(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0032446
(43) 공개일자 2011년03월30일

(51) Int. Cl.
A61K 36/481 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 36/54* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0089932
(22) 출원일자 2009년09월23일
심사청구일자 2009년09월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
박동석
서울특별시 송파구 문정동 휘미리 APT 210동 1503호
이재동
서울특별시 강남구 대치동 대치삼성아파트 103동 1101호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

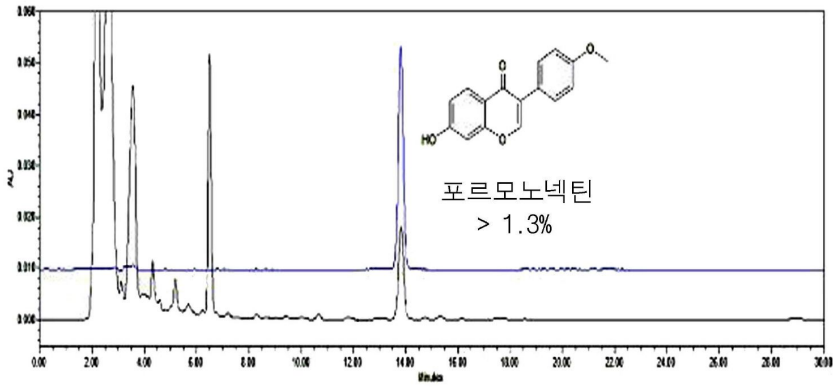
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 포함하는 골다공증 및 골질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 BHH10{황기(*Astragalus membranaceus* BGE.), 계지(*Cinnamomum cassia*), 황백(*Phellodendron amurensis*)} 추출물을 함유하는 골다공증 및 골질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 BHH 10 추출물은 난소절제 골다공증 동물실험에서 골형성 회복를 나타내었고, 파골세포 활성을 억제하고, 조골세포의 증식 및 분화를 촉진하며, 성장인자 및 골형성 단백질 발현 증가 효과를 나타냄으로서 골다공증의 예방과 치료 및 치주질환 등의 골질환에 유용한 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

대 표 도



(72) 발명자

백용현

서울특별시 강남구 대치동 청실 APT 3동 1005호

허정은

서울특별시 서대문구 연희동 712번지

최도영

경기도 광주시 오포읍 신현리 현대모닝 1차 아파트 204-1502

특허청구의 범위

청구항 1

황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C_1 내지 C_4 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 혼합생약재는 황기 : 계지 : 황백의 배합 중량비가 0.5 ~ 3 : 0.5 ~ 3 : 1인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 혼합생약재는 황기 : 계지 : 황백의 배합 중량비가 2 : 2 : 1인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 골질환은 치주질환 또는 골형성 부전증인 것을 특징으로 하는 골질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 9

황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 골질환은 치주질환 또는 골형성 부전증인 것을 특징으로 하는 골질환 예방 및 개선용 건강식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 BHH10{황기(*Astragalus membranaceus* BGE.), 계지(*Cinnamomum cassia*) 및 황백(*Phellodendron amurensis*)} 추출물을 함유하는 골다공증 및 치주질환 등의 골질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골은 석회화된 견고한 표면과 골수로 불리는 내부의 세포 성분이 결합된 특수조직이다. 생리적으로 상이한 이 두 구조의 결합은 일생을 두고 지속되는 골의 재형성(bone remodeling) 과정에 기인한 것인데, 이는 골에 가해지는 호르몬이나 물리적 자극에 의해 골수에 있는 파골세포(osteoclast)들의 골의 표면으로 모여 골을 파들어가면서 파괴하는 골흡수(bone resorption)가 일어난 자리에 모여든 조골세포(osteoblast)에 의한 골기질의 합성(bone formation)으로 설명된다(Park JS, *Natl. Nutr.*, 215, pp25-31, 2000).

[0003] 골표면에 위치하는 조골세포는 세포막에 당단백 효소인 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)를 가지고 있으며 I 형 콜라겐(type I Collagen, Col), 오스테오칼신(osteocalcin, OCN), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN), 뼈 시알로단백(bone sialoprotein, BSP)과 같은 골기질 물질을 분비하고 석회화시키는 역할을 한다(Collier FM et al., *Endocrinology*, 139(3), pp1258-1267, 1998). 골은 조골세포와 파골세포 활성의 균형을 유지함으로 골량이 일정하게 유지되며 이들의 활성으로 골의 재생이 지속적으로 일어난다. 그러나 조골세포보다 파골세포의 활성이 증가할 때 골량이 감소하여 골다공증을 유발하고, 폐경기 이후의 여성은 혈중 에스트로겐 농도 감소로 골다공증을 유발한다.

[0004] 골다공증은 현재 가장 중요한 사회적 문제 중 하나로 이로 인하여 한창 일을 할 나이의 여성들에게 있어 골다공증으로 인한 골반뼈의 골절이 야기되며 미국의 경우 매년 약 26만명의 여성들에게 유발되고 있으며, 이중 약 12 ~ 20% 정도는 사망에 이르고 있다. 사회가 노령화되고 여성들의 사회참여가 활발해지고 있는 상황에서 노인들이나 폐경 후 여성들의 골다공증 및 골다공증으로 인한 골절은 심각한 문제를 야기한다.

[0005] 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 물질로는 에스트로겐(estrogen), 남성화 스테로이드 호르몬(androgenic anabolic steroid), 칼슘 제제, 인산염, 불소 제제, 이프리플라본(Ipriflavone), 비타민 D_3 등이 있다. 에스트로겐은 조골세포의 세포고사를 억제하여 세포의 생존기간을 증가시키고 파골세포의 세포고사를 촉진하여 세포의 생존기간을 감소시켜 폐경증상의 치료와 골밀도 유지에 어느 정도 효과적인 방법이나 유방암, 자궁내막 증식증 등을 유발하는 부작용이 있다. 따라서 세계적으로 에스트로겐의 긍정적인 치료 효과만을 갖는 선택적인 에스트로겐 수용체 조절자(selective estrogen receptor modulators, sERMs)를 개발하여 에스트로겐 대체 치료에 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있고 같은 맥락에서 최근에 상대적으로 골에 분포도가 높은 에스트로겐 수용체 아형(subtype)인 ERβ에 대한 관심이 집중되고 있다. 골의 재흡수를 억제하는 약물이고 SERMs, fluoride 등이 있는데 이들 약물은 단기간(~ 5년 정도)의 치료에는 골밀도 증가에 효과적이나 장기간의 투여시 골량의 증가가 촉진되지 않으며 오히려 장기간의 투여에 따른 부작용을 초래한다. 따라서 장기간의 투여에도 지속적인 골밀도 증가 효과를 나타내고 부작용이 적은 안전한 예방 및 치료제 개발이 요구되고 있다. 이외에도 골다공증 파골세포의 활성을 억제하여 골파괴를 억제시키거나 조골세포의 증식을 통해 골재생 단위의 활성을 증가시키는 약물로 $1,25(OH)_2D_3$(calcitriol)(칼시토닌), 부갑상선호르몬(parathyroid hormone, PTH), 비스포스포네이트(bisphosphonate) 제제 등이 있다.

[0006] 그러나 기존 골다공증 치료약제들은 골흡수만을 차단시키거나 골형성을 촉진시키는 효능만을 갖으며 장기간 투여시 많은 부작용을 유발하고 있다. 따라서 장기간 투여에도 지속적인 골밀도 증가 효과를 나타내고 부작용

이 적은 안전한 예방 및 치료제 개발이 요구되고 있다.

[0007] 황기(*Astragalus membranaceus* BGE.)는 콩과(Fabaceae)에 속하는 다년생 초본으로 산지에 자라고 약초로 흔히 재배된다. 한국에는 황기속(*Astragalus*)에 제주도에서 자라는 탐라황기(*A. adsurgens*), 꽃이 자주색인 자주황기(*A. dauricus*), 백두산 지역의 고원에서 자라는 개황기(*A. uliginosus*) 등을 비롯해 5종(種)이 자라고 있다. 한약재로 쓰이는 황기는 황기의 뿌리로 가늘고 긴 원뿔형, 원구형 또는 몽둥이 모양이다. 길이 10 ~ 80 ㎝, 지름은 0.2 ~ 15 ㎜로 흔히 분기되어 있다. 겉면은 담백색을 나타내고 회갈색의 코르크층이 군데군데 있으며, 단단하고 절단면은 섬유성이며, 세로 절단면은 백색이고 중심부는 유황색을 띠고 있다. 봄 또는 가을에 채취하여 건조시킨다. 성분으로는 교질, 점액질, 전분, 자당, 포도당, 섬유소, 비타민 B 등이 알려져 있다. 성질은 약간 따뜻하고 독이 없으며 맛은 달다.

[0008] 황기는 한방에서는 생약재로 사용하는데, 주로 비경(脾經), 폐경(肺經)에 작용하며, 아울러 신경(腎經), 대장경(大腸經) 및 삼초경(三焦經)에도 작용한다. 황기의 효능으로는 보기승양(補氣升陽), 고표지한(固表止汗: 피부의 방어기능을 강화하여 땀을 멈추게 하는 치료법), 이수소종(利水消腫: 배뇨를 원활하게 하여 부은 것을 가라앉게 하는 치료법), 탁독배농(托毒排膿: 기혈을 보익하는 약물을 사용하여 정기를 보조해서 병독을 밖으로 밀어냄으로써 내부의 농을 배출하는 치료법) 등이 있다. 따라서 황기는 만성쇠약, 특히 비위기(脾胃氣) 허약에 효과가 있으며, 중추신경계의 흥분작용 효과도 있다. 피로, 무력감, 음성저하, 맥연완(脈軟緩) 등의 증상이 있을 때 복용하면 좋은데 장기간 다량 복용해야 효과가 있다. 탈항(脫肛), 자궁탈(子宮脫), 내장하수(內臟下垂), 자궁출혈 등의 중기하함(中氣下陷: 비장의 기능이 악화된 것이 더욱 악화됨) 증상이 있을 때도 사용한다. 체질을 개선하고 전신 근육의 긴장을 높임으로써 효과를 나타낸다. 말초신경마비, 뇌졸증의 후유증인 반신불수, 만성관절류머티즘, 결관절주위염 등에 사용하는데 이들은 기혈양허(氣血兩虛)로 인해 순환장애가 생기는 동통이나 혈비(血痺)이다. 기행즉혈행치혈선치기(氣行則血行治血先治氣)라는 관점에서 황기를 써서 기를 보충한다. 황기는 고표의 주약이므로 표허자한(表虛自汗: 기운이 부족하여 피부의 방어기능이 튼튼하지 못해 저절로 땀이 나는 증상)에 사용한다. 신장염에도 사용하는데 황기는 이뇨하여 부종을 없앨 뿐 아니라 단백뇨를 낮추고 전신의 영양상태를 개선한다. 황기는 오랫동안 헐어 있는 화농증에 사용한다. 현대의학적으로 보면, 항균작용과 인체의 저항력 증가로 인하여 자궤배농되어 유합하기 쉽게 하는 것이다.

[0009] 최근 연구 보고에 따르면, 황기는 면역력을 높여주며 조혈기능을 높여줌으로써 방사선치료를 받고 있는 암환자의 치료 및 회복에 도움을 주는 처방에 사용한다고 보고되었으며(Cheng XD et al., *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 36(3), pp211-217, 2004), 난소 절제술을 실시한 동물모델(OVA rat model)에 황기 분획 추출물을 경구함으로써 골대사 작용을 촉진 시키는 결과 등이 보고된 바 있다(Kim C et al., *Arch. Pharm. Res.*, 26(11), pp917-924, 2003). 그러나 현재까지 황기의 골파괴 억제, 골형성 및 골재생 촉진에 의한 치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다.

[0010] 계지(*Cinnamomum cassia*)는 장나무과의 상록교목식물인 계수나무(또는 계피나무라고도 함)의 어린 가지로, 맵고 달며 성질은 따뜻하고 심과 폐와 방광에 작용한다. 위를 튼튼하게 하고, 중풍을 억제하며 진통, 강심작용이 있고 피부혈관을 확장시키고 한선을 자극하여 땀을 내어 해열작용을 하며 바이러스의 억제작용을 한다고 알려져 있으며, 오한, 발열, 두통, 몸의 통증, 땀이 나지 않는 경우나 심계항진 등에 사용한다. 긴 원주형으로 많은 가지가 있으며 길이는 30 ~ 70 ㎝, 굵은 쪽의 지름은 0.3 ~ 1 ㎝이다. 표면은 홍갈색이나 갈색으로 세로의 능선이 있고 가는 주름과 작은 덩어리 모양의 잎과 가지가 붙어있던 흔적이 있으며, 질은 단단하고 부서지기 쉬우며 절단하기 쉽고, 광서, 광동성이 주산지이며 월남, 스리랑카, 인도 등지에서도 재배된다. 계지의 약리실험 결과로 발한작용, 해열작용, 진통작용, 강심작용, 항알레르기작용, 항바이러스작용 및 억균작용 등이 밝혀졌으나, 현재까지 계지의 골파괴 억제, 골형성 및 골재생 촉진에 의한 골다공증 치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다.

[0011] 황백(*Phellodendron amurensis*)은 황벽나무의 껍질을 약재로 이르는 말로, 황경피라고도 한다. 낙엽활엽 교목으로 높이 10m 정도로 자라는데, 껍질에는 코르크가 발달했으며 속껍질은 황색이다. 잎은 마주나며, 깃꼴겹잎으로 작은 잎사귀는 5 ~ 13장이며, 달걀모양의 피침형(披針形) 또는 긴 원형이다. 잎 가장자리에는 작은 톱니 및 연한 털이 있으며, 중간 맥(脈)의 기부(基部)에는 긴 털이 약간 있다. 5~6월에 황색의 꽃이 피는데, 자웅이

주(雌雄異株)의 단성(單性)이다. 원추 모양의 수술은 긴 원형으로, 수꽃에는 5개의 수술이 있으며 암꽃에는 퇴화된 수술이 비늘 조각 모양을 하고 있다. 자방은 5실로 되어 있으며 암술대는 짧고 암술머리는 5갈래로 갈라진다. 열매는 장과상(漿果狀)의 육질이 많고 중심부에 단단한 핵을 갖고 있으며, 동그란 모양으로 익었을 때에는 자흑색을 띤다. 우리나라에서는 제주·전남 지역을 제외한 전지역에서 분포하고, 일본·만주·중국·아무르·우수리 등지에 분포하며, 잡목 숲 또는 산속의 계곡에서 자란다.

[0012] 황백나무 줄기에서 껍질을 벗겨내어 조피(粗皮: 거친 껍질)를 제거하거나 썰어서 햇볕에 말린 후, 이것 즉 황백은 약으로 쓰이며 혈당저하 작용을 한다. 또한 폐렴쌍구균, 인형결핵균, 포도상구균 등에 대하여 발육저지 작용을 함과 동시에 종양세포의 번식을 저지시키고, 살균작용을 한다. 복용하는 경우에는 미각 반사의 항진에 의하여 위액의 분비를 촉진시키고, 식욕의 항진도 가져오게 한다. 또한 일반 알칼로이드가 지니는 전신작용을 하지 않기 때문에 다량으로 투여해도 부작용이 없으므로 정장제 뿐만 아니라 건위제로 사용할 수 있다. 또한 이 약재에 대하여 여러 세균의 내성(耐性)도 생기지 않으므로 유행성 눈병이 유행할 때 세안 소독약으로도 사용할 수 있다. 그 외에도 혈압강하·중추신경계 억제·항염증 등의 효과도 보고되어 있으며, 동양의학에서는 황련해독탕·시호청간탕·형개연교탕 등에 사용되고 있으나, 현재까지 황백의 골형성 및 골재생 촉진에 의한 골다공증 치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 황기, 계지 및 황백으로 구성된 혼합생약재(BHH10) 추출물이 난소제거 흰쥐모델에서 소주골 면적을 증가시키고, 파골세포의 활성을 억제하며, 조골세포의 활성을 증가시켜 골다공증의 예방과 치료 및 치주질환 등의골질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0014] 본 발명은 탁월한 골파괴 억제, 골형성 및 골재생 촉진 효과를 지닌 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 함유한 골다공증의 예방과 치료, 및 치주질환 등의 골질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주질환 등의 골다공증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 치주질환 등의 골질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

효 과

[0019] 본 발명의 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물은 난소절제 골다공증 동물모델에서 골형성 회복 효과, 파골세포의 활성 억제, 조골세포의 증식 및 분화 촉진, 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 분비 증가, 골형성 단백질인 BMP-2 발현 촉진으로 골형성 증가 효과를 보임으로써 골다공증 또는 치주질환 등의 골질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물, 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명에서 사용되는 용어들을 정의한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "골다공증"은 뼈의 양이 감소하고 질적인 변화로 인해 뼈의 강도가 약해져서 골절이 일어날 가능성이 높은 상태를 의미한다. 상기 골다공증은 원발성(原發性) 골다공증인 일차성 골다공증과 속발성(續發性) 골다공증인 이차성 골다공증을 모두 포함하는 의미이다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "골질환"은 골밀도가 감소되어 일어나는 모든 질환을 의미한다. 상기 골질환은 골다공증, 골형성 부전증, 치주질환 또는 골절 등을 모두 포함하는 의미이다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "치주질환"이란 입안에 항상 존재하는 많은 세균에 의해 형성된 치태(치면세균막, 플라그)와 치석이 염증을 일으켜 치주조직을 파괴하는 모든 질환을 의미한다. 상기 치주질환은 흔히 풍치라고도 하는데, 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)을 모두 포함하는 의미이다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 골질환 또는 골다공증의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 골질환 또는 골다공증의 증세가 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 골질환 또는 골다공증 증상이 호전될 수 있는 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 골질환 또는 골다공증의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명은 황기(*Astragalus membranaceus* BGE.), 계지(*Cinnamomum cassia*) 및 황백(*Phellodendron amurensis*)의 혼합생약재 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 또는 골질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 골질환은 골형성 부전증 또는 치주질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기 혼합생약재 추출물은 하기와 같은 단계를 포함하는 방법으로 제조하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며 일반적인 추출방법은 모두 사용가능하다:

[0033] 1) 건조된 황기(*Astragalus membranaceus* BGE.), 계지(*Cinnamomum cassia*) 및 황백(*Phellodendron amurensis*)을 용매로 추출하는 단계;

[0034] 2) 상기 추출된 추출물을 여과하는 단계; 및

[0035] 3) 상기 여과된 여과액을 농축하는 단계.

[0036] 상기 황기, 계지 및 황백은 재배한 것 또는 시판하는 것을 모두 사용할 수 있다.

[0037] 이들을 혼합하여 사용하는 경우, 황기, 계지 및 황백을 각각 1 내지 5의 중량비(w/w)로 혼합하여 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 황기 : 계지 : 황백의 배합 중량비가 0.5 ~ 3 : 0.5 ~ 3 : 1인 것이 바람직하고, 상기 배합 중량비가 2 : 2 : 1인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0038] 상기 추출에 사용되는 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 C_1 내지 C_4 저급 알코올인 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하며, 30 ~ 70% 에탄올을 이용하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 용매는 약 1 : 0.1 내지 1 : 10, 바람직하게는 1 : 0.2 내지 1 : 5의 혼합비(v/v)를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매를 사용하는

것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0039] 상기 추출에 사용되는 용매의 양은 혼합생약재 시료 중량의 약 1 내지 20배를 사용하는 것이 바람직하고, 시료 중량의 약 2 내지 10배로 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출의 온도 및 시간은 실온에서 약 0.5 내지 48시간 동안 추출하는 것이 바람직하고, 실온에서 1 내지 30시간 동안 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출의 횟수는 1회 내지 5회 추출하는 것이 바람직하고 1회 내지 3회 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 추출방법에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출물은 액상, 분말 또는 농축액 등 모든 형태로 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 지표 성분으로서 황기 추출물은 포르모노넥틴(formononetin), 계지 추출물은 신남산(cinnamic acid) 및 황백 추출물은 베르베린(berberine)을 각각 지표 성분으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0041] 구체적으로, 본 발명의 혼합 생약재 추출물은 포르모노넥틴(formononetin)을 0.5 내지 6(w/w%), 신남산(cinnamic acid)을 0.2 내지 2(w/w%), 베르베린(berberine)을 0.5 내지 5(w/w%)로 포함하는 것이 바람직하며, 포르모노넥틴을 1.0 내지 3.0(w/w%), 신남산을 1.0 내지 3.0(w/w%), 베르베린을 2.0 내지 4.0(w/w%)로 포함하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 황기, 계지 및 황백을 세척한 후 건조된 상태의 각 한약재를 동량의 비율로 혼합한 후, 상기 시료의 8 내지 10배의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 대해서는 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3시간 재가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 농축하였다. 최종적으로 동량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태의 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물을 수득하였다(이하, '황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물'을 'BHH10 추출물'로 명명함).

[0043] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 생체내(*In vivo*)에서 안전한 물질임을 확인하기 위해, 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여에 의한 체중, 조직무게의 변화, 투여 약물의 장기 투여에 의한 간 및 신장에 대한 독성 검사, 및 혈구수 변화를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 BHH10 추출물 투여군은 체중 및 자궁의 무게를 정성군(Sham군)과 유사한 증가를 나타낸 반면에, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17(황기, 계지, 자초, 갈근, 황백, 지각의 혼합생약재) 추출물 및 E2(17β-estradiol) 투여군은 체중 및 자궁의 무게를 1/2 수준으로 증가시키는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5 참조). 또한, 간 및 신장에 대한 독성이 나타나지 않았으며, 투여약물에 따른 혈구수 변화의 차이가 거의 없었다(표 2 참조).

[0044] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 생체내(*In vivo*)에서 소주골(trabecula)의 면적에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 정량적 영상 분석기(Quantitative image analysis system)를 이용하여 경골의 소주골의 면적을 계산한 결과, 난소 적출한 음성대조군은 정상군(Sham군)에 비해 소주골의 면적이 45%로 감소되어 골다공증이 유발되었음을 알 수 있었고, 본 발명의 BHH10 추출물의 투여 후에는 소주골 면적이 대조군에 비해 191%까지 증가시키는 것을 알 수 있었다. 이는 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17 및 E2(17β-estradiol) 투여군에 비해 소주골 면적을 현저히 증가시킨 것을 알 수 있다(도 6 및 표 3 참조).

[0045] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 생체내에서 골밀도에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 골밀도 측정기를 이용하여 경골, 요추골, 대퇴골의 골밀도 변화를 측정한 결과, 난소 적출한 음성대조군은 Sham군(정상군)에 비해 경골, 요추골, 대퇴골의 골밀가 감소하였고, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물 및 BHH17 추출물에서는 유의한 변화가 없었으나, BHH10 추출물 및 E2 투여군에서 대조군에 비해 골밀도가 경골과 요추골에서 현저하게 증가함을 확인하였다(도 7 참조).

[0046] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 생체내에서 혈중 호르몬에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈중 호르몬을 정량한 결과, 난소 적출한 음성대조군은 GH(성장호르몬)가 감소하였고, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17 추출물 및 BHH10 추출물은 약물의 투여에 의해 유의한 영향을 받지 않았으나, E2 투여군은 성장호르몬의 유의한 증가를 보였다(도 8 참조).

[0047] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 생체내에서 골형성 관련 인자의 발현 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 혈중내 골형성관련 성장인자(VEGF) 및 골형성단백질(BMP-2)을 측정한 결과, 난소 적출한 음

성대조군은 VEGF 및 BMP-2 단백질이 감소하였으나, BHH10 추출물은 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17 추출물 및 E2 투여군에 비해 뛰어난 골형성 단백 인자들의 증가를 보였다(도 9 참조). 또한, 오스테오칼신(OCN)을 측정한 결과, BHH10 추출물은 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물 및 BHH17 추출물 보다 우수한 증가를보였으며, E2 투여군과 동등한 정도의 발현량을 보였다(도 10 참조).

[0048] 따라서, 본 발명의 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물은 이들 생약재 단독인 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, 황기, 계지, 자초, 갈근, 황백, 지각의 혼합생약재 추추출, 및 E2(17β-estradiol)에 비해 소주골 면적을 현저히 증가시키며, 상기 물질들에 비해 안전한 물질임을 확인함으로써 골다공증 또는 골질환 치료제로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0049] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 사람의 연골하골 하부조직의 파골세포에 대한 활성 억제 효과를 가지는지 알아보기 위해, 주석산염저항산성인산분해효소(tartrate- resistant acid phosphatase, TRAP) 염색 방법을 이용하여 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 반응된 파골세포의 수를 농도의존적으로 억제시키는 것을 확인하였다(도 11 참조).

[0050] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포의 증식에 대한 활성 촉진 효과를 가지는지 알아보기 위해, WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 연골하골 하부조직의 조골세포 생존을 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다(도 12 참조).

[0051] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 조골세포의 분화에 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포에서 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 뛰어난 ALP 활성 증가 효과를 나타냄으로써 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포 분화를 촉진함을 알 수 있었다(도 13 참조).

[0052] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 조골세포 성장을 증식시키는지 알아보기 위해서, 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포의 증식에 대한 영향을 WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물은 100 ㎍/㎖ 농도 이하의 범위에서 Saos-2 세포의 생존율에 영향을 미치지 않으므로 세포독성이 없는 안전한 약물임을 확인할 수 있었고, Saos-2 세포 생존을 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다(도 14 참조).

[0053] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 조골세포의 분화에 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포에서 알칼리 포스파타제의 활성을 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 뛰어난 ALP 활성 증가 효과를 나타냄으로써 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다(도 15 및 도 16 참조).

[0054] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 조골세포에서 ELISA 키트 및 RT-PCR을 이용하여 VEGF의 발현 정도를 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 혈관생성촉진인자인 VEGF 분비를 증가시킴을 확인할 수 있었다(도 17 및 도 19 참조).

[0055] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 골형성 단백질(bone morphogenic protein-2, BMP-2)의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해, 조골세포에서 ELISA 키트를 이용하여 BMP-2의 발현 정도를 측정한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 낮은 농도에서도 유의적으로 BMP-2 분비를 증가시킴으로서 골형성 증진을 촉진시키는 것을 알 수 있었다(도 18 및 도 20 참조).

[0056] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 골형성 관련 유전자인 오스테오칼신(osteocalcin; OCN), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN) 및 제 Ⅰ형 콜라겐(type Ⅰcollagen, Col Ⅰ)의 활성에 영향을 미치는지 알아기 위해, 조골세포-유사 세포주로부터 RNA을 추출하여 OCN, OPN 및 Col Ⅰ 유전자의 발현정도를 RT-PCR로 분석한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 골형성 관련 유전자들의 활성을 촉진시키는 것을 알 수 있었다(도 21 및 도 22 참조).

[0057] 본 발명의 한가지 실시 태양에서는 BHH10 추출물이 조골세포의 분화 및 골형성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 조골세포-유사 세포주에서 세포내 칼슘 침착을 염색방법을 통해 분석한 결과, 본 발명의 BHH10 추출물이 농도의존적으로 세포 내 칼슘 침착정도를 정량적으로 측정하여 확인할 수 있었다(도 23 및 도 24 참조).

[0058] 따라서, 본 발명의 BHH10 추출물은 골형성 회복 효과를 가지며, 파골세포의 활성을 억제시키고, 조골세포의 증식 및 분화를 촉진시키며, 성장인자 및 골형성 단백질 발현을 증가시키며, 독성 및 부작용이 거의 없으므로, 골

다공증 또는 골질환 예방 및 치료제의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있다.

[0059] 본 발명의 BHH10 추출물은 골다공증 또는 골질환의 예방 및 치료에 대하여 상기 BHH10 추출물을 0.1 ~ 50 중량% 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 BHH10 추출물을 포함하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0061] 본 발명의 BHH10 추출물을 포함하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 BHH10 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100 ㎎/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0063] 본 발명의 BHH10 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물을 포함하는 조성물을 골다공증에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환 치료 방법을 제공한다.

[0065] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골다공증 예방 방법을 제공한다.

[0066] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물을 포함하는 조성물을 골질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환 치료 방법을 제공한다.

[0067] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 골질환 예방 방법을 제공한다.

[0068] 상기 골질환은 골형성 부전증 또는 치주질환인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0069] 본 발명의 BHH10 추출물은 난소절제 골다공증 동물실험에서 우수한 골형성 회복 효과를 나타내며, 파골세포의 활성을 억제하고, 조골세포의 증식 및 분화를 촉진하며, 성장인자 및 골형성 단백질 발현을 증가시킴으로써, 골다공증 또는 치주 질환 등의 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명의 BHH10 추출물은 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, 및 황기, 계지, 자초, 갈근, 황백,

지각의 혼합생약재 추추출, 및 기존의 골다공증 치료제인 E2(17β-estradiol)에 비해 현저히 높은 골형성 효과를 나타냈으며, 상기 물질들에 비해 안전한 물질임을 확인함으로써 골다공증 또는 골질환 치료제의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[0071] 본 발명의 투여에 있어서, BHH10 추출물을 함유하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 투여에 있어서, 본 발명의 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 보다 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다.

[0073] 본 발명의 투여에 있어서, 본 발명의 조성물은 투여의 모든 방식이 가능하며, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 복강, 근육 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0074] 본 발명의 투여에 있어서, 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 1일 0.0001 내지 100 ㎎/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0075] 아울러, 본 발명은 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 또는 골질환 예방 및 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0076] 본 발명에서 정의되는 "건강기능성 식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0077] 상기 BHH10 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

[0078] 또한, 골다공증 또는 골질환의 예방 및 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0079] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 BHH10 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0080] 상기 외에 본 발명의 BHH10 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 BHH10 추출물은 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 BHH10 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

실 시 예

[0081] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 비교예, 실험예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0082] 단, 하기 실시예, 비교예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 비교예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0083] **<실시예 1> 혼합생약(BHH10) 추출물의 제조**

[0084] 경희의료원 한방병원에서 황기, 계지 및 황백을 구입하여, 물로 세척한 후 협잡물을 제거하고 잘 건조된 상태의 각 한약재를 황기, 계지, 황백의 중량비가 2 : 2 : 1의 비율로 혼합한 총 100 g에 1 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 대해서는 0.5 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3시간 재가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 0.2 ℓ로 농축하였다. 최종적으로 동량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태의 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물(수득량: 17.8%)을 수득하였다. 상기, '황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물'을 'BHH10 추출물'로 명명하였다.

[0085] **<비교예 1> 황기 추출물의 제조**

[0086] 경희의료원에서 구입한 황기 100 g을 음건 후 세절하여 1 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 85℃에서 열탕 추출하였다. 여과 후, 농축하여 건조시킨 후, 황기 추출물 27 g을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0087] 상기의 방법으로 추출 및 정제한 황기 추출물을 이용하여 크로마토그램 분석을 수행한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 포르모노넥틴(formononetin) 함량은 1.3%였다(도 1).

[0088] **<비교예 2> 계지 추출물의 제조**

[0089] 경희의료원에서 구입한 계지 100 g을 음건 후 세절하여 1 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 85℃에서 열탕 추출하였다. 여과 후, 농축하여 건조시킨 후, 계지 추출물 8.1 g을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0090] 상기의 방법으로 추출 및 정제한 계지 추출물을 이용하여 크로마토그램 분석을 수행한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 트랜스 신남산(trans-cinnamic acid) 함량은 1.3%였다(도 2).

[0091] **<비교예 3> 황백 추출물의 제조**

[0092] 경희의료원에서 구입한 황백 100 g을 음건 후 세절하여 1 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 85℃에서 열탕 추출하였다. 여과 후, 농축하여 건조시킨 후, 황백 추출물 17.9 g을 얻어 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0093] 상기의 방법으로 추출 및 정제한 계지 추출물을 이용하여 크로마토그램 분석을 수행한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 베르베린(berberine) 함량은 2.6%였다(도 3).

[0094] **<비교예 4> BHH17 추출물의 제조**

[0095] 경희의료원 한방병원에서 구입한 황기, 계지, 자초, 갈근, 황백, 지각을 각각 물로 세척한 후 협잡물을 제거하고 잘 건조된 상태로 만든 후, 각 한약재를 황기, 계지, 자초, 갈근, 황백, 지각을 2 : 2 : 2 : 2 : 1 : 2의 비율로 혼합하여 100 g에 1 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간 동안 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 대해서는 0.5 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3시간 동안 재가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 0.2 ℓ로 농축하였다. 최종적으로 동량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태의 BHH17 추출물(수득량: 25.9%)을 수득하였다.

[0096] **<실시예 2> 난소 적출 흰쥐(OVX) 동물 모델의 제조**

[0097] 경희의료원으로부터 수득한 체중 200 ~ 300 g의 암컷 흰쥐(Sprague Dawley rat)를 사용하여 샴(sham)군(정상군)을 제외하고 대조군과 시험군의 모든 흰쥐 암컷에서 양측 난소 적출술을 시행하였다. 양측 난소를 절제(OVX군)하거나 난소절제를 제외한 모든 조작을 행한 후(Sham 군) 1주일의 회복기를 거친 후 9주간의 투여를 실시하였다. OVX군에 시험시료를 용량별, 기간별로 경구 또는 복강 투여하고 시료에 대한 비교물질로 현재 많이 사용되는 골다공증 치료물질인 17베타-에스트라디올(17β-estradiol)을 투여하여 그 효과를 비교하였다. 수술 전, 투여 전 및 투여 일정 기간마다 채혈하여 총혈구수 검사하였으며, 혈장을 분리하여 이후의 실험에 사용하였다. 일정기간의 투여 후 장기 조직과 경골, 대퇴골 및 요추골을 분리하여 독성검사, 형태계측학적 검사, 및 BMD 측정을 수행하였다.

[0098] **<실시예 3> 사람의 연골하골 하부조직의 파골세포 배양**

[0099] 경희의료원으로부터 관절염 환자 수술시 정상 대퇴부로부터 얻은 연골하골 하부조직의 뼈를 제공받아 실험하였다. 연골하골 하부조직의 뼈(bone)를 잘게 조각내고, 제 Ⅱ형 콜라게네이즈(type Ⅱ collagenase)로 30분 처리하여 분리하였다. 세포를 10% FBS를 첨가한 α-MEM(alpha-minimal essential medium)에 M-CSF 25 ng/ml, sRANKL 25 ng/ml+M-CSF 25 ng/ml, sRANKL 25 ng/ml+M-CSF 25 ng/ml +VEGF 50 ng/ml를 넣은 각각의 배지 조성에서 파골세포로 분화시켰다.

[0100] **<실시예 4> 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포 배양**

[0101] 경희의료원으로부터 관절염 환자 수술시 정상 대퇴부로부터 얻은 연골하골 하부조직의 뼈를 제공받아 실험하였다. 연골하부 하부조직의 뼈(bone)를 잘게 조각내고, 제 Ⅱ형 콜라게네이즈(type Ⅱ collagenase)로 30분 처리한 후 외식 배양(explant culture)하였다. 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 배양한 후, 2번 계대 배양하여 사용하였다.

[0102] **<실시예 5> 조골세포 배양**

[0103] 사람유래 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포주인 Saos-2세포(ATCC 등록번호; HTB-85)는 ATCC(American Type Culture Collection, USA)로부터 수득하였으며, 15% 우태아혈청(FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen Corporation, CA, USA)이 첨가된 배지(McCoy's 5A, Gibco BRL, USA)를 이용하여 배양하였다.

[0104] **<실시예 6> 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

[0105] 트리졸 시약(TRIzol reagent, Invitrogen Corporation, CA, USA)을 이용하여 RNA를 준비하였다. 1 ㎍의 총 RNA, Oligo(dT)$_{12}$ 프라이머, dNTP (10 mM), 0.1M 디티오트레이톨(DTT, dithiotreitol), 역전사효소(Promega, USA) 및 RNase 저해제에 완충액을 첨가하여 역전사(reverse transcription) 반응을 42℃에서 60분간 수행하였다. 상기에서 합성된 각각의 cDNA와 하기 [표 1]에 기재된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응(PCR; Polymerase Chain Reaction)은 cDNA 0.5 ㎍, 2.5 unit의 Taq 중합효소(TaKaRa Taq™, Takara, Japan), 1.5 mM dNTP, 1×완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 각 프라이머쌍 20 pmol씩을 섞고 증류수로 총 부피를 10 ㎕로 맞춘 다음 기계(TaKaRa Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.8% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 특정 밴드(band)를 확인하였다. PCR 산물인 베타-액틴(β-Actin)을 지표 유전자로 사용하였고, Gel-Doc EQ(BIO-RAD Laboratories, Milan, Italy)를 이용하여 정량하였다.

표 1

[0106]

유전자		프라이머의 서열
β-액틴	정방향(서열번호 1)	5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACTTTGG-3'
	역방향(서열번호 2)	5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'
OCN	정방향(서열번호 3)	5'-GAGGACCCTCTCTCTGCTCACTCTGCTGGC-3'
	역방향(서열번호 4)	5'-GTGGTGCCATAGATGCGCTTGTAGGCGTCC-3'
OPN	정방향(서열번호 5)	5'-CTCGGATGAATCTGACGAATCTCACCATTC-3'
	역방향(서열번호 6)	5'-CTTACTCTTAGGGTCTAGGACTAGCTTGTC-3'
Col1	정방향(서열번호 7)	5'-TGGTCTTGGAGGAAACTTTGC-3'
	역방향(서열번호 8)	5'-AGTATCTCCTTTGGCACCATC-3'
VEGF	정방향(서열번호 9)	5'-TGCACCCACGACAGAAGGGGA-3'
	역방향(서열번호 10)	5'-TCACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3'
BMP-2	정방향(서열번호 11)	5'-CAGCCATGAATTTCACAGCC-3'
	역방향(서열번호 12)	5'-GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'

[0107] **<실험예 1> 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여에 의한 체중 및 조직무게의 변화 측정**

[0108] **<1-1> 체중 및 조직무게의 변화 측정**

[0109] 상기 <실시예 2>에 의해 난소가 적출된 실험동물에 상기 BHH10 추출물, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물 및 BHH17 추출물을 각각 투여한 후, 상기 투여된 실험동물의 체중을 매주 측정하고, 일정기간 투여 후 조직무게를 측정하여 Sham군과 대조군의 체중과 조직무게를 본페로니 다중 비교법(boneferroni multiple comparison method)으로 비교하였다.

[0110] 실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 대조군의 경우 Sham군과 비교하여 급격한 체중의 증가를 나타내었으며, BHH10 추출물의 5 g/kg/day의 투여군은 대조군과 유사한 체중 증가를 나타내었다. 대조 약물군(E2)의 경우 Sham군과 대조군의 중간 정도의 체중 증가 현상을 나타냈다(도 4).

[0111] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 자궁의 무게는 Sham군(정상군)에 비해 음성대조군에서 급격히 감소하였고, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17 추출물 및 E2의 투여군은 정상군의 1/2 수준 이상으로 회복되었다. BHH10 추출물 5g/kg/day 투여군은 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다(도 5).

[0112] 따라서, BHH10 추출물은 대조군 및 대조 약물군과 비교하여 체중 및 자궁의 무게에 변화를 주지 않아 체내 호르몬의 변화가 없이 안전한 것으로 판단된다.

[0113] **<1-2> 총 혈구수 및 장기 독성 측정**

[0114] 상기 <실시예 2>에 의해 난소가 적출된 실험동물에 상기 BHH10 추출물, 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물 및 양성대조군(Estradiol; E2)을 각각 투여한 후, 투여 약물의 장기 투여에 의한 간 및 신장에 대한 독성 검사를 실시한 결과, 본 연구에서 실시한 투여량으로는 간 및 신장에 대한 독성이 나타나지 않았다. 또한 혈구수(complete blood cells counts ; CBC) 측정 결과, 수술 전(10주령), 실험 후(20주령)를 비교하였을 때 모든 군에서 시작할 때보다 종료 시에 WBC, LY, MO, GR가 모두 감소하였으나 각 주령에서 투여약물에 따른 차이는 없었다(표 2).

표 2

[0115]

	Age (week)	Control	Sham	비교예 1	BHH10	E2(양성대조군)
WBC	10	18.8±1.3	16.6±2.5	15.3±1.6	16.6±1.3	20.6±1.9
	20	7.9±0.8	6.0±0.5	6.5±0.7	7.7±0.8	9.1±1.1
LY	10	14.3±1.0	12.2±2.0	12.1±1.1	11.8±1.1	16.9±1.6
	20	6.5±0.6	4.9±0.4	5.3±0.5	6.4±0.7	7.1±0.9

MO	10	2.6±0.3	1.9±0.3	1.8±0.4	2.3±0.3	2.2±0.2
	20	0.9±0.1	0.7±0.1	0.9±0.2	1.0±0.2	1.0±0.1
GR	10	2.7±0.3	2.5±0.4	1.4±0.3	2.6±0.3	3.2±0.6
	20	0.6±0.2	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.9±0.3
RBC	10	7.47±0.10	7.93±0.19	7.60±0.17	7.58±0.16	7.68±0.12
	20	8.29±0.08	7.94±0.19	7.58±0.20	8.09±0.08	8.39±0.12
Hb	10	13.8±0.3	14.3±0.2	14.1±0.1	14.0±0.2	14.1±0.2
	20	15.1±0.1	14.2±0.3	14.0±0.2	14.9±0.2	15.4±0.2
HCT	10	42.1±0.5	44.2±0.8	43.3±0.8	43.2±0.8	43.6±0.5
	20	46.3±0.4	43.5±0.8	42.7±1.0	45.3±0.3	46.7±0.6

[0116] **<실험예 2> 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여에 의한 소주골 면적 측정**

[0117] 상기 <실시예 2>에 의해 난소가 적출된 실험동물에 상기 BHH10 추출물, 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물 및 양성대조군(Estradiol; E2)을 각각 투여한 후 9주 후 해부하여 요추골 및 경골 조직들을 분리하였다

[0118] 요추골 및 경골 조직들을 10% 포르말린 용액에 고정한 후, 포름산(Formic acid) 내에서 탈회 후, 조직의 관찰부위를 절단한 다음, 70% ~ 100% 알코올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수과정을 거쳐 자일레드로 청명하고 파라핀 포패를 시행하였다. 파라핀 포매된 조직을 마이크로톰으로 5마이크론으로 절단하여 헤마톡실린 및 에오신(Hematoxyline & eosin, H&E)염색을 실시한 후 광학 현미경으로 관찰한 후, 형태 계측학적 분석을 실시하였다.

[0119] 정량적 영상 분석기(Quantitative image analysis system, Wild Leits Co.)의 디지타이저(digitizer)로 각 소주의 윤곽선을 따라 그려서 면적을 계산하고 이것으로 소주골의 면적을 자동적으로 계산하고 이것으로 각 경골의 근위부에서 성장판의 직하부의 부분 중 가로변의 길이가 성장판 길이의 약 2/3 정도 되는 길이로 기준 면적 $2 \times 106\ \mu m^2$인 직사각형의 내부에 있는 소주골(trabecula)의 면적을 측정하였다.

[0120] 실험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 난소 적출한 음성대조군은 Sham군(정상군)에 비해 소주골의 면적이 45%로 감소되어 골다공증이 유발되었음을 알 수 있었고, 황기 추출물, 계지 추출물, 황백 추출물, BHH17 추출물 및 E2 투여군에 비해 본 발명의 BHH10 추출물의 투여 후에는 소주골 면적이 더 증가되었다($P<0.05$)(도 6).

[0121] 또한, 하기 [표 3]에서 나타난 바와 같이 BHH10 추출물 처리군의 소주골 면적은 대조군의 191%까지 경골의 소주골 면적이 증가되어 E2 투여군에 비해 현저히 우수한 효과가 있었다(표 3).

표 3

[0122]

	경골 소주골 면적	요추골 소주골 면적
대조군	100.0 ± 13.2	100.0 ± 5.4
Sham군	243.5 ± 10.7#	116.4 ± 5.9
황기 추출물	169.1 ± 16.2	110.1 ± 2.3
계지 추출물	164.2 ± 14.7	109.7 ± 4.6
갈근 추출물	157.7 ± 18.9	106.4 ± 5.9
BHH17 추출물	164.2 ± 14.7*	111.2 ± 8.9
BHH10 추출물	218.6 ± 10.0*	104.5 ± 2.1
E2 (양성대조군)	160.9 ± 13.2*	108.1 ± 1.1

[0123] #: 음성대조군과 비교시 $p<0.05$; 및, *: Sham군과 비교시 $p<0.05$.

[0124] **<실험예 3> 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여에 의한 및 골밀도 측정**

[0125] 상기 <실시예 2>의 동물실험에서 경골, 요추골, 대퇴골을 분리하여 골밀도 측정기(LUNAR PIXImus)를 이용하여 골밀도의 변화를 측정 후, 이들을 토대로 투여 약물별 골밀도의 변화를 계산하였다.

[0126] 실험 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 난소 적출한 음성대조군은 Sham군(정상군)에 비해 경골, 요추골, 대퇴골의 골밀도(Bone mineral density; BMD)가 감소하였고, 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물에서는 유의한 변화가없었으나, BHH10 추출물 및 E2 투여군에서 대조군에 비해 골밀도가 경골과 요추골에서 유의하게 증가함을 확인하였다(도 7).

[0127] **<실험예 4> 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여에 의한 골형성 관련 인자들의 변화 측정**

[0128] 상기 <실시예 2>에 의해 난소가 적출된 실험동물에 상기 BHH10 추출물, 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물 및 양성대조군(Estradiol; E2) 을 각각 투여한 후, 혈중 호르몬의 정량을 실시한 결과, 대조군의 경우 GH(성장호르몬)는 난소제거에 의해 감소하였으나, 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물 및 BHH10 추출물은 약물의 투여에 의해 유의한 영향을 받지 않았으나, E2 투여군은 성장호르몬의 유의한 증가를 보였다(도 8).

[0129] 또한, 혈중내 골형성관련 성장인자(VEGF) 및 골형성단백질(BMP-2)을 측정한 결과, 대조군의 경우 VEGF 및 BMP-2 단백질이 난소제거에 의해 감소하였고, BHH10 추출물은 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 및 E2 투여군에비해 뛰어난 골형성 단백 인자들의 증가를 보였다(도 9).

[0130] 이외에도 오스테오칼신(OCN)을 측정한 결과, BHH10 추출물은 비교예 1, 비교예 2, 비교예 3, 비교예 4 추출물 보다 우수한 증가를 보였으며, E2 투여군과 동등한 정도의 발현량을 보였다(도 10).

[0131] 결론적으로 본 발명의 BHH10 출물은 골다공증 동물모델에서 체중증가및 장기에 독성을 미치지 않았으며, 성장호르몬의 영향을 받지 않았고, 골형성 관련 성장인자 및 골형성 단백질인자 발현 증가로 소주골면적 증가와 골밀도를 증가시키는 효과를 보인 것으로 사료된다.

[0132] **<실험예 5> 혼합생약재(BHH10) 추출물의 파골세포의 활성 억제 효과 측정**

[0133] 본 발명의 BHH10 추출물이 사람의 연골하골 하부조직의 파골세포에 대한 활성 억제효과는 주석산염저항산성인산분해효소(tartrate- resistant acid phosphatase, TRAP) 염색 방법을 이용하여 측정하였다(Leukocyte Acid Phosphatase kit, Sigma, MO, USA).

[0134] 구체적으로, 상기 <실시예 3>의 파골세포를 48-웰 플레이트(well plate)에 1×10^5 세포수/웰이 되도록 각각의 웰(well)에 넣고 배양한 후, BHH10 추출물을 농도별(Control, 0.1, 1, 10 ㎍/㎖)로 100 ㎕씩 첨가한 다음, 7일간 배양하였다. 배양한 배지를 모두 제거하고 고정 용액(fixative solution)을 넣어 30초 동안 세포를 고정시킨 후, 파골세포의 특성인 산성 인산분해효소(acid phosphatase) 활성을 이용한 TRAP 염색 키트(staining kit)를 이용하여 파골세포를 염색하였다.

[0135] 실험 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 BHH10 추출물이 TRAP 염색에서 양성으로 반응된 파골세포의 수를 농도의 존적으로 억제시킴을 확인하였다(도 11).

[0136] **<실험예 6> BHH10 추출물의 연골하골 하부조직의 조골세포 성장 측정**

[0137] 본 발명의 BHH10 추출물이 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포의 증식에 대한 영향은 WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정하였다(cell counting kit-8, Dojindo molecular technologies, Tokyo, 일본).

[0138] 구체적으로, 상기 <실시예 4>의 조골세포를 1×10^4 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주한 후, BHH10 추출물을 농도별(0.01, 0,1, 1, 10, 100 ㎍/㎖)로 100 ㎕씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. 10 ㎕의 WST-8(water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 가하고 2시간 더 배양하여 WST-8 포르마잔이 형성되어 발색되면 ELISA 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 시료처리군 흡광도의 %로 측정하여 나타내었다.

[0139] 실험 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 BHH10 추출물이 0 내지 100 ㎍/㎖ 농도의 범위에서 3일 동안 연골하골 하부조직의 조골세포 생존을 유의하게 증가시킴을 확인하였다(도 12).

[0140] **<실험예 7> BHH10 추출물의 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포에서 알칼리 포스파타제(ALP)의 활성 측정**

[0141] 혈청효소인 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 조골세포의 분화 중기에 생성된다(Zhao Y et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), pp1371-1376, 2005).

[0142] 이에, BHH10 추출물이 조골세포의 분화에 변화를 미치는지 확인하기 위해서 ALP 활성을 측정하였다. ALP 활성은 세포 내 ALP가 파라-니트로페닐포스페이트 (p-nitrophenylphosphate, pNPP)를 파라-니트로페놀(p-nitrophenol)과 인산염 (phosphate)으로 분해하여 발색하는 정도를 키트(ALP kit, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0143] 상기 <실험예 4>와 같이 처리하여 준비한 조골세포를 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100, Sigma, USA)으로 용해시키고, 초음파 기계(Branson, USA)로 처리 후 14,000 g, 4℃에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 반응 완충액(reaction buffer)과 함께 37℃에서 3분간 배양한 후, 0.1 N NaOH를 이용하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준선은 파라-니트로페놀(p-nitrophenol; Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 사용하여 정량하였고, 이를 근거로 시료의 ALP 량을 환산하였다.

[0144] 실험 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 본 발명의 BHH10 추출물은 조골세포에 처리 3일 경과 후, 0.01, 0.1, 1 및 10 ㎍/㎖에서 뛰어난 ALP 활성을 나타냄을 확인한 바, BHH10 추출물이 사람의 연골하골 하부조직의 조골세포 분화를 촉진함을 알 수 있었다(도 13).

[0145] **<실험예 8> BHH10 추출물의 조골세포 성장 증식 효과 측정**

[0146] BHH10 추출물의 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2세포의 증식에 대한 영향은 WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정하였다(cell counting kit-8, Dojindo molecular technologies, Tokyo, 일본).

[0147] 구체적으로, <실시예 5>의 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 1 × 10^4 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주한 후, BHH10 추출물을 농도별(0.01, 0,1, 1, 10, 100 ㎍/㎖)로 100 ㎕씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. 10 ㎕의 WST-8(water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 가한 후, 2시간 더 배양하여 WST-8 포르마잔이 형성되어 발색되면 ELISA 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 시료 처리군 흡광도의 %로 측정하였다.

[0148] 실험 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 BHH10 추출물은 0 내지 100 ㎍/㎖ 농도의 범위에서 3일 동안 Saos-2 세포의 생존율에 영향을 미치지 않아, 세포독성이 없는 안전한 약물임을 확인할 수 있었고, 또한 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 ㎍/㎖의 농도에서는 Saos-2 세포 생존을 유의하게 증가시킴을 확인하였다(도 14).

[0149] **<실험예 9> BHH10 추출물의 조골세포에서 알칼리 포스파타제(ALP)의 활성 측정**

[0150] 혈청효소인 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 조골세포의 분화 중기에 생성된다(Zhao Y et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), pp1371-1376, 2005).

[0151] 조골세포의 분화에 BHH10 추출물이 변화를 미치는지 확인하기 위해서 ALP 활성을 측정하였다. 상기 <실험예 6>와 같이 처리하여 준비한 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100, Sigma, USA)으로 용해시키고, 초음파 기계(Branson, USA)로 처리 후, 14,000 g, 4 ℃에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 반응 완충액(reaction buffer)과 함께 37℃에서 3분간 배양한 후 0.1 N NaOH를 이용하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준선은 파라-니트로페놀(p-nitrophenol; Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 사용하여 정량하였고, 이를 근거로 시료의 ALP 량을 환산하였다.

[0152] 실험 결과, 하기 도 15에 나타난 바와 같이, 본 발명의 BHH10 추출물은 조골세포에 처리 3일 경과 후, 0.01 및 0.1 ㎍/㎖에서 뛰어난 ALP 활성을 나타냄을 확인한 바, BHH10 추출물이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었

다(도 15).

[0153] **<실험예 10> BHH10 추출물의 조골세포에서 알칼리 포스파타제(ALP) 염색으로 활성 측정**

[0154] 혈청효소인 알칼리 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP)는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 조골세포의 분화 중기에 생성된다(Zhao Y et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), pp1371-1376, 2005).

[0155] 조골세포의 분화에 BHH10 추출물이 변화를 미치는지 확인하기 위해서 ALP 활성을 염색하여 측정하였다. 상기 <실시예 5>의 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 1 × 10^5 세포수/웰의 농도로 12-웰 플레이트에 분주한 후, BHH10 추출물을 농도별(0, 0.1, 1, 10 ㎍/㎖)로 500 ㎕씩 첨가한 후 배양하였다. 14일간 배양하여 준비한 연골하골 세포를 70% 메탄올로 고정시키고, 염색시약(BCIP/NBT Liquid substrate system; Sigma-Aldrich Co., MO, USA) 처리 후 차광하여 실온에서 30분간 반응하여 발색정도를 확인하였다.

[0156] 실험 결과, 하기 도 16에 나타난 바와 같이 본 발명의 BHH10 추출물은 조골세포에 처리 14일 경과 후, 0.1 및 10 ㎍/㎖에서 뛰어난 ALP 활성을 나타냄을 확인한 바(a:음성대조군, b: BHH10 추출물 0.1 ㎍/㎖ 처리군, c: BHH10 추출물 10 ㎍/㎖ 처리군, d: VEGF 50 ng/㎖ 처리군), BHH10 추출물이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다(도 16).

[0157] **<실험예 11> BHH10 추출물에 의한 혈관 내피세포 성장인자(VEGF)의 발현 증가 측정**

[0158] 혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포의 분화 초기에 합성되는 성장촉진인자로, BHH10 추출물이 VEGF의 분비에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다.

[0159] 구체적으로, 48-웰 플레이트에 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 5 × 10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후 각 웰에 BHH10 추출물을 농도별(0 내지 100 ㎍/㎖)로 처리하고 72 시간 배양하였다. VEGF 발현량을 정량하기 위하여 상기 세포배양액을 수집하여 -70℃에 보관하였다. VEGF 정량은 ELISA 키트(VEGF ELISA kit, R&D systems INC., MN, USA)를 이용하여 수행하였다. 항체가 표지된 키트의 플레이트에 상기 배양액을 100 ㎕씩 분주하여 반응시키고 인산염완충액(PBS)으로 세척하여 퍼록시다제가 부착된 염소 항-마우스 면역글로불린G(peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, R&D systems INC., MN, USA)와 반응시키고 다시 세척하였다. 기질(TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 이용하여 발색시키고 반응을 종료시킨 후 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0160] 실험 결과, 도 17에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 BHH10 추출물은 혈관생성촉진인자인 VEGF 분비를 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 특히 낮은 농도에서도 유의적으로 VEGF 분비를 증가시킴으로서 BHH10 추출물이 혈관 생성을 촉진함을 확인할 수 있었다(도 17).

[0161] **<실험예 12> BHH10 추출물에 의한 골형성 단백질(BMP)의 발현 증가 측정**

[0162] 골형성 단백질(bone morphogenic protein-2, BMP-2)은 조골세포의 분화 후기에 합성되는 단백질로, BHH10 추출물이 BMP-2의 발현에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다.

[0163] 구체적으로, 48-웰 플레이트에 조골세포를 5 × 10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후 각 웰에 BHH10 추출물을 농도별(0 내지 100 ㎍/㎖)로 처리하고 72시간 배양하였다. BMP-2 발현량을 정량하기 위하여, 상기 세포배양액을 수집하여 -70℃에 보관하였다. BMP-2 정량은 ELISA 키트(BMP-2 ELISA kit, R&D systems INC., MN, USA)를 이용하여 수행하였다. 항체가 표지된 키트의 플레이트에 상기 배양액을 100 ㎕씩 분주하여 반응시키고 인산염완충액(PBS)으로 세척하여 퍼록시다제가 부착된 염소 항-마우스 면역글로불린G(peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, R&D systems INC., MN, USA)와 반응시키고 다시 세척하였다. 기질(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)을 이용하여 발색시키고 반응을 종료시킨 후 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0164] 실험 결과, 도 18에서 나타난 바와 같이 본 발명의 BHH10 추출물은 골형성 단백질 BMP-2 분비를 증가시킴을 확

인할 수 있었으며, 특히 낮은 농도에서도 유의적으로 BMP-2 분비를 증가시킴으로서 BHH10 추출물이 형성 증진을 촉진함을 확인할 수 있었다(도 18).

[0165] **<실험예 13> BHH10 추출물의 혈관 내피세포 성장인자(VEGF) 및 골형성 단백질(BMP-2) 유전자 발현 측정**

[0166] 상기 <실시예 6>의 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 법을 이용하여 BHH10 추출물을 처리한 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포주인 Saos-2 세포에서 VEGF 및 BMP-2 유전자의 발현정도를 알아보았다.

[0167] 실험 결과, 도 19A에서 나타난 바와 같이 1 ㎍/㎖의 BHH10 추출물 처리시 3일, 7일, 14일 모두 증가하였고, 도 19B에서 보이는 바와 같이 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 ㎍/㎖의 BHH10 추출물과 양성대조군 50 ng/ml의 VEGF 처리 후 14일간 배양 시 농도 의존적으로 VEGF 유전자의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 즉, BHH10 추출물이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다(도 19A 및 도 19B).

[0168] 또한, 도 20에 나타난 바와 같이, BMP-2 유전자 발현은 0.1, 1 ㎍/㎖의 BHH10 추출물 처리 후 배양 3일 후부터 증가하는 양상을 보였다(도 20).

[0169] 따라서, BHH10 추출물이 성장인자 및 골형성 단백질의 발현을 촉진함을 확인할 수 있었다.

[0170] **<실험예 14> BHH10 추출물의 골형성 관련 유전자 발현 촉진 활성 측정**

[0171] 오스테오칼신(osteocalcin; OCN), 오스테오폰틴(osteopontin, OPN) 및 제 Ⅰ형 콜라겐(type Ⅰcollagen, Col I)은 조골세포에서 분비되는 골기질로서, 상기 OCN, OPN 및 Col I의 활성 정도는 조골세포 증식의 판정요소가 되어 그 농도가 증가하면 골세포의 성장 및 분화가 활발함을 알려준다(Collier FM et al,, *Endocrinology*, 139(3), pp1258-1267, 1998).

[0172] 이에, 본 발명의 BHH10 추출물의 투여가 OCN, OPN 및 Col I의 활성에 영향을 미치는지 알아보았다. 구체적으로, 48-웰 플레이트에 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 5 × 10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후, 각 웰에 1 ㎍/㎖의 황백 추출물을 처리하고 14일간 배양하였다. 3일 간격으로 배양액을 교환하였으며, 3일째에 배양액을 수집하여 I형 콜라겐의 분비 활성을 측정하고, 3일, 7일 및 14일째 세포로부터 RNA을 추출하여 OCN, OPN 및 Col I 유전자의 발현정도를 RT-PCR하여 분석하였다.

[0173] 실험 결과, 도 21에 나타난 바와 같이 1 ㎍/㎖의 BHH10 추출물 처리 후 배양 14일째 모두 OCN, OPN 및 Col I의 유전자 발현이 증가하였다.

[0174] 또한, 도 22에 나타난 바와 같이 BHH10 추출물 농도 의존적으로 골형성 분화 유전자의 활성을 촉진함을 확인할 수 있었다(도 21 및 도 22).

[0175] **<실험예 15> BHH10 추출물의 칼슘 침착 촉진 활성 측정**

[0176] 칼슘의 침착 정도는 골석화(osteocalcification) 및 무기질 침착(mineralization)을 확인하는 척도로 그 정도가 증가하면 조골세포의 분화 및 골형성이 활발함을 알려준다.

[0177] 이에, 본 발명의 BHH10 추출물의 투여가 칼슘의 침착을 활성화하는지 여부를 알아보았다. 그체적으로, 24-웰 플레이트에 조골세포-유사(osteoblast-like) 세포주인 Saos-2 세포를 1 × 10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 1 % 우태아혈청(FBS, GIBCO BRL, USA)와 1 % 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, GIBCO BRL, USA), 50 ㎍/㎖ 아스코르빈산(ascorbic acid, Sigma, USA) 10 mM β-글리세롤포스페이트(β-glycerolphosphate, Sigma, USA)가 첨가된 배지 조건으로 배양한 후, 각 웰에 본 발명의 BHH10 추출물을 0.1, 10 ㎍/㎖로 첨가하여 약 14일간 배양하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 배양 후 메탄올로 세포를 고정시키고, 0.4 % 알리자린 레드 S(Alinzarin Red S, Sigma, USA) 시약으로 염색하여 칼슘의 침착정도를 확인하였으며, 현미경(Axiovert 200, ZEISS, Germany)으로 관찰 후, 사진촬영(200 ×)하였다.

[0178] 실험 결과, 도 23에 나타난 바와 같이 세포내 칼슘 침착은 BHH10 추출물 처리 14일 후부터 현저히 관찰할 수 있었으며(도 23; a: 음성대조군, b: BHH10 추출물 0.1 ug/mL 처리군, c: BHH10 추출물 10 ug/mL 처리군, d:

VEGF 50 ng/mL처리군), 도 24에 나타난 바와 같이 BHH10 추출물 농도 의존적으로 세포 내 칼슘 침착정도를 정량적으로 측정하여 확인할 수 있었다(도 24).

[0179] 하기에 본 발명의 BHH10 추출물을 함유하는 제조예를 설명하나, 본 발명은 이에 한정되지 않는다.

[0180] **<제조예 1> 산제의 제조**

[0181] BHH10 추출물 20 mg

[0182] 유당 100 mg

[0183] 탈크 10 mg

[0184] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0185] **<제조예 2> 정제의 제조**

[0186] BHH10 추출물 10 mg

[0187] 옥수수전분 100 mg

[0188] 유당 100 mg

[0189] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0190] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0191] **<제조예 3> 캅셀제의 제조**

[0192] BHH10 추출물 10 mg

[0193] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0194] 락토오스 14.8 mg

[0195] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0196] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0197] **<제조예 4> 환의 제조**

[0198] BHH10 추출물 1 g

[0199] 유당 1.5 g

[0200] 글리세린 1 g

[0201] 자일리톨 0.5 g

[0202] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0203] **<제조예 5> 과립의 제조**

[0204] BHH10 추출물 150 mg

[0205] 대두 추출물 50 mg

[0206] 포도당 200 mg

[0207] 전분 600 mg

[0208] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0209] **<제조예 6> 주사제의 제조**

[0210] BHH10 추출물 10 mg

[0211] 만니톨 180 mg

[0212] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0213] $Na_2HPO_4,12H_2O$ 26 mg

[0214] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0215] **<제조예 7> 액제의 제조**

[0216] BHH10 추출물 20 mg

[0217] 이성화당 10 g

[0218] 만니톨 5 g

[0219] 정제수 적량

[0220] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0221] **<제조예 8> 건강 식품의 제조**

[0222] BHH10 추출물 1000 mg

[0223] 비타민 혼합물 적량

[0224] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0225] 비타민 E 1.0 mg

[0226] 비타민 B1 0.13 mg

[0227] 비타민 B2 0.15 mg

[0228] 비타민 B6 0.5 mg

[0229] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0230] 비타민 C 10 mg

[0231] 비오틴 10 ㎍

[0232] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0233] 엽산 50 ㎍

[0234] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0235] 무기질 혼합물 적량

[0236] 황산제1철 1.75 mg

[0237] 산화아연 0.82 mg

[0238] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0239] 제1인산칼륨 15 mg

[0240] 제2인산칼슘 55 mg

[0241] 구연산칼륨 90 mg

[0242] 탄산칼슘 100 mg

[0243] 염화마그네슘 24.8 mg

[0244] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0245] **<제조예 9> 건강 음료의 제조**

[0246] BHH10 추출물 1000 mg

[0247] 구연산 1000 mg

[0248] 올리고당 100 g

[0249] 매실농축액 2 g

[0250] 타우린 1 g

[0251] 정제수를 가하여 전체 900 ㎖

[0252] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0253] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

산업이용 가능성

[0254] 상기에 나타난 바와 같이 본 발명의 황기, 계지 및 황백의 혼합생약재 추출물은 우수한 골파괴 억제, 골형성 및 골재생 촉진 효과를 가지고 있으며, 세포독성이 거의 없으므로, 상기 혼합생약재 추출물은 골다공증 또는 골질환의 예방 및 치료제 개발, 및 건강기능식품 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0255] 도 1은 BHH10(황기, 계지 및 황백의 혼합생약재) 추출물의 지표성분인 포르모노넥틴(formononetin)의 함량을 컬럼 크로마토그래피로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0256] 도 2는 BHH10 추출물의 지표성분인 트랜스-신남산(trans-cinamic acid)의 함량을 컬럼 크로마토그래피로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0257] 도 3은 BHH10 추출물의 지표성분인 베르베린(berberine)의 함량을 컬럼 크로마토그래피로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0258] 도 4는 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 동물 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

[0259] 도 5는 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 자궁의 무게 변화를 나타낸 그래프이다.

[0260] 도 6는 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 소주골 면적의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0261] 도 7은 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 골밀도 변화를 나타낸 그래프이다.

[0262] 도 8은 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 성장호르몬의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0263] 도 9는 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 골형성 관련인자 VEGF 및 BMP-2의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0264] 도 10은 난소 적출 동물 모델에서 BHH10 추출물 투여시 골형성 관련인자 OCN의 변화를 나타낸 그래프이다.

[0265] 도 11은 BHH10 추출물 처리시 사람의 연골하골 조직에서 유래한 파골세포의 활성을 억제한 그림이다.

[0266] 도 12는 BHH10 추출물 처리시 사람의 대퇴부 연골하골 유래 조골세포의 생존 정도를 나타낸 그래프이다.

[0267] 도 13은 BHH10 추출물 처리시 사람의 대퇴부 연골하골 유래 조골세포에서 알칼리 포스파타아제(ALP) 활성 정도를 나타낸 그래프이다.

[0268] 도 14는 BHH10 추출물 처리시 조골세포(SaOS-2) 조골세포의 생존 정도를 나타낸 그래프이다.

[0269] 도 15는 BHH10 추출물 처리시 조골세포(SaOS-2) 조골세포에서 알칼리 포스파타아제(ALP) 활성 정도를 나타낸 그래프이다.

[0270] 도 16은 BHH10 추출물 처리시 조골세포(Saos-2)에서 알칼리 포스파타아제(ALP) 분비 활성 증가 정도를 나타낸 그림이다.

[0271] 도 17은 BHH10 추출물 처리시 조골세포(Saos-2)에서 혈관생성성장인자(VEGF)의 분비 활성을 나타낸 그래프이다.

[0272] 도 18은 BHH10 추출물 처리시 조골세포(Saos-2)에서 골형성 단백질(BMP-2)의 분비 증가를 나타낸 그래프이다.

[0273] 도 19는 BHH10 추출물 처리시 조골세포(Saos-2)에서 VEGF 유전자의 발현 정도를 나타낸 그림이다.

[0274] 도 20은 BHH10 추출물 처리시 처리시간에 따른 조골세포(Saos-2)에서 BMP-2 유전자 발현 정도를 나타낸 그림이다.

[0275] 도 21은 BHH10 추출물 처리시 처리농도에 따른 조골세포(Saos-2)에서 BMP-2 유전자 발현 정도를 나타낸 그림이다.

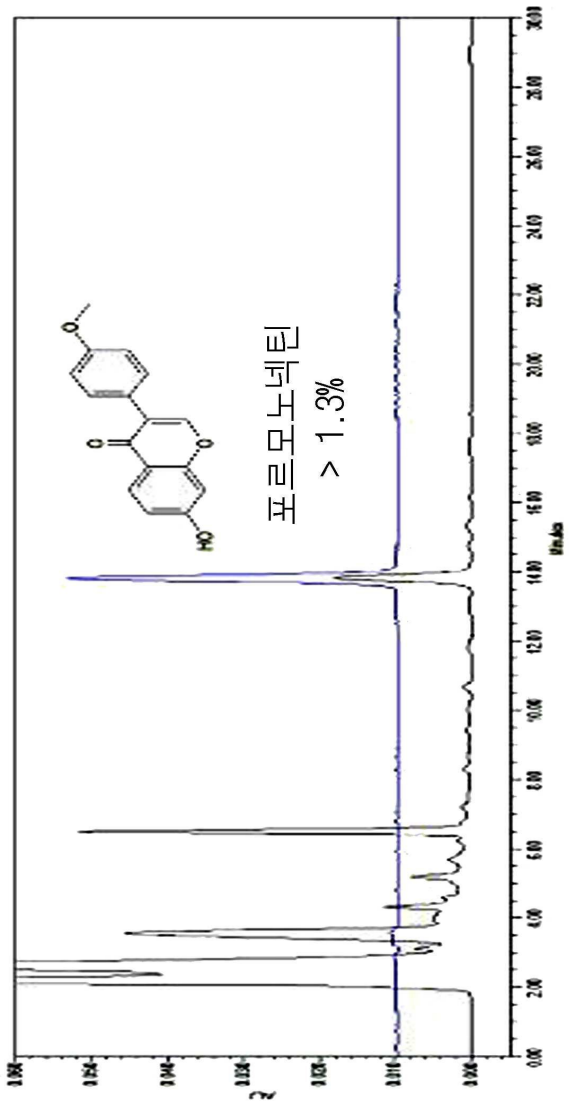
[0276] 도 22는 BHH10 추출물 처리시 처리시간에 따른 조골세포(Saos-2)에서 OCN, OPN 및 Col I의 유전자 발현정도를 나타낸 그림이다.

[0277] 도 23은 BHH10 추출물 처리시 처리농도에 따른 조골세포(Saos-2)에서 OCN, OPN 및 Col I의 유전자 발현정도를 나타낸 그림이다.

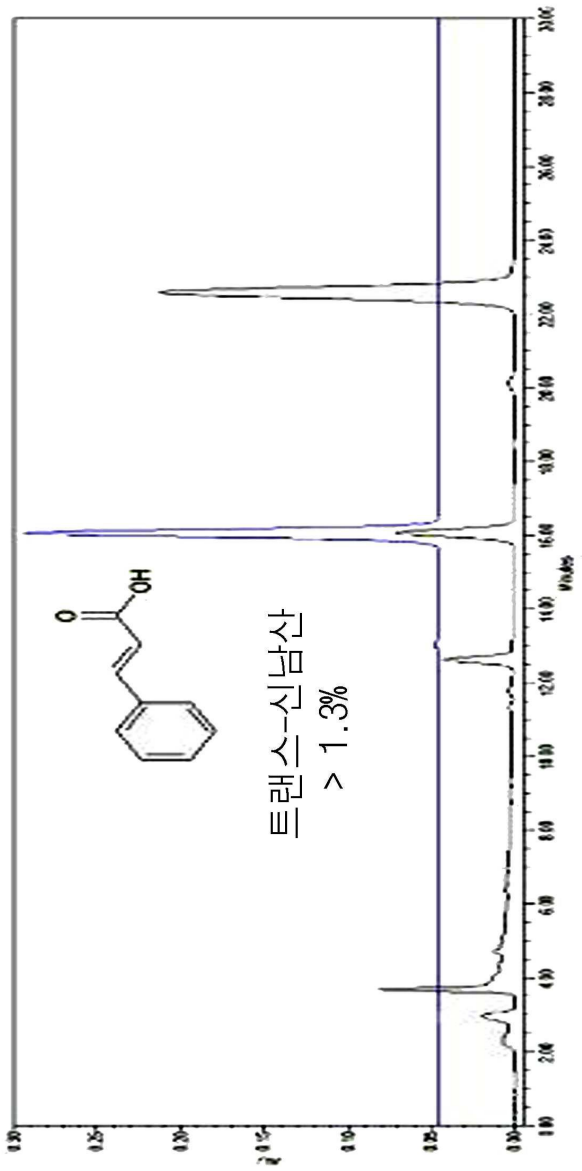
[0278] 도 24는 BHH10 추출물 처리시 조골세포(Saos-2)에서 칼슘의 침착 정도를 나타낸 그림이다.

도면

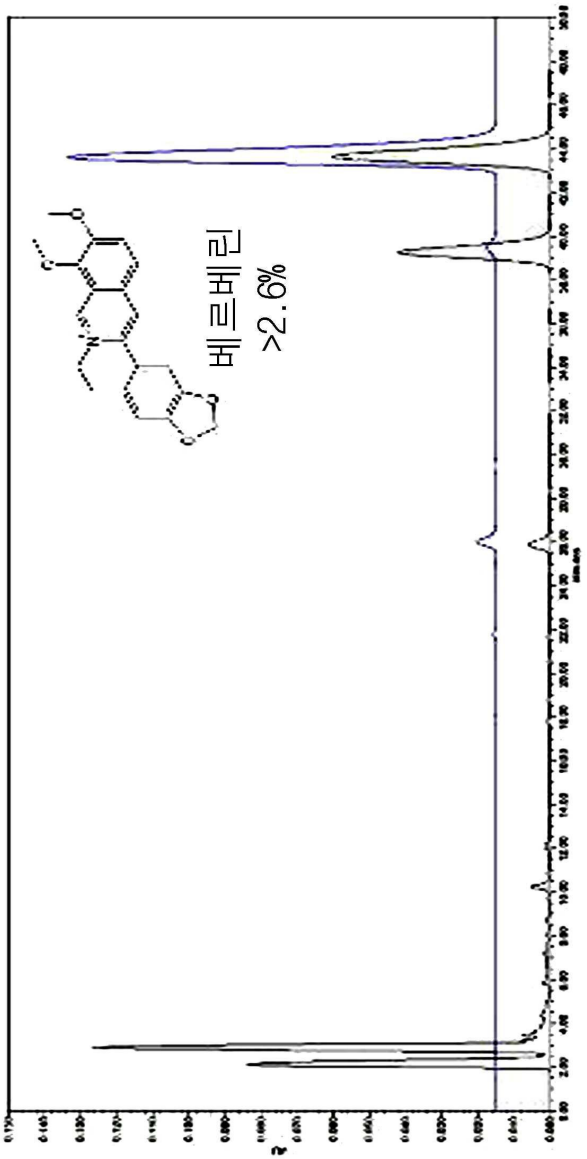
도면1



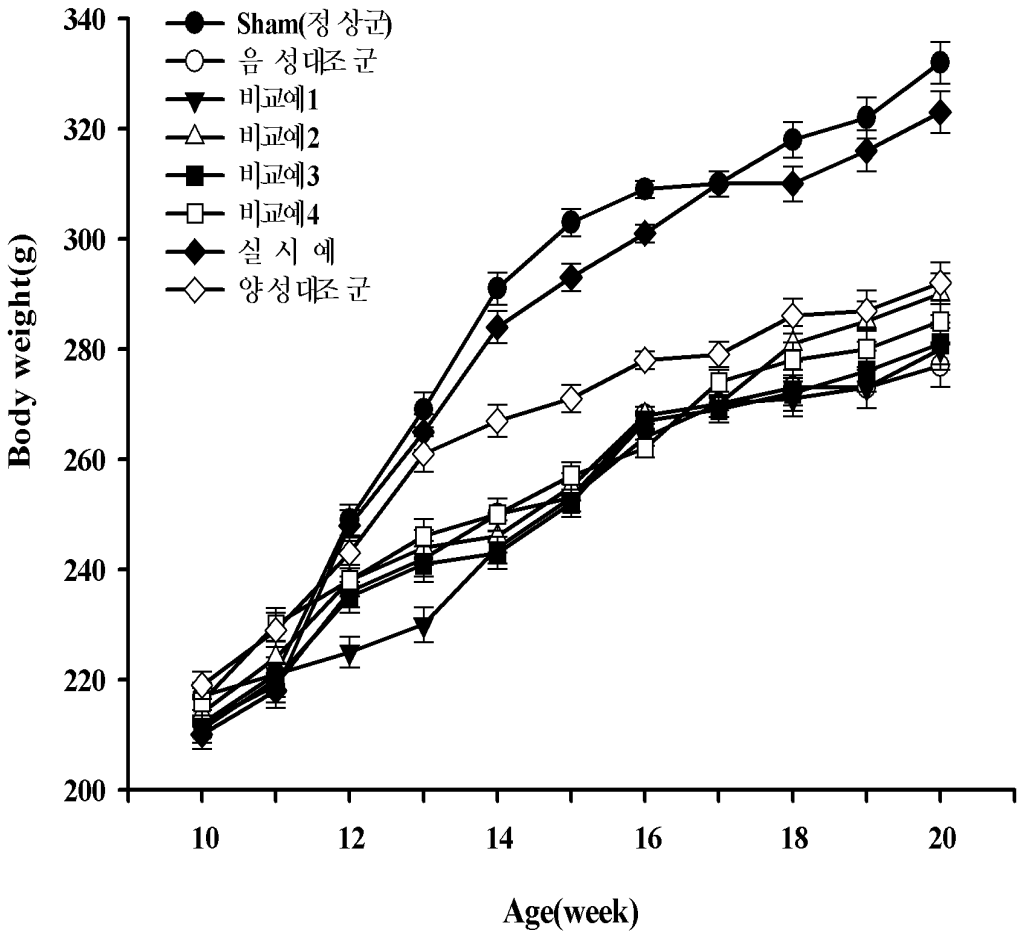
도면2



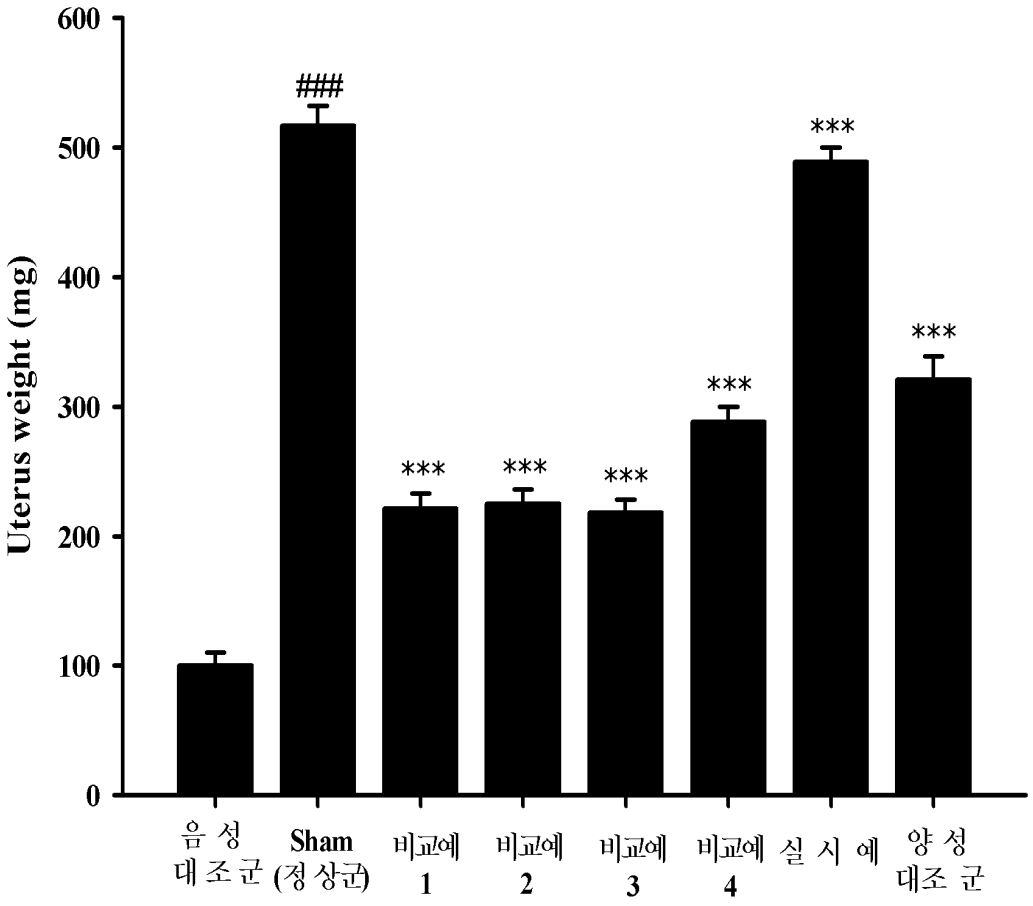
도면3



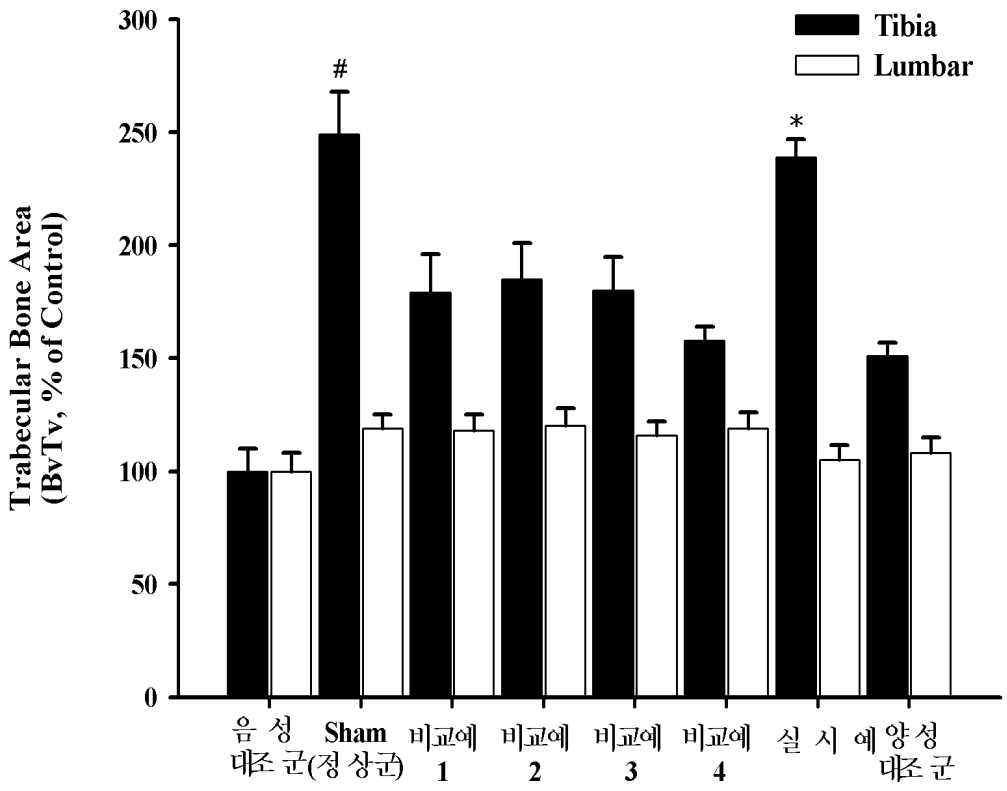
도면4


Sham(정상군)
음성대조군
비교예1
비교예2
비교예3
비교예4
실시예
양성대조군
Body weight(g)
340
320
300
280
260
240
220
200
10
12
14
16
18
20
Age(week)

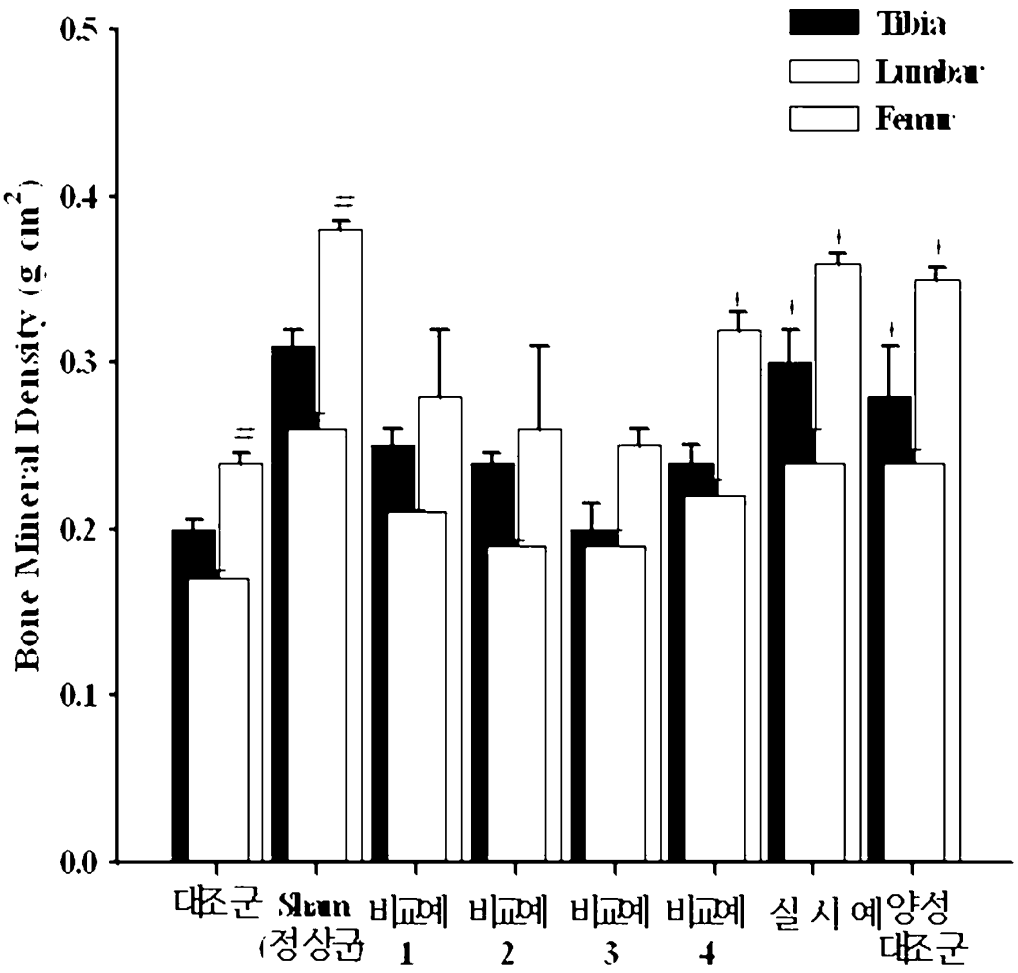
도면5


Uterus weight (mg)
600
500
400
300
200
100
0
###
***
***
***
***
***
***
음성 대조군
Sham (정상군)
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실시예
양성 대조군

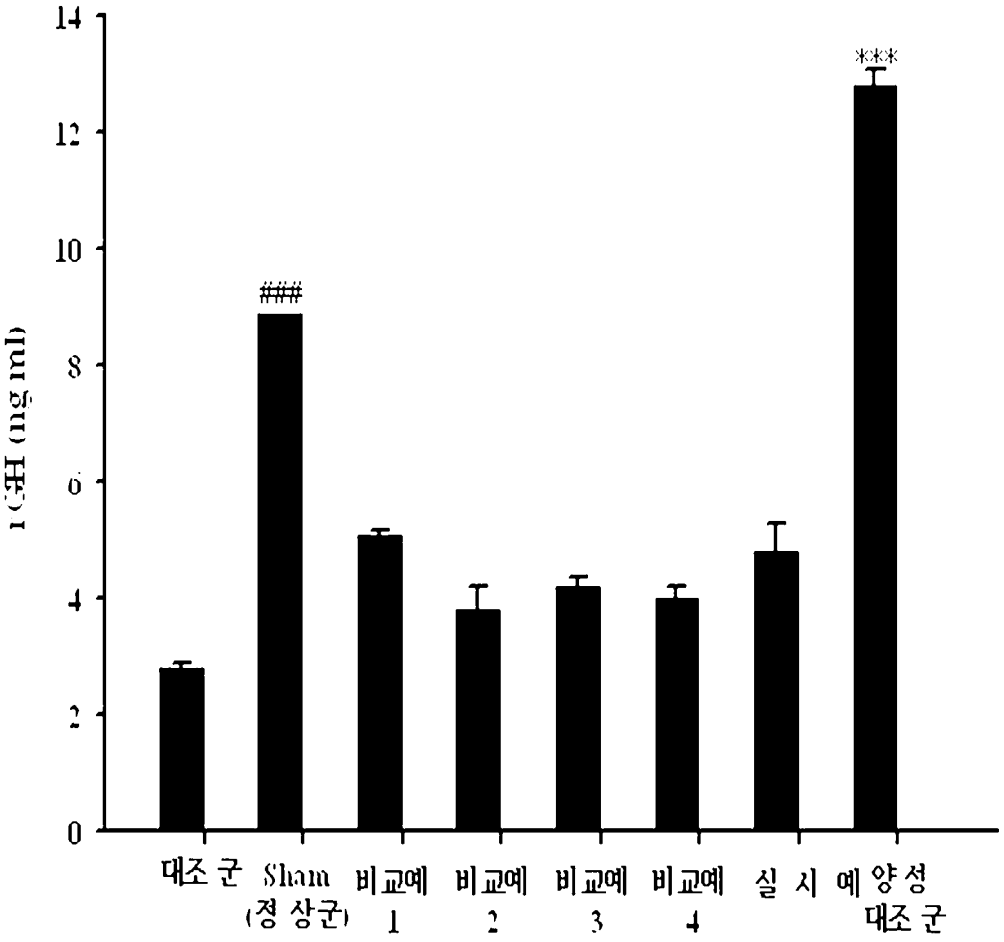
도면6


Tibia
Lumbar
Trabecular Bone Area
(BvTv, % of Control)
300
250
200
150
100
50
0
#
*
음성 대조군
Sham (정상군)
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실시예
양성 대조군

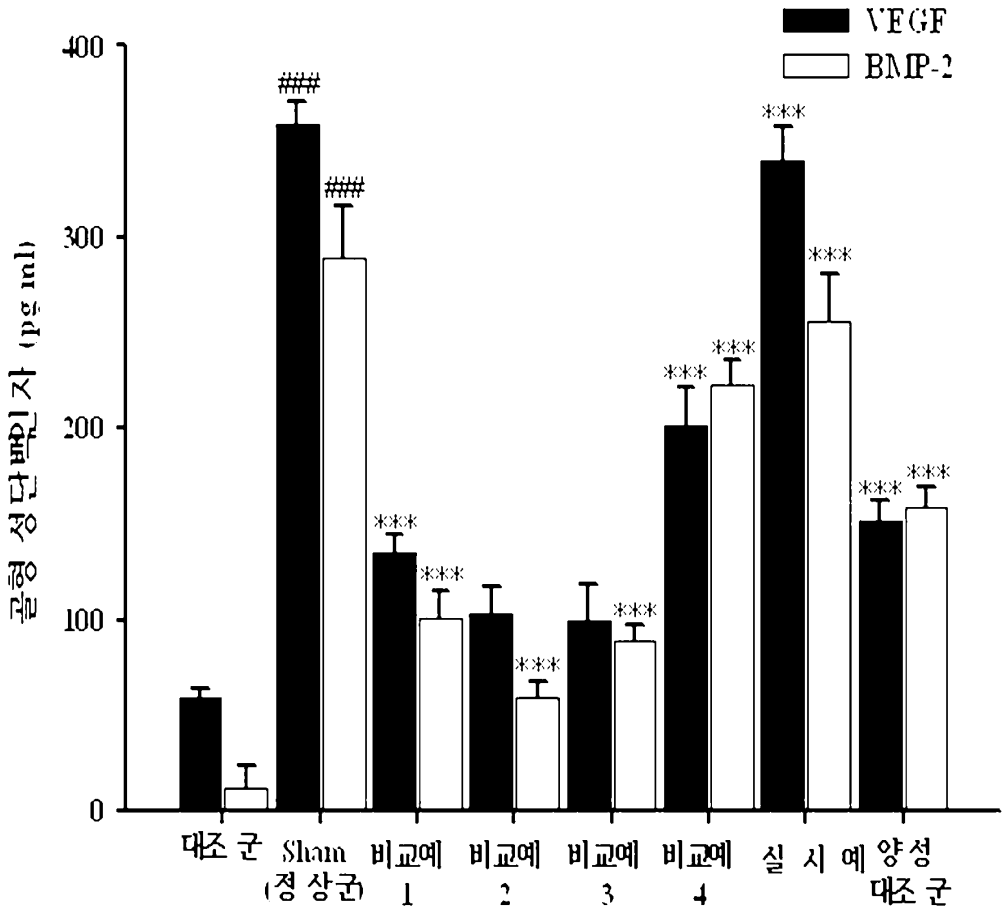
도면7


Tibia
Lumbar
Femur
Bone Mineral Density (g cm^2)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
대조군
Sham
(정상군
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실 시 예
양성 대조군

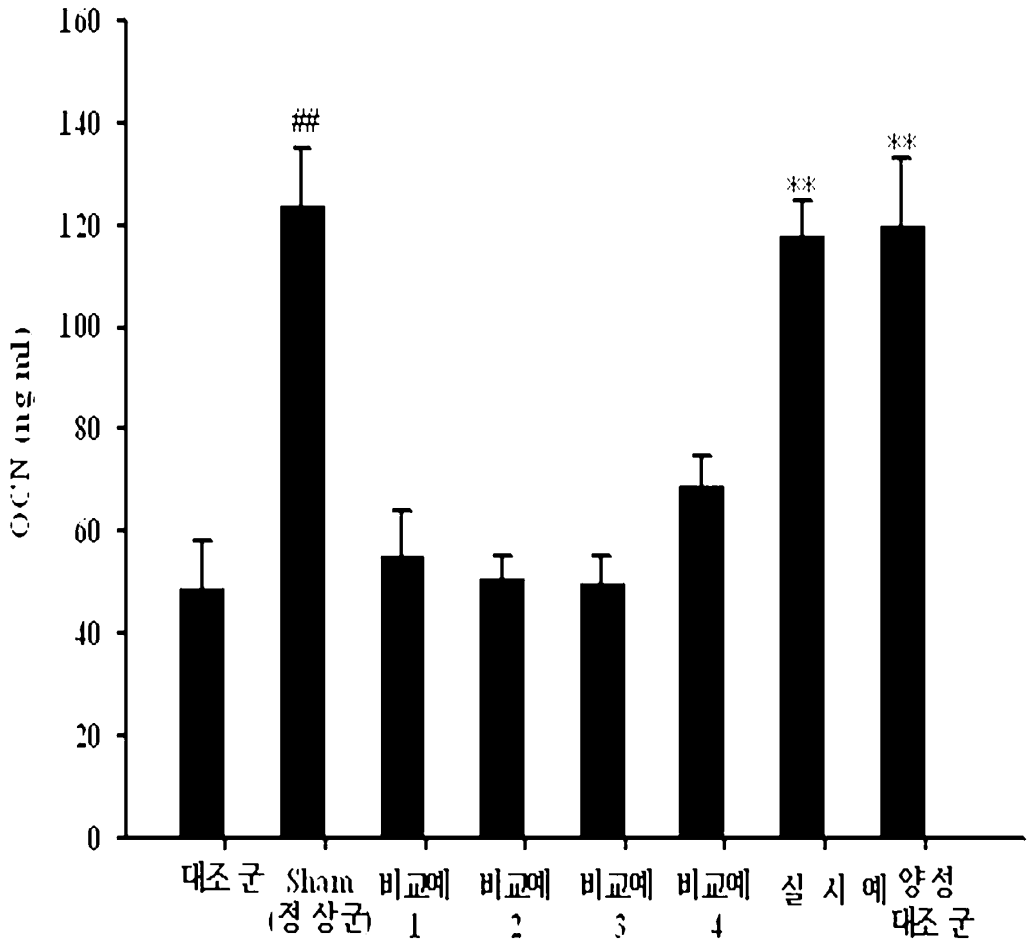
도면8



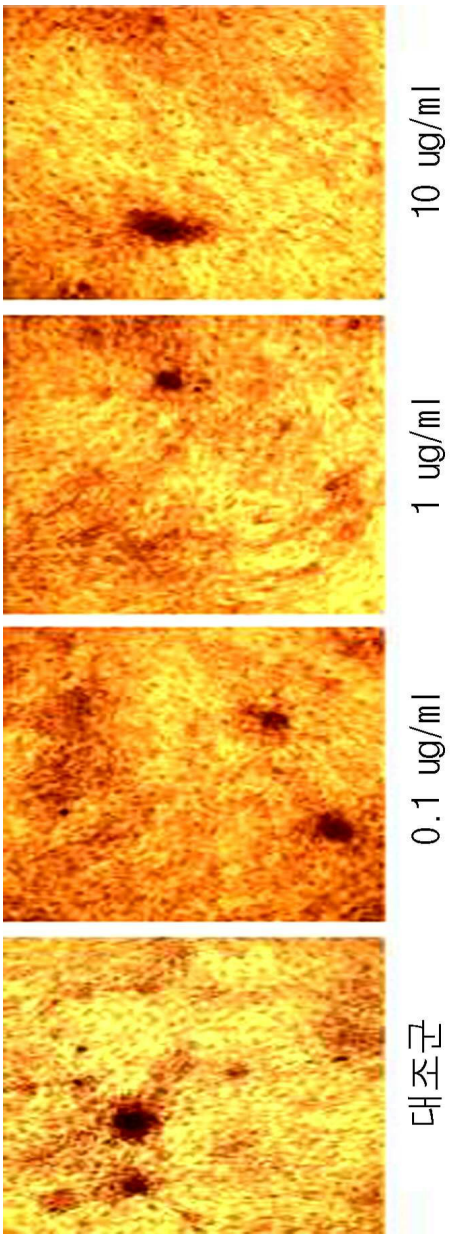
도면9


VEGF
BMP-2
골형성 단백질 (pg/ml)
400
300
200
100
0
###
###
***
***
***
***
***
***
***
***
***
***
대조 군
Sham (정 상군)
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실 시 예
양성 대조 군

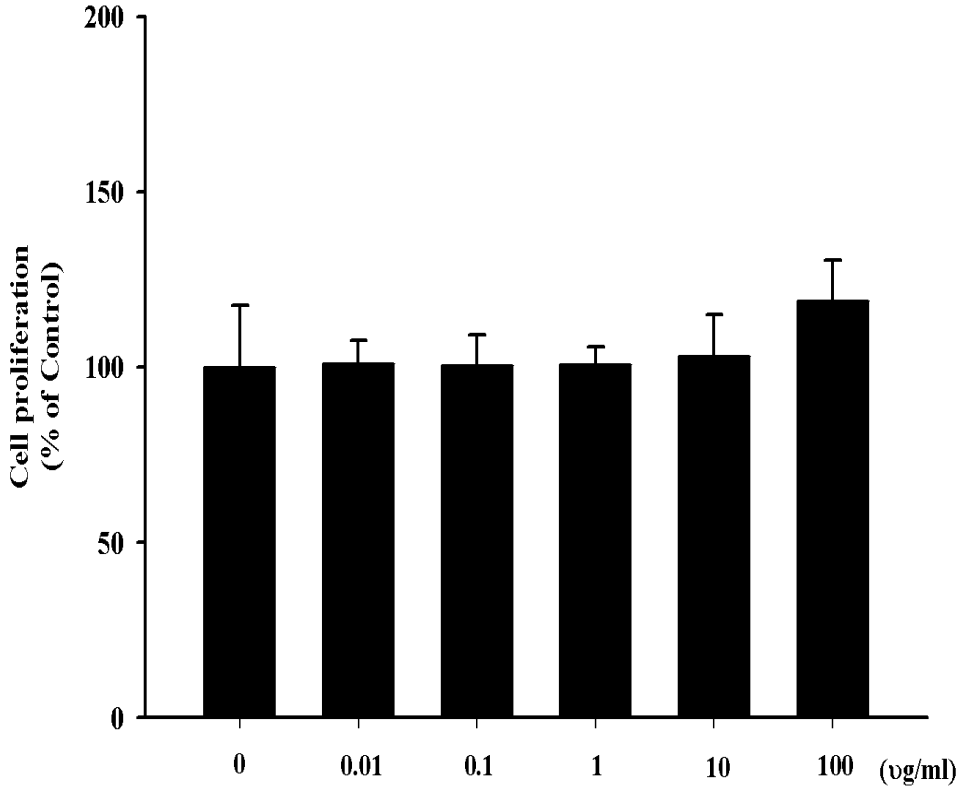
도면10


160
140
120
100
80
60
40
20
0
OCN (ng/ml)
##
**
**
대조군
Sham (정상군)
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실시예
양성 대조군

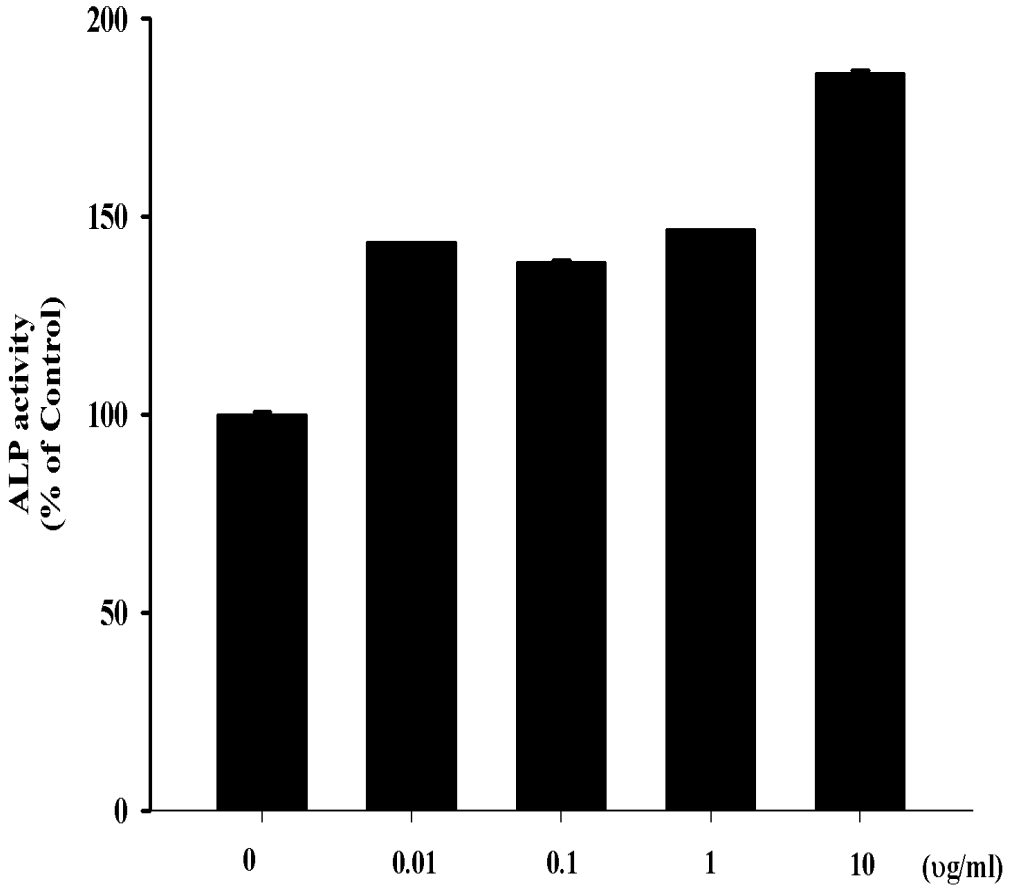
도면11



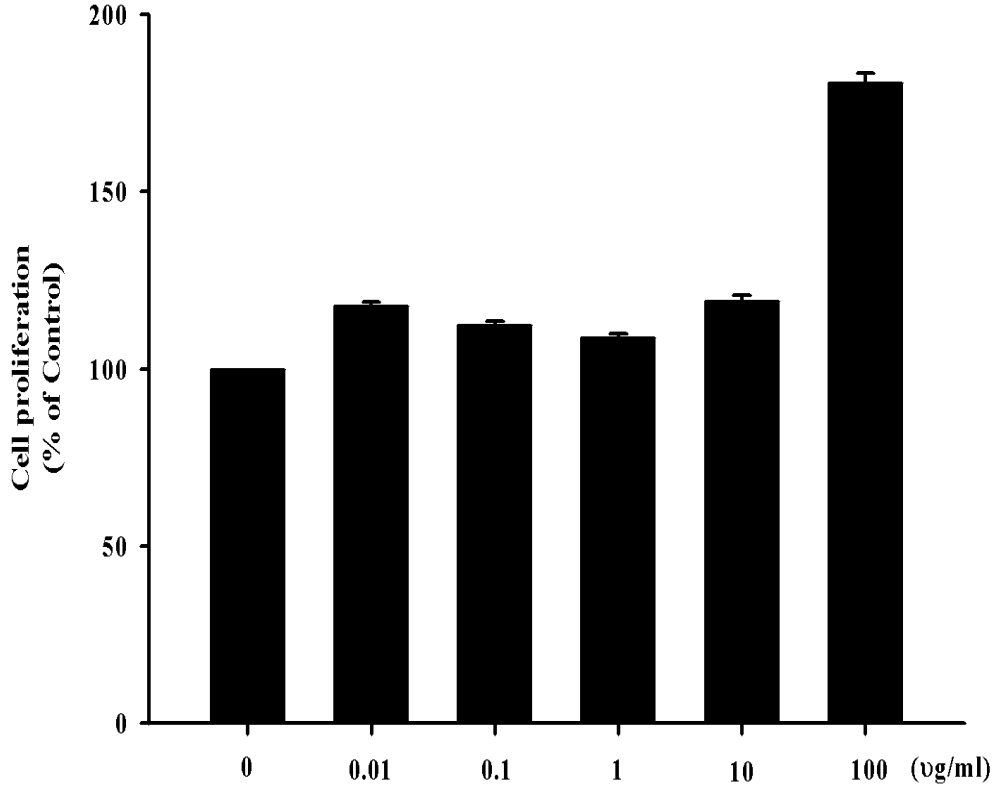
도면12


200
150
100
50
0
Cell proliferation
(% of Control)
0
0.01
0.1
1
10
100
(υg/ml)

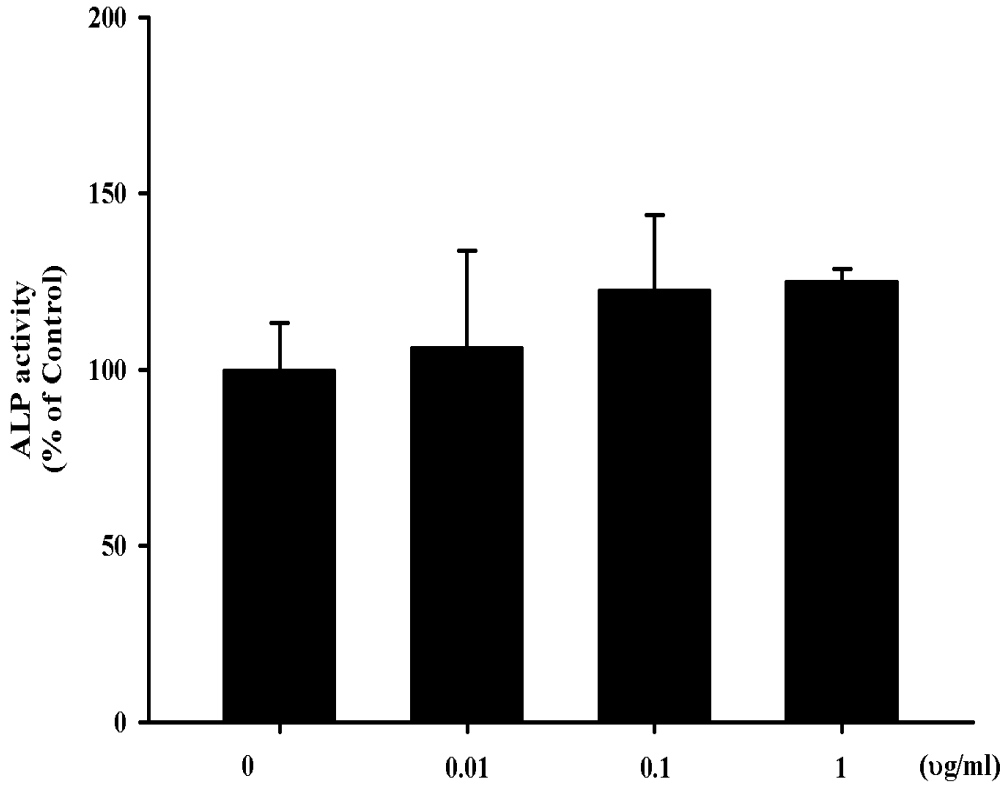
도면13



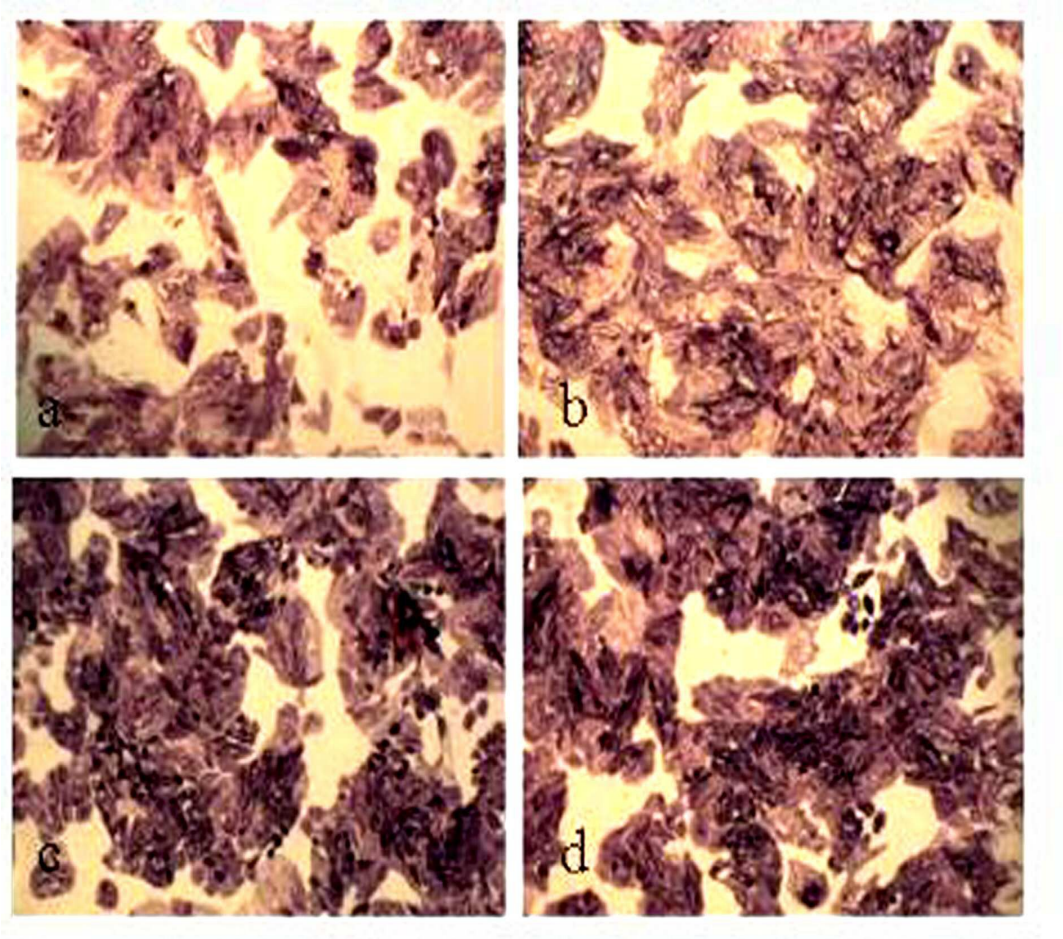
도면14


200
150
100
50
0
Cell proliferation
(% of Control)
0
0.01
0.1
1
10
100
(υg/ml)

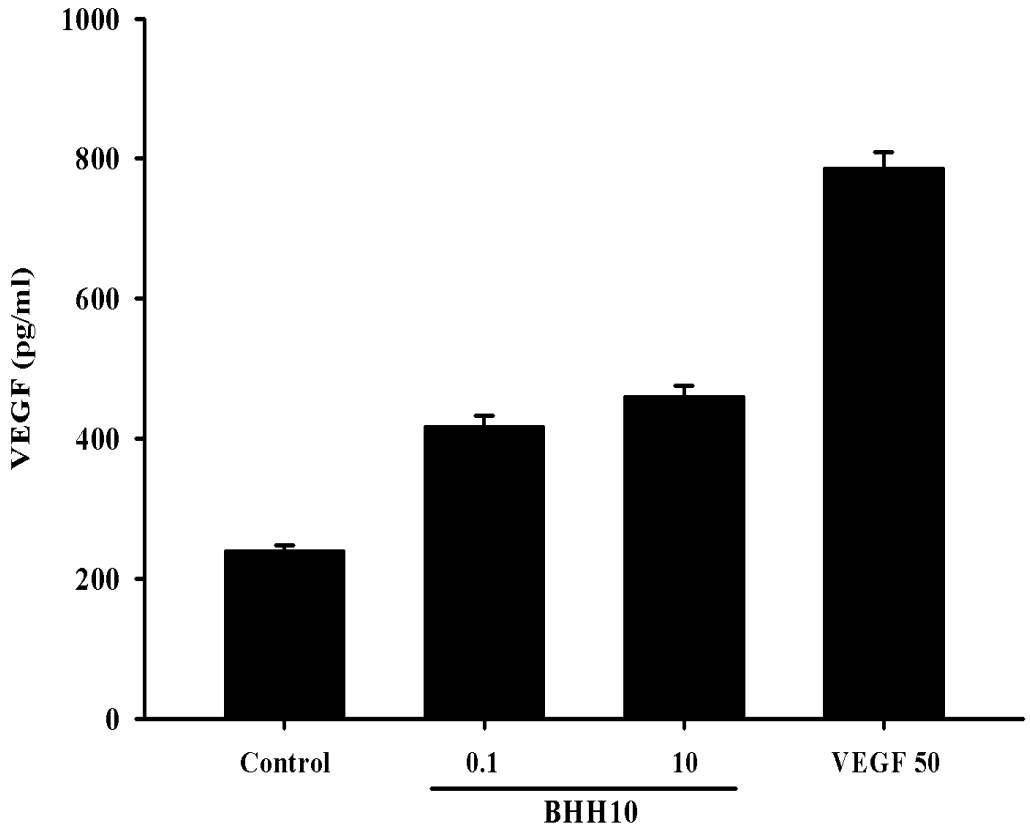
도면15



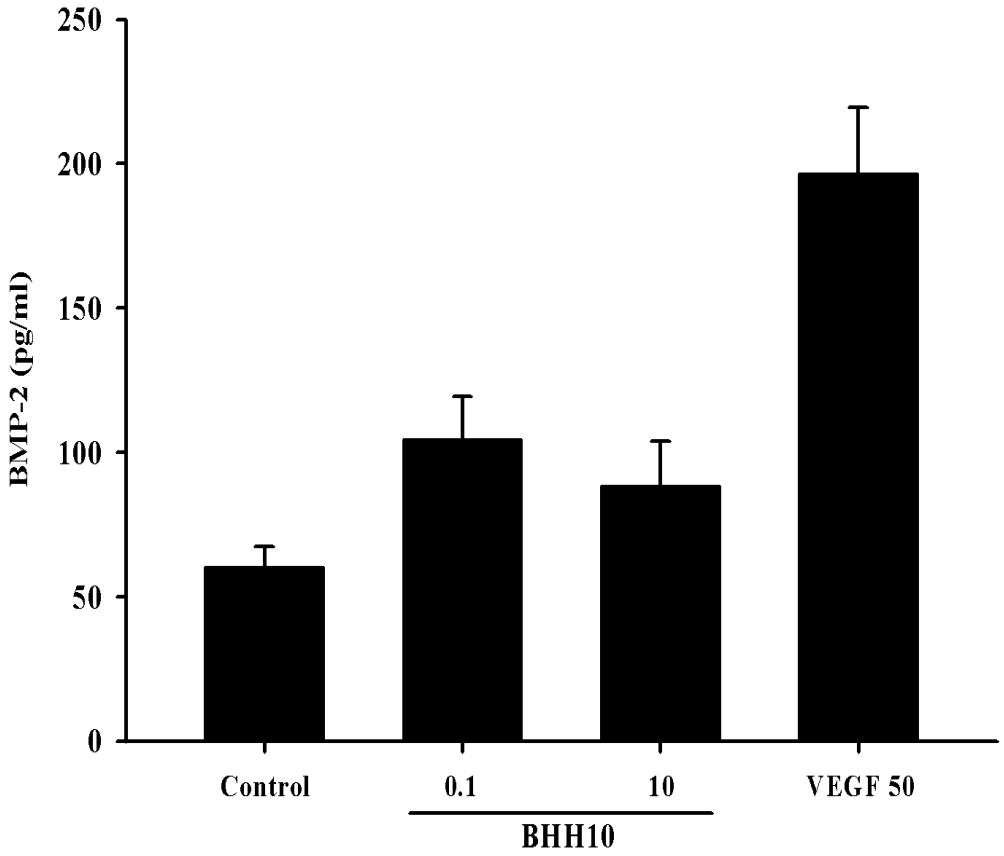
도면16



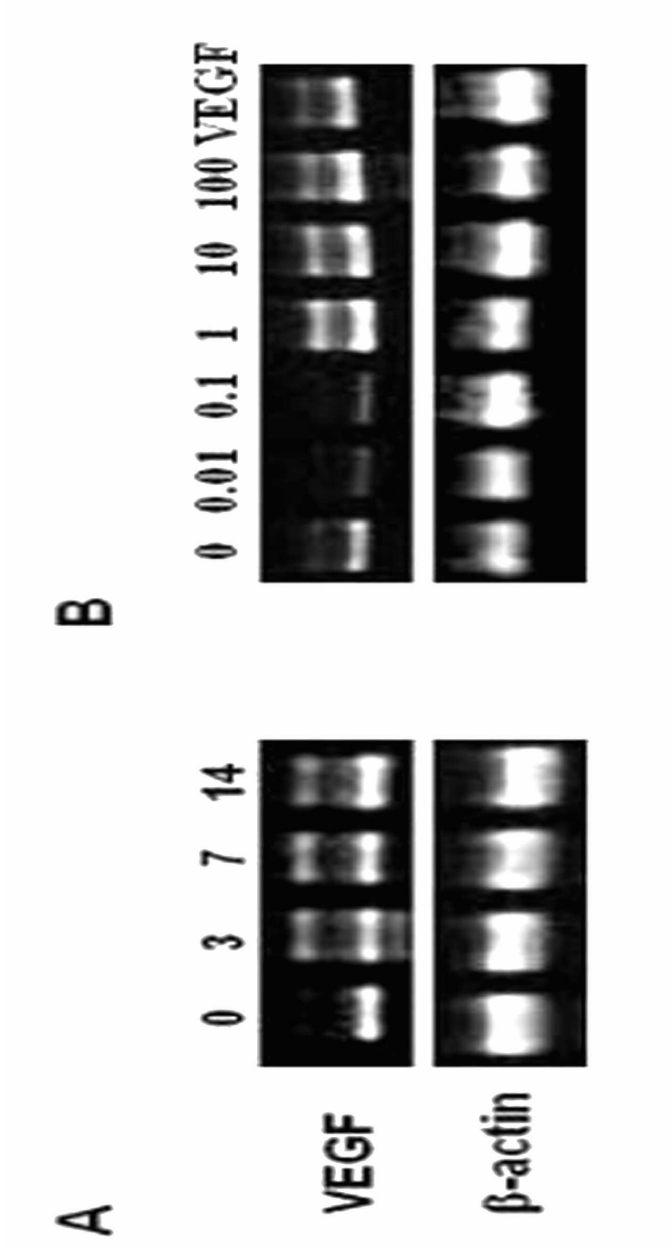
도면17



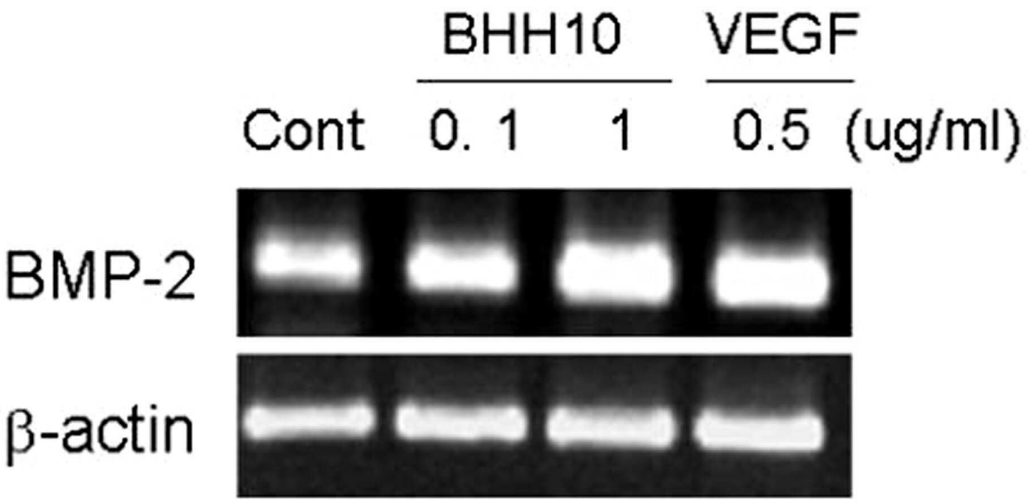
도면18



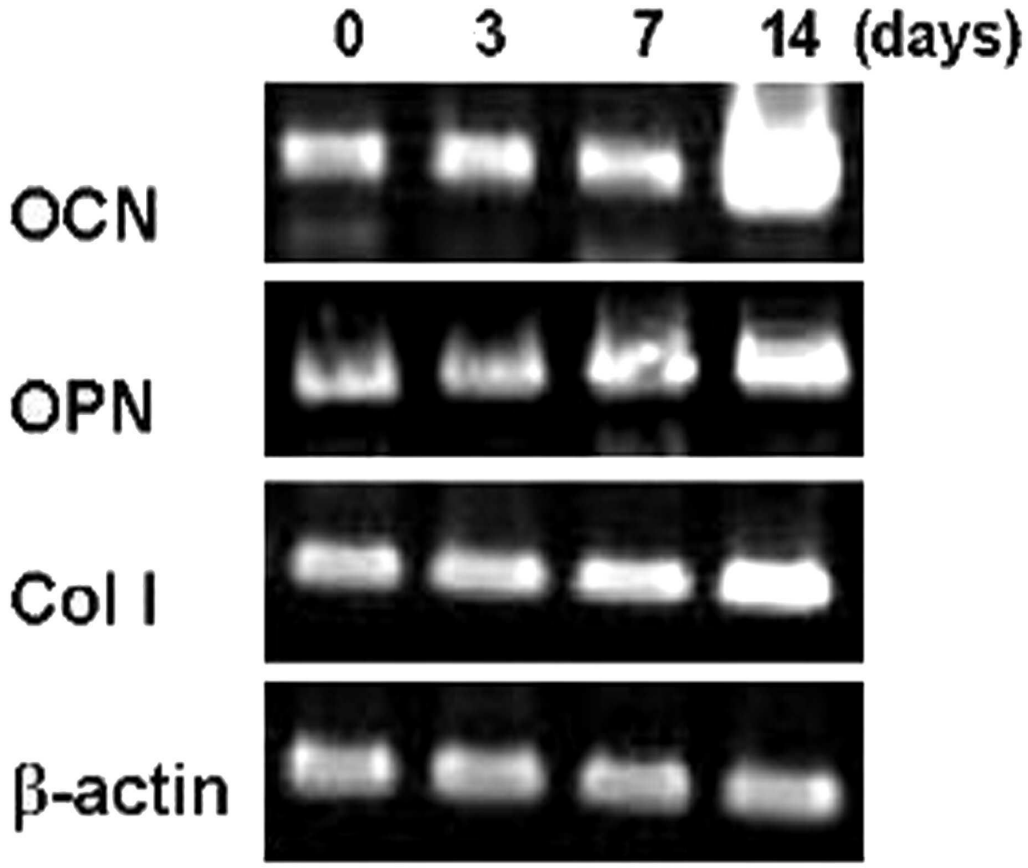
도면19



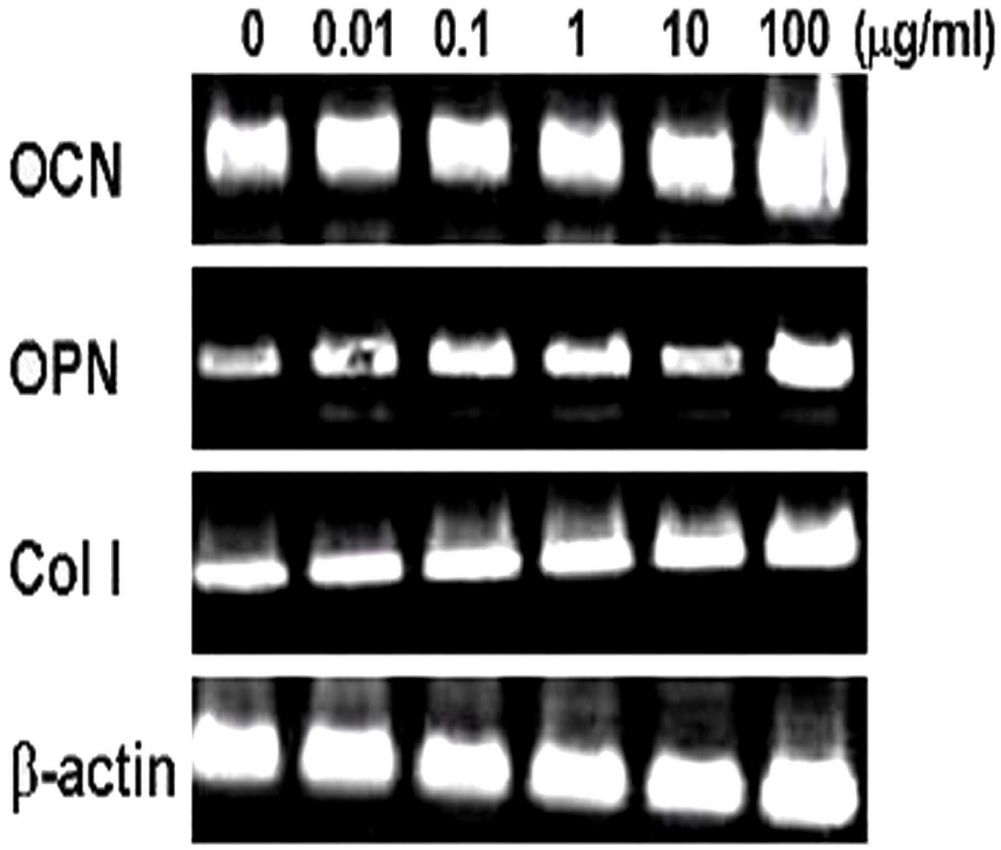
도면20


BHH10
VEGF
Cont
0. 1
1
0.5 (ug/ml)
BMP-2
β-actin

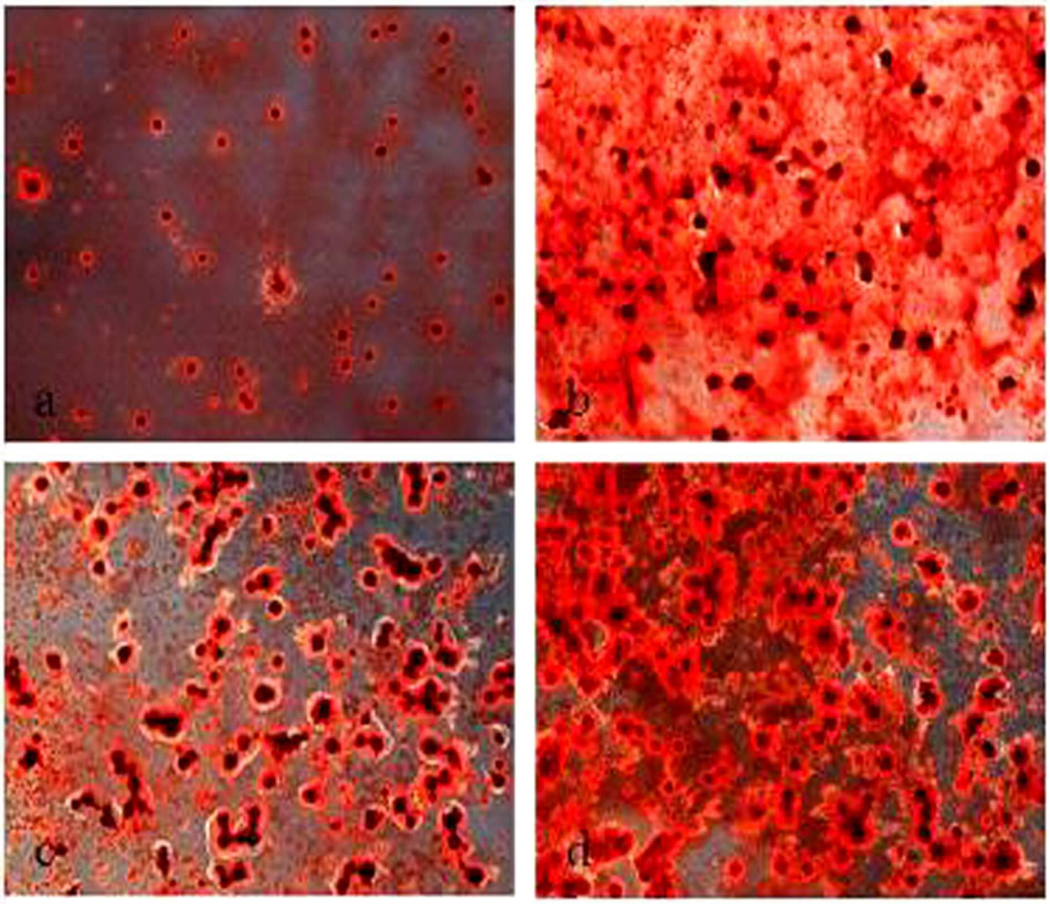
도면21


0
3
7
14 (days)
OCN
OPN
Col I
β-actin

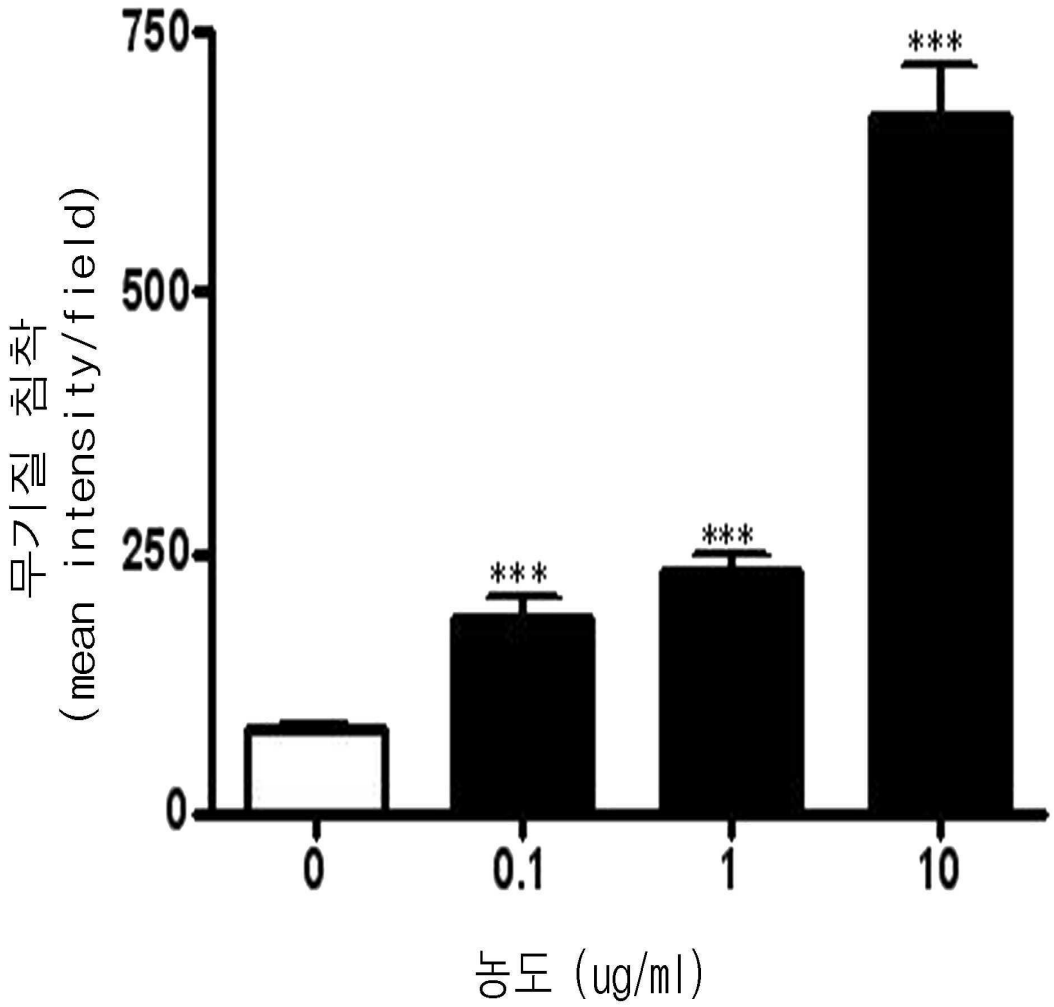
도면22



도면23



도면24



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
<120> Composition comprising the extract of Astragalus membranaceus BGE., Cinnamomum cassia and Phellodendron amurensis for preventing and treating of osteoporesis and bone disease

<130> 9p-08-62

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 30
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin forward primer

<400> 1
cctggccaag gtcatccatg acaactttgg 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin reverse primer

<400> 2
catgaggtcc accaccctgt tgctgtagcc 30

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN forward primer

<400> 3
gaggaccctc tctctgctca ctctgctggc 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN reverse primer

<400> 4

gtggtgccat agatgcgctt gtaggcgtcc 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN forward primer

<400> 5
ctcggatgaa tctgacgaat ctcaccattc 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN reverse primer

<400> 6
cttactctta gggtctagga ctagcttgtc 30

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> coll forward primer

<400> 7
tggtcttgga ggaaactttg c 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> coll reverse primer

<400> 8
agtatctcct ttggcaccat c 21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF forward primer

<400> 9
tgcacccacg acagaagggg a 21

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VEGF reverse primer

<400> 10
tcaccgcctt ggcttgtcac at 22

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BMP-2 forward primer

<400> 11

cagccatgaa tttcacagcc 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BMP-2 reverse primer

<400> 12
gggagtttcc atgaagccac 20