



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월22일
(11) 등록번호 10-2410703
(24) 등록일자 2022년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/11 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01) C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/11 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0052090
(22) 출원일자 2020년04월29일
심사청구일자 2020년04월29일
(65) 공개번호 10-2021-0133465
(43) 공개일자 2021년11월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190115789 A*
KR1020130042537 A
KR1020130070901 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국 한의학 연구원
대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
(72) 발명자
하현일
대전광역시 유성구 엑스포로 501, 108동 101호(전민동, 청구나래아파트)
장선아
대전광역시 유성구 유성대로 1672 기숙사 201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 10 항

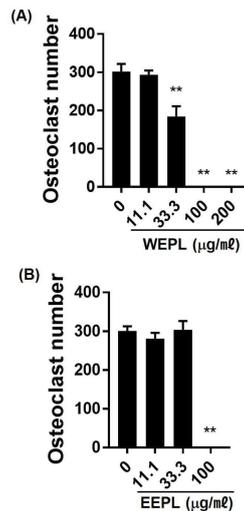
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 석위 추출물이 파골세포 분화 억제 및 조골세포의 분화 촉진 효과가 있으며, 파골세포의 전구세포의 생존율을 증가시키고, 난소절제 동물모델에서 해면골 골밀도 및 골체적을 증가시키는 효과가 있는 것이다. 따라서 본 발명의 석위 추출물은 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품 또는 의약품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
 A23V 2002/00 (2013.01)
 A23V 2200/306 (2013.01)
 A23V 2300/14 (2013.01)
 C12N 2506/1346 (2013.01)

양현

대전광역시 유성구

(72) 발명자

김태수

대전광역시 서구 둔산로 201, 602동 406호(둔산동, 국화아파트)

황윤환

대전광역시 중구 충무로107번길 100, 102동 802호 (대흥동, 센트럴자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KSN2012330
과제번호	KSN2012330
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국한의학연구원
연구사업명	주요사업
연구과제명	산업수요 해결형 한약 응용기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

석위(*Pyrrrosia lingua*) 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 석위 잎 추출물의 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 석위 잎 추출물은 파골세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항 있어서, 상기 석위 잎 추출물은 골생성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 골질환은 골소실에 의해 야기되는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골다공증성 골절, 골소실증, 골결손, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 종양에 의한 골파괴(Neoplastic bone destruction), 치주질환(Periodontal diseases)에 의한 골파괴 및 퇴행성 골질환 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

석위(*Pyrrrosia lingua*) 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

석위 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 중간엽줄기세포의 조골세포로의 분화용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 석위(*Pyrrrosia lingua*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한, 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.

[0003] 뼈(bone)는 세포, 콜라겐성 기질 및 무기질 성분으로 구성된 매우 복잡한 조직이다. 이들은 장기의 보호뿐만 아니라, 조혈화에 필요한 미세 환경제공과 같은 기본적인 다양한 기능을 제공하여 준다. 또한, 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉, 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다.

[0004] 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 매우 역동적이고, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골재형성(bone remodeling)이라고 한다.

[0005] 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다. 골재형성은 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려졌다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand)과 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK(receptor activator of nuclear factor- κ B)에 결합하면 파골 전구세포가 거대 다핵 파골세포로 성숙화(PLturation)되어 골 흡수(bone resorption)가 일어난다. 그러나 OPG가 RANKL과 결합하면 RANKL과 RANK 사이의 결합이 차단되어 파골세포의 형성이 억제되고 필요 이상의 골 흡수가 일어나지 않게 된다. 이러한 파골세포의 활성화로 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴가 이루어지며 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다.

[0006] 한편, 석위(*Pyrrrosia lingua*)는 양치식물 고사리목 고란초과의 여러해살이풀로 나무줄기와 바위면에 붙어서 자란다. 뿌리줄기가 옆으로 뻗고 길이 3mm이며, 적색 또는 다갈색 비늘조각으로 덮인 형상이다. 잎자루는 지름 10~26cm로 딱딱하고 흠이 있으며 성모로 덮인다. 잎몸은 넓은 바소꼴 또는 달걀 모양의 바소꼴로 양 끝이 좁고 두껍다. 잎 앞면은 짙은 녹색으로 털이 없으나 뒷면에는 갈색 성모가 밀생하며 가장자리가 밋밋하다. 포자낭군은 포막이 없고 뒷면 전체에 밀생한다. 한방에서는 잎과 뿌리를 이노제로 사용한다.

[0007] 골질환 관련 선행기술로, 한국공개특허 제2019-0115789호에 골다공증을 치료하기 위한 약제 및 그의 제조 방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0380865호에 골다공증 예방 및 치료에 효과를 갖는 괴화 추출물이 개시되어 있으나, 본 발명의 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 석위 추출물이 파골세포 분화 억제 및 조골세포의 분화 촉진 효과가 있으며, 파골세포의 전구세포의 생존율을 증가시키고, 난소절제 동물모델에서 해면골 골밀도 및 골체적을 증가시키는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 석위(*Pyrrrosia lingua*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 중간엽줄기세포의 조골세포로의 분화용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 석위 추출물이 파골세포 분화 억제 및 조골세포의 분화 촉진 효과가 있으며, 파골세포의 전구세포의 생존율을 증가시키고, 난소절제 동물모델에서 해면골 골밀도 및 골체적을 증가시키는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 석위 열수 추출물(WEPL)(A) 및 석위 70% 에탄올 추출물(EEPL)(B)의 처리 농도에 따른 파골세포 형성 억제효과를 확인한 결과이다. **은 본 발명의 석위 추출물을 처리하지 않은 대조군 대비 석위 추출물을 처리한 실험군의 파골세포 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이다.

도 2는 석위 에탄올 추출물(EEPL)의 처리에 따른 조골세포 분화 촉진 효과를 확인한 Alizarin Red S 염색 결과이다. **은 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 석위 에탄올 추출물을 처리한 군의 조골세포 분화가 통계적으로 유의미하게 증가했다는 것으로, $p < 0.01$ 이다.

도 3은 석위 열수 추출물(WEPL)(A) 및 석위 70% 에탄올 추출물(EEPL)(B)의 처리 농도에 따른 파골세포 전구세포의 세포생존율을 확인한 결과이다. *, **은 본 발명의 석위 추출물을 처리하지 않은 대조군 대비 석위 추출물을 처리한 실험군의 세포생존율이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이다.

도 4는 난소절제(OVX) 마우스 모델에서 석위 에탄올 추출물(EEPL)의 경구 투여에 따른 대퇴 해면골의 골밀도(BMD)(A) 및 골체적(BV/TV)(B) 변화를 확인한 결과이다. ##는 난소를 절제하지 않은 정상 마우스군(Sham) 대비 난소를 절제한 마우스 군(OVX)의 대퇴 해면골의 골밀도(BMD) 및 골체적(BV/TV)이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이고, *, **은 난소절제 마우스군(OVX) 대비 난소절제 후 30 및 100mg/kg의 석위 에탄올 추출물을 투여한 군의 해면골 골밀도 또는 골체적이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 석위(*Pyrrhosia lingua*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 석위 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:

[0016] (1) 석위에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0017] (2) 단계 (1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0018] (3) 단계 (2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.

[0019] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 물 또는 에탄올이고, 더욱더 바람직하게는 에탄올이지만 이에 한정하지 않는다.

[0020] 상기 제조방법에 있어서, 추출방법은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 당 업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 석위 중량의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 5~15배 첨가하는 것이다. 추출온도는 20~110℃인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5~10시간인 것이 바람직하며, 0.5~5시간이 더욱 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 (3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조 또는 동결 건조하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0021] 상기 석위 추출물은 석위 잎을 추출한 것이 바람직하지만 이에 제한하는 것은 아니다.

[0022] 상기 석위 추출물은 파골세포의 분화를 억제하고 골생성을 촉진하는 특징이 있고, 상기 골질환은 골소실에 의해 야기될 수 있으며, 상기 골질환은 골다공증, 골다공증성 골절, 골소실증, 골결손, 불유합골절, 골형성 부전증, 골연화증, 골연화증성 골절, 골형성 장애, 종양에 의한 골파괴(Neoplastic bone destruction), 치주질환

(Periodontal diseases)에 의한 골파괴 및 퇴행성 골질환 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 제한하는 것은 아니다.

- [0023] 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 식위 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0025] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0026] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린 또는 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100중량부당 0.01~0.1중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 식위(*Pyrrrosia lingua*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 슈크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 담당자에 의해 용이

하게 결정될 수 있다.

- [0030] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 석위 추출물을 유효성분으로 함유하는 중간엽줄기세포의 조골세포로의 분화용 조성물에 관한 것이다.
- [0032] 뼈속 골수에서의 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 연골, 골조직, 인대, 골수기질로 분화하며 면역조절 및 억제기능이 있는 조직 재생에 적합한 줄기세포이다. 중간엽줄기세포는 수정란이 분열하여 생기 중배엽에서 분화된 연골, 골조직, 지방조직, 골수의 기질(stroma) 등에 존재하는 줄기세포를 의미한다. 본 발명에서의 중간엽줄기세포는 배양조건에서 바닥에 부착되어 자라야 하며, 시험관내에서 뼈모세포, 지방세포, 연골세포로 분화하는 능력이 있는 것이며, CD73, CD90 및 CD105를 발현하고, c-kit, CD11b, CD19, CD14, CD34, CD45, CD14, CD79 및 HLA-DR의 발현이 없는 것이 특징이다.
- [0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0034] **실시예 1. 석위 추출물 제조**
- [0035] 석위(*Pyrosia lingua*)의 추출물을 다음과 같은 방법으로 제조하였다.
- [0036] 석위의 열수 추출물(WEPL)은 석위 잎 500g을 증류수 3.5 l 에 넣고 3시간 동안 환류추출(Heating PLntle) 후 정성여과지(Qualitative Filter Paper, Ø185mm)로 여과하여 동결 건조하였다. 세포 실험에서는 증류수로 녹인 석위 열수 추출물(WEPL)을 0.22µl 필터로 여과 후 실험에 사용하였다.
- [0037] 석위의 에탄올 추출물(EEPL)은 석위 500g을 70% 에탄올 3.5 l 에 넣고 3시간 동안 환류추출(Heating PLntle) 후 정성여과지(Qualitative Filter Paper, Ø185mm)로 여과한 후 회전 농축기(Rotary evaporator)로 농축한 다음 동결 건조하였다. 디메틸설폭시드(dimethyl sulfoxide)로 녹인 후 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 실험에 사용하였다. 동물 실험에서는 동결 건조된 추출물을 멸균증류수로 녹여 사용하였다.
- [0038] **실시예 2. 석위 추출물의 파골세포 분화에 대한 효과 분석**
- [0039] 석위 추출물이 파골세포의 전구세포가 파골세포로 분화하는 것을 억제하는지 여부를 확인하고자 하였다. 파골세포 전구세포에 석위 열수 추출물(WEPL)과 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 농도별로 처리하고 이에 따른 파골세포수를 분석하였다.
- [0040] 구체적으로, 마우스의 골수 세포를 M-CSF(60ng/ml)와 10% FBS를 함유한 α-MEM 배지에 3일 동안 배양하여 골수 세포 유래 대식세포(BMM)를 수득하여 이를 파골세포 전구세포로 사용하였다. 파골세포를 생성하기 위해, 상기 수득한 BMM을 96웰 플레이트의 웰당 1×10^4 개의 세포를 넣은 후 M-CSF(60ng/ml) 및 RANKL(50ng/ml)을 포함하는 배지에 4일 동안 배양하였고, 같은 배양조건에서 BMM에 11.1, 33.3, 100 및 200µg/ml의 석위 열수 추출물(WEPL) 및 11.1, 33.3 및 100 µg/ml의 에탄올 추출물(EEPL)을 처리하였다. 세포를 10% 포르말린으로 고정된 후 나프톨 AS-MS 포스페이트 및 패스트 레드 바이올렛 LB 염(Fast red violet LB salt)을 이용하여 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 염색 하였고, 핵이 3개 이상인 TRAP 양성세포(파골세포, osteoclast)를 계수하였다.
- [0041] 그 결과, 33.3, 100 및 200 µg/ml의 석위 열수 추출물(WEPL) 처리에 의해서 파골세포 분화 억제 효과가 통계적으로 유의미하게 나타났고, 100µg/ml의 석위 에탄올 추출물(EEPL) 처리에 의해서도 파골세포 분화 억제 효과가 통계적으로 유의미하게 나타났다.
- [0042] **실시예 3. 석위 추출물의 조골세포 분화에 대한 효과 분석**
- [0043] 석위 추출물이 조골세포 분화를 촉진하는지 여부를 확인하고자 하였다. 중간엽줄기세포에 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 농도별로 처리하고 이에 따른 조골세포로의 분화 정도를 Alizarin Red S 염색으로 분석하였다.
- [0044] 구체적으로, 마우스의 골수 유래 중간엽줄기세포(D1 ORL UVA)를 96웰 플레이트의 웰당 1.7×10^4 개 넣은 후 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에 2일 동안 배양하였다. 10% FBS를 함유한 α-MEM 배지로 교체 후 아스코르브산

(ascorbic acid, 50 μ g/ml) 및 β -글리세롤포스페이트(β -glycerophosphate, 5mM)를 8일 동안 처리하여 조골세포 분화를 유도하였고, 동일한 배양조건에서 석위 에탄올 추출물(EEPL)의 농도 (11.1 및 33.3 μ g/ml)로 처리하였다. 세포를 10% 포르말린으로 고정된 후 조골세포 분화에 따른 석회화(mineralization) 정도를 확인하기 위해 Alizarin red S로 염색하였다. 10% 아세트산을 이용하여 염색된 Alizarin red S를 추출하여 농도를 측정하였다.

[0045] 그 결과, 33.3 μ g/ml의 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 처리함으로써, 통계적으로 유의미하게 조골세포 분화를 촉진하는 것을 확인하였다(도 2).

[0046] **실시예 4. 석위 추출물의 세포 생존에 대한 효과 분석**

[0047] 석위 추출물의 파골세포의 전구세포의 생존을 억제하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0048] 구체적으로, 상기 실시예 2의 골수세포 유래 대식세포(BMM)를 96웰 플레이트의 웰당 2×10^4 개 넣은 후 M-CSF(60ng/ml)를 함유하는 배지에 1일 동안 다양한 농도의 석위 열수 추출물(WEPL) 또는 석위 에탄올 추출물(EEPL) 시료를 첨가하여 배양하였다. 세포 계수 키트-8(Cell counting Kit-8, Dojindo Inc.)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(Cell viability)을 확인 하였다.

[0049] 그 결과, 11.1, 33.3, 100 및 200 μ g/ml의 석위 열수 추출물(WEPL) 처리에 의해서 파골세포의 전구세포 생존율이 증가하였다(도 3A).

[0050] 또한, 33.3 및 100 μ g/ml의 석위 에탄올 추출물(EEPL) 처리에 의해서 파골세포의 전구세포 생존율이 증가하였다(도 3B).

[0051] **실시예 5. 석위 에탄올 추출물의 골 소실에 대한 영향 분석**

[0052] 난소 절제 마우스에 석위 에탄올 추출물을 경구투여해서 대퇴 해면골의 골밀도(bone mineral density, BMD) 및 골체적(bone volume/total volume, BV/TV)을 분석하였다.

[0053] 구체적으로, 6주령의 암컷 C57BL/6J 마우스 24마리(중앙실험동물, 서울)를 1주 순화 후, 7주령 마우스를 양측난소절제(OVX, 18마리) 및 가수술(Sham, 6마리)을 실시하였다. 1주일 후 저지방사료(D12450B, Research diet사)를 자유롭게 섭취하게 하고, 상기 양측난소절제(OVX) 마우스 중에서, 임의 선택적으로 6마리에게는 멸균증류수에 녹인 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 마우스 kg당 30mg씩 5주 동안 매일 1회 경구 투여하였고, 다른 6마리에게는 멸균증류수에 녹인 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 마우스 kg당 100mg을 5주 동안 매일 1회 경구 투여하였다. 한편, 가수술(Sham, 6마리)군과 나머지 양측난소절제(OVX) 대조군(6마리)은 멸균증류수를 5주 동안 매일 1회 경구 투여하였다. 이후, 대퇴골을 적출하고 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 대퇴골의 마이크로 컴퓨터단층촬영(micro-CT, SkyScan 1276, Bruker) 후, 해면골(trabecular bone)의 골밀도(bone mineral density, BMD) 및 골체적(bone volume/total volume, BV/TV)을 분석하였다.

[0054] 그 결과, 도 4(A)에 나타난 바와 같이, 난소절제(OVX) 대조군 대비 난소 절제를 하지 않은 가 수술(Sham)군과 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 30mg/kg 또는 100 mg/kg을 투여한 군의 해면골 골밀도(BMD)가 통계적으로 유의적으로 증가하였다.

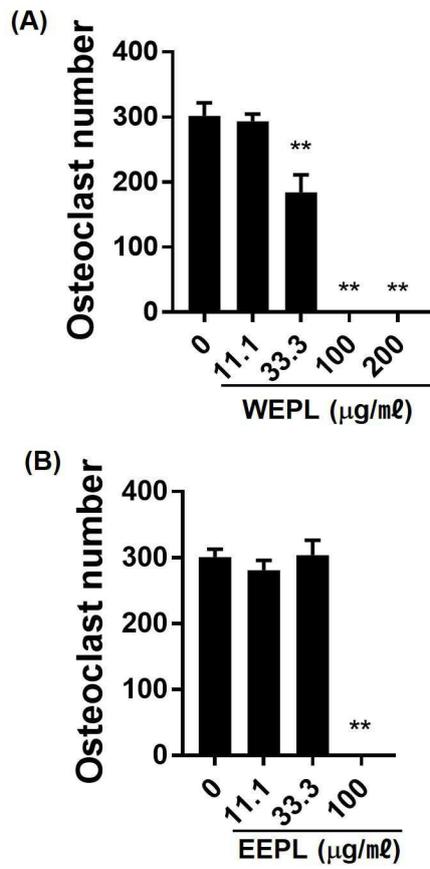
[0055] 또한, 도 4(B)에 나타난 바와 같이, 난소절제(OVX) 대조군 대비 난소 절제를 하지 않은 가 수술(Sham)군과 30mg/kg의 석위 에탄올 추출물(EEPL)을 투여한 군의 해면골 골체적(BV/TV)이 유의적으로 증가하였다.

[0056] [통계처리]

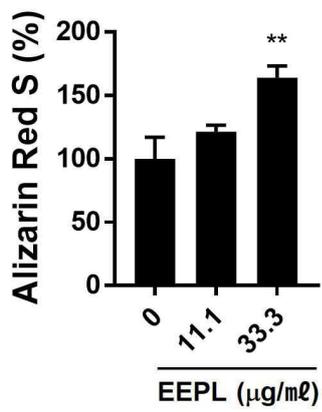
[0057] 본 발명의 실시예 2~4에서 획득한 데이터는 평균±표준편차로 나타냈으며, 실시예 5에서 획득한 데이터는 평균±표준오차로 나타냈다. 통계분석은 던넛 테스트를 수반하는 일원배치 분산분석으로 계산하였다.

도면

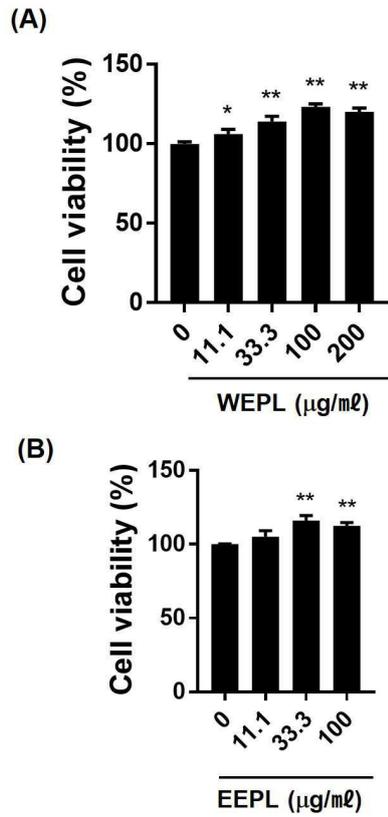
도면1



도면2



도면3



도면4

