



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월30일
(11) 등록번호 10-2247166
(24) 등록일자 2021년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/89 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/89 (2013.01)
A61P 35/04 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-0117584
(22) 출원일자 2019년09월24일
심사청구일자 2019년09월24일

(65) 공개번호 10-2021-0035594
(43) 공개일자 2021년04월01일

(56) 선행기술조사문헌
박선희 외. 산겨울 추출물의 Elastase 활성 저해 및 Matrix Metalloproteinase-1 발현 억제 효과. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. Vol. 36, No. 2, June 2010, pp. 129-136*
KR1020160105586 A
KR1020160098571 A
KR101517716 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양대학교 산학협력단
부산광역시 영도구 태종로 727 (동삼동, 한국해양대학교)

(72) 발명자
서영완
부산광역시 수영구 남천동로 41, 103동 603호 (남천동, 남천동 코오롱 하늘채 골든비치)
공창숙
부산광역시 연제구 해맞이로 23, 109동 1302호 (거제동, 거제유림아시아드아파트)
김준세
부산광역시 해운대구 좌동순환로8번길 78, 101동 1201호 (중동, 해운대메트로하이츠)

(74) 대리인
특허법인부경

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김미화

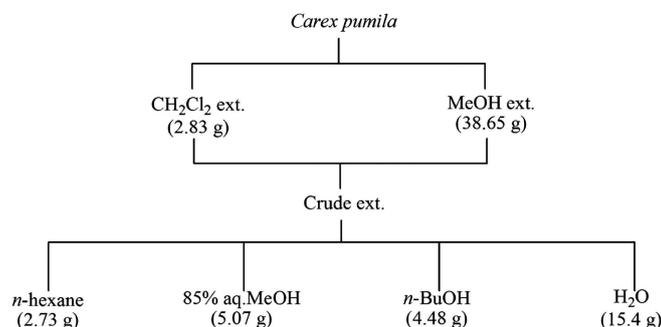
(54) 발명의 명칭 **좁보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 안전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 좁보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 안전이 억제용 약학 조성물로 활용될 수 있도록 좁보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물과, 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

이러한 본 발명은, 좁보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매 및 극성용매로 하여 추출한 좁보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법을 기술적 요지로 한다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019-E-G034-010116
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	사회맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업
연구과제명	해양생물 유래 피부노화 억제와 피부주름 개선 활성을 가지는 화합물 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국해양대학교 LINC+사업단
연구기간	2019.06.03 ~ 2020.01.31
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

좁보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매 및 극성용매로 추출한 좁보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하고,

HT-1080 세포로 이루어진 세포주에서 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-2 및 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-9의 mRNA와 단백질 발현을 억제하여,

세포 독성이 없는 것을 특징으로 하는,

암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 용매 분획물은,

상기 좁보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후,

상기 디클로로메탄층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하거나,

상기 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H₂O)로 분획하여 얻은,

n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는,

암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비극성용매는,

디클로로메탄(dichloromethane, CH₂Cl₂)인 것을 특징으로 하는,

암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 극성용매는,

메탄올(methanol, CH₃OH) 및 에탄올(ethanol, C₂H₅OH) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는,

암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물.

청구항 6

좁보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매로 추출하여 비극성용매 추출물을 얻고, 좁보리사초를 극성용매로 추출하여 극성용매 추출물로 얻어 상기 비극성용매 추출물과 상기 극성용매 추출물을 혼합하여 좁보리사초 추출물을 제조하는 단계; 및

상기 좁보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후, 상기 디클로로메탄

층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하거나, 상기 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H₂O)로 분획하여 얻은 n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 용매 분획물을 제조하는 단계;를 포함하되,

상기 줌보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물은,

HT-1080 세포로 이루어진 세포주에서 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-2 및 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-9의 mRNA와 단백질 발현을 억제하여,

세포 독성이 없는 것을 특징으로 하는,

암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 줌보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 암전이 억제용 약학 조성물로 활용될 수 있도록 줌보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물과, 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 제어되지 않는 비정상적인 세포성장에 의해 종양(tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 정상조직 또는 기관으로 침윤하여 파괴시키고 새로운 성장장소를 만들어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환군을 총칭한다.

[0003] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있고, 의학 기술 또한 혁신적으로 발전하고 있음에도 불구하고, 암의 발생 및 암에 의한 사망은 계속 증가 추세에 있다.

[0004] 세계보건기구의 최근 통계 자료에 의하면 전세계적으로 연간 약 1천만 명 이상의 새로운 암환자가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서도 암은 가장 높은 사망원인으로 연간 약 십만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 암에 의해 사망하고 있다.

[0005] 암의 발생요인으로는 여러가지가 있으며, 예컨대 유전인자 또는 면역학적 요인 등의 내적 요인과, 화학물질, 방사선 또는 바이러스 등의 외적 요인으로 구분될 수 있다.

[0006] 최근 들어서는 암 환자의 증가와 관련하여, 현대사회에서 암이 발생하는 원인은 유전적 요인보다 환경적 요인이 더 큰 비중을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0007] 특히 식생활에서 오는 발암물은 환경적 요인의 36%로써 매우 높은 것으로 알려져 있기 때문에, 현대사회에서의 생활환경이 근원적으로 변화되지 않는 이상 이러한 암의 발병률 및 암에 의한 사망자 수의 증가 추세는 계속해서 유지될 것으로 보인다.

[0008] 이러한 암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하며, 의료보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다는 점에서 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 더욱 강조되고 있다.

[0009] 최근에는 암의 발생과 전이, 암세포의 생리, 암의 진단과 치료에 대한 연구와 함께 식품을 비롯한 항암 효과를 지니는 물질 검색을 통하여 새로운 암 치료제 개발이 진행되고 있는 중이나, 대부분의 항암치료는 주로 방사선과 강한 독성의 합성화학약품을 사용하고 있는 실정인바 세포독성으로 인해 많은 부작용이 유발될 우려가 있다.

[0010] 한편 암의 진행과정을 살펴보면, DNA의 교란 및 손상을 통해 암세포로 변해가는 과정인 시발단계, 분열로 비정상적으로 증식하는 과정인 증진단계, 침윤, 전이 등의 악성종양 유전자의 발현과정인 발현단계의 세단계로 구분된다.

[0011] 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinases, MMPs)는 상술된 세단계 중에서 발현단계에 관여하는 것

으로 알려져 있는데, 이렇게 MMPs가 암의 전이에 관여한다는 사실이 밝혀짐에 따라 제약회사들이 MMPs 저해 방법에 관심을 가지고 연구를 진행하고 있고, 최근 MMPs 효소에 대해 밝혀진 새로운 지식들을 근거로 더 선택성이 높은 MMPs 저해를 위해 새로운 항암제 개발 전략이 시도되고 있다.

[0012] 그러나 아직까지는 유효한 MMPs 저해 효과를 이용한 항암제는 미미한 관계로, 암세포 전이 억제 활성화에 대한 새로운 기술개발 연구가 절실히 요구되고 있는 시점이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 국내 공개특허공보 제10-2018-0136592호, 2018.12.26.자 공개.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 상기한 문제점을 해소하기 위하여 발명된 것으로, 암전이 억제용 약학 조성물로 활용될 수 있도록 쯔보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 쯔보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매 및 극성용매로 추출한 쯔보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하고, HT-1080 세포로 이루어진 세포주에서 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-2 및 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-9의 mRNA와 단백질 발현을 억제하여, 세포 독성이 없는 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물을 기술적 요지로 한다.

[0016] 삭제

[0017] 바람직하게는 상기 용매 분획물은, 상기 쯔보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후, 상기 디클로로메탄층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하고, 상기 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H₂O)로 분획하여 얻은 n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0018] 바람직하게는 상기 비극성용매는, 디클로로메탄(dichloromethane, CH₂Cl₂)인 것을 특징으로 한다.

[0019] 바람직하게는 상기 극성용매는, 메탄올(methanol, CH₃OH) 및 에탄올(ethanol, C₂H₅OH) 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 쯔보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매로 추출하여 비극성용매 추출물을 얻고, 쯔보리사초를 극성용매로 추출하여 극성용매 추출물로 얻어 상기 비극성용매 추출물과 상기 극성용매 추출물을 혼합하여 쯔보리사초 추출물을 제조하는 단계; 및 상기 쯔보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후, 상기 디클로로메탄층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하거나, 상기 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H₂O)로 분획하여 얻은 n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 용매 분획물을 제조하는 단계;를 포함하되, 상기 쯔보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물은, HT-1080 세포로 이루어진 세포주에서 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-2 및 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinase, MMP)-9의 mRNA와 단백질 발현을 억제하여, 세포 독성이 없는 것을 특징으로 하는 암전이 억제용 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물의 제조방법을 기술적 요지로 한다.

발명의 효과

[0021] 상기 과제에 해결 수단에 의한 본 발명에 따른 쯔보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법은, 인체 섬유육종 HT-1080 암세포에서 쯔보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물이 암세포 전이와 밀접하게 관련된 매트릭스 메탈로프로티나제 효소인 MMP-2(gelatinase A) 및 MMP-9(gelatinase B)의 mRNA와 단백질 발현을 억제함으로써, 암전이 억제용 약학적 조성물로 활용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 쯔보리사초(*Carex pumila*)의 추출 및 분획 과정도.
- 도 2는 CH₂Cl₂ 추출물과 MeOH 추출물의 MMP-2 및 MMP-9 활성을 나타낸 그래프.
- 도 3은 쯔보리사초 추출물의 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 및 단백질 발현 수준을 나타낸 그래프.
- 도 4는 쯔보리사초 분획물의 세포생존율에 대한 영향을 나타낸 그래프.
- 도 5는 쯔보리사초 분획물의 MMP-2 및 MMP-9 활성을 나타낸 그래프.
- 도 6은 쯔보리사초 분획물의 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 및 단백질 발현 수준을 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명을 설명하기에 앞서, 우선 높은 염농도의 토양에서 생육하는 식물을 염생식물이라고 하는데, 강한 바람과 햇빛, 해무, 해수에 의한 침수, 염분 섞인 지하수 등의 영향을 늘 받기 때문에 염생식물은 이러한 혹독한 환경에서 생존하기 위한 독특한 생리적 기전을 갖추고 있다.
- [0024] 즉 염생식물은 독특한 생리기전으로 인해 생리 활성을 가지는 이차대사산물이 생성된다 할 수 있는데, 예를 들어, 염생식물 통통마디에서 분리된 isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranosid과 quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside는 유의적인 지방 세포 분화 억제효과를 보이고 있다.
- [0025] 염생식물 중 쯔보리사초(*Carex pumila*)는 세계적으로 호주, 뉴질랜드, 일본, 중국, 대만, 칠레, 시베리아 남부 지역 등에 서식하고, 한반도에서는 동·서·남해안 및 제주도 일대에서 서식하는 사초과의 다년생 초본식물이다.
- [0026] 쯔보리사초는 토양수분함량이 높은 생육지를 원하기 때문에 고도가 낮은 사구지역과 담수가 해양으로 유입되는 지역에 주로 분포한다. 굵은 뿌리줄기가 땅속으로 길게 뻗고 줄기는 10~20cm이며, 잎의 폭은 2~4mm로 광택이 나고 질기다. 2~3개의 수꽃이 꽃 자루 윗부분에 있고, 1~2개의 암꽃이 아래로 약간 떨어져 붙어 있으며 모두 자갈색이다.
- [0027] 쯔보리사초의 성분으로는 (-)-ε-viniferin, miyabenols C와 A, kobophenol B 등이 있는데, Kobophenol B는 황색포도당구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 억제 활성이 있다.
- [0028] 이러한 활성을 가진 쯔보리사초는 알레르기 반응 억제에 대한 연구는 보고된 적 있으나, 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinases, MMPs) 활성 저해에 관한 연구는 이루어진 적이 없다.
- [0029] 따라서 본 발명에서는 염생식물로부터 MMPs 저해활성을 가지는 물질을 탐색하는 과정 중에 다른 염생식물 추출물에 비해 해안사구에서 자라는 쯔보리사초 추출물의 MMPs 활성 저해능이 높은 것을 확인하여 쯔보리사초를 추출 및 분획함으로써 HT-1080 세포에서의 MMPs 활성 및 발현에 미치는 쯔보리사초의 MMPs 억제 소재로서의 개발 가능성에 관해 설명해 보고자 한다.
- [0031] 이하, 본 발명의 쯔보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물 및 이의 제조방법을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0032] 본 발명은 쯔보리사초(*Carex pumila*)를 비극성용매 및 극성용매로 하여 추출한 쯔보리사초 추출물 또는 이의 용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 것이 특징이다.
- [0033] 첫째, 쯔보리사초 추출물은 쯔보리사초의 잎과 뿌리를 비극성용매로 추출하여 비극성용매 추출물을 얻고, 쯔보리사초를 극성용매로 추출하여 극성용매 추출물로 얻은 후, 비극성용매 추출물과 극성용매 추출물을 혼합하여 형성되는 구성이다.

- [0034] 비극성용매는 디클로로메탄(dichloromethane, CH_2Cl_2)으로 이루어질 수 있고, 극성용매는 탄소수 1 내지 4의 알코올일 수 있는데, 그 중 메탄올(methanol, CH_3OH) 및 에탄올(ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 중 어느 하나 이상으로 이루어질 수 있다.
- [0035] 비극성용매와 극성용매를 함께 사용하여 쯔보리사초를 추출하는 이유는, 극성용매로만 추출하게 되면 쯔보리사초의 유용성분이 100% 추출되지 않을 수 있기 때문이다. 이런 이유로 세포벽면을 다 녹여 유기성분을 모두 추출할 수 있는 비극성용매인 디클로로메탄을 함께 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 추출용매로 사용된 비극성용매와 극성용매는 서로 섞일 수 있는 성질을 가지고 있어, 비극성용매로 추출할 때 극성이 있는 성분들이 함께 띠려올 수도 있기 때문에 비극성용매 추출물과 극성용매 추출물을 혼합하여 조추출물(Crude Extract)인 쯔보리사초 추출물을 형성하는 것이 바람직한 것이다. 단, 본 발명에서 언급되는 '조추출물'은 쯔보리사초를 비극성용매 및 극성용매로 하여 추출한 '쯔보리사초 추출물'과 동일한 의미로 해석하기로 한다.
- [0037] 둘째, 쯔보리사초의 용매 분획물은 쯔보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후, 디클로로메탄층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하고, 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H_2O)로 분획하여 얻은 n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 구성이다.
- [0038] 즉 쯔보리사초 추출물을 물 또는 유기용매를 이용하여 순차적으로 분획한 것으로, 쯔보리사초 추출물을 디클로로메탄과 물을 이용해 디클로로메탄층과 물층으로 나눈 후, 디클로로메탄층을 농축한 다음 n-헥산(n-hexane) 및 85% 메탄올(85% aq.MeOH)로 분획하고, 물층을 농축한 다음 n-부탄올(n-BuOH) 및 물(H_2O)로 분획함으로써, 이로부터 얻은 n-헥산 분획물, 85% 메탄올 분획물, n-부탄올 분획물 및 물 분획물 중 어느 하나 이상인 쯔보리사초 분획물로 제조할 수 있게 된다.
- [0039] 참고로, 본 발명의 매트릭스 메탈로프로티나제 활성 억제 조성물은 약학 조성물로 적용될 수 있기 때문에 쯔보리사초를 주성분인 에탄올(ethyl alcohol, ethanol)만을 사용하여 추출도 가능하다.
- [0040] 한편, 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinases, MMPs)의 경우, 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 재형성 및 분해와 관련된 Ca^{2+} , Zn^{2+} 의존성 켈티드내부가수분해효소(endopeptidase)로써, 콜라겐분해효소(collagenase), 젤라틴분해효소(gelatinase), 스트로멜라이신(stromelysin)을 포함하며, 이들은 암, 특히 중앙 혈관신생과 전이, 조직복구, 경화증, 관절염, 염증 및 혈관 질환과 같은 다양한 생리적, 병리적 과정과 연관되어 있다.
- [0041] MMPs는 암세포의 생존과 팽창과 관련이 있는데, 근거리 분비 방식의 암세포는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), 성장인자 및 MMP 유도체를 분비함으로써 숙주세포가 MMPs를 생산하도록 자극한다. 정상세포에서 분비된 MMPs는 암세포 표면에 결합하여 중앙세포에 의해 사용된다.
- [0042] MMPs 중 MMP-2(72kDa)와 MMP-9(92kDa)은 gelatinase A, gelatinase B라고도 하며, 탄성조직의 단백질을 붕괴시키는 elastolytic activity를 갖는다. 이러한 젤라틴분해효소(gelatinase)는 증가된 발현상태에서 암세포로 이루어진 악성종양의 침윤 및 전이 활동과 연관되어 있다.
- [0044] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0045] <실시예 1>
- [0046] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 쯔보리사초(*Carex pumila*)의 추출 및 분획 과정도로서, 도 1에 도시된 바와 같이 실험재료로 사용된 쯔보리사초는 전라남도 무안군에서 채집하였고, dichloromethane(CH_2Cl_2)에 24시간 동안 침지시킨 후 여과하는 방식을 2회 실시하여 추출물을 얻었다. 그리고 남은 잔사에 동량의 methanol(MeOH)을 이용하여 동일한 방식으로 추출물을 얻었으며, 추출물은 감압회전증발기로 농축하였다.
- [0047] 각각의 추출물을 합한 조추출물을 동량의 CH_2Cl_2 와 H_2O 를 이용하여 분획한 후, CH_2Cl_2 층을 n-hexane과 85% aq.MeOH를 이용하여 다시 분획하였고, H_2O 층은 n-butanol(n-BuOH)을 이용하여 분획을 실시하여 각각의 분획층을 얻었다.
- [0049] 이하, 상술된 실시예에 따라 획득한 쯔보리사초 추출물 또는 이의 분획물을 이용한 실험예를 상세하게 설명하면

다음과 같다.

[0050] <세포배양>

[0051] 실험에 사용된 인간 섬유육종 세포주인 HT-1080 세포는 100unit/mL penicillin-streptomycin(Gibco-BRL, USA), 10% fetal bovine serum(FBS)(GenDEPOT, USA)을 첨가한 RPMI 1640(GenDEPOT, USA)을 배양액으로 하여 37℃, 5% CO₂ incubator(Formascientific, Japan)에서 배양하였다.

[0052] 배양된 세포의 배지는 일주일에 2~3회 교환해주었고, 세포 밀도가 높아지면 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.02% EDTA)(Gibco-BRL, USA)를 수분간 처리하여 세포를 떼어내고 계대배양하였다.

[0053] <세포독성 측정>

[0054] 세포생존율을 측정하기 위해 배양된 세포를 5×10^3 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지와 각 농도별로 준비된 시료를 처리하여 24시간동안 동일한 조건에서 배양하였다.

[0055] 대조군에는 시료가 아닌 phosphate buffered saline(PBS)를 처리하였다. 24시간 배양 후 PBS로 세포를 세척하고 100 μL의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, 1mg/mL) 용액을 첨가하여 4시간 동안 동일한 조건에서 배양하였다.

[0056] MTT formazan crystal 생성량을 측정하기 위해 각 well당 100 μL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 처리하여 formazan crystal을 완전히 녹인 후 ELISA reader(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 구하였다.

[0057] <Gelatin zymography를 이용한 MMP-2, MMP-9 활성 측정>

[0058] HT-1080 세포를 2×10^5 cells/well이 되도록 24 well plate에 분주하여 24시간동안 고착시켰다. 고착된 세포에 serum free medium로 교체한 후 일정한 농도의 시료를 처리하여 1시간 동안 배양하였고 MMP 발현 유도를 위하여 phorbol 12-myristate-13-acetate(PMA, 10ng/mL)(Sigma aldrich, USA)를 처리하였다.

[0059] 이를 24시간 동안 배양하여 얻은 상등액은 Bradford 단백질 결정법으로 전체 단백질 함량을 정량하여 동등한 양의 단백질을 가지는 조정배지가 되게 하였다. 정량한 상등액은 1.5mg/mL gelatin (Sigma aldrich, USA)을 함유한 비환원조건의 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였다. Sodium dodecyl sulfate(SDS)를 제거하기 위해 2.5% Triton X-100(JUNSEI, Japan)을 함유하는 50mM Tris-HCl(pH 7.5)로 polyacrylamide gel을 세척하였다.

[0060] 세척 후 MMP에 의한 gelatin 가수분해를 유도하기 위해 developing buffer(10mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl)를 이용하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다.

[0061] 반응이 끝난 gel을 0.5% Coomassie brilliant blue 250(LPS solution, Korea)에 담가 30분간 염색시킨 후 destaining buffer(acetic acid : water : methanol = 10 : 40 : 50)로 탈색시켰다. Gelatin이 분해되어 투명하게 나타나는 band의 면적을 비교하여 MMP-2와 MMP-9의 활성을 측정하였다.

[0062] <Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석>

[0063] PMA로 유도된 HT-1080 세포에서 줌보리사초 CH₂Cl₂ 추출물과 MeOH 추출물의 농도별 처리에 의한 MMP-2와 MMP-9의 생성량을 R&D system의 효소면역측정법을 사용하여 측정하였다.

[0064] DuoSet ELISA kit(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)의 96 well plate의 각 well에 100 μL의 capture antibody(MMP-2, #843027: 2 μg/mL, MMP-9, #844926: 1 μg/mL)를 처리하여 상온에서 overnight시켰다.

[0065] 25X Wash Buffer(0.05% Tween 20 in PBS 25X)를 1X로 희석한 Wash Buffer로 세척 후 10X Reagent Diluent(1% BSA in PBS)를 희석한 300 μL의 1X Reagent Diluent를 처리하고 1시간 반응시켜 blocking하였다.

[0066] Wash Buffer로 세척 후 일정농도의 시료 100 μL 처리하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 시료는 zymography에서 준비된 상등액을 채취하여 사용하였다. 세척 후 각 well에 100 μL의 detection antibody(MMP-2, #843028: 10ng/mL, MMP-9, #844927: 150ng/mL)를 처리하여 상온에서 2시간 반응시켰다.

[0067] 세척 후 100 μL의 Streptavidin-HRP(horseradish-peroxidase, #890803)을 처리하여 암실에서 20분간 반응시킨 후 세척하고 100 μL의 Substrate solution(H₂O₂ : Tetramethylbenzidine = 1 : 1)을 처리하여 암실에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 50 μL의 Stop solution (2 NH₂SO₄)을 첨가하여 450nm에서 ELISA reader(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)로 흡광도를 측정하였다.

[0068] <Cell migration assay>

[0069] HT-1080세포를 12 well plate에 well 당 세포의 밀도가 80~90%가 되도록 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 2mm white tip을 이용하여 well의 가운데를 일자로 scratch하여 wound를 줬다. 세포를 PBS로 세척한 다음 serum free medium으로 교환한 후 각 well에 100 μg/mL 농도로 시료를 처리하였다. Cell migration은 현미경(Nikon Eclipse TS100, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) 상에서 관찰되었고 시료처리 후 0h과 24h의 사진 촬영을 하였다.

[0070] <RNA 분리와 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 분석>

[0071] 동일 조건으로 시료 처리된 HT-1080 세포를 PBS로 세척하고 Trizol reagent(ambion, life technologiesTM, USA)를 사용하여 세포의 전체 RNA를 추출하고 정량하였다.

[0072] Oligo-DT, primer 및 SuperScriptTM II reverse transcriptase를 이용하여 동량의 RNA(2 μg)에서 단일가닥의 cDNA로 합성하였다. Target cDNA는 MMP-2와 MMP-9 primer를 사용하여 PCR 방법으로 증폭하였고, internal control gene으로 β-actin을 사용하였다. 단, RT-PCR용 프라이머 서열은 아래의 표 1에 나타내었다.

표 1

Gene name	Sequence
MMP-2	Forward 5'-ATG-GCA-AGT-ACG-GCT-TCT-GT-3'
	Reverse 5'-ATA-CTT-CTT-GTC-GCG-GTC-GT-3'
MMP-9	Forward 5'-CTC-GAA-CTT-TGA-CAG-CGA-CA-3'
	Reverse 5'-GCC-ATT-CAC-GTC-GTC-CTT-AT-3'
β-actin	Forward 5'-AGC-CAT-GTA-CGT-AGC-CAT-CC-3'
	Reverse 5'-TCC-CTC-TCA-GCT-GTG-GTG-GT-3'

[0073]

[0074] T100 Thermal Cycler(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 5분간 95℃에서 pre-denaturation을 하고 한 cycle이 45초간 95℃에서 denaturation, 1분간 60℃에서 annealing, 45초간 72℃에서 extension인 과정을 30번 반복하여 cDNA를 증폭시켰다.

[0075] 증폭된 PCR 산물들은 1.5% agarose gel을 사용하여 100V에서 10분간 전기영동하여 분리시킨 후 ethidium bromide 용액에서 20분간 반응시키고 UV(Davinch-Chemi imagerTM, ACS-400SM, Davinch-K, Seoul, Korea)를 이용하여 mRNA 발현 정도를 관찰하였다.

[0076] <Western blot 분석>

[0077] 단백질 발현을 분석하기 위해 Western blot을 실시하였다. 먼저 RIPA lysis buffer(Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA)로 시료 처리된 HT-1080 세포에서 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA kit(Thermo scientific, USA)를 이용하여 정량하였고 동량의 단백질(20 μg)을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel에서 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Buckinghamshire, UK)으로 단백질을 이동시켰고 5% skim milk로 blocking하였다. 그 후 각각의 단백질의 발현을 분석하기 위해 각각의 단백질에 특이적인 항체(Cell Signaling Technology, MA, USA)인 MMP-2(#13132), MMP-9(#13667), β-actin(#3700)을 사용하였다. 세척 후 2차 항체(Cell Signaling Technology, MA, USA),

(#7074, #7076)를 상온에서 1시간 동안 반응시켜 detection시켰다. 세척 후 enhanced chemiluminescence(ECL) system(GE healthcare, UK)으로 반응 후 CAS-400SM Davinch-Chemi imager™(Davinch-K)을 사용하여 protein band를 관찰하였다.

[0078] <통계처리>

[0079] 실험결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 표시하였으며, statistical analysis system v9.1(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계프로그램을 이용하여 실험 결과의 유의성을 검토하였다.

[0080] 집단 간의 유의성 검정을 위해 일원 배치 분산분석(ANOVA)을 행하였고 사후검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

[0082] 이하, 상술된 실험예에 따른 결과를 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0083] <좁보리사초 추출물의 MMP-2와 MMP-9 활성 억제 효과>

[0084] 도 2는 CH₂Cl₂ 추출물과 MeOH 추출물의 MMP-2 및 MMP-9 활성을 나타낸 그래프이다. 도 2를 참조하면 ELISA에 의한 세포생존율, MMP-2 및 MMP-9의 분비 수준에 대한 좁보리사초 추출물의 효과 및 HT-1080 세포에서 젤라틴 zymography에 의한 조추출물의 MMP-2 및 MMP-9 활성의 효과를 나타낸 것임을 알 수 있다. ^{a-e}Mean은 Duncan's multiple range test에 의해 유의미하게 다르다($p < 0.05$). 값은 평균 ± SD(n = 3)이다.

[0085] 도 2-(a)는 좁보리사초에서 최대한 많은 물질을 추출하기 위해 극성도가 다른 두 가지 용매 CH₂Cl₂와 MeOH를 사용하여 추출하였고, 이 추출물이 HT-1080세포에 미치는 독성의 여부를 MTT assay로 확인한 것이다.

[0086] 즉 도 2-(a)를 참조하면, CH₂Cl₂와 MeOH 추출물을 각각 100, 200 μg/mL 농도로 처리하여 세포생존율을 측정한 결과, CH₂Cl₂와 MeOH 추출물의 200 μg/mL 농도에서는 HT-1080 세포에 대하여 각각 36.9%, 16.0%의 세포생존율을 보이는 독성이 나타났지만, 100 μg/mL 농도에서는 80% 이상의 세포생존율을 보여 100 μg/mL 이하의 농도에서 추출물을 이용하여 MMPs 억제 활성 실험을 실시하였다.

[0087] 도 2-(b)는 PMA 처리에 의한 MMP-2 분비 정도를 ELISA kit를 사용하여 평가한 결과를 나타낸 것이고, 도 2-(c)는 PMA 처리에 의한 MMP-9 분비 정도를 ELISA kit를 사용하여 평가한 결과를 나타낸 것이다.

[0088] 도 2-(b) 및 도 2-(c)를 참조하면, PMA만 처리한 세포의 MMP-2와 MMP-9 분비수준은 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 약 2-3배로 높게 나타났다. PMA와 좁보리사초 CH₂Cl₂ 추출물을 함께 처리한 결과, PMA 단독 처리군과 비교하였을 때 농도 의존적으로 MMP-2와 MMP-9 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. MeOH 추출물의 경우 MMP-9보다는 MMP-2의 생성 억제 효과가 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0089] 도 2-(a), 도 2-(b) 및 도 2-(c)의 결과에서와 같이 추출물 단계에서 좁보리사초의 MMPs 생성 억제능의 가능성을 검토한 후 CH₂Cl₂와 MeOH 추출물을 합한 조추출물을 시료로 하여 MMPs 억제 활성 실험을 추가적으로 진행하였다.

[0090] MMPs의 발현은 암의 진행에 있어서 직접적인 영향을 주는데, 그 중에서 gelatinase인 MMP-2와 MMP-9은 암세포로 이루어진 악성종양세포의 전이와 침윤에 특히 연관되어 있다. 따라서 도 2-(d)에 좁보리사초 조추출물이 HT-1080 세포에서 PMA에 의한 MMP-2와 MMP-9의 분비에 미치는 효과를 효소 기질 분해능을 이용하여 활성을 확인하는 방법인 gelatin zymography를 이용하여 세포 독성을 나타내지 않는 범위에서 평가한 것을 나타내었다.

[0091] 이는 효소적 활성을 보는 실험이므로 FBS가 없는 medium으로 진행하였다. PMA를 단독으로 처리한 세포에서는 PMA와 sample을 모두 처리하지 않은 세포에 비하여 MMP-2와 MMP-9의 발현이 뚜렷하게 증가한 것을 확인할 수 있으며, 이러한 증가는 조추출물의 처리에 의해 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. PMA와 함께 조추출물을 100 μg/mL 농도로 처리한 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 발현 억제율이 각각 41.7%, 20.7%로 MMP-9보다는 MMP-2의 발현을 유의적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 도 3은 좁보리사초 추출물의 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 및 단백질 발현 수준을 나타낸 그래프이다. 도 3을 참조하면, HT-1080 세포에서 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 검정에 의해 각각 관찰된 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현 수준에 대한 좁보리사초로부터의 조추출물의 효과를 나타낸 것임을 알 수 있다. ^{a-e}Mean은 Duncan's multiple range test에 의해 유의미하게 다르다($p < 0.05$). 값은 평균 ± SD(n = 3)이다.

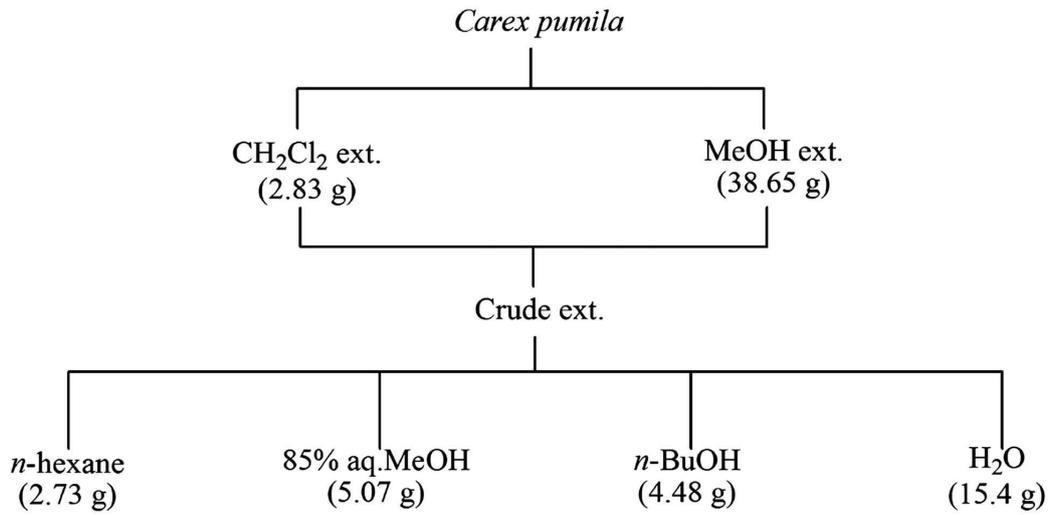
- [0093] 즉 도 3은 조추출물의 MMP 생성억제효과와 암세포 전이 관련 인자와의 연관성을 알아보기 위해 HT-1080 세포에서 조추출물에 의해 일어나는 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현 및 단백질 발현 수준을 RT-PCR 및 Western blot assay를 이용하여 분석해 나타낸 것이다.
- [0094] 내용인즉 조추출물의 처리에 의해 MMP-2와 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. RT-PCR 결과, PMA를 단독으로 처리한 세포에서는 PMA와 sample을 모두 처리 하지 않은 세포에 비하여 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현이 뚜렷하게 증가하였으며 PMA와 함께 조추출물을 100 μ g/mL 농도로 처리한 세포에서 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 발현 억제율이 각각 33.5%, 43.1%를 나타내었다(도 3-(a) 참고).
- [0095] 도 3-(b)를 참조하면, Western blot 분석 결과, 추출물을 처리한 세포에서의 MMP-2와 MMP-9 단백질 수준은 각각 62.3%, 49.1%를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0096] <좁보리사초 분획물의 MMP-2와 MMP-9 활성 억제 효과>
- [0097] 도 4는 좁보리사초 분획물의 세포생존율에 대한 영향을 나타낸 그래프이다. 도 4를 참조하면, HT-1080 세포에 MTT 분석 및 ELISA 분석에 의하여 MMP-2, MMP-9의 분비 수준에 의해 세포생존율에 좁보리사초에서의 용매 분획물의 효과를 나타낸 것임을 알 수 있다.
- [0098] 도 4-(a)에서와 같이, 좁보리사초의 CH_2Cl_2 추출물과 MeOH 추출물을 혼합한 조추출물을 용매 극성에 따라 n-hexane, 85% aq.MeOH, n-BuOH, H_2O 로 분획한 다음, 좁보리사초의 용매 분획물이 HT-1080 세포에 미치는 독성의 여부를 MTT assay로 확인하였다. 용매 분획물을 각각 10, 50, 100, 200 μ g/mL 농도로 처리하여 세포생존율을 측정 한 결과, 모든 시료는 100 μ g/mL의 처리농도까지 HT-1080 세포에 대하여 80% 이상의 세포생존율을 보여 100 μ g/mL의 농도에서 MMPs 억제 활성 실험을 실시하였다.
- [0099] 도 4-(b) 및 도 4-(c)를 참조하면, PMA 처리에 의한 MMP-2와 MMP-9 분비 수준을 ELISA법으로 평가한 결과, PMA를 단독으로 처리한 세포에서의 MMP-2와 MMP-9 분비수준이 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 높게 나타남을 알 수 있다. PMA와 좁보리사초 용매 분획물을 함께 처리한 세포에서는 n-hexan은 유의적인 MMP-2 분비 억제효과를 보였으며, 85% aq.MeOH 분획층이 가장 우수한 MMP-2와 MMP-9 분비억제효과를 나타내었다. 이는 control과 blank를 대비하여 거의 완전한 억제효과를 보였다.
- [0100] 도 5는 좁보리사초 분획물의 MMP-2 및 MMP-9 활성을 나타낸 그래프로써, HT-1080 세포에서 gelatin zymography 및 세포이동에 의한 좁보리사초로부터의 용매 분획의 MMP-2 및 MMP-9 활성에 대한 효과를 나타낸 것이다.
- [0101] 도 5-(a)에 도시된 바와 같이, 좁보리사초 용매 분획물이 HT-1080 세포에서 PMA에 의한 MMP-2와 MMP-9 발현에 미치는 효과를 gelatin zymography로 평가한 결과, PMA를 단독으로 처리한 세포에서는 PMA와 sample을 모두 처리 하지 않은 세포에 비하여 MMP-2와 MMP-9의 발현이 뚜렷하게 증가한 것을 확인할 수 있었으며, PMA와 좁보리사초 용매 분획물을 함께 처리한 세포에서는 85% aq.MeOH 분획층이 가장 우수한 MMP-2와 MMP-9 발현 억제효과를 나타내었다.
- [0102] MMP-2의 경우에는 65.3%, MMP-9의 경우에는 70.2%의 MMPs 발현 억제율이 나타났다. MMP-2 및 MMP-9의 생성과 세포성장, 분화, 사멸, 이동과의 상관성에 대해 보고된 바 있으며, 이러한 보고는 MMP-2 small interfering RNA(siRNA)를 처리하여 세포 성장과 이동을 억제시키는 메커니즘 연구를 통해 확인되었다. 좁보리사초 용매분획물의 HT-1080 세포의 이동성에 미치는 영향을 cell migration법을 이용하여 측정하였다(도 5-(b) 참고).
- [0103] 즉 FBS의 영향에 의한 세포 증식을 막기 위해 serum free medium을 사용하였다. Sample을 처리하지 않은 세포는 24시간 후 이동패턴을 보였으나, 100 μ g/mL의 처리농도에서 세포는 억제된 이동패턴을 보였다. 모든 용매 분획물에서 유의적인 세포이동 억제를 확인할 수 있으며, 특히 85% aq.MeOH 분획층이 가장 큰 세포이동 저해능을 나타내었다.
- [0104] 도 6은 좁보리사초 분획물의 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 및 단백질 발현 수준을 나타낸 그래프로써, RT-PCR에 의해 관찰된 MMP-2 및 MMP-9의 mRNA 발현 수준 및 HT-1080 세포에서 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰된 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현 수준에 대한 좁보리사초의 용매 분획의 효과를 나타낸 것이다.
- [0105] 즉 도 6은 HT-1080 세포에서 용매 분획물에 의해 일어나는 MMP-2와 MMP-9의 mRNA 및 단백질 발현 수준은 RT-PCR 및 Western blot assay를 이용하여 분석해 나타낸 것으로, 용매 분획물의 처리에 의해 MMP-2와 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현량이 감소하는 경향을 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0106] RT-PCR 결과, PMA를 단독으로 처리한 세포에서는 PMA와 sample을 모두 처리하지 않은 세포에 비하여 MMP-2와

MMP-9의 mRNA 발현이 뚜렷하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. PMA와 100 μg/mL 농도의 용매 분획물로 처리한 결과, MMP-2의 경우 n-BuOH 분획층에서 82.6%의 가장 높은 억제율을 나타내었고, MMP-9의 경우 85% aq.MeOH 분획층에서 56.7%의 가장 높은 mRNA 발현 억제율을 나타내었다(도 6-(a) 참고).

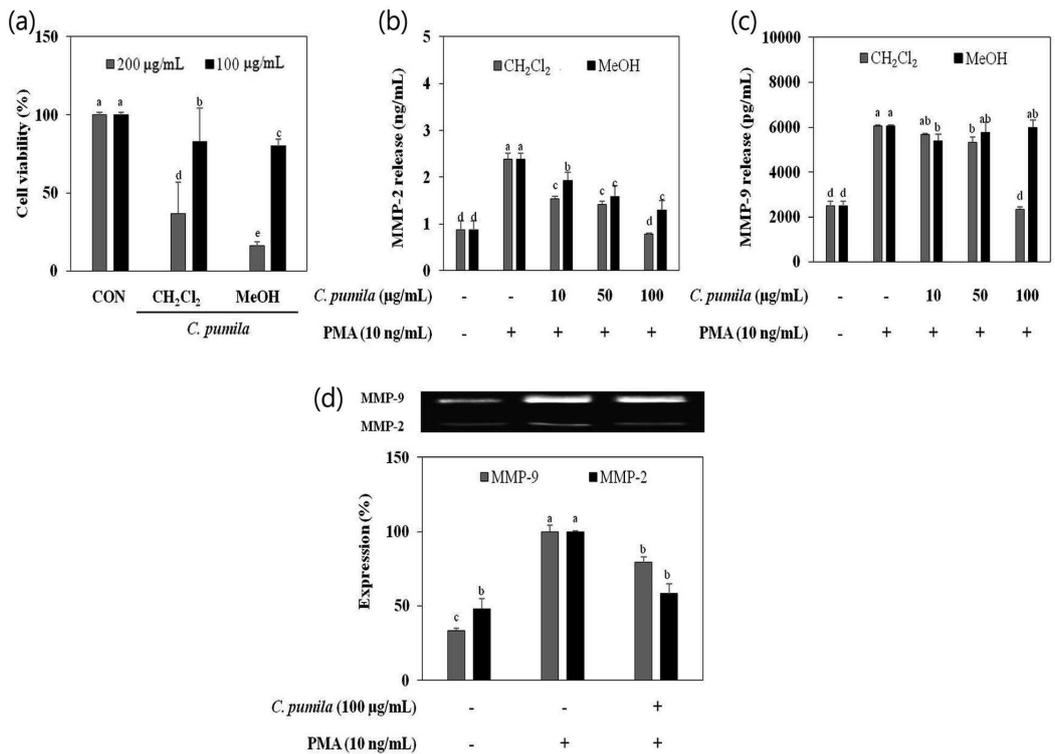
- [0107] 그리고 도 6-(b)에 의하면, Western blot assay 결과, 용매 분획물 처리에 의해, MMP-2의 경우에는 n-BuOH 분획이 39.6%, MMP-9의 경우에는 85% aq.MeOH 분획층이 29.1%의 단백질 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0108] 상술된 결과로부터 n-BuOH과 85% aq.MeOH 분획층에서 MMP-2 및 MMP-9 생성에 대해 높은 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0110] 이하, 상술된 실시예 및 실험예를 통한 결론을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0111] 염생식물은 해안가, 염습지, 갯벌, 내륙 사막 등 전세계에 2,500여 종이 서식하며, 이러한 극한의 환경에서 생존하기 위한 생존기전을 가짐으로써 다양한 생체 활성 분자를 합성한다.
- [0112] 염생식물인 줌보리사초의 MeOH 추출물에서 분리된 성분으로 (-)-ε-viniferin, miyabenols C와 A, kobophenol B 등이 보고된 적은 있지만 매트릭스 메탈로프로티나제(matrix metalloproteinases, MMPs) 활성 억제 효과에 대한 연구는 이루어지지 않아 본 발명에서는 HT-1080 인간 섬유육종 세포에서 염생식물 중 줌보리사초의 MMPs 활성 억제 효과를 알아본 것이다.
- [0113] 앞서 언급한바 있듯이, MMP-2와 MMP-9은 증가된 발현상태에서 악성종양의 침윤 및 전이 활동과 연관되어 있으며, elastolytic activity를 갖는 효소이다. 이러한 MMP-2와 MMP-9에 대한 줌보리사초 추출물의 효소적 활성, mRNA 및 단백질 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 gelatin zymography, ELISA assay, RT-PCR, Western blot assay를 수행하여 유의적인 MMPs 활성 억제 효과를 확인하였다.
- [0114] 그리고 줌보리사초의 MMPs 활성 억제 효과를 나타내는 물질의 특성을 알아보기 위하여 합쳐진 조추출물을 극성도에 따라 n-hexane, 85% aq.MeOH, n-butanol, water로 분획하여 용매 분획물을 얻었다. MMP-2와 MMP-9에 대한 각각의 용매 분획물의 효소적 활성, 세포이동, mRNA 및 단백질 발현 억제 효과를 조사하기 위하여 gelatin zymography, ELISA assay, cell migration assay, RT-PCR, Western blot assay를 수행하였다.
- [0115] 용매 분획물들 중에는 85% aq.MeOH 분획층이 MMP-2와 MMP-9의 효소적 활성과 세포이동을 현저하게 억제하였으며 MMP-9의 mRNA와 단백질 발현을 가장 많이 감소시켰다.
- [0116] 또한 n-BuOH 분획이 가장 우수한 MMP-2의 mRNA와 단백질 발현 억제 효과를 보여주었다. 시료의 85% aq.MeOH과 n-BuOH 분획층이 유의적인 MMPs 활성 억제 효과를 나타내는데, 줌보리사초 용매추출 및 분획물에서는 85% aq.MeOH 분획층이 가장 우수한 MMPs 활성 억제 효과를 나타내어 이 분획층에 효과적인 MMPs 억제 활성 물질이 존재한다는 것에 의미가 있다.
- [0118] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다.
- [0119] 따라서 본 발명에 개시된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라, 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것도 아니다.
- [0120] 본 발명의 보호 범위는 특허청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

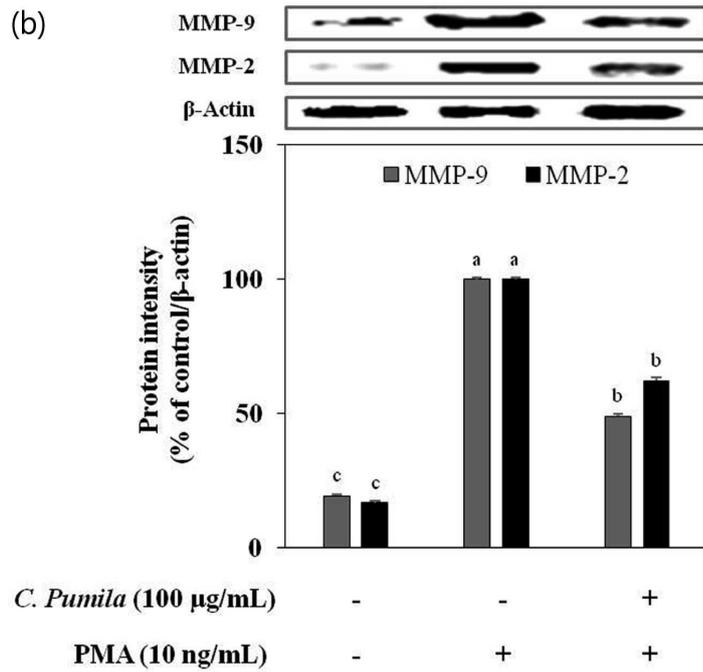
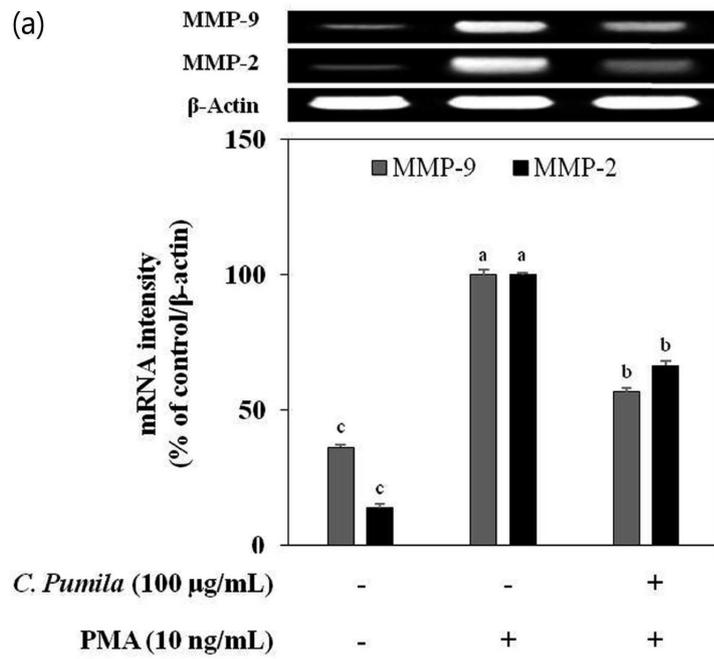
도면1



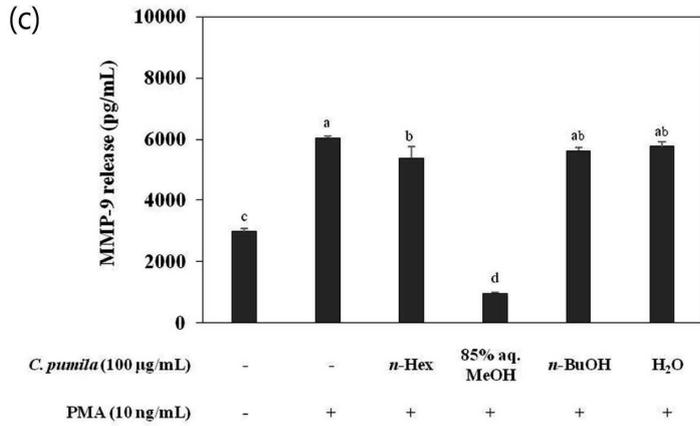
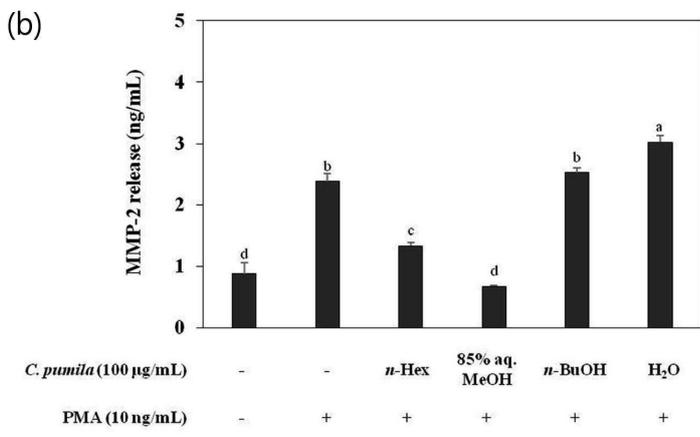
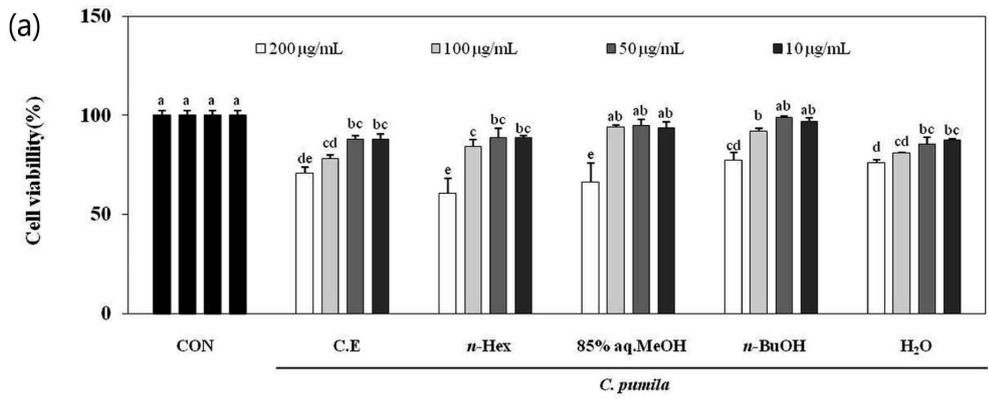
도면2



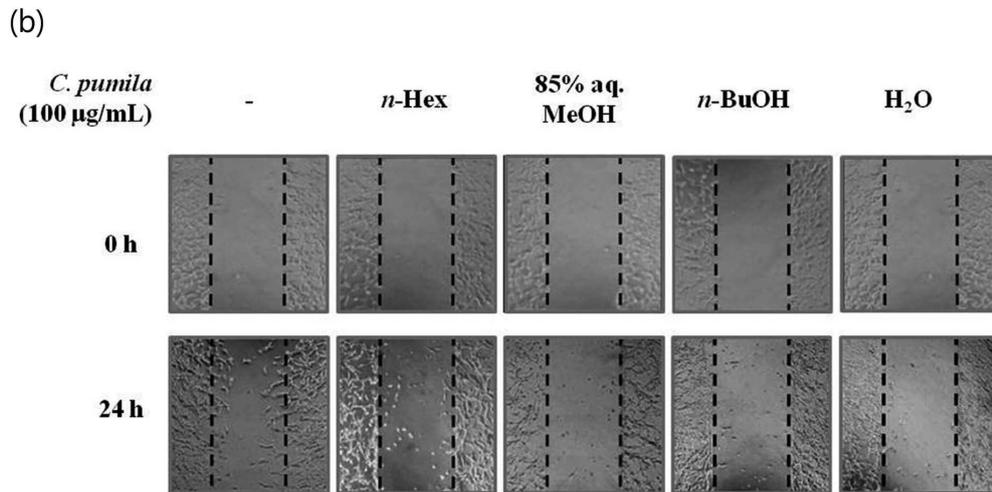
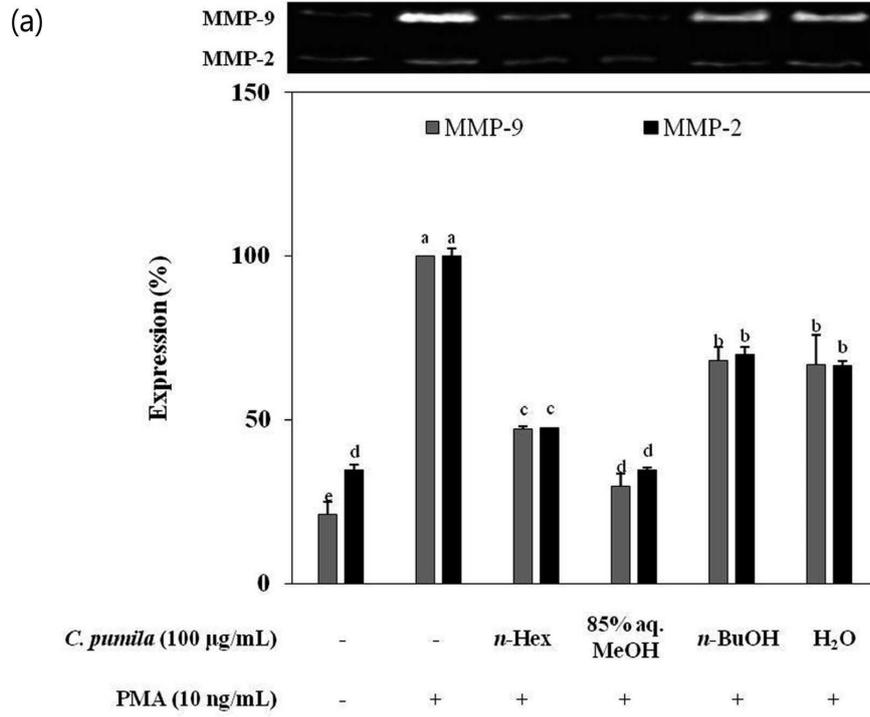
도면3



도면4



도면5



도면6

