(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A23L 1/29 (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년07월18일
(11) 등록번호 10-0740565
(24) 등록일자 2007년07월11일

(21) 출원번호 10-2006-0007583
(22) 출원일자 2006년01월25일
심사청구일자 2006년01월25일
(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 계명대학교 산학협력단
대구 달서구 신당동 1000번지

이인선
대구광역시 달서구 도원동 1443번지 강산타운 409동 1002호

(72) 발명자 이인선
대구광역시 달서구 도원동 1443번지 강산타운 409동 1002호

이효정
대구 북구 태전동 에덴 APT 103-1302

유미희
대구 달서구 용산동 평화타운 301-701

이지원
대구 달서구 본동 610-5

(74) 대리인 특허법인 율촌

(56) 선행기술조사문헌
JP2005298450 A
KR1020050014230 A
KR1020040107713 A
JP17298450 A

심사관 : 이규안

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 파골세포 분화억제 효과를 가지는 황금 추출물 및 이를 포함하는 건강기능식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 황금 추출물 및 이를 포함하는 건강기능식품 식품조성물에 관한 것으로서, 골개형(bone remodeling)에 있어서 골생성(bone formation)에 대한 골흡수(bone resorption)의 증가로 인한 불균형에 따라 초래되는 골질환의 주된 원인이 되는 파골세포 활성 증가를 효과적으로 억제할 수 있는 황금 추출물, 이를 포함하여 노인들의 골질환이나 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골 질환 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품에 관한 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

(정정) 황금을 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하여 얻어지는 TRAP(tatrate-resistant acid phosphatase) 효소의 활성증가로 인한 파골세포의 분화에 의한 골질환 예방용 황금 추출물.

청구항 2.

(정정) 제 1 항의 황금 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는 TRAP(tatrate-resistant acid phosphatase) 효소의 활성증가로 인한 파골세포의 분화에 의한 골질환 예방용 건강기능식품 조성물.

청구항 3.

(정정) 제 2 항에 있어서, 황금 추출물을 적어도 0.01중량%로 포함하는 것임을 특징으로 하는 TRAP(tatrate-resistant acid phosphatase) 효소의 활성증가로 인한 파골세포의 분화에 의한 골질환 예방용 건강기능식품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 황금 추출물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 골개형(bone remodeling)에 있어서 골생성(bone formation)에 대한 골흡수(bone resorption)의 증가로 인한 불균형에 따라 초래되는 골질환의 주된 원인이 되는 파골세포 활성 증가를 효과적으로 억제할 수 있는 황금 추출물과 노인들의 골질환이나 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골 질환 개선에 유효한 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

골(bone)은 세포와 콜라겐성 기질 그리고 무기질 성분으로 구성되어진 매우 복잡한 조직이다. 이들은 기계적인 지지, 중요한 장기의 보호, 조혈화에 필요한 미세 환경제공, 그리고 칼슘과 다른 미네랄의 저장 장소와 같은 기본적이며 다양한 기능을 제공하여 준다.

골조직은 일생을 두고 지속적으로 재형성되는 활발한 대사 조직이다. 골개형(bone remodeling)은 파골세포(osteoclast)가 골에 붙어 산성화(acidification) 및 단백질 분해작용(proteolytic digestion)에 의해 오래된 골을 제거하고 그 제거된 위치에 조골세포(osteoblast)가 여러 종류의 단백질과 콜라겐으로 이루어진 골기질을 분비하여 유골(osteoid) 형성과 무기질 침착(mineralization)을 유도하여 새로운 골을 형성함으로써 이루어진다. 이러한 두 과정 즉, 골흡수와 골형성은 서로 밀접하게 연결되어 이루어지고 골의 정상적인 구조를 유지하는 데 중요하다.

이 두 과정은 골흡수 후 즉시 골형성이 일어나는 연속적인 상호작용인데, 질환이나 식이, 호르몬과 물리적인 스트레스 등의 요인들에 의해 상호작용의 불균형이 초래되어 골질환이 발생하게 된다. 특히, 노인들의 골질환이나, 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골 질환은 조골세포에 의한 골형성 보다는 골을 흡수하는 파골세포 활성 증가가 주된 원인이다(Togari A, Arakawa S, Arai M, Matsumoto S. Alteration of in vitro bone metabolism and tooth formation by zinc. Gene Pharmacol.24: 1133-1140 (1993)). 이러한 파골세포는 단핵-탐식세포(monocyte-macrophage) 계통의 조혈전구세포(hematopoietic precursor)에서 분화되며, 골내막에 위치하고 골조직에 존재하는 유일한 다핵세포이다. 또한 파골세포는 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)와 풍부한 칼시토닌(calcitonin, CT) 수용체를 가지는 특징이 있으며 실제적으로 뼈의 흡수작용을 할 때는 산 생성이 활발하고 악틴 링(actin ring)을 형성하여 골기질을 흡수한다.

한편, 고령화 사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증(osteoporosis)은 가장 흔한 대사성 질환으로 골형성과 골흡수의 불균형에 의하여 골의 화학적 조성에는 변화가 없으나 단위용적내의 골량을 감소시켜 척추, 요골 및 대퇴부의 골절을 쉽게 일으키는 질환이다. 평균 수명이 70세를 넘어서서 선진국 수준에 도달하고 있는 우리나라도 골다공증에 대한 사회적, 의학적 관심이 증가하고 있다.

현재까지 골다공증의 치료방법으로서 완전하게 확립된 것은 없으며 일단 손실된 뼈 조직을 원상으로 재생시키는 것은 어렵다. 따라서 가급적 조기에 발견하고 뼈 손실이 더 이상 증가되지 않도록 또는 진행속도가 지연될 수 있도록 하는 데 그 치료목표를 두고 있다.

현재 골다공증에 대해 임상으로 사용되는 것에는 골 흡수 억제제로서 주로 사용되는 에스트로겐, 알렌드로네이트, 칼시토닌, 그리고 비스포스포네이트 제제 등이 있다.

현재 미국 식약청에서 골다공증 치료 및 예방약제로 승인한 것은 에스트로겐과 라록시펜, 알렌드로네이트 및 비스포스포네이트 제제 등이며 이들 약제들은 모두 골 흡수 억제 약제로서 최근 메타 분석(meta analysis) 결과 척추부의 골절은 35~50% 내외로 감소시키지만, 대퇴부의 골절 예방효과는 비스포스포네이트 제제만 보이는 것으로 밝혀졌다(Oh HJ, Therapy of osteoporosis in climacteric. J. Korea Acad. Fam. Med. 21: 20-27; Pole HAP, Felsenberg D, Hanley DA, Stenpan J, Munoz-Torres M, Wolkins TJ, Qui-sheng G, Galich M, Vandormael K, Yates AJ. Mulrinational placebo-controlled, randomised trial of the effects of Alendronate on Bone density and fracture risk in postmenopausal women with law bone mass: Results of the FOSIT. Osteoporosis Int. 9: 461-468 (1999)).

따라서 골다공증의 근본적인 치료제는 아직 없다고 해도 과언이 아니며, 기존의 치료제는 부작용이 심해서 임상의 의사나 환자에 만족을 주지 못하고 있으나, 폐경기 골다공증의 치료법으로 호르몬 대체요법인 에스트로겐 보충이 시도되어 왔으며 골량 유지에 효과적인 것으로 보고 되고 있다. 그러나 이 치료는 60세 이상의 고령층에서는 골량 감소 억제효과가 폐경초기에 비하여 낮으며, 최소 5년 이상의 장기 치료를 요하고 불규칙한 자궁 출혈, 유방암, 자궁 내막암 및 고혈압 발생 빈도 증가 등의 합병증 위험이 있는 것으로 지적되고 있다.

이에 최근에는 케르세틴(quercetin)과 캄페롤(kaempferol)이 파골세포의 골 흡수를 억제하는 효과(Wattel A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouilet C, Petit JP, Fardelonne P, Brazier M. Potent inhibitory effect of naturally occurring cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292: 94-101 (2002)); 대두를 이용한 조골세포 활성 검색(Lee YS. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoclast-like cells. Korea Soybean Digest 18: 35-42 (2001)); 그리고 두충의 골다공증 효과에 대한 연구(Lee DS, Byun SY. Effects of the dietary mixture of eucommia ulmoides oliver on osteoporosis. Korean J. Biotechnol. Biol. 16: 614-619 (2001)) 등 부작용이 적고 쉽게 접할 수 있는 천연소재를 이용한 골다공증 개선제 검색이 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 일상생활에서 식용 또는 약용으로 이용되고 있는 천연물에 대한 생리활성 물질을 규명하기 위해 RAW264.7 cell을 이용한 파골세포 분화 과정 중 여러 천연물 추출물을 처리하여 TRAP 활성을 측정하는 방법을 통해 파골세포의 분화 억제능을 검색하던 중, 황금 추출물이 이러한 활성이 있음을 알게 되어 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 세포 독성이 없으면서 낮은 농도에서도 TRAP 효소의 활성을 저해하는, 즉 파골세포 분화 억제 효과를 갖는 황금 추출물을 제공하는 데 그 목적이 있다.

또한, 본 발명은 이와 같은 황금 추출물을 포함하여 파골세포 분화 억제 효과를 가지는 건강기능식품 조성물을 제공하는 데도 그 목적이 있다. 이와 같은 건강기능식품은 골다공증과 같은 골질환 개선에 유용하다.

본 발명은 황금을 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하여 얻어지는 TRAP(tatrate-resistant acid phosphatase) 효소의 활성증가로 인한 파골세포의 분화에 의한 골질환 예방용 황금 추출물을 그 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 유효량의 황금 추출물을 포함하며, 식품학적으로 용인된 첨가제들을 포함하는 TRAP(tatrate-resistant acid phosphatase) 효소의 활성증가로 인한 파골세포의 분화에 의한 골질환 예방용 건강기능식품 조성물에도 그 특징이 있다.

발명의 구성

이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

황금(*Scutellaria baicalensis* Geogri.)은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생 초본이며 주원산지는 한국과 중국을 비롯한 동북 아시아로서 한국 전역과 양자강 이북의 중국 및 시베리아 등 동북 아시아에 자생 또는 재배되고 있다. 특히, 중국에서는 중북부에서 동북부에 걸쳐 다양한 스쿠텔라리아(*Scutellaria*)속 식물이 분포되어 자생하고 있다. 황금은 일명 속썩은풀이라고도 하며 다른 이름으로는 부장(신농본초경초), 내허, 공장, 경금, 황문(명의별록), 인두(오보본초) 등으로 불리워진다. 높이는 20 ~ 60 ㎝ 정도이고 7월에서 9월 사이에 자색의 꽃을 개화하는 단일성 식물로서 우리나라 전역에서 재배가 가능하며 용도는 주로 약용으로 사용되나 관상용 또는 식용으로 이용되기도 한다.

황금의 뿌리부분의 모양은 방추상 또는 반관상을 이루며 길이는 8 ~ 20 ㎝, 지름은 5 ~ 20 ㎜이다. 바깥면은 모양이 조잡하고 가로주름이 있으며, 여러 곳에 측근이 붙었던 자국이 있다. 약용으로는 주로 구근을 이용하며 소염성 해열, 진통, 지사, 동맥경화성 고혈압 등의 치료에 이용된다. 또한, 향약대사전에는 '실화를 사하고 습은열을 제거하며 지혈, 안태의 효능이 있다' 고 기록되어 있다.

이러한 황금의 대표적인 성분은 플라보노이드(flavonoids)로 밝혀져 있는데, 식물계에 현재까지 약 4,000여종의 플라보노이드(flavonoid) 화합물이 알려져 있다. 황금의 성분에 대한 연구는 1970년대 이후 과학적인 분석기기를 이용하여 본격적으로 시작되었으며, 그 후 부삼 등(부삼 의, 궁일론기범, 정본길융, 목진치구. 1984.Scutellaria속 식물성분연구(제 3 보)(황금의 후라보노이도 성분について その3. 약학잡지. 104: 524 ~ 528)에 의해 집중적인 연구가 수행되어 지금까지 바이칼린(baicalin), 바이칼레인(baicalein), 오고닌-7-O-글루쿠로나이드(Wogonin-7-O-glucuronide), 오고닌(Wogonin), 오록실린 A-O-글루쿠로나이드(Oroxylin A-7-O-glucuronide), 오록실린 A(Oroxylin A), 스쿨캅플라본 I (Skullcapflavone I), 디하이드로오록실린 A(Dihydrooroxylin A), 바이칼레인-7-O-글루코사이드(Baicalein-7-O-glucoside) 등 약 60여종의 플라보노이드(flavonoid) 화합물들의 구조가 밝혀져 있다. 이들 성분은 식물 중에 너무 많이 함유되어 있기 때문에 오히려 주목을 끌지 못하였으나, 최근 이에 대한 다양한 약리적 활성이 보고 되면서부터 황금의 식물세포 배양 등을 통한 보다 많은 양의 플라보노이드(flavonoids)를 생산하는 연구가 보고되어 있다(Seo, W. T., Park, Y. H. and Choe, T. B. 1993. Identification and production of flavonoids in a cell suspension culture of *Schutellaria baicalensis* G. Plant Cell Reports. 12: 414 ~ 417).

일반적으로 황금 추출물을 얻는 방법으로는 알코올 등을 이용한 용매추출이나 단수 열수추출 등의 방법이 있는데, 본 발명에서는 메탄올을 용매로 한 방법을 사용한다. 그러나, 이에 한정되는 것이 아님은 물론이다.

메탄올을 이용하여 황금 추출물을 얻는 방법을 좀더 구체적으로 살펴보면, 시료인 황금을, 10배 가량의 80% 메탄올을 이용하여 3 회 반복 추출한다. 추출액을 여과지를 사용하여 1회 이상 여과하고 회전감압농축기로 농축하여 동결건조한 후 분말화하여 이를 시료로 사용한다.

메탄올 추출법을 이용하여 얻어진 황금 추출물의 경우는 비교적 낮은 농도에서도 30% 이하의 TRAP 활성을 보여 파골세포 분화를 효과적으로 억제함을 확인하였고, 또한 세포독성도 나타나지 않았다.

본 발명의 황금 추출물은 파골세포의 분화를 억제할 목적으로 음식물에 첨가될 수도 있다. 본 발명의 황금 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 육류, 음료수, 초콜렛, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이

스크림류, 알콜음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이와 같이 음식물에 적용하게 되면 성인 및 노인층의 광범위한 계층에 이르기까지 늘 간편하게 황금 추출물을 간편하게 섭취할 수 있어 지속적인 음용 효과를 기대할 수 있다.

본 발명에서 이와 같은 황금 추출물을 건강기능식품에 적용하는 경우 전체 조성물에 대해 황금 추출물을 적어도 0.01중량% 이상 함유하는 것이 효과적인 측면에서 바람직하다. 황금 추출물의 경우 그 함량이 과량으로 포함되더라도 독성을 나타내지는 않으므로 그 첨가량의 상한을 설정하는 것은 각별한 의미가 없다 할 것이다.

본 발명은 또한 더 나아가 TRAP 효소의 활성 증가로 인한 파골세포의 분화에 기인하여 발생되는 질환의 개선에 유효한 약학 조성물에도 황금 추출물을 적용할 수 있는데, 약학 조성물로 사용하기 위해서는 황금 추출물, 이의 농축액 또는 건조분말을 유효성분으로 할 수 있으며, 이를 약학적으로 용인된 담체와 혼합하여 제조할 수 있음은 물론이다. 이 약학 조성물은 통상적으로 제약 분야에서 사용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 제약 방법에 의해 정제, 캅셀제, 산제, 과립, 현탁제, 유화제, 시럽제, 액제 또는 비경구 투여용 제제와 같은 단위 투여형 또는 수회 투여형 약제학적 제제로 제형화될 수 있다.

이하, 본 발명을 다음과 같은 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 다음의 실시예는 본 발명을 예시하기위한 것인 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 황금 추출물의 제조

황금에 10배 가량의 80% 메탄올을 가하여 3회 반복하여 추출한 다음, 추출액을 와트만 No.3. 여과지를 사용하여 2회 여과하고, 회전감압 농축기(R-3000, Buchi Switzerland)로 농축하여 동결 건조하여 분말화하여 시료로서 사용하였다.

실험예 1: 황금 추출물의 세포독성 확인

(1)세포주의 배양

본 실험에 사용된 마우스 대식 세포주 유래인 RAW264.7 cell은 한국세포주 은행으로부터 분양받았으며(KCLB 40071), 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생물질(antibiotics, penicilline/streptomycin)을 첨가한 α-MEM(alpha-minimum essential medium) 배지를 이용하여 5% CO_2가 존재하는 37℃ 인큐베이터에서 1주일에 2-3회 계대 배양였다.

파골 세포 분화를 유도하기 위해 96-well plate에 RAW264.7 cell이 4×10^3 cells/well이 되도록 분주한 후 α-MEM 배지에 RANKL 50ng/mL과 PD98059 10μM 되도록 첨가하여 5% CO_2가 존재하는 37℃ 인큐베이터에서 4일간 배양하였다.

여기서, RANKL은 인체가 파골세포(osteoclast)를 만들고 활성화 시키는데 중요한 분자이며, PD98059는 MEK 1/2 저해제로서, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있는 것이다.

(2)세포독성 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 Green 등의 방법(Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growthinhibitory lympokines. J. Immunal. Meth. 70: 257 (1984))에 준하여, 3-(4,5-디메틸-티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, MTT) 분석을 실시하여 측정하였다.

구체적으로, 먼저 상기 (1)로부터 배양한 cell을 0.4% 트립판 블루(trypan blue) 염색법으로 세포수를 측정한 후(이를 대조군으로 함) 96-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/200 μL 농도로 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 이와는 별도로, 새로운 MEM 배지 200 μL에 상기 실시예 1로부터 얻어진 시료를 다음 표 1에 나타낸 바와 같은 농도로 녹이고, 이들을 준비한 각 well에 첨가하였다. 시료가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, MTT(5 mg/mL) 용액 10 μL를 각 well에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 포마잔(formazan) 결정을 용해시켜 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내어, 이를 다음과 같이 표시하였다.

+ 2: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) 〉 110%

+1: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) 〉 100%

0: 80 〈(시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≤ 100%

-1: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≥ 80%

-2: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≥ 70%

-3: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≥ 60%

그 결과는 다음 표 1에 나타낸 바와 같다.

[표 1]

시료농도에 따른 세포 생존율(%)					
	시료농도(㎍/mL)				
	1,000	300	100	30	10
실시예 1	-3	-2	0	+1	+2

상기 표 1에서 보는 바와 같이, 황금의 추출물은 모두 높은 농도로 처리하였을 때도 RAW264.7 cell에 대한 세포독성이 없음을 알 수 있다.

실험예 2: 황금 추출물의 TRAP 활성 측정 및 파골세포의 형태학적 변화 관찰

TRAP 효소는 파골세포가 골 흡수작용을 할 때 효소의 분비가 증가되고 ATP, 니트로페닐 포스페이트(nitrophenyl phosphate)가 존재할 때 높은 활성을 가지는 효소로서 파골분화 정도를 측정할 수 있는 파골세포의 세포 화학적 표지효소(marker enzyme)이다.

한편, 파골세포는 골 내막에 위치하며 골 조직에 존재하는 유일한 다핵세포로, RANKL에 의해 분화 초기에는 단핵의 전 파골세포를 형성하지만 세포가 융합되어 다핵의 성숙 파골세포로 분화되면 골 표면에 흡착하여 주름막을 형성하는 특징을 가진다.

TRAP 염색은 기질인 나프톨 AS-MX 포스페이트(naphtohol AS-MX phosphate)와의 반응산물을 fast red violet LB로 염색하여 확인하는 방법으로 다핵의 파골세포를 관찰할 수 있고, 훽스트(hoechst) 염색을 통해서는 성숙한 파골세포의 악틴 링(actin ring)을 관찰함으로써 파골세포로의 분화정도를 알 수 있다.

따라서, 본 실험예에서는 추출물을 이용한 파골분화 정도를, Hotokezaka 등(Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito k, Matsuo KI, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW 264.7 cells into Osteoclast-like cells. J. Biol. Chem. 277: 47366-47372 (2002))의 방법에 따라 TRAP 효소 활성 측정과 TRAP 염색 및 악틴 링 염색법으로 확인하였다.

(1)TRAP 활성 측정

96-well에 4×10^3 cells/well이 되게 cell을 접종하고 분화인자인 RANKL 및 PD98059와 상기 실험예 1에서와 같이 준비한 농도가 다른 각각의 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 dulbecco's PBS(phosphate buffer saline)로 세척한 다음 10% 포름알데히드로 고정한 cell에, 기질 용액(1.36 mg/mL 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM tartrate, 50mM citrate buffer(pH 4.6))을 100 μL씩 분주하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 plate에 옮기고 0.1 N-NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내어, 이를 다음과 같이 표시하였다.

-2: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) 〉 120%

-1: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) 〉 100%

0: 60 〈(시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≤ 100%

+ 1: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≤ 60%

+ 2: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≤ 30%

+ 3: (시료의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100) ≤ 10%

그 결과는 다음 표 2에 나타낸 바와 같다.

[표 2]

시료농도에 따른 TRAP 활성(%)					
	시료농도(㎍/mL)				
	1,000	300	100	30	10
실시예 1	+3	+3	+3	+3	+2

상기 표 2의 결과로부터, 황금 추출물은 비교적 낮은 농도에서도 30% 이하의 TRAP 활성을 보여 파골분화 억제 효과가 우수함을 알 수 있다.

(2)TRAP 염색 및 악틴 링 염색

TRAP 염색은 먼저 50 mM 타르타르산(tartaric acid)를 포함하는 50 mM 소듐 아세테이트 완충액(sodium acetate buffer) 10mL에 1mg/mL 나프톨 AS-MX 포스페이트(naphtol AS-MX phosphate)와 N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide) 100 μL를 첨가하여 염색액을 제조한 후, 10% 포름알데히드로 고정한 cell에 제조한 염색액을 45 μL씩 분주하고 건조 오븐에서 30분 동안 방치하여 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과는 다음 도 1에 나타낸 바와 같다.

악틴 링(actin ring) 염색은 TRAP 염색법과 동일하게 96-well에 4×10^3 cells/well이 되게 세포를 접종하고 상기 분화인자와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 10% 포름알데히드로 세포를 고정시킨 후 PBS로 세척하여 헥스트 용액(hoechst solution)의 최종농도가 10 μM이 되도록 세포에 첨가하여 암실에서 30분 정도 반응시켰다. 형광 현미경의 blue 파장을 이용하여 분화된 파골세포의 악틴 링 형태 변화를 관찰하였으며, 그 결과를 다음 도 2에 나타내었다.

도 1 및 도 2에 있어서, 각 A는 대조군의 경우이고, 각 B는 본 발명 실시예 1에 따라 얻어진 황금 추출물을 20㎍/mL 농도로 처리하여 파골세포 분화 정도를 관찰한 결과인 바, 대조군에 비해 본 발명 황금 추출물을 처리한 경우에 다핵의 악틴 링들이 많이 형성되지 않아 파골세포 분화가 억제되었음을 관찰할 수 있다.

실시예 2: 기능성 음료의 제조

상기 실시예 1로부터 얻어진 황금 추출물 분말 0.01중량%와 식용색소 0.05중량%, 오렌지 에센스 0.05중량%, 과다 7.0중량%, 구연산 0.1중량%, 비타민 C 0.05중량%를 포함하는 일반 기능성 음료 베이스를 첨가한 조성물을 제조한 다음, 정제수를 가하여 음료를 제조하였다.

실시예 3: 약술의 제조

탈취 정제된 40중량%의 알코올을 증류수로 희석하고, 상기 실시예 1에 따라 제조된 본 발명의 황금 추출물 0.01중량%를 첨가하고, 스테비오사이드, 고과당, 아미노산, 구연산, 소금 등을 첨가하여 알코올 함유 농도 15 내지 30중량%로 제조하였다.

실시예 4: 건강 식품의 제조

상기 실시예 1의 황금 추출물 1,000mg, 적량의 비타민 혼합물(비타민 A 아세테이트 70㎍, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2㎍, 비타민 C 10mg), 비오틴 10㎍, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50㎍, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 적량의 무기질 혼합물(황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg)을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용한다.

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 황금 추출물은 TRAP 효소의 활성을 저해하여 궁극적으로는 파골세포의 분화를 억제함으로써 골개형(bone remodeling)에 있어서 골생성(bone formation)에 대한 골흡수(bone resorption)의 증가로 인한 불균형에 따라 초래되는 골질환, 예를 들어 노인들의 골질환이나 여성들의 폐경기로 인해 발생하는 골 질환을 개선할 수 있는 기능성 식품 등에 유용하다.

도면의 간단한 설명

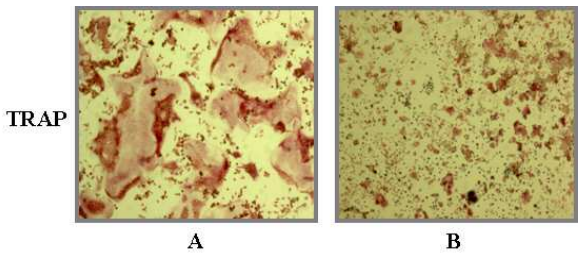
도 1은 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색법을 이용하여 분화정도를 확인한 결과이고,

도 2는 헥스트(hoechst) 염색을 통해 성숙한 파골세포의 악틴 링(actin ring) 형성 정도를 관찰한 결과로서,

도 1 및 도 2에 있어서, 각 A는 대조군의 경우이고, 각 B는 본 발명 실시예 1에 따라 얻어진 황금 메탄올 추출물을 20㎍/mL 농도로 처리하여 관찰한 경우이다.

도면

도면1



도면2

