(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0083868
(43) 공개일자 2025년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/889* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0172628
(22) 출원일자 2023년12월01일
심사청구일자 2023년12월01일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김봉이
서울특별시 강동구 상암로 355, 4동 101호
김정우
경기도 남양주시 도제원로 116, 403동 1404호
(74) 대리인
위병갑

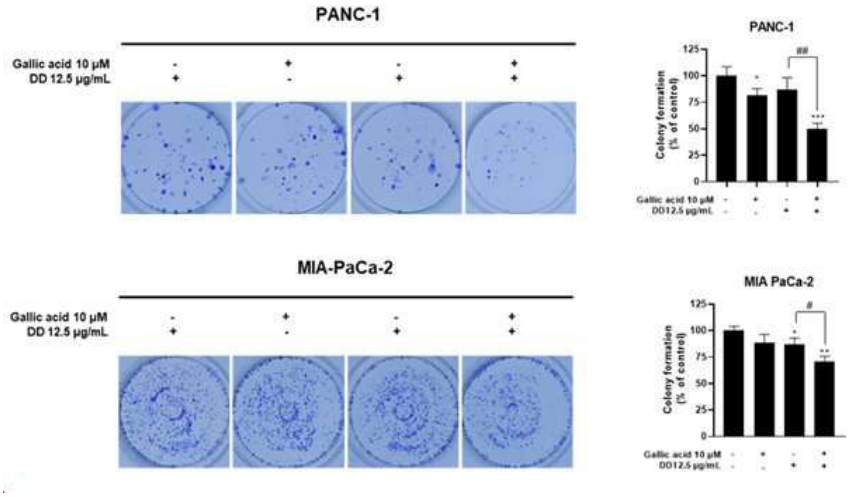
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **갈산 및 혈갈을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 췌장암 세포에 대한 세포 독성 및 활성 산소종(ROS) 생성을 증가시켜 세포 사멸을 유도하며, 세포 성장 억제 효과를 나타냄으로써, 췌장의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우 보다 우수한 효과를 나타내어, 병용 사용 시 췌장암의 치료에 더욱 효과적일 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/889 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/02 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345351506
과제번호 2020R1I1A2066868
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 한약물의 장내 미생물 조절을 통한 췌장암 억제 연구
기 여 율 95/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711158248
과제번호 2020R1A5A2019413
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 한약물 재해석 암 연구 센터
기 여 율 5/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혈갈 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 췌장암 세포의 생존율을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 췌장암 세포에서 활성 산소종(ROS) 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 췌장암은 췌관 선암종, 선방세포암종, 신경내분비종양, 장액성 낭성종양, 점액성 낭성종양, 췌관내 유두상 점액종양 및 고형 가유두상 종양으로 이루어진 군에 선택된 1종 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 7

갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 항암 보조제.

청구항 8

갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 갈산 및 혈갈을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체 내의 세포들은 영원히 생존해 있는 것이 아니라 세포사멸(apoptosis)의 과정을 거쳐 제거된다. 그러나 암

세포는 이러한 과정에서 벗어나 계속해서 분열한다. 그 결과 사멸해야 할 비정상 세포들이 계속해서 증식하고, 전이되어 몸속에서 퍼지게 된다. 이러한 암세포를 제거하기 위해서는 세포사멸을 유도해야 한다.

[0003] 췌장암(pancreatic cancer)은 초기 진단이 어렵고 주변 장기나 림프절로 쉽게 전이되는 특징이 있어 예후가 매우 좋지 않으며, 수술로 절제하는 것이 가장 효과적인 치료법이지만 10-20% 정도의 환자들만이 수술이 가능한 것으로 알려져 있어 암 사망률이 매우 높은 공격적인 암종으로 분류되어 있다. 또한, 수술을 받은 환자들 중에서도 공격적인 전이가 발생하면 일반적인 화학 요법이나 방사선 요법 등의 치료가 어렵다.

[0004] 이러한 췌장암 치료에 사용되는 많은 약물 치료법 중에서 젬시타빈(gemcitabine)은 지난 20년간 췌장암 환자 치료에서 가장 일반적으로 사용되는 치료법으로 알려져 있다. 젬시타빈과 함께 다양한 약물과의 병용치료가 췌장암에서 사용되고 있지만, 그 효과는 미미하여 췌장암 환자들의 유의적인 생존율 증가에는 영향을 미치고 있지 않다. 이후 개발된 폴피리녹스(FOLFIRINOX)는 5-FU(5-fluorouracil), 류코보린(leucovorin), 이리노테칸(irinotecan) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)의 4가지 약물의 조합으로 구성되어 있으며, 젬시타빈 단독과 비교하여 췌장암의 중앙 생존율을 증가시켰다. 또한, 알부민이 결합된 파클리탁셀(paclitaxel)과 젬시타빈의 병용치료도 젬시타빈 단독과 비교하여 췌장암에서 중앙 생존율을 증가시키는 효과를 나타냈다. 하지만 최종적으로 장기 생존율을 확인하였을 때 이러한 약물의 병용 치료의 효과는 미미했을 뿐만 아니라 약물 독성으로 인한 부작용이 발생하기도 하였다.

[0005] 한편, 갈산(gallic acid)은 오배자, 바위솔, 수정목 및 섬오갈피나무를 포함하는 다양한 식물로부터 추출한 추출물에서 발견되는 페놀산(phenolic acid)의 한 종류로, 항산화, 간기능 보호 및 항염 효과 등이 보고되었다.

[0006] 또한, 혈갈(血竭, Draconis Sanguis)은 종려과(Palmae)에 속한 기린갈(Daemonorops draco Blume)의 과실과 나무줄기에서 채취한 수지로, 외상, 염증, 부인병, 알레르기성 피부염에 관한 연구 결과가 보고되었다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 갈산과 혈갈에 대해 연구하던 중, 갈산 및 혈갈 추출물을 췌장암 세포주에 처리한 경우 암세포의 전이 및 성장을 차단하는 효과를 확인하였으며, 특히 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우에 보다 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 항암 보조제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 갈산 및 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 췌장암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 및 췌장암의 항암 보조제를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 갈산 및 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 췌장암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0014] 상기 혈갈 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 것일 수 있다.

[0015] 상기 조성물은 췌장암 세포의 생존율을 감소시키는 것일 수 있고, 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것일 수 있으며, 췌장암 세포에서 활성 산소종(ROS) 생성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0016] 상기 췌장암은 췌관 선암종, 선방세포암종, 신경내분비종양, 장액성 낭성종양, 점액성 낭성종양, 췌관내 유두상 점액종양 또는 고형 가유두상 종양일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 조성물은 췌장암 세포에 대한 세포 독성 및 활성 산소종(ROS) 생성을 증가시켜 세포 사멸을 유도하며, 세포 성장 억제 효과를 나타냄으로써, 췌장암의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0018] 특히, 갈산 및 혈갈 추출물을 각각 단독 처리한 경우와 비교하여, 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우 보다 우수한 효과를 나타내어, 병용 사용 시 췌장암의 치료에 더욱 효과적일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 갈산 및 혈갈 추출물의 단독 처리에 따른 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)의 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 갈산 및 혈갈 추출물의 단독 및 병용 처리에 따른 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)의 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 갈산 및 혈갈 추출물의 단독 및 병용 처리에 따른 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)의 콜로니 형성을 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 갈산 및 혈갈 추출물의 처리에 따른 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)에서의 활성산소종(ROS)의 생성 수준을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시태양 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시태양 및 실시예에 한정되지 않는다.

[0021] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 항암 보조제를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 갈산 및 혈갈 추출물을 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 갈산 및 혈갈 추출물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 개체에 투여하여 췌장암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0026] 상기 혈갈 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는 99% 에탄올로 추출한 것일 수 있다.

[0027] 상기 조성물은 췌장암 세포의 생존율을 감소시키는 것일 수 있고, 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것일 수 있으며, 췌장암 세포에서 활성 산소종(ROS) 생성을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 "갈산(gallic acid)"은 3,4,5-트리히드록시벤조산(3,4,5-trihydroxybenzoic acid)으로, 무색, 무취의 결정이며 약산성을 띤다. 식물의 잎, 줄기, 뿌리, 몰식자, 오배자 등에 유리상태로 존재하거나 타닌(tannin)의 구성 분자로 존재한다

[0029] 본 발명의 "혈갈(Draconis Sanguis)"은 기린갈(麒麟竭) Daemonorops draco Blume의 열매에서 삼출된 수지를 가열 압착하여 만든 덩어리를 의미한다.

[0030] 본 발명의 "췌장암"은 췌관 선암종(pancreatic ductal adenocarcinoma), 선방세포암종(acinar cell carcinoma), 신경내분비종양(neuroendocrine tumor), 장액성 낭성종양(serous cystadenoma), 점액성 낭성종양(mucinous cystic neoplasm), 췌관내 유두상 점액종양(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN), 고형가(假)유두상 종양(solid pseudopapillary tumor)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 피복정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 현탁액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 좌제, 에멀전제, 페이스트제(pastes), 연고제, 크림제, 로션제, 산제, 분무제 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다. 상기 제제화를 위해 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 희석제 등의 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈

크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구투여 또는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한 상기 조성물의 치료적으로 유효한 양은 투여방법, 목적부위, 환자의 상태에 따라 달라질 수 있으며, 인체에 사용시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다.

[0033] 또한, 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 항암 보조제는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제로서, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않으나 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다. 또한, 농도의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다.

[0035] 상기 항암 보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암 보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암 보조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 유제품, 발효제품 또는 식품 첨가물일 수 있다. 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0037] 상기 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 액제, 페이스트, 겔, 또는 젤리 등의 형태를 포함하며, 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "세포사멸"은 아폽토시스 또는 세포자멸사라고도 하며, 일종의 계획된 세포 죽음(programmed cell death; PCD)으로서 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램에 의해 비정상 세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 스스로 자살해 사멸함으로써 전체적인 신체 건강을 유지하도록 하는 메커니즘이다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어 "추출물(extract)"은 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할 수 있으며, 추출물 이의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출과정을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다. 추출물의 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반 추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C1-C4의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로포름, 디클로로메탄 또는 에틸아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있다.

[0040] 본 발명에 사용된 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 위장질환 등을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 위장질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"은 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본 발명에서 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0042] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0044] **[실시예 1] 재료 및 추출물 제조**

[0045] **1-1. 갈산의 구입**

[0046] 본 발명의 갈산은 Sigma Aldrich에서 Gallic acid(G7384)을 구매하여 사용하였다.

[0048] **1-2. 혈갈 추출물 제조**

[0049] 강원도가 원산지인 혈갈을 서울 동대문구 약원한약국에서 구매하였다. 100% 에틸 알코올로 추출한 후 2회 여과하였다. 상기 용액을 감압 농축하여 혈갈 에탄올 추출물을 제조하였다. 혈갈 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 100mg/mL의 stock solution을 제조하여 사용하였다.

[0051] **[실시예 2] 췌장암 세포주에 대한 세포 독성 확인**

[0052] **2-1. 갈산 및 혈갈 추출물의 단독 처리**

[0053] 상기 실시예 1의 갈산과 혈갈의 췌장암 세포주에 대한 항암 활성을 확인하기 위하여, 췌장암 세포주인 PANC-1과 MIA PaCa-2(한국세포주은행) 100㎕를 96웰-플레이트에 1.0×10^4 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서, 37℃의 5% CO_2 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다. 배양한 96웰-플레이트에서 배지만 걷어내고 갈산(Gallic acid)을 0, 18.75, 37.5, 75, 150, 300 uM의 농도로, 혈갈 추출물(DD)을 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ug/mL의 농도로 각각 100 ul씩 처리한 뒤, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 세포에 EZ-Cytox 시약(DoGen)을 10 ul 처리하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 한 뒤 마이크로플레이트 리더기(Bio-rad Model 680)를 이용하여 450nm 파장대에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 확인하였다.

[0054] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 갈산 및 혈갈 추출물은 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)에서 농도 의존적으로 세포 생존율을 감소시키는 것으로 나타났다. 따라서, 갈산 및 혈갈 추출물은 췌장암 세포에 대한 독성을 나타내며, 췌장암 세포의 사멸을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0056] **2-2. 갈산 및 혈갈 추출물의 병용 처리**

[0057] 상기 실시예 1의 갈산과 혈갈의 병용 처리 시 췌장암 세포주에 대한 항암 활성을 확인하기 위하여, 췌장암 세포주인 PANC-1과 MIA PaCa-2(한국세포주은행) 100 ul를 96웰-플레이트에 1.0×10^4 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서, 37℃의 5% CO_2 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다. 배양한 96웰-플레이트에서 배지만 걷어내고 0, 10 uM 농도의 갈산(Gallic acid), 0, 12.5 ug/mL 농도의 혈갈 추출물(DD), 및 10 uM의 갈산 및 12.5 ug/mL의 혈갈 추출물의 혼합물을 각각 100 ul씩 처리한 뒤, 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포에 EZ-Cytox 시약(DoGen)을 10 ul 처리하고 1시간 동안 다시 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 뒤 마이크로플레이트 리더기(Bio-rad Model 680)를 이용하여 450nm 파장대에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우 각각을 단독으로 처리한 경우와 비교하여 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)에서 더욱 강한 독성 및 증가된 세포 사멸을 나타내었고, 따라서 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리할 경우 상승 효과(시너지 효과)를 나타내는 것을 확인하였다.

[0060] **[실시예 3] 췌장암 세포주에 대한 성장 억제 효과 확인**

[0061] 상기 실시예 1의 갈산과 혈갈의 췌장암 세포주의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 콜로니 생성(colony formation)을 진행하였다. 췌장암 세포주인 PANC-1과 MIA PaCa-2 세포주(한국세포주은행) 2 mL을 6웰-플레이트에 2.0×10^5 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 10% inactivated fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서, 37℃의 5% CO_2 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다. 배양한 96웰-플레이트에서 배지만 걷어내고 0, 10 uM 농도의 갈산(Gallic acid), 0, 12.5 ug/mL 농도의 혈갈 추출물(DD), 및 10 uM의 갈산 및 12.5 ug/mL의 혈갈 추출물의 혼합물을 각각 2 mL씩 처리하고, 24시간 동안 37℃의 5% CO_2 인큐베이터로 인큐베이션하였다. 그 후 새로운 배지로 갈아준 후 PANC-1은 9일, MIA PaCa-2는 8

일동안 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS로 워싱하여 고정한 후 염색하여 결과를 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 갈산 및 혈갈 추출물의 처리에 따라 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)에서 농도 의존적으로 콜로니(colony) 수가 감소하는 것으로 나타났고, 따라서 갈산 및 혈갈 추출물은 췌창암 세포의 성장을 억제하는 효과를 갖는 것을 확인하였다. 특히 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우 각각을 단독 처리한 경우와 비교하여 보다 우수한 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0064] **[실시예 4] 췌장암 세포주에서 활성 산소종(ROS)의 생성 확인**

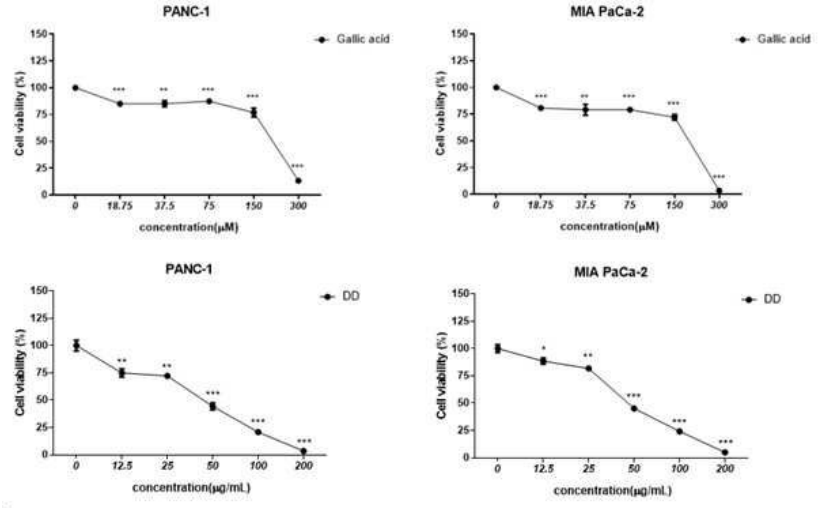
[0065] 암의 치료를 위한 화학요법이나 방사선치료는 대부분 암세포 내에 활성산소종(Reactive Oxygene Species, ROS)의 생성을 유도하여 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 그 기능을 하게 된다.

[0066] 따라서 상기 실시예 1의 갈산과 혈갈이 췌장암 세포주의 ROS 발생에 미치는 영향을 확인하기 위해, 암세포의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성을 확인할 수 있는 DCF-DA assay를 진행하였다. 췌장암 세포주인 PANC-1과 MIA PaCa-2(한국세포주은행) 100 ul를 96웰-플레이트에 1.0×10^4 세포/웰이 되도록 분주한 뒤, 37℃의 5% CO_2 인큐베이터(MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)로 배양하였다. 배양한 96웰-플레이트에서 배지만 걷어내고 20 uM DCF-DA을 처리하여 45분 동안 반응시켰다. 그 후 다시 배지를 걷어내고 페놀 레드가 포함되지 않은 DMEM 배지로 세척하였다. 갈산(Gallic acid)과 혈갈 추출물(DD), 및 이의 혼합물을 각각 100 ul씩 처리한 뒤, 4시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로 인큐베이션한 뒤 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 485nm와 535nm에서 형광을 측정함으로써 ROS 발생을 확인하였다.

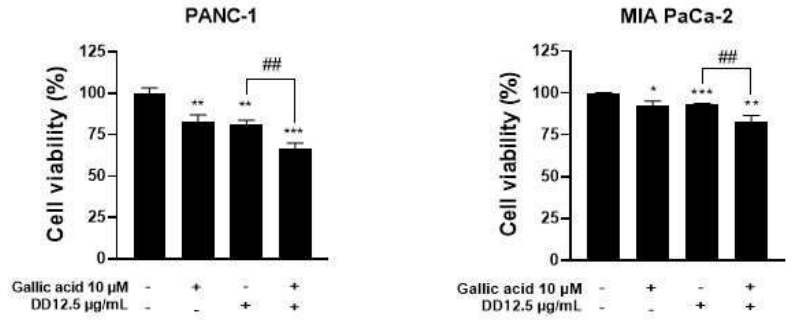
[0067] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 갈산 및 혈갈 추출물은 췌장암 세포주(PANC-1 및 MIA PaCa-2)에서 ROS 발생을 증가시키는 것으로 나타났고, 특히 갈산 및 혈갈 추출물을 병용 처리한 경우 각각을 단독 처리한 경우와 비교하여 더욱 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, 갈산 및 혈갈 추출물은 췌장암 세포에서 ROS 생성을 증가시킴으로써 세포 사멸을 촉진하는 효과를 갖는 것을 알 수 있다.

도면

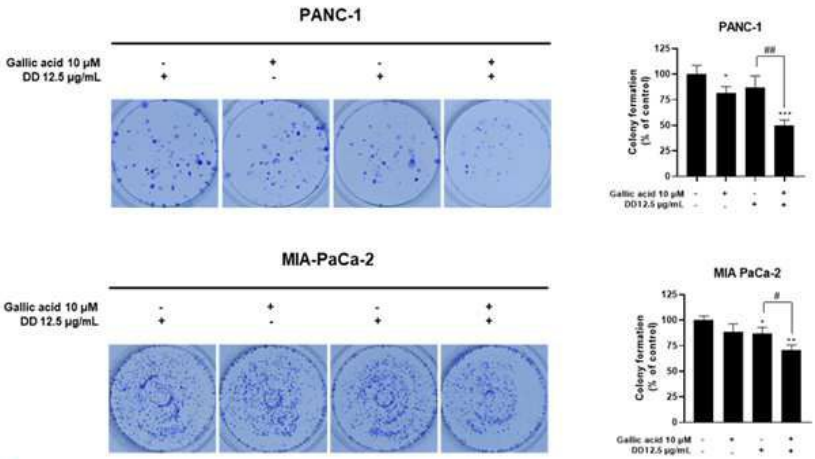
도면1



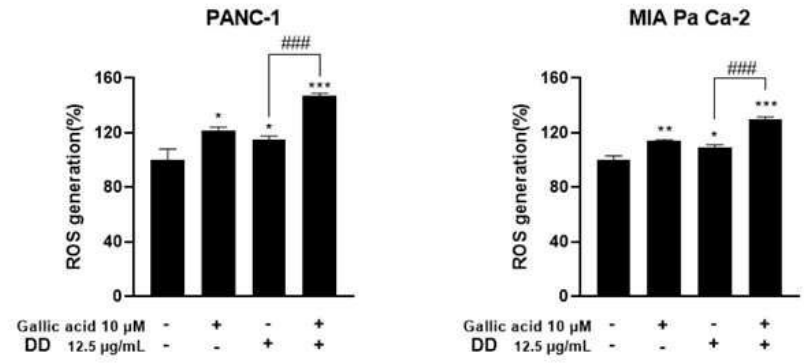
도면2


PANC-1
Cell viability (%)
125
100
75
50
25
0
##
**
**
***
Gallic acid 10 μM - + - +
DD12.5 μg/mL - - + +
MIA PaCa-2
Cell viability (%)
125
100
75
50
25
0
##
*
***
**
Gallic acid 10 μM - + - +
DD12.5 μg/mL - - + +

도면3


PANC-1
Gallic acid 10 μM - + - +
DD 12.5 μg/mL + - + +
PANC-1
Colony formation (% of control)
125
100
75
50
25
0
##
***
Gallic acid 10 μM - + - +
DD12.5 μg/mL - - + +
MIA-PaCa-2
Gallic acid 10 μM - + - +
DD 12.5 μg/mL + - + +
MIA PaCa-2
Colony formation (% of control)
125
100
75
50
25
0
#
**
Gallic acid 10 μM - + - +
DD12.5 μg/mL - - + +

도면4


PANC-1
ROS generation(%)
160
120
80
40
0
###
*
*
***
Gallic acid 10 μM - + - +
DD 12.5 μg/mL - - + +
MIA Pa Ca-2
ROS generation(%)
160
120
80
40
0
###
**
*
***
Gallic acid 10 μM - + - +
DD 12.5 μg/mL - - + +