



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0008351
(43) 공개일자 2012년01월30일

(51) Int. Cl.

A61K 36/61 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0069163

(22) 출원일자 2010년07월16일

심사청구일자 2010년07월16일

(71) 출원인

중앙대학교 산학협력단

서울 동작구 흑석동 221

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

김소미

제주특별자치도 제주시 대원길 82-5 (오등동)

최형균

경기도 안양시 동안구 부림로 10, 503동 202호 (평촌동, 꿈마을아파트)

김영석

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 신공학과 361호 향미화학실 (대현동, 이화여자대학교)

(74) 대리인

양부현, 김승진

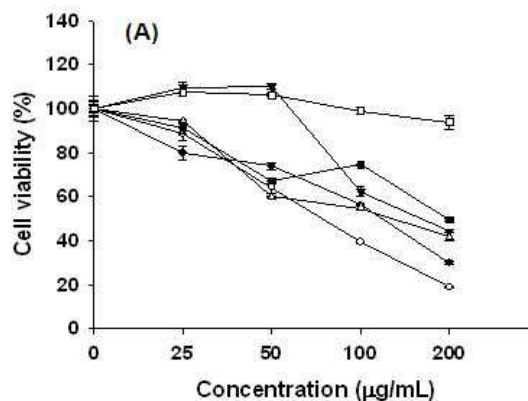
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암세포에서 아포토시스(세포사멸)를 유도하고 세포주기를 조절함으로써 암세포의 항-증식 활성을 발휘한다. 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2007-000-20492-0

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 핵심연구지원(협동연구)

연구과제명 Metabolomics를 이용한 국내산 아열대 식물체의 metabolome 분석 및 생리활성과의 상관
관계 규명

기여율

주관기관 중앙대학교

연구기간 2007년 09월 01일 ~ 2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

구아바 (*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 물, 탄소수 1-4 개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 또는 1,3-부틸렌 글리콜의 용매 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물은 상기 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 n-부탄올을 용매로 사용하여 추가 분획한 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 암의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 암의 개선 또는 완화용 기능성 식품 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 구아바 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 위암은 세계적으로 암관련 사망 원인 중 가장 흔한 것 중 하나이다. 최근에, 현재의 화학치료에 내성을 갖는 암세포가 중국적으로는 세포 군집에서 우위를 점하여 더 높은 치사율에 이르게 되는 사실이 밝혀졌기 때문에 새로운 항암제의 개발은 항암화학치료법에서 가장 중요한 이슈가 되고 있다(Kang, Park, Kim, Lee, Han & Leem, 2005). 환경요인과 높은 농도의 염 섭취 및 신선한 과일과 야채의 섭취 부족이 일반적으로 위암 발생의 위험을 크게 증가시키는 것으로 알려져 있다(Yan & Xu, 2003). 전염병학적 연구에 의하면 과일 및 채소를 함유하는 식이가 암의 위험을 크게 감소시키는데 기여한다는 것을 입증되었다(Jayaprakasha, Kandadi, Poulouse, Jadegou, Gowda & Patil, 2008). 식품에 함유된 몇 가지 식물 산물들은 인간에 있어서 항암 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 메틸 단백질(Brividia, Pan & Rechkemmer, 2002), 레스베라트롤 유사체(Wolter, Clausnitzer, Akoglu & Stein, 2002), 리놀레산 퀴누게이트(Kemp, Jeffry & Romagnolo, 2003) 및 녹차 추출물(Mueller-Klieser, Schreiber-Klais, Walenta & Kreuter, 2002)은 다양한 분자 및 세포 메커니즘을 통해 인 비트로에서 항암활성을 나타내는

것으로 보고되었고, 방울다다기양배추(Brussels sprouts)로부터 얻은 과즙 또는 동결건조분말은 동물 모델의 colonic crypt에서 아폽토시스 수준을 크게 증가시키고 세포분열을 감소시켰다(Smith, Mithen & Johnson, 2003). 또한, 과일 및 채소에서 발견된 다수의 플라보노이드, 예를 들어 케르세틴(quercetin)은 암세포에서 아폽토시스를 유발하는 것으로 나타났다 (Chen, Wu & Lin, 2007).

[0004] 구아바 (*Psidium cattleianum* Sabine = *Psidium littorale* Raddi)은 도금양과(Myrtaceae family)에 속하는 관목 또는 작은 구아바 나무이고(Verheij and Coronel, 1991), 스토로베리 구아바(strawberry guava) 또는 캐틀리 구아바(cattely guava)라고도 불리운다. 이의 매력적인 잎이나 과일에 의해 일반구아바(common guava)인 *P. guajava*와는 다른 종(species)으로써 구분된다. 의약으로서의 중요성 및 좋은 품질 때문에, 다양한 구아바는 세계적으로 다양한 지역에서 재배되고 한국의 제주도에서도 재배되고 있다. 구아바(*P. cattleianum*)의 잎 추출물은 바이오필름(biofilm)상에 고농도로 성장하는 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 변이체를 사멸시키는 것으로 보고되었다(Brighenti et al., 2008). 면역반응성을 증명하는 몇가지 타입의 이소플라보노이드가 구아바 (*P. littorale*)의 잎으로부터의 물-에탄올 추출물에서 검출되었고(Lapcik et al., 2005), 200종 이상의 휘발성 화합물이 구아바(*P. cattleianum*) 과일 오일에서 이미 확인되었다(Pino, Marbot & Vazquez, 2001). 관련된 문헌을 검토한 결과 일반 구아바(common guava)인 *P. guajava*의 과일과 잎은 항산화, 간세포 보호, 항-알러지, 항균, 항유전독성, 항변형체, 심장활성, 항감기, 항당뇨, 항-염증 및 항암 효과를 갖는 것으로 알려져 있다 (Gutierrez, Mitchell & Solis, 2008).

[0005] 따라서, 구아바과의 일원으로서 구아바 (*P. cattleianum* sabine)은 다른 유용한 약리학적 활성에 부가하여 항암 활성을 갖고 있으리라고 예측되어 왔으나, 지금까지 구아바(*P. cattleianum*)의 항암 효과에 관해서는 전혀 보고되어 있지 않다. 암은 세포 증식 이상 및 아폽토시스 장애가 특징이기 때문에 아폽토시스의 치료학적 응용이 항-종양 의학의 개발에 대한 모델로 여겨지고 있다(Hong et al., 2003).

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 천연물로부터 항암 활성을 갖는 물질을 탐색하기 위해 예의 노력하였다. 그 결과, 구아바 (*Psidium cattleianum*) 잎 추출물이 암세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하고 및 세포주기 조절을 통해 뛰어난 암세포 항증식 효능을 갖고 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 구아바(*Psidium cattleianum* sabine) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0009] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면 본 발명은 구아바 (*Psidium cattleianum*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 조성물은 다양한 구아바 종(species) 중에서 스토로베리 구아바(strawberry guava)로도 알려진 구아바 *Psidium cattleianum*의 잎 추출물을 유효성분으로 포함한다.

[0012] 본 발명에서 구아바 잎 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉,

통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 분리할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 구아바 잎 추출물을 추출하기 위한 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 예를 들어 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출하는 것이 바람직하다.
- [0014] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 구아바 잎 추출물은 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올을 용매로 한 추출물이며, 가장 바람직하게는 메탄올을 용매로 한 추출물이다.
- [0015] 본 발명 다른 바람직한 구현예에 의하면, 상기 구아바 잎 추출물은 상기 용매 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 n-부탄올 용매를 사용하여 추가 분획하여 얻은 분획물이다.
- [0016] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 구아바 잎 추출물은 구아바 잎의 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올 추출물의 n-헥산 또는 클로로포름 용매 분획물이다.
- [0017] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 구아바 잎 추출물은 탄소수 1-4개의 저급 알코올 추출물의 클로로포름 용매 분획물이다.
- [0018] 본 발명의 유효성분 구아바 (*Psidium cattleianum*) 잎 추출물은 암세포의 증식을 억제하는 활성을 갖는다.
- [0019] 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에 증명되는 바와 같이, 본 발명의 구아바 잎 추출물은 암세포에서 항-아포토시스(apoptosis, 세포사멸) 단백질의 발현을 억제하고 아포토시스 유도 단백질의 발현을 증가시킴으로써 아포토시스를 유도하며, 세포주기의 sub-G1 세포군집 비율을 증가시킨다. 상기와 같은 기작을 통해 암세포에서 항증식 활성을 나타낸다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물은 암의 치료 또는 예방 용도의 약제학적 조성물의 형태로 제조될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명에서의 치료 대상 암은 특정 암으로 한정되지 않으며, 예를 들어 유방암, 폐암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 췌장암, 피부암, 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 전립선암, 기관지암 또는 골수암을 들 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약제학적 조성물에는 유효성분으로서 구아바 잎 추출물 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0025] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-1000 mg/kg(체중)이다.
- [0026] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 구아바 잎 추출물의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정

화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0029] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물은 암의 완화 또는 개선 용도의 기능성 식품 조성물의 형태로 제조될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분으로서 구아바 잎 추출물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르트암 등)를 이용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0032] (i) 본 발명은 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물의 신규한 항암 용도에 관한 것이다.
- [0033] (ii) 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암세포에서 아폽토시스(세포사멸)를 유도하고 세포주기를 조절함으로써 암세포의 항-증식 활성을 갖는다.
- [0034] (iii) 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암세포에서 아폽토시스(세포사멸)를 유도하고 세포주기를 조절함으로써 암세포의 항-증식 활성을 발휘한다. 본 발명의 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물은 암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a 내지 도 1c는 구아바 잎 추출물에 대해, 세포의 성장 억제 실험 결과를 보여준다. 생존능(viability)은 MTT 분석에 기초하여 측정하였다. 측정값은 평균±SD 값으로 표현하였다(n=4).
- 도 1a는 구아바 잎 추출물의 용매 분획으로 처리한 SNU-16 세포의 결과이고, 비처리 세포(DMSO 만으로 처리한 세포)를 대조군으로 사용하였다. 분획: ●, 클로로포름 분획(CF); ○, 헥산(hexane)분획(HF); ▼, 에틸아세테이트 분획(EF); △, 부탄올 분획(BF); ■, 메탄올 분획(MF); □, 수성 잔여물(ARF).
- 도 1b는 케르세틴(quercetin)으로 처리한 세포에 대한 결과이다.
- 도 1c는 구아바 잎의 CF로 처리한 다양한 암세포주의 결과이다. 비처리 세포(DMSO 만으로 처리한 세포)를 대조군으로 사용하였다. 세포주: ●, SNU-16 (인간위암세포주); ○, HepG2 (인간 간암세포주) ▼, HeLa (인간자궁경부암세포주); 및 △, U-937 (인간 백혈병 암세포주).
- 도 2a 및 도 2b는 핵의 Hoechst 33342 염색 및 DNA 단편화를 검사한 결과를 보여준다.
- 도 2a는 세포를 CF (100 µg/ml)과 케르세틴(100 nM)으로 24 시간 동안 처리한 후 Hoechst 33342으로 염색한 결과를 보여준다.
- 도 2b는 DNA 단편화를 1.8% 아가로스 젤 전기영동에 의해 분석한 결과를 보여준다. 세포들을 지시된 농도의 CF 또는 케르세틴과 함께 24시간 인큐베이션하였다.
- 도 3a 및 도 3b는 SNU-16 세포내에서 아폽토시스 관련 단백질 발현을 면역 블로팅으로 분석한 결과이다. 세포 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분리하고 호오스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이트된 염소 항-래빗 IgG과 함께 필수 1차 항체로 프로브하였다. b-액틴을 내부 대조군으로서 사용하였다.
- 도 3a는 세포를 지시된 농도의 CF와 함께 24 시간 인큐베이션한 후에 세포를 용해한 후 웨스턴 블로팅한 결과이

다.

도 3b는 세포를 지시된 농도의 케르세틴과 함께 24 시간 인큐베이션한 후에 세포를 용해한 후 웨스턴 블로팅한 결과이다.

도 4a 및 도 4b는 구아바 잎의 80% 메탄올 추출물의 클로로포름 분획의 HPLC 프로파일이다.

도 4a는 감정적으로 확인된 화합물들의 280 nm에서 HPLC-PDA 스펙트럼의 주요 피크들을 보여준다(1-10).

도 4b는 UV 스펙트럼을 갖는 ESI⁺-MS 데이터와 CF의 주요 화합물 3',4',5' 트리메톡시 플라본의 구조를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038] 실시예

[0039] 실험방법 및 재료

[0040] 1. 화합물

[0041] HPLC 등급의 아세토니트릴(acetonitrile), 물 및 TFA(trifluoroacetic acid)는 Merck (Darmstadt, Germany) 및 Fisher Scientific Ltd. (MA, USA)으로부터 구입하였다. RPMI 1640 배지, DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지, 트립신/EDTA, FBS (fetal bovine serum), 페니실린, 스트렙토마이신, Hoechst 33342 염색제들은 Invitrogen Life Technologies Inc. (Grand Island, NY)으로부터 구입하였다. DMSO (Dimethyl sulfoxide), Quercetin, MTT, PI, RNase A, 및 카스파아제(caspase) 활성 분석 키트는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)으로부터 구입하였다. Bax, 절단된 카스파아제-3 및 β -액틴 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA)으로부터 구입하였고, 항-카스파아제-8 및 항-Bcl-2은 각각 R&D systems (Minneapolis, MN) 및 Santa Cruz (Santa Cruz, CA)으로부터 구입하였다. BCA 단백질 분석 키트는 Pierce (Rockford, IL)으로부터 구입하였고, PVDF(polyvinylidene fluoride)막은 Millipore (Bedford, MA)으로부터 구입하였다. 모든 다른 시약은 분석용 등급의 것을 사용하였다.

[0042] 2. 식물 재료

[0043] 구아바 (*P. cattleianum*) 잎은 제주의 농촌진흥청 난지농업연구소 근처에 위치한 농장에서 수집하였고, 증거표본(voucher specimen, NO: 109/08)으로서 제주대학교의 아열대 연구소 식물표본실에 기탁하였다.

[0044] 3. 추출 및 샘플 준비

[0045] 공기 건조된 잎(1200 gm)을 밀링머신(milling machine)을 사용하여 분쇄하고, 80% 메탄올을 사용하여 상온에서 3일간 교반하면서 추출하였다. 추출물을 여과하고, 40℃에서 감압하에서 진공 로터리 증발기(vacuum rotary evaporator)를 사용하여 농축하고, 동결건조하여 조 메탄올 추출물을 얻었다(27 mg). 건조시킨 메탄올 추출물(20 mg)을 물(500 ml)내에서 현탁시키고, n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 n-부탄올을 사용하여 단계적으로 추가 추출공정을 행하여 분획하였다. 클로로포름 분획 분말은 DMSO에 용해시키고, PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)를 사용하여 희석하여 항증식 분석에 사용하는 원하는 최종 농도로 만들었다.

[0046] 4. 세포 배양

[0047] 인간 자궁경부암세포주(HeLa), 인간 간암세포주(HepG2), 인간 위암세포주(SNU-16), 인간 백혈병암세포주(U937)의 암세포주와 인간 폐섬유아세포주(CCD-25Lu)은 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)으로부터 얻었다. 세포주는 10%(v/v)열-불활성화된 FBS(fetal bovine serum), 100 units/ml의 페니실린 및 100 μ

g/ml의 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 또는 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포들은 5% CO₂ 분위기하에서 37℃의 습화된 배양기내에서 유지하였다.

[0048] **5. 세포 생존능(cell viability) 분석**

[0049] 구아바 (*P. cattleianum*) 잎의 클로로포름 분획(CF)의 다양한 암세포주의 생존능에 미치는 영향은 MTT-기반 분석에 의해 측정하였다 (Carimichael, Degraff, Gazdar, Minna & Mitchell, 1987). 간략하게 설명하면, 대수기 (exponential-phase)에 있는 세포들을 수집하고 마이크로타이터 플레이트에 10⁴-10⁵ 세포/웰의 농도로 분주하였다. 이어서 세포들을 다양한 농도의 CF의 존재하에서 4일간 인큐베이션 하였다. 인큐베이션한 후에, 0.1 mg의 MTT (Sigma, St. Louis, MO)를 각 웰에 첨가하고 세포들을 37℃에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 2,500 rpm으로 상온에서 20 분간 원심분리하여 배지를 조심스럽게 제거하였다. 이어서, 포르마잔(formazan) 결정을 용해시키기 위해 DMSO (150 µl)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 Sunrise microplate reader (Sunrise, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 570 nm 에서 즉시 읽었다. 세포 생존능 비율은 다음의 공식을 사용하여 계산하였다: [(대조군-처리군)/대조군]의 평균값 X 100 %. 모든 세포 역제는 각 농도에서 3회 반복하여 평가하였다.

[0050] **6. 세포 형태 및 핵 단편화(nuclear fragmentation)**

[0051] 6-웰 플레이트에 10⁵ 세포/ml의 농도로 담겨져 있는 SNU-16 세포를 플레이팅한 후 5시간 시점에 동등량의 CF으로 처리하였다. 24시간 후에, 10 µM의 Hoechst 33342(DNA-특이적 형광염색제)를 각 웰의 용액에 첨가하고 플레이트를 37℃에서 10 분간 인큐베이션하였다. 이어서 염색된 세포를 Olympus 형광현미경을 사용하여 관찰하였다. 상기 동일한 방법을 대조군으로서 25-200 µM 농도의 케르세틴(quercetin)에 적용하여 비교를 위해 형광 현미경하에서 측정하여 기록하였다.

[0052] **7. 유세포 분석(flowcytometric analysis)**

[0053] 세포주기 분포 분석을 위해, SNU-16 세포 (1 X 10⁵ 세포/ml)을 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, CF (25 - 200 µg/ml)으로 24 시간 동안 처리하였다. 처리 후에, 세포들을 수집하고, 70% 에탄올에서 고정시킨 후, 2 mM EDTA를 함유하는 PBS에서 세정하고, 1 mg/ml RNase 및 50 mg/ml 프로피디움 요오드(propidium iodide)를 포함하는 1ml의 PBS내에서 재현탁하였고, 압조건 37℃에서 30분간 인큐베이션 한 후, FACScaliber 유세포분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 분석하였다. 각 데이터 파일에 대해 10,000 세포로부터 얻은 데이터를 수집하였다. 아포토시스 지표인 저이수이배체(hypodiploid) 함량을 갖는 핵의 백분율을 결정하기 위해 모든 히스토그램은 Cell Quest (Becton Dickson, USA)를 사용하여 분석하였다(Hockenbery, Nunez, Milliman, Schreiber & Korsmeyer, 1990).

[0054] **8. DNA 단편화(fragmentation)**

[0055] SNU-16 세포 (1 X 10⁵ 세포/ml)를 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 CF으로 24 시간동안 처리하고, 세포들을 다시 수집하였다. 지놈 DNA를 추출 완충액(10 mM의 Tris, pH 8.0, 0.1 M의 EDTA)내에서 추출하였다. 소듐도데실설페이트(sodium dodecyl sulfate)를 0.5% 첨가하고, 혼합물을 50 °C에서 0.5 µg/ml의 proteinase K와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물을 페놀:클로로포름:이소아밀알코올(25:24:1)으로 추출하고, DNA를 5M의 염화나트륨 및 2배 부피의 에탄올을 사용하여 침전시켰다. 추출 DNA의 동등한 양을 0.1 µg/ml의 에티디움브로마이드를 함유하는 1.8% 아가로스겔상에서 전기영동한 후, 자외선 하에서 시각화하였다.

[0056] **9. 면역블로팅 분석**

[0057] 25, 50, 100 및 200 µg/ml의 CF으로 처리한 후에, SNU-16 세포들을 수집하고 차가운 PBS으로 2회 세정하였다. 세포들을 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM

NaVO₃, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 25 µg/ml aprotinin, 및 25 µg/ml leupeptin)내에서 용해시키고 30 분간 얼음안에 두었다. 용해물을 4℃에서 13,000 rpm으로 30 분간 원심분리하고, 상등액은 -70℃에서 사용시까지 보관하였다. 단백질 농도는 BCA (bicinchoninic acid) 단백질 분석 키트(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 측정하였다. 용해물의 동등한 양(60-100 µg의 단백질)을 7.5 - 15% SDS-PAGE를 통해 분리하고, 글리신 이전 완충액(glycine transfer buffer, 192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 및 20% 메탄올(v/v))을 사용하여 PVDF(polyvinylidene difluoride)막 (Millipore, MA)상으로 이전시켰다. 5% 비-지방 건조우유로 블로킹하고, 상기 막을 1차 항체와 함께 2 시간 동안 인큐베이션시킨 후, TBS (Tris-buffered saline) 및 0.1% Tween 20을 포함하는 우유내에서 2차 항체와 함께 30 분간 추가 인큐베이션하였다. 1차 항체로는 인간 항-카스파아제-3, 항-PARP, 항-Bax (Cell Signaling, Beverly, MA), 항-카스파아제-8 (R&D Systems, MN) 및 항-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 항체들을 1:1,000 또는 1:2,000 의 희석비율로 사용하였고, 2차 항체로는 호오스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이트 염소 항-인간 IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 1:5,000의 희석 비율로 사용하였다. 이어서, 상기 막을 X-레이 필름에 노출시켰다. 단백질 밴드는 WEST-ZOL[®] plus Western Blot Detection System (iNtRON, Gyeonggi-do, Korea)을 사용하여 검출하였다.

10. HPLC-PDA-ESI-MS/MS에 의한 분석

구아바 잎 추출물의 클로로포름 분획(CF)(1 mg)을 아세트니트릴/물 (50/50, v/v)의 혼합물내에 용해시키고, PTFE 0.20-µm 시린지 필터(Advantec, Tokyo, Japan)를 통해 여과한 후, 2µl를 HPLC 컬럼 상에 주입하였다. HPLC-PDA-ESI-MS 분석은 Thermo Scientific Surveyor HPLC 및 LTQ linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Electrospray ionization (ESI; Bruke esquire 3000 plus) 및 280 nm에 맞추어진 Photodiode-Array Detector (PDA)를 사용하여 행하였다. UV 스펙트럼은 200 내지 700 nm 범위에서 스캐닝하였다. 크로마토그래피 분리는 Hypersil GOLD C18 컬럼 (100 X 2.1 mm; I.D., 1.9 µm) 상에서 용출액 A (H₂O + 0.05% TFA) 및 용출액 B (아세트니트릴 + 0.05% TFA)을 사용하여 200 µl/분의 유속에서 다음의 농도구배 용출 프로파일에 따라 행하였다: 0-25 분, 90-40% A; 25-35 분, 40-2% A; 35-38 분, 2% A; 38-43 분, 2-40% A, 및 43-45 분, 40% A. ESI 실험은 포지티브 및 네가티브 모드에서 모두 수행하였다. 세팅은 다음과 같았다: 측정된 질량 범위 m/z 150-1000; 이온 트랩 온도, 350℃; Em, 5.0 kV; 건조 N₂, 10 ml/분; nebulizing N₂, 30 psi; sheath gas flow, 30 units; capillary voltage, 9 V; 및 collision gas, helium.

1차 정량 분석을 수행하기 위해, 관찰된 모든 피크들의 피크 영역 조사를 행하였다. 잠정적 구조 확인은 각각의 종(species)의 선별된 이온 크로마토그램을 갖는 관심의 이온을 질량-선택함으로서 수행하였다. MSⁿ 스펙트럼은 오토 MS² 모드 (베이스 피크의 생성물 이온은 다음 단계 MS에 대한 전구 이온으로서 자동적으로 선별되었다)에서 얻어졌고 추가 구조적 정보를 제공하였다. 기계 작동 및 데이터 수집은 상업적으로 구입 가능한 소프트웨어 Xcalibur (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA)으로 수행하였다.

11. 통계적 분석

모든 결과는 평균±표준편차로서 표현하였다. Social Science Software (SPSS 12.0 for Windows, 2003, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의 통계학 패키지를 사용하여 일원 변량 분석(one way analysis of variance)을 행하였다. 데이터는 평균±SD로 표현하였고, p < 0.05의 값을 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다. 모든 분석은 3회 중복하여 수행하였다.

실험결과

1. 세포 생존능에 대한 CF의 효과

구아바 잎의 메탄올 추출물로부터 항암 화합물을 추출하기 위해, 4 가지 종류의 유기용매, 즉 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 n-부탄올을 이미 기술된 방법에 따라 단계적 방식으로 적용하여 분획하였다(Moon, Kim, Cho, Chang, Kim & Cho, 2009). 상기 방법에 의해 얻어진 구아바 (*P. cattleianum*) 잎 추출물 분획의 다양한 농도의 SNU-16 세포의 성장에 대한 영향을 MTT-기반 분석을 통해 검사하였다. 테스트된 추출물중에서 헥산 분

획(HF) 및 클로로포름 분획(CF) 모두 강력한 효과를 발휘하는 것으로 나타났다.

[0066] 이어서, CCD-25Lu 세포(정상 폐 섬유아세포)의 성장에 대한 HF 및 CF의 효과를 평가하였다. HF는 CCD-25Lu 세포에서 독성을 유도한 반면, CF는 독성이 없었다. 따라서, CF를 우선적으로 선택하여 SNU-16 세포의 아폽토시스를 통한 생존능 감소를 평가하였다. 25, 50, 100 및 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 CF에 노출된 SNU-16 세포의 생존능 비율이 각각 79.8 ± 3.4 , 73.8 ± 1.6 , 56.3 ± 0.8 , 및 29.9 ± 0.6 이었고, 세포 성장의 억제는 용량 의존적 방식으로 나타났다(도 1a). 상기와 유사한 효과는 포지티브 대조군으로서 가장 흔한 식용 플라보놀(flavonol)인 케르세틴(quercetin)을 25 - 200 μM 농도 범위에서 사용한 경우에도 나타났다(도 1b). 다음으로, 다른 암세포주의 성장에 대한 CF의 영향을 조사하였다. IC_{50} 값은 세포주에 따라 변화하였고, SNU-16 세포는 50 - 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 용량에서 CF-유도된 독성에 가장 민감하였다(도 1c).

[0067] 2. CF에 의한 아폽토시스의 유도

[0068] CF-유도된 생존능 감소가 아폽토시스에 의한 것인지를 규명하기 위해, Hoechst 33342를 사용하여 핵 염색을 행하였고 DNA 단편화 분석을 행하였다. 형광성 DNA-결합 염색제인 Hoechst 33342으로 핵을 염색하면 CF-처리된 세포내에서 단편화되고 응축된 핵을 관찰할 수 있었고, 이와 유사한 결과는 케르세틴(quercetin)으로 처리한 경우에도 관찰되었다(도 2a). 증가되는 농도의 CF 및 케르세틴으로 처리된 세포는 염색체 내부 절단에 의한 DNA 단편화에 대응하는 래더(ladder)의 축적이 증가하는 유사한 패턴을 나타내었다(도 2b). 종합하면, 상기 결과들은 CF가 SNU-16 세포내에서 아폽토시스를 유도한다는 것을 지시한다.

[0069] 3. 세포주기 진행에 대한 영향

[0070] CF 처리후에 sub-G1 군집에 있는 세포들을 아폽토시스 인덱스로서 정량화하였고, 케르세틴 처리의 것과 비교하였다. CF로 24시간 처리하면 농도 의존적 방식으로 sub-G1 세포 군집의 증가가 유도되었다(표 1). 하기 표 1에는 sub-G1 분획에 있는 SNU-16 세포의 백분율을 24 시간 동안에 걸쳐 측정한 결과를 나타내었다.

표 1

Sample	Concentration (unit)				
	0	25	50	100	200
Sub-G1 (%) CF ^a	7.19 $\pm$ 2.9	8.94 $\pm$ 2.8	10.1 $\pm$ 0.3	31.4 $\pm$ 5.8	66.6 $\pm$ 12.0
Quercetin ^b	9.97 $\pm$ 3.2	13.62 $\pm$ 5.1	25.11 $\pm$ 4.3	34.85 $\pm$ 2.8	35.45 $\pm$ 6.0

[0072] CF 처리에 의해 sub-G1 단계에 있는 세포들의 비율이 7.19%(0 $\mu\text{g/ml}$)에서 31.4%(100 $\mu\text{g/ml}$)으로 증가하였고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 CF의 처리에 의해서는 sub-G1 군집에 있는 세포들이 66.6% 까지 더욱 증가하였다. 케르세틴(quercetin)의 농도를 증가시키면서 처리하는 경우 유사한 결과들이 관찰되었으나, 200 μM 의 농도로 처리하는 경우에 sub-G1 군집의 추가적인 증가는 관찰되지 않았다. 따라서, 상기 결과는 CF에 대응하여 관찰되는 성장의 억제가 세포주기에서의 sub-G1 단계 중지(arrest)와 관련이 있다는 것을 나타낸다.

[0073] 4. 아폽토시스-관련 단백질의 웨스턴 블로팅 분석

[0074] 면역블로팅 방법을 통해 CF-유도된 아폽토시스의 기작을 조사하고 케르세틴과 비교하였다. CF-처리된 SNU-16 세포내에서 항-아폽토시스 단백질인 Bcl-2의 발현은 농도 의존적 방식으로 현저하게 억제된 반면, Bax의 발현은 비교적 일정하게 유지되었다(도 3a). 케르세틴(quercetin)으로 처리된 세포내에서도 유사한 결과가 관찰되었다(도 3b). 상기 결과는 SNU-16 세포를 CF와 케르세틴으로 처리하면 Bax/Bcl-2의 비율을 아폽토시스 우호적 비율로 변화시킴으로써 아폽토시스를 유발하는 것으로 보여진다. CF 및 케르세틴은 농도 의존적 방식으로 카스파아제-8, 및 카스파아제-3의 발현을 증가시켰으며, PARP의 단백질 분해도 증가시켰다. 따라서, 상기 결과들은 SNU-16 세포에서의 CF의 아폽토시스 유도 활성화는 Bax/Bcl-2의 비율과 카스파아제 활성화의 증가와 관련된다는

것을 암시하고 있다.

5. LC-PDA-ESI-MS/MS에 의한 CF의 화학적 특성 분석

SNU-18 세포내에서 아폽토시스의 유도에 현저한 영향을 끼치는 활성성분을 확인하기 위해 CF에 대해 비-타겟 LC-PAD-MS/MS 화학 분석을 행하였다. 도 4a는 UV 280 nm에서 CF의 주요 피크의 HPLC 스펙트럼을 보여준다. 화합물들을 모분자의 이온, UV값, 보유시간(retention time) 및 용출순서와 함께 기존 문헌(Wang, Wang, Huang, Tu & Ni, 2007; Zhou et al., 2007; Du & Chen, 2010)에 기술된 분획 패턴을 기초로 하여 잠정적으로 확인하였다. 공지된 데이터 (Huck, Huber, Ongania & Bonn 2000)와의 비교에 의해 확인된 3',4',5'-트리메톡시플라본(trimethoxy flavone)의 UV 및 MS 데이터는 도 4b에 나타내었다. 대응하는 상업적 표준물질이 없고 오버랩핑 및 넓은 영역의 피크 때문에 혼합물내에서 확인된 화합물을 LC/UV에 의해 정량하는 것은 용이하지 않았다. 따라서, 잠정적으로 확인된 화합물의 비교 피크 영역의 비율은 구아바 잎의 CF의 구성성분의 비교 양을 결정하는데 사용하였다. 혼합물내에는 폴리메톡실레이티드플라본(polymethoxylated flavone), 세스키테르펜(sesquiterpene), 제니스테인(genistein), 페룰산(ferulic acid), 올레아놀산(oleanolic acid) 및 공지되지 않은 다른 화합물들을 포함하고 있었다(표 2). 하기 표 2에는 구아바 잎의 클로로포름 분획에서 UV 및 질량 분석 데이터로 확인한 화합물들의 프로파일을 나타내었다.

표 2

Peak No	RT(min.)	UV data (λ_{max})	ESI [M+H] ⁺	Tentative Compounds	RPA (%)
1	10.4	208, 280	195.25	Ferulic acid	1.9
2	11.3	243, 364	639.31	Unknown	2.6
3	11.6	209, 280	609.27	Unknown	3.4
4	14.9	260, 315	235.11	Unknown	3.7
5	15.2	247, 374	221.21	Sesquiterpenes	4.9
6	21.0	209, 292	271.32	Genistein	3.4
7	22.7	208, 275	437.35	Phloridizin	1.0
8	22.9	278, 325	313.16	3', 4', 5' trimethoxy flavone	18.0
9	24.8	208, 276	230.24	Unknown	2.0
10	33.3	220, 412	457.24	Oleanolic acid	0.9

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

- Ampasavate, C., Okonogi, S., & Anuchapreeda, S. (2010). Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *African Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, 4, 13-21.
- Brighenti, F. L., Luppens, S. B., Delbem, A. C., Deng, D. M., Hoogenkamp, M. A., Gaetti-Jardim, E. Jr., et al. (2008). Effect of Psidium cattleianum leaf extract on Streptococcus mutans viability, protein expression and acid production. *Caries Research*, 42, 148-154.
- Brivida, K., Pan, L., & Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of nitrogen-activated protein kinases. *Journal of Nutrition*, 132, 2814-2818.
- Carimichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47, 936-942.

- [0084] Chen, C. N., Wu, C. L., & Lin, J. K. (2007). Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Cancer Letters*, 245, 218-231.
- [0085] Chen, K. C., Hsieh, C. L., Peng, C. C., Hsieh-Li, H. M., Chiang, H.S., Huang, K. D., et al. (2007). The aqueous extract of *Psidium guajava* L. (PE) inhibited the cancer cell DU-145 in a dose- and time-dependent manner. *Nutrition and cancer*, 58, 93-106.
- [0086] Chen, K. C., Peng, C. C., Chiu, W. T., Cheng, Y.T., Huang, G. T., Hsieh, C. L., et al. (2010). Action Mechanism and Signal Pathways of *Psidium guajava* L. Aqueous Extract in Killing Prostate Cancer LNCaP Cells. *Nutrition and cancer*, 62, 260-270.
- [0087] Coates, E. M., Popa, G., Gill, C. I. R., McCann, M. J., McDougall, GJ, Stewart, D., et al. (2007). Colon-available raspberry polyphenols exhibit anti-cancer effects on in vitro models of colon cancer. *Journal of Carcinogenesis*, 6, 4-17.
- [0088] Davis, J. N., Muqim, N., Bhuiyan, M., Kucuk, O., Pienta, K. J., & Sarkar, F. H. (2000). Inhibition of prostate specific antigen expression by genistein in prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 16, 1091-1097.
- [0089] Du, Q., & Chen, H. (2010). The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells. *Food Chemistry*, 119, 567-572.
- [0090] Graziani, G., Argenio, G. D., Tuccillo, C., Loguercio, C., Ritieni, A., Morisco, F., et al. (2005). Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut*, 54, 193-200.
- [0091] Gutierrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 1-27.
- [0092] Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D., & Korsmeyer, S.J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 384, 334-336.
- [0093] Hong, M. Y., Chapkin, R. S., Davidson, L. A., Turner, N. D., Morris, J. S., Carroll, R. J., et al. (2003). Fish oil enhances targeted apoptosis during colon tumor initiation in part by downregulating Bcl-2. *Nutrition and Cancer*, 46, 44-51.
- [0094] Huck, C. W., Huber, C. G., Ongania, K. H., & Bonn, G. K. (2000). Isolation and characterization of methoxylated flavones in the flowers of *Primula veris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 870, 453-462.
- [0095] Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. J., & Gescher, A. (2000). Characterization of Potentially Chemopreventive Phenols in Extracts of Brown Rice That Inhibit the Growth of Human Breast and Colon Cancer Cells. *Cancer Epidemiology and Biomarker Prevention*, 9, 1163-1170.
- [0096] Jayaprakasha, G. K., Kandadi, K. K., Poulouse, S. M., Jadegou, Y., Gowda, G. A. N., & Patil, B. S. (2008). Novel triterpenoid from *Citrus aurantium* L. possesses chemo preventive properties against human colon cancer cells. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 16, 5939-5951.
- [0097] Kang, S. A., Park, H. J., Kim, M.J., Lee, S. Y., Han, S. W., & Leem, K. H. (2005). *Citri Reticulatae Viride Pericarpium* extract induced apoptosis in SNU-C4, human colon cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 231-235.
- [0098] Kemp, M. Q., Jeffry, B. D., & Romagnolo, D. F. (2003). Conjugated acid inhibits cell proliferation through a p53- dependent mechanism: effects on the expression of G1- restriction points in breast and colon cancer cells. *Journal of Nutrition*, 133, 3670-3677.
- [0099] Lapcik, O., Klejdus, B., Kokoska, L., Davidova, M., Afandi, K., Kuban, V., et al. (2005). Identification of isoflavones in *Acacia sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 983-992.

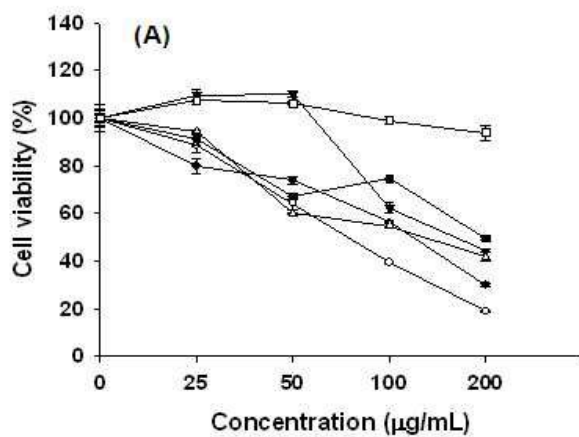
- [0100] Leardkamolkarn, V., Tiemyuyen, S., & Sripanidkulchai, B. (2009). Pharmacological Activity of *Kaempferia parviflora* Extract against Human Bile Duct Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer and Prevention*, 10, 695-698.
- [0101] Lee, J. S., Kim, H. S., Halm, K. B., Sohn, M. W., Yoo, M., Johnson, J. A., et al. (2008). Inhibitory Effects of 7-Carboxymethoxy-3',4',5'-Trimethoxy Flavone (DA-6034) on *Helicobacter pylori*-Induced NF- κ B Activation and iNOS Expression in AGS Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 180-191.
- [0102] Lee, K. W., Lee, H. J., Surh, Y. J., & Lee, C. Y. (2003). Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 1074-1078.
- [0103] Li, J., Guo, W. J., & Yang, Q. Y. (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, 8, 493-495.
- [0104] Li, S., Pan, M. H., Lo, C. Y., Tan, D., Wang, Y., Shahidi, F., et al. (2009). Chemistry and health effects of polymethoxy flavones and hydroxylated polymethoxy flavones. *Journal of Functional Foods*, 1, 2-12.
- [0105] Lim, H. K., Moon, J. Y., Kim, H., Cho, M., & Cho, K.S. (2009). Induction of apoptosis in U937 human leukaemia cells by the hexane fraction of an extract of immature *Citrus grandis* Osbeck fruits. *Food Chemistry*, 114, 1245-1250.
- [0106] Mertens-Talcott, S. U., Talcott, S. T., & Percival, S. S. (2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *Journal of Nutrition*, 133, 2669-2674.
- [0107] Miodini, P., Fioravanti, L., Fronzo, G. D., & Cappelletti, V. (1999). The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *British Journal of cancer*, 80, 1150-1155.
- [0108] Moon, J. Y., Kim, H., Cho, M., Chang, W.Y., Kim, C.T., & Cho, S.K. (2009). Induction of apoptosis in SNU-16 human gastric cancer cells by the chloroform fraction of an extract of Dangyuja (*Citrus grandis*) leaves. *Journal of Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 52, 168-175.
- [0109] Mueller-Klieser, W., Schreiber-Klais, S., Walenta, S., & Kreuter, M. H. (2002). Bioactivity of well-defined green tea extracts in multicellular tumor spheroids. *International Journal of Oncology*, 21, 1307-1315.
- [0110] Pino, J. A., Marbot, R., & Vazquez, C. (2001). Characterization of Volatiles in Strawberry Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5883-5887.
- [0111] Seeram, N. P., Adams, L. S., Hardy, M. L., & Heber, D. (2004). Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 2512-2517.
- [0112] Smith, T. K., Mithen, R., & Johnson, I. T. (2003). Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. *Carcinogenesis*, 24, 491-495.
- [0113] Verheij, E. W. M., & Coronel, R. E. (1991). Edible fruits and nuts. In: E.W.M. Verheij and R.E. Coronel (eds), *Plant Resources of South-East Asia*, vol. 2 (pp. 335-349), Indonesia: PROSEA Foundation Press.
- [0114] Wang, D., Wang, J., Huang, X., Tu, Y., & Ni, K. (2007). Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 44, 63-69.
- [0115] Wolter, F., Clausnitzer, A., Akoglu, B., & Stein, J. (2002). Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the S phase of the cell cycle in colorectal cell lines.

Journal of Nutrition, 132, 298-302.

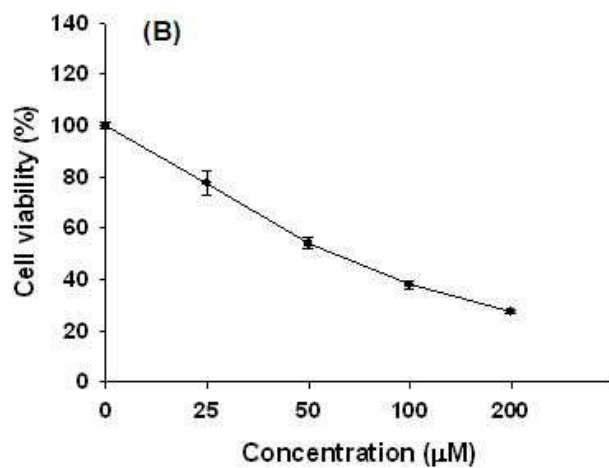
- [0116] Yan, J., & Xu, Y. H. (2003). Tributyrin inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. World J Gastroenterology, 9, 660-664.
- [0117] Yu, Z., Li, W., & Liu, F. (2001). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. Cancer Letters, 215, 159-166.
- [0118] Zhang, P., Li, H., Chen, D., Ni, J., Kang, Y., & Wang, S. (2007). Oleanolic Acid Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Caspase Activation and Poly (ADP-ribose) Polymerase Cleavage. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39, 803-809.
- [0119] Zhou, D.Y., Chen, D. L., Xu, Q., Xue, X. Y., Zhang, F. F., & Liang, X. M. (2007). Characterization of polymethoxylated flavones in Fructus aurantii by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization combined with tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 43, 1692-1699.

도면

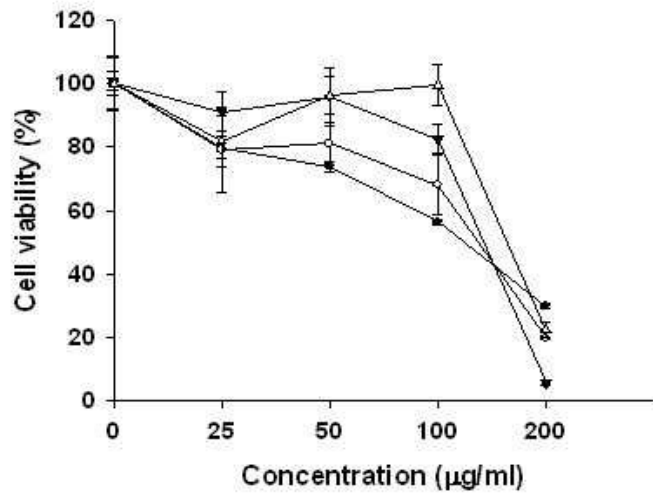
도면1a



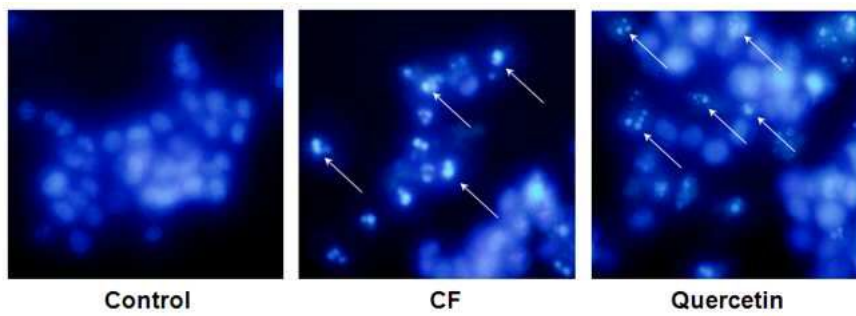
도면1b



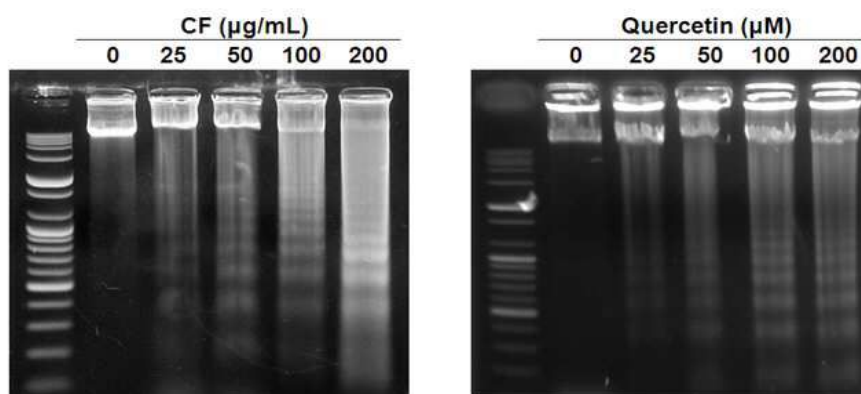
도면1c



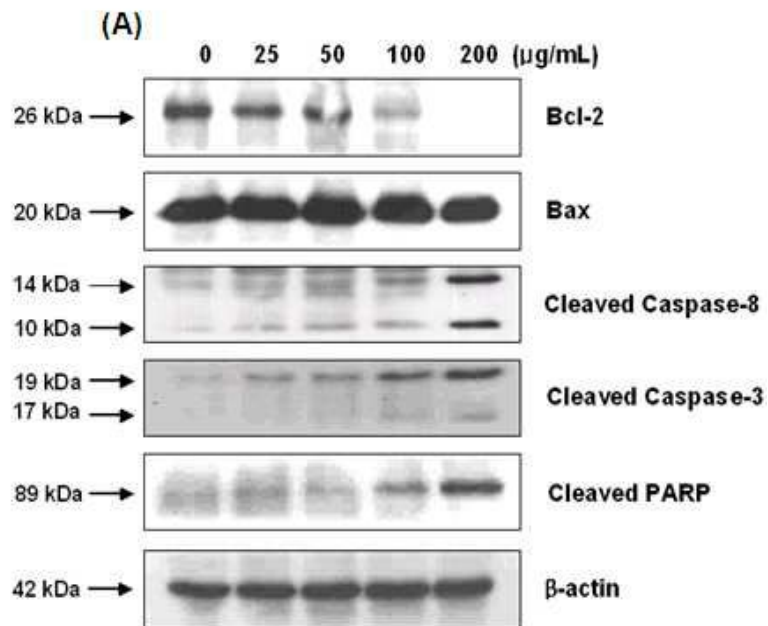
도면2a



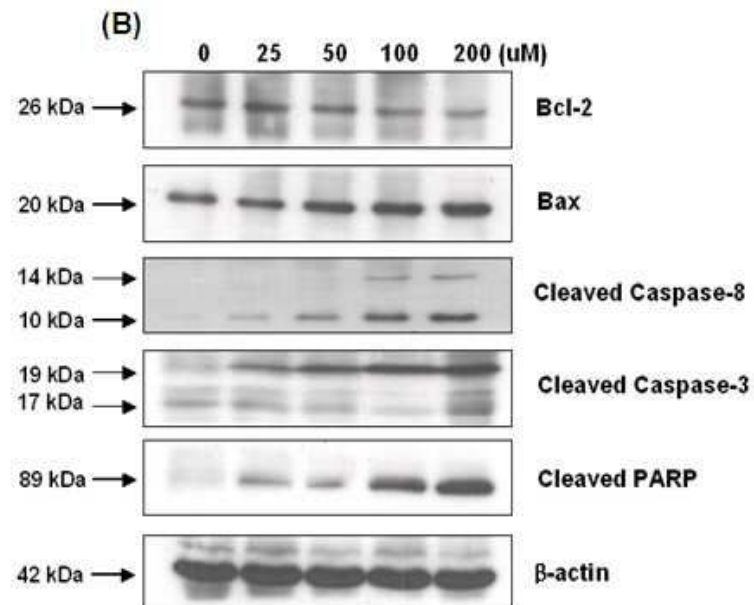
도면2b



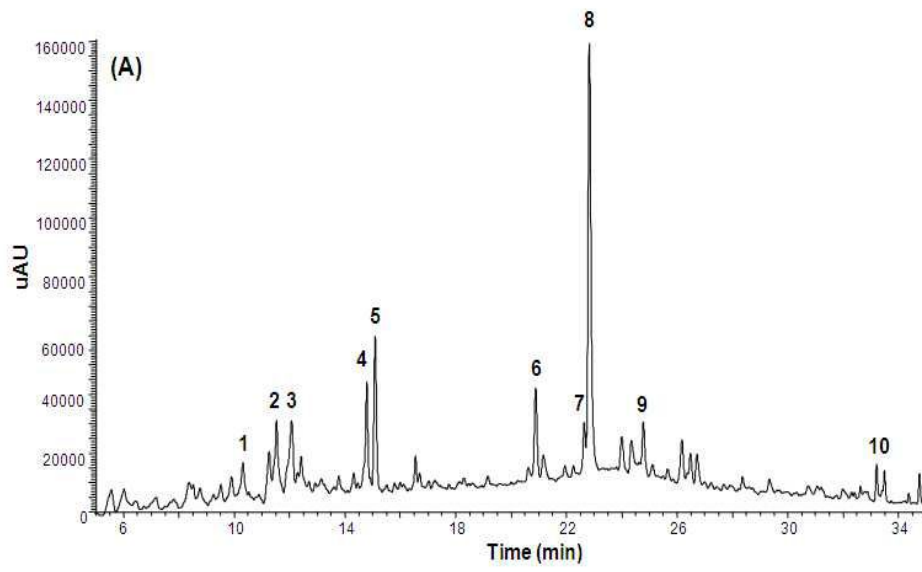
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

