



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0071061
(43) 공개일자 2009년07월01일

(51) Int. Cl.

A61K 36/05 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0139257

(22) 출원일자 2007년12월27일

심사청구일자 2007년12월27일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김수현

제주 제주시 아라2동 1138번지 프로빌아파트
103-201

전유진

제주 제주시 아라2동 1138번지 프로빌아파트
105-101

(74) 대리인

김일성

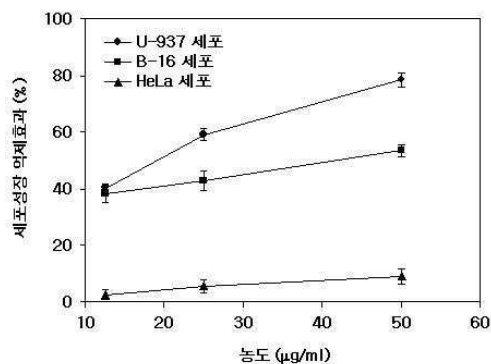
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 제주산 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는셀루클라스트 소화물

(57) 요약

본 발명은 제주산 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀루클라스트(Celluclast) 소화물에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 천연물질인 해조류 중 제주산 녹조류인 청각(*Codium fragile*)을 당분해 효소인 셀루클라스트(celluclast)를 이용하여 청각을 가수분해시켜 청각의 셀루클라스트 소화물(digests)을 제조하는 것으로, 청각의 셀루클라스트 소화물은 항암 효능 및 U-937 혈액암 세포의 세포자사멸(apoptosis) 유도효능을 나타내므로, 암 관련 질환에 유용한 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있는 제주산 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀루클라스트(Celluclast) 소화물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

제주산 청각(*Codium fragile*)에 당분해 효소인 셀룰라스트를 작용시켜 가수분해함으로써 얻어진 청각 셀룰라스트 소화물이 항암 활성의 효능을 가진 것을 특징으로 하는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 제주산 청각 셀룰라스트 소화물이 혈액암세포인 U-937에 세포자멸사(apoptosis) 유도 효능을 가진 것을 특징으로 하는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 제주산 청각 셀룰라스트 소화물에서 분리해 낸 조당 성분이 혈액암세포인 U-937를 억제하는 효능을 가진 것을 특징으로 하는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물

청구항 4

제 1항에 있어서, 제주산 청각 셀룰라스트 소화물은, 의약적 약품, 기능성 식품소재 또는 건강식품으로 이용 가능한 것을 특징으로 하는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 제주산 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물 에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 천연물질인 해조류 중 제주산 녹조류인 청각(*Codium fragile*)을 이용하여 효소적 소화작용으로부터 청각 소화물을 제조하는 것으로, 제조된 청각 셀룰라스트 소화물은 3종류 암세포에 대한 항암 효능 및 U-937 혈액암 세포의 세포자사멸(apoptosis) 유도효능을 나타내므로, 암 관련 질환에 유용한 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있는 제주산 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물 에 관한 것이다.

<7> 최근 암 발생률은 산업의 급격한 발달, 지구 생태계 및 식생활의 변화 등으로 과거에 비해 급격히 증가하고 있으나, 아직도 암의 발생기전이 불명확하여 난치성 질병으로 알려져 있다. 현재 사용되고 있는 항암제들은 효소 제제나 백신 등의 생물학적 제제, 순수합성 의약품 및 천연물 유래의 의약품 등으로 크게 구분할 수 있는데, 이중 유전자, 효소, 백신 등을 이용한 항암제는 실용단계에 있는 상태는 아니며 화학요법에 의해 개발된 많은 항암제는 암의 종류에 따라 약리작용이 다양하고(Gillman et al., The pharmacological Basis of therapeutics, Maxwell Macmillan., 18, p1202, 1986), 독성에 의한 부작용이 다양하게 나타났기 때문에 암 치료시 문제점으로 지적되고 있다(Chung et al., J. Wonkwang Medical Sci., 3, pp13-34, 1987). 또한 항암제는 암세포의 성장을 효과적으로 억제하기도 하지만, 때로는 정상 세포에 대해서 독성을 나타내기도 한다. 따라서 많은 학자들은 이 같은 독성의 작용기전을 밝히기 위하여 많은 연구를 수행하고 있으며(Yamazaki et al., Biosci, Biotech Biochem., 56(1), p149, 1992 ; Tompson et al., Exp. Cell Res., 41, pp411-427, 1966 ; Ellem et al., Devel. Biol., 118, pp311-330, 1968), 근래에는 세포 배양 기술이 급격히 발달함에 따라 각종 세포를 배양한 후, 여러 독성물질을 투여함으로써 이들의 세포독성에 대한 기전을 세포 수준에서 규명하려는 연구도 활발히 진행되고 있으며, 항암제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여 생약 및 천연물을 이용한 항암제의 개발이 지속적으로 시도되고 있다.

<8> 정상적인 세포는 세포분열에 의하여 세포증식이 이루어지고 일정기간동안 자신에게 주어진 기능을 수행한 후 세포사 (cell death)(Trump et al., Toxicol. Pathol., 25(1), pp1097-1098, 1997)를 일으키는데 이러한 세포

사에는 아폽토시스 (Apoptosis, 세포자사멸)와 네크로시스(Necrosis, 괴사)의 2가지 형태가 존재하게 된다. 아폽토시스는 프로그램화된 세포사(programmed cell death)로 요약되는 세포의 자살이며 능동적 세포사로서 세포는 생길 때부터 기능과 생존기간이 정해지고, 이 기간 동안 기능을 수행하고 계획된 시기에 세포사를 일으킨다. 네크로시스는 외상, 영양소결핍 등에 의해 일어나는 수동적 세포사이며 세포의 타살을 의미한다. 아폽토시스는 불필요해진 세포 또는 원하지 않는 세포를 제거하는 정상적인 생리 과정으로 제어기구에 의해 프로그램된 능동적 과정이라고 할 수 있다. 그리고 네크로시스와는 형태학적, 생화학적으로 많은 차이점을 나타낸다. 아폽토시스의 형태학적 특징으로는 세포 수축(cell shrinking), 수포 형성(membraneblebbing), 아폽토시스 바디(apoptotic body) 형성, 핵 응축(nuclear condensation) 및 단편화(fragmentation) 등이 있으며, 아폽토시스 세포의 제거 과정으로 인하여 많은 염증반응을 동반하는 네크로시스와는 달리 염증반응은 나타나지 않는다(Wyllie, A. H., Int. Rev. Cytol., 68, pp251-603, 1980). 생화학적 특징으로는 GTPase 등의 엔도뉴클레아제(endonuclease), 카스페이즈(Caspase)와 같은 프로테아제(protease)의 활성화가 나타난다(Hale, A. J. et al., Eur. J. Biochem., 236, pp1-26, 1996 ; Arends, M. J. et al., American J. Pathology, 136, pp1769-1771, 1990). 아폽토시스는 네크로시스와는 달리 ATP형태의 에너지를 필요로 하며, 신호전달기전에서의 단계가 요구되는 에너지 의존형 능동적 과정이다. 한편, 네크로시스(Necrosis, "accidental" cell death)는 아폽토시스와는 다르게 영양소결핍, 독성이 있는 화학물질에 노출, 기계적인 충격 같은 상황에서 유발되는 수동적 세포사라고 할 수 있다. 네크로시스 발생 시에는 세포내로 세포밖의 이온(extracellular ion)과 수분이 유입되어 세포의 주요한 항상성(homeostasis)을 깨트려 세포의 능력을 손상시킨다. 또, 세포의 플라스마 막(plasma membrane)이 붕괴되어 세포질이 포함하고 있는 라이소솜의 효소(lysosomal enzyme)가 세포외부의 조직으로 분비된다. 그 결과 네크로시스가 일어난 세포의 외부의 조직은 극심한 염증반응을 받게된다(Luster, M. L., Environ. Health Perspect, 106(9), pp418-419, 1998).

<9> 본 발명의 청각(*Codium fragile*)은 청각목 청각과의 바닷말로, 높이는 10~30cm, 굵기는 1.5~3 mm 이고, 아래 쪽이 좀 더 굵은 편이다. 가지는 사슴 뿔 모양으로 갈라져 곧게 자라며, 모두 같은 높이에 달하여 부채꼴 모양을 이룬다. 수심 1~20 m의 깊은 곳 중에서도 파도의 영향을 적게 받는 곳에서 자라며 암석, 조개껍질 또는 다른 해조류 등에 붙어살고 온·난대 및 아열대 해역에 분포한다.

<10> 지금까지 해조류에 대한 연구가 많이 이루어졌지만 주로 영양적인 측면에서 수행되었다. 최근에 와서 해조류의 생체 기능성 효과에 대한 연구가 이루어지고 있는데 이중 갈조류의 성분인 푸코이단과 푸코잔틴이 항암활성이 높게 나타난다고 보고되고 있으며(Koyanagi, S. et al., Biochem. pharmacol. 65, pp 173-179, 2003 ; Hosokawa, M. et al., BBA-Gen. Subject 1675, pp 113-119, 2004), 홍조류의 카라기난 또한 항암활성을 나타낸다고 알려졌다(Zhou, G. et al., Pharmacol. Res. 51, pp153-157, 2005 ; Zhou, G. et al., Pharmacol. Res. 53, pp 129-134, 2006). 하지만 녹조류에 대한 항암활성 연구는 미흡한 실정이며 특히, 청각에 대한 항암효과에 관한 연구결과는 없는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<11> 따라서 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래의 기술을 개선시키기 위하여 안출한 것으로, 본 발명은 항암활성을 갖는 제주산 청각으로부터 당분해 효소인 셀룰라스트 소화물에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 제주 연안에 서식하고 녹조류의 한 종인 청각(*Codium fragile*)에 대하여 당분해 효소인 셀룰라스트를 이용하여 청각을 소화시켜 청각 셀룰라스트 소화물을 제조하고, 그의 셀룰라스트 소화물을 이용하여 3종류 암세포에 대한 항암활성과 U-937 혈액암 세포의 세포자사멸(apoptosis) 유도하여 혈액암 세포의 성장을 저해하는 효능을 나타내는 것으로, 암 관련 질환에 유용한 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

<12> 본 발명은 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 천연물질인 해조류 중 제주산 녹조류인 청각(*Codium fragile*)으로부터 당분해 효소인 셀룰라스트를 이용하여 청각 유래 셀룰라스트 소화물을 제조하는 것으로, 제조된 청각의 셀룰라스트 소화물은 3종류 암세포에 대한 항암 효능 및 U-937 혈액암 세포의 세포자사멸(apoptosis) 유도효능을 나타내므로, 암 관련 질환에 유용한 의약품 및 건강기능식품으로 이용될 수 있는 청각을 유효성분으로 항암활성을 가지는 셀룰라스트(Celluclast) 소화물에 관한 것이다.

<13> 본 발명의 구성을 실시예 및 실험예를 통해 설명하면 다음과 같다.

<14> [실시예 1] 재료의 채집 및 준비

<15> 시험에 사용한 재료는 제주 연안에 서식하고 있는 해조류 중 녹조류의 한 종인 청각(*Codium fragile*)을 채집하여 사용하였으며, 채집한 청각은 부착생물과 염분, 모래등을 제거한 후, 깨끗한 담수로 씻어 동결건조한 후, 50 메쉬 이하의 크기로 분말화하여 사용하였다.

<16> [실시예 2] 청각의 셀룰로라스트 소화물 제조방법

<17> 청각의 셀룰로라스트 소화물 제조는 허 등의 방법에 따라 수행하였다. 우선 동결건조된 시료 1g에 100ml의 버퍼용액을 첨가하고, 셀룰로라스트 10mg을 혼합하였다. 셀룰로라스트는 pH 4.5, 50℃의 조건에서 최적의 가수분해 조건을 나타내어 상기의 가수분해 조건 하에서 12시간 동안 가수분해를 수행하였다. 가수분해물은 가수분해되지 않은 잔사를 제거하기 위해 5,000g에서 20분간 원심분리 시켰다. 최종적으로 청각의 효소적 가수분해물은 필터링을 거친 후에 얻어졌고, 동결건조시켜 실험에 사용될 때까지 -20℃에서 보관하였다.

<18> 또한 셀룰로라스트 소화물은 2 배의 에탄올을 혼합하여 잘 섞어준 후, 침전된 침전물(당과 단백질 혼합물)을 얻은 후, 침전물은 물에 녹였다. 녹인 물은 암모늄 설페이트(ammonium sulfate)를 포화되도록 섞은 후, 단백질을 침전시켜 원심분리를 통하여 상층액(조당)을 분리하였다. 상층액은 투석을 통하여 암모늄 설페이트를 제거하고 동결건조를 통하여 조당을 분리하여 실험에 사용하였다.

<19> [실시예 3] 청각 셀룰로라스트 소화물의 성분분석

<20> 일반성분분석은 AOAC(1990)에 따라 수분은 상압 105℃ 가열건조법, 지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하고 탄수화물 정량은 Dubois 등(1956)의 phenol sulfuric acid 법으로 수행하였다. 당분석법은 AOAC (1990)의 방법을 이용한 페놀-황산법으로 수행하였다.

<21> [실험예 1] 세포배양

<22> 암세포는 혈액암 세포인 U-937(human promonocytic leukemia) 세포, 피부암 세포인 B-16(mouse melanoma) 세포, 자궁암 세포인 HeLa(woman cervical carcinoma) 세포 및 정상세포인 V79-4(Chinese hamster lung fibroblast) 세포의 5종을 한국 세포주 은행(KCLB)과 제주대학교 의과대학 현진원 교수님으로부터 분양 받아 100 units/ml의 페니실린-스트렙토마이신(penicillin streptomycin, GIBCO) 및 10% FBS(fetal bovine serum, GIBCO)가 함유된 RPMI 1640배지와 DMEM(GIBCO)를 사용하여, 37℃, 5% 이산화탄소 항온기에서 배양하였다. 계대 배양은 3일 내지 4일에 한 번씩 시행하였다.

<23> [실험예 2] 세포 증식 저해 효과

<24> 청각 셀룰로라스트 소화물의 세포 증식 저해 효과는 테트라졸리움 염의 하나인 엠티티 (MTT)를 사용하여, 엠티티의 환원에 의해 생성되는 포르마잔(formazan)의 흡광도를 측정하여 알아보았다(Carmichael, J., DeGraff, W. G. et al., Cancer Research, 47, p936, 1987). 즉, 상기 실험예 1에서 배양한 여러 세포주($1.0-2.5 \times 10^5$ /ml)를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣고, 청각 수용성 추출물을 농도(12.5, 25, 50/ml)로 첨가하였다. 이를 시간대별(12, 24, 48, 72시간) 또는 72시간 배양한 다음, 엠티티 시약 100μg를 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. 플레이트를 1000rpm에서 5분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, DMSO (dimethylsulfoxide, 시그마사) 150μl를 가하여 엠티티의 환원에 의해 생성된 포르마잔 침전물을 용해시킨 후, 마이크로플레이트 리더(microplate reader, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 증식 억제 정도를 측정하였다.

<25> 그 결과를 보면, 도 1은 4 종류의 암세포에 대한 청각 셀룰로라스트 소화물의 세포성장 억제효과 비교를 나타낸 것으로, 이를 상세하게 설명하면, 자궁암 세포인 HeLa(△)에서는 낮은 세포증식 억제효과를 보인 반면, 혈액암 세포인 U-937(▼)과 피부암 세포인 B-16(○)에서는 청각 수용성 추출물 50 /ml를 처리하였을 때, 각각 78.54%와 53.48%의 세포 성장 억제효과를 나타내었고, 이는 청각 셀룰로라스트 소화물 농도가 증가함에 따라 성장 억제효과 또한 증가하였다(도 1 참조).

<26> 상기 도 1에 나타난 결과에 따라, 성장 억제효과가 좋았던 혈액암 세포에 청각 셀룰로라스트 소화물을 농도별(12.5, 25, 50 /ml)로 첨가한 후, 각 시간대별(12, 24, 48, 72시간)로 배양한 결과는 도 2의 U-937 혈액암세포에 대한 청각 셀룰로라스트 소화물의 처리 농도별과 시간별에 따른 세포성장 억제효과 비교에서 나타낸 것과 같이, 소화물의 농도와 배양시간의 증가에 따라 세포 성장억제효과 또한 증가하였으며(도 2 참조),

<27> 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과에서는 표 1의 청각 셀룰로라스트 소화물 처리에 따른 U-937 혈액암세

포의 세포생존률의 변화 측정을 나타낸 것과 같이, 혈액암세포 (U-937)와 정상세포(V79-4)에 청각 셀룰라스트 소화물을 각각 50 /ml를 처리하였을 때 혈액암세포 (U-937)는 16%만 생존한 반면 정상세포(V79-4)는 89%가 생존하였다(표 1 참조).

표 1. 청각 셀룰라스트 소화물 처리에 따른 혈액암세포 (U-937)와 정상세포(V79-4)의 세포생존률의 변화

청각 소화물 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	세포 생존률 (%)	
	U-937	V79-4
-	100.0 $\pm$ 4.2	100.0 $\pm$ 2.4
12.5	56.5 $\pm$ 1.5	103.4 $\pm$ 4.3
25	31.7 $\pm$ 3.7	102.3 $\pm$ 5.9
50	16.2 $\pm$ 0.9	89.2 $\pm$ 3.5

<28>
<29> [실험예 3] 세포 핵의 형태학적 변화(Morphological changes) 측정

<30> 세포자사멸의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해, DNA 특이적으로 결합하는 형광 염색액인 웨치스트 33342 (Hoechst 33342)를 사용하여 DNA를 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다. 즉, 혈액암 세포인 U-937 세포($2 \times 10^5/\text{ml}$)에 25, 50, 100 /ml의 농도로 청각 셀룰라스트 소화물을 가한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양후 웨치스트 33342 용액을 가하여 37℃, 암하에서 10분간 염색하였다, 형광현미경하에서 핵의 형태학적 변화를 관찰하였으며, 그 결과를 도 3의 유세포분석(flow cytometric analysis)을 통해 청각 셀룰라스트 소화물 처리에 따른 혈액암세포 (U-937)의 세포의 세포자사멸(apoptosis) 정도를 석도를 통하여 살펴보면, 정상 대조군에 비해, 청각 수용성 추출물을 처리한 혈액암세포인 U-937 세포에서 추출물의 농도가 25, 50 및 100 /ml의 농도에서 농도 의존적으로 세포의 크기가 축소되었으며, 핵의 모양이 불규칙하였고 부분적인 핵의 응집현상을 관찰할 수 있었다(도 3 참조).

<31> [실험예 4] 세포 주기 분석(Cell cycle analysis)

<32> 청각 셀룰라스트 소화물에 의한 세포자사멸 유도에 의하여 서브-G1 저이배체(Sub-G1 hypodiploid) 세포가 증가하는지 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

<33> 혈액암세포인 U-937 세포($2 \times 10^5/\text{ml}$)에 25, 50 및 100 mg/ml의 농도로 청각 셀룰라스트 소화물을 처리한 다음 24시간 동안 배양한 후, 혈액암세포인 U-937 세포를 수집하여 PBS로 세척하였다. 혈액암세포인 U-937 세포를 -20℃에서 70 % 에탄올로 30분 동안 고정시킨 후, PBS로 세척하고, RNase A(1mg/ml)를 처리한 다음에 프로피다이움 아이오다이드(PI, 시그마사)로 염색하고, 유세포 분석기(COULTER EPICS XLTM Flow Cytometer, BECKMAN COULTER)를 사용하여 세포주기를 분석하였다(Nicoletti, I., et al., J. Immunol. Methods, 139, p271, 1991).

<34> 실험결과는 도 4의 청각 셀룰라스트 소화물 처리에 따른 Bax, Bcl-xL, 카스파제-3 과 -7 단백질의 변화 측정을 나타낸 것으로, 청각 셀룰라스트 소화물 처리시 추출물의 농도가 25, 50 및 100 /ml의 농도에서 농도 의존적으로 세포자사멸 세포(sub-G1 hypodiploid)가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 4 참조)

<35> [실험예 5] 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)

<36> 혈액암세포인 U-937 세포($2 \times 10^5/\text{ml}$)에 청각 셀룰라스트 소화물을 25, 50 및 100 /ml의 농도로 처리한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 2~3회 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 세척하였다. 500 ml의 용해 완충액 (lysis buffer)을 첨가하여 1시간동안 용해시킨 다음, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였으며, 단백질 농도는 브래드포드(Bradford) 방법을 이용하여 정량하였다(Bradford, M. M., Anal. Biochem., 72, p248, 1976). 40 의 세포 용해물(lysate)을 10% 및 12% 미니 젤 SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)로 변성 분리하여, 이를 폴리비닐리덴 디플루오라이드막 (polyvinylidene difluoride

membrane, BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 전이(transfer)하였다. 그리고 막(membrane)의 차단(blocking)은 5% 탈지유(skim milk)가 함유된 TTBS(TBS + 0.1 % Tween 20) 용액으로, 상온에서 2시간 동안 실시하였다. Bcl-2의 발현 양을 검토히기 위한 항체로는 항-인간 Bcl-2(anti-human Bcl-2, 1:1000)(셀시그널링사), Bax의 발현 양을 검토히기 위한 항체로는 항-인간 Bax(anti-human Bax, 1:1000)(셀시그널링사), 카스페이즈-7(Caspase-7)의 발현 양을 검토히기 위한 항체로는 단절된 카스페이즈-9 Ab(1:1000)(셀시그널링사) 및 카스페이즈-3(Caspase-3)의 발현 양을 검토히기 위한 항체로 단절된 카스페이즈-3 Ab(Cleaved caspase-3 Ab, 1:1000)(셀시그널링사)을 TTBS 용액에서 희석하여 사용하였으며, 반응은 상온에서 2시간 동안 진행하였다. 2차 항체로는 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 항-레빗 IgG(anti-rabbit IgG, 세리그널링사)를 1:5000으로 희석하여 이용하였으며, 반응은 상온에서 30분 동안 진행하였다. 막을 TTBS로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Co. RPN2106)과 1 내지 3분간 반응시킨 후, 엑스-레이(X-ray) 필름에 감광하였다.

<37> 그 결과, 세포자사멸을 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암유발 유전자 산물의 하나인 Bcl-2(또는 Bcl-xL)은 다른 암 유전자 단백질과는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포생존 조절, 즉 세포자사멸을 억제하는 기능이 있으며, Bcl-2 계열에 속하는 Bax 단백질은 세포자사멸을 촉진시키는 단백질(protein)로 밝혀졌으며 Bcl-2와의 헤테로(hetero-) 혹은 호모다이머(homodimer)를 형성함으로써, 세포자사멸의 조절에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Korsmeyer, S. et al., Biochem. Biophys. Acta., 63, p1271, 1995).

<38> 따라서 본 실험에서 청각 셀루클라스트 소화물 처리시에 Bcl-xL 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-xL의 발현은 청각 셀루클라스트 소화물 50 /ml 농도 이후부터 점차농도 의존적으로 감소하였다. 하지만 이와는 달리 세포자사멸을 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax 단백질의 발현은 변화가 없었다(도 4 참조).

<39> 또한 청각 셀루클라스트 소화물 25, 50 및 100 /ml의 농도별로 24 시간 처리하여 카스페이즈-3, -7의 활성변화를 조사한 결과, 25 /ml 농도부터 농도 의존적으로 활성이 증가되어 나타났다(도 4 참조).

<40> [실험예 6] 청각 셀루클라스트 소화물의 성분분석

<41> 일반성분분석은 AOAC(1990)에 따라 수분은 상압 105℃ 가열건조법, 지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하고 탄수화물 정량은 Dubois 등(1956)의 phenol sulfuric acid 법으로 수행하였다.

<42> 당 성분을 분석하기 위한 전처리 과정은 다음과 같다.

<43> 청각 셀루클라스트 소화물에서 분리된 당을 1 미로그램/밀리리터 로 제조한 후 4몰 트리플루오로아세트익시드(4M TFA) 1밀리리터와 1:1 비율로 섞은 후 105℃ 인큐베이터에서 4시간 동안 산 가수분해 반응을 시킨다. 그 후 트리플루오로아세트익시드를 진공건조기로 제거 한다. 증류수를 넣고 녹인 후 다시 진공건조기로 제거하는 방법을 2~3회 반복함으로써 트리플루오로아세트익시드를 완전히 제거한다.

<44> 당 성분 분석은 바이오-엘씨(Bio-LC)을 이용하였으며 다음과 같다. 푸코스, 람노즈, 아라비노즈, 갈락토즈, 글루코즈, 만노즈, 자일로즈를 시그마에서 구입하여 표준물질로 사용하였다. 바이오-엘씨는 DIONEX의 HPAEC-PAD 시스템을 이용하였으며, 용출 용매는 18 mM 수산화나트륨(NaOH) 용액을 사용하였다. 컬럼은 당 성분 분석 전용인 CarboPacTM PA1을 사용하였으며 유속은 분당 1 ml로 흘려주었다. 주입량은 10 마이크로리터를 주입하였으며 표준물질과 머무름 시간을 비교하여 정량하였다.

<45> 그 결과, 표 2의 청각 셀루클라스트 소화물의 성분분석에서와 같이, 청각 셀루클라스트 소화물로는 수분이 7.5%, 회분이 15.6%, 단백질이 4.5%, 지방이 1.2%를 차지하고 있었다. 또한 70.2%가 당 이었으며 조당의 성분은 갈락토스 61.21%와 아라비노스 30.53%가 주성분으로 각각 61.21%와 30.53%를 보였으며, 글루코스 5.02%, 만노스 1.99% 및 푸코스 06.4%는 미량 함유되어 있었다.

표 2. 청각 셀룰로라스트 소화물의 성분분석

성분	함량 (%)
수분	7.5
회분	15.6
단백질	4.5
지방	1.2
조당(crude polysaccharide)	70.2
갈락토스(Galactose)	61.21
아라비노스(Arabinose)	30.53
글루코스(Glucose)	5.02
만노스(Mannose)	1.99
푸코스(Fucose)	0.64
람노스(Rhamnose)	-
자일로스(Xylose)	-

<46>

<47> 또한, 조당 분획물에 의한 U-937 혈액암 세포의 성장 억제를 살펴보면, 도 5의 청각 수용성 추출물로부터 분리한 조당 분획물의 U-937 혈액암세포에 대한 세포성장 억제효과에 나타난 것과 같이, 조당 분획물에 의한 U-937 혈액암세포의 성장 억제는 5 /ml를 처리하였을 때 54.9%의 높은 성장억제를 보였다(도 5 참조).

<48>

이상의 결과를 종합해 보면,

<49>

1) 청각 셀룰로라스트 소화물의 농도가 증가됨에 따라 3 종류의 암세포에 대하여 성장억제 효과를 가지며, 성장 억제효과가 좋았던 혈액암세포 (U-937)에 청각 셀룰로라스트 소화물을 농도별 시간대별로 배양한 결과에서도 소화물의 농도와 배양시간의 증가에 따라 세포 성장억제효과 또한 증가하였으며, 혈액암세포 (U-937)와 정상세포 (V79-4)에 청각 수용성 추출물을 각각 50 /ml를 처리하였을 때 대장암세포(CT-26)는 16%만 생존한 반면 정상세포(V79-4)는 89%가 생존하였다.

<50>

2) 세포자사멸의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위한 것으로, 유세포분석(flow cytometric analysis)을 통해 청각 셀룰로라스트 소화물 처리에 따른 혈액암세포(U-937)의 세포의 세포자사멸(apoptosis) 정도를 분석도를 통하여 살펴보면, 정상 대조군에 비해, 청각 셀룰로라스트 소화물을 처리한 혈액암세포인 U-937 세포에서 농도 의존적으로 세포의 크기가 축소되었으며, 핵의 모양이 불규칙하였고 부분적인 핵의 응집현상을 관찰할 수 있었다.

<51>

3) 청각 셀룰로라스트 소화물에 의한 세포자사멸 유도에 의하여 서브-G1 저이배체(Sub-G1 hypodiploid) 세포가 증가하는지 관찰하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과는 청각 셀룰로라스트 소화물 처리시 추출물의 농도 의존적으로 세포자사멸 세포(sub-G1 hypodiploid)가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

<52>

4) 세포자사멸을 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자를 알아보기 위하여, 청각 셀룰로라스트 추출물 처리시에 Bcl-xL 및 Bax의 발현양상의 변화를 조사한 결과, Bcl-xL의 발현은 청각 셀룰로라스트 소화물 50 /ml 농도 이후부터 점차농도 의존적으로 감소하였다. 하지만 이와는 달리 세포자사멸을 촉진시키는 기능을 수행하는 Bax 단백질의 발현은 변화가 없었다.

<53>

또한 청각 셀룰로라스트 소화물 25, 50 및 100 /ml의 농도별로 24 시간 처리하여 카스페이즈-3, -7의 활성변화를 조사한 결과, 25 /ml 농도부터 농도 의존적으로 활성이 증가되어 나타났다.

<54>

5) 청각 셀룰로라스트 소화물로부터 분리한 조당 분획물에 의한 U-937 혈액암세포의 성장 억제를 살펴보면, 조당 분획물에 의한 U-937 혈액암세포의 성장 억제는 5 /ml를 처리하였을 때 54.9%의 높은 성장억제를 보였다

<55>

이상에서와 같이 본 발명은 비록 상기의 실시 예에 한하여 설명하였지만 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다.

발명의 효과

<56>

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 청각의 소화물은 노보자임사의 당분해효소인 셀룰로라스트를 청각 분말 원료에 그대로 사용함으로써 매우 효과적으로 제조할 수 있었으며, 또한 이러한 청각의 셀룰로라스트 소화

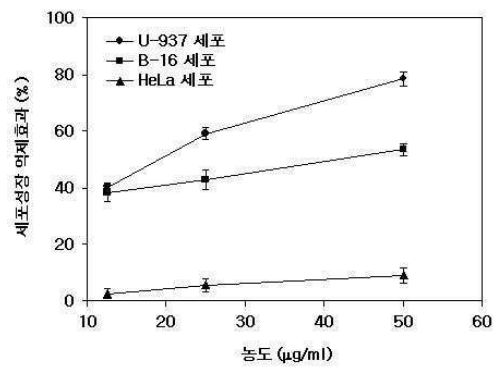
물로는 우수한 항암 활성이 있는 것으로 확인되었는데, 그 중에서 혈액암 세포 (U-937)에 대해서는 강력한 항암 효력을 가지는 등의 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

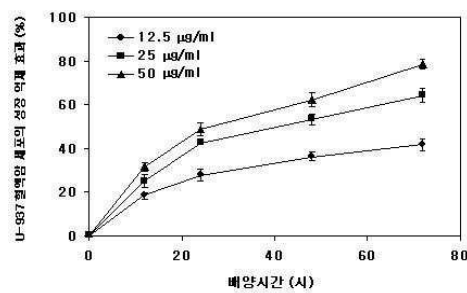
- <1> 도 1는 4종류의 암세포에 대한 청각 소화물의 세포성장 억제효과 비교도
- <2> 도 2는 CT-26 대장암세포에 대한 청각 소화물의 처리 농도별과 시간별에 따른 세포성장 억제효과 비교도
- <3> 도 3은 유세포분석(flow cytometric analysis)을 통해 청각 소화물 처리에 따른 CT-26 대장세포의 세포의 세포 자사멸(apoptosis) 정도를 분석도
- <4> 도 4는 청각 소화물 처리에 따른 Bax, Bcl-xL, 카스파제-3 과 -7 단백질의 변화 측정도
- <5> 도 5는 청각 소화물로부터 분리한 조당 분획물의 CT-26 대장암세포에 대한 세포성장 억제효과도

도면

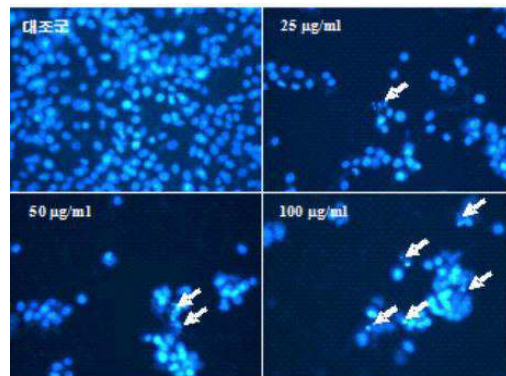
도면1



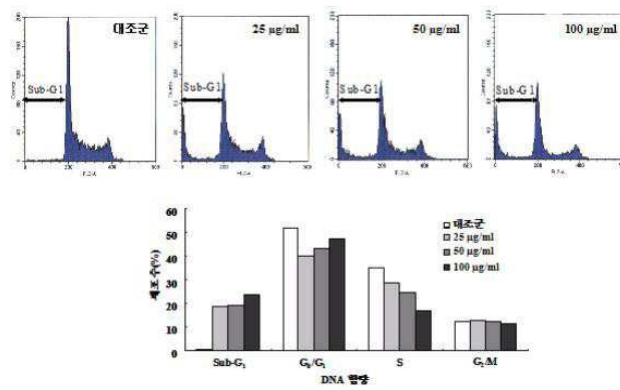
도면2



도면3



도면4



도면5

