



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0111630
(43) 공개일자 2012년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(21) 출원번호 10-2011-0030227

(22) 출원일자 2011년04월01일

심사청구일자 2011년04월01일

(71) 출원인

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김소미

제주특별자치도 제주시 대원길 82-5 (오등동)

안광석

서울특별시 성북구 장위로2길 67, 106동 1307호 (하월곡동, 꿈의숲푸르지오)

(74) 대리인

김승진, 양부현

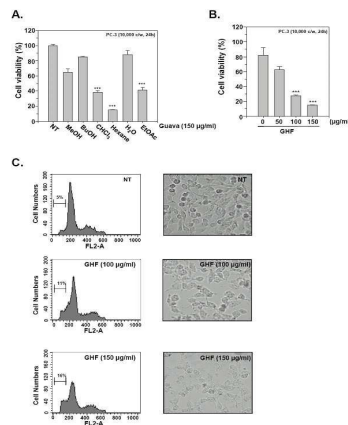
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선암 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물의 전립선암에 대한 항암 용도에 관한 것이다. 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암세포에서 세포사(apoptosis)를 유도하여 세포독성 활성을 나타낸다. 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0477

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 메틸플라본계화합물의 암세포사멸기작과 구조와의 상관관계 규명

주관기관 제주대학교

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 헥산 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선암의 치료, 예방 또는 개선용 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 1 항에 있어서, 상기 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 전립선암세포에서 (i) 세포주기의 sub-G₁ 단계에서 중지(arrest); (ii) AKT-mTOR-S6K1 신호전달 경로의 억제; (iii) 사이클린 D1 유전자의 발현 억제; (iv) Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1, IAP-2 유전자의 발현 억제; 또는 (v) COX-2 유전자 및 VEGF 유전자의 발현 억제의 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

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

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 전립선암의 개선용 기능성 식품 조성물 형태인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선암의 치료, 예방 또는 개선용 약제학적 조성물 또는 기능성 식품조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine)는 133 개속 이상의 속(genera)과 3,800 종 이상의 식물종을 포함하는 도금양과(Myrtaceae family)에 속한다. 구아바 잎은 당뇨병, 설사, 기침, 생리통 및 고혈압의 치료용도로 아프리카 민간 의약으로도 사용되어왔다. 또한, 상처의 감염저해제 및 방부제로 작용하여 여드름, 치아우식, 잇몸감염 및 인후염의 치료용도로도 사용되었다. 구아바 식물의 효능에 관한 선행 연구로서는 항균효과 [1], 항설사 효과 [2], 항당뇨효과 [3], 항여드름 효과 [4], 진정제 [5], 향기침효과 [6], 및 마약성 활성 [7] 등이 있다. 많은 연구결과들에 의하면, 구아바의 잎은 트리테르페노이드 [8], 플라보노이드 [9], 방향유(essential oil)[10], 및 탄닌[11]을 다량 포함하고 있다고 보고되었다. 최근에는 구아바잎의 추출물들이 항염증효과[12], 정자보호 효능[13], 및 화학물질에 의한 손상예방 효과[14-17]를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 또한, 당뇨병에 초래되는 사람의 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)의 생존능 감소를

억제하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다[18]. 전립선암은 안드로겐-의존성 질환으로서 주로 질환의 초기 단계에서 효과가 있는 안드로겐-고갈 치료에 의해 치료된다[19]. 그러나, 이 치료법은 많은 환자의 경우에서 실패율이 높고, 지속적인 안드로겐 고갈은 재발성이 있는 안드로겐-비의존성 전립선암을 초래하게 된다 [20, 21].

[0003] PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT 신호전달 경로는 인간 전립선암의 발달 및 진전에서 세포의 생존과 아포토시스(apoptosis)로부터 세포 보호에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[22, 23]. PI3K가 활성화되면, AKT와 같은 여러 개의 하위 타겟물질들이 인산화되거나 활성화된다. AKT의 활성화는 안드로겐-의존성 세포에 비해 안드로겐-비의존성 세포에서 크게 증가되는 것으로 나타났다[24]. PI3K/AKT 신호전달은 세포 성장을 조절하는 라파마이신(mTOR) 경로의 포유동물 타겟을 조절하는데 관여되어 있다고도 보고되어 있다[24]. 형질전환 마우스 모델에서 AKT를 과발현시키면 전립선상피내 종양의 병변을 형성하였으나, mTOR 억제하면 이러한 병변형성이 사라졌음이 보고되어 있다[25]. 따라서, mTOR은 HIF1 α 을 조절하여 성장에 영향을 미치고[26], TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)을 억제함[27]으로써 전이성 전립선암에서 매우 중요한 역할을 하게 된다. 최근에 mTOR 신호전달경로는 암 치료에서 중요한 약물 타겟이 되고 있다[28]. 또한, 다수의 연구 결과, 리보솜 p70 S6 키나아제 (S6K1) 활성이 mTOR에 의해 직접적 또는 간접적인 메카니즘에 의해 조절된다는 것이 입증되었다[29, 30, 31, 32]. S6K1은 세포주기(cell cycle), 세포성장 및 세포생존의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 mitogen-activated serine/threonine kinase이다. 최근에는, S6K1이 친-세포사 분자인 BAD를 인산화에 의해 불활성화시켜 세포의 생존을 촉진한다는 것이 보고되어 있다[33].

[0004] 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

[0005] 본 발명자들은 천연물로부터 인간 전립선암의 새로운 치료 물질을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물이 인간 전립선암세포주에 특이적으로 세포독성 활성을 가지며, 세포주기를 sub-G₁ 단계에서 중지시키고, AKT/mTOR/S6K1 신호전달경로를 억제해 통해 세포사(apoptosis)를 촉진시킨다는 것을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선암 치료, 예방 또는 개선용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0007] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물을 유효성분으로 포함하는 전립선암의 치료, 예방 또는 개선용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물의 뛰어난 전립선암(prostate cancer) 특이적 항암효과를 발견한 것에 기초한다.

[0010] 본 발명의 구아바는 다양한 구아바 종(species) 중에서 스트로베리 구아바(strawberry guava)로도 알려진 "*Psidium cattleianum*" 구아바이며, 이의 매력적인 잎이나 과일에 의해 일반 구아바(common guava, *P. guajava*)와는 다른 종(species)로 구분된다.

[0011] 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.

- [0012] 본 발명의 구아바 잎 추출물을 추출하기 위한 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 예를 들어 물, 탄소수 1-4 개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸 아세테이트 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출하는 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 구아바 잎 추출물은 물 또는 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올을 용매로 한 추출물이며, 가장 바람직하게는 물 또는 메탄올을 용매로 한 추출물이다.
- [0013] 본 발명의 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 상기 구아바 잎 추출물을 헥산(hexane)을 용매로 사용하여 추가 분획하여 얻은 분획물이다.
- [0014] 본 발명의 유효성분 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 전립선암세포의 증식을 억제하는 항암활성을 갖는다.
- [0015] 하기 본 발명의 구체적인 일 실시예에 증명되는 바와 같이, 본 발명의 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 전립선암세포에서 세포사(apoptosis)를 유도하여 세포독성 효과를 나타낸다.
- [0016] 본 발명의 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 전립선암세포에서 세포주기를 sub-G₁ 단계에서 중지시키며, AKT-mTOR-S6K1 신호전달 경로를 억제함으로써 세포사를 유도한다.
- [0017] 본 발명의 구아바 잎 추출물의 헥산 분획물은 (i) 세포증식을 매개하는 사이클린(Cyclin) D1 유전자; (ii) 세포생존에 관련된 Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1, IAP-2 유전자; (iii) 전이(metastasis)를 매개하는 COX-2 유전자; 및 (iv) 맥관형성 관련 유전자 VEGF의 발현을 억제한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물은 전립선암의 치료 또는 예방 용도의 약제학적 조성물의 형태로 제조될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약제학적 조성물에는 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0020] 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.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0025] 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 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 조성물은 전립선암의 개선 용도의 기능성 식품 조성물의 형태로 제조될 수 있다.
- [0027] 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 추출물의 헥산 분획물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로서 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천

연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0029] (i) 본 발명은 구아바 (*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물의 전립선암에 대한 항암 용도에 관한 것이다.

[0030] (ii) 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암세포에서 세포사(apoptosis)를 유도하여 세포독성 활성을 나타낸다.

[0031] (iii) 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명은 구아바 (*Psidium cattleianum* Sabine) 잎 추출물의 핵산 분획물의 전립선암에 대한 항암 용도에 관한 것이다. 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암세포에서 세포사(apoptosis)를 유도하여 세포독성 활성을 나타낸다. 본 발명의 구아바 잎 추출물의 핵산 분획물은 전립선암의 치료, 예방 또는 개선 용도의 약제학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물로 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 구아바 잎 추출물의 추가 분획물이 인간 전립선암 세포주 PC-3 세포의 생존율에 미치는 영향을 측정하는 결과이다. 패널 A : PC-3 세포들을 96-웰 플레이트상에 접종하고(1×10^4 세포/웰), 구아바 잎 추출물의 분획물(MeOH, BuOH, CHCl_3 , 핵산, H_2O , 및 EtOAc 용매 분획물)을 $150 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 패널 B : 세포들을 지시된 다양한 농도의 GHF(구아바 잎 추출물의 핵산 분획물)로 24 시간 동안 처리하였다. 패널 A 및 B에서 나타난 대표적인 세포 생존율은 MTT 분석을 사용하여 측정하는 것이다. 비처리군과 비교하여 $***P < 0.001$. 패널 C : 5×10^5 세포들을 6-웰 플레이트상에 접종한 후에, 지시된 농도의 GHF를 24 시간 동안 처리하였다. 이어서, 세포들을 고정하고 유세포 분석기를 통해 분석하거나(왼쪽 패널), 또는 현미경을 통해 관찰하였다(오른쪽 패널).

도 2는 GHF가 AKT-mTOR-S6K1 신호전달 경로를 억제하는 결과를 보여준다. PC-3 세포들을 지시된 상이한 농도의 GHF으로 6 시간 동안 처리하였다. 이어서, 동등한 양의 세포 용해물을, p-AKT (Ser473) 및 AKT에 대한 항체 (패널 A), p-mTOR (Ser2448) 및 mTOR에 대한 항체 (패널 B), p-S6K1 (Thr 421/Ser424), S6K1, 및 β -액틴에 대한 항체 (패널 C)를 사용하여 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다. 결과들은 3회의 독립 실험의 대푯값으로 나타내었다.

도 3은 GHF가 항-세포사, 세포증식, 전이 및 맥관형성 유전자 산물들을 하향-조절하고, 카스파아제(caspase)를 활성화시켜 세포사를 유도한다는 것을 증명하는 결과를 보여준다. PC-3 세포들을 GHF의 지시된 다양한 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 이어서, 동일한 양의 세포 용해물을 Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1, IAP-2, Cyclin D 1, COX-2, VEGF, 카스파아제-3, 카스파아제-8, 카스파아제-9, 및 PARP들에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다(패널 A-C 참조). 항- β -액틴 항체를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

도 4는 GHF가 미토콘드리아 막 전위를 소실시킴으로써 세포사(apoptosis)를 유도하는 것을 보여준다. PC-3 세포들을 $100 \mu\text{g/ml}$ 또는 $150 \mu\text{g/ml}$ 의 GHF으로 24 시간 동안 처리하고, 세포들을 FITC-컨쥬게이트된 아넥신 V 항체와 함께 인큐베이션시키고, 유세포 분석기(패널 A)와 형광 현미경(패널 B)하에서 분석하였다. GHF의 24 시간 처리 후에, 세포들을 고정시키고 TUNEL 반응액을 가하여 인큐베이션시킨 후에, 유세포 분석기(패널 C)에 의해 분석하고, 형광현미경하(패널 D)에서도 분석하였다. 패널 E의 그래프는 상기 패널 D에서 화살표로 지시된 세포의 확대 이미지에서 세포를 통과하여 그려진 선을 따라 측정된 형광 세기를 보여준다. 패널 F에서 PC-3 세포를 $100 \mu\text{g/ml}$ 또는 $150 \mu\text{g/ml}$ 의 GHF으로 24 시간 동안 처리하고, 세포들을 로다민123(Rhodamine123)과 함께 인큐베

이전하였다. 대표 결과들은 공초점 현미경을 사용하여 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 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.
- [0035] **실시예**
- [0036] **실험재료 및 방법**
- [0037] **1. 세포 배양**
- [0038] 전립선암세포주 PC-3세포는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum), 100 units/ml의 페니실린 및 100 µg/ml의 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂ 및 95% 공기의 습화된 분위기내에서 37℃ 온도에서 배양하였다. 세포배양과 관련된 모든 실험은 세포를 접종하고 하루 후에 행하였다.
- [0039] **2. 구아바 잎의 다양한 분획물**
- [0040] 공기-건조한 구아바(*Psidium cattleianum* Sabine) 잎을 분말화시키고, 간헐적인 초음파 분쇄와 함께 80% 메탄올로 상온에서 3일간 추출하였다. 추출물을 여과한 후, 감압조건하에서 진공 로터리 증발기로 농축시키고 동결 건조하였다. 메탄올 추출물들을 물에 현탁하고, 4종의 상이한 용매를 사용하여 계단식 단계를 거쳐 추가 분획하였다. 수득한 분획은 다음과 같았다: n-헥산 분획(HF), 클로로포름 분획(CF), 에틸아세테이트 분획(EF), n-부탄올 분획(BF), 및 수용성 분획(WF)이다. 추출물 분말은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고, PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)으로 희석하여 최종 농도로 제조하였다.
- [0041] **3. 화합물**
- [0042] 항-p-AKT (Ser473), 항-AKT, 항-p-mTOR (Ser2448), 항-mTOR, 항-p-S6K1 (Thr 421/Ser424), 항-S6K1, 항-카스파아제-3, 및 항-절단된-카스파아제-3 항체들은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)으로부터 구입하였다. 항-Bcl-2, 항-Bcl-xL, 항-Survivin, 항-IAP-1, 항-IAP-2, 항-Cyclin D1, 항-COX-2, 항-VEGF 항-카스파아제-8, 항-카스파아제-9, 항-PARP, 항-β-액틴 항체들 및 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)으로부터 구입하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], DAPI [4', 6-diamidino-2-phenylindole] 및 PI(propidium iodide)는 Sigma (St. Louis, MO)으로부터 구입하였다. Rhodamine 123은 Molecular Probes (Eugene, OR)으로부터 구입하였고, Annexin V는 BD Biosciences (Palo Alto, CA)으로부터 구입하였다. TUNEL 분석 키트는 Roche Diagnostics GmbH (Germany)으로부터 구입하였다.
- [0043] **4. MTT 분석**
- [0044] 세포 생존율은 NADH-의존성 디히드로게나아제 활성을 검출하는 MTT 분석에 의해 측정하였다. 1x PBS (phosphate-buffered saline)에 용해시킨 50ml의 MTT 용액(5 mg/ml)을 세포에 직접 가하고, 4 시간 동안 인큐베이션하여 MTT가 포르마잔(formazan)으로 대사되도록 하였다. 흡광도는 570 nm의 파장에서 자동화된 분광학적 플레이트 리더를 사용하여 측정하였다. 세포의 생존율은 비처리 대조군과 비교하여 상대 백분율로 정상화하였다.
- [0045] **5. 웨스턴 블로팅 분석**
- [0046] PC-3 세포를 지시된 농도의 GHF로 처리하고, 세포들을 용해시킨 후, 총 단백질 농도를 Bradford 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA)으로 측정하였다. 동일한 양의 세포 용해물을 SDS-PAGE (sodium dodecyl-polyacrylamide gel

electrophoresis)상에서 분리하고, PVDF (polyvinylidene fluoride)막으로 이전시킨 후, 0.1% Tween 20 및 5% 탈지유 또는 5% BSA를 포함하는 1X TBS를 사용하여 상온에서 1 시간 동안 블로킹 과정을 행하였다. 블로킹 후에, 막을 각각의 1차 항체와 함께 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 막을 2회 세척하고, 희석된 HRP(horseradish peroxidase)-컨쥬게이트 2차 항체(1:10000) 들로 상온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 3회 세척한 후, 막을 ECL(enhanced chemiluminescence) 키트(Millipore, Bedford, MA)를 사용하여 검출하였다.

6. 세포주기(Cell Cycle) 분석

PC-3 세포들은 웰당 5×10^5 세포의 농도로 6-웰 플레이트에 접종하고, 1일간 인큐베이션하였다. 지시된 농도의 구아바 핵산 분획물(GHF)으로 24 시간 동안 처리한 후, 세포들을 회수하고 1x PBS로 세척하였다. 세포 펠릿을 70% 차가운 에탄올로 -20℃에서 하룻밤 고정시켰다. 고정된 세포들을 1 mg/ml RNase A를 포함하는 1x PBS으로 재현탁시키고, 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였으며, 상온의 암실에서 50 μ g/ml PI를 첨가하고 30분간 더 인큐베이션하여 세포를 염색하였다. 염색된 세포들의 DNA 함량을 FACS Vantage SE (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) 유세포분석기 및 CellQuest Software를 사용하여 분석하였다.

7. TUNEL 분석

각 세포들의 세포사(apoptotic cell death)는 TUNEL 분석 키트를 사용하여 관찰하였다. 유세포분석을 위해, PC-3 세포들을 웰당 1×10^6 세포농도로 6-웰 플레이트에 접종하고, 1일간 인큐베이션한 후, GHF으로 24시간 동안 처리하였다. 이어서 세포들을 회수하고 1x PBS으로 세척하였다. 세포 펠릿을 4% 파라포름알데히드를 처리하여 상온에서 30 분간 고정시켰다. 고정된 세포들을 1x PBS내의 0.2% Triton X-100을 15분간 처리하여 투과화(permeabilization)시켰고, 세포들을 세척하고, TUNEL 반응액이 포함된 1x PBS로 재현탁시킨 후, 암실, 37℃에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 현미경분석을 위해, 세포들을 폴리-L-라이신 코팅된 슬라이드상에서 접종하고, 4% 파라포름알데히드를 사용하여 상온에서 30분간 고정시켰으며, 1x PBS으로 3회 세척하였다. 0.2% Triton X-100으로 투과화시키고 15 분후에, 세포들을 1xPBS으로 3회 세척하고, TUNEL 반응액을 첨가하였다. 세포들을 알루미늄막으로 포장한 후에 습화된 CO₂ 인큐베이터내에서 37℃, 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포들을 1 μ g/ml DAPI 용액으로 상온의 암실에서 5분간 염색하였다.

8. 아넥신 V (Annexin V) 분석

1×10^6 세포들을 GHF으로 24 시간 동안 처리하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 후, FITC 컨쥬게이트된 아넥신 V 또는 1 μ g/ml DAPI 용액으로 염색하였다. 세포들을 세척하고 유세포 분석기 또는 공초점 현미경으로 분석하였다.

9. 마이토콘드리아 막 전위($\Delta \psi_m$)의 측정

마이토콘드리아 막 전위 민감 역색물로서 로다민(rhodamine) 123을 사용하였다. GHF으로 처리하고 24시간 후에, 세포들을 1xPBS으로 세척하고, 상온의 암실에서 10 μ M의 로다민 123으로 30분간 인큐베이션하였다. 세포들을 1xPBS으로 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 이어서, 세포들을 1 μ g/ml DAPI 용액으로 염색하고, 형광현미경으로 분석하였다.

10. 통계학적 분석

실험 데이터들은 평균 $\pm$ SD으로 표시하였다. 비처리 대조군과 비교한 데이터의 통계학적 유의성은 Student unpaired t-test를 사용하여 결정하였다. 유의성은 $P < 0.05$ 으로 정하였다.

실험결과

- [0058] 1. 구아바 잎 추출물의 헥산분획물(GHF)은 인간 전립선암 세포 PC-3세포에 대해 가장 강력한 세포독성 활성을 나타내었다.
- [0059] 구아바 잎 추출물을 MeOH, BuOH, CHCl₃, 헥산(Hexane), H₂O, 및 EtOAc을 사용하여 분획하였다. PC-3 세포에 대한 6 가지 용매 분획물들의 세포독성 효과를 관찰하기 위해, 세포들을 각각의 분획물로 150 µg/ml의 농도로 24 시간 동안 처리한 후, 세포 생존율을 MTT 분석을 사용하여 측정하였다. 다른 분획물들과 비교하여, 구아바 헥산 분획물(GHF)이 가장 강력한 세포독성 효과를 나타내었다(15.02 ± 0.36, P < 0.001, n=4; 도 1의 패널 A). 또한, GHF는 100 µg/ml 농도에서는 유도된 유의성 있는 효과를 보였지만, 50 µg/ml 농도에서도 세포 사멸 효과를 나타내었다(27.37 ± 1.46, P < 0.001, n=4; 도 1의 패널 B). 도 1의 패널 C에서 보여지는 바와 같이, GHF는 형태학적 변화와 세포 손실을 유도하였고(오른쪽 패널), PI 염색 결과 세포사 과정에 있는 세포(apoptotic cell)를 나타내는 피크를 확인할 수 있었다(sub-G1): 이들은 용량-의존적 방식으로 5%에서 16%까지 크게 증가하였다(왼쪽 패널). 이러한 실험결과들은 GHF가 PC-3 세포의 세포 주기를 sub-G1 단계에서 중지시킴으로써 세포의 생존율을 감소시킨다는 것을 암시한다.
- [0060] 2. 구아바 잎 추출물의 헥산분획물(GHF)은 AKT/mTOR/S6K1 신호전달 경로를 억제한다.
- [0061] 다음으로, GHF가 세포 생존 및 증식에 관련되어 있는 대표적 단백질인 AKT의 활성을 조절할 수 있는지를 조사하였다. 도 2의 패널 A에 나타난 바와 같이, GHF는 농도의존적 방식으로 AKT의 구성적 활성화를 억제하였다. AKT의 하위 단백질들인 mTOR 및 S6K1의 구성적 활성화도 GHF에 의해 억제되었다. 또한, S6K1의 전체 발현 수준이 감소되었으나, AKT 및 mTOR의 발현수준은 감소하지 않은 것도 확인하였다(도 2의 패널 B 및 패널 C 참조). 상기와 같은 실험결과들은 GHF에 의한, AKT/mTOR/S6K1 신호전달의 억제가 PC-3 세포의 세포독성에 영향을 줄 수 있다는 것을 암시하는 것이다.
- [0062] 3. GHF는 세포사(apoptosis), 세포 증식, 전이 및 맥관 형성에 관여하는 다양한 단백질들을 하향조절한다.
- [0063] Bcl-2, Bcl-xL, Survivin, IAP-1, 및 IAP-2와 같은 단백질들의 구성적 발현은 세포 생존 및 항-세포사(anti-apoptosis)에 관련되어 있기 때문에[Nature. 1990;348:334-6; J Biol Chem. 2000;275:26661-4; J Biol Chem. 2002;277:3247-57], 이러한 단백질들의 유전자의 구성적 발현에 대한 GHF의 영향을 측정하였다. GHF는 농도-의존적 방식으로 상기 유전자들의 발현을 억제하였다(도 3의 패널 A 참조). 또한, GHF는 세포주기 단백질(Cyclin D1), 및 전이(metastasis) 및 맥관형성에 관련된 단백질들(COX-2 및 VEGF)의 발현을 억제하였다(도 3의 패널 B 참조).
- [0064]
- [0065] 4. GHF는 프로카스파아제-9; 프로카스파아제-8; 프로카스파아제-3, 및 PARP의 절단을 유도한다.
- [0066] 프로카스파아제-9; 프로카스파아제-8; 프로카스파아제-3, 및 PARP는 세포사(apoptotic cell death) 경로에 관련되어 있기 때문에[Annu Rev Biochem. 1999;68:383-424; J Cell Biol. 1999;144:281-92, GHF-처리된 PC-3 세포에서의 이들의 수준을 조사하였다. GHF는 프로카스파아제-9의 절단을 약간 유도하였으나, 반면 프로카스파아제를 나타내는 밴드가 없어지고, 이들의 절단된 형태가 나타나는 것에 의해 보여지는 바와 같이, 프로카스파아제-8, 및 프로카스파아제-3의 절단은 100-150 µg/ml 농도의 GHF에 의해 명확하게 유도되었다. 또한, GHF는 PARP 절단을 농도 의존적 방식으로 유도하였다(도 3의 패널 C 참조). 전반적으로, 상기와 같은 결과들은 GHF가 카스파아제-8 및 카스파아제-3의 활성화를 유도하여 PARP의 절단을 촉진한다는 것을 암시하는 것이다.
- [0067] 5. GHF는 미토콘드리아의 기능장애 (dysfunction) 유도를 통해 초기 및 후기 세포사를 유도한다.
- [0068] PI 염색에 대한 sub-G1 피크가 세포사 특징을 나타내지만, 또한 이는 상이한 염색질 구조 또는 낮은 DNA 함량을 갖는 정상 세포와 같은 기계적으로 손상된 세포를 나타내기도 한다. 따라서, 다음으로 GHF가 세포사멸에 미치는 영향을 조사하였다. 아넥신(annexin) V 항체를 사용하여 막에 노출된 포스파티딜트랜스퍼라아제(phosphatidylesterase)에 측정에 의한 초기 세포사(early apoptosis)를 검사한 결과, 유세포 분석(도 4의 패널 A 참조) 또는 형광 현미경(도 4의 패널 B 참조) 분석에서 보여지는 바와 같이, 비-처리 세포와 비교하여 아넥신 V 포지티브 세포(초기 세포사 과정에 있는 것으로 간주되는 세포)가 약간 증가하였다. 반면에, TUNEL 분

석을 통해 DNA 가닥 절단 측정에 의해 후기 세포사를 검사한 결과, GHF 처리에 의해 후기 세포사에 있는 세포가 극적으로 증가하였다(도 4의 패널 C - E 참조). 미토콘드리아 막 전위의 붕괴는 미토콘드리아 기능장애를 초래하게 되어, 미토콘드리아 팽창, 사이토크롬 c의 분비, 및 세포사(apoptosis)가 발생된다[Science. 1997;275:1132-6]. 따라서, GHF가 미토콘드리아 막 전위에서의 변화를 유도하는지 여부를 검사하였다. 도 4의 패널 F에서 보여지는 바와 같이, 미토콘드리아내에서의 로다민 123(Rh123)의 축적은 비-처리된 세포와 비교하여 GHF 처리에 의해 크게 감소하였다. 이러한 결과들은 GHF가 PC-3 세포내에서 미토콘드리아 기능장애를 통해 초기 및 말기 세포사를 유도한다는 것을 암시해 주는 것이다.

[0069] 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.

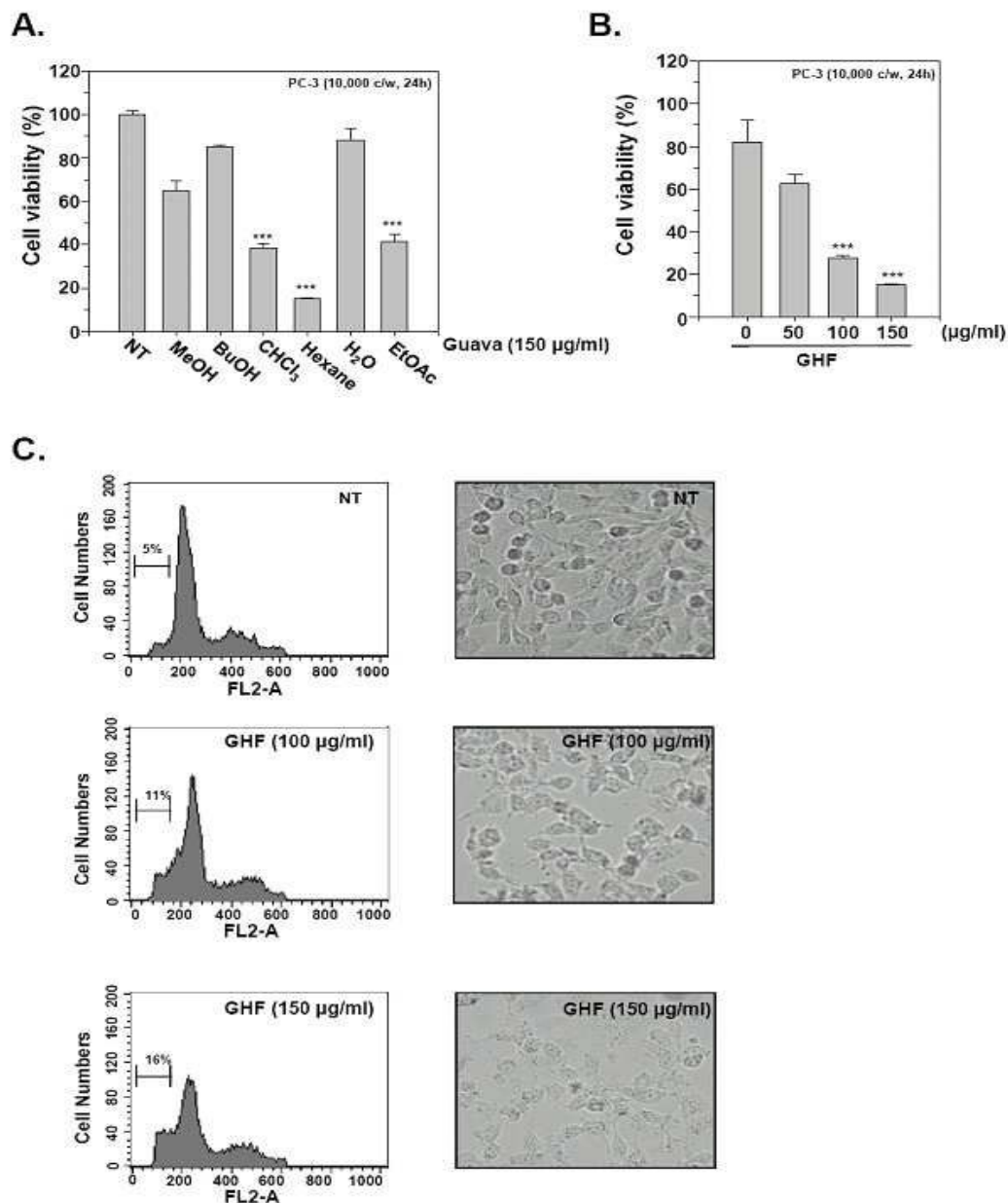
[0070] 참고문헌

- [0071] [1] Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2008;50:11-5.
- [0072] [2] J Ethnopharmacol. 2002;83:19-24.
- [0073] [3] Nutr Metab (Lond).7:9.
- [0074] [4] Am J Chin Med. 2005;33:197-204.
- [0075] [5] J Agric Food Chem. 2009;57:2882-8.
- [0076] [6] J Ethnopharmacol. 1999;67:203-12.
- [0077] [7] J Ethnopharmacol. 1988;24:219-31.
- [0078] [8] Phytochemistry. 1974;13:2015-6.
- [0079] [9] J Appl Microbiol. 2006;101:487-95.
- [0080] [10] Zhong Yao Cai. 1999;22:78-80.
- [0081] [11] Chem Pharm Bull. 1992;40:2092-8.
- [0082] [12] Phytother Res. 2008;22:1030-4.
- [0083] [13] Niger Postgrad Med J. 2007;14:273-6.
- [0084] [14] Cancer Lett. 2006;235:114-20.
- [0085] [15] J Agric Food Chem. 2009;57:6114-22.
- [0086] [16] Nutr Cancer. 2010;62:260-70.
- [0087] [17] Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009;80:239-45.
- [0088] [18] J Agric Food Chem. 2007;55:8523-33.
- [0089] [19] BJU Int. 2005;95:1320-6.
- [0090] [20] BJU Int. 2005;96 Suppl 2:41-6.
- [0091] [21] BJU Int. 2007;99:1056-65.
- [0092] [22] Cancer Cell. 2003;4:167-74.
- [0093] [23] J Biol Chem. 2005;280:33558-65.
- [0094] [24] Endocrinology. 2001;142:4795-805.
- [0095] [25] Nat Med. 2004;10:594-601.

- [0096] [26] Mol Cell Biol. 2002;22:7004-14.
- [0097] [27] J Urol. 2004;172:1333-7.
- [0098] [28] Curr Cancer Drug Targets. 2008;8:647-65.
- [0099] [29] Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:1432-7.
- [0100] [30] J Biol Chem. 1999;274:34493-8.
- [0101] [31] J Biol Chem. 1999;274:687-92.
- [0102] [32] Nature. 1995;377:441-6.
- [0103] [33] Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:9666-70.

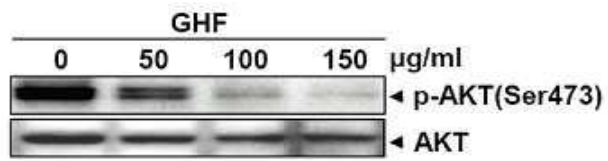
도면

도면1

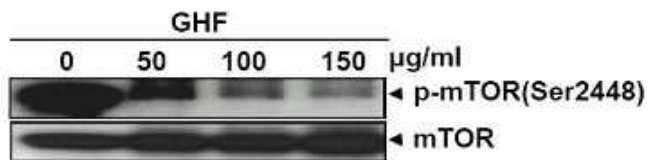


도면2

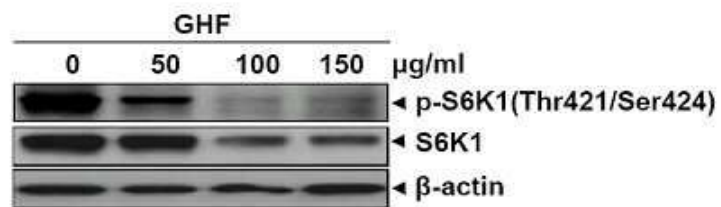
A.



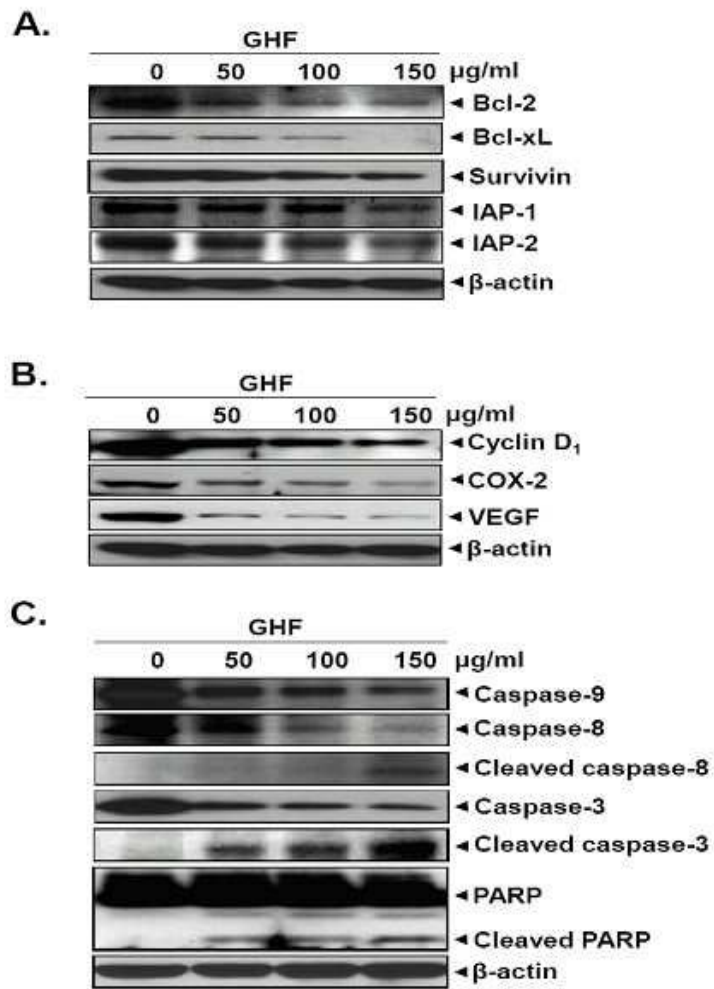
B.



C.



도면3



도면4

