



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0130125
(43) 공개일자 2011년12월05일

(51) Int. Cl.

A61K 36/28 (2006.01) A61K 31/357 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0049606

(22) 출원일자 2010년05월27일

심사청구일자 2010년05월27일

기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호

김정례

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8512호

한승준

강원도 춘천시 후평동 춘천바이오벤처프라자 2-1-2

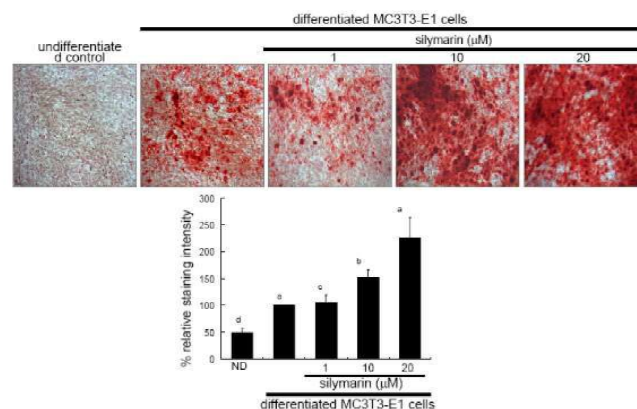
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 엉덩위의 유효성분을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 골형성을 도모하는 조골세포 분화를 촉진시키고 골흡수를 도모하는 파골세포의 분화를 억제시키는 엉덩위의 함유성분인 실리마린(silymarin) 또는 실리비닌(silibinin)을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다. 보다 구체적으로, 실리마린 또는 실리비닌은 골형성에 관여하는 조골전구세포(마우스 섬유아세포인 MC3T3-E1)의 분화 초기단계에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키고, 제 I 형 콜라겐(type I collagen) 생성을 촉진시키며, 조골세포의 석회화를 증가시킨다. 또한 대식세포(마우스 대식세포인 RAW264.7)를 파골세포로 분화시키는 과정에서 실리비닌이 파골세포의 형성과정에서 촉진되는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)와 기질단백질 분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)-9 활성을 감소시킨다. 이로서 실리마린 또는 실리비닌은 부작용이 없으면서 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 증강시킬 수 있고 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

영정귀 함유성분인 실리마린(silymarin)을 유효성분으로 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 2

청구항 1에서, 영정귀 함유성분인 실리마린(silymarin)을 유효성분은 조골전구세포의 분화단계에서 염기성 인산 분해효소의 활성을 증가시키며, 제 I 형 콜라겐 분비 증가와 함께 칼슘 석회화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 3

영정귀 함유성분인 실리비닌(silibinin)을 유효성분으로 포함한 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 4

청구항 3에서, 영정귀 함유성분인 실리비닌(silibinin)을 유효성분은 조골전구세포의 분화단계에서 염기성 인산 분해효소의 활성을 증가시키며, 제 I 형 콜라겐 분비 증가와 함께 칼슘 석회화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 5

청구항 3에서, 영정귀 함유성분인 실리비닌(silibinin)을 유효성분은 대식세포의 파골세포 분화단계에서 파골세포 생성을 억제시키고 TRAP의 활성을 감소시키며 골흡수에 관여하는 MMP-9의 분비를 억제시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 골형성을 도모하는 조골세포 분화를 촉진시키고 골흡수를 도모하는 파골세포의 분화를 억제시키는 영정귀의 함유성분인 실리마린(silymarin) 또는 실리비닌(silibinin)을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다. 보다 구체적으로, 실리마린 또는 실리비닌은 골형성에 관여하는 조골전구세포(마우스 섬유아세포인 MC3T3-E1)의 분화 초기단계에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키고, 제 I 형 콜라겐(type I collagen) 생성을 촉진시키며, 조골세포의 석회화를 증가시킨다. 또한 대식세포(마우스 대식세포인 RAW264.7)를 파골세포로 분화시키는 과정에서 실리비닌이 파골세포의 형성과정에서 촉진되는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)와 기질단백질 분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)-9 활성을 감소시킨다. 이로써 실리마린 또는 실리비닌은 부작용이 없으면서 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 증강시킬 수 있고 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002]

평균수명이 늘어남에 따라 65세 이상의 고령인구가 310만명을 돌파하여최근 우리나라는 고령화 사회에서 고령사회에 진입하였다. 이에 노인층에서 다발되는 골다공증 환자도 급격하게 증가하고 있는 추세이다. 골다공증 유병건수는 1998년에 인구 1000명당 3.87명에서 2002년에는 11.55명, 2007년에는 52.78명으로 약 5배 정도 증가하였다. 현대사회에서는 젊은 연령층과 남자들도 골다공증 증세를 보이는 골감소증이 나타나는 보고가 있어 점차 연령이 낮아지고 있다. 골다공증외에 퇴행성 관절염은 심한 통증과 장애를 일으키는 노인성 고관절 만성 전신성 염증성 질환이다. 퇴행성 골관절염은 보통 50세 이전에는 발병빈도가 낮으나 50세가 지나면 발병빈도가 급속히 증가하게 되어 고령화 사회에서 심각하다. 골다공증환자들은 골 조직의 내부구조가 취약해져서 골절을 야기하게 된다. 골다공증으로 인한 골절은 2007년 한 해 동안 10만 건 이상 보고되었다.

[0003]

골(bone)조직은 칼슘 등의 무기질, 콜라겐(collagen)과 비콜라겐 단백질을 함유한 유기질, 그리고 골세포로 구성되어 있으며 유기질은 제1형 콜라겐(type 1 collagen)이 90%, 오스테오칼신(osteocalcin) 및 기타

단백질이 나머지 10%를 차지하고 있다. 골은 형성(formation)과 흡수(resorption)가 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로 여러 가지 종류의 자극에 반응한다. 골조직은

[0004] 파골세포(osteoclast)에 의하여 생성된 단백분해효소나 이온 등에 의하여 골조직을 분해하는 흡수과정(resorption)를 통하여 침식공간이 만들어지면 결합조직으로부터 분화된 조골세포(osteoblast)가 골조직을 형성(formation)하여 공간을 채우는 골개조(bone remodeling)가 일어난다. 흡수과정은 7-10일 정도의 단시간 일어나지만 형성과정은 2-3개월이나 소요된다.

[0005] 이와 같이 골대사는 조골세포와 파골세포의 활성정도에 따라 오래된 뼈가 파괴, 흡수되거나 새로운 뼈가 형성되는데, 정상적인 경우 이들 세포의 상호작용에 의해 골개조가 일어난다. 하지만, 골형성과 골흡수간의 균형이 깨지면서 뼈의 골량이 감소하기 때문에 골다공증이 일어나게 된다. 이러한 골개조는 생성과 흡수가 균형을 이루다가 35-40세가 되면서 흡수에 비하여 생성된 골량이 지속적으로 적어지게 되고, 폐경기 여성인 경우 여성호르몬의 변화로 인해 급격히 감소하게 된다. 골다공증은 초기에 급격히 진행되는데 골흡수로 인해 골손실이 되지만, 골형성이 불충분하여 일어나기도 하므로 조골전구세포가 조골세포로 분화하는 능력에 의해서도 결정된다. 여성에서 뿐만 아니라 남성에서도 예외가 아니다. 술과 흡연, 운동부족으로 인한 남성들의 골손실로 인한 골절의 위험이 여성보다 더 높다. 골절로 인한 사망률이 남성이 여성보다 더 높다. 따라서 골손실을 억제하기 위해서는 조골세포에 의한 골형성을 촉진시키거나, 파골세포에 의한 골흡수를 억제시키는 것이 필요하다.

[0006] 최근 사회적으로 미적인 기준을 키가 큰 서구형 미적 기준에 맞추어져 모든 사람들이 큰 키를 원하고 있어서 상대적으로 평균 신장임에도 불구하고 괜한 자괴감을 가지고 있게 되는 경우가 많다. 이러한 사회 환경에서 작아 보이는 키를 키우기 위해 각종 운동이나 성장 촉진제를 복용하는 노력이 경주되고 있어 저신장증을 가진 환자의 고통이 크다. 저신장증 성장에는 유전적 요인과 환경적 요인이 중요하고 유전적 요인이 결정적이라고 할 수 있다. 성장이 느린 어린이의 성장을 위하여 성장 호르몬제 투여를 가장 많이 사용하고 기타 스테로이드제제나 여아일 경우 여성호르몬제를 병행해서 치료한다.

[0007] 골형성 부전증 (osteogenesis imperfecta)은 심각한 골격계 형성부전과 골절이 쉽게 일어나는 골격계 질환의 일종이다. 골형성 부전증의 제1유형은 30,000만명 당 1명의 빈도로 유병율을 나타내며, 증상이 심한 환자는 제1형 콜라겐(type I collagen)의 생성 감소나 콜라겐 유전자 돌연변이로 인하여 비정상적인 콜라겐 합성을 나타낸다. 골형성 부전증은 유전적인 질환이며 대부분의 경우 상동염색체 우성유전이지만 가족력이 없는 산발적 경우로 발생한다. 콜라겐은 인체 내 결합조직에서 중요한 단백질로서 골형성 부전증은 체내의 콜라겐 생성에 관여하는 유전자의 결손으로 인해 발병하여 골절이 쉽게 일어난다.

[0008] 조골세포는 골수내 간질세포(bone marrow stromal stem cell)로부터 유래되며 골기질을 합성하는 분화된 세포이다. 골형성은 세포내에서 뼈 형성 단백질(bone morphogenetic protein; BMP), Wnt, MAP(mitogen-activated protein) 키아나제 등의 다양한 신호전달 체계의 상호작용에 의해 조골세포에 의하여 촉진되고, 조골세포가 분화되면서 제1형 콜라겐(type I collagen), 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase), 오스테오칼신(osteocalcin), 오스테오네틴(osteonectin) 등의 단백질 발현이 증가한다. 따라서 이러한 물질들은 골개조 과정에서 생성되는 물질로서 골대사 표지자(biomarker)들이며 혈액이나 소변에서 측정할 수 있다. 골형성 표지자(bone formation marker)에는 염기성 인산분해효소, 오스테오칼신 및 procollagen I extension peptides 등이 있다.

[0009] 사람에 있어서는 적어도 4가지 종류의 염기성 인산분해효소가 존재하는데, 이들은 각각 태반염기성 인산분해효소(placental ALP), 태반유사 염기성 인산분해효소(placental-like ALP), 장 염기성 인산분해효소(intestinal ALP) 및 조직 비특이성 염기성 인산분해효소(tissue non-specific ALP)로 알려져 있다(Harris, H., Clin. Chim. Acta., 186. 133-150. 1990). 이중 비특이적으로 여러 조직에 분포되는 조직 비특이성 염기성 인산분해효소는 보통 간, 뼈, 그리고 신장에서 높게 발현된다. 이 효소의 활성화는 석회화하는 연골과 함께 빠르게 성장하는 골에 있어서 초기 석회화에 관여하는 칼슘 수송에 요구되며, 석회화를 위해 이용되는 칼슘은 염

기성 인산분해효소에 의해 조절된다는 보고가 있다(Halech, J., et al., Phil. Trans. Royal Soc. Lond., 302, 91-98, 1983). 조골세포는 콜라겐과 같은 결합섬유나 오스테오칼신 등의 골기질을 합성하고, 석회화는 인산과 칼슘을 농축하여 결정을 형성하게 되면서 일어난다(Fleish H., et al., AmJ Physiol., 200, 1296-1300, 1961).

[0010]

파골세포(osteoclast)는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로부터 유래되는 단핵세포들이 서로 융합되어 거대다핵세포로 골흡수에 관여한다. 파골세포의 분화에 있어 대식세포 콜로니 자극인자 (macrophage-colony stimulation factor, M-CSF)는 파골전구세포의 생존인자로 파골세포 분화를 유도한다. 파골전구세포가 M-CSF의 자극을 받게 되면 Akt, MAP 키나아제를 통해 cyclin D를 활성화시키고 세포 증식을 자극시키며, 이후 c-fos와 RNAK 수용체를 발현시킨다. 파골세포를 활성화 하는 가장 중요한 RANKL은 조골세포나 활성화된 면역세포에서 형성된다. RANKL은 파골세포 및 파골전구세포에 위치한 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진한다. 즉, 단핵세포의 전구체들이 융합하여 골흡수를 담당하는 다핵 파골세포로 분화할 수 있으며, 이러한 분화 과정은 RANKL이 RANK에 결합하여 MAP 키나아제의 활성을 조절하고, 이는 NF- κ B(nuclear factor kappa B) 전사인자가 핵내로 들어가서 파골세포 분화와 관련된 주석산염 저항성 산성 인산분해효소(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP), MMP-9, c-Src 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 등의 단백질 발현이 증가하게 된다. 산성 인산분해효소는 파골세포 외에도 전립선, 혈소판, 적혈구, 비장 등에 존재하는 리보솜 효소로 파골세포에서 유래된 포스파타제(phosphatase)는 L-tartrate에 의해서 억제되지 않으므로 TRAP라고 하며 파골세포와 전구세포를 인지할 수 있는 골흡수 표지자(bone resorption marker)로 사용되고 있다. 골흡수는 산성화에 의한 무기질의 용해와 효소에 의한 기질단백질의 용해과정으로 가수분해효소를 분비하여 골조직에 존재하는 무기질과 유기물을 용해시키고, 콜라겐 분해효소, 시스테인 단백 분해효소 등이 골흡수에 관여한다 (Boyle WJ. et al., Nature, 423, 337-342, 2003).

[0011]

[0012]

MMP는 세포외 기질을 분해하는 효소로서 현재까지 20여종 이상의 MMP가 발견되었다. MMP는 정상적인 생물학적 과정인 기관형성, 신경성장, 뼈형성, 혈관신생 및 세포사멸 뿐만 아니라 관절염, 피부 및 위궤양 등의 다양한 병적인 과정에 관여한다(Nagase H., et al., J Biol Chem., 274, 21491-21494, 1999). 이중 MMP-9는 gelatinase B 혹은 92 kDa gelatinase라고도 불리우며, 젤라틴(gelatin)과 콜라겐을 분해하는 능력을 가지고 있다. MMP-9는 파골전구세포와 파골세포의 이동에 관여하며 파골세포 분화를 유도하는 사이토카인(cytokine)의 활성화 과정에도 관여한다고 보고되었으며(Sato T et al., J Bone Miner Res, 13, 59-66, 1998), 골흡수 과정에도 중요한 역할을 담당한다 (Andersen TL., et al., Bone, 35, 1107-1119, 2004; Uchida M., et al., J Cellular physiology, 185, 207-214, 2000).

[0013]

[0014]

골다공증 치료에서 파골세포의 활성을 억제시켜 골흡수를 억제시켜주는 억제제와 조골세포의 활성을 증가시켜 주는 골형성 촉진제의 역할에 대한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 골다공증 치료제는 비스포스포네이트, 칼시토닌 등의 골흡수 억제제와 현재 유일하게 승인되어 쓰이는 골형성촉진제인 부갑상선호르몬(parathyroid hormone)이 시판되고 있다. 폐경 여성에서는 에스트로겐 투여가 골다공증 치료에는 효과적이나 유방암의 발생을 증가시키고 동맥경화성 질환을 증가시킨다는 보고가 있으며, 장기간의 투여가 필요한 골다공증 치료제들은 부작용을 일으킬 가능성이 높다.

[0015]

실리마린(silymarin)과 실리비닌(silibinin)은 엉겅퀴(milk thistle)에 함유되어 있는 성분으로 항산화 물질인 플라보노이드 계열의 성분으로 알려져 있다. 엉겅퀴는 국화과에 속하는 다년생 풀이며 전 세계에 약 250종이 있으며 우리나라에는 약 13종이 분포되어 있다. 한방에서는 지상부 또는 지하부를 대개라 하여 약용으로 사용해 왔다. 엉겅퀴는 순 잎, 줄기, 뿌리는 모두 식용으로 이용할 수 있으며, 특유의 향미가 있어 차로도 이용되어 지고 있는 식물이다. 엉겅퀴에는 생리활성이 뛰어난 apigenin, luteolin, myricetin, kaemferol, pectolinarin 등을 포함한 약 78종의 플라보노이드가 확인되었다. 엉겅퀴의 주요 성분인 실리마린은 플라보노리그난인 silibinin, silycristin, silydianin, isosilybin 이성체의 혼합물로서 엉겅퀴의 성숙한 열매의 주 구성 물질이다.

[0016]

옛날부터 엉겅퀴는 젖을 먹이는 어머니들이 젖이 잘 나오도록 하기 위해서 엉겅퀴차를 마시게 함으로써

잘 알려진 식물이다. 영어 이름인 밀크시슬(milk thistle)이 그러한 사실을 암시하고 있다. 실리마린은 간세포의 세포막 수용체에 결합하여 유해 물질의 세포내 침투 및 간세포내 물질의 유출을 방지하여 간보호작용을 하며, 손상된 간세포의 재생을 빠르게 한다고 알려져 있으며(Schumann J. et al., Hepatol., 39, 333-340, 2003), 실리마린은 알코올에 의해 유도된 간경화를 억제하는 효과를 가지고 있다는 보고가 있다(Lieber, CS., et al., J clin Gastroenterol., 4, 336-339, 2003). 현재 실리마린 소재로 한 간보호 건강기능성 식품이 시판되고 있다. 실리마린을 함유하는 동맥경화의 치료 및 예방용 조성물(출원번호 10-2003-0087616), 실리마린을 포함하는 자극성 접촉피부염 예방 및 치료용 약학적 조성물(출원번호 10-2007-0025618)에 관한 특허가 등록되어 있다.

[0017] 골다공증의 예방 및 치료제로 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져 있으나 골형성 촉진제의 발명은 아직 미미하며 또한 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이다. 또한, 실리마린과 실리비닌에 대한 연구는 대부분 간기능 보호에 관련된 발명이고, 염기성 인산분해효소의 활성을 증가와 함께 석회화를 촉진시켜 골다공증 치료를 위한 골형성을 촉진시킬 수 있는 골형성 촉진제로서의 용도에 대해서는 보고된 바 없다.

[0018] 본 발명자들은 엉겅퀴에 함유되어 있는 실리마린과 실리비닌 함유성분이 조골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키는 것은 물론이며, 제 I 형 콜라겐 분비 증가와 함께 석회화를 촉진시키는 활성을 확인하고, 대식세포의 파골세포 분화과정에서 골흡수에 관여하는 TRAP 활성의 억제와 MMP-9의 분비를 감소시킴으로서 실리마린 또는 실리비닌 함유성분이 골형성을 촉진시키고 골흡수를 억제시키는 골다공증 치료제로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 엉겅퀴의 함유성분인 실리마린 또는 실리비닌이 골형성 단계에서 조골세포의 분화를 촉진시키고 골흡수에 관여하는 파골세포의 분화를 억제시켜 골다공증과 같은 골질환의 치료와 예방을 위한 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엉겅퀴의 함유성분인 실리마린 또는 실리비닌에 노출된 조골전구세포의 조골세포로의 분화과정에서 염기성 인산분해효소의 활성이 증가하고, 제 I 형 콜라겐 분비와 석회화를 촉진시키며, 파골세포의 분화 단계에서 TRAP 활성과 골흡수에 관여하는 MMP-9 분비를 억제시켜 골다공증을 치료하고 예방할 수 있는 효능을 확인하였다.

발명의 효과

[0021] 본 발명으로 엉겅퀴의 함유성분인 실리마린 또는 실리비닌을 포함하는 조성물을 제공하여, 골형성을 촉진시키고 골흡수를 억제시켜 주는 효능으로 골다공증을 치료하고 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도1과 도2는 조골전구세포의 초기 분화단계에서 나타나는 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성에 대한 실리마린과 실리비닌의 촉진효과를 나타낸 결과이다. 그래프의 수치는 염기성 인산분해효소의 활성을 흡광도 측정 후 정량화 한 것이다.

도3과 도4는 분화과정에 있는 조골전구세포에서 제 I 형 콜라겐 분비(collagen type I)에 대한 실리마린과 실리비닌의 촉진효과를 나타낸 결과이다. 웨스턴블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도5와 도6은 조골세포의 분화과정에서 나타나는 석회화에 대한 실리마린과 실리비닌의 효능에 대한 결과이다. Alizarin Red S stain 결과이며, 이것을 광학현미경 촬영 후 흡광도를 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도7은 실리비닌이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하여 파골세포의 생성을 억제시키는 것을 나

타낸 결과이다. 그림은 파골세포의 생성정도를 TRAP 염색결과이다.

도8은 RAW264.7 대식세포의 파골세포로의 분화과정에서 TRAP의 활성화에 대한 실리비닌의 억제 효과를 나타낸 결과이다. 그래프는 파골세포의 TRAP 활성을 정량화 한 것이다.

도9는 RAW264.7 대식세포를 파골세포로 분화시킨 후 골흡수에 관여하는 MMP-9의 분비를 실리비닌이 억제하는 것을 나타낸 결과이다. 파골세포에서 MMP-9의 분비를 gelatin zymography로 측정한 결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화 한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 골형성을 도모하는 조골세포 분화를 촉진시키고 골흡수를 도모하는 대식세포에서 파골세포의 분화를 억제시켜 엉덩퀴의 함유성분인 실리마린(silymarin) 또는 실리비닌(silibinin)을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.

[0024] 보다 상세하게는 실리마린 또는 실리비닌은 골형성에 관여하는 조골전구세포(마우스 섬유아세포인 MC3T3-E1)의 분화 초기단계에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키고, 제 I 형 콜라겐(type I collagen) 생성을 촉진시키며, 조골세포의 석회화를 증가시킨다. 또한 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 생성을 억제하고, TRAP 활성을 억제하며 골흡수 단계에서의 MMP-9의 분비 억제시켜 골흡수를 억제시킨다. 이로서 실리마린 또는 실리비닌은 부작용이 없으면서 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 증강시키고 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 감소시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물을 제공한다.

[0025] 실리마린과 실리비닌은 하기 화학식 1과 같은 구조를 갖고 있고 통상적인 방법에 따라 제조하여 사용하거나 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0026]

[0027] 화학식 1

[0028]

[0029] 실리비닌(silibinin) ($C_{25}H_{22}O_{10}$, MW 482)

[0030] 상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~3%의 양으로 함유되는 것을 특징으로 한다.

[0031] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명의 엉덩퀴의 함유성분인 실리마린과 실리비닌이 조골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키고, 제 I 형 콜라겐 분비 증가 및 석회화를 촉진시킴으로서, 그리고 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키고 골흡수에 관여하는 MMP-9의 분비를 억제시킴으로서 골다공증으로 인한 골흡수 이후 골형성을 촉진시키는 활성을 나타내는 것이다.

[0033] 본 발명에 의한 조골세포의 분화 촉진용 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 구체적으로 음료, 분말, 농축, 캡슐 제형 또는 의약 제형일 수 있다. 실리마린 또는 실리비닌은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.001에서 5중량%의 범위로 사용된다. 이는 0.001중량% 미만에서는 그 효과를 기대할 수 없고, 5중량% 초과에서는 안전성, 또는 제형상의 제조에 어려움이 있기 때문이다. 유효한 효과와 안정성 및 제형 안정성을 고려하면 0.01~3.0 중량%가 바람직하다.

[0034] 본 발명에 다음의 실시 예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

- [0035] (실시 예1) 세포배양 실험
- [0036] (1-1) 마우스 조골전구세포(MC3T3-E1) 배양
- [0037] 마우스 조골전구세포(MC3T3-E1)는 10% fetal bovine serum (FBS)와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Minimum Essential Medium Alpha Medium (α -MEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 조골세포로 분화하기 위하여 10 mM glycerol-2-phosphate와 50 μ g/ml ascorbic acid을 첨가한 배지에서 실리마린과 실리비닌을 최대 15일간 각각 처리하였다.
- [0038] (1-2) 마우스 대식세포(RAW264.7) 배양
- [0039] 마우스 대식세포(RAW264.7)는 ATCC(USA)에서 구입하여 배양하였다. RAW264.7은 10% FBS와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 파골세포로 분화하기 위하여 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에서 실리비닌을 5일 동안 처리하였다.
- [0040] (실시 예2) 실리마린과 실리비닌에 의한 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활성 증가
- [0041] (2-1) 염기성 인산분해 효소 활성 측정
- [0042] 염기성 인산분해 효소 활성을 측정하기 위해 5.0×10^4 밀도의 조골전구세포에 실리마린 또는 실리비닌을 처리하였다. 배양 처리한 세포를 0.2% Triton X-100 으로 용해시켜 14,000 $\times$ g 에서 10분간 원심분리하였다. 96well plate에 세포 lysate를 분주하고 6 mM p-nitrophenyl phosphate 과 1 mM MgCl₂이 포함된 0.5 M Tris-HCl (pH 9.9) 용액을 넣고 37°C 에서 1시간 동안 배양하였다. 0.1 N NaOH를 첨가하여 반응을 중지시키고, p-nitrophenyl phosphate의 가수분해물은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질은 Lowry 정량방법으로 측정하였으며, 염기성 인산분해효소 활성은 nmol p-nitrophenol (PNP)/min/mg protein 으로 측정하였으며 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.
- [0043]
- [0044] 그 결과는 도 1과 2에 나타내었다.
- [0045] 도 1과 2에 나타낸 바와 같이 조골전구세포에서 염기성 인산분해효소 활성은 분화배지로 배양하여 분화시키는 동안에 증가되었고, 실리마린(도 1) 또는 실리비닌(도 2)을 처리한 조골전구세포에서는 더욱더 그 활성이 증가되는 것으로 나타났다.
- [0046] (실시 예3) 실리마린과 실리비닌에 의한 제 I 형 콜라겐 분비 증가
- [0047] (3-1) 웨스턴블롯
- [0048] 조골전구세포의 제 I 형 콜라겐의 생성 정도를 측정하기 위해 2.5×10^5 밀도의 MC3T3-E1 조골전구세포에 엉덩퀴 함유 성분인 실리마린과 실리비닌을 처리하였다. 제 I 형 콜라겐의 분비능을 측정하기 위하여 분화과정의 세포배양으로 수확한 세포배지를 준비하였다. 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 6% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% bovine serum albumin (BSA)에 3시간 동안 blocking하였다. 제 I 형 콜라겐 단백질의 일차항체(polyclonal rabbit anti-human antibody, Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoResearch Lab.)의 이차항체

로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 제 I 형 콜라겐 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0049]

그 결과는 도 3과 4에 나타내었다.

[0050]

MC3T3-E1 조골전구세포를 분화하는 과정에서 6일간 실리마린 또는 실리비닌을 함께 처리하면, 분화된 조골세포에서 제 I 형 콜라겐의 분비가 증가하고 실리마린(도 3) 또는 실리비닌(도 4)은 분화된 조골세포에서 더 많은 제 I 형 콜라겐이 분비시켰다.

[0051]

(실시 예4) 실리마린과 실리비닌에 의한 석회화 증가

[0052]

(4-1) Alizarin Red S 염색법

[0053]

조골세포에 의한 석회화 정도를 측정하기 위해 5×10^4 밀도의 MC3T3-E1 조골전구세포에 엉겅퀴 성분인 실리마린과 실리비닌을 처리하였다. 분화배지로 분화하는 과정에서 실리마린 또는 실리비닌으로 처리된 세포를 PBS로 2회 세척 후 4℃에서 70% ethanol로 1시간 동안 고정시켰다. 40 mM Alizarin Red S (pH 4.2, Sigma Co.) 용액으로 10 분간 염색하고, 증류수로 충분히 세척하여 calcium nodule 형성 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 염색정도를 정량하기 위하여 10% (W/V) cetylpyridinium chloride이 녹아있는 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액으로 녹여낸 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0054]

도 5와 6은 엉겅퀴 함유성분인 실리마린(도 5) 또는 실리비닌(도 6)은 분화된 MC3T3-E1 조골세포에서 calcium nodule 형성을 증가시켜 석회화를 촉진시켰다.

[0055]

(실시 예5) 엉겅퀴 함유 성분인 실리비닌의 파골세포 생성 억제

[0056]

(5-1) TRAP 염색법

[0057]

TRAP 염색을 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7 세포를 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에 실리비닌을 처리하였다. 배양이 끝난 Triton x-100 을 10초간 처리하였다. Triton x-100을 제거한 후 PBS로 세척한 후 Leukocyte Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma Co.)를 이용하여 37℃에서 30분간 염색시킨 후 TRAP 양성인 파골세포 형성을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0058]

[0059]

그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0060]

도 7에 나타난 바와 같이 RANKL로 대식세포를 분화시키는 과정에서 실리비닌을 처리하게 되면 파골세포의 생성이 억제되는 것으로 나타났다.

[0061]

(실시 예6) 실리비닌의 TRAP 활성 억제

[0062]

(6-1) TRAP 활성 측정

[0063]

파골세포의 TRAP 활성을 측정하기 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7에 RANKL과 함께 엉겅퀴 함유 성분인 실리비닌을 처리하였다. 배양이 끝난 파골세포를 PBS로 세척한 다음 4% formaldehyde 로 고정한 후 기질용액(5 mM 4-nitrophenyl phosphate disodium salt, 10 mM sodium tartrate dibasic dihydrate, 50 mM citrate

buffer (pH 4.6)) 100 μ l를 분주하여 37℃에서 30분 동안 배양 후 0.1 N NaOH 반응으로 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] 그 결과는 도 8에 나타내었다.

[0065] 5일간 배양된 RAW264.7세포에서 RANKL을 처리하여 분화시키면 함께 처리된 실리비닌에 의하여 증가된 TRAP 활성은 감소되었다.

[0066] (실시 예4) MMP-9

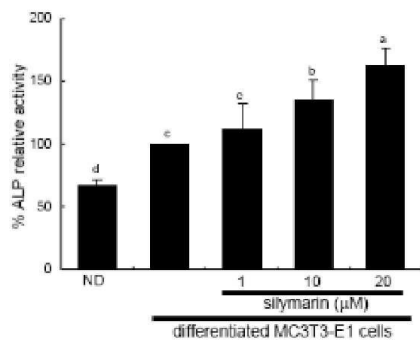
[0067] (4-1) gelatin zymography

[0068] 파골세포의 MMP-9의 활성을 측정하기 위해 1×10^4 밀도의 대식세포 RAW264.7에 RANKL와 함께 엉겅퀴 성분인 실리비닌을 처리하였다. 배양이 끝난 파골세포의 배지를 수집하였다. 0.1% gelatin이 첨가된 8% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 한 후, gel을 2.5% Triton X-100 넣고 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 이용해 세척해 주고 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂와 0.05% Brij-35이 포함된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액에서 20시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Coomassie brilliant Blue G-250, 2% acetic acid 와 45% methanol이 첨가된 용액으로 gel을 염색한 후 30% methanol과 10% acetic acid 용액에 넣어 destain 하였다.

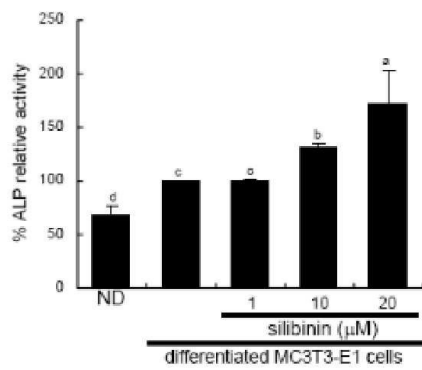
[0069] 도 9는 엉겅퀴 함유성분인 실리비닌이 대식세포 RAW264.7 세포가 파골세포로 분화하는 과정에 생성되는 골흡수성 MMP-9의 분비를 감소시켰다.

도면

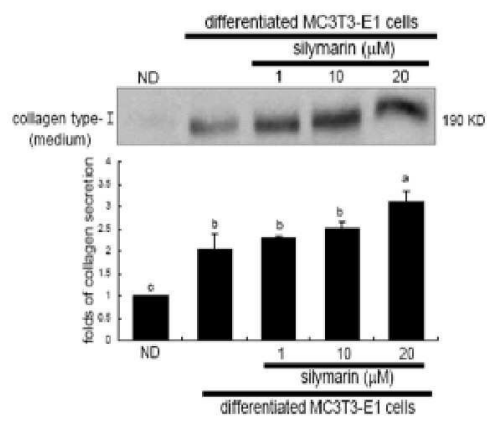
도면1



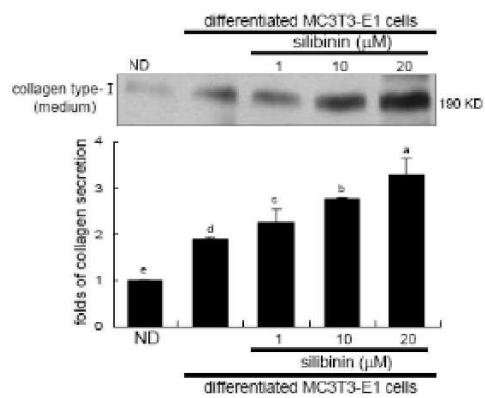
도면2



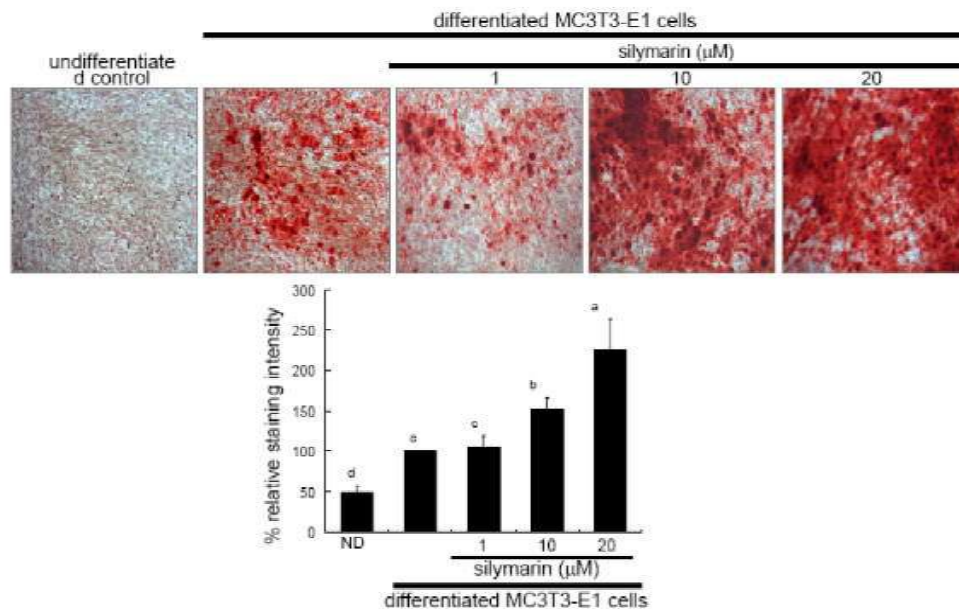
도면3



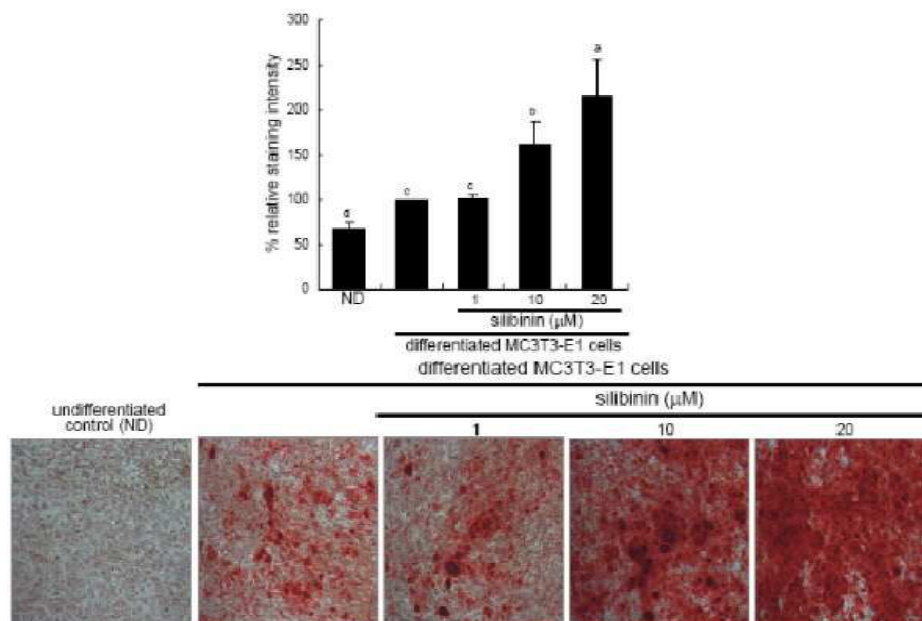
도면4



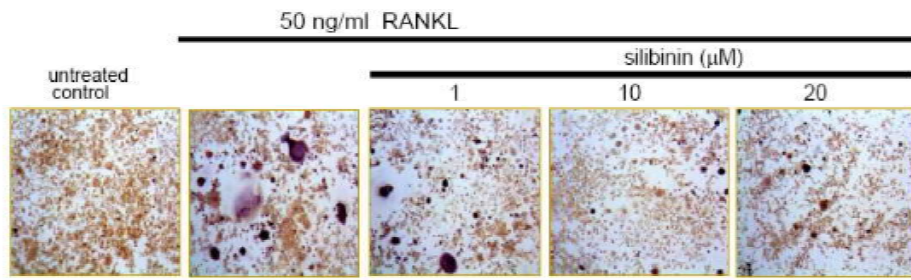
도면5



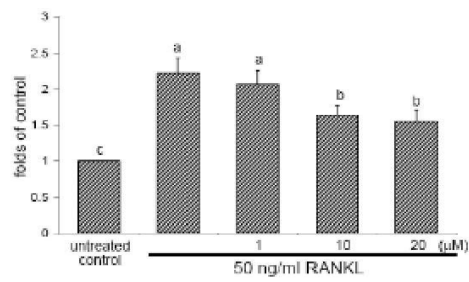
도면6



도면7



도면8



도면9

