(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
A61K 36/54 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년03월28일
(11) 등록번호 10-0700481
(24) 등록일자 2007년03월21일

(21) 출원번호 10-2006-0018306
(22) 출원일자 2006년02월24일
심사청구일자 2006년02월24일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 경희대학교 산학협력단
경기 용인시 기흥읍 서천리 1

(72) 발명자 이재동
서울특별시 동대문구 이문동 426번지 삼성래미안APT 204-1601호

박동석
서울 송파구 문정2동 훼미리아파트 210동 1503호

백용현
서울 강남구 대치동 청실아파트 3동 1005호

양하루
서울 도봉구 창동 북한산아이파크 520동 803호

허정은
서울 서대문구 연희동 712번지 14-6

(74) 대리인 신동인

(56) 선행기술조사문헌
KR1020020024020 A
JP 15-171303 A
JP 12-191542 A
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 여호섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 계지 추출물을 포함하는 골절의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 계지(*Cinnamomum cassia*) 추출물을 함유하는 골절의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 계지 추출물은 조골세포의 증식 및 분화 촉진, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 촉진 및 혈관 내피세포 성장인자 (VEGF) 분비 촉진 효과를 나타냄으로서 골절의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

계지 (Cinnamomum cassia) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 혈관 형성 및 조골세포 증식작용으로 골유합 효과를 나타냄을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에 가용한 추출물인 약학조성물.

청구항 4.

혈관 형성 및 조골세포 증식작용으로 골유합 효과를 나타내는 계지 (Cinnamomum cassia) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태인 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혈관형성 촉진 및 조골세포 증식 효과를 갖는 계지 (*Cinnamomum cassia*) 추출물을 함유하는 골절의 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

혈관신생 (angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고있는 내피세포의 이동 (migration)과 세포간 장벽인 세포외기질 (ECM; extracellular matrix)을 통과하는 침윤(invasion), 성장 (proliferation), 혈관이 만들어지는 단계인 분화(tube-like formation)의 단계를 거치며 이에 대한 유도물질과 억제물질 간의 균형에 의하여 정교하게 조절되는 것으로 알려져 있다 (Schott RJ and Morrow LA, *Cardiovasc. Res.*, 27(7), pp1155-1161, 1993). 이는 고도로 조절되는 과정으로 상처치유과정 및 배 또는 황체 엑스의 발생을 제외한 정상상태에서는 거의 일어나지 않는다 (Folkman J and Shing Y, *J. Biol.Chem.*, 267(16), pp10931-10934, 1992). 전반적으로 혈관형성은 연관된 기저막의 효소에 의한 퇴화로 시작되는 몇 가지의 단계와 연관되어 있다. 게다가, 혈관신생에는 혈소판-유

래성장인자 (platelet-derived growth factor), 골형성단백질-2 (BMP-2; bone morphogenic protein-2), 혈관내피세포 성장인자 (VEGF; vascular endothelial growth factor), 및 섬유아세포성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor), FGF-2 같은 혈관신생인자에 의한 적절한 자극이 필요하다 (Folkman J and Shing Y, *J. Biol.Chem.*, 267(16), pp10931-10934, 1992; Ferrara N, *Recent Prog. Horm. Res.*, 55, pp15-35, 2000; Burgess WT and Maciag T, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, pp575-606, 1989).

혈류공급의 영향을 비교적 많이 받는 근골격계에서도 혈관생성의 중요성이 부각되면서 치료성 혈관신생이 각광을 받기 시작하였고, 골유합, 골형성, 골이식, 국소 허혈성 골괴사 등에서 이미 혈관형성의 촉진이 치료에 도움을 주는 것으로 알려져 활용되고 있는 실정이다 (안재훈 등, *대한정형외과학회지*, 34, pp631-642, 1999). 모세혈관에서 혈장단백질을 투과를 증가시키는 사이토카인 (cytokine)으로서, 세포의 분열과 이동을 촉진하고 세포소멸의 억제를 통해 새로 형성된 혈관의 생존을 유지시키며, 혈관세포의 이동을 촉진시켜 새로운 세포의 발생 및 분화를 촉진시키는 VEGF는 최근 연구에서 뼈 성장의 조절에 대한 역할에 많은 관심이 집중되었으며, BMP-2 보다 조골세포의 증식에 더 강력한 유도활성을 갖는다고 보고되었다 (Midy V and Plouet J, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199(1), pp380-386, 1994). 또한 스타틴 (statin)이 VEGF 및 BMP-2 같은 골 동화 요소의 발현을 촉진시키고, 이에 따라 조골세포 (osteoblast)의 증식 및 석회화 (calcification)를 촉진됨이 보고되었다 (Maeda T. et al., *Endocrinology*, 144(2), pp681-692, 2003).

골은 석회화된 견고한 표면과 골수로 불리는 내부의 세포 성분이 결합된 특수조직이다. 생리적으로 상이한 이 두 구조의 결합은 일생을 두고 지속되는 골의 재형성 (bone remodeling) 과정에 기인한 것인데, 이는 골에 가해지는 호르몬이나 물리적 자극에 의해 골수에 있는 파골세포 (osteoclast)들이 골의 표면으로 모여 골을 파들어 가면서 파괴하는 골흡수 (bone resorption)와 흡수가 일어난 자리에 모여든 조골세포 (osteoblast)에 의한 골기질의 합성 (bone formation)으로 설명된다 (Park JS, *Natl. Nutr.*, 215, pp25-31, 2000).

골표면에 위치하는 조골세포는 세포막에 당단백 효소인 알칼리 포스파타제 (ALP; alkaline phosphatase)를 가지고 있으며 Ⅰ형 콜라겐 (Col Ⅰ; type I Collagen), 오스테오칼신 (OCN; osteocalcin), 오스테오폰틴 (OPN; osteopontin), 뼈 시알로단백 (BSP; bone sialoprotein)과 같은 골기질 물질을 분비하고 석회화시키는 역할을 한다 (Collier FM et al., *Endocrinology,* 139(3), pp1258-1267, 1998).

관절염이나 골절, 골다공증에 상용되는 약재들은 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아져 노년층에서 많이 유발되는 골관절 질환의 치료시 장기간에 걸친 전신 투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 골절 및 골재생의 치료에 있어 효과는 우수하면서 부작용을 극소화하며 관절조직보호 효과가 우수한 새로운 처방의 필요성이 대두 되고 있으며 이에 따라 한약물의 신약개발에 대한 세계 각국의 관심이 집중되고 있다.

계지(*Cinnamomum cassia*) 장나무과의 상록교목식물인 계수나무(또는 계피나무라고도 함)의 어린 가지로, 맵고 달며 성질은 따뜻하고 심과 폐와 방광에 작용한다. 위를 튼튼하게 하고, 중풍을 억제하며 진통, 강심작용이 있고 피부혈관을 확장시키고 한선을 자극하여 땀을 내어 해열작용을 하며 바이러스의 억제작용을 한다고 알려져 있으며, 오한, 발열, 두통, 몸의 통증, 땀이 나지 않는 경우나 심계항진 등에 사용한다. 긴 원주형으로 많은 가지가 있으며 길이는 30-70cm, 굵은 쪽의 지름은 0.3-1cm이다. 표면은 홍갈색이나 갈색으로 세로의 능선이 있고 가는 주름과 작은 덩어리 모양의 잎과 가지가 붙어있던 흔적이 있으며, 질은 단단하고 부서지기 쉬우며 절단하기 쉽고, 광서, 광동성이 주산지이며 월남, 스리랑카, 인도 등지에서도 재배된다. 계지의 약리실험 결과로 발한작용, 해열작용, 진통작용, 강심작용, 항알레르기작용, 항바이러스작용 및 억균작용 등이 밝혀졌으나, 현재까지 계지의 골유합, 골재생 활성에 의한 골절 치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다.

이에, 본 발명자들은 본 발명의 계지 추출물이 탁월한 혈관형성 촉진 효과 및 조골세포 증식에 의한 골유합 효과를 가짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 탁월한 혈관형성 촉진 효과와 조골세포 증식에 의한 골유합 효과를 지닌 계지 추출물을 함유한 골절의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 계지 (*Cinnamomum cassia*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

상기 추출물은 혈관 형성 및 조골세포 증식으로 인한 골유합 효과를 나타냄을 특징으로 한다.

또한 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올과 물의 혼합용매에 가용한 추출물, 바람직하게는 물 또는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(v/v)를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 계지 추출물은 하기와 같이 수득 될 수 있다.

본 발명의 계지를 세절하여 준비한 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 물, 에탄올, 메탄올 등과 같은 C_1 내지 C_4의 저급 알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(v/v)를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매로, 실온에서 약 0.5 내지 48시간, 바람직하게는 1 내지 30시간 동안 교반 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 상온 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 계지 추출물을 수득할 수 있다.

상기 제조공정으로 수득된 본 발명의 계지 추출물은 조골세포인 Saos-2세포의 증식, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 증가, 혈관 내피세포 성장인자 분비 촉진 및 혈관 내피세포 성장인자 수용체의 활성 증가에 의한 조골세포 증식 효과를 나타내어 골유합 활성을 가져 골절의 예방 및 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

본 발명은 상기의 제조공정으로 얻어진 계지 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공한다.

본 발명의 계지 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

본 발명의 골절 예방 및 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 계지 추출물을 0.1 ~ 50 중량% 포함한다.

본 발명의 계지 추출물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

본 발명의 계지 추출물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 계지 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 추출물은 1일 0.0001 내지 100 ㎎/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 ㎎/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

본 발명의 계지 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

또한, 본 발명은 혈관 형성 및 조골세포 증식으로 인한 골유합 효과를 나타내는 계지 (*Cinnamomum cassia*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다.

또한, 골절의 예방 및 치료 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 계지 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 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 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 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 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 계지 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 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 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 계지 추출물의 제조

경희의료원 한방병원에서 구입하여 물로 세척한 후 협잡물을 제거하고 잘 건조된 상태의 계지 250 g에 2 ℓ의 50%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 교반하면서 6시간동안 환류 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 대해서는 1.5 ℓ의 30%(v/v) 에탄올 수용액을 가해 3 시간 재 가온 추출한 후 여액을 모두 합하여 1.5 ℓ로 농축하였다. 여기에 동량의 수포화 n-부틸알콜을 가하여 3회 층 분리한 후 n-부틸알콜 가용층만을 모아 58 ℃로 계지 추출물이 건조될 때까지 감압 농축하였다. n-부틸알콜과 물이 거의 증발된 상태에서 0.2 ℓ의 물을 가해 공비 농축한 후 다시 2회 반복감압 농축하고, 최종적으로 동량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 동결 건조하여 분말상태의 계지 추출물 (수득율 : 8.1%)을 수득하였다.

참고예 1. 조골세포 배양

사람유래 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2세포 (ATCC 등록번호; HTB-85)는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 수득하였으며, 15 % 우태아혈청 (FBS)과 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (Invitrogen Corporation, CA, USA)이 첨가된 배지 (McCoy's 5A, Gibco BRL, USA)를 이용하여 배양하였다.

참고예 2. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

트리졸 시약 (TRIzol reagent, Invitrogen Corporation, CA, USA)을 이용하여 RNA를 준비하였다. 1 ㎍의 총 RNA, Oligo $(dT)_{12}$ 프라이머, dNTP (10 mM), 0.1M 디티오트레이톨 (DTT, dithiotreitol), 역전사효소 (Promega, USA) 및 RNase 저해제에 완충액을 첨가하여 역전사 (reverse transcription) 반응을 42 ℃에서 60분간 수행하였다. 상기에서 합성된 각각의 cDNA와 하기 표 1 및 서열번호 1 내지 12에 기재된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응 (PCR; Polymerase Chain Reaction)은 cDNA 0.5 ㎍, 2.5 unit의 Taq 중합효소 (TaKaRa Taq™, Takara, Japan), 1.5 mM dNTP, 1x 완충액 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 각 프라이머쌍 20 pmol씩을 섞고 증류수로 총부피를 10 ㎕로 맞춘 다음 기계 (TaKaRa Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.8 % 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고 EtBr (ethidium bromide)로 염색하여 특정 밴드 (band)를 확인하였다. 서열번호 1 및 2의 프라이머를 이용한 PCR 산물인 베타-액틴 (β-Actin)을 지표유전자로 사용하였고, Gel-Doc EQ (BIO-RAD Laboratories, Milan, Italy)를 이용하여 정량하였다.

[표 1]

유전자		프라이머의 서열
β-Actin	정방향	5′CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACTTTGG3′
	역방향	5′CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC3′
OCN	정방향	5′GAGGACCCTCTCTCTGCTCACTCTGCTGGC3′
	역방향	5′GTGGTGCCATAGATGCGCTTGTAGGCGTCC3′
OPN	정방향	5′CTCGGATGAATCTGACGAATCTCACCATTC3′
	역방향	5′CTTACTCTTAGGGTCTAGGACTAGCTTGTC3′
Col1	정방향	5′TGGTCTTGGAGGAAACTTTGC3′
	역방향	5′AGTATCTCCTTTGGCACCATC3′
VEGF	정방향	5′TGCACCCACGACAGAAGGGGA3′
	역방향	5′TCACCGCCTTGGCTTGTCACAT3′
VEGF R1	정방향	5'-CAGCCATGAATTTCACAGCC-3'
	역방향	5'-GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'

실험예 1. 계지 추출물의 조골세포 성장 촉진 활성 측정 (*in vitro*)

계지 추출물의 조골세포의 증식에 대한 영향은 WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정하였다 (cell counting kit-8, Dojindo molecular technologies, Tokyo, 일본). 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 $1x10^4$ 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주한 후, 실시예 1의 계지 추출물을 농도별 (0.01, 0,1, 1, 10, 100 ㎍/㎖)로 100 ㎕씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. 10 ㎕의 WST-8 (water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 가하고 2시간 더 배양하여 WST-8 포르마잔이 형성되어 발색되면 ELISA 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 시료처리군 흡광도의 %로 측정하여 도 1에 나타내었다.

상기 실험 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 계지 추출물은 0 내지 100 ㎍/㎖ 농도의 범위에서 3일 동안 Saos-2 세포의 생존율에 영향을 미치지 않아, 세포독성이 없는 안전한 약물임을 확인할 수 있었고, 또한 0.1 및 10 ㎍/㎖의 농도에서는 Saos-2 세포 생존을 유의성 있게 증가시킴을 확인하였다.

실험예 2. 알칼리 포스파타제 (ALP)의 활성 측정

혈청효소인 알칼리 포스파타제 (ALP; alkaline phosphatase)는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 조골 세포의 분화 중기에 생성된다 (Zhao Y et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), pp1371-1376, 2005). 조골세포의 분화에 계지 추출물이 변화를 미치는지 확인하기 위해서 ALP 활성을 측정하였다.

ALP 활성은 세포 내 ALP가 파라-니트로페닐포스페이트 (pNPP; p-nitrophenylphosphate)를 파라-니트로페놀 (p-nitrophenol)과 인산염 (phosphate)으로 분해하여 발색하는 정도를 키트 (ALP kit, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 이

용하여 측정하였다. 상기 실험예 1과 같이 처리하여 준비한 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 0.1 % 트리톤 X-100 (Triton X-100, Sigma, USA)으로 용해시키고, 초음파 기계 (Branson, USA)로 처리 후 12,000 g, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 반응 완충액 (reaction buffer)과 함께 37 ℃에서 3분간 배양한 후 0.1 N NaOH를 이용하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준선은 파라-니트로페놀 (p-nitrophenol; Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 사용하여 정량하였고, 이를 근거로 시료의 ALP 량을 환산하였다.

실험결과 하기 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 계지 추출물은 조골세포에 처리 3일 경과 후, 0.01 및 1 ㎍/㎖에서 뛰어난 ALP 활성을 나타냄을 확인한 바, 계지 추출물이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

실험예 3. 혈관 내피세포 성장인자 (VEGF) 및 혈관 내피세포 성장인자 수용체 (VEGF R1) 분비 및 활성 측정

혈관 내피세포 성장인자 (VEGF; vascular endothelial growth factor)는 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포의 분화 후기에 세포에 의해 합성되는 혈관생성촉진인자로, 계지 추출물이 VEGF의 분비에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 실시하였다.

48-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 $1x10^4$ 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후 각 웰에 계지 추출물을 농도별 (0 내지 100 ㎍/㎖)로 처리하고 72 시간 배양하였다.

3-1. 계지 추출물의 VEGF 분비 촉진 활성 측정

VEGF 발현량을 정량하기 위하여 상기 세포배양액을 수집하여 -70 ℃에 보관하였다. VEGF 정량은 ELISA 키트 (VEGF ELISA kit, R&D systems INC., MN, USA)를 이용하여 수행하였다. 항체가 표지된 키트의 플레이트에 상기 배양액을 100 ㎕씩 분주하여 반응시키고 인산염완충액 (PBS)으로 세척하여 퍼록시다제가 부착된 염소 항-마우스 면역글로불린G (peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, R&D systems INC., MN, USA)와 반응시키고 다시 세척하였다. 기질 (TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 이용하여 발색시키고 반응을 종료시킨 후 ELISA 판독기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 하기 도 3에 나타내었다.

실험결과 도 3에서 보여지는바와 같이, 본 발명의 계지 추출물은 혈관생성촉진인자인 VEGF 분비를 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 특히 낮은 농도에서도 유의적으로 VEGF 분비를 증가시킴으로서 계지 추출물이 혈관 생성을 촉진함을 확인할 수 있었다.

3-2. 계지 추출물의 VEGF 및 VEGF R1 유전자 발현 촉진 활성 측정

참고예 2의 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR; Reverse transcription polymerase chain reaction) 법을 이용하여 계지 추출물을 처리한 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2 세포의 VEGF, VEGF R1(Vascular endothelial growth factor Receptor 1) 유전자의 발현정도를 알아보았다.

도 4에 나타난 바와 같이, 배양 7일 후 VEGF 및 VEGF R1 유전자 발현은 0.1, 10 ㎍/㎖의 계지 추출물 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였다. 즉, 상기 결과로부터 계지 추출물이 성장인자 생성을 촉진 및 골형성 분화유전자의 활성을 촉진함을 확인할 수 있었다.

실험예 4. 골형성관련 유전자 발현 촉진 활성 측정

오스테오칼신 (osteocalcin; OCN), 오스테오폰틴 (osteopontin, OPN) 및 Ⅰ형 콜라겐 (Col I; type Ⅰ collagen)은 조골세포에서 분비되는 골기질로 OCN, OPN, Col I의 활성정도는 조골세포 증식의 판정요소가 되어 그 농도가 증가하면 골세포의 성장 및 분화가 활발함을 알려준다 (Collier FM et al,, *Endocrinology,* 139(3), pp1258-1267, 1998). 본 발명의 계지 추출물의 투여가 OCN, OPN, Col I의 활성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 하기와 같은 실험을 하였다.

48-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 $1x10^4$ 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후, 각 웰에 1 ㎍/㎖의 계지 추출물을 처리하고 14일간 배양하였다. 3일 간격으로 배양액을 교환하였으며, 3일째에 배양액을 수집하여 I형 콜라겐의 분비 활성을 측정하고, 3일, 7일 및 14일째 세포로부터 RNA을 추출하여 OCN, OPN 및 Col I 유전자의 발현정도를 RT-PCR하여 분석하였다.

그 결과, 도 4에서 보여지는 바와 같이 OCN, OPN, 및 Col I 유전자의 발현이 증가하였다. 즉, 상기 결과로부터 계지 추출물이 성장인자 생성을 촉진 및 골형성 분화유전자의 활성을 촉진함을 확인할 수 있었다.

실험예 5. 유효활성지표물질 신남산(Cinnamic acid)의 조골세포 증식 측정

조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 $1x10^4$ 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주한 후, 계지의 지표물질이 유효활성물질인지를 확인하기 위하여 지표물질 검색 후 HPLC 실시로 구조 분석하여 신남산임을 확인하고, 구입(구입처)한 신남산을 농도별 (0.01, 0,1, 1, 10, 100 ㎍/㎖)로 100 ㎕씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. 10 ㎕의 WST-8 (water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 가하고 2시간 더 배양하여 WST-8 포르마잔이 형성되어 발색되면 ELISA 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 시료처리군 흡광도의 %로 측정하여 도 5에 나타내었다.

상기 실험 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 계지로부터 분리된 신남산 0 내지 100 ㎍/㎖ 농도의 범위에서 3일 동안 Saos-2 세포의 생존율에 영향을 미치지 않아, 세포독성이 없는 안전한 약물임을 확인할 수 있었고, 또한 0.01 및 100 ㎍/㎖의 농도에서는 Saos-2 세포 생존을 유의성 있게 증가시킴을 확인하였다.

실험예 6. 신남산의 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 측정

혈청효소인 알칼리 포스파타제 (ALP; alkaline phosphatase)는 골 형성의 지표가 되는 효소로써 조골 세포의 분화 중기에 생성된다(Zhao Y et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8), pp1371-1376, 2005). 조골세포의 분화에 계지로부터 분리된 신남산이 변화를 미치는지 확인하기 위해서 ALP 활성을 측정하였다.

ALP 활성은 세포 내 ALP가 파라-니트로페닐포스페이트 (pNPP; p-nitrophenylphosphate)를 파라-니트로페놀 (p-nitrophenol)과 인산염 (phosphate)으로 분해하여 발색하는 정도를 키트 (ALP kit, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 상기 실험예 5와 같이 처리하여 준비한 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 0.1 % 트리톤 X-100 (Triton X-100, Sigma, USA)으로 용해시키고, 초음파 기계 (Branson, USA)로 처리 후 12,000 g, 4 ℃에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 반응 완충액 (reaction buffer)과 함께 37 ℃에서 3분간 배양한 후 0.1 N NaOH를 이용하여 반응을 정지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준선은 파라-니트로페놀 (p-nitrophenol; Sigma-Aldrich Co., MO, USA)을 사용하여 정량하였고, 이를 근거로 시료의 ALP 량을 환산하였다.

실험결과 하기 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 계지로부터 분리된 신남산은 조골세포에 처리 3일 경과 후, 0.01 내지 100 ㎍/㎖에서 뛰어난 ALP 활성을 나타냄을 확인한 바, 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

실험예 7. 랫트에 대한 경구투여 반복투여 독성실험

6주령의 특정병원부재 (SPF) SD계 랫트를 사용하여 반복투여 독성실험을 다음과 같이 실시하였다.

군당 6 마리씩의 동물에 실시예 1의 계지 추출물을 0.5 % 메틸셀룰로스 용액에 현탁시켜 2 g/kg의 용량으로 1일 1회 2주간 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 동물의 폐사 여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하고 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명에 따른 계지 추출물은 모든 랫트에서 2000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않으며 경구 투여 최소 치사량 (LD_{50})은 2000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

하기에 본 발명의 추출물을 함유하는 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

제제예 1. 산제의 제조

계지 추출물 20 mg

유당 100 mg

탈크 10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

계지 추출물 10 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

제제예 3. 캅셀제의 제조

계지 추출물 10 mg

결정성 셀룰로오스 3 mg

락토오스 14.8 mg

마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

제제예 4. 주사제의 제조

계지 추출물 10 mg

만니톨 180 mg

주사용 멸균 증류수 2974 mg

Na_2HPO_4,$12H_2O$ 26 mg

통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2㎖) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

제제예 5. 액제의 제조

계지 추출물 20 mg

이성화당 10 g

만니톨 5 g

정제수 적량

통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

제제예 6. 건강 식품의 제조

계지 추출물 1000 ㎎

비타민 혼합물 적량

비타민 A 아세테이트 70 ㎍

비타민 E 1.0 ㎎

비타민 B1 0.13 ㎎

비타민 B2 0.15 ㎎

비타민 B6 0.5 ㎎

비타민 B12 0.2 ㎍

비타민 C 10 ㎎

비오틴 10 ㎍

니코틴산아미드 1.7 ㎎

엽산 50 ㎍

판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

무기질 혼합물 적량

황산제1철 1.75 ㎎

산화아연 0.82 ㎎

탄산마그네슘 25.3 ㎎

제1인산칼륨 15 ㎎

제2인산칼슘 55 ㎎

구연산칼륨 90 ㎎

탄산칼슘 100 ㎎

염화마그네슘 24.8 ㎎

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.

제제예 7. 건강 음료의 제조

계지 추출물 1000 ㎎

구연산 1000 ㎎

올리고당 100 g

매실농축액 2 g

타우린 1 g

정제수를 가하여 전체 900 ㎖

통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

발명의 효과

본 발명에 따른 계지 추출물은 혈관세포 증식, 이동, 분화 및 성장인자의 분비 촉진에 의한 혈관형성 촉진 활성을 나타내며, 조골세포의 증식 및 분화 촉진, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 촉진, 혈관 내피세포 성장인자 (VEGF) 분비 촉진 및 혈관 내피세포 성장인자 수용체 (VEGF R1) 활성 촉진 활성을 가지므로, 골절의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 계지 추출물 처리 시 조골세포 (Saos-2)의 생존 정도를 나타낸 도이고,

도 2는 계지 추출물 처리 시 알칼리 포스파타아제 (ALP) 활성 정도를 나타낸 도이며,

도 3은 계지 추출물 처리 시 조골세포 (Saos-2)에서 혈관생성촉진인자 (VEGF)의 분비 활성을 나타낸 도이며,

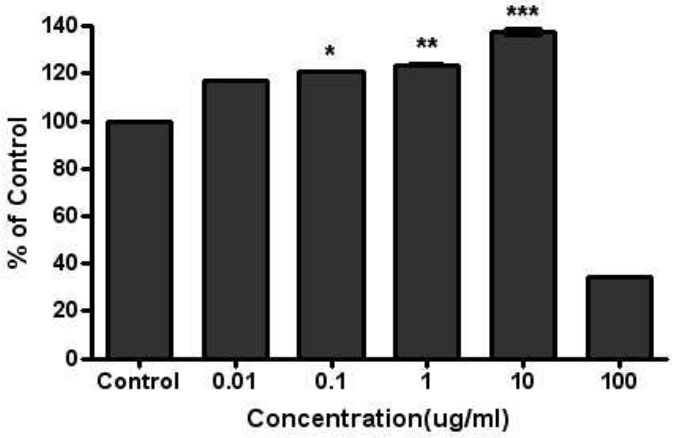
도 4는 계지 추출물 처리 시 조골세포 (Saos-2)에서 VEGF, VEGF R1, OCN, OPN, 및 Col I 유전자의 발현 정도를 나타낸 도이고,

도 5는 계지의 유효활성지표물질인 신남산 처리 시 조골세포 (Saos-2)의 생존 정도를 나타낸 도이며,

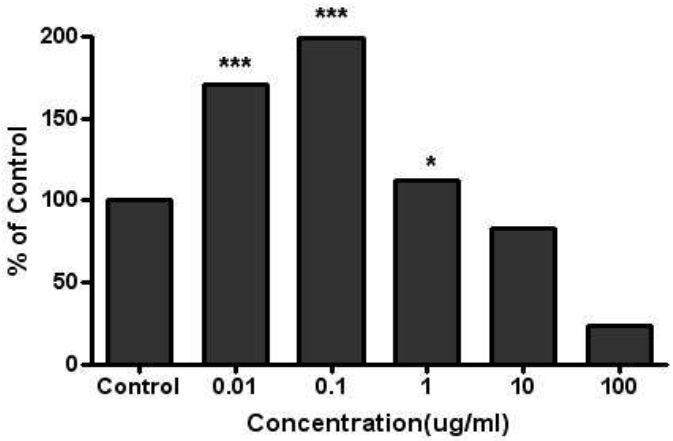
도 6은 계지의 유효활성지표물질인 신남산 처리 시 알칼리 포스파타아제 (ALP) 활성 정도를 나타낸 도이다.

도면

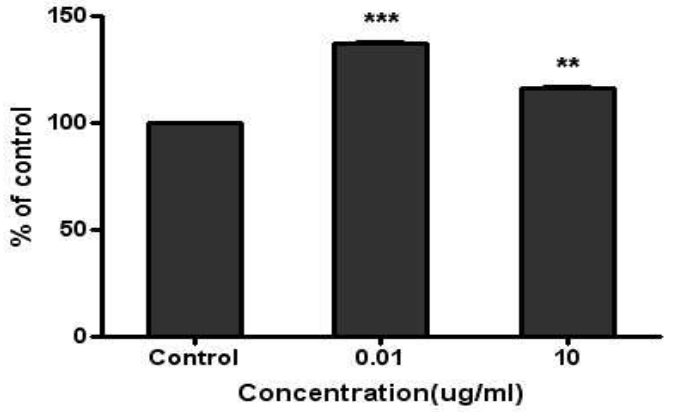
도면1


140
120
100
80
60
40
20
0
% of Control
*
**
***
Control
0.01
0.1
1
10
100
Concentration(ug/ml)

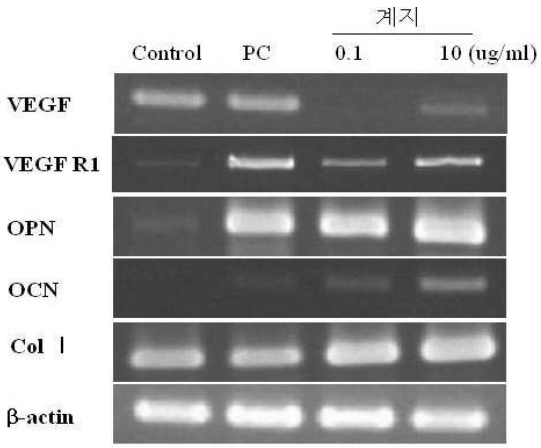
도면2


200
150
100
50
0
% of Control
***
***
*
Control
0.01
0.1
1
10
100
Concentration(ug/ml)

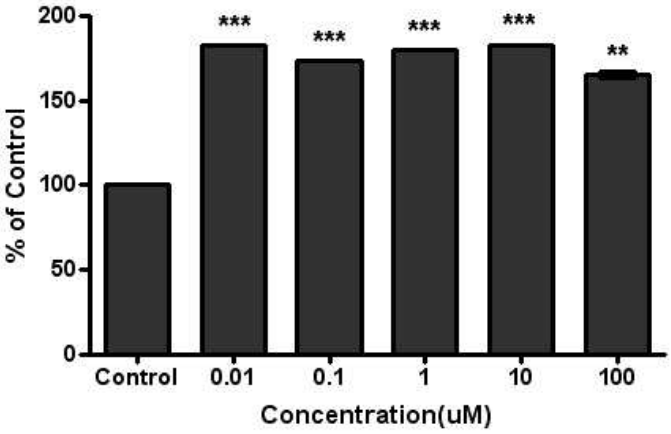
도면3


150
100
50
0
% of control
***
**
Control
0.01
10
Concentration(ug/ml)

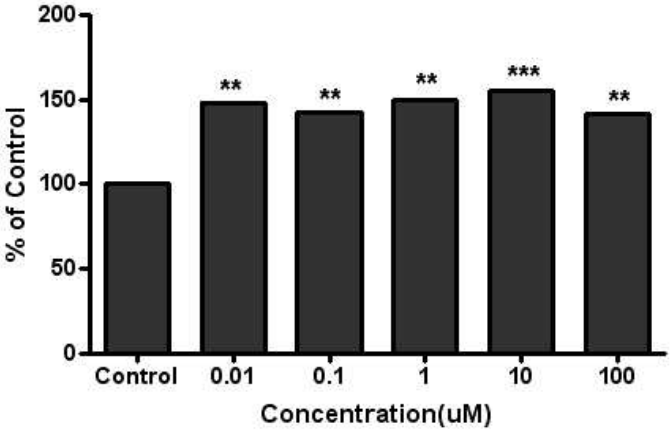
도면4



도면5



도면6



서열목록

서열목록 전자파일 첨부