



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월26일
(11) 등록번호 10-1739838
(24) 등록일자 2017년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0039924(분할)
(22) 출원일자 2017년03월29일
심사청구일자 2017년03월29일
(62) 원출원 특허 10-2016-0004170
원출원일자 2016년01월13일
심사청구일자 2016년01월13일
(56) 선행기술조사문헌
Molecules, 15, 7403-7414, 2010.
CN104887693 A
Journal of Medicinal Food, 14(11), 1439-1447, 2011.

(73) 특허권자
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
주식회사 나인비
대전광역시 유성구 대덕대로590번길 11-10, 103호(도룡동, 더.포엠)
(72) 발명자
정선용
경기도 용인시 기흥구 예현로 15, 107동 1401호(서천동, 서그내마을에스케이아파트)
박은국
경기도 수원시 영통구 인계로264번길 1, 3층 (매탄동)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 2 항

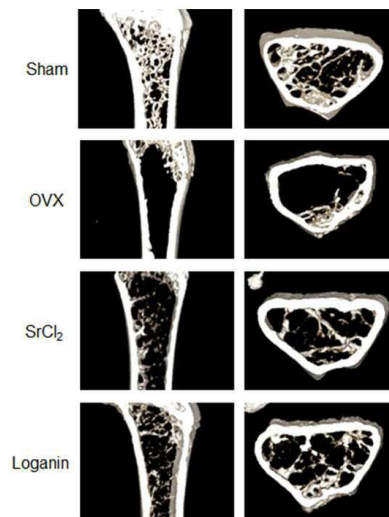
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 로가닌을 유효성분으로 함유하는 파골세포 분화 억제용 시약 조성물

(57) 요약

본 발명은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파골세포 분화 억제용 시약 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 로가닌은 파골세포 분화 억제에 좋은 효능이 있으며, 폐경 후의 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골흡수 마커 증가 및 골형성 마커 감소를 효과적으로 억제하는 효능이 있다. 따라서, 본 발명의 로가닌과 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 예방, 개선 및 치료를 위한 약학적 제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도7b



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2250/60 (2013.01)

(72) 발명자

김문창

경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 호원로 182-1,
현대아파트 108동 1005호

김정현

경기도 수원시 영통구 매봉로 20, 102동 1001호 (매탄동, 매탄 e-편한세상)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 시험관 내(in vitro) 파골세포 분화 억제용 시약 조성물.

청구항 2

시험관 내에서(in vitro) 로가닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 파골세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내 파골세포 분화 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파골세포 분화 억제용 시약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여성임을 상징하는 대표적인 호르몬인 에스트로젠(estrogen)은 생리, 임신, 폐경에 이르는 여성의 일생을 조절하는 중요한 여성 호르몬이다. 에스트로젠은 여성의 난소 안에 있는 여포와 황체 그리고 태반에서 주로 분비되는 여성호르몬으로 잘 알려져 있으며, 에스트론(E1), 에스트라디올(E2), 에스트리올(E3) 등의 호르몬을 총칭한다. 에스트로젠은 광범위한 조직과 기관에 영향을 미치며 특히 자궁, 비뇨기, 유방, 피부, 뼈, 그리고 혈관들이 유연성과 정상상태를 유지하는데 필요하다. 따라서 폐경 후의 여자에서는 에스트로젠 부족에 따른 다양한 증상이 나타날 수 있으며, 폐경 후 골다공증은 가장 심각한 증상 중의 한가지이다(도 1).

[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 2).

[0004] 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1)은 여성의 경우, 폐경 후 에스트로젠 호르몬이 부족해지면서 뼈의 구성성분이 체내조직으로 흡수되고 장을 통한 칼슘흡수가 저하되면서 발생한다(도 3). 특히, 에스트로젠 호르몬의 급격한 감소로 인해 파골세포(osteoclast)의 분화 및 증식이 촉진되어 그 결과로서 골흡수(bone resorption)가 골형성(bone formation) 보다 많아지게 되어 골소실이 항진되고 골량의 감소가 발생하게 된다(도 4). 사람에 따라 폐경 후에 급격히 진행될 수 있다.

[0005] 폐경 후 골다공증의 작용 기전은, 폐경에 의해 에스트로젠이 감소하게 되면 골수와 흉선 등에서 인터루킨-7(IL-7)이 크게 증가하게 된다. 이러한 IL-7의 증가는 말초혈액에서의 T-세포의 수가 증가하게 되고, 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)의 발현 증가가 발생한다. TNF와 더불어 RANKL, M-CSF, IL-1, IL-6 등의 사이토카인의 증가로 인해 파골세포(osteoclast)의 분화와 증식이 활성화되게 되는데, 사람에 따라서는 이러한 파골세포의 과잉 분화와 증식으로 인해 결국 골량 및 골밀도 감소에 의한 폐경 후 골다공증이 발생하게 된다(도 5).

[0006] 노인성 골다공증(제2형 골다공증, type 2)은 남녀 모두에서 연령증가에 따른 골소실에 의해 생긴다. 체내 활성형 비타민 D의 감소로 장내 칼슘흡수가 적어지는 것과 골세포를 새로 만들어내는 조골세포가 감소되어 나타나고 비교적 완만히 진행된다.

[0007] 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 있

다.

[0008] 갱년기가 시작되면 난소의 기능이 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.

[0009] 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, 보다 효과적인 여성 폐경후 골다공증의 예방, 개선, 치료를 위한 약학적 제제 또는 건강기능식품의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0024651호(2015.03.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 로가닌(Loganin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있으며, 보다 구체적으로는 폐경 후 여성의 에스트로겐 호르몬의 감소로 인해 발생하는 폐경 후 골밀도 감소 및 골다공증의 예방, 개선 및 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 발명의 목적은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 시험관 내(in vitro) 파골세포 분화 억제용 시약 조성물 및 시험관 내에서(in vitro) 로가닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 파골세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내 파골세포 분화 억제 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 로가닌(Loganin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 로가닌(Loganin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 시험관 내(in vitro) 파골세포 분화 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 로가닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 파골세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내 파골세포 분화 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파골세포 분화 억제용 시약 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 로가닌은 파골세포 분화 억제에 좋은 효능이 있으며, 폐경 후의 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골흡수 마커 증가 및 골형성 마커 감소를 효과적으로 억제하는 효능이 있다. 따라서, 본 발명의 로가닌과 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 예방, 개선 및 치료를 위한 약학적 제제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 여성 갱년기 증후군 증상의 종류와 증세를 나타낸 것으로, 폐경 후 골다공증은 가장 심각한 증상 중의 한가지이다.
 도 2는 골다공증의 발생기전을 나타낸 모식도이다.
 도 3은 폐경 후 에스트로겐 호르몬이 부족해지면서 뼈의 구성성분이 체내조직으로 흡수되고, 장을 통한 칼슘흡수가 저하되면서 발생하는 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증, type 1)을 나타내고 있다.
 도 4는 폐경 후 에스트로겐 결핍시 발병하는 폐경 후 골다공증의 발병 기전을 나타낸다.
 도 5는 폐경 후 골다공증의 작용 기전을 나타낸다.
 도 6은 마우스 골수에서 파골세포로 분화가 가능한 단핵세포(monocyte)를 분리(도 6a)하여, 로가닌을 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 파골세포로의 분화 정도를 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 측정(도 6b) 및 TRAP 염색(도 6c)을 통해 분석한 결과이며, 로가닌이 단핵세포의 파골세포로의 분화 억제에 유의한 효과가 있다는 것을 나타낸다.
 도 7은 폐경 마우스 모델(난소적출 마우스)에 로가닌 10mg/kg/day 투여 12주 동안의 골밀도변화(도 7a)를 측정하였으며, 대퇴부 뼈를 적출하여 micro-CT 사진(도 7b)을 찍은 후 뼈 부피율(% bone volume, BV)(도 7c), 해면골소주 두께(trabecular thickness, Tb.Th)(도 7d), 해면골소주 수(trabecular number, Tb.N)(도 7e), 해면골소주 공간(trabecular spacing, Tb.Sp)(도 7f)을 수치화하여 분석한 결과이며, 로가닌이 폐경에 의한 골밀도 감소 및 뼈 미세구조 치밀도 저하를 유의하게 억제한다는 효과가 있다는 것을 나타낸다.
 도 8은 폐경 마우스 모델에 로가닌 10mg/kg/day 투여 12주 후 마우스 혈액에서 혈청을 분리하여 골대사 마커인 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand)(도 8a)와 OPG(osteoprotegerin)(도 8b)의 혈중 단백질량과 OPG/RANKL의 비율(도 8c)을 측정한 결과이며, 로가닌이 폐경에 의한 혈중 골흡수(bone resorption) 마커 증가와 골형성(bone formation) 마커의 감소를 유의하게 억제한다는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이에, 본 발명자들은 폐경 후 여성에서 에스트로겐 호르몬 감소로 나타나는 폐경 후 골밀도 감소와 뼈 미세구조 치밀도 저하를 억제하는 효능이 있는 단일화합물인 로가닌의 in vitro 및 in vivo 효능에 관해 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0020] 본 발명은 로가닌(Loganin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0021] 상세하게는, 상기 여성 폐경 후 골다공증은 에스트로겐 분비 저하에 의한 것이고, 상기 에스트로겐 분비 저하는 골밀도 감소, 뼈 미세구조 치밀도 저하, 혈중 골흡수(bone resorption) 마커 증가 및 골형성(bone formation) 마커 감소를 유도할 수 있다.
- [0022] 보다 상세하게는, 상기 골흡수(bone resorption) 마커는 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)이고, 상기 골형성(bone formation) 마커는 OPG(osteoprotegerin)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 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.
- [0024] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 약학 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제 등으로 제형화 될 수 있다. 한편, 상기 약학적 조성물은 상기 로가닌(Loganin) 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있는데, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 약품 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 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.
- [0025] 상기 약제학적 조성물은 여성 폐경 후 골다공증의 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 통상적으로는 국

소 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.

[0026] 또한, 본 발명은 로가닌(Loganin), 이의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 여성 폐경 후 골다공증 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 건강식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽, 음료 또는 환의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품 조성물은 유효성분인 본 발명에 따른 로가닌(Loganin) 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0028] 상기 건강식품조성물에 함유된 로가닌(Loganin)의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0029] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 로가닌(Loganin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 시험관 내(in vitro) 파골세포 분화 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 로가닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 파골세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내 파골세포 분화 억제 방법을 제공한다.

[0032] 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.

[0033] <실시예 1> 로가닌(Loganin)의 화학적 구조

[0034] 본 발명에서 동물실험에 사용한 시험 단일화합물은 로가닌(Loganin)이다. 로가닌은 마전과(馬錢科, Loganiaceae)에서 유래된 이름의 이리도이드 배당체(iridoid glycosides)로서 화학구조식은 $C_{17}H_{26}O_{10}$ 이다. 로가닌은 마전자(馬錢子, nux vomica), 산수유(Cornus officinalis)에 많이 함유되어 있는 천연 유래의 단일화합물(single compound)이다.

[0035] <실시예 2> 로가닌의 파골세포 분화 억제 효능

[0036] 파골세포(osteoclast)는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로부터 유래 되며 노화된 뼈를 파괴하는 골흡수를 담당하는데, 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성(bone formation)과 파골세포에 의한 골흡수(bone resorption)의 균형 있는 작용을 통하여 골재형성(bone remodeling)이 이루어진다. 여성 에스트로겐이 급격히 감소되는 폐경 후에는 특히 파골세포의 분화 및 증식의 증가로 인한 골흡수가 증가되기 때문에 파골세포 분화 억제에 대한 로가닌의 효능을 조사하였다.

[0037] 파골세포의 분화 활성 실험을 위하여, 6주령 마우스 골수(bone marrow)로 부터의 파골세포의 근원세포인 primary 단핵세포(monocyte)를 분리, 배양하였다. 단핵세포 positive 마커 항체인 CD11b를 처리한 후, 세포자동 해석분리장치(fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 마우스 골수로부터 단핵세포가 제대로 분리, 배양되었음을 검증하였다(도 6a). 마우스 단핵세포에 파골세포로의 분화 유도제인 M-CSF(30 ng/ml)와 LANKL(50 ng/ml)을 처리하여 3일 동안 파골세포로 분화를 유도시켰다. 또한, 파골세포 분화 유도 시에 음성 대조군에는 생리식염수를 실험군에는 로가닌을 1 μ g/ml, 5 μ g/ml 및 10 μ g/ml의 농도로 배지에 함께 첨가하였다. 단핵세포의 파골세포로의 분화 활성 정도는 TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 측정 및 염색법으로 분석하였다. 세포배양 3일 후에 생리식염수로 세포를 세척한 후, TRAP 활성도를 405 nm의 파장에서의 흡광도 측정과 TRAP 염색후 현미경 관찰 방법으로 분석하였다. 생리식염수를 처리한 대조군(Control)에 비교해서, 로가닌을 1 μ g/ml(Lo1), 5 μ g/ml(Lo5) 및 10 μ g/ml(Lo10)의 농도로 처리한 실험군 모두에서 통계적으로 유의하게 단핵세포의 파골세포로의 분화가 억제되었다(도 6b)(*: $p < 0.05$ vs. 음성 대조군). 또한, TRAP 염색 실험에서 파골세포 유도 대조군(Induction)에 비해 파골세포 유도와 로가닌(10 μ g/ml)을 함께 처리한 실험군

(Induction+Loganin)에서 분화된 파골세포의 수가 현저하게 감소되었다(도 6c). 즉, 로가닌이 파골세포 분화 억제에 뛰어난 효능이 있음이 밝혀졌다.

[0038] <실시예 3> 난소절제 폐경 마우스 모델에서 로가닌의 폐경 후 골다공증 발생 억제 효능

[0039] 로가닌의 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(SrCl₂)을 10mg/kg/day 용량으로 경구 주입(oral injection)한 SrCl₂ 마우스군은 골밀도 개선 효능 실험에서는 양성 대조군으로 사용하였다. 실험군은 로가닌을 10mg/kg/day 용량으로 경구 주입하였다. 10주령의 sham-operated 및 난소절제 ddY 암컷 마우스는 중앙실험동물(주)에서 구입하여 아주대학교 실험동물센터 검역실에서 1주간의 순화기간을 거친 후 청정동물사육구역으로 이동시켰다. 마우스 개체별 체중을 측정하여 실험군 간의 통계적으로 유의한 체중 차이가 나지 않도록 군분리를 시행하였다. 실험에 사용할 로가닌은 수용액으로 시험액을 만들었으며, 실험동물센터의 반입을 위해 방사선 조사 전문업체인 소야그린텍(주)에 의뢰하여 감마선 조사를 통해 멸균 작업을 시행하였다.

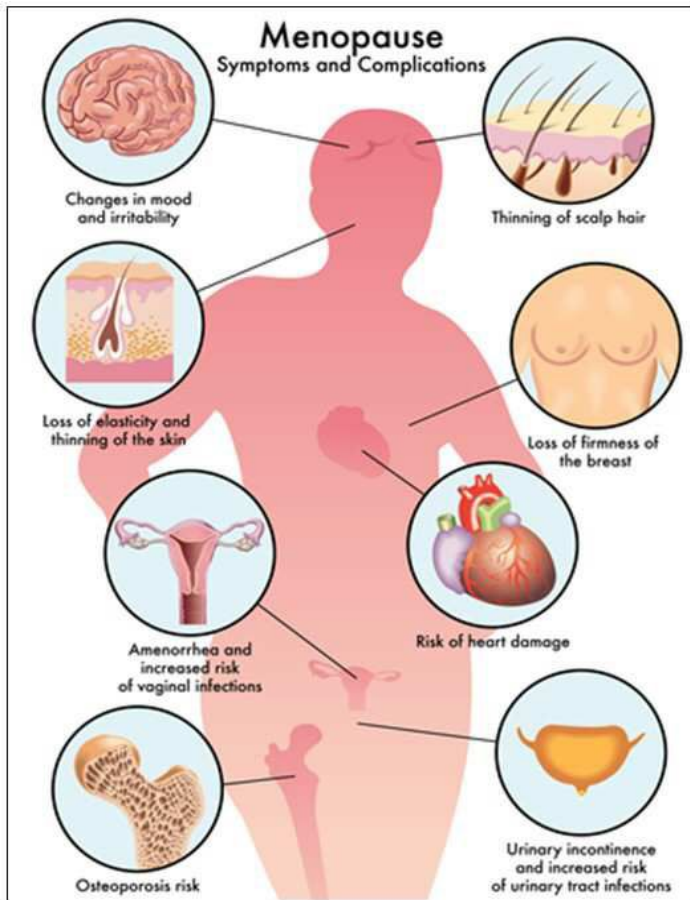
[0040] 동물실험 시작 시에 PIXImus bone densitometer로 초기 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다. 졸레틸(zoletil)과 럼퐁(rompun)의 혼합마취제(1:2 혼합액을 생리식염수와 2:3 비율로 희석) 50ul를 주사하여 마우스를 마취시킨 후, 골밀도 측정 틀에 고정시키고 골밀도를 측정하였다. 마우스에 로가닌 투여 6주 후와 12주 후 마우스의 골밀도를 PIXImus bone densitometer로 측정하고 12주 실험종료 후 혈액 채취와 대퇴부 뼈를 적출하여 micro-CT를 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.

[0041] 난소를 제거하지 않은 정상의 Shame 마우스와 비교하였을 때, 난소를 제거한 OVX 마우스의 뼈의 6주 및 12주 후의 골밀도 증가율의 현저한 감소와(도 7a), micro-CT 촬영 사진 상의 뼈 미세구조 치밀도의 현저한 저하를 나타내었다(도 7b). 또한, 뼈의 부피율(도 7c), 해면골소주 두께(도 7d), 해면골소주 수(도 7e)는 현저하게 낮았고 해면골소주 공간(도 7f)은 높았다. 하지만, 로가닌을 10mg/kg/day 용량으로 12주간 투여한 실험군에서는 폐경에 의해 발생하는 골밀도 감소와 뼈 미세구조 치밀도 저하가 억제되고(도 7a, 7b), 뼈의 부피율, 해면골소주 두께, 해면골소주 수의 감소와 면골소주 공간의 증가도 모두 억제되었다(도 7c, 7d, 7e, 7f). 이러한 결과는 양성 대조군인 SrCl₂ 마우스의 결과와 유사하였다. 또한, 통계분석에서도 효능의 유의성이 확인되었다(*: p<0.05 vs. OVX 음성 대조군).

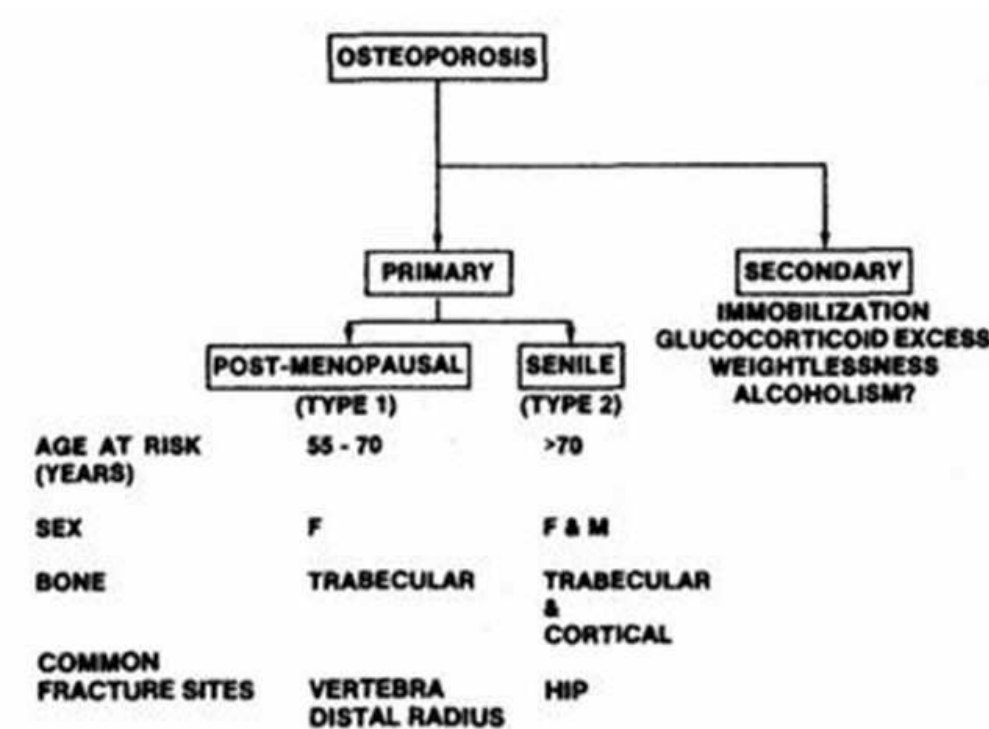
[0042] 다음으로, 혈중 골대사 마커의 변화를 조사하였다. 폐경 마우스모델 실험 12주 후에 마우스 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 골흡수(bone resorption) 마커인 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand)와 골형성(bone formation) 마커인 OPG(osteoprotegerin)의 혈중 단백질량을 ELISA 방법으로 분석하였다. 난소를 제거하지 않은 정상의 Shame 마우스와 비교하였을 때, 난소를 제거한 OVX 마우스에서 RANKL의 증가(도 8a), OPG의 감소(도 8b), OPG/RANKL 비율의 감소(도 8c)를 나타내었다. 하지만, 로가닌을 10mg/kg/day 용량으로 12주간 투여한 실험군에서는 혈중 골흡수 마커인 RANKL의 증가, 골형성 마커인 OPG의 감소, OPG/RANKL 비율의 감소가 모두 억제되었다(도 8a, 8b, 8c). 이러한 결과는 양성 대조군인 SrCl₂ 마우스의 결과와 유사하였다. 또한, 통계분석에서도 효능의 유의성이 확인되었다(*: p<0.05 vs. OVX 음성 대조군).

도면

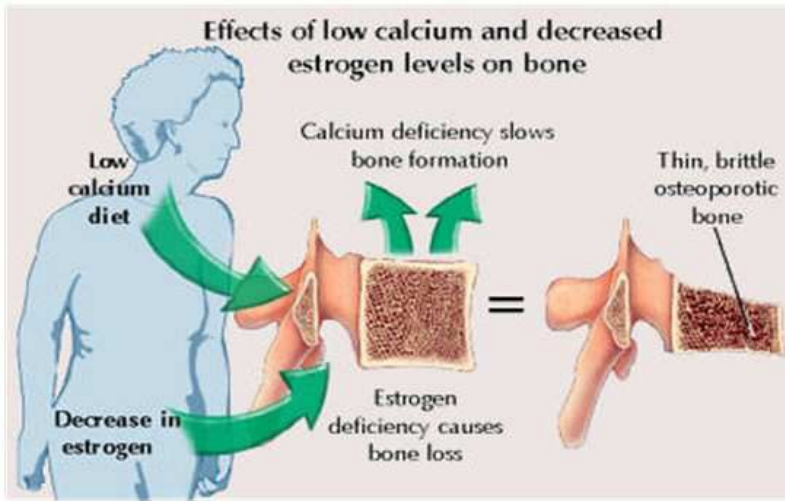
도면1



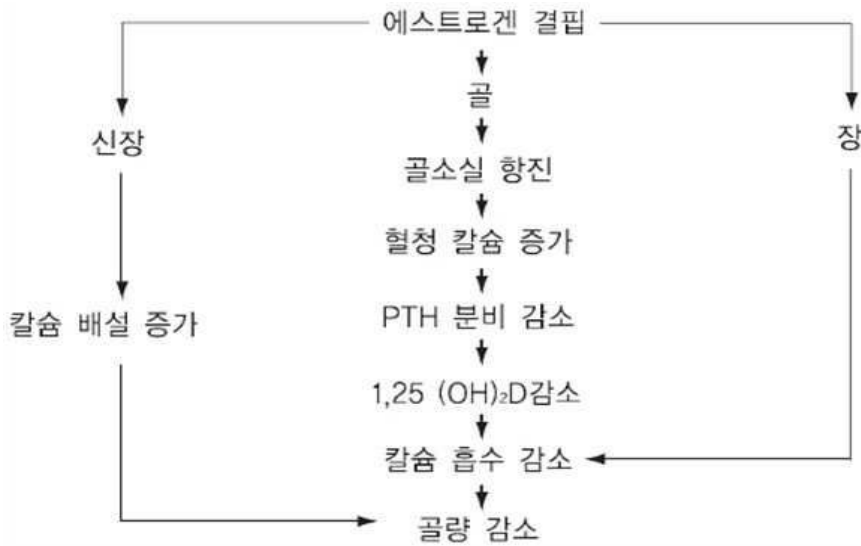
도면2



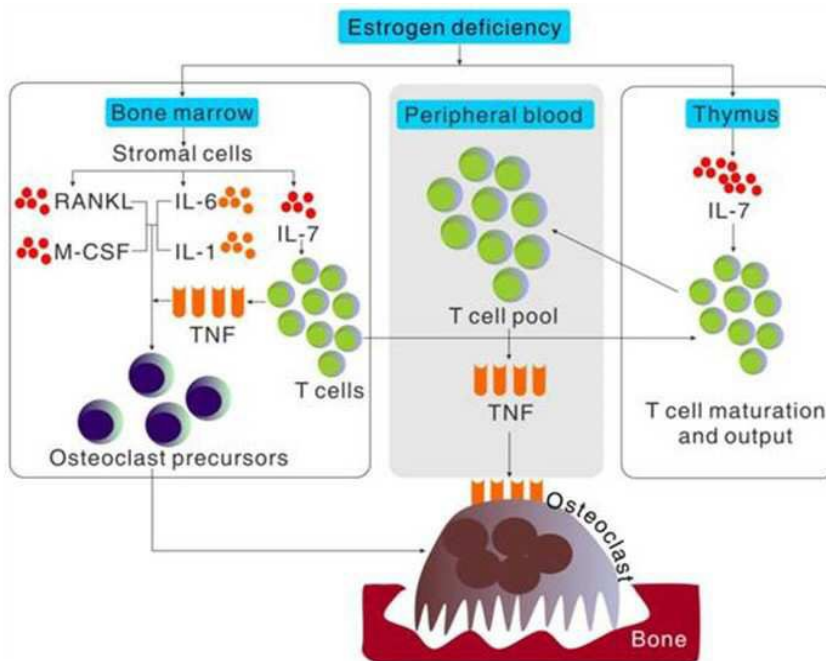
도면3



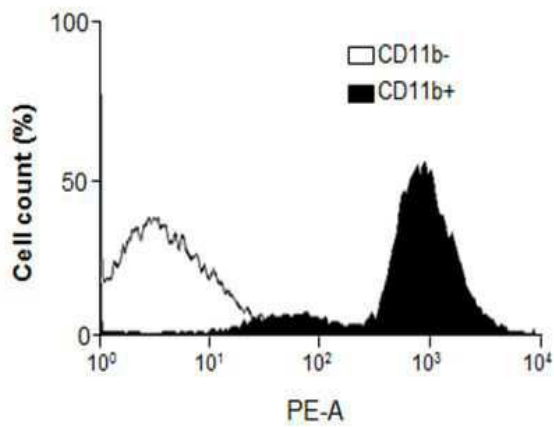
도면4



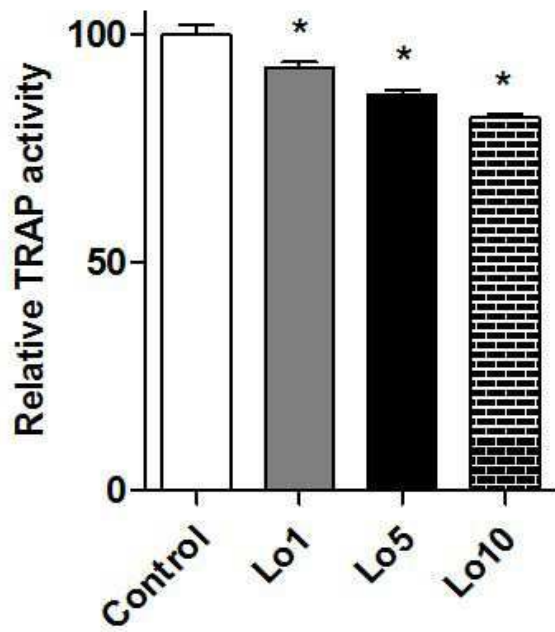
도면5



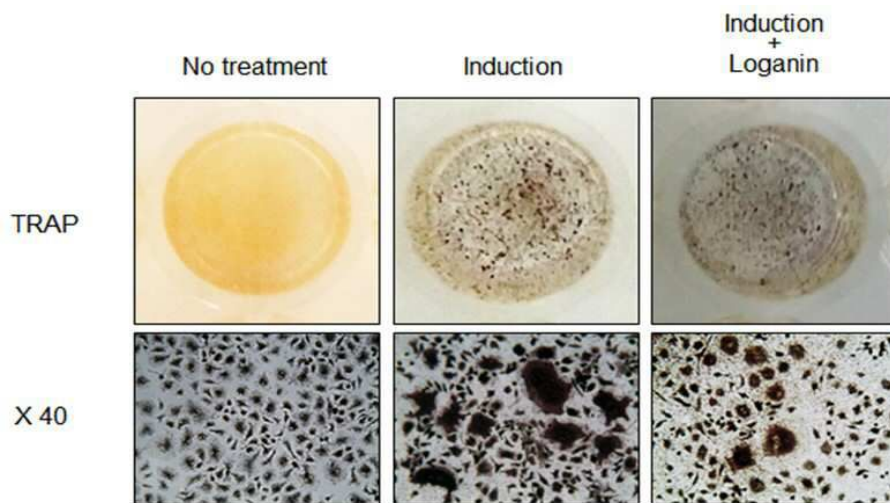
도면6a



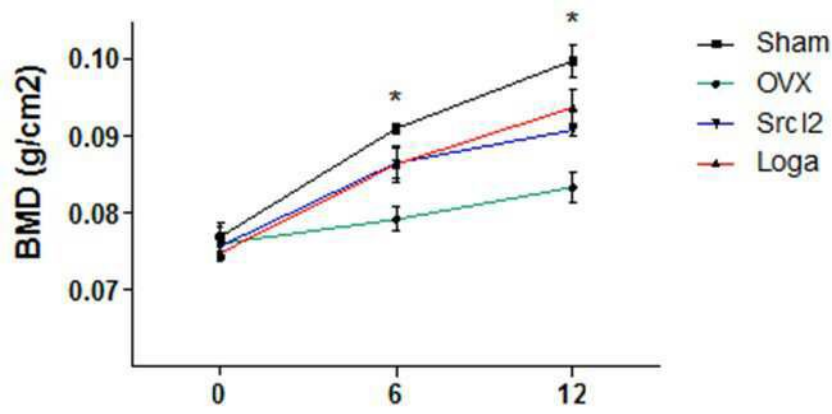
도면6b



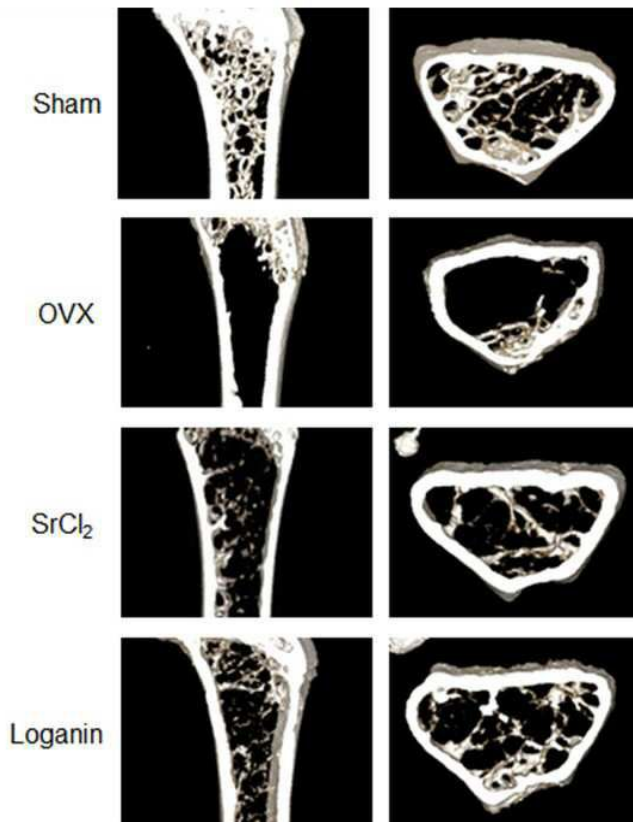
도면6c



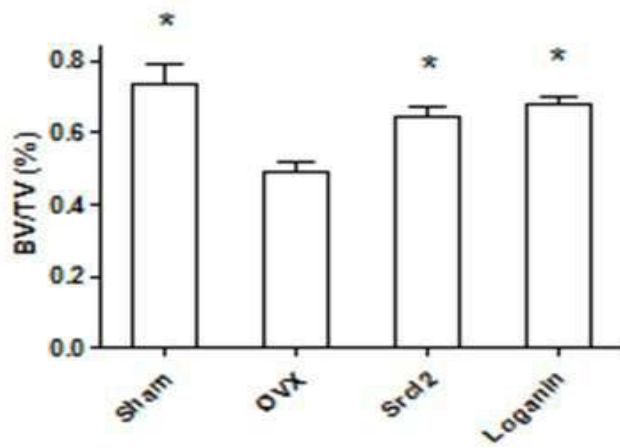
도면7a



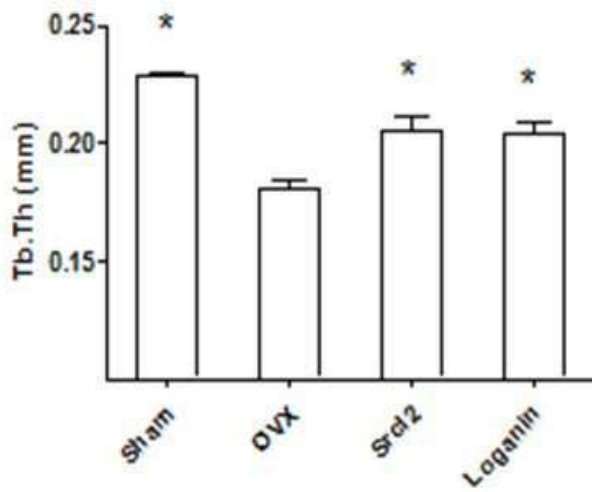
도면7b



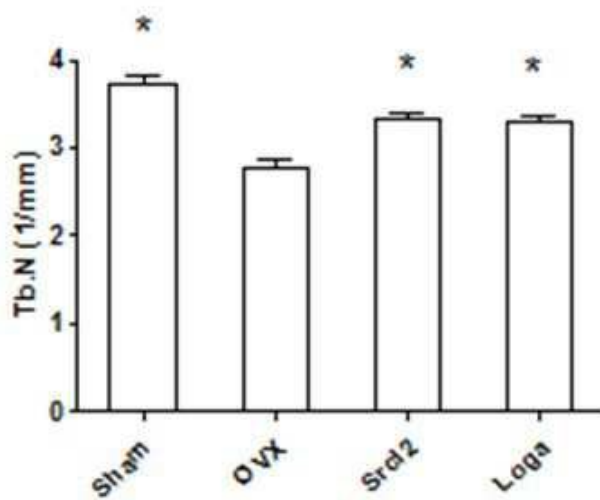
도면7c



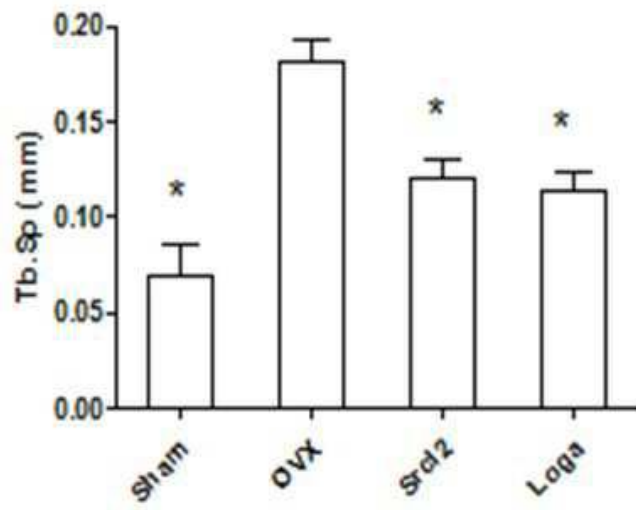
도면7d



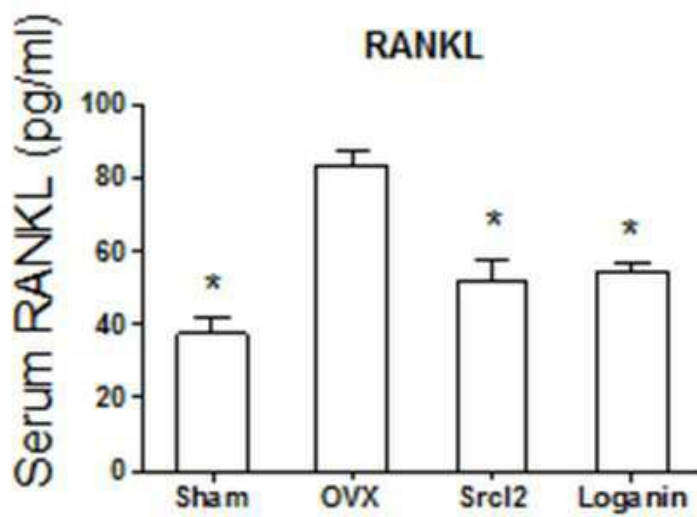
도면7e



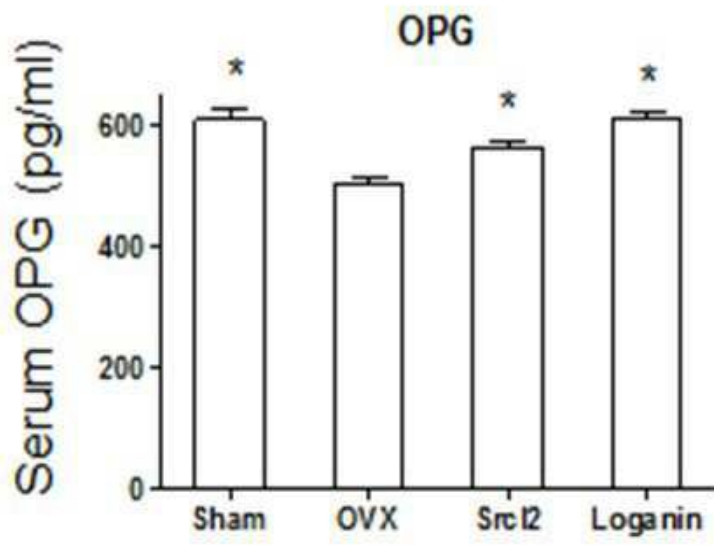
도면7f



도면8a



도면8b



도면8c

