

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0070778
(43) 공개일자 2020년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/815 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/815 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0158290
(22) 출원일자 2018년12월10일
심사청구일자 2018년12월10일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정혁상
서울특별시 성동구 고산자로 160, 108동 701호(응봉동, 대림 강변 타운)
손영주
서울특별시 강남구 역삼로 315-1, 501동 1601호(역삼동, 개나리SK뷰)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

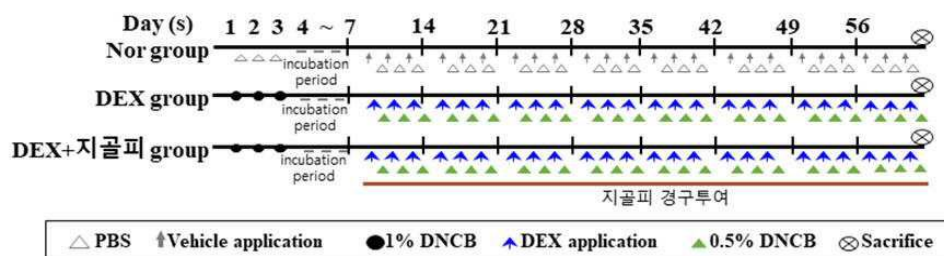
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 지골피의 스테로이드 부작용 개선 효과

(57) 요약

본 발명은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물에 관한 것으로서, 상기 추출물을 스테로이드 약물과 병용하여 경구 투여한 경우 스테로이드 약물로 인한 부작용인 골다공증이 개선 또는 억제되는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

A61P 19/10 (2018.01)

(72) 발명자

이비나

서울특별시 마포구 서강대길 11-6(신수동)

김은영

경기도 성남시 중원구 은이로24번길 4(은행동, 성진빌라)

김재현

서울특별시 성북구 솔샘로25길 28, 111동 1004호(정릉동, 정릉풍림아이원아파트)

홍수연

서울특별시 광진구 자양로5길 45, 선양하이츠빌라동 502호(자양동, 선양하이츠빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1B03028505

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업/이공학개인지초연구지원사업/기본연구

연구과제명 스테로이드 병용 · 대체 한약물 개발 연구: 골질환 타깃 상승효과 및 부작용 제어 기술

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합물에 의해 추출된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유기 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 스테로이드 약물로 인한 부작용은 골다공증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 스테로이드 약물은 코르티솔, 히드로코르틴, 코르티손, 텍사메타손, 파라메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 하이드로코티솔, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드, 헥세스트롤, 메티마졸, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오로메톨론, 베클로메타손 디프로피오네이트, 에스트리올, 디플로라손 디아세테이트, 디플루코르톨론 발레레이트 및 디플루프레드네이트에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 10 내지 200 mg/kg의 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 스테로이드 약물과 병용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 추출물은 10 내지 200 mg/kg의 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

스테로이드 약물 및 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 스테로이드 약물은 코르티솔, 히드로코르틴, 코르티손, 텍사메타손, 파라메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 하이드로코티솔, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드, 헥세스트롤, 메티마졸, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오로메톨론, 베클로메타손 디프로피오네이트, 에스트리올, 디플로라손 디아세테이트, 디플루코르톨론 발레레이트 및 디플루프레드네이트에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 추출물은 10 내지 200 mg/kg의 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스테로이드 제제는 치료가 까다로운 염증 질환에 우수한 효과를 보여 광범위하게 처방되고 있다. 그러나, 스테로이드는 내성 발생에 의한 심각한 부작용이 우려되는 약물 중 하나이다. 대표적인 스테로이드 제제인 텍사메타손, 프레드니솔론, 하이드로코티솔의 경우 골다공증, 백내장, 고혈압 등 급성 부작용을 일으킬 수 있다는 보고가 계속되고 있고, 이러한 이유로 하루 3회 이상 사용을 금하고 있다. 최근 스테로이드 부작용에 대한 위험성이 알려지면서 스테로이드 사용량을 줄여야 한다는 우려의 목소리가 높아지고 있지만, 국내 의원과 병원을 비롯한 상급 종합병원에서의 부신 호르몬인 스테로이드제의 처방률은 오히려 증가하고 있는 추세이다.

[0003] 현재 사용되고 있는 대표적인 스테로이드 대체약물로는 비스테로이드성 약물 (Non Steroidal anti inflammatory drugs, NSAIDs)인 aspirin, ibuprofen, meloxicam, nimesulide, etololac, celecoxib (셀레브렉스), rofecoxib (Vioxx), etoricoxib, valdecoxib (벡스트라) 등이 있다. 이 약물들은 염증을 일으키는 prostaglandin을 합성하는 cyclooxygenase라는 물질을 감소시키는 작용을 하며, 스테로이드성 약물과 함께 널리 사용되고 있다. 하지만, 스테로이드성 약물에 비해서 효과가 강력하지 않으며, 장기간 사용 시 위궤양, 천식 증상 악화, 신장문제 등의 또 다른 부작용을 초래하기도 한다. 면역 수정 요법, 사이토카인 면역요법, 인터페론감마주사, 고용량 자외선치료 등이 개발되었지만 작용기전과 효과 및 부작용 여부 또한 확실하지 않다.

[0004] 따라서, 스테로이드 제제의 효과를 유지하면서 이의 부작용을 줄일 수 있는 물질의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1477480호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 스테로이드 약물 및 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합물에 의해 추출된 것일 수 있고, 상기 유기 용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 스테로이드 약물로 인한 부작용은 골다공증인 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 스테로이드 약물은 코르티솔, 히드로코르틴, 코르티손, 텍사메타손, 파라메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 하이드로코르티솔, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드, 헥세스트롤, 메티마졸, 플루오시노니드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오로메톨론, 베클로메타손 디프로피오네이트, 에스트리올, 디플로라손 디아세테이트, 디플루코르톨론 발레레이트 및 디플루프레드네이트에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 텍사메타손인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 10 내지 200 mg/kg의 농도로 처리되는 것일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 100 mg/kg의 농도로 처리되는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 스테로이드 약물과 병용되는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 경구 투여되는 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 스테로이드 약물 및 지골피 추출물을 유효성분으로 포함하는 스테로이드 약물로 인한 부작용의 개선 또는 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 지골피 추출물은 스테로이드 약물과 병용하여 투여한 경우 스테로이드 약물로 인한 부작용인 골다공증이 개선 또는 억제되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 각 실험군에 따른 DNCB 감작, 텍사메타손(Dexamethasone) 도포 및 지골피 경구 투여에 대한 실험 스케줄을 나타낸 것이다.

도 2는 각 실험군에 따른 대퇴골의 골밀도 (bone mineral density) 및 미세구조(Trabecular separation, Trabecular number, Trabecular pattern factor, Trabecular structure model index 및 Trabecular

volume/Total volume)를 분석한 결과이다

도 3은 각 실험군에 따른 몸무게 및 장기(liver, spleen, thymus, testis 및 kidney)의 무게를 측정된 결과이다.

도 4는 각 실험군에 따른 칼슘(calcium), DKK1 (Dickkopf-1), SOST (sclerostin), IL-6 (interleukin-6), OPG (osteoprotegerin) 및 FGF (fibroblast growth factors)의 혈액 내 골 관련 지표를 분석한 결과이다.

도 5는 각 실험군에 따른 피부조직에서의 비만세포의 수를 분석한 결과이다.

도 6은 각 실험군에 따른 피부각질세포(HaCaT)에서 GM-CSF 및 ICAM의 발현량을 분석한 결과이다.

도 7은 각 실험군에 따른 p-GR (phospho-glucocorticoid receptor, ser211)의 발현력을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에서 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 지골피(Lycii Radicis Cortex)로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 지골피의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.
- [0023] 상기 지골피로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 70% 에탄올을 사용할 수 있다.
- [0024] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 지골피 추출물의 제조 방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- [0025] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 지골피 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.
- [0026] 따라서, 본 발명에 있어서 지골피 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획물 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따른 지골피 추출물을 제조하는 방법을 조금 더 구체적으로 살펴보면 다음과 같다. 지골피 추출물은 2 시간 동안 열수 추출되었다. 여과지를 이용해서 여과된 지골피 열수 추출물은 동결건조 되었다. 동결건조한 지골피를 분말화한 뒤, 정제수에 녹여서 사용하였다.
- [0028] 본 발명에서 스테로이드 약물로 인한 부작용은 스테로이드 치료 또는 개체 내의 스테로이드 양의 증가에 의하여 야기되는 것일 수 있다. 스테로이드 치료란 개체의 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위하여 개체에 스테로이드 약물을 투여 하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 스테로이드 치료의 부작용으로서는, 감염증의 악화, 유발이나 증상을 은폐, 면역력 저하; 부신피질 기능 부전; 당뇨병의 유발, 악화, 혈당 상승 등의 내당능 이상; 소화관 궤양, 소화관 출혈, 위장 천공, 출혈성 궤양; 경련, 두개 내압 항진; 정신 변조, 우울 상태; 골다공증, 특히 척추골의 압박 골절 등의 골 대사 저하; 골두 무균성 괴사 예를 들면, 대퇴골, 상완골 골절; 근육병증 예를 들면, 근육 위축을 동반하는 근력 저하, 특히 근위근의 근 중량 저하·근력 저하, 근력 기능 저하, 체중 감소; 녹내장, 안압 항진, 후방 백내장; 혈전 예를 들면, 혈액 응고 항진; 심근경색으로 심파열; 천식 발작 증악; 주사에 의한 아나필락시스; 만월양 안모, 물소혹(buffalohump); 광선 작용에 의해 혈압 상승; 나트륨-수분 저류 예를 들면, 부종, 체중 증가, 저칼륨성 알칼로시스; 소아에게 발육 장애; 월경 이상; 정자 운동, 수의 감소; 좌창, 다모, 탈모, 색소 침착; 피부 비박화, 취

약화, 피하 출혈, 선조 자반, 안면 홍반, 지방, 직염; 창상 치유 장애; 과민 증상 (예를 들면, 발진) 소양감, 딸국질; 다행증, 불면, 두통, 현기증; 발한 이상, 다뇨, 백혈구 증가; 지방간, 질소부평형; GOT, GPT, ALP 상승; 고지혈증, 고콜레스테롤 혈증, 스테로이드 신증; 악심, 구토, 위통, 가슴통증, 복부팽만감, 구갈, 설사, 식욕 항진; 중심성 장액성 맥락 망막병증에 의한 망막 장애, 안구 돌출; 근육통, 관절통, 발열, 피로감; 근육, 피내, 피하 주사로 국소 조직의 위축, 함몰, 체중 감소; 정맥 주사시에 혈전, 정맥염, 동통, 종창, 압통 증악; 이탈 증후군; 전신 증상: 발열, 두통, 역피로감, 전신 권태감, 탈력감, 쇼크/소화기: 식욕 부진, 식욕 저하, 악심 구토, 설사/신경계: 두통, 불안 증상, 흥분/경련, 의식장애, 근육통, 관절통 등을 들 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형을 갖는 것일 수 있다. 경구 투여 제형은 과립제, 산제, 액제, 정제, 캡셀제, 건조시럽제, 또는 그 조합일 수 있고, 비경구 투여 제형은 주사제 또는 피부외용제일 수 있다. 피부외용제는 크림, 젤, 연고, 피부 유화제, 피부 현탁액, 경피전달성 패치, 약물 함유 붕대, 로션, 또는 그 조합일 수 있다. 바람직하게는 경구 투여 제형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서 투여 개체는 스테로이드 부작용을 갖고 있는 것일 수 있다. 상기 개체는 스테로이드 치료 또는 개체 내의 스테로이드 양의 증가에 의하여 야기되는 스테로이드 부작용을 갖고 있는 것일 수 있다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다.

[0032] 본 발명에서 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피 (transdermal), 점막, 코안 (intranasal), 기관내 (intratracheal) 또는 피하 투여와 같은, 임의의 수단 에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 투여는 스테로이드 약물 투여 전, 동시, 또는 그 후에 투여하는 것일 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1. 실험방법

[0038] 1.1. 실험동물 사육 및 관리

[0039] 생후 7주가 된 ICR 마우스(영바이오, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)는 12 시간 명/암 주기의 규칙적인 광원 설비, 22-24℃의 온도 및 55-60%의 습도가 유지되는 동물실에서 사육하였다. 동물 관리와 동물 실험은 경희대학교 동물실험 윤리 위원회의 가이드 라인에 따라 수행되었다(KHUASP(SE)-17-182).

[0041] 1.2. 지골피 추출물의 준비

[0042] 지골피(Lycii Radicis Cortex, LRC)는 절편하여 100 g/L의 농도로 준비한 후, 2시간동안 열수 추출되었다. 이후, 3M 여과지를 이용하여 지골피 열수 추출물을 여과하였고, 24시간 이상 동결건조하였다. 동결건조한 지골피는 분말화한 후, 정제수에 녹여 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 농도로 준비하고 실험동물에 구강투여하였다. 세포실험에서 분말 지골피 추출물은 정제수에 녹여 100 mg/mL의 농도로 준비하고 배지에 희석하여 사용하였다.

[0044] 1.2. 스테로이드의 장기 투여로 유도된 골다공증 동물모델 제작

[0045] 본 발명자들은 스테로이드에 의한 골다공증 동물모델을 제작하기 위해, 아토피 피부염이 유발된 동물모델에 스테로이드를 장기 투여하여 골다공증이 유도된 동물모델을 제작하였다. 간단히, 마우스는 3일간 1% DNCB(2,4-Dinitrochlorobenzene)로 1차 아토피 감작 후 4일간 잠복기를 가졌다. 이후, 0.5% DNCB로 일주일에 세 번씩 8주간 감작을 진행하였다 (도 1). 스테로이드인 텍사메타손(Dexamethasone)은 2 mg/kg의 농도로 올리브 오일(olive oil)과 PBS의 9:1 비율의 혼합물에 녹여 DNCB의 감작 다음날에 일주일에 세 번씩 8주간 피부에 도포하였다 (도 1). 지골피는 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 농도로 물에 녹여 일주일에 6번 매일 같은 시간에 8주간 경구 투여하였다 (도 1). 실험군은 다음과 같다: PBS 처리 및 vehicle 도포된 정상군(Nor group); DNCB 감작 및 텍사메타손 도포된 DEX 처리군(DEX group); 및 DNCB 감작, 텍사메타손 도포 및 지골피 경구투여된 DEX+지골피 처리군(DEX+LRC group).

- [0047] **1.3. 대퇴골의 골밀도 및 미세구조 분석**
- [0048] 실험종료 후 희생된 마우스의 대퇴골을 분리하여 micro-CT (SkyScan1176, Skyscan, Belgium) 장비로 촬영하여 골밀도 및 미세구조를 분석하였다.
- [0050] **1.4. 실험동물의 몸무게 및 장기 무게 측정**
- [0051] 실험동물인 마우스의 몸무게는 매주 같은 날, 같은 시간에 측정하였다. 실험종료 후 희생된 마우스의 간, 비장, 흉선, 고환 및 신장 등의 장기 무게를 측정하였다.
- [0053] **1.5. 혈액 내 골 관련 지표 분석**
- [0054] 마우스의 심장에서 취한 혈액은 상온에 30분간 방치한 후, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이로부터 얻어진 혈청에서 Calcium Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA)를 이용하여 칼슘의 양을 측정하였다. 혈액 내 골 관련 지표인 DKK1 (Dickkopf-1), SOST (sclerostin), IL-6 (interleukin-6), OPG (osteoprotegerin) 및 FGF (fibroblast growth factors)의 양은 Mouse Bone Magnetic Bead Panel Kit (Cat#MBNMAG-41 K, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 분석하였다.
- [0056] **1.6. 피부 조직의 형태학적 분석**
- [0057] 희생된 마우스의 등쪽 피부는 절개하여 에탄올을 첨가하여 탈지, 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 조직은 5 μ m로 절편한 후, 톨루이딘 블루(Toluidine blue)로 염색하였고, 염색된 조직은 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.
- [0059] **1.7 HaCaT (Human keratinocyte) 세포 내에서 염증 사이토카인의 ELISA (cytokine Enzyme-linked immunosorbent assay) 분석**
- [0060] 사람각질세포인 HaCaT 세포에서 염증 반응에 대한 영향을 분석하고자 ELISA 실험을 수행하였다. HaCaT 세포는 1×10^6 cells/ml로 분주한 후, 24시간 안정화 되었다. 이후, HaCaT 세포는 DEX 0.1 μ M, DEX 1 μ M, 지골피 (LRC) 10 μ g/ml, 지골피 (LRC) 100 μ g/ml, DEX 1 μ M + 지골피 (LRC) 10 μ g/ml, 및 DEX 1 μ M + 지골피 (LRC) 100 μ g/ml로 1시간 전처리되었다. 전처리 후 HaCaT 세포는 TNF- α /IFN- γ 로 24시간 동안 자극되었다. 상층액만 걸어서 4,000 rpm에 5분간 원심분리하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관되었다. 상층액은 실험 직전에 상온에 적응되어 ELISA 실험되었다. ELISA 방법은 상업 kit에 동봉된 방법을 따라 실험되었다.
- [0062] **1.8. RAW264.7 세포에서 p-GR (phospho-glucocorticoid receptor) 핵 내 단백질 수준 분석**
- [0063] 염증실험에서 사용되는 RAW264.7 세포는 DEX 0.1 μ M, DEX 1 μ M, 지골피 (LRC) 10 μ g/ml, 지골피 (LRC) 100 μ g/ml, DEX 1 μ M + 지골피 (LRC) 10 μ g/ml, 및 DEX 1 μ M + 지골피 (LRC) 100 μ g/ml로 각각 2시간과 24 시간에서 전처리 되었다. 이후, 30분간 1 μ g/mL LPS (Lipopolysaccharides)로 자극되었다. 세포핵 내 단백질은 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit에 의해 분리되어 단백질 상태로 BCA assay를 통해 정량되었다. 정량된 단백질 30 μ g/mL은 100 V에서 10 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하고, NC (nitrocellulose) membrane으로 이동시켰다. 이후, 1차 anti-p-GR으로 overnight 반응시키고, 2차 항체로 1시간 반응시켰다. 이후, 암실에서 membrane에 ECL solution (Santacruz, California USA)을 반응시켜 x-ray 필름 현상을 통해 나타내었다.
- [0065] **실시예 2. 지골피에 의한 대퇴골의 골밀도 및 미세구조에서의 효과**
- [0066] 본 발명자들은 스테로이드 제제에 의해 유발된 골다공증에 대한 지골피의 예방 또는 치료 효과를 확인하기

위해, 각 실험군의 마우스에서 대퇴골을 분리하여 골밀도 및 미세구조를 분석하는 실험을 수행하였다.

[0067] 그 결과, 도 2에서와 같이, 스테로이드인 텍사메타손이 장기 투여된 DEX 처리군에서는 정상군(Nor group)에 비해 골밀도(bone mineral density)가 50% 정도 감소되었고, 텍사메타손과 함께 지골피가 처리된 DEX+지골피 처리군에서는 골밀도가 상승되는 효과가 있음을 확인하였다. 골소주 사이의 넓이(Trabecular separation)에 있어서도 DEX 처리군에서는 정상군(약 0.35 mm)에 비해 약 0.6 mm로 넓어졌고, DEX+LRC High (지골피 100 mg/kg 처리군)에서는 약 0.45 mm로 좁아졌음을 확인하였다. 또한, 골소주의 개수(Trabecular number)에 있어서도 DEX 처리군에서는 정상군에 비해 감소하였고, DEX+LRC Low (지골피 50 mg/kg 처리군)에서는 정상군과 유사한 정도로 증가하였고, LRC High 에서는 정상군보다 더 현저히 증가되는 효과가 있음을 확인하였다.

[0068] 뼈의 연결성을 나타내는 지표인 Trabecular pattern factor에 있어, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 증가되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 정상군과 유사한 정도로 감소되어 뼈의 안정적인 연결성을 보였다. Trabecular structure model index (SMI)는 뼈의 형태를 3차원으로 나타내주는 지표로서 낮은 값일수록 안정적인 판모양의 형태를 띄고, 높은 값일수록 기둥모양의 불안정적인 형태를 띄는데, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 SMI 값이 증가하였고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 정상군 및 DEX 처리군에 비해 SMI 값이 유의하게 감소하였음을 확인하였다. 또한, 골의 부피(Trabecular volume/Total volume)에 있어서, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 현저히 감소되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 DEX 처리군에 비해 현저하게 증가하였음을 확인하였다 (도 2).

[0069] 따라서, 본 발명자들은 스테로이드와 함께 지골피를 처리한 경우 텍사메타손을 처리하지 않은 정상군과 유사하거나 이보다 현저한 효과의 대퇴골의 골밀도 및 미세구조를 나타냄으로써, 지골피가 스테로이드에 의해 유발되는 골다공증의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0071] 실시예 3. 지골피에 의한 실험동물의 몸무게 및 장기무게에서의 효과

[0072] 본 발명자들은 지골피가 실험동물의 몸무게 및 장기무게에 영향을 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 3에서와 같이, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 몸무게(body weight), 간(liver) 및 흉선(thymus)의 무게가 유의하게 감소되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 DEX 처리군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, DEX 처리군에서는 정상군과 비교하여 비장(spleen) 및 신장(kidney)의 무게에 있어 유의적인 차이를 보이지 않았다. 고환(testis)의 무게에 있어서, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 약간 감소되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 DEX 처리군에 비해 유의하게 증가되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 3).

[0074] 실시예 4. 지골피에 의한 혈청 내 골 관련 지표에서의 효과

[0075] 본 발명자들은 지골피가 혈청 내 골 관련 지표에 영향을 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 4에서와 같이, DEX 처리군은 정상군에 비해 혈청 내의 칼슘 농도가 현저히 증가되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 유의하게 감소되는 효과를 보였다. 이는 스테로이드의 장기 투여에 의해 칼슘의 체내 흡수율이 감소하였고, 지골피가 체내 흡수율을 증가시킨 것을 의미한다.

[0076] 또한, 조골 세포의 분화 및 응집에 기여하는 Wnt 기전의 억제제인 DKK-1 (Dickkopf-1)의 경우 DEX 처리군에서는 정상군에 비해 유의하게 증가되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 DEX 처리군에 비해 유의하게 감소되는 효과를 나타내었다. Wnt 기전 억제제인 SOST (sclerostin)에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 골 재흡수 지표인 IL-6 (interleukin-6) 및 인대사 조절자인 FGF (fibroblast growth factors)의 경우 DEX 처리군에서는 정상군에 비해 유의하게 증가되었고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 파골세포를 억제시키는 OPG (osteoprotegerin)의 경우 DEX 처리군에서는 정상군에 비해 증가되었는데, 이는 골손실의 방어기전으로 보이며, DEX+지골피 처리군에서는 DEX 처리군에 비해 감소되는 경향을 보였으나 유의하지 않았다 (도 4).

[0078] 실시예 5. 지골피에 의한 피부조직 내 비만세포의 감소 효과

[0079] 본 발명자들은 지골피가 피부 내 비만세포에 영향을 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 알러지 반응 정도를 측정할 수 있는 비만세포의 침투 실험에서, DEX 처리군에서는 정상군에 비해 비만세포의 수가 유의하게

증가하였고, DEX+LRC Low와 DEX+LRC High에서는 DEX 처리군에 비해 비만세포의 수가 유의하게 감소하였음을 확인하였다 (도 5).

실시예 6. 지골피에 의한 HaCaT (Human keratinocyte) 세포 내 염증 사이토카인 감소 효과

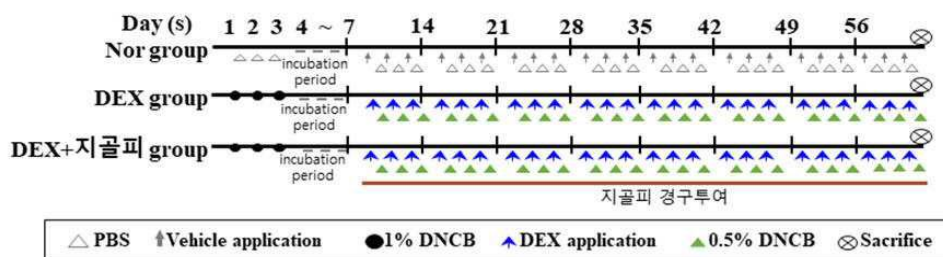
본 발명자들은 지골피가 사람 각질 세포인 HaCaT 세포에서 지골피와 DEX, DEX+지골피가 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA 실험을 진행하였다. 그 결과, DEX는 GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor human), ICAM (Intercellular adhesion molecule)을 효과적으로 감소시켰다. DEX는 MCP-1(Monocyte chemoattractant protein 1)을 감소시켰지만 유의한 정도는 아니었다. 지골피 단독사용은 GM-CSF, ICAM, MCP-1에서 영향이 미미하였지만, DEX와 지골피를 함께 사용했을 때는 DEX 단독사용과 마찬가지로 GM-CSF, ICAM를 효과적으로 감소시켰으며, 특히, MCP-1의 경우에는 DEX 단독사용보다 DEX+지골피에서 더 효과적으로 MCP-1이 감소하였다.

실시예 7. 지골피에 의한 RAW264.7 세포의 핵 내 p-GR (phospho-glucocorticoid receptor) 작용에서의 효과

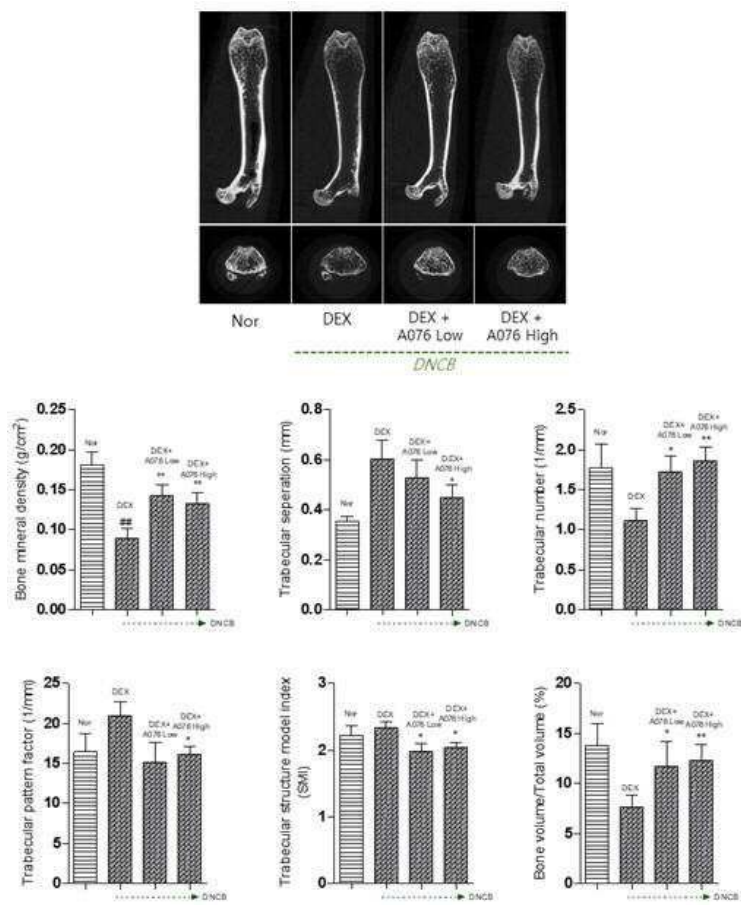
염증 발생시 p-GR은 핵 내로 이동하여 염증 조절에 관여한다고 알려져 있다. 본 발명자들은 지골피가 p-GR 핵 내 이동에 미치는 영향을 확인하였다. DEX를 처리했을 때 p-GR은 2시간에서 발현하였고 24시간에서는 발현이 현저히 줄어들었다. 이는 DEX가 단기간 사용 시에는 세포에서 염증을 조절하지만, 장기간 사용했을 시 내성이 발생하여 염증 조절능이 감소하였다는 것을 의미한다. 반면, 지골피를 2시간과 24시간에서 각각 전처리 했을 때는 뚜렷한 변화가 보이지 않았다. 이는 지골피 단독사용은 스테로이드의 agonist가 될 수 없다는 것을 의미한다. 마지막으로 지골피+DEX의 경우 2시간에서 DEX 단독사용보다 높은 p-GR 발현력을 나타내었으며 24시간에서도 계속 그 발현력을 유지하여 염증 조절에 관여하고 있음을 보여주었다. 이로써, DEX와 지골피의 병용이 스테로이드 내성 발생을 감소해주는 데 효과가 있음을 확인하였다.

도면

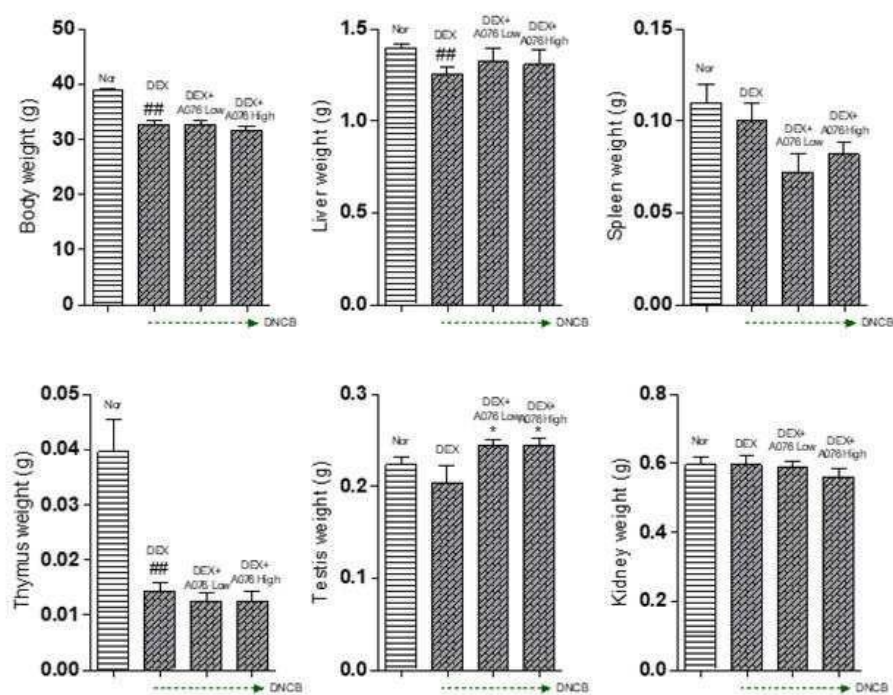
도면1



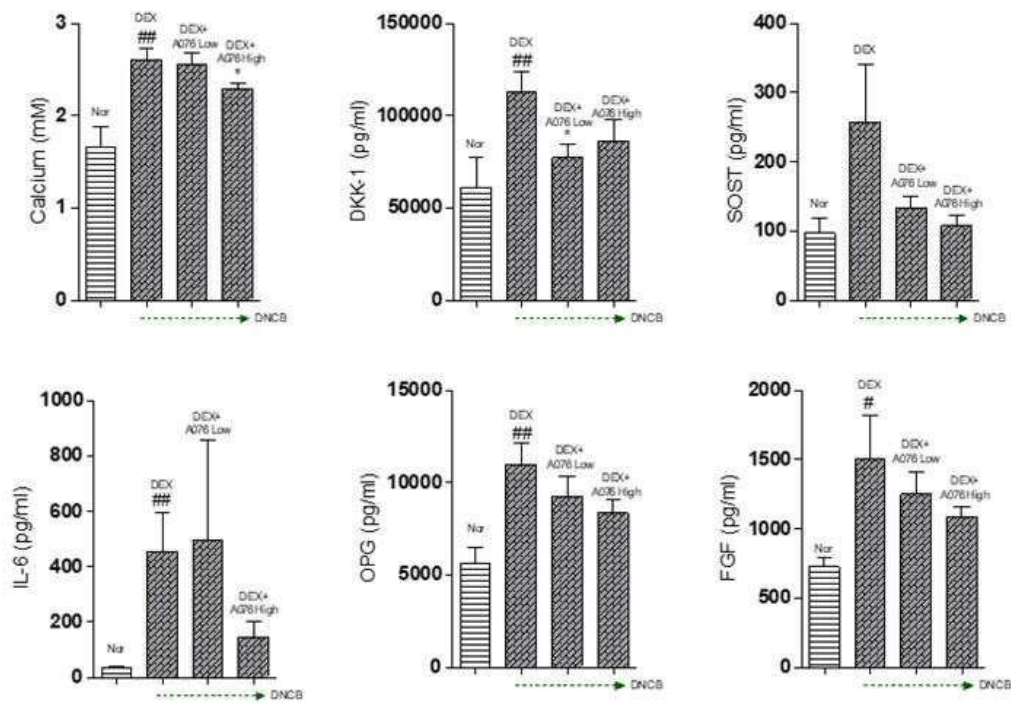
도면2



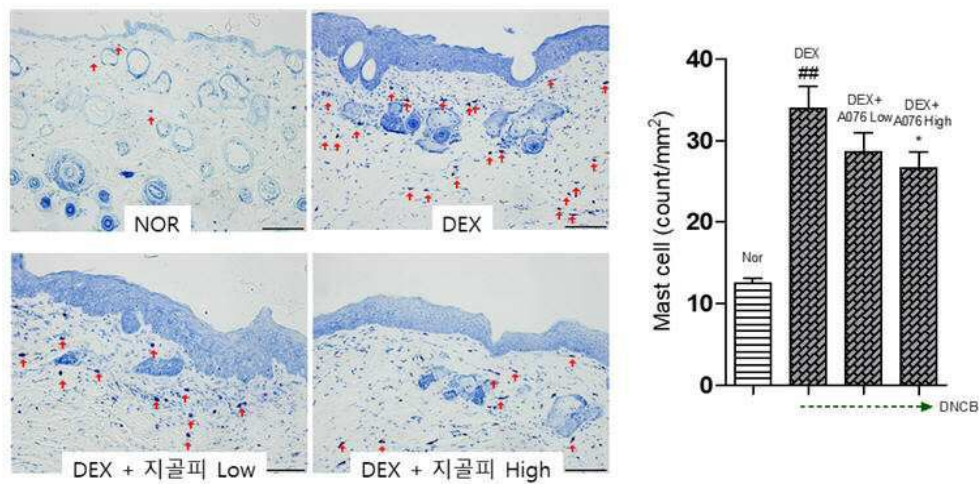
도면3



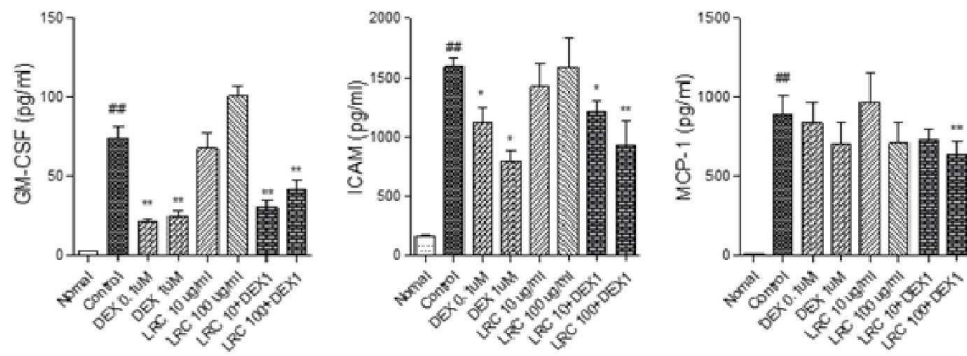
도면4



도면5



도면6



도면7

