



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1524230

(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/815 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0092484

(22) 출원일자 2013년08월05일

심사청구일자 2013년08월05일

(65) 공개번호 10-2015-0016712

(43) 공개일자 2015년02월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR100497944 B1

KR100764813 B1

구용모 등. 대한한의학회지. 2008, 29(3), pp.144-154

Li, F. et al. Pharmaceutical biology. 2001, 39(5), 351-356*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

동우당제약(주)

경북 영천시 임고면 운주로 267-14,

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

(72) 발명자

허담

대구광역시 수성구 용학로 149 (지산동)

정선용

경기 용인시 기흥구 예현로 15, 107동 1401호 (서천동, 서그내마을에스케이아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이성우

전체 청구항 수 : 총 1 항

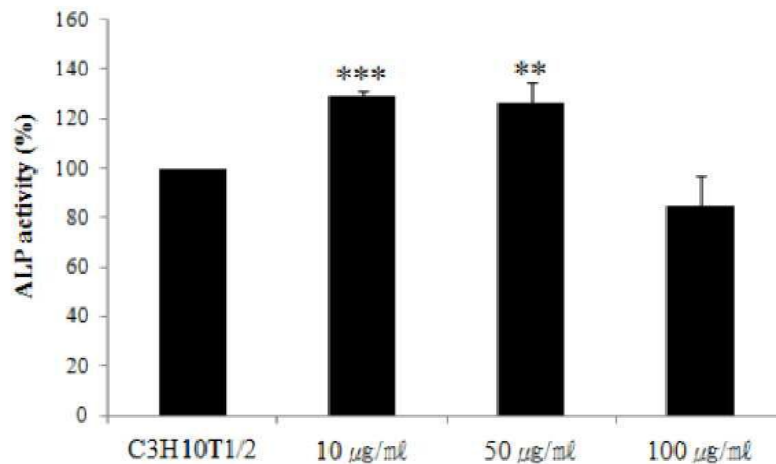
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 지골피 에탄올 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 지골피 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 지골피 추출물을 포함하는 조성물은 골대사에 영향을 미치는 세포의 증식을 촉진하면서 조골세포 분화 활성을 유도하고 골다공증 동물 모델에서의 골밀도 개선 효과를 가짐으로써 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 가진다. 따라서, 본 발명의 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 골대사 관련 질환, 예를 들어 골다공증, 골감소증, 골연화증, 칼슘조절 이상, 즉 고칼슘혈증, 저칼슘혈증의 예방 및 골기능 개선을 위한 약학적 제제 또는 기능성 식품으로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

진현석

서울 구로구 구로동로18길 20-4, 301호 (구로동)

이지원

경북 경산시 대학로16길 45, 202호 (정평동, 성문하이츠)

강민정

경북 경산시 압량면 압록3로2길 7-5,

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111133-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 골대사 조절 핵심 유전자의 발현 조절 효능을 가진 골다공증 예방 및 증상 개선 기능성 식품 개발 및 상품화

기여율 1/1

주관기관 동우당제약 주식회사

연구기간 2011.11.26 ~ 2014.12.25

명세서

청구범위

청구항 1

지골피 추출물을 전체 조성물 중에 10 ug/ml 내지 50 ug/ml의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 지골피 에탄올 추출물을 포함하는 골다공증 예방을 위한 조성물로서,

상기 지골피 추출물이 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 제조된 것을 특징으로 하는 골다공증 예방을 위한 조성물:

(S1) 지골피를 50 내지 60℃에서 열풍건조시킨 다음, 60메쉬 이하의 크기로 분쇄하는 단계;

(S2) 상기 분쇄된 지골피에 물 3.3 l 와 에탄올 7.7 l 를 가하고 80℃에서 4시간 동안 추출하여 지골피 추출액을 제조하는 단계;

(S3) 상기 수득된 지골피 추출액을 12,000 내지 15,000rpm에서 10 내지 15분간 원심분리한 다음, 60 내지 80℃에서 1차 감압농축하는 단계; 및

(S4) 상기 농축된 지골피 추출물을 여과한 후 2차 감압농축하여 지골피 에탄올 추출물을 수득하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 지골피 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 중간엽줄기세포 및 조골세포의 세포 증식 촉진 및 분화 활성을 증가시키며, 난소 절제 마우스에 골 밀도 개선 효능을 갖는 지골피 추출물을 함유하는 골대사 질환 예방 및 골 기능 개선을 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

골 조직은 골세포와 골세포 주위의 딱딱한 칼슘조직으로 둘러싸인 밀집된 결합조직으로, 지지와 근 부착의 기계적 기능을 하며, 이러한 골 조직에 의해서 뼈가 이루어져 인체의 골격을 형성한다. 또한, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능과 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 이러한 골 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포 기질과 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast) 및 골세포(osteocyte) 등 여러 종류의 세포들로 구성된다. 골수 내 간질세포(bone marrow stromal cell)로부터 유래한 조골세포는 골 형성에 주된 역할을 담당하며, 조혈모세포로부터 유래 되는 파골세포는 파괴되어 노화된 골 흡수를 담당하는데, 이러한 조골세포와 파골세포에 의한 골 형성과 골 흡수의 균형 있는 작용을 통하여 골의 재형성(remodeling)을 유

지하게 된다.

[0003] 골 재형성 유지에 주요 역할을 담당하는 조골세포와 파골세포 간의 평형에 이상이 생겼을 때 골 대사성 질환이 발생한다. 골 대사성 질환의 대표적인 예로써 골다공증이 있는데, 골다공증은 조골세포에 의한 골 형성에 비하여 파골세포의 골 흡수 활성이 증가함으로써 결과적으로 총 골량(total bone mass)이 감소하게 되어 경미한 충격에도 골절이 유발되는 질환을 말한다. 현재까지 골다공증 완치를 위한 효과적인 치료법은 없으며 예방이 강조되고 있는 실정이다.

[0004] 골 형성을 담당하는 조골 세포는 중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cell)에서 기원되어 형성되는데 조골 세포 분화에 의해 형성되는 칼슘 등을 포함한 무기질화는 뼈의 세기를 유지시켜줄 수 있을 뿐만 아니라, 신체 전체의 칼슘 및 호르몬 대사의 항상성에도 매우 중요한 기능을 하고 있다. 이러한 조골 세포의 분화에 의한 칼슘 형성은 비타민 D 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone) 등에 의해 조절되며, 세포 내에서 뼈 형태 형성단백질(bone morphogenetic protein; BMP), Wnt, MAP키나아제, 칼시뉴린-칼모둘린 키나아제(calcineurin-calmodulin kinase), NF- κ B, AP-1 등의 다양한 신호 전달 체계의 상호 작용(cross-talk)에 의해 조골 세포의 분화에 관련된 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase:ALP)가 초기 분화단계에서 합성된 후, 무기질화에 관련된 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 타입 I 콜라겐 (type 1 collagen) 등이 합성됨으로써 조골 세포의 분화에 의한 골 형성이 이루어진다고 알려져 있다.

[0005] 최근 생체 외 배양조건에서 조골세포를 생산하고 이를 이용하여 골조직의 기능을 강화하여 예방하거나 골 손상을 치료하고자 하는 노력이 급증하고 있다. 골형성 첨가물(Osteogenic supplement)과 변형 성장 인자 베타계(Transforming Growth Factor beta(TGF-beta) subfamily)가 골조직의 형성과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 특히 BMP2 또는 BMP4 등을 배양매지에 첨가하여 배양할 경우 조골세포로의 분화 유도가 증가됨이 보고되고 있다. 임상적으로 우수한 기능을 수행할 수 있는 물질을 확보하기 위해 골세포 분화 유도에 관여하는 인자 및 작용기전을 이해하는 것이 중요하다. 또한 이들의 활성을 조절하는 물질을 발굴하여 분화 유도 기술에 활용하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 조골세포를 증식시킬 뿐만 아니라 분화를 유도하는 물질을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 지골피 추출물이 중간엽줄기세포와 조골세포의 세포 증식 및 분화 활성에 효과가 있으며, 골다공증 동물 모델인 난소 절제 마우스를 대상으로 한 동물실험에서 골밀도 개선 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명에서 해결하고자 하는 기술적 과제는 골대사 질환 예방 또는 골기능 개선을 위한 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명에서는 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 골대사 질환 예방 또는 골기능 개선을 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 지골피 추출물을 포함하는 조성물은 골대사에 영향을 미치는 세포의 증식을 촉진하면서 조골세포 분화 활성에 효과가 있으며, 골다공증 동물 모델인 난소 절제 마우스를 대상으로 한 동물실험에서 골밀도 개선 효과가 있음을 확인한 것으로 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 가진다. 따라서, 본 발명의 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 골대사 관련 질환, 예를 들어 골다공증, 골감소증, 골연화증, 칼슘조절 이상, 즉 고칼슘혈증, 저칼슘혈증의 예방 및 골기능 개선을 위한 약학적 제제 또는 기능성 식품으로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 본 명세서에 첨부되는 다음의 도면들은 본 발명의 바람직한 실시예를 예시하는 것이며, 전술한 발명의 내용과

함께 본 발명의 기술사상을 더욱 이해시키는 역할을 하는 것이므로, 본 발명은 그러한 도면에 기재된 사항에만 한정되어 해석되어서는 아니 된다.

도 1은 지골피 추출물을 10 ug/ml, 50 ug/ml 및 100 ug/ml의 농도로 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포와 조골모세포인 MC3T3-E1 세포에 처리하여 세포 증식을 관찰한 결과로서, 도 1a는 C3H10T1/2 세포의 증식을 나타낸 그래프이고, 도 1b는 MC3T3-E1 세포의 증식을 나타낸 그래프이다.

도 2는 지골피 추출물을 10 ug/ml, 50 ug/ml 및 100 ug/ml의 농도로 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포와 조골모세포인 MC3T3-E1 세포에 처리하여 세포의 ALP(알칼라인 포스파타제, alkaline phosphatase) 활성을 확인한 결과로서, 도 2a는 C3H10T1/2 세포의 ALP 활성을 나타낸 그래프이고, 도 2b는 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 C3H10T1/2 세포와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포에서의 지골피 추출물에 대한 골대사 관련 유전자 마커 *Alp*, *Runx2* 및 *Bglap* (Osteocalcin, *Ocn*)에 대해 유전자 발현양을 real-time PCR 방법으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 골대사 질환 예방 또는 골기능 개선을 위한 조성물에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에서 사용하는 지골피(대한약전명: Lycium Root Bark)는 구기자 나무 뿌리껍질로, 몸이 허약하여 생기는 식은땀, 해수, 천식, 토혈, 코피, 소변출혈, 고혈당, 고혈에 좋으며, 신경통, 두통, 어깨통증, 근육통, 요통, 허리와 무릎의 무력감이 있는 경우에 사용한다. 약리작용은 심혈관계통의 혈압강하작용, 혈당강하작용이 보고되어 있다.
- [0013] 본 발명의 골대사 질환 예방 또는 골기능 개선을 위한 조성물에는 지골피 추출물이 전체 조성물 중에 1 ug/ml 내지 100 ug/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 상기 지골피 추출물의 농도가 전체 조성물 중에 1 ug/ml 미만일 경우 목적하는 골대사 관련 질환의 예방효과 및 골기능 개선효과를 기대하기 어려우며, 100 ug/ml를 초과할 경우 사용량 대비 효과가 우수하지 않으므로 농도를 늘리는 것은 무의미하다.
- [0015] 본 발명의 지골피 추출물은 지골피를 건조 및 분쇄한 다음 추출하고, 1차 농축 및 여과 과정을 거친 후 2차 농축하는 공정에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 대한민국 특허 등록 제10-0169290호에 기재된 방법에 따라 지골피 추출물을 수득할 수 있다.
- [0016] 바람직하게, 본 발명의 지골피 추출물은 하기 단계를 포함하는 방법에 따라 수득될 수 있다:
- [0017] (S1) 지골피를 50 내지 60℃에서 열풍건조시킨 다음, 60메쉬 이하의 크기로 분쇄하는 단계;
- [0018] (S2) 상기 분쇄된 지골피에 중량비로 6 내지 10배의 추출용제를 가하고, 70 내지 80℃에서 2 내지 6시간 동안 추출하는 과정을 2 내지 3회 반복하여 추출액을 제조하는 단계;
- [0019] (S3) 상기 수득된 지골피 추출액을 12,000 내지 15,000rpm에서 10 내지 15분간 원심분리한 다음, 60 내지 80℃에서 1차 감압농축하는 단계; 및
- [0020] (S4) 상기 농축된 지골피 추출물을 여과한 후 2차 감압농축하여 지골피 추출물을 수득하는 단계.
- [0021] 상기 단계 (S2)에서 추출용제는 물, 에탄올 수용액, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 특히 물과 에탄올 수용액을 1:2 내지 1:3의 부피비로 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다. 상기 에탄올 수용액의 농도는 20 내지 40%인 것이 바람직하다.
- [0022] 본 발명에서는 상기 지골피 추출물에 대한 골대사 활성을 측정하였으며, 구체적으로 골대사 연구에 주로 사용되는 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포주와 조골모세포인 MC3T3-E1 세포주를 대상으로 지골피 추출물을 처리하여 *in vitro* 실험을 진행하였다.
- [0023] 중간엽줄기세포는 조골세포 또는 지방세포로의 분화능을 지닌 세포이고, 조골모세포는 조골세포로 분화하기 이전 단계의 세포를 말한다. 이러한 두 종류의 세포주를 대상으로 지골피 추출물의 세포 증식 효과를 확인하기 위해, MTT 시험을 시행하였고, 분화 활성 효능을 확인하기 위해서는 Alkaline phosphatase (ALP) 활성 정도와 조

골세포 분화 효능을 분자 수준에서 확인하기 위해 조골세포 분화 유전자 마커들의 변화 양상을 조사하였다.

- [0024] 또한, 난소절제 마우스를 대상으로 지골피 추출물을 단기 투여(8주간) 후 골밀도 개선 효과를 확인하는 *in vivo* 실험을 진행하였다.
- [0025] 대부분의 골다공증 환자들은 여성에서 폐경에 의해 나타나는 에스트로겐 감소와 관련되어 있으므로, 골다공증 예방을 위한 건강식품 개발을 위한 동물 모델로서는 난소 절제 동물 모델이 가장 적합한 것으로 알려져 있다.
- [0026] 본 발명의 종합적인 실시 예에 따르면, 지골피 추출물을 포함하는 조성물이 중간엽줄기세포와 조골세포의 세포 증식과 분화를 촉진하는 효과가 있음을 MTT 시험과 골세포 분화와 관련한 ALP 활성과 골대사와 관련된 유전자 마커들의 발현양을 증가시키는 것을 통해 확인 하였으며, 난소 절제 마우스 대상의 동물 실험에서는 지골피 추출물의 단기 투여(8주)를 통해 골밀도 개선 효과가 있음을 확인하였다.
- [0027] 본 발명의 유효성분인 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학적 조성물을 경구형 제형으로 제제화할 경우 색깔을 부여하기 위하여 식용색소를 추가로 첨가할 수 있다. 이의 사용량은 본 발명의 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 0.1 내지 1 중량%의 양으로 첨가될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 본 발명의 지골피 추출물이 1 내지 300 mg/kg의 양으로 투여되도록 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 또한 그 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서 골대사 질환이란 예를 들어, 골다공증, 골감소증, 골연화증, 칼슘조절 이상, 즉 고칼슘혈증, 저칼슘혈증을 의미한다.
- [0033] 또한 본 발명은 골대사 질환의 예방 및 골기능 개선에 효과적인 성분과 식품학적으로 허용되는 식품 보조 첨가제를 함유하는 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 조성물 자체는 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 섭취 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 상기 조성물은 골대사 질환의 예방 및 골기능 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중 본 발명의 기능성 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 % 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 지시된 비율로, 필수 성분으로서 본 발명의 조성물을 함유하는 외에는 추가되는 성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 또는 칼슘 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트담 등)를 들 수 있으며, 칼슘으로는 산호분말(풍화산호칼슘)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0037] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 예를 들어 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호

성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 상기 착색제로는 식용색소를 추가로 첨가할 수 있다. 이의 사용량은 본 발명의 식품 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 0.1 내지 1 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0038] 본 발명에 따른 지골피 추출물을 포함하는 조성물은 골대사에 영향을 미치는 세포의 증식을 촉진하면서 조골세포 분화 활성을 유도함으로써 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 가진다. 따라서, 본 발명의 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 골대사 관련 질환, 예를 들어 골다공증, 골감소증, 골연화증, 칼슘조절 이상, 즉 고칼슘혈증, 저칼슘혈증의 예방 및 골기능 개선을 위한 약학적 제제 또는 기능성 식품으로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0040] <실시예 1> 지골피 추출물의 제조

[0041] 지골피를 구입하여 시험물질로 사용하기 전에 동우당제약(주)의 약재품질팀에서 대한약전에 근거한 정밀검사, 잔류이산화황 분석, 잔류 중금속 측정, 잔류 농약 분석 등을 통해 시험물질로서의 적합성을 확인하였다.

[0042] 지골피 1.0 kg을 깨끗이 세척하여 60℃에서 열풍건조시키고, 60매쉬 이하로 분쇄한 다음, 물 3.3 l 와 에탄올 7.7 l 를 가하고 80℃에서 4시간 동안 추출하여 지골피 추출액을 제조하였다.

[0043] 이어서, 상기 지골피 추출액을 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 다음, 약 70℃에서 수분함량이 약 30% 이하가 될 때까지 감압농축한 다음 여과한 후 다시 농축공정을 수행하여 최종 농축양이 112 g인 지골피 추출물을 수득하였다. 이 때 지골피 추출물의 농도는 76 brix 이었다.

[0044] <시험예 1> 세포의 배양

[0045] 마우스 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포와 조골모세포인 MC3T3-E1 세포를 각각 10% 우태아 혈청, 1mM의 피루브산 나트륨, 100 unit/L 페니실린 및 100 mg/L 스트렙토마이신이 첨가된 Basal Medium Eagle (BME) 배지와 α-최소 필수 배지(α-MEM) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

[0046] MC3T3-E1 세포의 경우에는 조골 분화 유도제인 ascorbic acid (50 ug/ml)와 β-Glycerophosphate (10 mM)를 첨가하여 3일 동안 분화 유도시킨 후 지골피 추출물을 처리하였다.

[0047] 상기 실시예 1에서 수득된 지골피 추출물을 멸균 증류수에 용해시켜 10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml의 3 종류의 농도군으로 C3H10T1/2 세포 및 MC3T3-E1 세포에 각각 처리하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 대조군으로 지골피 추출물을 처리하지 않은 상태에서 배양한 세포를 사용하였다.

[0048] <시험예 2> 세포 증식 분석 (cell proliferation assay)

[0049] 세포 증식 분석은 수용성 Tetrazolium salt를 이용한 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit 제품을 사용하여 측정하였다.

[0050] 구체적으로, C3H10T1/2 세포 및 MC3T3-E1 세포(3X10³ cells/well)를 96well 플레이트에 접종하여 5% CO₂가 공급되는 37℃ 조건으로 성장배지에서 24시간 동안 배양 후, 3가지의 농도(10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml)의 지골피 추출물을 세포에 처리하고, 2일 동안 배양하였다. WSTs (Tetrazolium salt)를 각각의 배양세포 및 샘플에 처리하고 37℃에서 2시간 배양하였다. 흡광도는 450nm에서 측정하였으며, 참고 파장으로 655nm를 사용하였으며, 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.

- [0051] 통계 분석은 추출물을 처리하지 않은 대조군과 각각의 추출물 처리 실험군에 대해 Student T-test를 시행하였으며, 유의 수준에 따라, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 표기하였다.
- [0052] 도 1a에서 보듯이, C3H10T1/2 세포주에서는 지골피 추출물을 처리한 모든 군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며 세포증식을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [0053] 도 1b에서 보듯이, MC3T3-E1 세포주를 대상으로 수행한 실험 결과, 지골피 추출물 10 ug/ml 처리군과 50 ug/ml 처리군에서 통계적으로 유의하게 세포증식을 촉진시키고 있음을 알 수 있었다.
- [0054] 상기와 같은 방법으로 C3H10T1/2 세포와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포에서의 지골피 추출물에 대한 세포 증식을 분석한 결과, 실험에 사용한 2종의 세포주 모두에서 지골피 추출물이 세포 증식을 촉진하는 결과를 보여 주고 있으며, 특히 지골피 추출물 10 ug/ml 농도군에서 세포 증식 촉진 효과가 가장 큰 것으로 분석되었다.
- [0055] <시험예 3> ALP 활성 분석
- [0056] 세포의 ALP 활성을 3 종류의 농도(10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml)의 지골피 추출물을 처리한 실험군 및 대조군을 48시간 동안 배양 후 측정하였다. ALP 활성은 TRACP and ALP Assay Kit를 이용하여 측정되었다.
- [0057] 구체적으로, 생리식염수로 세포를 세척한 후, 세포 용해제를 이용하여 용해된 세포에 ALP의 기질인 p-니트로페닐 포스페이트를 처리하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 이어서, 반응 중지 용액인 0.5N NaOH를 첨가한 후 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0058] 상기와 같은 방법으로 C3H10T1/2 세포와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포에서의 지골피 추출물에 대한 세포의 ALP 활성 효과를 분석하였으며, 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다. 통계 분석은 추출물을 처리하지 않은 대조군과 각각의 추출물 처리 실험군에 대해 Student T-test를 시행하였으며, 유의 수준에 따라, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ 로 표기 하였다.
- [0059] 도 2a에서 보듯이, C3H10T1/2 세포주에서는 지골피 추출물 10 ug/ml 처리군과 50 ug/ml 처리군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며, ALP 활성을 증가 시키는 것으로 확인되었다.
- [0060] 도 2b에서 보듯이, MC3T3-E1 세포주를 대상으로 시행한 동일한 실험의 결과는 지골피 추출물 10 ug/ml 처리군에서 통계적으로 유의하게 ALP 활성을 증가 시키고 있음을 알 수 있었다. 반면, 이와 상반된 결과로 100 ug/ml 처리군에서는 통계적으로 유의하게 ALP 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.
- [0061] 이와 같은 결과로부터 실험에 사용한 2종의 세포주 모두에서 지골피 추출물이 세포의 ALP 활성을 증진 시키는 결과를 보여 주고 있으며, 특히 지골피 추출물 10 ug/ml 농도군에서 세포 ALP 활성 증진 효과가 가장 좋은 것으로 분석되었다.
- [0062] <시험예 4> 조골세포 분화 유전자 마커 발현양 분석
- [0063] 조골세포 분화시 발현양의 변화를 보이는 골대사 관련 유전자 마커 중 3종의 조골 세포분화 유전자 마커 *Alp*, *Runx2* 및 *Bglap* (Osteocalcin, *Ocn*)에 대해 유전자 발현양을 real-time PCR 방법으로 확인하였다.
- [0064] 대조군 세포와 지골피 추출물을 처리한 실험군 세포를 수확한 후 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리하였고, genomic DNA를 제거하기 위해 DNase I을 상온에서 15분간 반응시킨 후 EDTA를 처리하여 DNase I을 불활성화하였다.
- [0065] 이어서, oligo dT 프라이머를 시발체로 하여 역전사 반응을 유도하여 cDNA를 합성한 후, 각 유전자의 서열 특이적 프라이머와 SYBR Green을 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 발현양에 대한 분석은 *Gapdh* 유전자를 control로 한 대상 유전자의 상대 정량법을 사용하였다. 조골세포 분화 정도를 확인하기 위해 사용한 유전자 마커의 발현양 확인을 위한 유전자 특이적 프라이머 서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

종류	유전자	서열이름	서열 정보 (5' -> 3')
Relative Control	<i>Gapdh</i>	Gapdh-F	TGA CCA CAG TCC ATG CCA TC (서열번호 1)
		Gapdh-R	GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG(서열번호 2)
조골 세포분화 유전자 마커	<i>Alp</i>	Alp-F	TCC CAC GTT TTC ACA TTC GG (서열번호 3)
		Alp-R	CCC GTT ACC ATA TAG GAT GGC C (서열번호 4)
	<i>Runx2</i>	Runx2-F	TAA AGT GAC AGT GGA CGG TCC C (서열번호 5)
		Runx2-R	TGC GCC CTA AAT CAC TGA GG (서열번호 6)
	<i>Bglap</i> (Osteocalcin)	Bglap-F	TAG TGA ACA GAC TCC GGC GCT A (서열번호 7)
		Bglap-R	TGT AGG CGG TCT TCA AGC CAT (서열번호 8)

[0066]

[0067]

상기와 같은 방법으로 C3H10T1/2 세포와 분화 유도된 MC3T3-E1 세포에서의 지골피 추출물에 대한 골대사 관련 3종의 유전자 마커 *Alp*, *Runx2* 및 *Ocn*의 발현양을 비교하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 세포 증식과 ALP 활성 시험에서 가장 효과가 좋았던 지골피 추출물 10 ug/ml 처리군에 대해서 확인하였다. 통계 분석은 추출물을 처리하지 않은 대조군과 각각의 추출물 처리 실험군에 대해 Student T-test를 시행하였으며, 유의 수준에 따라, *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001로 표기하였다.

[0068]

도 3에서 보듯이, 2종류의 세포주 모두에서 지골피 추출물이 3종의 유전자 마커 *Alp*, *Runx2* 및 *Ocn*의 발현양을 모두 증가시키고 있었으며, 특히 분화 유도된 MC3T3-E1 세포주에서 3종류의 유전자 분화 마커 발현양의 변화가 더욱 현격하였음을 알 수 있다.

[0069]

<시험예 5> 골다공증 동물모델의 골밀도 개선 효과 분석

[0070]

5주령의 sham-operated ddY 암컷 마우스 4마리와 난소절제 ddY 암컷 마우스 16마리를 중앙실험동물(주)에서 공급 받아 아주대학교 실험동물센터 검역실에서 1주간의 순화기간을 거친 후 Clean 동물사육구역으로 이동하였다. 마우스 개체별 체중을 측정하여 실험기간의 통계적으로 유의한 체중 차이가 나지 않도록 군분리를 시행하였다. 실험에 사용할 지골피 추출물은 100 mg/ml의 농도로 stock solution을 만들었으며, 실험동물센터의 반입을 위해 방사선 조사 전문업체인 소야그린텍(주)에 의뢰하여 감마선 조사를 통해 멸균 작업을 시행하였다. 지골피 추출물 투여 전에 PIXImus bone densitometer로 초기 골밀도를 측정하였다. 골밀도를 측정하기 전에 졸레틸과 럼폰 혼합 마취제(Zoletil과 Rompun 1:2 혼합액을 생리식염수와 2:3 비율로 희석함) 50 ul를 사용하여 주사마취 한 후, 골밀도 측정 틀에 고정시키고 골밀도(BMD, Bone Mineral Density)를 측정하였다. 골밀도 측정 후 다음날부터 지골피 추출물의 저용량 투여군은 50 mg/kg, 중용량 투여군은 150 mg/kg, 고용량 투여군은 300 mg/kg의 섭취량이 되도록 음수에 혼합하여 자유식이 시키기 시작하였다. 추출물이 혼합된 음수병은 3일 간격으로 교체를 해주었고, 주1회 체중을 측정하였으며, 주1회 케이지를 교체해 주었다. 지골피 추출물 투여 후 8주 후에 최종 체중을 측정하고 그 결과를 하기 표 2에 나타내었으며, 주사 마취 후 골밀도(BMD, Bone Mineral Density)를 측정하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 2

군과 용량군		초기 측정값	8주 후		체중변화	p value
			체중	p value		
난소절제군		30.2 ±2.50	39.8 ±3.48		9.7 ±1.83	
Sham		31.0 ±2.22	38.6 ±3.69	0.640	7.6 ±4.82	0.451
지골피 추출물	50 mg/kg	30.2 ±2.46	41.3 ±1.56	0.468	11.2 ±2.65	0.384
	150 mg/kg	30.3 ±2.24	42.1 ±4.92	0.479	11.8 ±4.17	0.387
	300 mg/kg	30.3 ±2.16	43.1 ±3.05	0.210	12.8 ±1.35	0.033

[0071]

표 3

군과 용량군		BMD of right femur					
		initial BMD	p value	final BMD	p value	ΔBMD	p value
난소절제군		0.072 ±0.002		0.082 ±0.002		0.010 ±0.002	
Sham		0.081 ±0.005	0.016	0.104 ±0.005	0.00015	0.023 ±0.002	0.00023
지골피 추출물	50 mg/kg	0.074 ±0.004	0.404	0.088 ±0.003	0.018	0.014 ±0.003	0.103
	150 mg/kg	0.070 ±0.003	0.338	0.094 ±0.004	0.003	0.022 ±0.006	0.012
	300 mg/kg	0.073 ±0.002	0.514	0.092 ±0.005	0.009	0.020 ±0.004	0.010

[0072]

[0073]

상기 표 2에 따르면 난소절제군과 지골피 추출물 투여군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 없도록 군분리를 시행하였기에 초기 체중 측정값에서는 군간의 차이가 없으며, 8주 후의 최종 체중 측정치에도 군간의 유의한 차이가 존재하지 않았다. 다만, 체중 증가량을 대상으로 난소절제군과 각 농도별 지골피 추출물 사이의 Student's t-test를 분석한 결과에서는 고용량군에서 체중 증가량이 유의하게 높은 결과를 나타내고 있다. 그러나, 최종적으로 골밀도 측정치 결과인 표 3을 살펴보면, 난소 절제군과 Sham 군간에는 초기 BMD 수치부터 유의한 차이가 있게 Sham 군의 골밀도가 높았으며, 이러한 경향은 최종 BMD와 BMD 변화량에서는 더 큰 차이를 보여 주고 있다. 이러한 사실은 골다공증 동물 모델로의 유도가 잘 되었음을 나타내고 있다. 이러한 사실을 바탕으로 지골피 추출물의 골밀도 개선 효과를 살펴보면 초기 BMD는 난소 절제군과 유의한 차이가 없었으나, 지골피 중용량군과 고용량군에서는 최종 BMD와 BMD 변화량 모두에서 난소 절제군에 비하여 골밀도가 유의하게 높음을 확인할 수 있었다.

[0074]

상기의 실험 결과들을 종합하면, 골대사에 영향을 미치는 세포주에 지골피 추출물에 대한 효과가 세포 증식을 촉진하면서 조골세포 분화 활성을 유도하는 것을 확인할 수 있었으며, 난소 절제 마우스를 대상으로 한 실험에서 골밀도 개선 효과를 보이고 있는 것을 확인하였다. 따라서, 지골피 추출물은 조골세포 분화 유도를 통해 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

[0075]

산업상 이용가능성

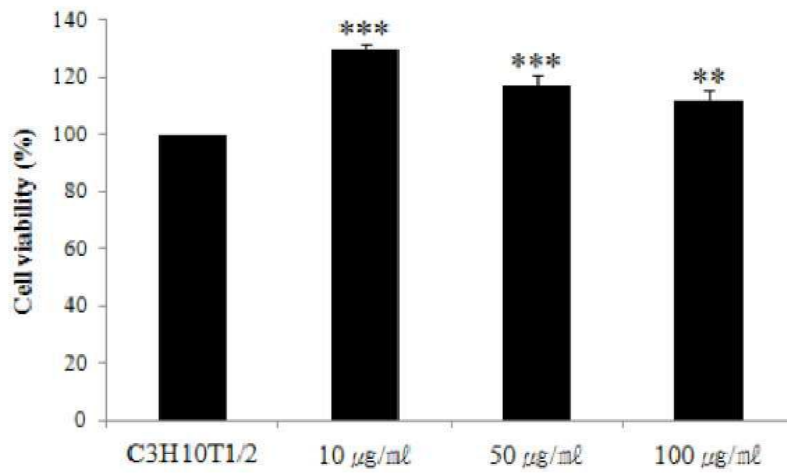
[0076]

본 발명에 따른 지골피 추출물을 포함하는 조성물은 골대사에 영향을 미치는 세포의 증식을 촉진하면서 조골세포 분화 활성을 유도함으로써 뼈 형성과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 가진다. 따라서, 본 발명의 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 골대사 관련 질환, 예를 들어 골다공증, 골감소증, 골연화증, 칼슘조

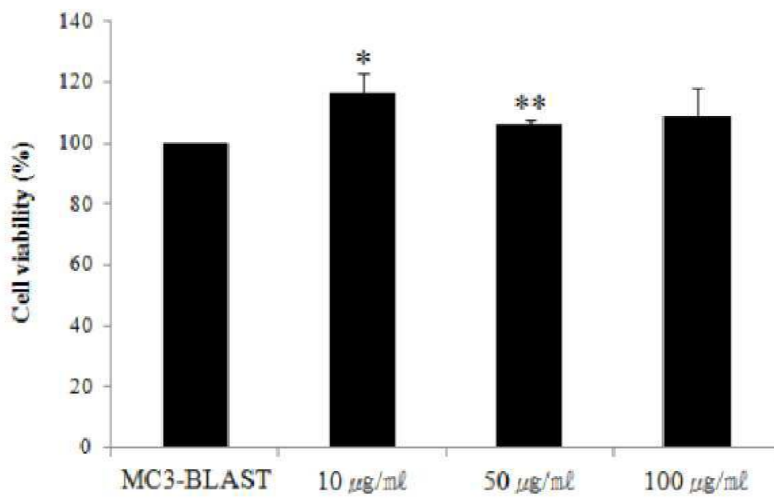
질 이상, 즉 고칼슘혈증, 저칼슘혈증의 예방 및 골기능 개선을 위한 약학적 제제 또는 기능성 식품으로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

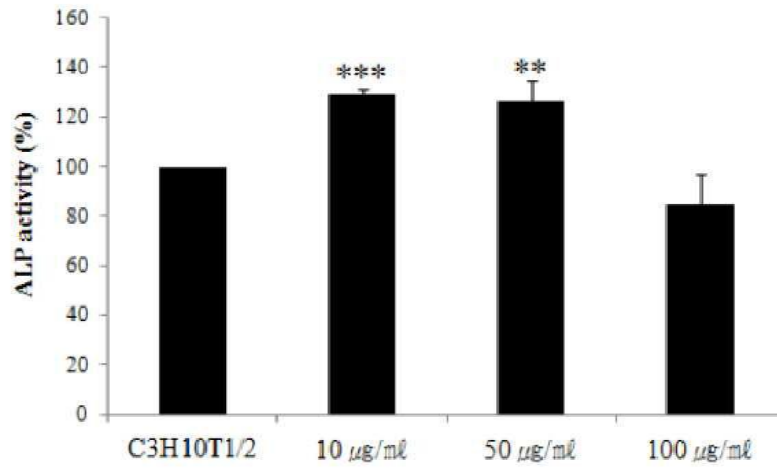
도면1a



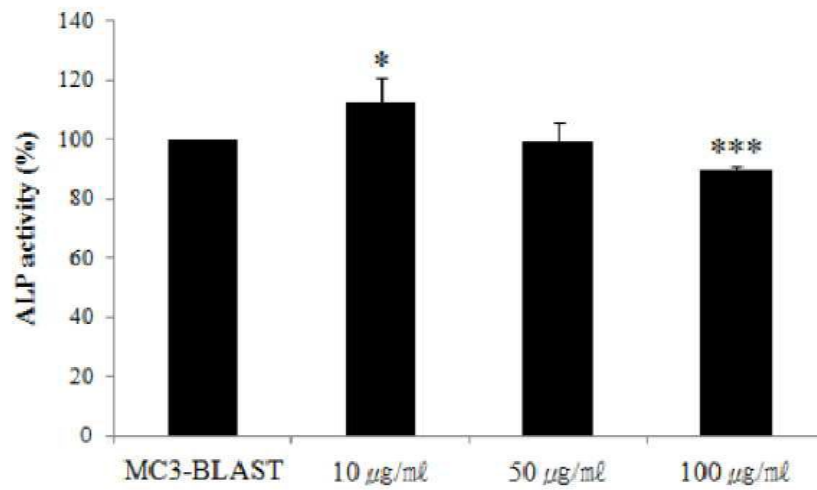
도면1b



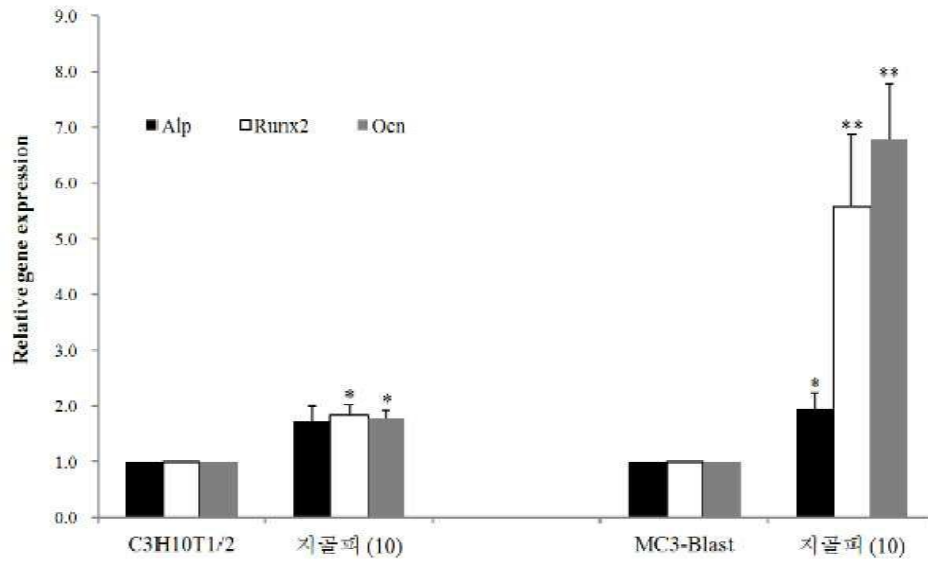
도면2a



도면2b



도면3



서열목록

<110> DONG WOO DANG CO., LTD

AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> A composition for preventing bone metabolism-related diseases and increasing bone function comprising lycium root bark extracts

<130> A00328

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh-F

<400> 1

tgaccacagt ccatgccatc

20

<210> 2

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh-R

<400> 2

gacggacaca ttggggtag	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Alp-F	
<400> 3	
tcccacgttt tcacattcgg	20
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Alp-R	
<400> 4	
cccgttacca tataggatgg cc	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Runx2-F	
<400> 5	
taaagtgaca gtggacggtc cc	22
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Runx2-R	
<400> 6	
tgcgccctaa atcactgagg	20
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bglap-F	

<400> 7

tagtgaacag actccggcgc ta

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bglap-R

<400> 8

tgtaggcggc cttcaagcca t

21