



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0124242
(43) 공개일자 2017년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2016.08)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0053901
(22) 출원일자 2016년05월02일
심사청구일자 2016년05월02일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교
생명과학관 8513호
루시아
강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교
생명과학관 8512호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 4 항

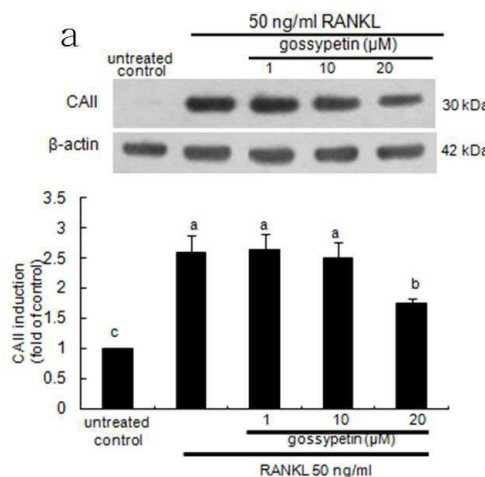
(54) 발명의 명칭 고시페틴을 함유하는 골다공증 개선용 식품 조성물 및 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 고시페틴을 함유하는 골다공증 개선용 식품 조성물 및 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 고시페틴(gossypetin)은 인체에 사용시 부작용이 없고, 파골세포와 뼈 사이의 산성화를 일으키는 탈수효소 II(CAII)와 염소(chloride) 이동에 관여하는 Ae2, ClC-7를 억제하며, 골 흡수 면적에 관여하는 LC3 II, Rab7의 발현 및 골 흡수에 관여하는 MMP-9 및 카텝신(Cathepsin) K의 발현을 억제하는 효과를 발휘한다.

또한, 이를 통해 고시페틴(gossypetin)은 파골세포의 골 흡수를 억제하고, 골다공증의 개선 및 치료 효과를 발휘한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2250/2116 (2013.01)

(72) 발명자

이은정

강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교 생
명과학관 8512호

김윤희

강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교 생
명과학관 8512호

명세서

청구범위

청구항 1

고시페틴(gossypetin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고시페틴은,

농도가 1~50 μM 인 것을 특징으로 하는 골다공증 개선용 식품 조성물.

청구항 3

고시페틴(gossypetin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 고시페틴은,

농도가 1~50 μM 인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고시페틴을 함유하는 골다공증 개선용 식품 조성물 및 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뼈(bone)는 형성과 흡수가 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로 다양한 종류의 자극에 반응한다. 이러한, 뼈의 대사는 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 활성 정도에 따라, 오래된 뼈를 파괴, 흡수하거나 새로운 뼈를 형성시킨다.

[0004] 조골세포(osteoblast)는 뼈를 생성하는 역할을 하고, 파골세포(osteoclast)는 뼈를 파괴하는 역할을 담당하게 된다. 조골세포는 조골전구세포로부터 분화되는데, 조골전구세포는 다양한 인자, 즉 뼈 형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein; BMP) 및 전환성장인자-베타(transforming growth factor- β ; TGF- β) 등에 의해서 조골세포로 분화된다. 분화된 조골세포는 단백질 및 비단백질 성분을 분비하고, 미네랄을 유도하여 뼈세포로 존재한다.

[0005] 한편, 조골세포는 파골세포의 분화에 필수적인 '대식세포 콜로니 자극인자(macrophage-colony stimulation factor, M-CSF)'와 'receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL)'을 생성한다. 이때 생성된 M-CSF와, RANKL는 하나의 핵을 가진 파골 전구세포를 자극하여, 연속적인 분화과정을 통해 거대 다핵세포인 파골세포로 분화한다. 분화된 파골세포는 뼈의 표면으로 단백질분해효소 등을 분비하여, 뼈 표면의 산성화를 유도함으로써 뼈의 구성성분인 단백질과 미네랄을 분해하고, 뼈를 파괴한다.

[0006] 조골세포와 파골세포의 대사가 정상적인 경우, 상호작용에 의해 골 개조(bone remodeling)가 일어난다. 하지만,

여성의 경우, 폐경 이후에 급격한 골 손실이 일어나게 되어 균형이 깨지기 쉽다. 또한, 노화로 인해 골 형성 기능이 퇴화됨에 따라 골손실이 지속되고, 골다공증이 일어나게 된다. 골다공증은 초기에 급격히 진행되는데, 골 흡수로 인한 골 손실이 발생할 수도 있고, 조골전구세포가 조골세포로 분화하지 못해 골형성이 불충분하여 발생하기도 한다.

- [0007] 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 “골강도의 약화로 골절의 위험성이 증가하게 되는 골격계질환”으로 정의하고 있다. 골강도는 골량과 골질에 의해 결정된다. 20대 중반 또는 30대 초반의 청장년 시기에 일생 중 최대 골량이 형성되고, 그 이후에는 연령 증가에 따라 골 손실이 진행된다. 30대에서 50대까지는 대체로 골량이 유지되며, 오래된 뼈를 제거하는 골흡수와 새로운 뼈를 형성하는 골형성의 항상성에 따라 유지된다.
- [0008] 골다공증의 예방 및 치료제로, 골 흡수 억제제의 발명은 활발히 이루어졌으나, 아직 그 효과가 미미한 실정이다. 폐경 여성에게는 에스트로겐 투여가 골다공증 치료에는 효과적이나, 유방암의 발생을 증가시키고, 동맥경화성 질환을 증가시킨다는 보고가 있다. 또한, 장기간의 투여를 필요로 하는 골다공증 치료제들은 부작용을 일으킬 가능성이 높다고 알려져 있다.
- [0009] 따라서, 최근에는 부작용이 없고, 인체에 무해한 천연물 또는 그로부터 유래한 성분을 함유하는 골다공증 개선제 또는 치료제를 개발하고자 하는 연구가 활발하다.
- [0010] 한편, 고시페틴(gossypetin)은 플라보노이드의 일종으로, 화학식 $C_{15}H_{10}O_8$, 분자량 318을 갖는다. 고시페틴은 짙은 황색 바늘 모양 결정으로 존재하며, 녹는점은 $311\sim 313^{\circ}\text{C}$ 이고, 에탄올, 메탄올에 잘 녹는 성질을 갖는다. 물에는 거의 녹지 않으며, 알칼리액에서 황색으로 침전하지만, 곧 녹색, 청색을 거쳐 암갈색으로 변한다. 진한 황산에는 등적색으로 녹고, 아세트산납에서는(에탄올 중) 암적색의 침전을 만드는 것이 특징이다.
- [0011] 그러나, 고시페틴(gossypetin)을 함유하는 골다공증 개선 및 치료를 위한 조성물에 대해서는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0814652호(등록 일자: 2008.03.12)에는, 하나 이상의 플라보놀 글리코시드를 함유하는 성분 A, 하나 이상의 테트라히드로염산 화합물을 함유하는 성분 B, 하나 이상의 칼슘 보충제를 함유하는 성분 C, 및 하나 이상의 마그네슘 보충제를 함유하는 성분 D를 함유하고, 골다공증 및/또는 염증성 관절 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 조성물에 관해 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0849253호(등록 일자: 2008.07.23)에는, 골쇄보(Rhizoma Drynariae) 추출물을 함유하는 골다공증 치료용 조성물 및 나린진(naringin)을 포함하는 조성물 및 그 조성물로 골다공증을 치료하는 방법에 관해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 파골세포와 뼈 사이의 산성화를 일으키는 과정을 억제하고, 골 흡수 면적에 관여하는 주름막 형성을 억제하는 성분을 함유함으로써, 골 흡수를 감소시켜 골다공증의 개선 및 예방 또는 치료를 위한 조성물을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고시페틴(gossypetin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 골다공증 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 고시페틴은 바람직하게 농도가 $1\sim 50\ \mu\text{M}$ 인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 $1\sim 20\ \mu\text{M}$ 인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 탈산탈수효소 II(CA II), Ae2, CIC-7, LC3 II,

Rab7, MMP-9 및 카텡신(Cathepsin) K의 발현을 억제할 수 있어, 골다공증의 개선에 현저히 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

[0018] 본 발명의 골다공증 개선용 식품 조성물은 일 예로, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 또한, 본 발명은 고시페틴(gossypetin)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 고시페틴은 바람직하게 농도가 1~50 μ M인 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 1~20 μ M인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 탈산탈수효소II(CAII), Ae2, CIC-7, LC3 II, Rab7, MMP-9 및 카텡신(Cathepsin) K의 발현을 억제할 수 있어, 골다공증의 예방 또는 치료에 현저히 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

[0022] 한편, 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 토크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때, 1일 0.00001 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 고시페틴(gossypetin)은 인체에 사용시 부작용이 없고, 파골세포와 뼈 사이의 산성화를 일으키는 탈산탈수효소II(CAII)에 관여하는 음이온 교환기(Ae2), 염소(chloride) 채널 CIC-7를 억제하며, 골 흡수 면적에 관여하는 LC3 II, Rab7의 발현 및 골 흡수에 관여하는 MMP-9 및 카텡신(Cathepsin) K의 발현을 억제하는 효과를 발휘한다. 이를 통해 고시페틴(gossypetin)은 파골세포의 골 흡수를 억제하고, 골다공증의 개선 및 치료 효과를 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1a는 탈산탈수효소II의 웨스턴블랏 결과이다. 도 1b는 음이온 교환기 Ae2 RT-PCR 결과이다. 도 1c는 음이온 교환기 Ae2의 웨스턴블랏 결과이다. 도 1d는 염화(chloride) 채널 CIC-7의 RT-PCR 결과이다.

도 2a는 고시페틴 처리된 파골세포의 리소좀 형성에 대한 형광현미경(Fluorescence microscopy) 촬영 결과이다. 도 2b는 LC3 I, LC3 II의 웨스턴블랏 결과이다. 도 2c는 Rab7의 웨스턴블랏 결과이다.

도 3a는 고시페틴 처리된 파골세포의 형광분석 결과이다. 도 3b는 MMP-9의 RT-PCR 결과이다. 도 3c는 자이모그래피(ymography)를 이용한 고시페틴의 MMP-9 분비 억제능 결과 (웨스턴 블랏)이다. 도 3d는 염화 채널 카텡신(Cathepsin) K의 RT-PCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실험예 1: 고시페틴의 파골세포 산성화 억제능 실험]

<실험예 1-1: 탈산탈수효소II의 웨스턴블랏>

본 실험예에서는 파골세포의 골 흡수를 돕고 산성화를 만드는 탈산탈수효소II(carbonic anhydrase II, CAII)의 역가를 측정하기 위해, 웨스턴블랏을 수행하고자 하였다.

마우스 대식세포(RAW264.7)를 ATCC(USA)에서 구입하여 1차 배양하였다. 1차 배양 후, RAW264.7을 10% FBS, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가되어 있는 'Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)' 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 2차 배양하였다.

이를 파골세포로 분화시키기 위하여, 50 ng/ml 농도의 RANKL(receptor activator of nuclear factor-kB ligand)을 처리하고, 1, 10, 20 μM 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 그 후, 웨스턴블랏은 10% SDS-PAGE로 수행하였다.

전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 스킴 밀크(Skim milk)에 3시간 동안 블로킹(blocking) 하였다. 탈산탈수효소II 단백질의 일차항체 Abcam(Cambridge, UK)을 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체로 1시간 반응시켰다.

반응 후, 니트로셀룰로소막(Nitrocellulose membrane)에 있는 탈산탈수효소II 단백질은 'Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)'로 검출하여 엑스-레이(X-ray) 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

<실험예 1-2: 음이온 교환기 Ae2의 RT-PCR>

본 실험예에서는 음이온 교환기 Ae2의 RT-PCR을 측정하고자 하였다.

파골세포로 분화시키기 위하여, 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μM 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 5일 동안 고시페틴을 처리한 파골세포에, 트리졸을 이용하여 mRNA 분리 후, 5 μg RNA와 200 unit 리버스 트랜스크립테이즈, 0.5 mg/ml Oligo-(dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

그 후, 5x PCR buffer를 포함하는 반응 마스터 믹스처(reaction master mixture) 25 μl, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 10 pmol 프라이머, 5 units Taq DNA 폴리머라아제(polymerase)와 cDNA를 이용하여 'My Cycler™ Thermal Cycler from Bio-Rad Laboratories (Berkeley, CA)' 기계를 통해 RT-PCR을 진행하였다. 이때, PCR 조건은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

	forward	reverse	크기
Ae2	5' -GAC AGC GAG AAG GGC TAA GA-3'	5' -GGA CTG GCG GTG GTA TTC AA-3'	255 bp
β-actin	5' - GAC TAC CTC ATG AAG ATC-3'	5' - GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'	500 bp

<실험예 1-3: 음이온 교환기 Ae2의 웨스턴 블랏>

- [0046] 본 실험예에서는 파골세포의 골 흡수를 돕고 산성화를 만드는 음이온 교환기 Ae2를 측정하기 위해, 웨스턴블랏을 수행하고자 하였다.
- [0047] 마우스 대식세포(RAW264.7)를 ATCC(USA)에서 구입하여 1차 배양하였다. 1차 배양 후, RAW264.7을 10% FBS, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가되어 있는 'Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)' 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 2차 배양하였다.
- [0048] 이를 파골세포로 분화시키기 위하여, 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μM 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 그 후, 웨스턴블랏은 10% SDS-PAGE로 수행하였다.
- [0049] 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)으로 전이시키고, 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 스킵 밀크(Skim milk)에 3시간 동안 블로킹(blocking)하였다. Ae2 단백질의 일차 항체 Novus Biologicals (Littleton, CO)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체로 1시간 반응시켰다.
- [0050] Ae2 단백질은 'Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)'로 검출하여 엑스-레이(X-ray) 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0052] <실험예 1-4: 염소(chloride) 채널 CIC-7의 RT-PCR>

- [0053] 본 실험예에서는 파골세포의 골 흡수를 돕고 산성화를 만드는 CIC-7을 측정하기 위해, RT-PCR을 수행하고자 하였다.
- [0054] 마우스 대식세포(RAW264.7)를 ATCC(USA)에서 구입하여 1차 배양하였다. 1차 배양 후, RAW264.7을 10% FBS와, 2 mM 글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가되어 있는 'Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)' 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 2차 배양하였다.
- [0055] 이를 파골세포로 분화시키기 위하여, 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μM 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 5일 동안 고시페틴을 처리한 파골세포에, 트리졸을 이용하여 mRNA 분리 후, 5 μg RNA와 200 unit 리버스 트랜스크립타제, 0.5 mg/ml Oligo-(dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, 5x PCR buffer를 포함하는 반응 마스터 믹스처(reaction master mixture) 25 μl, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 10 pmol 프라이머, 5 units Taq DNA 폴리머라아제(polymerase)와 cDNA를 이용하여 'My Cyclor™ Thermal Cyclor from Bio-Rad Laboratories (Berkeley, CA)' 기계를 통해 RT-PCR을 진행하였다. 이때, PCR 조건은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	forward	reverse	크기
CIC-7	5' -CGA GAT CGC GAT GAG GA-3'	5' -TCA CCC CAT TGA GGA AGC AC-3'	607 bp
GAPDH	5' -AAC TTT GGC ATT GTG GAA GGG-3'	5' - GAC ACA TTG GGG GTA GGA ACA C-3'	224 bp

[0058] <실험예 1-5: 실험 결과>

- [0059] 실험결과, 탈산탈수효소II, Ae2, CIC-7 모두 고시페틴 농도에 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다 (도 1). 도 1a는 탈산탈수효소II의 웨스턴블랏 결과이다. 도 1b는 음이온 교환기 Ae2 RT-PCR 결과이다. 도 1c는 음이온 교환기 Ae2의 웨스턴블랏 결과이다. 도 1d는 염소(chloride) 채널 CIC-7의 RT-PCR 결과이다.
- [0060] 이러한 결과를 통해, 고시페틴은 파골세포와 뼈 사이의 산성화 과정 억제에 효과적인 것을 확인할 수 있었다.

[0062] [실험예 2: 고시페틴의 리소좀과 주름막 융합 과정 억제능 실험]

[0063] <실험예 2-1: 고시페틴 처리 후, 리소좀 염색>

- [0064] 본 실험예에서는 고시페틴의 리소좀 및 주름막 형성 억제 효능을 관찰하고자 하였다.
- [0065] 5일 동안 이틀에 한번씩 배지를 갈아주며, 파골전구세포(Raw 264.7)에 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 파골세포에, 4% 포름알데하이드를 20분 동안 처리하여 고정한 후, 'Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Life Technologies)'과 'LysoTracker® Red DND-99 (Life Technologies)'를 이용하여 염색을 진행하였으며, 형광현미경(Fluorescence microscopy)을 이용하여 촬영하였다.
- [0067] <실험예 2-2: LC3 I, LC3 II의 웨스턴 블랏>
- [0068] 본 실험예에서는 리소좀 형성 과정을 측정하기 위해, LC3 I, LC3 II의 웨스턴블랏을 수행하고자 하였다.
- [0069] 5일 동안 이틀에 한번씩 배지를 갈아주며, 파골전구세포(Raw 264.7)에 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 그 후, 웨스턴블랏은 10% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)으로 전이시키고, 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 스킴 밀크(Skim milk)에 3시간 동안 블록킹(blocking)하였다.
- [0070] 그 후, LC3 I, LC3II 단백질의 일차항체(Novus Biologicals (Littleton,CO)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체로 1시간 반응시켰다.
- [0071] LC3 I, LC3II 단백질은 'Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)'로 검출하여 엑스-레이(X-ray) 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.
- [0073] <실험예 2-3: Rab7 의 웨스턴 블랏>
- [0074] 본 실험예에서는 리소좀과 주름막의 융합 과정 중 발현되는 Rab7 단백질을 측정하기 위해, Rab7의 웨스턴블랏을 수행하고자 하였다.
- [0075] 파골전구세포(raw 264.7)에 50 ng/ml 농도의 RANKL과, 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 5일 동안 처리하였다. 그 후, 웨스턴블랏은 10% SDS-PAGE로 수행하였다.
- [0076] 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 니트로셀룰로소막(nitrocellulose membrane)으로 전이시키고, 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여, 5% 스킴 밀크(Skim milk)에 3시간 동안 블록킹(blocking)하였다.
- [0077] 그 후, Rab7 단백질의 일차항체(Novus Biologicals (Littleton,CO)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체로 1시간 반응시켰다. Rab7 단백질은 'Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)'로 검출하여 엑스-레이(X-ray) 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.
- [0079] <실험예 2-4: 실험 결과>
- [0080] 실험결과, 자가소화작용(autophagy) 형성시, LC3 I 단백질은 LC3 II로 변환되어 자가용해장치(autolysosome)와 결합하여 활성화되는데, LC3 II는 고시페틴 농도의존적으로 활성화를 감소시키는 것으로 나타났다. 또한, 고시페틴은 농도 의존적으로 Rab7도 억제하는 것으로 나타났다 (도 2). 도 2a는 고시페틴 처리된 파골세포의 형광현미경(Fluorescence microscopy) 촬영 결과이다. 도 2b는 LC3 I, LC3 II의 웨스턴블랏 결과이다. 도 2c는 Rab7의 웨스턴블랏 결과이다.
- [0081] 이러한 결과를 통해, 고시페틴은 파골세포 내 리소좀 형성과 주름막 형성 억제에 효과적인 것으로 확인할 수 있었다.
- [0083] [실험예 3: 고시페틴의 골 흡수 억제능 실험]
- [0084] <실험예 3-1: 'Resorption kit'를 이용한 고시페틴의 골 흡수 억제능 확인>
- [0085] 본 실험예에서는 파골세포의 골 흡수를 확인하기 위해, 'Resorption kit'를 사용하고자 하였다.

[0086] 칼슘과 인이 코팅된 플레이트에 형광 물질을 코팅하고 5일 동안 분화한 파골세포에 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴을 각각 처리하여 칼슘과 인 분해 정도를 확인하였으며, 배지를 건어서 485~535 nm 형광분석기를 통해 'resorption activity'를 확인하였다.

[0088] <실험예 3-2: 고시페틴에 의한 MMP-9의 RT-PCR>

[0089] 본 실험예에서는 고시페틴에 의한 MMP-9의 RT-PCR을 측정하고자 하였다.

[0090] 파골세포로 분화시키기 위하여, 50 ng/ml 농도의 RANKL을 처리하고, 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴(gossypetin)을 각각 처리하였다. 5일 동안 고시페틴을 처리한 파골세포에, 트리졸을 이용하여 mRNA 분리 후, 5 μ g RNA와 200 unit 리버스 트랜스크립테이즈, 0.5 mg/ml Oligo-(dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[0091] 그 후, 5x PCR buffer를 포함하는 반응 마스터 믹스처(reaction master mixture) 25 μ l, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10 pmol 프라이머, 5 units Taq DNA 폴리머라아제(polymerase)와 cDNA를 이용하여 'My Cyclor™ Thermal Cyclor from Bio-Rad Laboratories (Berkeley,CA)' 기계를 통해 RT-PCR을 진행하였다. 이때, PCR 조건은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	forward	reverse	크기
MMP-9	5' -AGC CGA CTT TTG TGG TCT TCC-3'	5' -TCG TCG TCG AAA TGG GCA TC-3'	547 bp
GAPDH	5-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GGG-3	5'- GAC ACA TTG GGG GTA GGA ACA C-3'	224 bp

[0094] <실험예 3-3: 자이모그래피(zymography)를 이용한 고시페틴의 MMP-9 분비 억제능 확인>

[0095] 본 실험예에서는 골 흡수를 위해 뼈의 콜라겐을 분해하는 MMP-9 분비를 확인하고자 하였다.

[0096] 4일 동안 분화시킨 파골세포에, FBS가 첨가되지 않은 배지를 첨가하고, 1, 10, 20 μ M 농도의 고시페틴(gossypetin)을 1일 동안 각각 처리하였다. 그 후, 배지를 모아서 0.1% 젤라틴(gelatin)이 포함되어 있는 겔(gel)을 전기영동 한 후, 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 2.5% Triton X-100로 1시간 인큐베이션하고, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 세척하였다.

[0097] 세척 후, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 10 mM $CaCl_2$, 0.05% Brij-35, 200 mM NaCl 버퍼에 16시간 인큐베이션하였다. 이후, 0.1% 쿠마시 브릴리언트블루(Coomassie brilliant blue) R-250, 10% 아세트산(acetic acid), 45% 메탄올(methanol)이 포함된 버퍼로 염색한 후, 0.7% 아세트산(acetic acid), 40% 메탄올(methanol)로 디스테인(destain)을 진행한 후, 확인하였다.

[0099] <실험예 3-4: 파골세포 내 카텡신(Cathepsin) K의 RT-PCR>

[0100] 본 실험예에서는 파골세포에만 특징적으로 다량 발현되는 단백분해효소로서, 제1형 콜라겐과 같은 기질 단백을 분해하는 카텡신 K를 측정하기 위해 RT-PCR을 진행하고자 하였다.

[0101] 5일 동안 이틀에 한번씩 배지를 갈아주며, 한번 처리시 1, 10, 20 μ M 농도로 고시페틴(gossypetin)을 처리하였다. RANKL은 배지를 갈아줄 때 50 ng/ml 처리하였다. 각각 처리한 파골세포에 트리졸을 이용하여 mRNA 분리 후, 5 μ g RNA와 200 unit 리버스 트랜스크립테이즈, 0.5 mg/ml Oligo-(dT)를 이용하여 cDNA 합성하였다.

[0102] 그 후, 5x PCR buffer를 포함하는 반응 마스터 믹스처(reaction master mixture) 25 μ l, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 10 pmol 프라이머, 5 units Taq DNA 폴리머라아제(polymerase)와, cDNA를 이용하여 'My Cyclor™ Thermal Cyclor from Bio-Rad Laboratories (Berkeley,CA)' 기계를 통해 RT-PCR를 진행하였다. 이때, PCR 조건은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

	forward	reverse	크기
Cathepsin K	5' -AGG CGG CTA TAT GAC CAC TG-3'	5' -CCG AGC CAA GAG AGC ATA TC-3	407 bp
GAPDH	5' -AAC TTT GGC ATT GTG GAA GGG-3	5' - GAC ACA TTG GGG GTA GGA ACA C-3' '	224 bp

<실험예 3-5: 실험 결과>

실험 결과, 고시페틴 농도에 의존적으로 골 흡수 정도가 감소하는 것을 형광 분석기를 통해 확인할 수 있었다. 또한, 골 흡수 관련 효소인 MMP-9과, 카텡신(Cathepsin) K도 고시페틴 농도에 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다 (도 3). 도 3a는 고시페틴 처리된 파골세포의 형광분석 결과이다. 도 3b는 MMP-9의 RT-PCR 결과이다. 도 3c는 자이모그래피(ymography)를 이용한 고시페틴의 MMP-9 분비 억제능 결과 (웨스턴 블랏)이다. 도 3d는 염화 채널 카텡신(Cathepsin) K의 RT-PCR 결과이다.

이러한 결과를 통해, 고시페틴은 골 흡수를 억제하여, 골다공증 개선 및 치료에 효과적인 것을 확인할 수 있었다.

[실시에 1: 골다공증 개선용 식품 조성물 제조]

본 실시예에서는 하기와 같이 골다공증 개선용 식품 조성물을 제조하였다.

(1) 선식 제조

현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 검정콩, 검정깨 및 들깨 각각을 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 후 배전 및 분쇄하여 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 이후, 현미 30 중량%, 율무 15 중량%, 보리 20 중량%, 찹쌀 9 중량%, 들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%, 고시페틴 3 중량%, 영지 0.5 중량% 및 지황 0.5 중량%을 혼합하여 선식을 제조하였다.

(2) 츄잉껌 제조

껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량%, 물 2 중량% 및 고시페틴 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

(3) 캔디 제조

설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량%, 향료 0.1 중량% 및 고시페틴 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

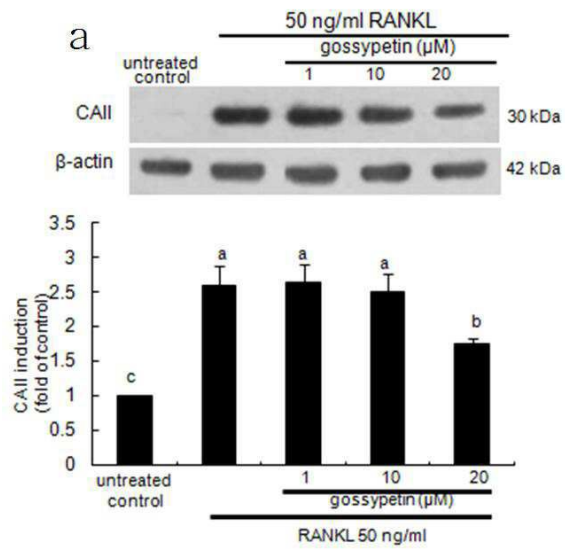
(4) 비스킷 제조

박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 암모니움 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B0.0001 중량%, 비타민 B0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제일인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 고시페틴 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

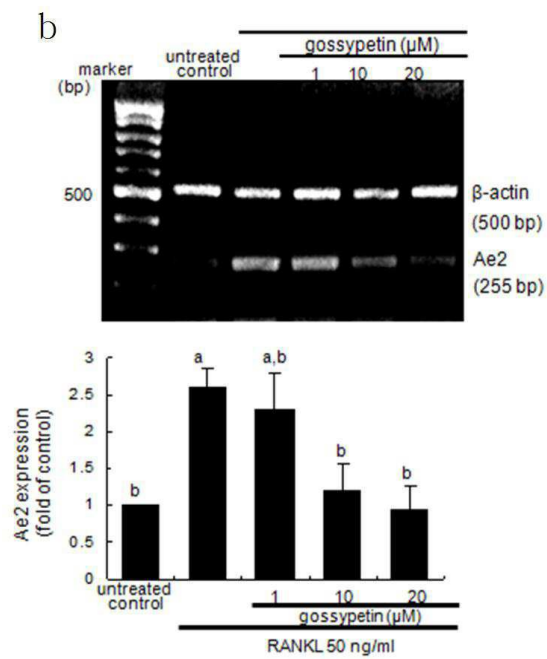
- [0124] (5) 건강음료 제조
- [0125] 꿀 0.26 중량%, 치옥토산아미드 0.0002 중량%, 니코틴산아미드 0.0004 중량%, 엽산리보플라빈나트륨 0.0001 중량%, 엽산피리독신 0.0001 중량%, 이노시톨 0.001 중량%, 오르트산 0.002 중량%, 물 98.7362 중량% 및 고시페틴 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.
- [0127] (6) 소시지 제조
- [0128] 돈육 65.18 중량%, 계육 25 중량%, 전분 3.5 중량%, 대두단백 1.7 중량%, 식염 1.62 중량%, 포도당 0.5 중량% 및 글리세린 1.5 중량%와 고시페틴 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 소시지를 제조하였다.
- [0130] (7) 건강보조식품 제조
- [0131] 스피루리나 55 중량%, 구아검효소 분해물 10 중량%, 비타민 B엽산염 0.01중량%, 비타민 B6 엽산염 0.01 중량%, DL-메티오닌 0.23 중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7 중량%, 유당 22.2 중량% 및 옥수수전분 1.85 중량%와 고시페틴 10 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.
- [0133] **[실시예 2: 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물 제조]**
- [0134] 본 실시예에서는 하기와 같이 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제조하였다.
- [0136] (1) 산제 제조
- [0137] 고시페틴 1 g에 유당 2 g을 혼합하고, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0139] (2) 정제 제조
- [0140] 고시페틴 100 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 통상의 정제 제조 방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0142] (3) 캡슐제 제조
- [0143] 고시페틴 100 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0145] (4) 주사제 제조
- [0146] 고시페틴 100 mg에 주사용 증류수 적량을 가하여 용해시키고, pH를 약 7.5로 조절한 다음 2 ml 용량의 앰플에 충전 및 멸균시켜 주사제를 제조하였다.

도면

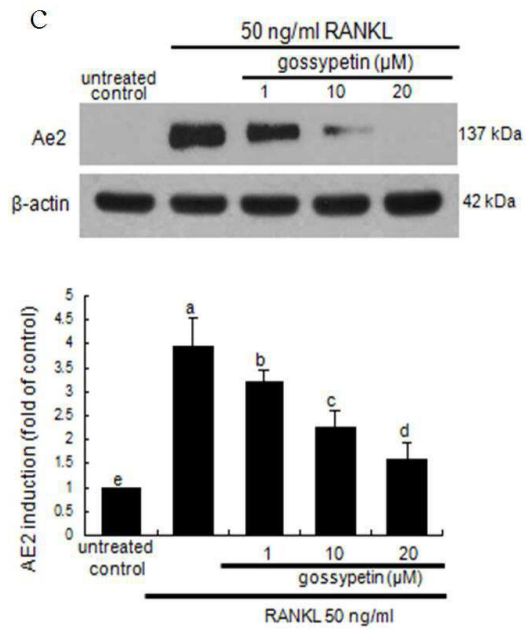
도면1a



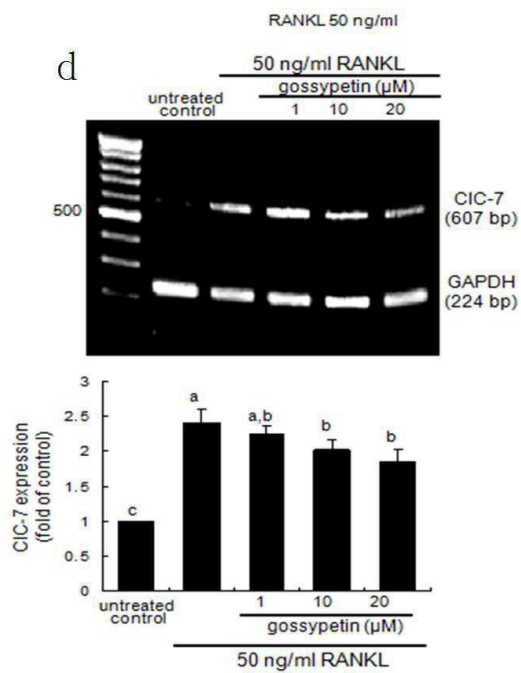
도면1b



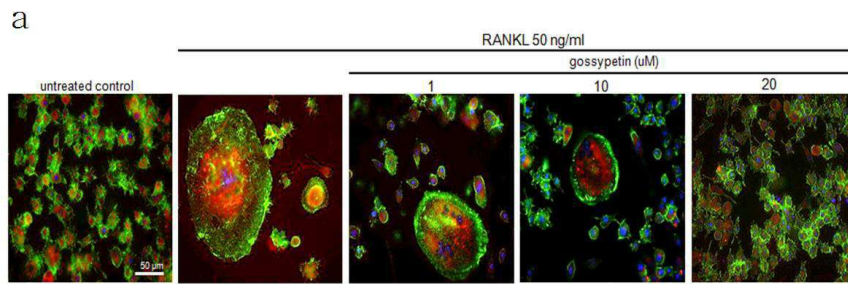
도면1c



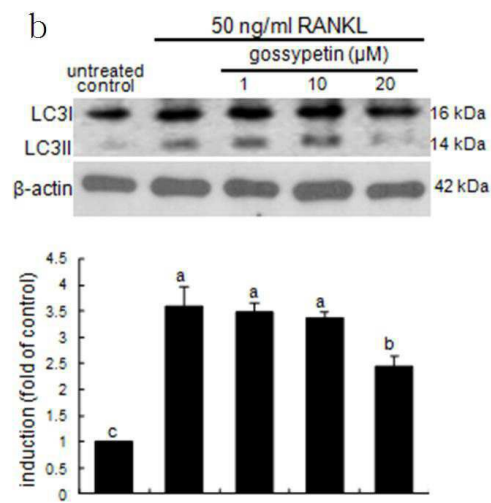
도면1d



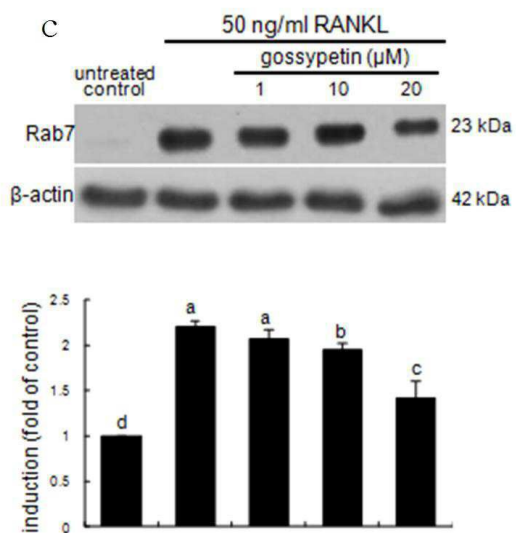
도면2a



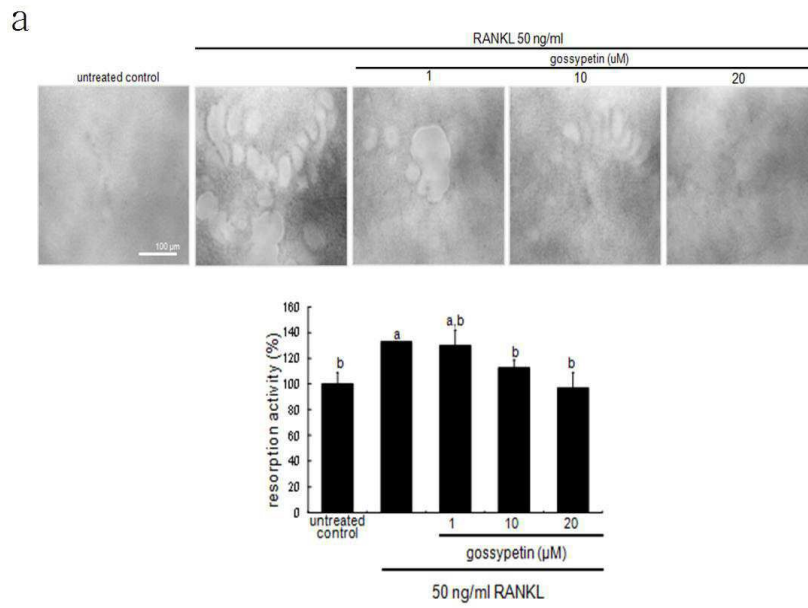
도면2b



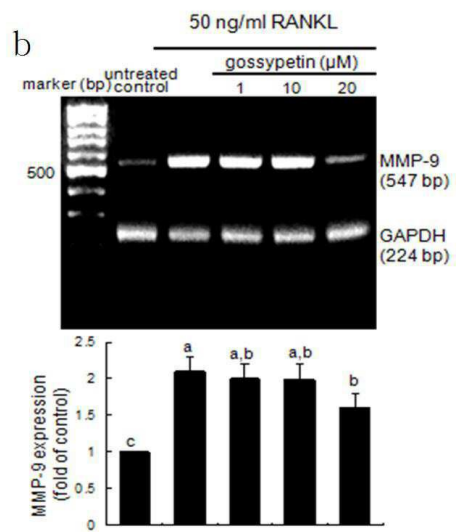
도면2c



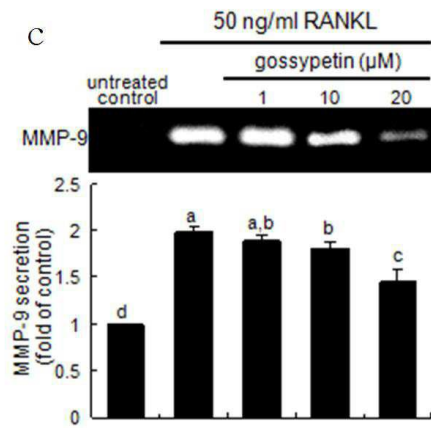
도면3a



도면3b



도면3c



도면3d

