



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월19일
(11) 등록번호 10-1759477
(24) 등록일자 2017년07월13일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 36/815 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0148813(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2016년11월09일
심사청구일자 2016년11월09일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-0025022
원출원일자 2016년03월02일
심사청구일자 2016년03월02일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Journal of Natural Products, 76(4), 615-620, 2013.*
KR1020070093226 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
주식회사 나인비
대전광역시 유성구 대덕대로590번길 11-10 ,10 3호(도룡동,더.포엠)</p> <p>(72) 발명자
양시영
경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 19, 8201동 20 4호 (이의동, 광교한양수자인)
김문창
경기도 성남시 수정구 위례동로 61, 5616동 1101 호 (창곡동, 위례 자연엔 래미안이편한세상)
김정현
경기도 수원시 영통구 매봉로 20, 102동 1001호 (매탄동, 매탄 e-편한세상)</p> <p>(74) 대리인
특허법인태백</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 1 항

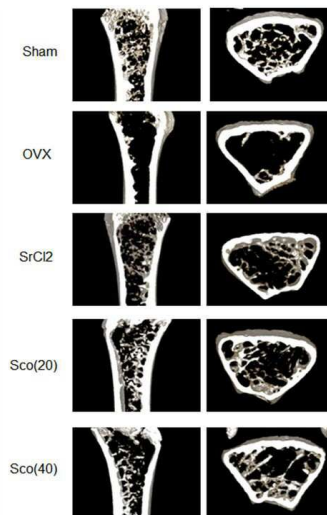
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 스코폴린을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 스코폴린(Scopolin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 스코폴린은 조골세포의 분화 촉진에 좋은 효능이 있으며, 폐경 후의 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골형성 마커 감소를 효과적으로 억제하는 효능이 있다. 따라서, 본 발명의 스코폴린과 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 예방 및 치료를 위한 약학적 제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도8b



(52) CPC특허분류

- A61K 31/7048 (2013.01)
- A61K 36/815 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2126000015
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발
 연구과제명 당뇨병에 의한 퇴행성관절염 유도 진행에서 Serpina2와 Zimp10의 병인적 역할에 관한 연

구

기 여 율 35/100
 주관기관 아주대학교 산학협력단
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HR16C0001030016
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 연구중심병원육성
 연구과제명 (1유닛3세부) 3D 면역칩 기반 비임상 개발 서비스 플랫폼
 기 여 율 35/100
 주관기관 아주대학교 산학협력단
 연구기간 2016.04.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2407000015
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발
 연구과제명 Inhba 및 Itln1 활성 억제를 통한 노인성 만성질환 기인 관절염 치료 기술 개발
 기 여 율 30/100
 주관기관 아주대학교 산학협력단
 연구기간 2015.11.12 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

스코폴린(Scopolin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 시험관 내(in vitro) 조골세포 분화 촉진용 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스코폴린(Scopolin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1) 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여성임을 상징하는 대표적인 호르몬인 에스트로겐(estrogen)은 생리, 임신, 폐경에 이르는 여성의 일생을 조절하는 중요한 여성 호르몬이다. 에스트로겐은 여성의 난소 안에 있는 여포와 황체 그리고 태반에서 주로 분비되는 여성호르몬으로 잘 알려져 있으며, 에스트론(E1), 에스트라디올(E2), 에스트리올(E3) 등의 호르몬을 총칭한다. 에스트로겐은 광범위한 조직과 기관에 영향을 미치며 특히 자궁, 비뇨기, 유방, 피부, 뼈, 그리고 혈관들이 유연성과 정상상태를 유지하는데 필요하다. 특히, 에스트로겐은 뼈 생성에 관여하는 조골세포(osteoblast)에 작용하여 골형성(bone formation)을 유지하게하고, 뼈 제거에 관여하는 파골세포(osteoclast)에 작용하여 골흡수(bone resorption)를 억제하여 뼈의 항상성을 유지하는데 중요한 작용을 한다(도 1). 따라서 폐경에 의한 에스트로겐 감소로 인해 나타나는 폐경 후 골다공증(postmenopausal osteoporosis)은 매우 심각한 폐경 후 여성 질환 중의 한가지이다(도 2).

[0003] 골다공증은 단위용적 내의 골량(骨量)이 정상인의 성별 연령 인종에 따른 정상치에 비해 비정상적으로 감소되어 있는 상태를 말한다. 허리를 구부리거나 주저앉는 등의 아주 사소한 충격으로도 뼈가 쉽게 부서져서 고관절, 손목뼈, 척추뼈 등에 골절이 잘 일어나는 것이 특징이다. 그 발생기전에 따라 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1)과 노인성 골다공증(제2형 골다공증, type 2)의 일차성 골다공증과, 약물 등 다른 원인에 의한 이차성 골다공증으로 나뉜다(도 3).

[0004] 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1)은 여성의 경우, 폐경 후 에스트로겐 호르몬이 부족해지면서 뼈의 구성성분이 체내조직으로 흡수되고 장을 통한 칼슘흡수가 저하되면서 발생한다(도 4). 또한, 에스트로겐 호르몬의 감소로 인해 조골세포의 분화 및 증식이 억제되어 그 결과로서 골형성이 억제되고, 파골세포의 활성화로 인해 골흡수가 골형성 보다 많아지게 되어 골소실(bone loss)이 항진되고 골량(bone mass)의 감소가 발생하게 된다(도 5). 사람에게 따라 폐경 후에 급격히 진행될 수 있다.

[0005] 노인성 골다공증(제2형 골다공증, type 2)은 남녀 모두에서 연령증가에 따른 골손실에 의해 생긴다. 체내 활성화

형 비타민 D의 감소로 장내 칼슘흡수가 적어지는 것과 골세포를 새로 만들어내는 조골세포가 감소되어 나타나고 비교적 완만히 진행된다.

[0006] 이차성 골다공증은 인체의 골세포 생산 및 유지에 관련된 기능에 영향을 미치는 여러 질환이나 약물복용 등에 의해 유발되는 골다공증이다. 갑상선 기능항진증, 부갑상선 기능 항진증, 쿠싱증후군, 류마치스 관절염, 고프로락틴 혈증 등이 관련이 있고, 스테로이드 호르몬제제, 갑상선호르몬제제 등이 이차성 골다공증을 유발할 수 있다.

[0007] 갱년기가 시작되면 난소 기능의 저하 및 실조로 난소에서 분비되는 여성호르몬이 감소되고 이로 인해 다양한 증상들이 나타날 수 있다. 폐경 후에는 급격한 골밀도 감소와 골량 감소가 원인이 되어 폐경 후 골다공증이 발생할 수 있다. 폐경 후 골다공증은 요통이나 기타 골관계의 질환을 유발할 수도 있고 쉽게 골절이 될 수 있기 때문에 삶의 질에 큰 영향을 미치는 질환이다. 특히, 조기 폐경이나 50세 이전에 난소를 적출한 여성의 경우는 폐경후 골다공증에 더욱 취약할 수 있다.

[0008] 여성 폐경 후 골다공증의 치료제로는 복합개량신약인 본비바플러스(조성분: 비스포스포네이트 계열)과 아클라스타(성분: 졸레드론산 5mg 주사액) 등의 치료제가 있다. 하지만, 부작용이 있어 천연물 유래의 치료제 또는 건강기능식품의 수요가 점점 높아지고 있다. 뼈 건강에 좋은 칼슘, 비타민 D, 이소플라본 등의 건강기능식품이 많이 사용되고 있으나 효과는 제한적이다. 따라서, 천연물 유래의 효과적인 여성 폐경후 골다공증의 예방 및 치료를 위한 약학적 제제의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0981350호(2010.09.03 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 스코폴린(Scopolin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있으며, 보다 구체적으로는 폐경 후 여성의 에스트로겐 호르몬의 감소로 인해 발생하는 폐경 후 골밀도 감소 및 골다공증의 예방 및 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 스코폴린(Scopolin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 스코폴린(Scopolin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 스코폴린은 조골세포 분화 촉진에 좋은 효능이 있으며, 폐경 후의 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골형성 마커 감소를 효과적으로 억제하는 효능이 있다. 따라서, 본 발명의 스코폴린과 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 예방 및 치료를 위한 약학적 제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 에스트로겐의 골형성(bone formation)과 골흡수(bone resrption)에 관여하는 기전을 나타낸 모식도이다.
 도 2는 폐경 후 에스트로겐 결핍시 발병하는 폐경 후 골다공증의 발병 기전을 나타낸다.
 도 3은 골다공증의 종류를 나타낸 모식도이며, 폐경 후 골다공증은 제1형 골다공증(type 1)이다.
 도 4는 폐경 후 에스트로겐 호르몬이 부족해지면서 뼈의 구성성분이 체내조직으로 흡수되고, 장을 통한 칼슘흡

수가 저하되면서 발생하는 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1)의 발병 기전을 나타내고 있다.

도 5는 폐경 후 에스트로겐 호르몬 결핍에 의한 조골세포의 사멸 및 억제와 파골세포의 활성의 기전을 나타낸 모식도이다.

도 6은 스코폴린(Scopolin)의 화학구조식을 나타낸다.

도 7은 조골세포인 MC3T3-E1 세포에 스코폴린을 1 µg/ml, 5 µg/ml 및 10 µg/ml의 농도로 처리한 후 세포 독성(도 7a), 조골세포 분화 마커인 ALP(알칼라인 포스파타제, alkaline phosphatase) 활성 측정(도 7b), ALP 염색(도 7c), Alizarin red S 염색을 통한 무기질화(mineralization)(도 7d)를 분석한 결과이며, 스코폴린이 조골세포에 독성이 없으며 조골세포의 분화 촉진에 유의한 효과가 있다는 것을 나타낸다.

도 8은 폐경 마우스 모델(난소적출 마우스)에 스코폴린 20 mg/kg/day 및 40 mg/kg/day 투여 12주 동안의 골밀도 변화(도 8a)를 측정하였으며, 12주 후의 대퇴부 뼈를 적출하여 micro-CT 사진(도 8b)을 찍은 후, 뼈 부피율(% bone volume, BV)(도 8c), 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)(도 8d), 해면골소주 수(trabecular number, Tb.N)(도 8e), 해면골소주 공간(trabecular spacing, Tb.Sp)(도 8f)을 수치화하여 분석한 결과이며, 스코폴린이 폐경에 의한 골밀도 감소 및 뼈 미세구조 치밀도 저하를 유의하게 억제하는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

도 9는 폐경 마우스 모델에 스코폴린 20 mg/kg/day 및 40 mg/kg/day 투여 12주 후 마우스 혈액에서 혈청을 분리하여 골대사 마커인 OPG(osteoprotegerin)(도 9a)와 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand)(도 9b)의 혈중 단백질량과 OPG/RNAKL의 비율(도 9c)을 측정한 결과이며, 스코폴린이 폐경에 의한 혈중 골형성 마커인 OPG의 감소와 골흡수 마커인 RANKL 증가를 유의하게 억제하는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이에, 본 발명자들은 폐경 후 여성에서 에스트로겐 호르몬 감소로 나타나는 폐경 후 골밀도 감소와 뼈 미세구조 치밀도 저하를 억제하는 효능이 있는 단일화합물인 스코폴린의 in vitro 및 in vivo 효능에 관해 확인하고 본 발명을 완성하였다.

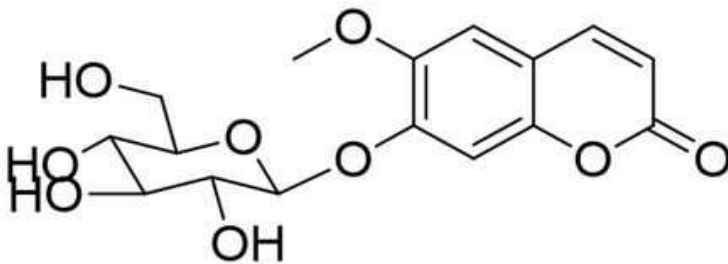
[0015] 본 발명은 스코폴린(Scopolin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0016] 상세하게는, 상기 여성 폐경 후 골다공증은 에스트로겐 분비 저하에 의한 것이고, 상기 에스트로겐 분비 저하는 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골형성(bone formation) 마커 감소 및 골흡수(bone resorption) 마커 증가를 유도할 수 있다.

[0017] 보다 상세하게는, 상기 골형성(bone formation) 마커는 OPG(osteoprotegerin)이고, 상기 골흡수(bone resorption) 마커는 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 스코폴린(Scopolin)은 화학식 1로 표시되며, 화학구조식은 C₁₆H₁₈O₉이다.

[0019] < 화학식 1 >



[0020]

[0021] 본 발명에 있어, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산 및 벤조산으로 이루어진 군에서 선택된 유기산, 또는 염산, 황산, 인산 및 브롬화수소산으로 이루어진 군에서 선택된 무기산에 의해 형성되는 산부가염일 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리

니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제 등으로 제형화 될 수 있다. 한편, 상기 약학적 조성물은 상기 스코폴린(Scopolin) 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 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, 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 약학적 조성물은 첨가제로서 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 상기 약제학적 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 통상적으로는 국소 투여 방식이 바람직하다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0025] <실시예 1> 스코폴린(Scopolin)의 화학적 구조

[0026] 본 발명에서 동물실험에 사용한 시험 단일화합물은 스코폴린(Scopolin)이다. 스코폴린은 화학구조식은 $C_{16}H_{18}O_9$ 이며 지골피(Lycii radices cortex) 등에 많이 함유되어 있는 천연 유래의 단일화합물(single compound)이다(도 6).

[0027] <실시예 2> 스코폴린의 조골세포 분화 촉진 효능

[0028] 조골세포(osteoblast)는 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 유래 되며 새로운 뼈 형성을 담당하는 세포이다. 여성 에스트로겐이 급격히 감소되는 폐경 후에 조골세포의 역할이 중요하기 때문에 조골세포의 증식과 분화에 대한 스코폴린(Scopolin)의 효능을 조사하였다.

[0029] 스코폴린의 세포독성은 수용성 Tetrazolium salt를 이용한 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit 제품을 사용한 세포 증식(cell proliferation) 분석을 통해 평가하였다. 구체적으로, 조골세포인 MC3T3-E1 세포(3×10^3 cells/well)를 10% 우태아 혈청, 1 mM의 피루브산 나트륨, 100 unit/L 페니실린 및 100 mg/L 스트렙토마이신이 첨가된 α -최소 필수 배지(α -MEM) 배지에서 5% CO_2 가 공급되는 37°C 조건으로 배양 후, 스코폴린을 3가지의 농도(1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml)로 세포에 처리하고, 2일 동안 배양하였다. Tetrazolium salt를 각각의 배양세포 및 샘플에 처리하고 37°C에서 2시간 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생리식염수를 처리한 대조군(Control)에 비교해서, 스코폴린을 1 μ g/ml(Sco1), 5 μ g/ml(Sco5) 및 10 μ g/ml(Sco10)의 농도로 처리한 실험군 모두에서 MC3T3-E1 세포증식에 나쁜 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다(도 7a).

[0030] 조골세포의 분화에 대한 스코폴린의 효능을 MC3T3-E1 세포를 이용하여 평가하였다. MC3T3-E1 세포에 조골 분화 유도제인 ascorbic acid(50 μ g/ml)와 β -glycerophosphate(10 mM)를 첨가하여 3일 동안 분화 유도시킨 후 스코폴린(Scopolin)을 처리하였다. 스코폴린은 1% 다이메틸설폭사이드(DMSO) 수용액에 용해시켜 1 μ g/ml(Sco1), 5 μ g/ml(Sco5) 및 10 μ g/ml(Sco10)의 농도로 MC3T3-E1 세포에 처리하여 48시간 동안 추가 배양하였으며, 대조군으로는 스코폴린을 처리하지 않은 상태에서 같은 양의 1% DMSO 수용액을 넣어 세포를 배양하였다. 조골세포의 분화 효능을 확인하기 위해 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 정도를 측정하였다. 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. 결과적으로, 스코폴린을 5 μ g/ml(Sco5) 또는 10 μ g/ml(Sco10)의 농도 처리한 군에서 통계적으로 유의하게 조골세포로의 분화가 증가되었다(도 7b)(* : $p < 0.05$ vs. 음성 대조군). 또한 ALP 염색을 통해 조골세포 분화를 평가한 결과 5 μ g/ml의 스코폴린을 처리한 세포의 ALP 염색이 증가되었다(도 7c).

[0031] 조골세포의 무기질화(mineralization) 분석은 5 μ g/ml의 스코폴린을 처리한 실험군 및 대조군을 3주 동안 배양한 후 Alizarin red S 염색 방법을 이용하여 평가하였다. 스코폴린을 처리한 세포의 무기질화가 증가되었다(도 7d). 이러한 결과로부터, 스코폴린이 조골세포의 분화 촉진에 효능이 있음을 확인하였다.

[0032] <실시예 3> 난소절제 폐경 마우스 모델에서 스코폴린의 폐경 후 골다공증 발생 억제 효능

[0033] 스코폴린의 in vivo 효능 평가를 위해 폐경 동물 모델로 10주령의 난소절제 ddY 암컷 마우스(ovariectomized-

mouse, OVX mouse)를 사용하였다(8주령기에 난소절제 시행 후 수술 회복을 위해 2주간 추가 사육). 대조군으로는 개복만하고 난소는 절제하지 않은 Shame 마우스군(정상 대조군), 난소절제 마우스에 생리식염수만 투여한 OVX 마우스군(음성 대조군), 난소 절제 마우스에 골밀도 개선효능이 있는 화합물인 염화스트론튬(SrCl_2)을 20 mg/kg/day 용량으로 경구 주입(oral injection)한 SrCl_2 마우스군은 골밀도 개선 효능 실험에서는 양성 대조군으로 사용하였다. 실험군은 스코폴린을 20 mg/kg/day 및 40 mg/kg/day 용량으로 경구 주입하였다. 10주령의 sham-operated 및 난소절제 ddY 암컷 마우스는 중앙실험동물(주)에서 구입하여 실험동물센터 검역실에서 1주간의 순화기간을 거친 후 청정동물사육구역으로 이동시켰다. 마우스 개체별 체중을 측정하여 실험군 간의 통계적으로 유의한 체중 차이가 나지 않도록 균분리를 시행하였다. 실험에 사용할 스코폴린은 1% DMSO 수용액에 녹여 시험액을 만들었으며, 실험동물센터의 반입을 위해 방사선 조사 전문업체인 소야그린텍(주)에 의뢰하여 감마선 조사를 통해 멸균 작업을 시행하였다.

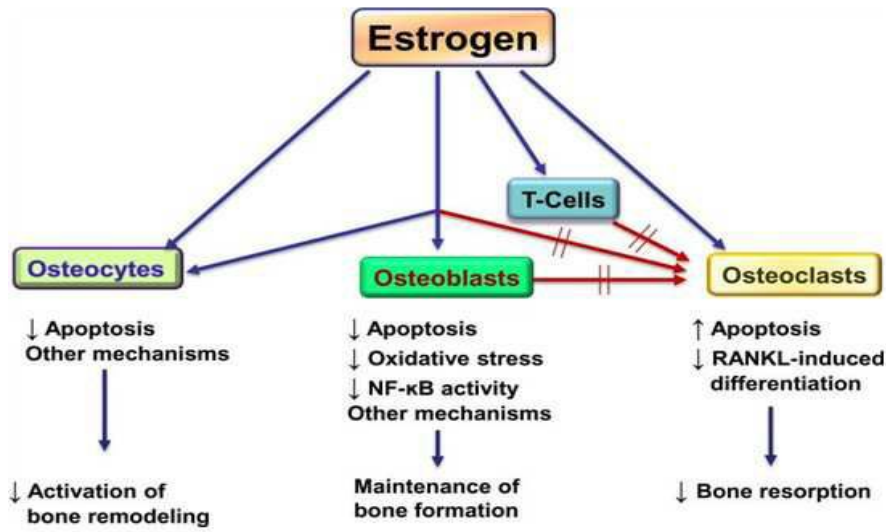
[0034] 동물실험 시작 시에 PIXImus bone densitometer로 초기 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다. 졸레틸(zoletil)과 럼폰(rompun)의 혼합마취제(1:2 혼합액을 생리식염수와 2:3 비율로 희석) 50 μl 를 주사하여 마우스를 마취시킨 후, 골밀도 측정 틀에 고정시키고 골밀도를 측정하였다. 마우스에 스코폴린 투여 6주 후와 12주 후 마우스의 골밀도를 PIXImus bone densitometer로 측정하고 12주 실험종료 후 혈액 채취와 대퇴부 뼈를 적출하여 micro-CT를 촬영한 후, 뼈의 부피율(% bone volume, BV), 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th), 해면골소주 수(trabecular number, Tb.N), 해면골소주 공간(trabecular spacing, Tb.Sp)을 수치화하여 분석하였다.

[0035] 난소를 제거하지 않은 정상의 Shame 마우스와 비교하였을 때, 난소를 제거한 OVX 마우스의 뼈의 6주 및 12주 후의 골밀도 증가율의 현저한 감소와(도 8a), micro-CT 촬영 사진 상의 뼈 미세구조 치밀도의 현저한 저하를 나타내었다(도 8b). 또한, 뼈의 부피율(도 8c), 해면골소주 두께(도 8d), 해면골소주 수(도 8e)는 현저하게 낮았고 해면골소주 공간(도 8f)은 높았다. 하지만, 스코폴린을 20 mg/kg/day 및 40 mg/kg/day 용량으로 12주간 투여한 실험군에서는 폐경에 의해 발생하는 골밀도 감소와 뼈 미세구조 치밀도 저하가 억제되고(도 8a, 8b), 뼈의 부피율, 해면골소주 두께, 해면골소주 수의 감소와 해면골소주 공간의 증가도 모두 억제되었다(도 8c, 8d, 8e, 8f). 이러한 결과는 양성 대조군인 SrCl_2 마우스의 결과와 유사하였다. 또한, 통계분석에서도 효능의 유의성이 확인되었다(*: $p < 0.05$ vs. OVX 음성 대조군).

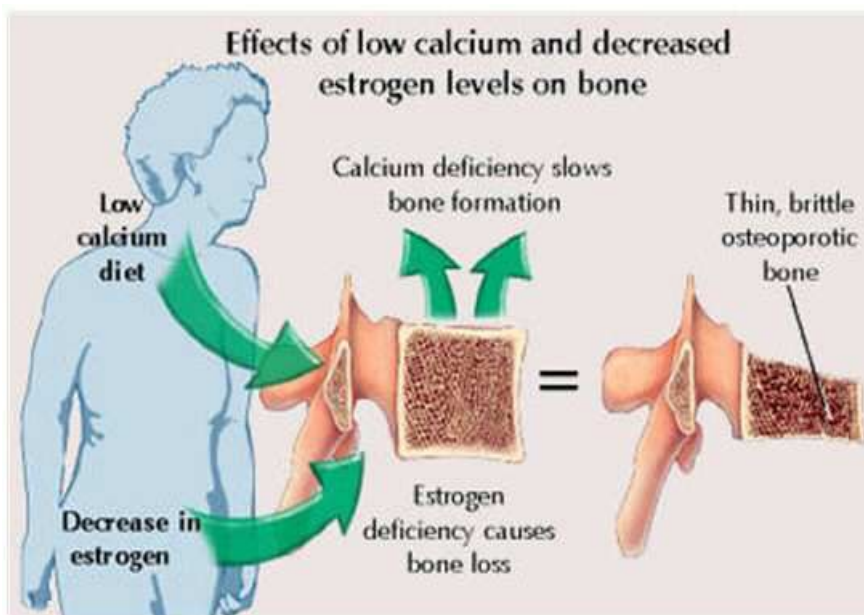
[0036] 다음으로, 혈중 골대사 마커의 변화를 조사하였다. 폐경 마우스모델 실험 12주 후에 마우스 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 골형성 마커인 OPG(osteoprotegerin)와 골흡수 마커인 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)의 혈중 단백질량을 ELISA 방법으로 분석하였다. 난소를 제거하지 않은 정상의 Shame 마우스와 비교하였을 때, 난소를 제거한 OVX 마우스에서 OPG의 감소(도 9a), RANKL의 증가(도 9b), OPG/RANKL 비율의 감소(도 9c)를 나타내었다. 하지만, 스코폴린을 20 mg/kg/day 및 40 mg/kg/day 용량으로 12주간 투여한 실험군에서는 혈중 골형성 마커인 OPG의 감소, 골흡수 마커인 RANKL의 증가, OPG/RANKL 비율의 감소가 모두 억제되었다(도 9a, 9b, 9c). 이러한 결과는 양성 대조군인 SrCl_2 마우스의 결과와 유사하였다. 또한, 통계분석에서도 효능의 유의성이 확인되었다(*: $p < 0.05$ vs. OVX 음성 대조군).

도면

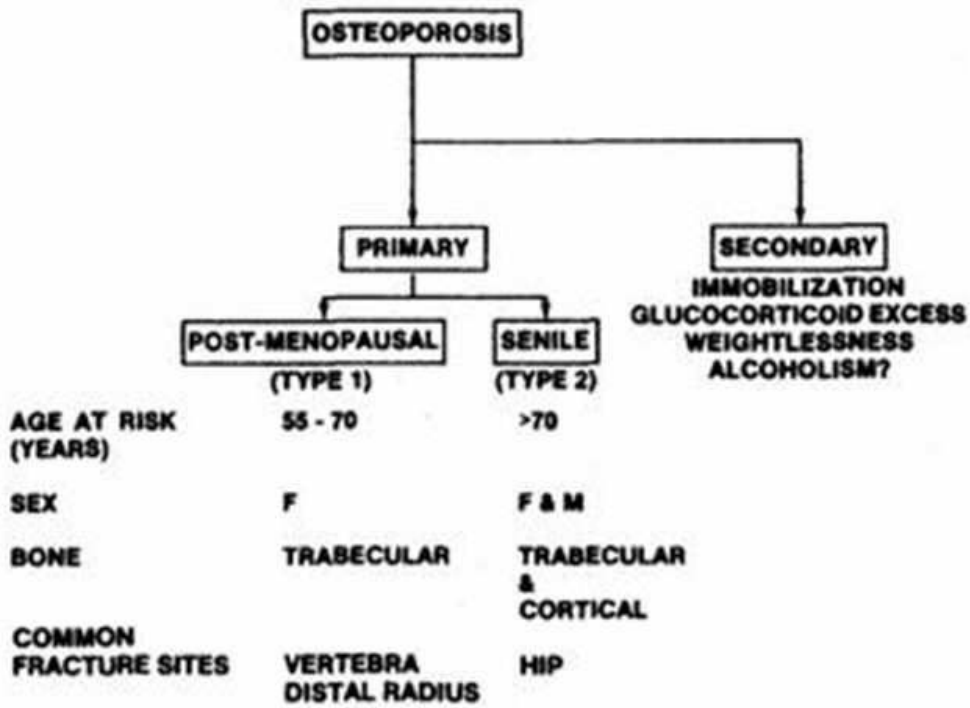
도면1



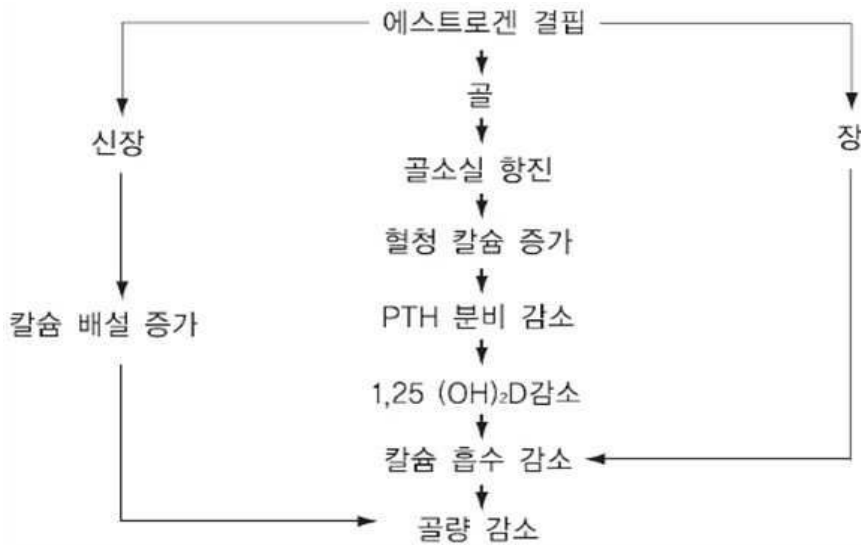
도면2



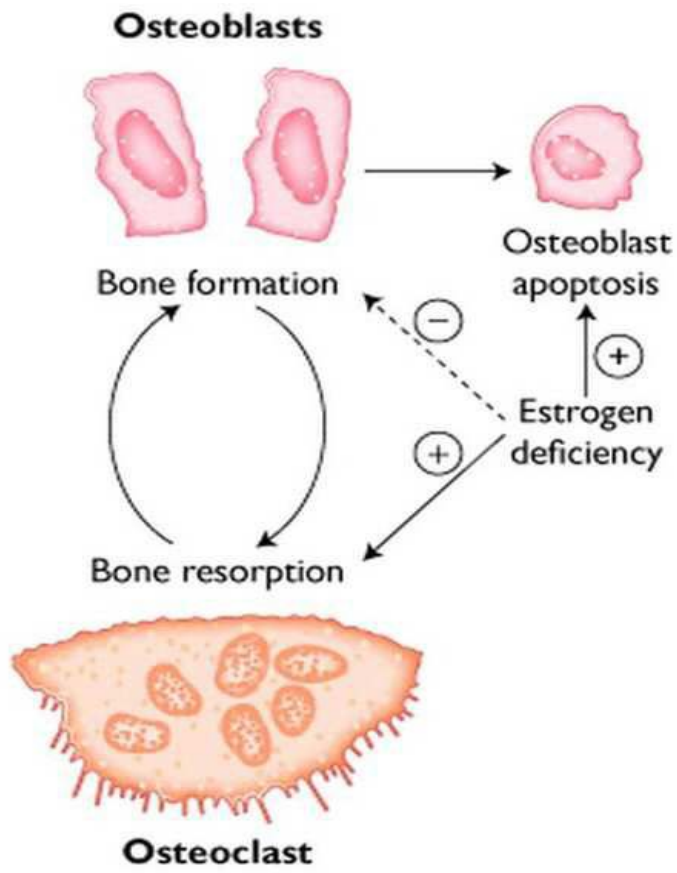
도면3



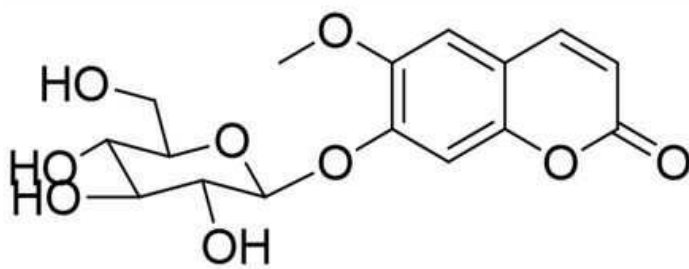
도면4



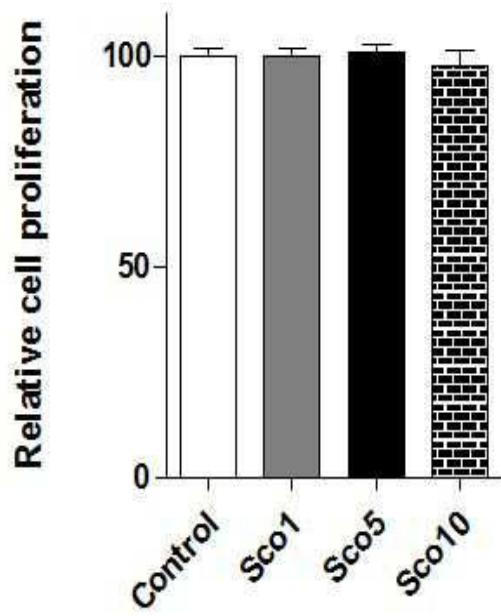
도면5



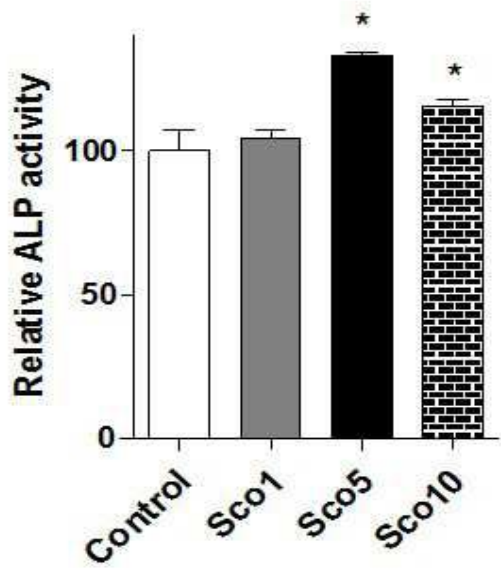
도면6



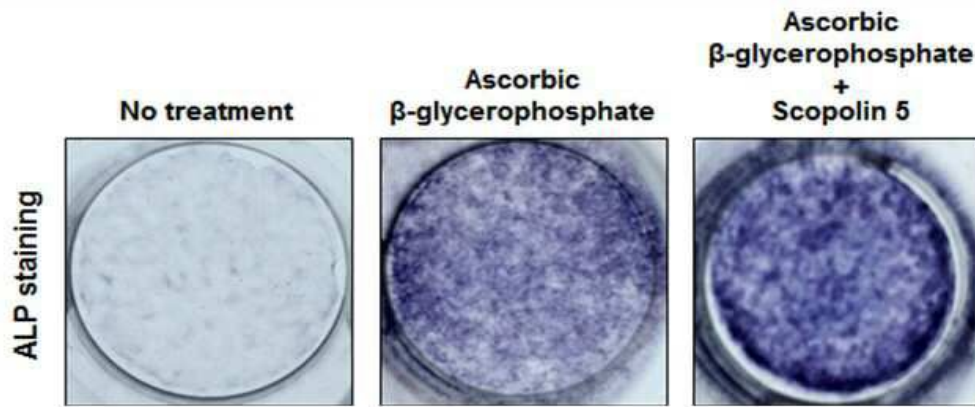
도면7a



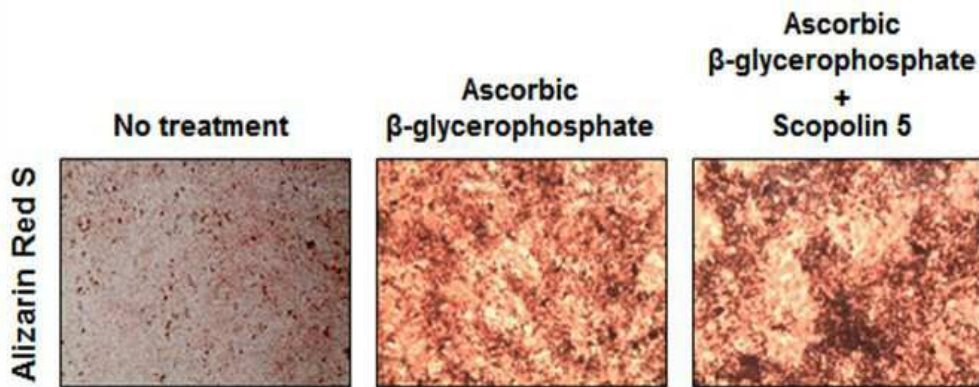
도면7b



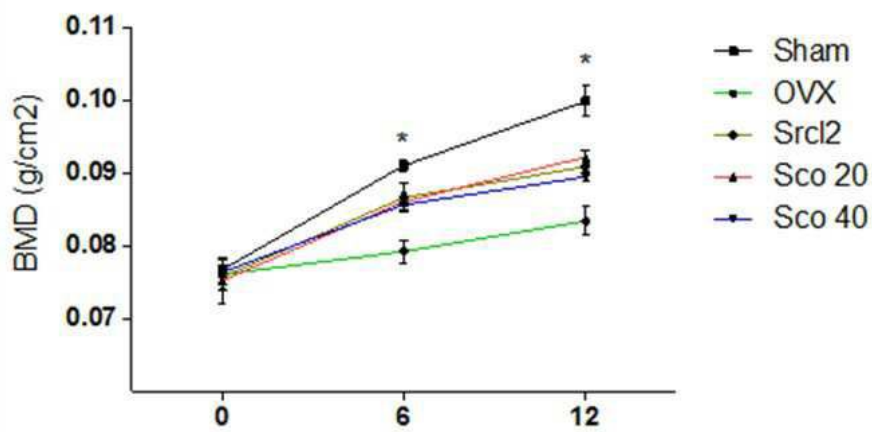
도면7c



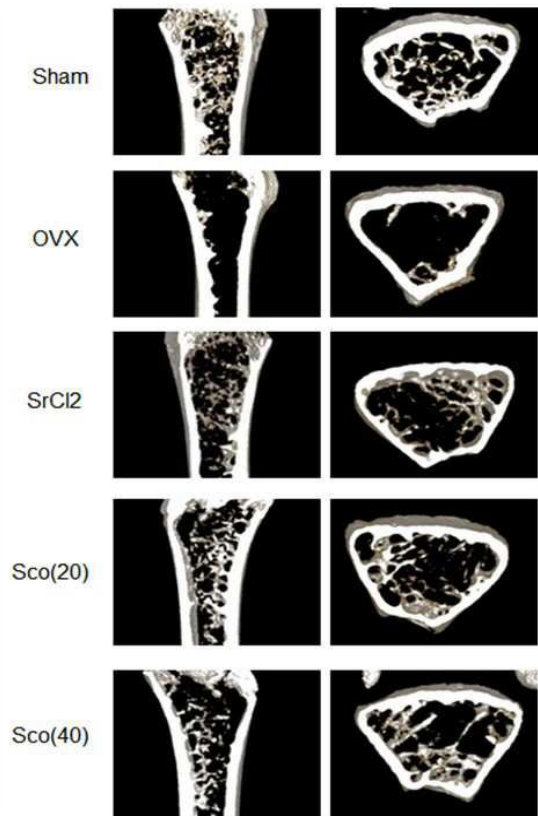
도면7d



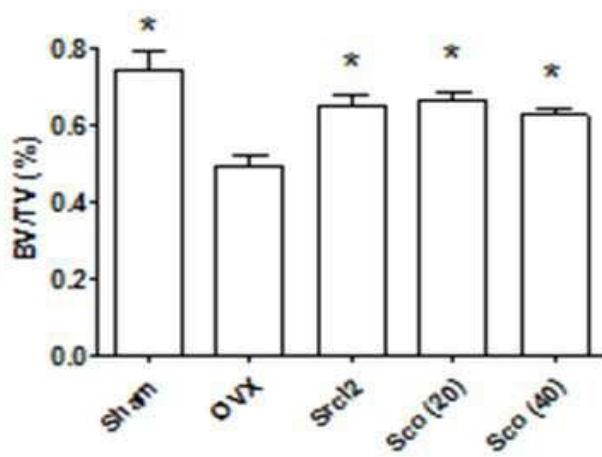
도면8a



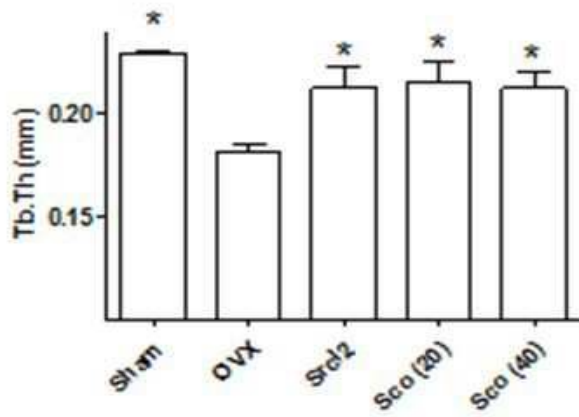
도면8b



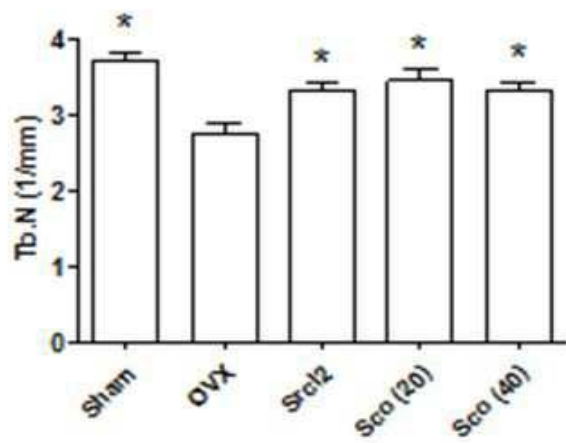
도면8c



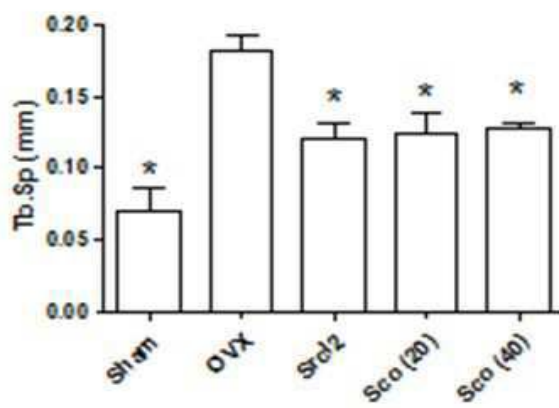
도면8d



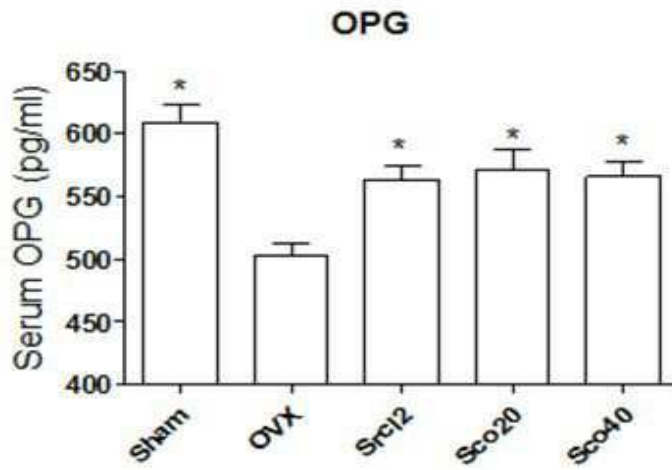
도면8e



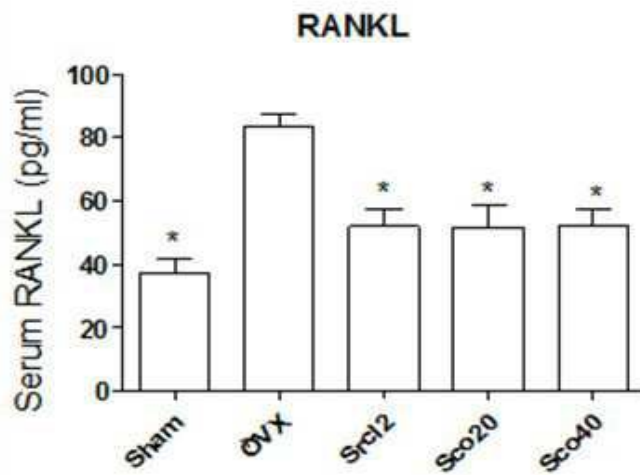
도면8f



도면9a



도면9b



도면9c

