, 5-FU), 카페시타빈(Capecitabine), 시타라빈(Cytarabine)등이 있으며, 퓨린(Purine) 유도체로는 메르캅토피린(Mercaptopurine, 6-MP)이 있다. 방사선 치료는 암세포에 방사선을 이용하여 파괴하는 방법으로 때로는 치료가 더 이상 가능하지 않을 때 환자의 증상을 완화시키는 목적으로 사용된다.

[0003] 그러나, 암 치료 방법들이 효과적으로 암의 성장을 억제함과 동시에 부작용을 초래하기도 한다. 수술의 경우는 폐합병증, 문합부(장을 자르고 이어준 부위) 누출, 장폐색, 배뇨장애, 성기능장애 등의 부작용이 나타날 수 있다. 항암화학요법 시에는 암세포 뿐만 아니라 정상세포까지 약물의 독성이 과급되기 때문에 다소간의 합병증이 나타나게 된다. 또한, 소화기 장애 및 장염, 백혈구나 혈소판 감소증, 면역억제, 피부 소양증 및 탈모, 신경계 독성, 신장 및 간독성이 있다. 방사선 치료에서도 암조직 뿐만 아니라 정상 조직에 방사선이 일부 투여되기 때문에 창상이 잘 아물지 않거나 피부괴사, 골수기능억제, 직장염 및 출혈 등이 합병증으로 나타날 수 있다.

[0004] 따라서 상기 언급한 부작용이 적으며 항암효과를 가지고 있는 천연소재의 추출물에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이며 안전하고 효능이 우수한 천연약제의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 잣잎 (혹은 '잣나무잎'이라고도 함)은 잣나무(*Pinus koraiensis* SIEB)로부터 얻어지며, 잣나무잎은 테르펜(terpene), 페놀화합물(phenolics), 탄닌(tannin) 등의 정유성분과, 엽록소성분, 무기 및 유기성분, 비타민 등의 다양한 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 다만, 잣나무잎은 본 발명자들에 의하여 당뇨병 치료 활성(대한민국 공개특허공보 제10-2010-0115598호), 비만 억제 활성(대한민국 공개특허공보 제10-2012-0134770호) 등에 대해서는 보고된 바 있으나, 항암 활성에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0007] 이에 본 발명자들은 잣나무잎을 이용한 항암 제제를 개발하기 위하여 연구를 수행한 결과, 잣나무잎이 암세포의 성장을 억제하여 항암 활성이 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2010-0115598호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2012-0134770호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기한 바와 같은 종래기술이 가지는 문제를 해결하여, 천연 추출물로서 안전하게 투여할 수 있으며, 암세포의 성장을 효과적으로 억제하여, 항암 효과가 우수한 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

약학적 조성물

[0011]

[0012] 본 발명은 잣나무잎 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013]

본 발명의 잣나무잎 추출물은 잣나무잎을 세척, 건조, 절단 및 분쇄, 추출 및 농축, 숙성단계를 걸쳐 얻을 수 있다.

[0014]

본 발명에 있어서, 잣나무잎 추출물은 통상적인 방법, 예를 들어, 물 추출법, 물+알코올 추출법, 알코올 추출법, 수증기증류추출법 등에 의하여 잣나무 잎으로부터 추출될 수 있다. 추출방법에 따라 추출물 내에 함유된 성분 및 조성이 상이할 수 있음은 당업자에게 자명한 사실이다. 본 발명에서는, 수증기증류추출법을 통해 얻어진 잣나무잎 추출물이 특히 바람직하다.

[0015]

수증기증류추출법은 당 분야에 잘 알려져 있다. 구체적으로, 수증기증류추출을 수행하기 위한 잣나무잎과 정제수의 비율은 1:1 내지 1:10 이며, 바람직하게는 1:1 내지 1:3, 더욱 바람직하게는 1:2이다 (중량 기준). 잣나무

있고 정제수를 증류탱크 내에서 70 ℃ 내지 500 ℃, 바람직하게는 80 ℃ 내지 150 ℃, 더욱 바람직하게는 90℃에서, 약 1 시간 내지 수일, 바람직하게는 3 내지 4 시간 동안 단회 또는 복수회로 증류시킨다. 이렇게 얻어진 증류물을 냉각 및 응축하여 얻어진 응축물을 본 발명에서 사용할 수 있다. 또한, 이렇게 얻어진 응축물을 당 분야의 통상의 방법으로 추가로 농축 및 여과하여 얻어진 더욱 순도 높은 잣나무잎 추출물을 사용할 수 있다. 수증기증류추출법에 의하여, 잣나무잎 추출물은 잣나무 향을 띄는 맑은 무색투명한 기름(오일)의 형태(증류추출오일)로 얻어진다.

[0016] 이렇게 얻어진 본 발명의 잣나무잎 추출물은 암세포의 성장을 효과적으로 억제하는 효과를 지니고 있다. 따라서, 본 발명의 잣나무잎 추출물은 암의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0017] 구체적으로, 본 발명의 잣나무잎 추출물은 식도암, 위암, 췌장암, 간암, 담낭암, 대장암 및 항문암으로 이루어진 군으로부터 선택된 소화기암의 암세포, 특히 대장암 세포의 성장을 억제하는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 잣나무잎 추출물은 소화기암의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분인 잣나무잎 추출물의 함량은 암의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 5 내지 80 중량%, 바람직하게는 20 내지 60 중량% 이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분으로 함유되는 잣나무잎 추출물은 약제학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등과 함께 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

[0020] 본 발명의 구형형태로써, 본 발명에 따른 잣나무잎 추출물을 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0021] 여기에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0023] 경구투여를 위한 고형제제로 제제화되는 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 가능하며, 이러한 고형 제제는 잣나무잎 추출물 이외에 적어도 한 가지 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 혼합하여 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0024] 경구투여를 위한 액상제제로 제제화되는 경우, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 가능하며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0025] 비경구 투여를 위한 제제로 제제화되는 경우, 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 연령, 상태 및 체중, 암의 진행 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위하여, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 잣나무잎 추출물 함량을 기준으로 성인 남성 기준 1일 10 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 100 mg/kg 내지 1000 mg/kg 이다.

[0027] 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구로, 또

는 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular)로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물은 암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] **식품 조성물**

[0031] 본 발명은 잣나무잎 추출물을 함유하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 식품 조성물에 사용되는 잣나무잎 추출물은 약학적 조성물에서 기재한 잣나무잎 추출물을 그대로 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 상기 암은 약학적 조성물에서 기재한 소화기암일 수 있다.

[0034] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. "건강기능식품"이라 함은 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 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0035] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "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.

[0036] 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.

[0037] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 위한 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 예컨대, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 보조 식품, 식품 첨가제 등에 사용될 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태일 수 있다.

[0038] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 잣나무잎 추출물을 약 1 내지 80 중량%, 바람직하게는, 20 내지 60 중량%로 포함할 수 있다. 이는 개인의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 암의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0040] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 잣나무잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.

[0041] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 잣나무잎 추출물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 잣잎 추출물, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0042] 환 형태의 건강기능식품은 잣나무잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[0043] 과립형태의 건강기능식품은 잣나무잎 추출물, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μ m), 14호 (1410 μ m) 및 45호 (350 μ m) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.

[0044] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5

개정판, p33-48, 1989).

발명의 효과

[0045] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 잣나무잎 추출물은 암세포의 성장을 억제하여, 항암 효과를 나타낸다. 따라서, 항암 효과가 우수한 건강 기능 식품 내지는 의약의 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 대장암 세포주에서 잣나무잎 추출물을 농도별로 처리하였을 시의 세포성장을 확인한 것이다.

도 2는 대장암 세포주인 HCT116에서 총 5일 동안 농도별로 잣나무잎 추출물을 처리하였을 시에 세포의 증식을 Crystal violet staining을 통해 확인한 것이다.

도 3은 대장암 세포주인 HCT116에서 총 5일 동안 농도별로 잣나무잎 추출물을 처리하였을 시에 세포의 증식을 Crystal violet staining을 처리한 뒤 70% ethanol로 녹여서 확인한 것이다.

도 4는 대장암 세포주인 HCT116에서 24시간, 48시간 동안 농도별로 잣나무잎 추출물을 처리하였을 시에 세포의 성장을 BrdU Assay를 통해 나타낸 그래프이다.

도 5은 대장암 세포주인 HCT116에서 농도별로 잣잎 추출물을 처리하였을 때 세포의 이동성을 전이의 모델로 이용되고 있는 Wound Healing Assay로 통해 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] **[제조예] 잣나무잎 추출물의 제조**

[0049] 신선한 잣나무잎(경기도 가평군, 강원 홍천군)을 수집하고 병들거나 벌레먹은 것, 마른 것을 선별해서 제거하고, 선별한 잣나무잎을 세척탱크에 넣고 흐르는 물로 3번 세척하였다. 세척한 잣나무잎을 3일간 음건(陰乾)하고, 이를 절삭기를 이용하여 10mm가량으로 일정하게 절단하였다. 절단된 잣나무를 증류탱크로 옮겼다. 증류탱크에 잣나무잎과 정제수의 비율을 1:2 정도로 하여 넣은 후 증류탱크의 잣나무잎의 추출온도를 90℃을 유지시켜 3~4시간 증류시켰다. 이때 냉각기 내부에 공급되는 냉각수의 온도는 18℃정도로 유지하며, 냉각기를 통과한 응축물을 응축물분리기에 수집하였다. 수집된 응축물은 기름과 물이 혼재되어 있기 때문에 추가의 농축과정과 여과과정을 거쳐 순도 높은 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물은 맑은 무색투명한 기름으로 잣나무향을 나타내었다. 상기 추출과정으로 얻어진 최종 추출물을 냉암소에서 최종 화학성분의 밸런스(안정화)와 풍미와 향을 위해 30일 정도 숙성시켰다.

[0050] **[실험예] 대장암 세포주에서 잣나무잎 추출물의 항암 효과 확인**

[0051] 대장암 세포주인 HCT116과 SW620을 96-웰 플레이트에 1×10^4 개씩 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 잣나무잎 추출물(EOPK)을 농도별로 처리해서 24시간 배양시킨 뒤 MTT cytotoxicity assay를 통해 암세포주에 대한 성장 억제효과를 확인하였다(도 1).

[0052] 도 1에 나타난 바와 같이, 잣나무잎 추출물은 일정 농도 이상이 되면 암세포 성장 억제효과가 있음이 확인되었다.

[0053] 도 1의 결과를 통해서, 대장암 세포주 HCT116에 독성을 미치지 않는 잣나무잎 추출물(EOPK)의 농도를 설정해서 아래 실험을 진행하였다.

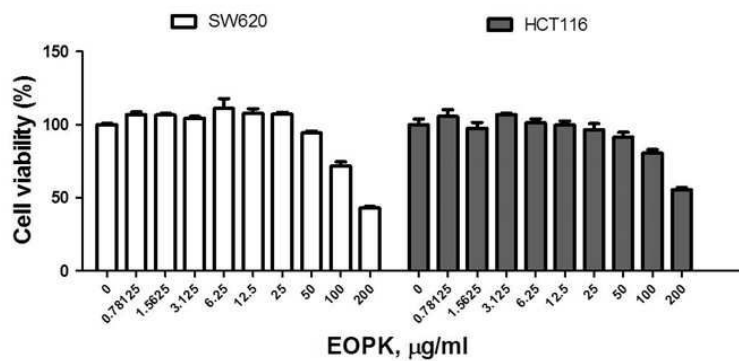
[0054] 대장암 세포주인 HCT116을 6-웰 플레이트에 5×10^4 개씩 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 잣나무잎 추출물(EOPK)을 농도별로 처리해서 24시간 배양시키고 다음날 새로운 잣나무잎 추출물로 다시 교체해 주었다. 이렇게 5일 동안 실시한 뒤 1% 글루타알데하이드 용액으로 고정을 시키고 0.05% Crystal violet 용액으로 염색한 뒤 사진을 찍었다(도 2).

[0055] 또한, 70% 에탄올로 녹이고 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices Co.)를 이용하여 570nm에서 reference로 405nm로 겹고 흡광도를 측정하였다(도 3).

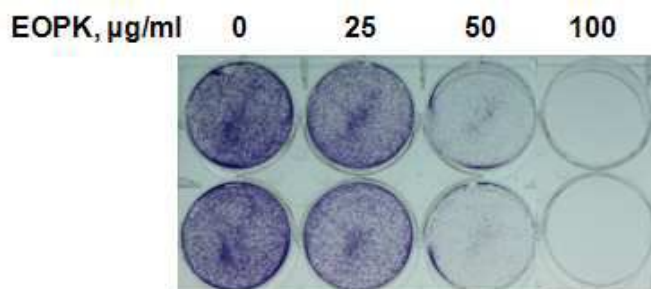
- [0056] 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 잣나무잎 추출물은 농도 의존적으로 대장암 세포의 증식을 억제하였다.
- [0057] 그리고, 대장암 세포주인 HCT116을 96-웰 플레이트에 1×10^4 개, 5×10^3 개씩 분주하고 24시간 동안 배양한 뒤에 잣나무잎 추출물(EOPK)을 농도별로 처리해서 24시간, 48시간 반응시킨 뒤 BrdU ELISA Kit (암세포 증식 정도를 측정 해볼 수 있는 키트)를 사용해서 대장암 세포주의 성장을 확인하였다(도 4).
- [0058] 도 4에 나타난 바와 같이, 잣나무잎 추출물은 농도의존적으로 대장암 세포의 증식을 억제하였으며, 잣나무잎 추출물을 48시간 동안 반응시킨 경우 24시간 반응시킨 경우보다 더욱 우수한 효과를 나타내었다.
- [0059] 또한, 대장암 세포주인 HCT116을 6-웰 플레이트에 4×10^5 개씩 분주하고 24시간 동안 배양한 뒤 세포의 이동성을 전이의 모델로 이용되고 있는 Wound Healing Assay를 통해 잣나무잎 추출물(EOPK)을 농도별로 24시간 동안 처리하였다(도 5).
- [0060] 도 5에 나타난 바와 같이, 잣나무잎 추출물은 농도 의존적으로 대장암 세포의 이동성을 억제함을 확인하였다.
- [0061] 상기 실험을 통해 확인된 바와 같이, 잣나무잎 추출물은 시험관내 암세포 모델인 HCT116에서 암세포 성장 억제를 통해, 항암 효과를 나타냄을 알 수 있다.

도면

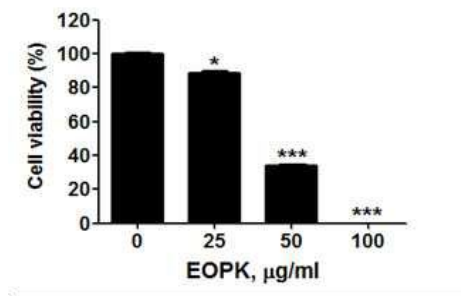
도면1



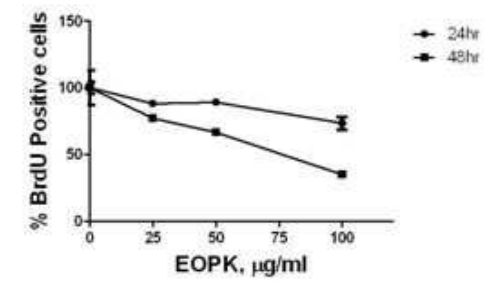
도면2



도면3



도면4



도면5

