



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0140129

(43) 공개일자 2015년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/23 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0068507

(22) 출원일자 2014년06월05일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김춘성

광주광역시 남구 서문대로678번길 7 대주1차아파트 101-1002

문성민

광주광역시 서구 풍암순환로 86 삼능남양아파트 102-1603

(74) 대리인

최석진

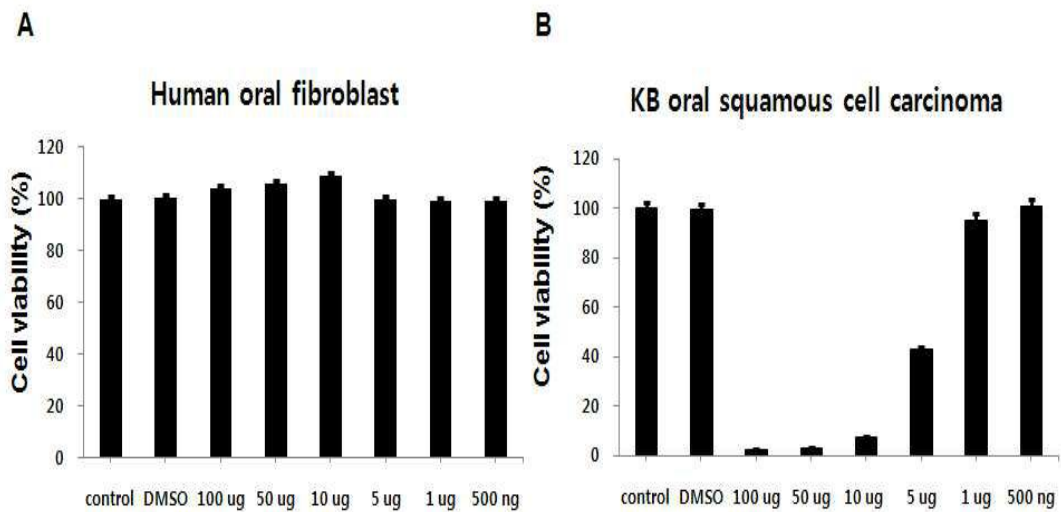
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성 조성물

(57) 요약

본 발명의 전호 메탄올 조성물이 구강암세포에 미치는 영향을 조사하고 성장 억제에 미치는 효과와 암세포 성장 억제 및 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 전호 메탄올 추출물을 구강암세포(KB 세포)에 처리한 후 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 LIVE-DEAD cell staining등을 수행하여 조사한 결과 본 발명의 조성물은 이용하여 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

전호 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전호 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 추출물의 1일당 투여량은 체중kg당 10 내지 2000mg/kg의 양으로 음용하는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 추출용매를 사용하여 추출한 전호 추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 6

제5항에 있어서, 분획물은 전체 조성물의 0.01 내지 99.9중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물의 1일당 투여량은 상기 분획물이 체중 kg당 1 내지 1000 mg/kg의 함량인 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 8

제4항 또는 제7항에 있어서, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화된 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 추출물은 구강암 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용되는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물

청구항 10

전호를 분쇄하여 가루로 제조하는 단계;

분쇄된 가루와 메탄올을 1: 1 중량비로 혼합하여 추출하는 단계;

추출된 추출물을 여과지로 여과하여 감압 농축하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물 추출방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암 활성효과가 탁월한 전호를 메탄올을 이용하여 추출한 조성물을 구강암 세포주에 적용시킴으로써 암세포의 성장을 억제시킬 수 있는 전호 추출물을 함유하는 항암 세포사멸 활성 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 우리나라 전역의 산이나 들에서 자생하는 산형과 (Umbelliferase)에 속하는 여러해살이풀로 어린잎은 식용으로 뿌리는 한방에서 약재로 사용되고 있다. 전호는 방추형으로 근두부에는 줄기와 엽초가 있고 길이는 3 - 10 cm, 지름 7 - 15 mm 바깥면은 흑갈색을 띠고 있으며, 위쪽에는 가로줄 및 뿌리자국이 있다. 껍질은 회백색이며 매끈하나 속이 엉성한 것도 있으며 특이한 방향이 있고, 맛은 쓰다.

[0003] 지금까지 전호의 성분으로는 디옥시포도필로톡신, 안젤로일 포도필로톡신, 이소안트라신, 포도필로톡신, 야테인과 같은 리그난 계열의 물질과 데커신, 노다케닌과 같은 쿠마린 계열의 물질들이 보고되어져 있다. 전호는 예로부터 기침, 천식 및 후두염의 치료제로 사용되어 지고 있다.

[0004] 전호에서 분리한 안젤로일 포도필로톡신은 일시적인 허혈에 유발되는 심근기능의 이상을 호전시키며, 최근에는 디옥시포도필로톡신을 처리하여 다양한 암세포주에서 세포사멸을 유도하거나 세포주기를 억제하여 암세포를 죽이는 것으로 알려지고 있다.

[0005] 구강암은 입안의 혀, 밑바닥, 볼점막, 잇몸, 입천장, 입술, 위아래 턱뼈 등에 발생하며 이를 총칭하여 구강암이라고 한다. 구강암의 종류로는 편평 상피세포암종(squamous epidermal carcinoma)이 87%로 가장 흔하고 그 밖에 침샘에서 발생하는 선양낭성암(adenoid cystic carcinoma), 점액표피양암(mucoepidermoid carcinoma), 선암 등이 있다.

[0006] 구강암의 원인 인자로는 흡연, 음주, 만성적 자극, Human Papilloma Virus(HPV) 감염 등이 있으며, 음주와 흡연을 함께할 경우에는 정상에 비해 1.5배 높은 구강암 발생률을 보이고 있다. 최근 발표된 중앙암 등록본부 자료에 의하면 2009년 우리나라에서는 연 192,561건의 암이 발생되었는데, 그 중 구강암은 남녀를 합쳐서 연 1,401건으로 전체 암 발생의 0.7%를 차지하였고 남녀의 성비는 1.8 : 1로 남자에게서 더 많이 발생했다고 보고하였다.

[0007] 구강암은 다른 부위의 암과는 달리 대부분 육안으로 판별이 가능하며 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이하며 화학방사선요법 혹은 유전자 치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고 구강암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 되어있지 않은 암 중의 하나로 알려져 있다. 현재까지 구강암 치료는 방사선요법과 5-FU(fluorouracil), cisplatin, bleomycin등의 항암제를 병행하여 치료하고 있으나 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하 등 과 같은 심각한 부작용이 나타나고 있다.

[0008] 구강암의 90% 이상이 상피세포 암이며, 발생기전은 신체의 다른 부위에서 발생되는 상피세포암과 유사하나 정확하게 암 발생기전이 알려져 있지 않다. 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 하며 과거에는 수술이나 방사선과 같은 국소요법이 치료의 근간을 이루어왔다. 현재에는 암 치료에 있어 수술 및 방사선을 이용하여 치료함과 동시에 항암제를 투여하여 치료하는 복합 치료요법이 개발되었다. 또한 면역요법의 개발이 한창이어서

interferon, interleukin 등이 출현하고 있으나 비용도 비싸고 결과도 만족할 만한 정도는 못되어 구강암에는 이용되지 못하고 있다.

- [0009] 진핵세포에서 세포사멸은 일반적으로 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램으로 비정상세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 체계적인 분자 신호전달 체계에 의해 세포가 스스로 자살해 사멸하거나 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음으로 세포의 사고사 또는 돌연사에 의해 세포 밖에서 수분이 유입됨으로써 세포가 팽창하여 죽은 세포괴사의 두 형태로 구별된다.
- [0010] 세포사멸은 세포치사를 억제하는 단백질 또는 반대로 세포치사를 유도하는 단백질들의 활성의 변화에 의해 일어나며 이러한 단백질들의 변화에 있어서 기본적으로 알려져 있는 것이 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptosis에 관련된 단백질과 caspase계 단백질이 존재한다.
- [0011] 세포사멸의 외형적 형태로는 초기 염색사의 응축과 더불어 건강한 세포의 경우 세포막 안쪽으로 노출되는 phosphatidylserine 막지질이 세포막 바깥쪽으로 노출되며 annexin-V나 live-dye와 같은 염색약을 세포에 직접 처리하여 살아있는 세포를 확인하거나 PI을 염색하여 죽은 세포를 확인 할 수 있다. 또한 정상세포에서는 chromosomal DNA는 분해되지 않는 단일한 형태를 띠는 반면 세포치사가 된 세포에서는 chromosomal DNA가 잘려지기 때문에 세포의 genomic DNA를 분리하여 아가로스겔에서 전기영동을 수행함으로써 세포치사 여부를 확인할 수 있다.
- [0012] 최근에는 지금까지 이용되고 있는 화학요법의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 진통, 이뇨 강장, 거담, 해열 또는 항염 효과가 있다고 알려진 약용식물의 성분을 추출, 정제하여 구강암 세포주에 처리하여 항암 활성 효과를 확인하는 연구들이 활발히 진행중이며, 기존의 화학요법에 사용되어왔던 항암제와 함께 이러한 약용식물을 병용하여 항암활성 효과 증강 및 부작용 억제효과들이 보고되고 있다.
- [0013] 또한, 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 자국의 약용작물 보호와 맞물려 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다.
- [0014] 최근 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며, 또한 생리활성 물질뿐만 아니라 다양한 암의 치료를 위한 항암 물질의 원료로도 이용되고 있을 만큼 응용 분야도 다양하다.
- [0015] 이와 같이, 우리나라 자생식물들과 각종 약용식물에 대한 효능 연구가 활발히 진행되어 지고 있으나 그 수준이 기초적인 효능연구에 집중되는 실정이기 때문에 정확한 기전 연구를 바탕으로 한 임상 적용 및 시장 유통이 될 수 있는 산업적 적용이 가능한 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 국내 공개특허공보 제10-2001-0061118호에는 겨우살이로부터 분리 정제한 렉틴과 증류수로 추출한 수추출물 및 상기의 렉틴과 수추출물을 혼합한 조성물은 신생혈관 억제활성이 있어 암의 전이억제에 뛰어난 효과가 있고, 아포토시스 유도활성, 텔로메라제 억제활성, 항암활성이 뛰어나며, 국소적으로 환부투여가 가능한 피부, 구강암, 인두암 등의 치료에 효과적이고, 특히 겨우살이로부터 분리·정제한 렉틴과 수추출물을 혼합하여 제조한 렉틴으로 강화된 겨우살이 추출물을 유효성분으로 하는 항암제용 조성물에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0002) 국내 공개특허공보 제10-2008-0061796호에는 해양 미생물 농늑균 속 균주 추출물을 함유하여 두경부암, 구강암, 후두암, 대장암, 위암에 아포토시스 또는 피사를 통하여 다양한 세포주에서 항암효과가 있어 암의 증식과 침습을 억제하고 성장인자에 의한 효과를 억제하며 세포사멸을 유도하여 항후 함암 후보물질로 사용할 수 있는 해양 미생물 추출물을 포함하는 항암 조성물에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0003) 국내 공개특허공보 제10-2008-0067990호에는 암세포내의 캐스파아제 3/7을 활성화시켜 세포핵내의 염색체 DNA를 절단하여 세포의 아포토시스를 유도하여 암세포를 사멸시키는 특징을 갖는 바디나물 추출물을 추성분으로 포함하는 항암제 조성물에 관하여 개시되어 있다.
- (특허문헌 0004) 국내 공개특허공보 제10-2008-0120625호에는 느티나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 항암조성물로 암세포사멸(apoptosis)을 유도하여 각종 구강암, 간암, 위암, 또는 자궁암의 예방 및 치료의 목적으로 사

용가능한 느티나무 메탄올 추출물을 포함하는 항암 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0005) 그러나 이와 같은 선행기술은 항암 활성효과 탁월한 전호를 메탄올을 이용하여 추출한 후 구강암 세포주에 처리하여 암세포의 세포치사를 유도하는 caspase계 단백질을 활성화하여 apoptoses를 발생하여 암세포 사멸 및 성장을 억제할 수 있는 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성 조성물은 개시되지 않아 차이를 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명의 전호 메탄올 추출물이 구강암세포에 미치는 영향을 조사하고 성장 억제에 미치는 효과와 암세포 성장 억제 및 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 전호 메탄올 추출물을 구강암세포(KB 세포)에 처리한 후 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 LIVE-DEAD cell staining등을 수행하여 조사하였다.

과제의 해결 수단

- [0018] 본원발명은 전호 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다. 전호 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하며, 추출용매를 사용하여 추출한 전호 추출물에 비극성용매로서 헥산, 클로로포름, 디클로메탄 및 에틸아세테이트 중 어느 하나를 분획용매로 사용하여 분획한 것일 수 있다.
- [0019] 상기 조성물 및 분획물은 0.01 내지 99.9 중량%의 양으로 포함되며, 상기 추출물의 1일당 투여량은 체중kg당 10 내지 2000mg/kg의 양으로 음용하는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용액으로 제형화된 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 전호를 분쇄하여 가루로 제조하는 단계; 분쇄된 가루와 메탄올을 1: 1 중량비로 혼합하여 추출하는 단계; 추출된 추출물을 여과지로 여과하여 감압 농축하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 구강암 예방 및 치료용 약학 조성물 추출방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 전호 메탄올 추출물을 이용하여 KB세포에서 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인한 결과 본 발명의 조성물은 이용하여 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리할 수 있는 효과가 있다.
- [0023] 또한, KB 세포에 본 발명의 전호 메탄올 추출물을 처리하게 되면 미토콘드리아 caspase family 의존성 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 통해 구강암세포의 성장을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 효과적인 천연 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 전호 메탄올 추출물이 정상 세포주인 human oral fibroblast와 KB세포의 생존능력에 미치는 효과에 관한 막대그래프를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 전호 메탄올 추출물의 처리에 의한 KB세포 genomic DNA의 분절화를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 전호 메탄올 추출물을 처리한 KB세포내에서 관련 단백질과 caspase 의존 단백질에 의한 세포사멸의 발현수준을 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포의 Live-dead cell staining을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명에서는 자생식물 전호를 메탄올을 이용하여 추출한 추출물을 이용하여 caspase계 단백질을 활성화시켜 미토콘드리아 의존성 기작에 의한 구강암 세포사멸로 세포성장을 억제시킬 수 있는 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성조성물이 제공된다.
- [0026] 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성 조성물의 추출방법은 전호를 증류수로 수세한 다음 메탄올을 이용하여 추출하는 단계; 상기추출물을 동결건조 하는 단계; 상기 단계의 추출물을 Dimethyl sulfoxide에 녹인 후 세포배양액에 희석하는 단계를 포함하는 추출방법이 제공된다.
- [0027] 이하 첨부된 도면을 참조하여 하기에서 상기 방법을 통한 조성물의 항암 활성효과를 검증하기 위해서 실시예를 상세히 설명한다. 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 상기와 같은 방법으로 전호 추출물을 함유하는 항암세포 활성 조성물을 제조하고, 제조된 조성물이 구강암세포에 끼치는 효과를 검증하기 위해서 구강암세포의 배양실험을 실시하고 상기 조성물을 처리하였다.
- [0028] 분석실험으로는 항암 활성효과 MTT기법과 세포성장 억제 농도인 IC(Inhibitory Concentration)₅₀를 확인하여 세포 성장억제를 확인하고, 구강암세포 성장의 억제가 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위해서 DNA 분절화 실험을 실시하였다.
- [0029] **I. 전호추출물을 함유하는 항암세포 활성 조성물의 효과검증을 위한 재료 및 방법**
- [0030] 본 발명의 목적을 달성하기 위해 사용된 전호 추출물을 함유하는 항암세포 사멸 활성 조성물이 구강암세포에 끼치는 효과를 검증하는 실험과 분석방법은 다음과 같다.
- [0031] **1. 실험재료**
- [0032] 전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)를 영농조합법인 한약사랑에서 구입하여 메탄올을 이용하여 추출 후 동결건조 시킨 것을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Calbiochem, USA)에 녹인 후 세포 배양액에 희석하여 사용하였다. anti-cleaved caspase-3,-7,-9, cleaved PARP, Bax, Bcl-2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)과 actin(Santa cruz Biotechnology, Inc)을 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.
- [0033] **2. 전호 추출물의 제조**
- [0034] 전호 10 kg을 분쇄하여 가루로 만든 후 10 L의 메탄올을 첨가하여 추출하였다. 추출을 2회 반복 실시한 후 추출물을 여과지로 여과하여 감압 농축하여 50 g의 추출물을 얻어 사용하였다.
- [0035] **3. 세포 배양**
- [0036] Human oral fibroblast와 구강암세포(KB, ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 μ g/ml penicillin, 100 Unit streptomycin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.
- [0037] **4. MTT assay**
- [0038] 전호 추출물에 대한 KB세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well culture plate에 3×10^5 cells/well 세포를 seeding 하고 12시간 후에 전호 추출물(500 μ g/ml, 1 mg/ml, μ g, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml)을 1 μ l 처리하였고, 대조군으로 DMSO 1 μ l를 처리하였다. 전호 추출물을 처리한 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 450 μ l의 DMEM 배양액과 50 μ l의 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2(MTT)용액을 첨가하였다. MTT용액이 첨가된 12 well plate을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 DMSO 500 μ l를 첨

가하여 녹인 후 96 well culture plate에 100 μ l를 분주 후 Microplate Autoreader ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

5. DNA fragmentation assay

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 3×10^5 KB 세포를 12 well plate에 배양 후 전호 추출물(5 mg/ml)을 1 μ l 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 한 후 500 μ l의 lysis buffer로 용해시켜 37°C incubator에 2 시간 동안 반응시킨 후 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution을 넣고 -20°C 에서 1시간 동안 보관한 뒤 12,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리 하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel을 이용하여 150 voltage에서 30분 전기영동하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

6. Western blot analysis

3×10^5 KB 세포를 12 well plate 에 배양 후 전호 추출물(5 mg/ml)을 1 μ l 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 세포를 수집한 후 phosphate buffer saline (PBS)로 두 번 세척하고, protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 50 μ g 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 loading 한 후 120 voltage에서 2 시간 동안 전기영동 하였다. Gel 상에서 분리 된 단백질은 western blot analysis를 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 transfer 한 후, blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체 anti-cleaved caspase-3,-7,-9, cleaved PARP, Bax, Bcl-2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin (Santa cruz Biotechnology, Inc)을 TBST(TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:1000 비율로 희석한 후 4°C 조건하에 16시간 동안 반응하였다. TBST를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)는 TBST를 이용하여 1:5,000 비율로 희석하여 1시간 반응 후 ECL kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 western blot analysis를 수행하였다.

7. Live-Dead cell staining

LIVE-DEAD cell staining kit(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있으며 LIVE-DEAD cell staining kit는 1 mM live-dye 와 2.5 mg/ml propidium iodide(PI)로 구성되어 있다. live-dye는 막 투과성이며 모든 세포막을 통과하여 핵산에 염색되어 녹색 형광을 나타낸다. 반면 PI는 막비투과성이며 세포막이 손상된 세포의 핵산에 염색되고 붉은색 형광을 나타낸다. live-dye와 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세포에 live-dye에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세포는 PI에 의해서 붉은색으로 염색된다. 따라서 본 실험에서는 live-dye와 PI을 동시에 KB 구강암 세포에 처리하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검증

모든 실험성적은 mean $\pm$ standard error of the mean으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 ANOVA 후에 standard t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(*, p<0.05)과 0.01 미만(**, p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

II. 전호 추출물을 함유하는 항암세포 활성 조성물이 구강암 세포에 미치는 효과

도 1은 본 발명의 전호의 메탄올 추출물이 정상 세포주인 human oral fibroblast와 KB세포의 성장능력에 미치는 효과에 관한 막대그래프를 나타낸다. 정상세포주인 human oral fibroblast와 KB세포에 전호의 메탄올 추출물에

의한 IC_{50} 및 세포성장 억제 효과를 조사하기 위해 추출물을 다양한 농도(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mg/mL , 5 mg/mL , 10 mg/mL , 50 mg/mL , 100 mg/mL)별로 1 μL 처리하여 24시간 후 MTT assay를 수행하였다. 세포 성장능력은 MTT assay 분석기법에 의해 결정된다. 세포성장능력의 퍼센트는 A570 nm의 비율로 계산된다. 각 데이터 포인트는 세 가지 독립적인 실험군의 평균 $\pm$ SD를 나타낸다.

[0049] 상기 실험의 결과로 도1에 도시된 그래프 A에서 정상세포주인 human oral fibroblast에서는 변화가 없었으며 이러한 결과는 전호 추출물이 정상세포에서는 세포독성이 없는 것으로 사료된다.

[0050] 반면 도 1에 도시된 표 B에서 KB 세포에서는 전호 추출물을 처리 후 24 시간 뒤 5 mg/mL 농도에서 1 μL 를 처리한 well에서 약 50% 정도 세포성장이 감소함을 확인할 수 있고 이러한 결과를 가지고 전호추출물의 IC_{50} 값이 5 μg 임을 확인할 수 있으며, 대조군으로 사용한 DMSO 대조군에서는 세포성장에 영향이 없는 것으로 사료된다.

[0051] 상기 연구결과는 국내에 자생하는 여러 가지 식물의 추출물보다 전호 메탄올 추출물이 더욱 빠르게 세포성장을 억제하는데 효과적인 것으로 사료된다.

[0052] 도 2는 본 발명의 전호 메탄올 추출물의 처리에 의한 KB세포 genomic DNA의 분절화를 나타낸다. 전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포의 증식억제가 apoptosis에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 KB세포 3×10^5 를 배양하고 전호 추출물 5 μg 를 처리하여 24 시간 동안 배양 후 세포를 수집하여 DNA 분절이 나타남을 확인하였다. Genomic DNA는 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동된다. 이러한 결과는 세포성장 억제가 세포사멸에 의한 기작을 통해 나타남으로 사료된다.

[0053] 상기 DNA분절을 확인함으로써 전호 메탄올 추출물의 KB세포에 대한 성장억제 효과가 세포사멸에 의한 것인지 알 수 있다. DNA분절 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화 되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어 nucleosomal DNA분절을 이루게 되고 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰할 수 있다.

[0054] 전호 메탄올 추출물을 KB세포에 5 μg 처리시 뚜렷한 DNA ladder를 관찰할 수 있었고 대조군으로 사용된 DMSO처리시 어떠한 분절화 현상도 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 전호 메탄올 추출물의 KB성장억제가 전형적인 apoptosis의 세포사멸에 의한 결과임으로 사료될 수 있다.

[0055] 도 3은 본 발명의 전호 메탄올 추출물을 처리한 KB세포 내에서 관련 단백질과 caspase 의존 단백질에 의한 세포사멸의 발현수준을 나타낸다. 3×10^5 KB세포를 배양한 후 24시간 동안 전호 메탄올 추출물 5 μg 처리시킨다. 전호 메탄올 추출물이 KB세포의 성장억제를 일으키는 기전임을 확인하기 위해 anti-apoptotic factor로 잘 알려진 Bcl-2와 pro-apoptotic factor로 알려진 Bax의 변화를 확인하고 또한 세포사멸에 가장 중요한 인자로 알려져 있는 caspase의 활성화를 확인하였다.

[0056] Bax, Bcl-2, cleaved caspase -9, -7, -3와 cleaved PARP 수준은 western blot analysis(A)와 western blots의 정량적 데이터(B) 의해 결정된다. 모든 용해물은 12% SDS-PAGE에 분리된다. 단백질의 양은 대조군 actin 수준에 의해 정상화된다. 상기 도면에 도시된 데이터는 세 가지 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로서 보고된다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 은 실험자의 t-test에 결정된 것으로서 조절된 것과 비교할 수 있다.

[0057] 도 3에 도시된 A에서 세포 내 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 Bcl-2의 변화를 확인한 결과 추출물을 처리했을 때 Bax의 발현이 증가하였으나 Bcl-2의 발현 변화는 현저하게 감소함을 확인하였다. B에서는 내인성 세포사멸 유도에서 하방에서 활성화되어 신호를 전달하는 caspase-7, -9의 활성화 및 내인성과 외인성 세포사멸경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3 활성화도 확인하였다. 반면에 대조군으로 사용한 DMSO에서는 caspase-3, -7, -9 활성화가 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

[0058] 상기 실험은 도 2에 도시된 DNA 분절실험의 apoptosis의 분자적 기전을 확인하기 위해 실시되었고 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptotic 연계 단백질로 알려져 있는 Bax와 Bcl-2의 단백질 변화 및 caspase-3, -7, -9의 단백질 활성을 western blot analysis를 수행하여 확인한 결과, 전호 메탄올 추출물을 처리 하였을 때 pro-apoptotic인자로 알려져 있는 Bax의 단백질은 증가하였고 anti-apoptotic인자로 알려져 있는 Bcl-2의 발현은 현저하게 감소함을 확인하였다. 또한 미토콘드리아 의존성 caspase-9, -7, -3 의 단백질 활성이 나타남을 확인하

였다. 더욱이 미토콘드리아 의존성 caspase 기작에 의해 최종적으로 PARP가 절단되어 KB 세포 성장이 억제됨을 확인하였다. 위와 같은 결과를 토대로 전호 메탄올 추출물을 KB세포에 처리하면 apoptosis의 특징적 경로중 하나로 알려져 있는 미토콘드리아의 caspase family 의존성에 의해 세포성장 억제 및 세포사멸과정을 유도하는 것으로 사료된다.

[0059] 도 4는 본 발명의 전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포의 Live-dead cell staining을 나타낸다. KB세포에서 전호 메탄올 추출물이 세포사멸에 영향을 확인하기 위해 live-dye와 PI 염색을 통해 확인하였다. 생존세포들은 live-dye(녹색)으로 착색되고 죽은 세포들은 PI(적색)으로 착색된다.

[0060] LIVE-DEAD cell staining kit(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있다. LIVE-DEAD cell staining kit는 1mM live-dye와 2.5 mg/ml propidium iodide(PI)로 구성되어 있다. live-dye는 막 투과성이며 모든 세포막을 통과하여 핵산에 염색되어 녹색 형광을 나타낸다. 반면 PI는 막비투과성이며 세포막이 손상된 세포의 핵산에 염색되고 붉은색 형광을 나타낸다. live-dye와 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세포에 live-dye에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세포는 PI에 의해서 붉은색으로 염색된다.

[0061] 도 4에서 KB 세포에 전호 메탄올 추출물 5 μ g을 24 시간 처리하여 배양한 후 염색을 통해 확인한 결과 메탄올 추출물에서 죽은 세포의 염색이 많이 됨을 확인할 수 있다.

[0062] III. 전호 추출물이 처리된 구강암세포 분석실험 결과

[0063] 본 발명의 KB 세포를 이용하여 전호 메탄올 추출물이 구강암세포 성장 억제에 미치는 효과와 암세포 성장억제 및 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 LIVE-DEAD cell staining등을 수행 한 결과 전호 메탄올 추출물은 5 μ g에서 KB세포의 성장을 50% 억제시켰으며 정상세포에서는 변화가 없음을 확인 할 수 있었다

[0064] 전호 메탄올 추출물은 KB세포의 핵에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였으며, live-dye와 PI와 같은 염색약을 처리하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 차이를 확인할 수 있었으며, KB세포 내 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 Bcl-2의 발현이 변화하며 또한 caspase-3, 7, 9의 활성화를 유도하고 PARP의 절단에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의존성 caspase 신호전달과정에 의한 분자적 기전이 일어남을 확인하였다.

[0065] 상기 결과를 토대로 전호 메탄올 추출물을 이용하여 KB세포에서 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인하였고, 더 나아가 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리하고 동물실험을 이용하여 기존에 알려져 있는 구강암 치료제보다 나은 새로운 천연 항암제 개발에 대한 기초 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

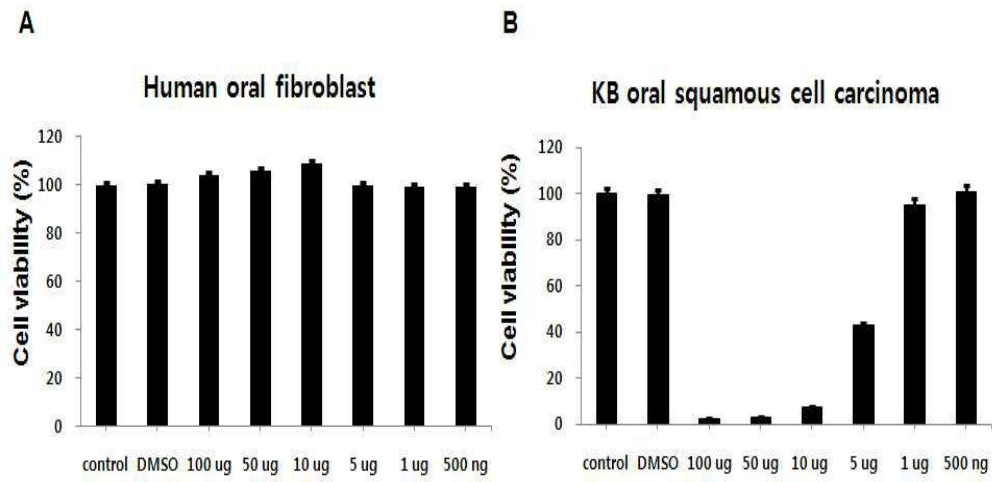
[0066] 또한, KB 세포에 전호 메탄올 추출물을 처리하게 되면 미토콘드리아 caspase family 의존성 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 통해 구강암세포의 성장을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 효과적인 천연 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

산업상 이용가능성

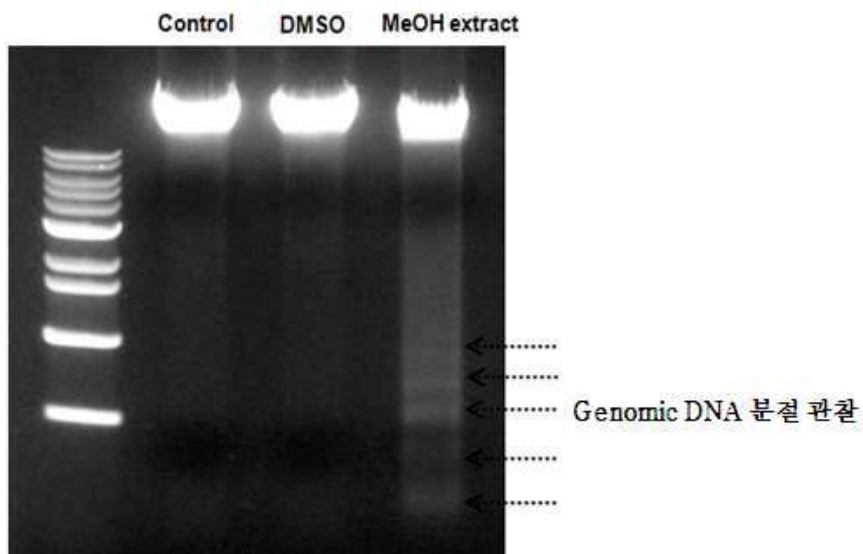
[0067] 전호 메탄올 추출물은 미토콘드리아 caspase family 의존성 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 통해 구강암세포의 성장을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 효과적인 천연 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 이용할 수 있는 효과가 있어 이를 항암제등으로 개발할 수 있는 산업상 이용가능성이 있다.

도면

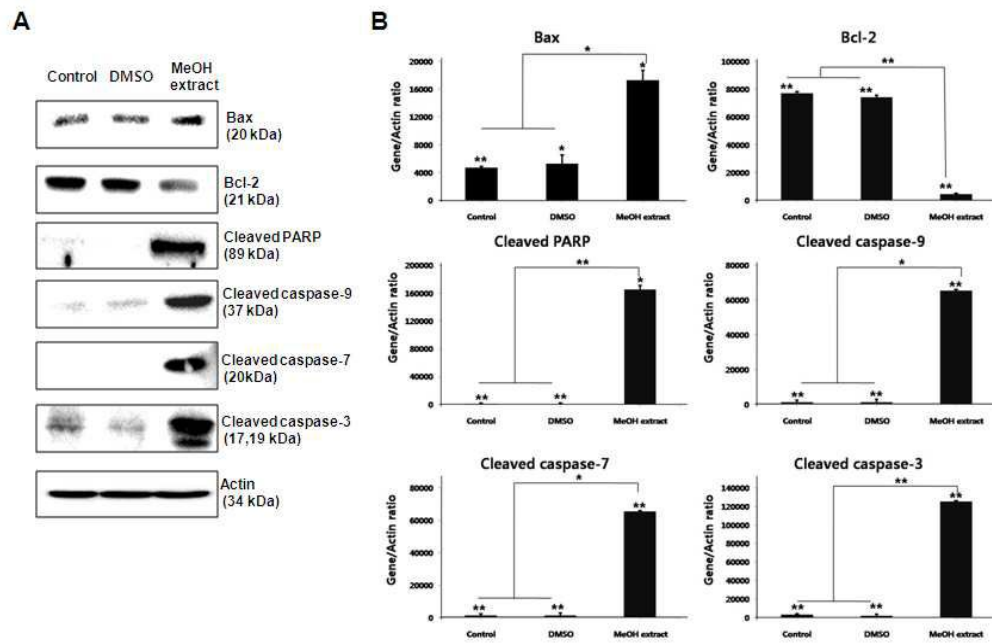
도면1



도면2



도면3



도면4

