

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0037781 (43) 공개일자 2010년04월12일
(51) Int. Cl. <i>A61K 36/234</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0097045 (22) 출원일자 2008년10월02일 심사청구일자 2008년10월02일	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내 (72) 발명자 서영완 광주광역시 북구 운암동 492-39 남택정 부산 남구 문현1동 53-3번지 부광주택 B-101호 (74) 대리인 이덕록	

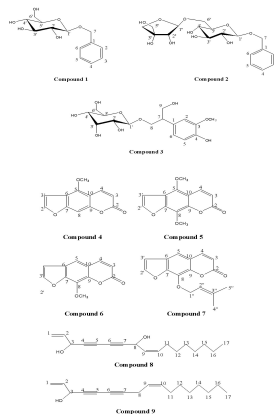
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 갯방풍 추출물을 함유하는 암예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 갯방풍 추출물을 함유하는 암예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 갯방풍 으로부터 추출 및 분리된 분획물과 이로부터 분리된 화합물들의 암예방 및 치료용 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 갯방풍 유래 분획물은 항암세포에 대해 높은 증식 억제효과를 나타내었고, 이폭토히스 과정에서 AGS와 HT-29 인체 암세포에서 iNOS와 COX-2, Bcl-2 유전자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 이로부터 분리한 9개의 화합물이 암세포에 대하여 높은 증식 억제 효과를 나타내었다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

공창숙

부산 연제구 거제4동 거제윙아시아드아파트
111-2401

엄영란

경상북도 김천시 부곡동 시범아파트 A동 511호

김유아

부산광역시 동구 초량동 829-39

이정임

경상남도 김해시 봉황동 회현아파트 107호

특허청구의 범위

청구항 1

갯방풍 유래 추출물을 유효성분으로 함유한 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

갯방풍 유래 추출물로부터 분획한 분획물을 유효성분으로 함유한 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 분획물이 갯방풍 *n*-헥산, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물

청구항 4

갯방풍 유래 분획물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유한 암예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 갯방풍 유래 화합물은 *n*-BuOH 분획물 유래 벤질-β-D-글루코피라노사이드(Benzyl-β-D-glucopyranoside) (1), *O*-β-D-아피오푸라노실-(1"→6')-β-D-글루코피라노사이드[*O*-β-D-apiofuranosyl-(1"→6')-β-D-glucopyranoside] (2), 1-β-D-글루코실옥시-2-(3-메톡시-4-하이드록시페닐-프로판-1,3-디올)[1-β-D-glucosyloxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl-propane-1,3-diol) (3), 85% aq. MeOH 분획물 유래 베르갯텐(Bergapten) (4), 이소핌피넨린(Isopimpinellin) (5), 잔토크신(Xanthotoxin) (6), 임페라토린(Imperatorin) (7), 팔카인돌(Falcaindiol) (8) 및 *n*-헥산 분획물 유래 팔카리놀(Falcarinol) (9)인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갯방풍 추출물을 함유하는 암예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 갯방풍으로부터 추출 및 분리된 분획물과 이로부터 분리된 화합물들의 암예방 및 치료용 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 천연물 화학적 연구는 오랜 기간 동안 주로 육상식물에 집중되어왔으나, 육상식물자원이 점점 고갈됨에 따라 천연물 화학적인 관심이 해양생물자원으로 이동되고 있다. 지금까지 해양천연물에 대한 연구는 육상천연물에 비하면 수 십 년에 불과하지만, 해양에는 육상과는 다른 생태적 특성을 가진 생물이 서식하고 있기 때문에 해양생물의 2차 대사산물에 대한 연구는 육상생물에서 생산되는 2차 대사산물과는 구조적으로 매우 다른 독특한 생리활성물질이 존재하여 해양천연물의 잠재적 가능성은 매우 클 것으로 기대되고 있다.

[0003] 해양생물의 서식지 중, 해안지역은 육상과 해양의 특성이 동시에 나타나며 시공간적으로 환경의 변화가 심하고 염분을 함유한 토양으로 인하여 식물의 분포가 제한되는 독특한 환경을 나타내는 지역이다. 특히, 해안염습지(salt marsh)는 해수의 영향을 주기적으로 받는 곳으로, 전 세계적으로 온대지방에서 한대지방에 걸쳐 극히 제한적으로 분포하며 우리나라에서는 서남해안 갯벌의 상부지역에 그 군락이 잘 발달되어 있다. 염생식물은 염염, 바닷가와 같이 토양의 염분 농도가 높아 일반 육상생물이 생육하기 어려운 해안염습지에 자라는 식물로, 육상으로부터 유입되는 풍부한 유기영양염류와 해양으로부터 유입되는 무기영양염류로 인하여 이러한 환경에 적응한 일부 종은 중간 경쟁이 거의 없기 때문에 생산성이 매우 높은 것이 특징이다.

[0004] 이러한 해안 염생식물의 높은 일차생산량은 온대지방의 해안염습지에는 초식동물이 거의 없기 때문에 대부분 해안염습지에서 분해되며 분해된 유기물은 저서성 규조류나 플랑크톤의 영양염류로 흡수되어 궁극적으로 염생식물은 해안염습지에서 먹이연쇄의 기초 생산자로서 소비자에게 먹이를 제공하는 중요한 역할을 한다. 우리나라의 해안염습지에 서식하는 식물로는 갯방풍(*Glehnia littoralis*)을 비롯하여 함초 (*Salicornia herbacea*), 해홍나

물 (*Suaeda maritima*), 칠면초 (*Suaeda japonica*), 갯질경이 (*Limonium tetragonum*) 등, 총 46종이 보고되었다. 그러나 염생식물이 서식하는 지대는 침식과 퇴적, 바닷물로부터의 직간접적 염의 유입, 불충분한 토양의 수분과 영양성분 그리고 높은 온도로 인하여 토양의 표면이 매우 불안정하기 때문에 일반 육상식물이 자라는데 매우 어려운 환경이다. 이러한 해안염습지와 같은 독특한 생태계는 전 세계적으로 한정되어 있는 희귀한 곳이며, 이곳에 생육하는 염생식물로부터 육상생태계에서는 볼 수 없는 유용한 신물질이 발견될 확률이 매우 높다고 할 수 있다.

[0005] 갯방풍(*Glehnia littoralis* F.Schmidt ex Miq.)은 산형과(Umbelliferae)에 속하는 다년생의 초본으로 우리나라를 비롯해 남태평양 지역의 해안에 주로 분포한다. 전체에 흰색 털이 나고 뿌리는 모래 속에 깊이 묻히며 높이는 20cm 정도이다. 줄기는 낮고 매우 짧으며 꽃은 흰색으로 6-8월에 피고 잎은 두껍고 윤이 나며 끝이 뭉뚝하다. 바닥에 붙어 자라기 때문에 강한 바람에도 이길 수 있다고 하여 방풍으로 명명 되었으며 해방풍, 빈방풍, 갯방풍으로도 불린다. 갯방풍의 어린 꽃봉오리와 잎은 식용가능하며 뿌리와 근경은 중국에서는 해열제, 진통제, 발한제 등 전통적 의약으로 사용되어져 왔다. 우리나라에서는 예로부터 갯방풍을 막걸리에 담가서 마시면 오래된 증풍을 고칠 수 있다 하였고, 증풍뿐만 아니라 기침, 기관지염, 폐결핵, 요통, 신경통 등에 두루 효험이 있으며 특히 뿌리는 폐를 튼튼하게 하는데 특효가 있다고 전해져왔다.

[0006] 앞선 연구에서는 갯방풍으로부터 소라렌(psoralen), 잔토독신(xanthotoxin), 베르가텐(bergaten), 임페라토린(imperatorin) 등의 푸로쿠마린(furocoumarin) 계열, 쿠마린 글루코사이드(coumarin glucoside), 폴리아세틸란 화합물(polyacetylenic 화합물s)이 분리된 바 있으며 이들 물질은 항종양, 무통증, 항-HIV(human immunodeficiency virus), 항류마티스, 항균, 항진균 등의 여러 가지 효능을 보인 바 있다.

[0007] 또한 대한민국 등록특허 제10-0679291호 “HGD - S J - 101 생약 복합제 추출물을 포함하는 동맥경화 예방 및 치료용 조성물”에 해방풍(*Glehnia littoralis*) 등을 포함하는 생약복합제 추출물을 유효성분으로 포함하고 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 동맥경화증 예방 및 치료용 약학조성물이 개시되어 있고,

[0008] 그러나 우리나라 바닷가에 서식하는 갯방풍의 화학성분에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았으므로 본 발명자들은 본 발명을 통하여 염생식물의 한 종류인 갯방풍이 함유하는 이차대사산물을 분리한 후 암세포성장에 미치는 생리활성을 검색하여 유용물질로의 개발 가능성을 탐색하여 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 갯방풍 유래 추출물의 신규한 항암 활성 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적은 갯방풍으로부터 분획물을 분리하고, 이들 분획물의 AGS 인체 위암세포를 억제하고, 이오포토시스 과정에서 AGS와 HT-29 인체 암세포에서 iNOS와 COX-2, Bcl-2 유전자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하며, 상기 분획물로부터 분리한 화합물에 대하여 암세포 증식억제효과를 확인함으로써 달성되었다.

[0011] 본 발명은 갯방풍 유래 추출물을 유효성분으로 함유한 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 갯방풍 유래 추출물로부터 분획한 분획물을 유효성분으로 함유한 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따른 분획물이 갯방풍 *n*-헥산, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 및 H₂O 분획물인 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한 본 발명은 갯방풍 유래 분획물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유한 암예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 갯방풍 유래 화합물은 *n*-BuOH 분획물 유래 벤질-β-D-글루코피라노사이드(Benzyl-β-D-glucopyranoside) (1), *O*-β-D-아피오프라노실-(1"→6')-β-D-글루코피라노사이드[*O*-β-D-apiofuranosyl-(1"→6')-β-D-glucopyranoside] (2), 1-β-D-글루코실옥시-2-(3-메톡시-4-하이드록시페닐-프로판-1,3-디올)[1-β-D-glucosyloxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-propane-1,3-diol] (3), 85% aq. MeOH 분획물 유래 베르가텐(Bergapten) (4), 이소핍피넨린(Isopimpinellin) (5), 잔토독신(Xanthotoxin) (6), 임페라토린(Imperatorin)

(7), 팔카인돌(Falcaindiol) (8) 및 *n*-헥산 분획물 유래 팔카리놀(Falcarinol) (9)인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명에서는 염생식물 자원들 중에 우리나라 연안에 많이 분포할 뿐만 아니라 식용으로 재배되고 있으며 이전부터 민간에서 약용식물로 이용되고 있는 갯방풍 (*Glehnia littoralis*)을 채집하여 이 식물의 2차 대사산물을 분리하고 그 구조를 결정한 후에 암세포성장억제에 대한 생리활성검색을 통하여 이들 식물의 산업적 활용 가능성에 대한 탐색연구를 시도하였다.

[0018] 먼저 포항 연안에서 채집한 갯방풍을 CH_2Cl_2 와 MeOH 용매로 각각 추출하여 두개의 조추출물을 얻었으며, 이를 합한 후에 용매의 극성에 따라 4개의 용매분획인 *n*-헥산, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH 그리고 H_2O 분획을 각각 얻었다. 세포수준의 항암활성효과 측정에서 용매 분획층에서는 85% aq. MeOH 분획과 *n*-헥산 분획이 모든 항암세포에 대해 높은 증식 억제효과를 나타내었고 특히 AGS 인체 위암세포에 대한 억제효과가 가장 큰 것으로 확인되었다. 또한 이들 용매 분획층은 이품토시스 과정에서 85% aq. MeOH 및 *n*-헥산 분획이 AGS와 HT-29 인체 암세포에서 iNOS와 COX-2, Bcl-2 유전자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 것이 관측되었다.

[0019] ^1H NMR 데이터 분석 및 분획물의 암세포성장억제율을 검토한 결과를 바탕으로 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-헥산 분획의 순서로 화학성분을 분리하여 9개의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물 9개에 대하여 암세포 증식억제효과를 측정한 결과, 대부분의 화합물이 암세포에 대하여 높은 증식 억제율을 보여 앞으로 갯방풍에 대한 새로운 암예방 및 개선에 유용한 식품 및 의약품의 소재로서의 개발이 기대되어진다.

효 과

[0020] 본 발명에 따른 갯방풍 유래 분획물은 항암세포에 대해 높은 증식 억제효과를 나타내었고, 이품토시스 과정에서 AGS와 HT-29 인체 암세포에서 iNOS와 COX-2, Bcl-2 유전자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 이로 부터 분리한 9개의 화합물이 암세포에 대하여 높은 증식 억제 효과를 나타내었다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] **실시예 1 : 갯방풍으로부터 시료의 추출, 분획 및 분리**

[0023] 본 실시예에 사용한 갯방풍 (*Glehnia littoralis*)은 2002년 9월 포항에서 직접 채집하였으며 응달에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C 에서 보관하였다가 해빙 후, 잘게 잘랐으며 메틸렌 클로라이드 용매를 넣고 24시간 방치하여 2번 반복 추출하였다. 얻어진 추출액은 40°C 수욕 상에서 회전 진공 증발기(EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하고 남은 잔사에 동량의 메탄올을 부어 위와 동일한 과정을 통해 추출물을 얻었다. 두 추출물을 합한 조추출물은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-헥산, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H_2O 분획물을 각각 22.09 g, 8.95 g, 16.92 g, 125.0 g 얻었다.

[0024] 이들 분획물에 대해 RP 플래쉬 컬럼 크로마토그래피, HP20 컬럼 크로마토그래피, 세파텍스 LH20 컬럼 크로마토그래피, 정상 HPLC, RP 플래쉬 컬럼 크로마토그래피, 실리카겔 예비 TLC를 이용하여 활성물질을 분리하였다.

[0025] 갯방풍의 *n*-BuOH 분획물로부터 벤질- β -D-글루코피라노사이드(Benzyl- β -D-glucopyranoside) (1), *O*- β -D-아피오후라노실-(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-글루코피라노사이드[*O*- β -D-apiofuranosyl-(1" $\rightarrow$ 6')- β -D-glucopyranoside] (2), 1- β -D-글루코실옥시-2-(3-메톡시-4-하이드록시페닐-프로판-1,3-디올)[1- β -D-glucosyloxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-propane-1,3-diol] (3)을 분리하였으며, 85% aq. MeOH 분획물로부터는 베르갭텐(Bergapten) (4), 이소핍핀넨린(Isopimpinellin) (5), 잔토크신(Xanthotoxin) (6), 임페라토린(Imperatorin) (7), 팔카인돌(Falcaindiol) (8)을 분리하였다. *n*-헥산 분획물층에서는 팔카리놀(Falcarinol) (9)를 분리하였다(도 1 참조).

[0026] 상기 물질의 순수성을 확인하기 위해 $^2\text{-D}$ NMR 분광법을 이용하였으며, 보조적으로 IR이나 UV-Vis 를 이용하여 정제된 물질의 작용기 및 발색단을 밝히는데 사용하였다.

[0027] **실험예 1 : 갯방풍 유래 화합물의 항암활성 분석**

(1) 세포배양

AGS 인체 위암 세포 (AGS human gastric adenocarcinoma cells)와 HT-29 인체 결장암 세포 (human colon adenocarcinoma cells), HT 1080 인체 섬유육종 세포 (human fibrosarcoma cells) 및 U937 (human histocytic lymphoma cells)은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. 이들 세포는 100 units/ml의 페니실린-스트렙토마이신과 10%의 FBS가 함유된 DMEM와 RPMI 1640을 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2-3회 리피딩(refeeding)하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% 트립신-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml 세포 배양 플라스크에 10 ml씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

(2) MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정

MTT 분석을 이용하여 갯방풍이 암세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 배양된 암세포를 96 웰 마이크로플레이트에 웰 당 2×10^5 cells/ml로 100 μ l씩 분주하여 37℃의 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후, 일정농도의 시료를 처리하여 37℃, CO₂ 배양기에서 48시간 더 배양하였다. 48시간 배양 후 MTT 시약(0.5 mg/ml)을 각 웰에 100 μ l씩 처리하고 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 포르마잔이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100 μ l를 넣어서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 아래의 식을 이용하여 암세포의 성장 억제율(%)을 구하였다.

$$\text{세포독성 (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

(3) 유전자발현분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNeasy RBB (GIBCO, USA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 올리고 dT 프라이머 (GIBCO, USA)와 AMV 역전사효소를 이용하여 2 μ g의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 템플릿으로 사용하여 iNOS와 COX-2, Bcl-2 유전자를 PCR(polymerase chain reaction) 방법으로 증폭하였다 (표 1 참조).

이때 하우스키핑 유전자인 β -액틴 유전자를 내부 대조군으로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% 아가로스 겔을 이용하여 전기영동하고 에티듐 브로마이드 (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

<표 1>

RT-PCR에 이용된 프라이머 서열

Gene name	Sequence
iNOS	Sence 5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	Antisence 5'-CAC-AGA-ACT-GAG-GGT-ACA-3'
COX-2	Sence 5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-ATT-GCT-3'
	Antisence 5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3'
Bcl-2	Sence 5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-AC-3'
	Antisence 5'-CAC-AGA-ACT-GAG-GGT-AC-3'
GAPDH	Sence 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3-3'
	Antisence 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GA-3'

(4) 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 p<0.05 수준에서 던컨 다중 범위 시험을 실시하였으며, 그 결과는 평균(Mean)±표준편차(Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 통계 분석 시스템(v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리

하였다.

[0041] (5) 조추출물의 인체 암세포 증식 억제효과

[0042] 염생식물인 갯방풍의 항암 생리활성 물질 탐색을 위한 기초 연구로서 갯방풍의 조추출물을 이용하여 AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric carcinoma cells), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 colon adenocarcinoma cells), HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cells), U937 인체 림프종세포 (U937 human histocytic lymphoma cells)의 성장에 미치는 영향을 5, 10, 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리 농도별로 관찰하였다 (도 2 참조).

[0043] 시료 처리 농도의 증가에 따라 인체 암세포의 생존율은 농도 의존적으로 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 시료의 처리농도 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 메탄올 추출물과 메틸렌 클로라이드 추출물은 대조군에 비해 대부분 50% 이상의 높은 암세포 증식억제효과를 나타내었으며, 4종의 암세포 중 AGS 인체 위암세포에서 가장 높은 암세포 성장 억제율을 보였다. 또한, 메탄올 추출물에 비해 메틸렌 클로라이드 추출물층에서 높은 증식 억제율을 보여 극성보다는 비극성 용매에서 보다 많은 성분의 항암생리활성물질의 탐색이 가능할 것으로 사료된다. 이러한 농도의 존적인 생존율의 감소는 조추출물의 처리에 의한 인체 암세포의 형태적 변이 및 부착력의 감소에 의한 것으로 볼 수 있다.

[0044] (6) 갯방풍의 용매 분획물의 암세포성장억제효과

[0045] 갯방풍의 메탄올 및 메틸렌 클로라이드 용매 추출물은 인체 암세포에 대하여 높은 증식억제효과를 나타내었으므로, 이들 추출물을 이용하여 순차적으로 분획한 용매 분획물에서의 암세포 증식 억제효과를 기대할 수 있다. 따라서 조추출물로부터 각 용매별 분획물을 추출하여 AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric carcinoma cells), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 colon adenocarcinoma cells), HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cells), U937 인체 림프종세포 (U937 human histocytic lymphoma cells)의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다(도 3 참조).

[0046] AGS 인체위암세포 성장억제 실험결과(도 3a 참조), 85% aq. MeOH 분획층에서 대조군과 비교하여 각각 5, 70, 90%의 암세포 증식저해효과를 보였고, n-헥산 층의 경우 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 낮은 저해효과를 보였으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 96%의 매우 높은 암세포 증식저해효과를 볼 수 있었다. H₂O 분획층과 n-BuOH 분획층에서는 처리 농도의 증가에 따라 암세포의 증식이 감소하였으나 모든 처리 농도에서 대조군과 비교하여 낮은 저해율을 보여 다른 분획물에 비해 거의 효과가 없었다.

[0047] HT-29 인체 결장암세포에서는 (도 3b), 85% aq. MeOH 분획층은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리농도에서는 대조군과 비교하여 암세포 증식저해효과가 전혀 없었으나 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 16 및 66%의 저해율로 용매 분획층 중 가장 높은 암세포 증식저해효과를 보였다. n-hexane 층에서는 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 암세포 증식저해효과가 거의 나타나지 않았으나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 63%의 저해율로 85% aq. MeOH 분획층 다음으로 높은 효과를 보였다. 그러나 H₂O 분획층과 n-BuOH 분획층은 AGS 인체 암세포에서 나타난 결과와 유사하게 대조군에 비교하여 암세포 성장저해효과가 거의 나타나지 않았다.

[0048] HT1080 인체 섬유육종세포에 갯방풍의 용매별 분획물을 농도별로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 보았다(도 3c 참조). 시료처리 농도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 85% aq. MeOH 분획층은 대조군에 비해 암세포 증식억제효과가 전혀 없었으나 10 와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 각각 16%와 77%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. n-헥산 분획층에서는 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료처리 농도에서 대조군에 비해 암세포 증식 억제효과가 거의 나타나지 않았으나, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 60%의 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그러나 H₂O 분획층과 n-BuOH 분획층은 처리 농도 증가에 따른 차이 없이 모든 농도에서 대조군에 비해 10% 이하의 낮은 저해율을 보여 다른 분획물에 비해 암세포 증식저해효과가 거의 없는 것으로 나타났다.

[0049] U937 인체 림프종세포의 경우 용매별 분획층을 위와 같은 농도로 처리하였을 때 85% aq. MeOH 분획층에서는 5, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료처리 농도에서 대조군과 비교하여 각각 29%, 83% 및 93%의 높은 암세포 증식저해효과를 나타내었다. n-hexane층에서도 대조군과 비해 각각 44, 63, 93%의 암세포 성장 억제율을 보여 85% aq. MeOH 분획층과 유사하게 높은 저해효과가 있음을 확인할 수 있었다. H₂O 분획층과 n-BuOH 분획층은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 35% 이하의 낮은 저해율로 농도의존적인 암세포 증식억제에는 거의 효과가 없었다.

[0050] 인체 암세포의 성장저해효과는 일부 분획층을 제외하고 각각의 처리 농도에 따라 차이가 있었으나 매우 유사한 경향을 나타내었다. HT1080 인체 섬유육종세포와 HT-29 인체 결장암세포의 경우 85% aq. MeOH, n-헥산 층에서

50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리 농도에서 약 60%이상의 높은 증식저해효과를 관찰할 수 있었다. 또한 AGS 인체 위암세포와 U937 인체 림프종세포의 성장저해효과는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 처리농도에서 약 90% 이상의 월등히 높은 증식저해효과를 보였다.

(4) 갯방풍의 용매 분획물이 mRNA 발현에 미치는 효과

암세포 성장 억제 효과에서 월등히 높은 효과를 보인 AGS와 HT-29세포에 대해서 mRNA 발현에 미치는 효과를 측정하였다 (도 4 참조). 염증 유전자로 알려진 iNOS 및 COX-2 유전자는 암세포의 증식 및 종양세포의 전이, 혈관 신생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, Bcl-2는 암세포의 아포토시스와 관련있는 것으로 알려져 있다. 갯방풍의 H_2O 와 n-BuOH분획물층에서는 처리 농도에 따른 유전자 발현 억제 효과가 대조군에 비해 거의 나타나지 않은 반면, 85% aq. MeOH 및 n-헥산 분획에서는 iNOS, COX-2, Bcl-2 유전자의 발현이 처리 농도에 의존적으로 억제되었다. 이는 85% aq. MeOH 및 n-헥산 분획에는 iNOS 및 COX-2, Bcl-2에 대해 억제효과를 갖는 성분이 들어 있어 암세포의 증식에 필요한 혈관신생을 억제하거나 암세포의 자살을 유도한 것으로 사료된다.

(5) 갯방풍에서 분리한 화합물 1-9의 암세포성장억제효과

갯방풍으로부터 분리된 화합물 1-9를 이용하여 4종의 인체암의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다(도 5 참조). 화합물 1-9는 대부분 농도 의존적으로 암세포증식억제효과를 나타내었으며, 암세포들간의 성장억제율을 비교한 결과, HT1080, U937, AGS, HT29 세포 중 AGS에서 가장 높은 활성을 보였다. 치료처리 농도 100 μM 에서는 화합물 1-9 모두 대조군에 비해 유의적으로 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 특히 화합물 8과 9가 가장 뛰어난 암세포 증식 억제효과를 보였다. 이 결과로부터 갯방풍의 암세포증식억제효과는 갯방풍으로부터 분리된 이들 화합물의 높은 암세포 증식억제효과에 의한 것으로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 갯방풍 유래 화합물의 화학식을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 갯방풍 조추출물의 암세포 성장억제 효과를 나타낸 도이다.

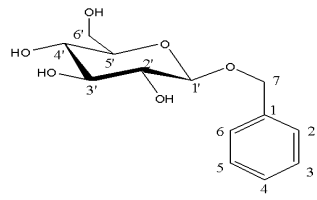
도 3은 본 발명에 따른 갯방풍 분획물의 암세포 성장억제 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 갯방풍의 용매 분획물이 mRNA 발현에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

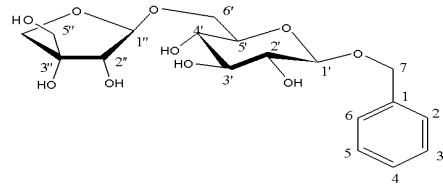
도 5는 본 발명에 따른 갯방풍 유래 화합물 1-9의 암세포성장억제효과를 나타낸 도이다.

도면

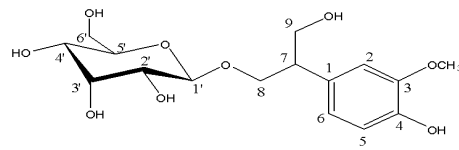
도면1



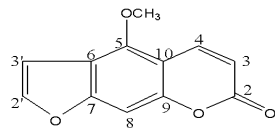
Compound 1



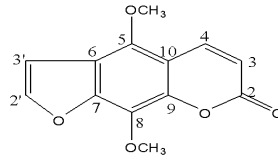
Compound 2



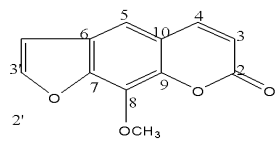
Compound 3



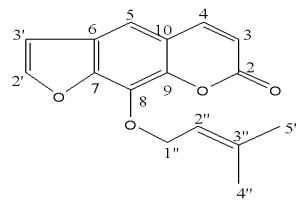
Compound 4



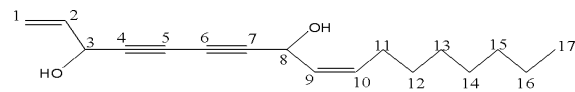
Compound 5



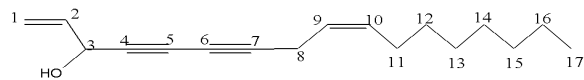
Compound 6



Compound 7

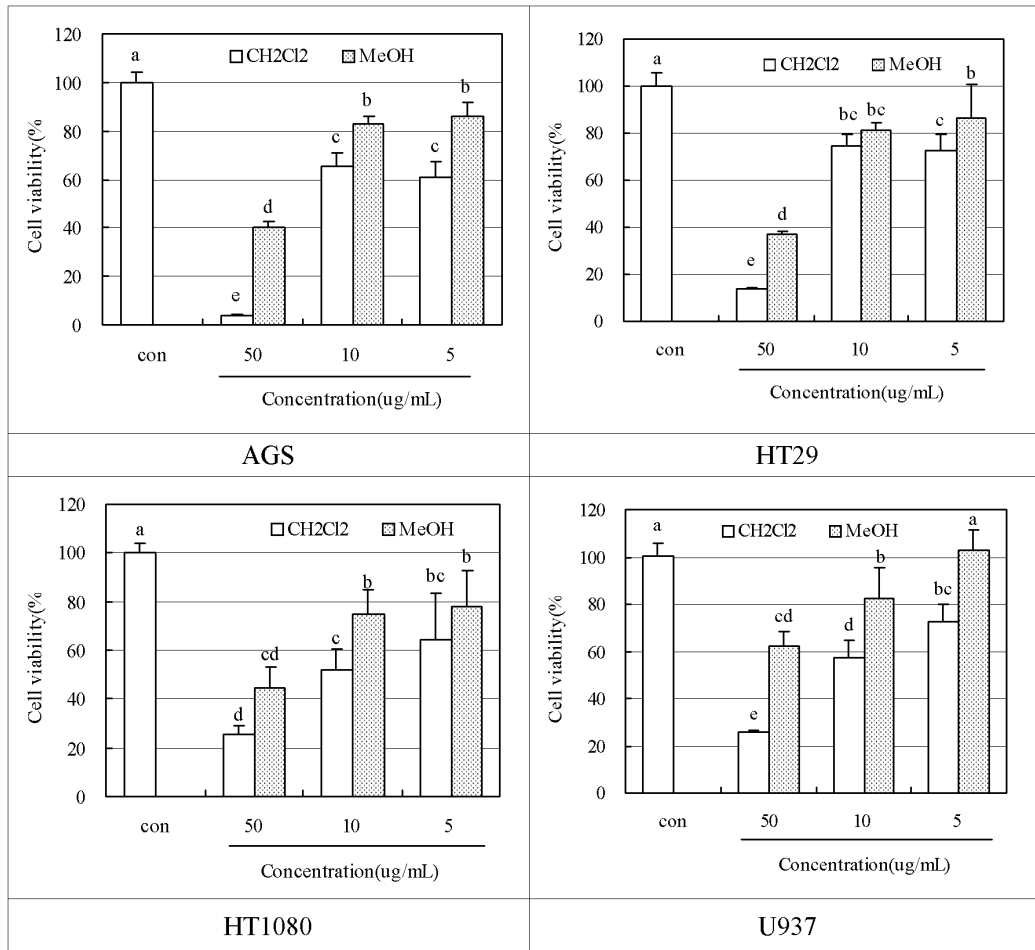


Compound 8

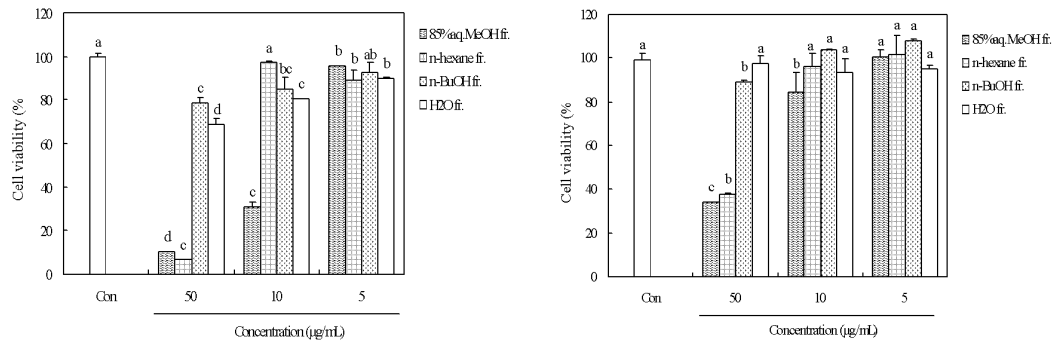


Compound 9

도면2

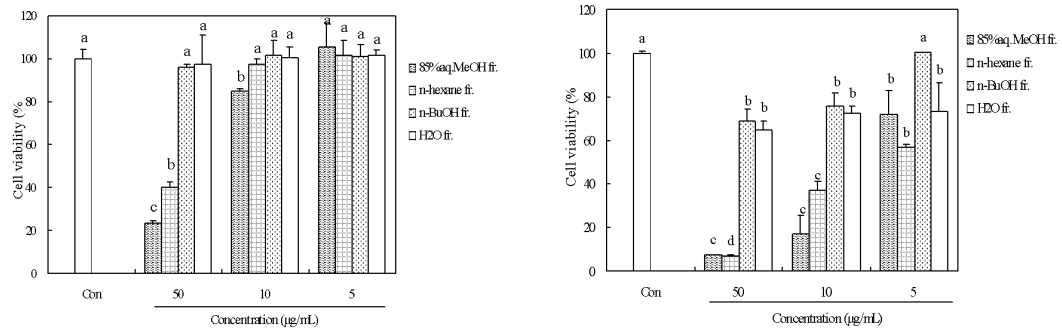


도면3



(a) AGS

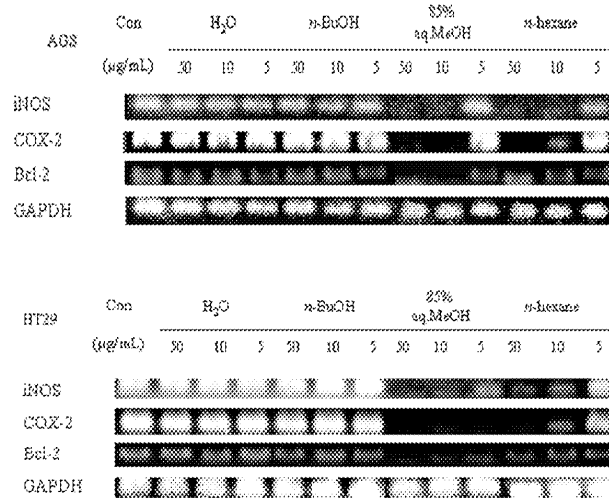
(b) HT29



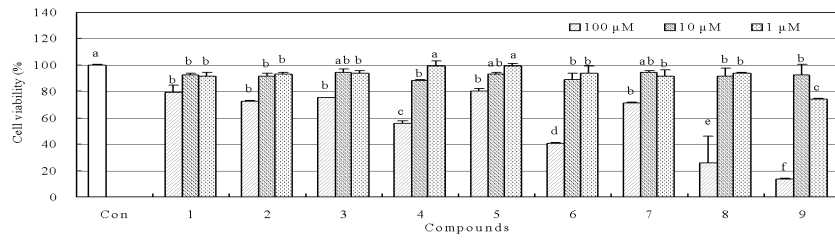
(c) HT1080

(d) U937

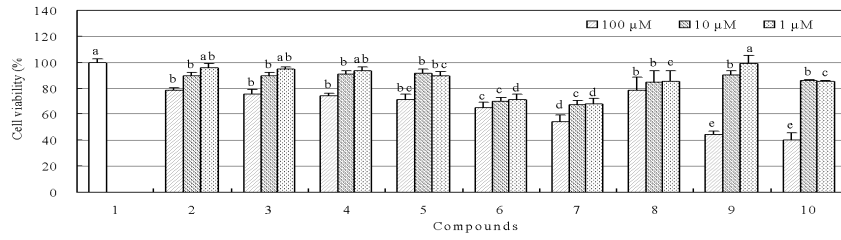
도면4



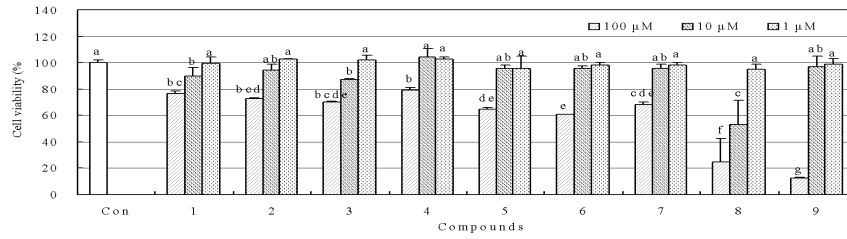
도면5



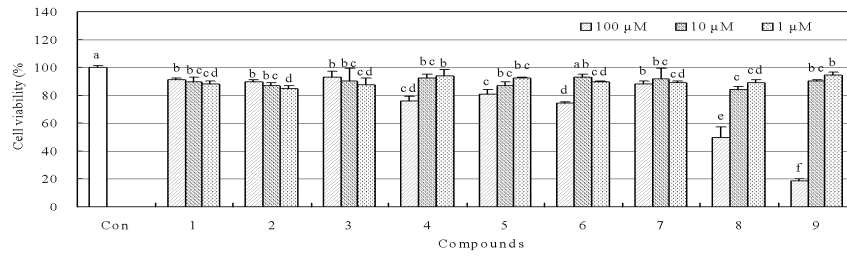
(a) AGS



(b) HT29



(c) HT1080



(d) U937