



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0007510
(43) 공개일자 2011년01월24일

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01) *A23L 2/52* (2006.01)

A61K 36/33 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0065062

(22) 출원일자 2009년07월16일

심사청구일자 2009년07월16일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

손용석

서울 광진구 광장동 현대홈타운 12차 Apt.
1201-1402

윤진아

경기도 고양시 일산동구 설문동 34

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

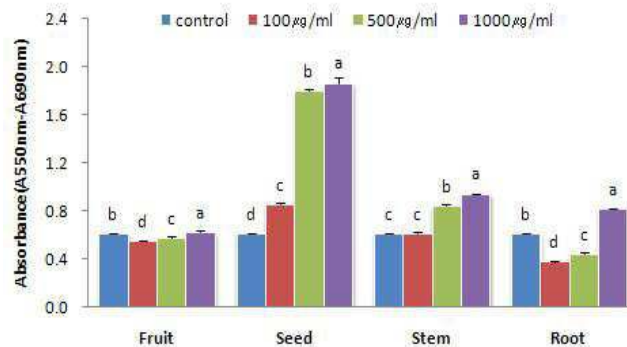
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 천년초선인장의 골다공증 예방효과

(57) 요약

본 발명은 천년초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 및 개선을 위한 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명의 천년초선인장 추출물 또는 분획물은 조골세포인 MG-63세포의 증식 및 세포분열을 촉진시키는 바, 골다공증의 예방 및 개선에 유용한 건강기능식품에 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

함상욱

충청북도 옥천군 옥천읍 금구리 235-1 가화현대아
파트 102동 103호

박지은

서울특별시 금천구 독산동 953 삼부르네상스플러스
오피스텔 910호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200804010821040010200

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 농업기술센터연구개발지원사업

연구과제명 [협동]천년초의 건강기능성 효과에 관한 연구

기여율

주관기관 고양시농업기술센터

연구기간 2008년 03월 01일 ~ 2008년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

천년초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 및 개선용 건강 기능식품.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물 또는 분획물은 천년초선인장의 열매, 종자, 줄기 또는 뿌리로부터 수득됨을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 추출물 또는 분획물은 천년초선인장의 종자 또는 줄기로부터 수득됨을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 추출물은 메탄올에 가용한 추출물인 건강기능식품.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 분획물은 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린, 부틸렌글리콜 또는 물로부터 선택되어진 용매에 가용한 분획물인 건강기능식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 분획물은 헥산, 에틸아세테이트 또는 물에 가용한 분획물인 건강기능식품.

청구항 8

제 1항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 천년초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 및 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] [문헌 1] Daewon Jeong, Yeungnam University. J. of Med., 24(2), pp.S270-276, 2007

[0003] [문헌 2] 한국공개특허 10-2005-0080452호

[0004] [문헌 3] 한승호, 김길수, 김복현 등, 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접착성피부염 치료제 개발, 2008

[0005] [문헌 4] Weon Jong Yoon et al. Arch Pharm Res. 30(1), pp.43-49, 2007

[0006] [문헌 5] D.Labelle et al., Cell Prolif., 40, pp.866-884, 2007

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 국가경제와 소득향상으로 인한 식습관 변화 및 이로 인한 성인병 증가와 고령화 시대의 도래와 함께 건강에 대한 관심은 크게 증가하면서도 성인병 발생은 점점 증가하고 있는 오늘날, 국내외적으로 가장 주목 받고 있는 것은 대사성증후군(Metabolic Syndrome)과 골다공증(Osteoporosis)이라고 할 수 있다.

[0008] 골다공증은 골 조직의 물리적 강도를 결정하는 칼슘이 여러 가지 이유(유전적 요인, 영양섭취, 호르몬의 변화, 운동, 생활습관)로 감소되어 골수강이 넓어지는 상태로, 약한 충격에도 골절이 일어나는 결과를 초래하여 삶의 질을 현저히 저하시키는 증상이다. 특히, 여성의 경우 30세 이후부터 골밀도가 지속적으로 감소되며, 폐경기에 이르면 여성 호르몬인 에스트로겐이 급격히 감소하여 인터루킨-7에 의한 것처럼 B-림파구가 다량 생성되어 골수에 B세포 전구체가 축적되고 이로 인해 인터루킨-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시켜 골밀도가 감소하게 된다.

[0009] 골다공증은 원발성과 속발성으로 분류되며, 원발성은 폐경 후 골다공증과 노인성 골다공증으로 나뉜다.

[0010] 폐경 후 골다공증(제 1형 골다공증)은 여성에서 폐경 이후 에스트로겐 결핍에 의해 일어나는 골다공증으로, 에스트로겐이 결핍되면 골수내 미세환경에서 사이토카인에 의한 조절기전의 장애로 인하여 비정상적으로 골재형성(bone remodeling)과정이 촉진된다. 즉 IL-1, IL-6 및 TNF- α 의 생성이 증가하고 이로 인해 조골세포 및 파골세포의 수가 증가하며 결국 골재형성의 활성화 빈도가 증가된다. 세포수의 증가뿐만 아니라 질적인 변화도 관찰되는데, 파골세포는 평소보다 더 깊게 뼈 속을 파고들면서 뼈를 흡수하게 된다. 심한 경우, 소주골을 관통하게 되면 뒤따르는 골형성 과정을 진행할 수 없어 심각한 뼈의 약화를 초래하게 된다. 또한, 에스트로겐은 파골세포의 세포사멸을 증가시키는데, 에스트로겐이 결핍되면 파골세포의 수명이 연장되고 수가 2~3배 증가하게 된다. 결국, 소주골이 얇아지면서 천공으로 인하여 연결성이 감소되고 피질골이 얇아지게 된다. 에스트로겐의 결핍은 조골세포뿐만 아니라 골세포의 세포사멸도 증가시켜 골형성을 감소시키고 골세포의 소관(canalliculi)을 통한 신호전달 체계의 장애로 인하여 뼈의 재생기능이 약화되어 골밀도는 폐경하고 난 뒤, 해마다 5% 정도 줄어들고 70세까지 폐경 전 수준의 50%까지 줄어들 수 있다.

[0011] 반면에 노인성 골다공증(제 2형 골다공증)은 노화와 관련된 변화로, 남성과 여성 모두에게서 일어나고 서서히 오래 진행된다. 60세 이상에서 나타나며 여성이 남성보다 더 흔한 것으로 보아 고령에서도 에스트로겐의 결핍이 영향을 미치는 것으로 추측된다. 나이가 많아짐에 따라 PPAR γ 2 및 리간드(ligand)인 PGJ2의 발현이 증가하여 간엽세포로부터 지방세포로의 분화는 증가하는 반면, 조골세포로의 분화는 감소하며, 또한 IGF 및 BP(binding protein)이 감소하게 되어 결국 뼈가 흡수된 부위를 새로운 뼈로 채울 수 없게 된다.

[0012] 속발성 골다공증은 류마티스 관절염, 신부전, 내분비 질환(성선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 쿠싱 증후군, 부갑상선 기능 항진증 등의 질환)이 있을 때나 스테로이드, 제산제, 갑상선 치료제 등을 장기간 복용했을 때 이차적으로 발생한다. 당질코르티코이드(Glucocorticoid)는 조골세포의 생성을 감소시키고, 또한 성숙된 조골세포의 세포사멸도 증가시킨다.

- [0013] 포유동물에서 뼈는 여러 가지 물질로 구성된 복합체로서, 콜라겐과 같은 단백질과 인산칼슘(calcium phosphate (수산화인회석, hydroxyapatite)) 형태로 존재하는 칼슘화된 단단한 기관이면서 가장 큰 기관이다. 뼈는 미네랄의 저장고이면서 몸을 지탱하는 역할을 수행한다. 뼈를 구성하고 있는 세포로는 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast), 골표면세포(lining cell) 및 골세포(osteocyte)가 있다. 뼈의 항상성은 뼈를 구성하는 단백질을 생성하고 미네랄 축적을 유도하는 조골세포(osteoblasts)와 뼈의 표면에 단백질 분해효소 분비 및 산성화에 의한 뼈 구성성분을 파괴하는 파골세포(osteoclasts)에 의해서 유지된다. 조골세포는 골수 내에 존재하는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 분화되고, 파골세포는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로부터 유도된다. 성인의 경우에 1년에 약 10%의 뼈가 생성되고 파괴되는 현상이 반복됨으로써 항상 건강한 뼈를 유지할 수 있다. 뼈의 항상성은 뼈를 생성하는 조골세포와 이를 흡수하는 파골세포의 균형에 의해서 조율된다. 골수 내 뼈 표면의 같은 공간에 존재하면서 조골세포에 의해서 파골세포의 분화가 조절된다. 조골 전구 세포가 다양한 인자(BMP, TGF- β)들에 의해서 분화된 조골세포는 단백질 및 비단백질 성분을 분비하고, 미네랄화를 유도하여 유골(osteoid)을 형성한다. 완전 분화된 조골세포는 골기질(bone matrix) 내에서 골세포(osteocyte) 형태로 존재한다. 뼈를 생성하는 조골세포의 조절은 이를 파괴하는 파골세포의 분화와 뼈 흡수능을 조절할 수 있다. 뼈의 표면에 공존하는 두 세포 간의 상호작용은 뼈의 생성과 파괴의 균형을 조절하여 이의 항상성을 유지한다(Daewon Jeong, Yeungnam University. J. of Med., 24(2), pp.S270-276, 2007).
- [0014] 현재 골다공증 치료제로 비스포스포네이트 제제(알렌드로네이트, 에티드로네이트), 호르몬 제제(탈록시펜), 비타민D 제제, 칼시토닌 제제, 칼슘 제제 등이 있다. 그러나 비스포스포네이트 제제는 흡수율이 떨어지며, 복용방법이 까다롭고 복용방법이 나쁘면 식도염을 유발시키는 단점이 있으며, 호르몬 제제는 평생 복용하여야 하며 유방암 및 자궁암 발생율을 증가시킨다. 비타민D 제제는 고가이며 효과가 확실하지 않고, 칼시토닌 제제는 고가이며 투여방법이 어려우며, 칼슘 제제는 부작용은 적지만 치료보다는 예방 효과에 국한된다는 단점이 있다(한국공개특허 10-2005-0080452호).
- [0015] 이러한 현대병을 예방 치료하는 데는 화학합성물에 의존하기보다는 부작용을 최소화 하는 방법으로 천연물이 가지는 건강기능성 효과에 대한 관심도가 점점 높아지고 있다.
- [0016] 손바닥선인장은 전 세계적으로 알려진 약 4,000여 종의 선인장 가운데 한 종류이며, 대부분 열대 및 아열대성으로 국내에는 도입종인 백년초(*Opuntia ficus-indica*)가 온난한 제주도 지방을 중심으로 재배 생산되고 있고, 이미 국내외적으로 많은 연구가 이루어지고 건강식품의 형태로 상품화 되어있다.
- [0017] 한편, 손바닥선인장류의 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)은 사계절이 뚜렷한 온대지역에 자생하며 월동이 가능한 다년생이고, 우리나라 토종 선인장으로, 한반도 전역에서 노지재배에 의한 생산이 가능하며, 현재 경기 및 충남 지역에서 주로 생산되고 있다(한승호, 김길수, 김복현 등, 천년초선인장의 안전 생산기술 개발 및 접촉성 피부염 치료제 개발, 2008).
- [0018] 천년초선인장은 백년초에 비하여 덜 알려져 있을 뿐만 아니라, 연구를 통하여 밝혀진 정보가 매우 적은 실정인데 반하여, 천년초선인장이 백년초에 비하여 페놀(phenol)과 플라보노이드(flavonoid) 성분 함량이 높다고 밝혀진 점 등으로 보아 인체건강에 미치는 기능성은 더욱 다양하고 더 뛰어날 수 있을 것으로 기대되는 바, 본 발명자들은 천년초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물에 의한 골다공증 예방 및 개선 효과에 대해 지속적으로 연구한 결과, 조골세포인 MG-63세포에서 MTT assay를 통하여 세포 증식 촉진효과를 확인하였을 뿐만 아니라, 유세포 분석(flow cytometry)을 통하여 세포분열 촉진효과를 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

- [0019] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 천년초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0020] 본원에서 정의되는 추출물 또는 분획물은 천년초선인장의 열매, 종자, 줄기 또는 뿌리, 바람직하게는 종자 또는 줄기로부터 수득됨을 특징으로 한다.
- [0021] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0022] 본원에서 정의되는 상기 분획물은 핵산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린, 부틸렌글리

콜 또는 물로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 헥산, 에틸아세테이트 또는 물, 보다 바람직하게는 에틸아세테이트에 가용한 분획물을 포함한다.

[0023] 이하, 본 발명의 추출물 및 분획물을 수득하는 방법을 상세히 설명한다.

[0024] 천연초선인장의 열매, 종자, 줄기 또는 뿌리, 바람직하게는 종자 또는 줄기를 동결건조 및 분쇄하여 시료 중량의 약 1 내지 10배(v/w), 바람직하게는 약 4 내지 6배(v/w)의 정제수를 포함한 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올을 첨가하고 실온에서 1 내지 120시간, 바람직하게는 48 내지 72시간 씩 1 내지 5회 반복하여 상온추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열추출 등, 바람직하게는 상온추출법으로 추출한 후, 여과 및 농축하는 제조공정을 통하여 본 발명의 추출물을 수득할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 분획물은 상기에서 얻은 추출물을 추출물 중량의 1 내지 100배, 바람직하게는 5 내지 30배 부피(v/w)의 헥산, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 글리세린, 부틸렌글리콜 또는 물로부터 선택되어진 용매, 바람직하게는 헥산, 에틸아세테이트 또는 물을 순차적으로 가하여 분획한 후, 농축 및 동결건조하는 제조공정을 통하여 본 발명의 분획물을 수득할 수 있다.

[0026] 본 발명의 추출물 또는 분획물을 포함하는 조성물은 골다공증의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 추출물 또는 분획물은 골다공증의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물 또는 분획물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 1 내지 5 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 mL를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0028] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물 또는 분획물을 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 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 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 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 mL당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0029] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(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. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 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 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

효 과

[0030] 본 발명의 천연초선인장(*Opuntia humifusa*) 추출물 또는 분획물은 조골세포인 MG-63세포의 증식 및 세포분열을 촉진시키는 바, 골다공증의 예방 및 개선에 유용한 건강기능식품에 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명을 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0032] 단, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실시예 1. 천년초선인장 추출물 및 분획물의 제조**

[0034] 1-1. 천년초선인장 열매 추출물 및 분획물의 제조

[0035] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 열매 1.36kg을 동결건조 및 분쇄하여 메탄올 8L을 첨가하고 실온에서 48 내지 72시간씩 3회 상온추출한 후, 여과지(Whatman No.2, Maidstone, England)로 여과하고 회전 진공 농축기(rotary vacuum evaporator; R-210 Rotavapor, BUCHI Co.)로 농축하여 천년초선인장 열매 추출물 230g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OH-F-M” 이라 명명함).

[0036] 상기 천년초선인장 열매 추출물(OH-F-M) 230g을 헥산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 열매의 헥산가용성 분획물(OH-F-H) 25g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OH-F-E) 4g 및 수가용성 분획물(OH-F-W) 201g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0037] 1-2. 천년초선인장 종자 추출물 및 분획물의 제조

[0038] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 종자 1.53kg을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 종자 추출물 80g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OH-Se-M” 이라 명명함).

[0039] 상기 천년초선인장 종자 추출물(OH-Se-M) 80g을 헥산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 종자의 헥산가용성 분획물(OH-Se-H) 21g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OH-Se-E) 3.1g 및 수가용성 분획물(OH-Se-W) 55.9g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0040] 1-3. 천년초선인장 줄기 추출물 및 분획물의 제조

[0041] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 줄기 800g을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 줄기 추출물 80g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OH-St-M” 이라 명명함).

[0042] 상기 천년초선인장 줄기 추출물(OH-St-M) 80g을 헥산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 줄기의 헥산가용성 분획물(OH-St-H) 20g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OH-St-E) 1.7g 및 수가용성 분획물(OH-St-W) 58.3g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0043] 1-4. 천년초선인장 뿌리 추출물 및 분획물의 제조

[0044] 천년초선인장(*Opuntia humifusa*)의 뿌리 16g을 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-1과 동일한 공정을 수행하여 천년초선인장 뿌리 추출물 2g을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(이하, “OH-R-M” 이라 명명함).

[0045] 상기 천년초선인장 뿌리 추출물(OH-R-M) 2g을 헥산 2L, 에틸아세테이트 2L 및 물 2L로 순차 분획한 후, 농축 및 동결 건조하여 천년초선인장 뿌리의 헥산가용성 분획물(OH-R-H) 0.35g, 에틸아세테이트가용성 분획물(OH-R-E) 0.24g 및 수가용성 분획물(OH-R-W) 1.41g을 각각 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.

[0046] 각 부위별 추출물 및 분획물의 수득율을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

용매	천년초선인장 <i>Opuntia humifusa</i>			
	열매(%)	종자(%)	줄기(%)	뿌리(%)

메탄올	16.91	5.23	10	12.50
헥산	1.83	1.37	2.50	2.18
에틸아세테이트	0.29	0.20	0.21	1.50
물	14.78	3.65	7.29	8.81

[0048] **참고예 1. 세포 배양**

[0049] 조골세포 MG-63을 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하여 DMEM 배지(DMEM, LONZA, Switzerland)에 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS, Gemcell, Gemini, USA), 1% L-글루타민(LONZA, Switzerland), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신(LONZA, Switzerland)이 함유된 배지를 사용하여, 37℃ 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0050] **실험예 1. 조골세포 증식 촉진효과 측정**

[0051] 천년초선인장 추출물 및 분획물의 조골세포 증식 촉진효과를 확인하기 위하여 문헌에 기재된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3 diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay로 하기와 같이 실험하였다(Weon Jong Yoon et al. Arch Pharm Res. 30(1), pp.43-49, 2007).

[0052] 상기 참고예에서 배양한 세포주를 5×10^3 cells/well의 밀도로 96-웰에 분주하여 24시간 동안 37℃ 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양한 후, 상기 실시예에서 수득한 천년초선인장 부위별 추출물 및 분획물을 0, 100, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 배지를 교환하였다. 24시간이 경과한 후, MTT 용액(Roche, Germany)을 첨가하고 ELISA reader(PowerWaveXS, Bio-Tek)를 이용하여 550nm 및 690nm에서 각각 흡광도를 측정하여 무처리 대조군과의 상대적인 세포성장 촉진 효과를 비교하였다.

[0053] 실험결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 천년초선인장 열매, 종자, 줄기 및 뿌리의 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 100, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과, 특히 종자와 줄기의 분획물에서 유의적으로 조골세포의 증식이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] **실험예 2. 조골세포 세포주기 분석**

[0055] 천년초선인장 추출물 및 분획물의 조골세포 세포분열 촉진효과를 확인하기 위하여 문헌에 기재된 방법을 이용하여 하기와 같이 실험하였다(D.Labelle et al., Cell Prolif., 40, pp.866-884, 2007).

[0056] 상기 참고예에서 배양한 세포주를 5×10^5 cells/well의 밀도로 6웰-플레이트에 분주하여 24시간 배양하였다. 상기 실시예에서 수득한 천년초선인장 추출물 및 분획물을 각각 0, 100, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 24시간 배양한 후, PBS로 세포 단층을 씻어낸 다음, 트립신-EDTA(GIBCO, 25200) 2ml을 첨가하여 세포를 수집하였다. 70% 에탄올 1ml을 넣어서 -20℃에 24시간 보관하여 고정하였다. 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, Sigma, 81845-25MG)을 첨가하여 30분간 염색한 후, FACS(fluorescence-activated cell sorting) 분석기(FACScan flow cytometer, Becton Dickinson, USA)를 사용하여 유세포 분석(flow cytometry)의 방법으로 세포주기를 분석하였다.

[0057] 실험결과, 도 2, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 조골세포 증식 촉진 효과가 탁월한 천년초선인장 종자 및 줄기의 에틸아세테이트 분획물(OH-Se-E 및 OH-St-E)을 농도별로 100, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과, G1기의 세포는 천년초선인장 종자 에틸아세테이트 분획물을 첨가하지 않은 대조군에 비해 유의적으로 감소한 반면, S기와 G2/M기의 세포는 대조군에 비해 유의적으로 증가함으로써, 천년초선인장 종자 및 줄기의 에틸아세테이트 분획물이 조골세포의 세포 주기 진행을 촉진함을 확인할 수 있었다.

[0058] 하기에 본 발명의 천연초선인장 추출물 및 분획물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0059] **제제예 1. 건강 식품의 제조**

[0060]	OH-Se-E	1000 mg
[0061]	비타민 혼합물	적량
[0062]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0063]	비타민 E	1.0 mg
[0064]	비타민 B1	0.13 mg
[0065]	비타민 B2	0.15 mg
[0066]	비타민 B6	0.5 mg
[0067]	비타민 B12	0.2 μ g
[0068]	비타민 C	10 mg
[0069]	비오틴	10 μ g
[0070]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0071]	엽산	50 μ g
[0072]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0073]	무기질 혼합물	적량
[0074]	황산제1철	1.75 mg
[0075]	산화아연	0.82 mg
[0076]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0077]	제1인산칼륨	15 mg
[0078]	제2인산칼슘	55 mg
[0079]	구연산칼륨	90 mg
[0080]	탄산칼슘	100 mg
[0081]	염화마그네슘	24.8 mg

[0082] 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.

[0083] **제제예 2. 건강 음료의 제조**

[0084]	OH-St-E	1000 mg
[0085]	구연산	1000 mg
[0086]	올리고당	100 g
[0087]	매실농축액	2 g
[0088]	타우린	1 g

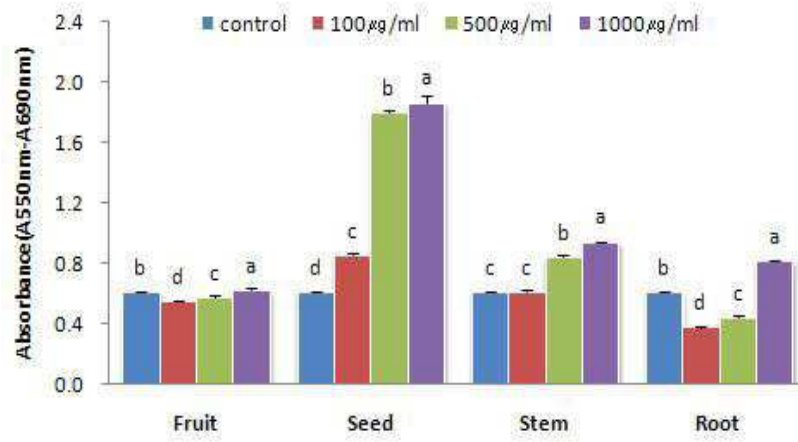
- [0089] 정제수를 가하여 전체 900 ml
- [0090] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.
- [0091] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.
- [0092] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업]
- [0093] [과제고유번호]
- [0094] 200804010821040010200
- [0095] [부처명]
- [0096] 농촌진흥청
- [0097] [연구사업명]
- [0098] 농업기술센터연구개발지원사업
- [0099] [연구과제명]
- [0100] [협동]천년초의 건강기능성 효과에 관한 연구
- [0101] [주관기관]
- [0102] 고양시농업기술센터
- [0103] [연구기간]
- [0104] 2008년 03월 01일 ~ 2008년 12월 31일

도면의 간단한 설명

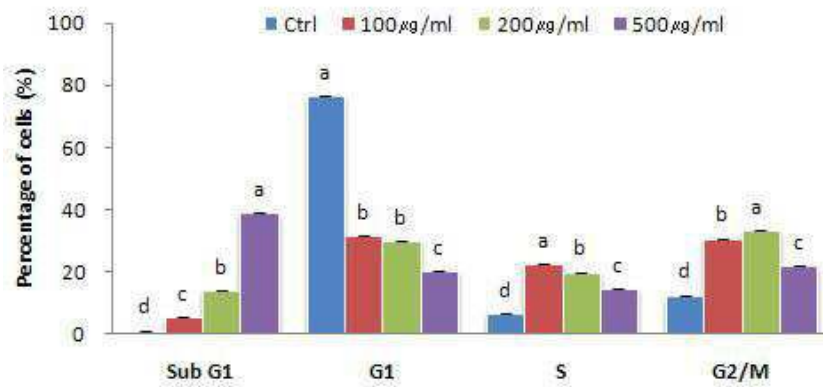
- [0105] 도 1은 천년초선인장 각 부위별 에틸아세테이트 분획물의 조골세포(MG-63) 증식 촉진효과(평균±표준오차(n=3)), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05)를 나타낸 도이고,
- [0106] 도 2는 천년초선인장 종자 에틸아세테이트 분획물(OH-Se-E)의 조골세포(MG-63) 세포주기 진행 촉진효과(평균±표준오차(n=3)), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05)를 나타낸 도이며,
- [0107] 도 3은 천년초선인장 줄기 에틸아세테이트 분획물(OH-St-E)의 조골세포(MG-63) 세포주기 진행 촉진효과(평균±표준오차(n=3)), 서로 다른 윗첨자는 통계적으로 유의차가 있음을 의미함(p<0.05)를 나타낸 도이고,
- [0108] 도 4는 천년초선인장 종자 분획물(OH-Se-E) 또는 줄기의 에틸아세테이트 분획물(OH-St-E) 처리 조골세포의 세포주기 분석결과를 나타낸 도이다.

도면

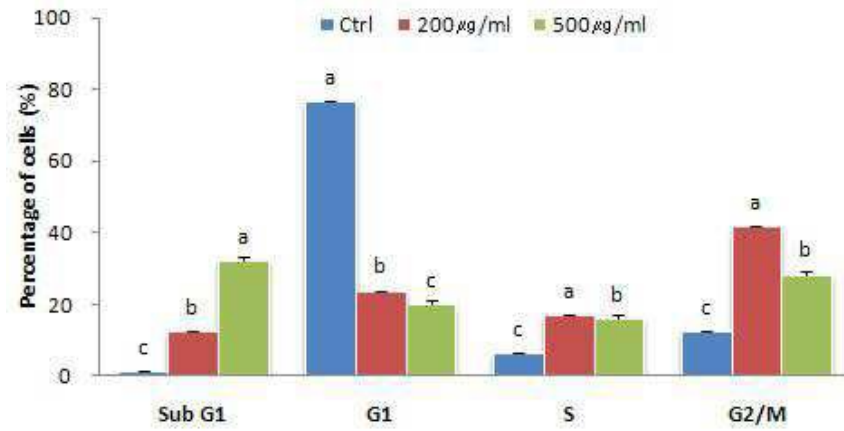
도면1



도면2



도면3



도면4

