



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0150830
(43) 공개일자 2022년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/21 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 15/12 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/21 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0054561
(22) 출원일자 2022년05월03일
심사청구일자 2022년05월03일
(30) 우선권주장
1020210057584 2021년05월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이궁주
세종특별자치시 남세종로 160, 107동 1001호 (새
나루마을 1단지, 집현동)
(74) 대리인
이원희

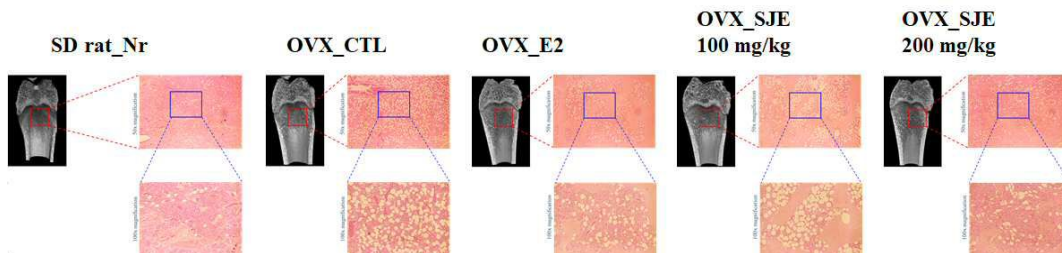
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **칠면초 추출물을 함유하는 갱년기 질환 및 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 대표적인 염생식물 중 하나인 칠면초(*Suaeda japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 및 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물 에 관한 것이다. 구체적으로 에스트로겐이 감소하는 갱년기 여성의 에스트로겐 합 성을 증가시키고, 골 중량 및 골밀도를 증가시키며, 혈액 내 칼슘의 배출을 감소시 킴으로써, 여 성 갱년기 증상 및 골다공증을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

A61P 15/12 (2018.01)

A61P 19/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/302 (2013.01)

A23V 2200/306 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113846
과제번호	2020R1A2C1015119
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견기초연구사업
연구과제명	크리스퍼 기반 토마토 IgE형 알레르기 유발물질 생성 Lcy e 유전자 편집기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.04.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

칠면초 (*Suaeda japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 골다공증은 에스트로겐 감소에 의한 골다공증인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 칠면초의 잎, 줄기, 열매 또는 뿌리 추출물인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 물, C1 내지 C2 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈중 에스트로겐의 농도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈중 칼슘 배출을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈중 DPD(deoxypyridinoline) 및 CTX-1(Type I Collagen Cross-Linked C-Telopeptide)를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈중 Osteocalcin 및 PINP(aminoterminal propeptide of type I procollagen)을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈중 LTB₄(Leukotriene B₄) 및 5-LOX(5-Lipoxygenase)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 관절 내 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 관절 내 COX-2 및 NOS-2의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 관절 내 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 혈청 내 RANKL(Receptor activator of nuclear factors κ B ligand)/OPG(osteoprotegerin)비율을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 피질 두께 및 소주골 면적을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 16

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 파골 세포 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 17

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 대퇴골의 골밀도, 골 용적비, 뼈 잔기둥 수 및 뼈 잔기둥 간 거리를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 18

칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강 기능식품 조성물.

청구항 19

칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료 용 약학적 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 갱년기 질환은 안면홍조, 발한, 불면증, 우울증, 신경과민, 피로감, 관 절통, 근육통, 두통, 가슴 두근거림, 질 분비물 감소, 방광염, 배뇨통, 집중장애, 단기 기억장애, 기억력 감퇴, 체중 및 체지방 증가, 지방간, 복부 비만, 관절염, 또는 갱년기성 심혈관계 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 21

칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선 용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칠면초 추출물을 함유하는 골다공증 및 여성 갱년기 질환 의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 여성의 갱년기는 40대 후반부터 난소의 기능이 저하되어 여성호르몬의 분비가 감소되고 여러가지 신체적 정신적 변화 및 증세가 일어나며 폐경기 이후의 시기로 이행되는 기간을 말한다. 갱년기 기간은 평균 4 내지 7년 정도이며, 대한폐경학회에 따르면 우리나라 50대 여성 중 약 89%가 갱년기 증상을 겪는다고 한다. 갱년기가 시작되면 난소 기능의 저하 및 실조로 난소에서 분비되는 여성 호르몬이 감소하게 되고, 호르몬의 변화가 극심하게 일어나는데, 특히 여성 호르몬인 에스트로겐의 수준이 감소하게 되어 이로 인한 여러 가지 증상들이 나타나게 된다.

[0004] 여성 갱년기의 대표적인 증상으로는, 생리 주기, 생리 기간 및 생리 량 등이 불규칙해지고, 주로 얼굴 및 상체에서 화끈 달아오르는 안면 홍조 증상이 나타나고, 땀이 많이 나고 가슴이 두근거리며, 외음부가 건조해지고 질 점액 분비가 감소되는 등 생식기의 위축이 오게 되어, 소변 횟수가 늘어나거나 배뇨시 통증을 느끼기도 한다.

그 외, 고혈압, 소화기 장애, 수면장애, 두통, 기억력 감퇴, 기분 변화, 우울증 등의 증상이 나타날 수 있으며, 특히 에스트로겐의 감소로 인하여 뼈에서 칼슘이 빠져나가 뼈의 질량이 감소하고, 구멍이 많아져 골손실이 증가하므로 골다공증의 발병률이 높아지게 된다.

[0006] 골다공증 (Osteoporosis)은 여러 가지 원인에 의하여 뼈의 질량이 감소하고, 뼈 조직의 미세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환이다. 특히, 골다공증은 뼈를 구성하는 미네랄 (특히 칼슘)과 기질이 감소한 상태이며, 골재형성의 균형이 깨져서 파골작용이 조골작용보다 증가된 상태에서 발생한다. 정상적인 뼈의 내부는 그물망처럼 치밀한 구조를 이루고 있으나, 골다공증의 경우에는 구조 사이의 간격이 넓어지고 미세구조가 얇아져 약해짐으로써 조그만 충격에도 뼈가 쉽게 골절될 수 있는 상태로 진행된다. 갱년기 골다공증의 가장 적절한 치료 시기는 골다공증이 발생하기 전 상태인 골부족증 단계이거나 갱년기의 초기이며, 골밀도 검사에서 정상 골밀도 소견을 보여도 골표지자 검사에서 골교체율이 증가되어 있으면 향후 골다공증이 발생할 가능성이 많으므로, 예방 치료를 하는 것이 좋다.

[0008] 갱년기 골다공증의 일차 치료 약물은 여성 호르몬제였으나 최근 연구들에서 여성호르몬 대체요법의 부작용 (유방암 또는 심혈관 질환 발생 증가)이 다수 보고되어 그 사용이 많이 주저되고 있는 실정이다. 호르몬제 복용이 불가능한 경우 비스포스포네이트 (Bisphosphonate) 제제, Selective estrogen receptor modulators (SERM) 등의 약물이 있으나, 비스포스포네이트제제의 경우 제제 사용과 함께 충분한 칼슘 섭취가 안되면 골연화 증상이 올 수 있고, SERM의 경우, 심혈관 질환과 유방암을 예방하는 효과는 있으나, 골밀도 증가 효과가 다소 떨어지고, 갱년기 증상을 더 악화시킬 수 있다는 문제점이 있다.

[0010] 이에 따라, 이소플라본, 플라보노이드, 리그난 등의 에스트로겐과 기능 및 구조가 유사한 식물 유래의 천연 에스트로겐인 피토에스트로겐 (phytoestrogen)에 대한 관심이 높아지고 있다. 또한, 상기 이소플라보노이드와 같은 천연 화합물이 선택적 에스트로겐 수용체 조절제로 작용한다는 증거가 늘어남에 따라 갱년기 장애를 예방, 개선 및 치료하기 위한 후보 물질로서 천연물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0012] 따라서, 갱년기 여성에 있어서 상기 조절제와 같은 활성을 지니면서도, 갱년기 장애를 개선하는 피토에스트로겐을 포함하는 보다 안전하고 효과적인 골다공증 및 여성 갱년기 질환의 치료제 개발이 필요하다. 그러나 갱년기 장애는 에스트로겐 분비 감소로 인한 포도당 대사, 지질 대사, 골 항상성 및 에너지 대사에 대한 복합적 장애를 포함하는 것이므로, 이 중 하나의 장애를 개선하더라도 다른 장애를 개선하는 효과가 나타나지 않는다면 전반적인 갱년기 증상 개선 효과를 기대하기 어렵다.

[0014] 최근, 천연물 유래 생리활성물질을 이용한 경우, 부작용이 적어 안전하며, 골질환 치료에 효과적인 골다공증 및 여성 갱년기 질환 치료제에 대한 연구가 진행되고 있다. 해양자원이 풍부한 우리나라의 지리적 환경 특성상 바닷가 염류지역 식물에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 서해안 지역의 해안가에 풍부하게 분포되어 있는 염습지 또는 염류토양에 자생하는 염생식물은 기능성 식품 또는 의약 및 미용 소재로 활용되고 있다.

[0016] 염생식물은 바닷가나 염분이 있는 호숫가 및 암염이 있는 지대, 즉 염류가 함유된 토지에서 생육할 수 있는 식물로, 담수와 해수가 교차하는 횡수가 많아 염분 농도가 계속 변하는 극한 생육환경에서 서식하기 때문에 생물학적으로 이용 가능성이 높은 2차 대사 산물이 다른 생물 종보다 풍부할 것이라고 여겨지며, 육상 식물과 해상 식물이 가진 다양한 생리활성 물질들을 동시에 포함할 것이라 추정되고 있다. 또한, 세포 안에 많은 미네랄이 들어 있어서 삼투압이 높기 때문에 토양 용액의 흡수가 필요할 때에도 물을 빨아들일 수 있는 특징을 지니고 있으며, 고농도 염류 환경에서 자라 기존의 식량 작물들과 토지 경합을 하지 않으면서도 유용한 자원을 만드는 바이오 연료와 사료 작물 후보로 주목을 받고 있어, 미래의 해수 농업, 내염성 작물 육종 등 지속가능한 농업을 위한 소재로 기대되고 있다.

[0018] 칠면초(*Suaeda japonica*)는 명아주과(*Chenopodiaceae*)에 속하는 일년생 초본식물로 바닷가 갯벌이나 고농도의 염류 토양에서 군락을 이루고 자라는 호염성 식물이며, 줄기는 높이 20 내지 50cm 정도로 곧게 자라며 곧봉 모양의 방망이처럼 생긴 잎이 어긋나게 달린다. 꽃은 늦여름에서 초가을에 걸쳐 녹색으로 피며 점차 자주색으로 바뀐다. 어린 순을 나물로 식용하며, 항산화 물질이 많이 들어있으며, 바닷물 속에 포함되어 있는 각종 미네랄이 다량 함유되어 있는 것으로 보고 되어 있다. 칠면초는 함초보다 Na^+ 함량은 적은 반면 Ca^{2+} , Fe^{2+} 및 Mn^{2+} 함량은 더 많이 함유되어 있다. 칠면초는 식물성 소금 및 천연 염료로써 이용되고 있으며 한방에서는 뿌리를 제외한 식물 전체를 약재로 사용하는데, 해열 효과가 있다고 알려져 있다. 한편, 칠면초에 대한 연구로는 한국등록특허 제1261029호에 칠면초를 포함하는 당뇨병 예방 또는 개선용 조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제10-2019-0061158호에 칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물이 개시되어 있다.

[0020] 본 발명자들은 칠면초 추출물을 이용하여 갱년기 증상 및 골다공증을 개선하기 위한 천연물 소재를 연구하던 중, 칠면초 추출물이 에스트로겐 결핍에 의한 혈청 내 칼슘 농도를 감소시키고, phosphorus 및 에스트로겐의 활성을 증가시키며 염증인자 및 골 흡수 표지자를 감소시키고, 파골세포의 활성을 감소시키며, 대퇴골의 골밀도, 골 용적비, 뼈 잔기둥 수 및 뼈 잔기둥 간 거리를 증가시키는 것을 확인함으로써, 칠면 초 추출물이 갱년기 증상 및 골다공증 예방 또는 치료 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명의 목적은 칠면초 추출물의 여성 갱년기 증상 및 골다공증의 치료용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 칠면초 (*Suaeda japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 질 환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명은 칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 질 환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 칠면초 추출물은 여성 갱년기 호르몬 변화로 인한 에스트로겐 감소를 완화시키고, 혈중 칼슘 배출을 완화시켜 골 밀도를 증가시킴으로써, 여성 갱년기 질환 및 골다공증의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도1은 칠면초 추출물 투여에 의한 갱년기 동물 모델의 몸무게 변화를 나타낸 그래프이다.

도2는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 식이 효율 및 식이 섭취량을 나타낸 그래프이다.

도3은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈액에서 백혈구 수준을 나타낸 그래프이다.

도4는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 Triglyceride, Total cholesterol, LDL 및 HDL 수준을 나타

낸 그림이다.

도5는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈청 내 GOT, GPT 및 크레아틴(Creatine)의 수준을 나타낸 그래프이다.

도6은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈청 내 칼슘 농도를 나타낸 그래프이다.

도7은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈청 내 LTB4(Leukotriene B4), DPD(deoxypyridinoline) 및 5-LOX(5-Lipoxygenase)의 수준을 나타낸 그래프이다.

도8은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈청 내 Osteocalcin, PINP(aminoterminal propeptide of type I procollagen) 및 CTX-1(Type I Collagen Cross-Linked C-Telopeptide)의 수준을 나타낸 그래프이다.

도9는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 혈청 내 Phosphorus, Estradiol(E2) 및 Pyridinoline의 수준을 나타낸 그래프이다.

도10은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 관절 내 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 유전자 발현 수준을 나타낸 그래프이다.

도11은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 관절 내 COX-2 및 NOS-2의 유전자 발현 수준을 나타낸 그래프이다.

도12는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 관절 내 MMP2 및 MMP9의

단백질 발현 수준과 혈청 내 OPG, RANKL의 수준 및 RANKL/OPG의 비율을 나타낸 그래프이다.

도13은 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 대퇴골에서 피질두께(cortical thickness), 소주골면적(trabecular bone area) 및 골 밀도(bone mineral density)의 변화를 보여주는 그림이다.

도14는 칠면초를 투여한 갱년기 동물 모델의 대퇴골에서 Tartrate acid phosphatase(TRAP)로 염색되는 파골세포의 활성을 보여주는 그림이다.

도15는 칠면초 추출물을 투여한 갱년기 동물 모델의 대퇴골에서 경골(tibia) 근위부의 골밀도와 구조적 변수들의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 칠면초 (*Suaeda japonica*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상 및 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 칠면초 추출물은 하기의 단계를 포함하는 제조방법에 의하여 제조될 수 있다:

1) 칠면초에 추출용매를 가하여 추출물을 제조하는 단계;

2) 단계1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

3) 단계 2)의 여과된 여과물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

상기 제조방법에서, 상기 단계 1)의 칠면초는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한없이 사용할 수 있다. 또한, 칠면초의 잎, 줄기, 뿌리, 열매, 씨앗 등 모든 부위를 포함할 수 있다.

상기 칠면초는 생 칠면초, 건조 칠면초 등을 모두 포함할 수 있고, 구체적으로는 건조 칠면초일 수 있다. 또한, 상기 칠면초는 통 칠면초, 세절 칠면초 또는 칠면초의 분말일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0045] 상기 추출용매는 물, 알코올 또는 이의 혼합물일 수 있다. 상기 알코올은 C1 내지 C2의 알코올일 수 있고, 구체적으로 상기 알코올은 에탄올 또는 메탄올일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 상기 추출용매는 추출에 사용되는 칠면초의 중량 1g당 5 내지 100mL 의 양으로 첨가될 수 있고, 5 내지 50mL로 첨가될 수 있고, 바람직하게는 5 내지 20mL로 첨가될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 상기 제조방법에서, 추출온도는 50 내지 100 ℃일 수 있고, 70 내지 90 ℃인 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 상기 추출방법은 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출일 수 있다. 이때, 추출 시간은 1 내지 12시간일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 상기 제조방법에서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진 공회전증발기를 이용할 수 있다. 또한, 상기 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분문 건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하지만, 이에 제한되지 않는다. 여성 갱년기 증상은 월경이 중단되는 시기인 갱년기에 생기는 다양한 이상 증상들을 의미하며, 대체로 난소 기능 저하로 인한 호르몬 불균형에 의해 여 생기게 된다. 상기 여성 갱년기 증상은 에스트로겐 분비 감소로 인한 증상을 나타내며, 상기 증상은, 안면홍조, 발한, 불면증, 우울증, 신경과민, 피로감, 관절통, 근육통, 두통, 가슴 두근거림, 질 분비물 감소, 방광염, 배뇨통, 집중장애, 단기 기억장애, 기억력 감퇴, 체중 및 체지방 증가, 지방간, 복부 비만, 골다공증, 관절염, 또는 갱년기성 심혈관계 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 또한 상기 갱년기 증상은 갱년기가 아니더라도 난소 절제, 난소 기능 저하 등의 원인으로 인한 에스트로겐 결핍 환자에서도 나타날 수 있다.
- [0056] 갱년기의 여성은 여성호르몬의 분비가 줄어들면서 혈중 지질이 증가 하게 되어 남성보다 낮았던 심혈관 질환의 위험이 남성과 비슷해진다. 혈중 지질의 주요 성분은 콜레스테롤과 중성지방이다. 에스트로겐은 LDL (저밀도 콜레스테롤) 수용체를 상향 조절함으로써 LDL 농도를 낮추는 작용을 하는데, 에스트로겐의 결핍이 생기면 LDL 수용체의 발현이 감소하여 LDL 농도가 증가하고, 또한, 복부 지단백 리파아제의 활성을 증가시켜 유리지방산과 중성지방이 증가하게 된다. 폐경 후 여성은 지질대사나 체지방 분포의 변화, 인슐린 작용, 동맥혈관벽 및 혈전 용해에 대한 에스트로겐의 작용이 소실되면서 대사증후군의 발생이 증가하게 된다.
- [0058] 골다공증은 여러가지 원인에 의하여 골량이 감소하고, 골 조직의 미 세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로, 특히 골을 구성하는 미네랄 (특히 칼슘)과 기질이 감소한 상태이며, 골 내부의 구조 사이 간격이 넓어지고, 미세구조가 얇아져 약해진 상태를 말한다.
- [0059] 골량은 30대 초까지 증가하다가 점차 감소하기 시작한다. 정상적인 골량의 감소는 개인에 따라 그 정도가 다르지만 병적으로 과도하게 감소하여 골량 이 골절 한계치 이하로 떨어지게 되면 가벼운 충격에도 쉽게 골절이 생기게 된다. 여성의 경우 50세 전후 폐경이 되면서 매우 빠른 속도로 골량이 줄어들게 되어 폐 경 후 3 내지 5년 내에 골밀도의 소실이 가장 빠르게 일어난다.
- [0060] 우리 몸의 뼈는 흡수되고 생성되는 재형성 과정을 반복하는데, 골다 공증은 이런 골형성과 골흡수 과정의 균형 이 깨져서 생기는 것이라 할 수 있다. 즉, 골흡수 속도가 너무 빨라지거나 골형성 속도가 느려져 골 생성량을 따라가지 못하면 뼈가 점점 엉성해지고 얇아지는 것이다. 폐경기 여성은 에스트로겐의 급격 한 감소 때문에 뼈의 흡수 속도가 더욱 가속화되어 많은 골량의 손실이 나타날 수 있다. 일반적인 골 손실은 매년 전체 골량의 1% 정도이지만 폐경기 초기에는 3 내 지 5%까지 골손실이 일어난다. 이러한 현상은 척추, 대퇴골, 손목뼈 등에서 특히 심하게 나타나고 문제가 된다.
- [0061] 혈중 에스트로겐은 뼈를 파괴하는 파골세포의 분화를 억제하고, 파골세포의 자연사를 촉진해서 뼈의 흡수를 억

제하며, 뼈를 만드는 조골세포의 분화를 촉진하고, 조골세포의 자연사를 억제해서 골형성을 유지하여 결국 뼈를 보호하는 역할을 한다.

- [0062] 따라서, 에스트로겐이 결핍되면 파골세포의 수명이 연장되고 그 수가 2 내지 3배 증가하게 되며, 결국 소주골이 얇아지면서 천공으로 인하여 연결성 이 감소되고 피질골에서는 피질골이 얇아지게 된다. 에스트로겐의 결핍은 조골세포뿐만 아니라 조골세포의 세포사멸도 증가시켜 골형성을 감소시키고 골세포의 골세포를 통한 신호전달 체계의 장애로 인하여 뼈의 재생능력이 약화된다.
- [0063] 혈중 칼슘 농도는 골흡수와 관련이 있는데, 에스트로겐의 결핍은 골 흡수를 촉진하는 염증 매개인자(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)의 생성을 촉진하게 되어 혈중 칼슘 농도를 증가시키게 되고, 이로 인해 칼슘 흡수 저하가 나타나게 된다. 칼슘의 흡수가 저하되면 골 형성 촉진인자의 생산감소로 골 형성이 부족하게 된다.
- [0064] 오스테오칼신 (Osteocalcin)은 뼈에서 가장 많이 생산되는 매트릭스 단백질 중 하나로서, 조골세포에서 생산되는 비콜라겐성 골기질 단백질이며, 조골활성도에 매우 특이적인 표지자로 알려져 있다.
- [0065] 디옥시피리디놀린 (deoxyypyridinoline, DPD)은 세포의 기질에서 콜라겐 사슬을 안정시키는 작용을 하는 교차결합물이며, 파골세포에 의하여 교원질이 분해되면서 유리되어 새로 합성된 교원질로부터는 생성되지 않고 이후 더 이상 대사를 거치지 않으므로, 직접적인 골흡수 지표로 사용된다.
- [0066] GOT (Glutamate Oxaloacetate Transaminase) 및 GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase)는 간에 다량 분포하여 간세포 손상 시 혈청 중의 농도가 현저히 상승하므로 그 활성도는 간 질환의 지표가 된다. 크레아틴 (creatinine)은 신장을 통해 배출되는 물질로, 신장 기능의 이상을 감지하는 지표로 사용 된다.
- [0067] LTB4(Leukotriene B4)는 염증의 매개체이며, 관절염, 건선, 심근경색, 과민성 장 질환 및 기타 많은 다른 질환과 같은 질환에서 결정적인 역할을 하는 것으로 보고 되었다. 5-LOX(5-Lipoxygenase)는 주요 염증 매개체 생산 조절에 의한 통증과 같은 염증성 질환들의 병태생리학에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 왔다. 혈중 PINP 수치는 뼈 형성 표지자로 혈 중에 높게 존재할 경우 뼈 형성이 원활하게 일어나고 있음을 의미한다.
- [0068] Receptor activator of nuclear factors κ B ligand (RANKL)는 파골세포의 세포막에 존재하는 수용체인 receptor activator of nuclear factors κ B (RANK)에 결합하여 파골세포가 뼈흡수 과정을 수행하게 하는 대표적인 파골세포 자극물질이다. 반면 osteoprotegerin (OPG)은 RANKL에 대한 가용성 유인 수용체(soluble decoy receptor)로 RANKL이 RANK에 결합하는 것을 방해하여 파골세포의 성숙과 활성화를 차단함으로써 뼈 흡수를 억제하는 물질로 알려져있다
- [0070] 갱년기 여성들에서 골다공증과 더불어 많이 나타나는 증상은 관절통, 요통 등의 근골격계 증상이다. 에스트로겐은 연골의 손상을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 많은 임상 연구에서 골 관절염이 에스트로겐의 수준과 관련이 있다고 보고하였다.
- [0071] 연골 파괴과정에서는 염증 관련 사이토카인 분비량이 증가하며, 활액 내에서의 염증반응도 활성화되어 아라키돈산으로부터 Prostaglandin E2 (PGE2) 및 Nitric oxide (NO)의 합성을 유도하는 COX-2 및 NOS-2의 발현이 증가하게 된다.
- [0072] 세포외 기질분해효소 중 특히 metalloproteinase (MMP)의 합성과 활성이 증가하면 염증이 연골에서 세포 외 바탕질의 조직화를 파괴한다. 연골표면 위에 관누스(pannus) 형성으로 MMP에 의한 효소분해를 통해 세포 외 바탕질 안으로 윤활막 침입 부위를 자리 잡게 되며, MMP의 계속되는 분비와 활성화로 연골은 완전히 붕괴되고 관절은 불안정해진다.
- [0073] 특히, MMP-2, MMP-9는 주로 골아세포와 파골세포에서 발현되는데 뼈 의 구조 및 생체 역학적 특성에 차별적으로 영향을 미치며, 젤라틴과 콜라겐을 분해하는 능력을 가지고 있다.
- [0074] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0075] 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크

로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제

[0076] 등을 첨가하여 조제될 수 있다.

[0078] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 과제의 기제로는 위캡슐, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0079] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0080] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성, 환자의 골 손실 정도와 같은 요인들에 따라 다르며, 당 업자에 의하여 적절하게 선택될 수 있고, 구체적으로 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1 회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0081] 본 발명의 "투여 대상"은 인간, 원숭이, 소, 말, 돼지, 양, 닭, 고양이, 개, 마우스, 토끼 등을 포함하지만, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 본 발명은 칠면초 추출물을 유효성분으로 함유하는 갱년기 증상 및 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0084] 본 발명의 용어 "건강기능식품"이란, 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 또는 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분 (기능성 원료)을 사용하여 제조하는 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리 기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품을 의미하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 본 발명의 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0086] 구체적인 실시예에서 본 발명자들은 칠면초 추출물이 에스트로겐 결핍에 의한 혈청 내 칼슘 농도를 감소시키고 (도 6) 염증인자인 LTB4 및 5-LOX와 골흡수 표지자인 DPD를 감소시키고(도 7), 골 형성에 관련된 호르몬인 오스테오칼신 및 PINP를 증가시키고 골 흡수 표지자인 CTX-1을 감소시키며(도 8), 혈청 내 phosphorus 및 에스트로겐의 활성을 증가시키고, 골 흡수 표지자인 Pyridinoline의 혈청 내 발현을 감소시키며(도 9), 관절 내 염증 매개 인자의 유전자 발현(도 10 및 11) 및 젤라틴과 콜라겐을 분해하는 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 감소시키며, RANKL/OPG 비율을 감소시키고(도 12), 피질 두께 및 소주골 면적을 증가시키며(도 13), 파골세포의 활성을 감소시키고(도 14), 대퇴골의 골밀도, 골 용적비, 뼈 잔기둥 수 및 뼈 잔기둥 간 거리를 증가시키는 것(도 15)을 확인하였다.

[0088] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0090] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0092] 실시예 1. 칠면초 추출물의 제조

[0094] 건조 후 분쇄한 칠면초 1kg에 70% (v/v) 에탄올 수용액 15L를 첨가하여 교반한 후, 환류추출기(heating Mantle, MS-DM609/20L)를 사용하여 85℃에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 그 후 왓츠만 여과지 No5A로 여과하여 여액을 얻은 다음 회전 진공증발기(Rotavapor R-121, Buchi, Switzerland)로 감압농축하고, 농축물을 동결건조기 (PF-

10/ALPHA 1-2LD, 독일)에 넣고 챔버 온도 -45℃ 진공압력 10 Torr 이하에서 72시간 동안 건조하여 칠면초 추출물 분말 112g을 수득하였다. 수득된 칠면초 추출물 분말은 냉동보관하면서 실험을 위한 시료로 사용하였으며, 실험 시 랫드(rat) 투여를 위해 생리식염수에 현탁시켰다.

- [0096] 실험예 1.
- [0098] 1-1 실험동물의 사육
- [0100] 실험동물은 7 주령의 SD 랫드를 일본에서 구입하였다. 암컷 SD 랫드 (7-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 12 일간 순화시킨 후 사용하였으며 온도 (20-25oC)와 습도(40-45%)를 조절한 사육실에서 polycarbonate cage 당 5 마리씩 총 35마리를 사육하였다. 명암주기는 12 시간 : 12 시간으로 조절하였으며, 사료 (Calcium Deficient Diet, MP Biomedicals제 0296017710, 칼슘결핍 식이를 이용하 여 골다공증 유발을 촉진함)와 물은 자유롭게 공급하였다.
- [0102] 1-2 실험동물의 난소절제술 (Ovariectomy)
- [0104] 난소는 좌우 신장의 아래쪽으로 지방 조직에 싸여 있는 한 쌍의 기관이다. 위쪽은 난소 정맥, 하부는 수란관을 통해 자궁에 연결되어 있다. 난소절제 동물은 주로 갱년기, 골다공증 및 내분비 연구에 사용된다.
- [0105] 실험동물들의 폐경기를 유도하기 위해, 양측 난소를 적출하였으며 나머지 정상동물 (SD rat)은 양측 난소를 적출하지 않은 난소 비적출군이였다. 실험물질은 1 주일의 회복기 후 투여를 시작하였으며, 행동학적 소견과 체중을 기준으로 하여, 난소적출 1 주일 후 반수의 동물을 선택하여 실험에 사용하였다.
- [0106] 난소 적출군은 Ketamine hydrochloride (ICN Biochemicals Inc., USA)와 Xylazine hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)의 마취 하에 개복 후 마지막 늑골에서 약간 뒤쪽에 있는 복부의 중간 아랫부분을 10mm 정도로 피부를 절개하였다. 이어 절개 부분을 벌려서 고정한 후, 난소 위 지방질 층의 혈관 아래의 수난관 부위에 5-0 견사로 결찰하여 소일자가위로 난소를 절제하였으며, 난소 비적출군에서는 양측의 난소를 노출시킨 뒤 제거하지 않고 복강을 폐쇄하였다.
- [0108] 1-3 칠면초 추출물의 경구투여
- [0110] 상기 실시예 1에서 추출한 칠면초 추출물의 효과를 측정하기 위하여, 랫드들을 무작위로 5개의 군으로 나누었다.
- [0111] SD_Nr: 정상군
- [0112] OVX-CTL: 난소절제 대조군
- [0113] OVX-E2: 17 β -estradiol(E2)를 투여한 양성대조군
- [0114] OVX-SJE 100 mg/kg : 칠면초 추출물 (SJE)100 mg/kg 투여군
- [0115] OVX-SJE 200 mg/kg : 칠면초 추출물 (SJE)200 mg/kg 투여군
- [0117] 칠면초 추출물 (SJE, 100 mg/kg, 200 mg/kg)을 증류수에 녹여 체중 kg 당 0.2ml의 용량으로, 난소 적출 1 주일 후부터 15 주간 경구용 zonde가 부착된
- [0118] 3 ml syringe를 이용하여 투여하였으며, 대조약물로 17 β -estradiol(E2)는 0.03 ug/sc의 용량으로 등부 부위에

피하주사하였다.

[0120] 1-4 체중 변화

[0122] 수술 당일, 난소 적출 1주일 후, 투여 시작일 및 최종 희생일을 포함하여 투여 기간 동안 1주일 간격으로 체중을 측정하였다. 투여 시작 시와 최종 희생 시 사료섭취에 의한 오차를 줄이기 위하여, 모든 실험동물을 절식(약 18 시간) 시켰으며, 회복기(recovery period ; Gain_I) 및 투여기(dosing period ; Gain_II) 동안의 체중 변화(증체량)를 계산하였다.

[0123] 체중 증가량을 보면 정상 SD 랫드에 비하여 난소절제 대조군(OVX_CTL)과 양성대조군(OVX-E2)에서 유의한 차이가 없었으며 약물 투여군인 칠면초 추출물 100 및 200 투여군과 정상군간의 체중변화 또한 유의한 차이가 관찰되지 않아 시험물질이 OVX 랫드의 체중을 변화시키는 데 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 1).

[0125] 1-5. 식이효율 및 식이섭취량

[0127] 식이효율은 아래의 식 1에 대입시켜 최종 체중증가량을 총 사료섭취량으로 나누어 산출하고 통계 처리하였다.

[0128] 식 1: 식이효율(feeding efficiency ratio: FER%)=체중증가량(g)/사료섭취량(g)X100

[0129] 상기 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 체중조절효과가 약물에 있는지 또는 사육환경에 있는지를 알 수 있다.

[0131] 본 연구결과에서 식이효율의 측면에서 볼 때, 대조군의 식이효율이 13.68%로 양성대조군과 칠면초 추출물 100 및 200 투여군은 대조군에 비하여 큰 차이가 나타나지 않았다. 또한 하루 식이섭취량도 그룹간 차이가 나타나지 않았다(도 2 및 표1).

표 1

Group	Food intakes	Body weight gain	Food efficiency
C57bl/6J	(g/day)	(g/day)	ratio (FER, %)
SD rat normal	13.60	2.92±0.09	21.5±0.68
OVX-CTL	13.68	1.79±0.46	13.1±0.45
OVX-E2	13.29	1.52±0.09	11.4±0.65
OVX-SJE 100 mg/kg	12.18	1.54±0.27	12.6±2.19
OVX-SJE 200 mg/kg	12.17	1.87±0.45	15.4±3.73

[0132]

[0133] 1-6 혈액 내 백혈구 수준 측정

[0135] 15주 후 동물실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태(약 16 시간)에서 ethyl ether로 마취하고, 10ml syringe로 심장에서 채혈한 후 혈액에서 백혈구(WBC)수를 측정한 결과, 도 3에서처럼 백혈구(WBC) 수는 정상군(6.97×10^3 cells/ul)에 비하여 대조군(10.61×10^3 cells/ul)에서 유의하게 증가했다. 그리고 양성대조군(8.52×10^3 cells/ul), 칠면초 추출물 100(8.35×10^3 cells/ul) 및 200(8.63×10^3 cells/ul) 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다

[0137] 1-7 혈청 생화학 검사

[0139] 동물실험 종료 후 전날에 diet를 제거하여 공복상태 (약 16시간)에서 ethyl ether로 마취하고, 10ml syringe로 심장에서 혈액을 채혈한 후 실온에서 1시간 방치한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 clotting activated serum tube를 이용하여 실온에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 Rat Pyridinoline crosslinks, Rat deoxypyridinoline (DPD), Rat Osteocalcin (OC), PINP, CTX-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, LTB4, 5-LOX 및 estradiol 수준은 ELISA kit를 이용하여 측정하였으며, 혈청 Ca 수준은 Ca strip (WAKO, JAPAN)을 이용하여 OCPC 방법으로, 그리고 GOT, GPT 검사는 자동혈액분석기(Toshiba 200FR, JAPAN)를 이용하여 mg/ml 단위로 측정하였다.

[0141] 대사성질환의 지표인 중성지방과 총콜레스테롤을 분석한 결과, 중성 지방은 칠면초 200mg/kg 투여 그룹만이 대조군에 비교하여 감소하였고, 혈청 내 총콜레스테롤 함량은 정상군(80.67mg/dL)에 비하여 대조군이 유의성 있게 증가하였고 (119.67 mg/dL), 그리고 칠면초 추출물 200 투여군이 (115.0 mg/dL) 대조군과 비교하여 감소하였다 (도 4a 및 b). 혈청 내 LDL 수준은 정상군(9.67 mg/dL)에 비해 대조군(10.17 mg/dL)에서 증가하였으며 대조군과 비교하여 칠면초 추출물 100 투여군(9.25 mg/dL)에서 감소하는 것을 확인하였다. 또한, HDL 수준은 정상군(31.00 mg/dL)에 비해 대조군(37.17 mg/dL)에서 증가하였으며 대조군과 비교하여 칠면초 추출물 200 투여군(32.75 mg/dL)에서 감소한 것을 확인 할 수 있었다.

[0143] 혈청자동측정기로 혈청중 GOT, GPT, 및 크레아틴의 수준을 측정한 결과, 정상군(GOT: 204.7 $\pm$ 10.2mg/dL, GPT: 52.3 $\pm$ 5.8 mg/dL)과 비교하여 대조군의 GOT(161.7 $\pm$ 21.0mg/dL) 및 GPT(29.3 $\pm$ 4.9mg/dL) 수준은 감소하였으나 대조군, 양성대조군(GOT: 130.8 $\pm$ 6.3mg/dL, GPT: 23.5 $\pm$ 2.0 mg/dL), 칠면초 추출물 100(GOT: 134.5 $\pm$ 2.7mg/dL, GPT: 26.3 $\pm$ 1.3 mg/dL) 및 칠면초 추출물 200(GOT: 152.5 $\pm$ 11.8mg/dL, GPT: 29.3 $\pm$ 2.1 mg/dL) 투여군 간의 차이는 나타나지 않았다(도 5a 및 b). 또한, 정상군(0.53 $\pm$ 0.02mg/dL)과 비교시 대조군(0.73 $\pm$ 0.04mg/dL)의 크레아틴 수준을 증가하였으나 대조군, 양성대조군(0.67 $\pm$ 0.01mg/dL), 칠면초 추출물 100(0.64 $\pm$ 0.01mg/dL) 및 칠면초 추출물 200(0.66 $\pm$ 0.02mg/dL) 투여군 간의 차이는 나타나지 않았다(도 5C).

[0145] 혈청 내 칼슘 농도는 정상군(5.3 $\pm$ 0.02 mg/dL)에 비하여 대조군이 2 배이상 증가하였다(10.2 $\pm$ 1.5 mg/dL). 이는 혈액을 통한 칼슘의 배출을 의미하며, 양성대조군(6.7 $\pm$ 1.6 mg/dL), 칠면초 추출물 100 (4.9 $\pm$ 0.5 mg/dL) 및 200 투여군 (7.2 $\pm$ 0.3 mg/dL) 은 대조군에 비하여 통계학적 유의하게 감소하였다(도 6).

[0147] 염증인자인 LTB4 및 5-LOX와 골흡수 표지자인 DPD를 ELISA를 통해 측정한 결과, 정상군과 비교시 대조군에서 혈청 내 LTB4, DPD 및 5-LOX 수준이 2배 이상 유의성 있게 증가하였고, LTB4과 DPD 수준은 양성대조군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, 혈청 내 LTB4, DPD, 5-LOX 수준은 실험군인 칠면초추출물 200 투여군에서 대조군에 비하여 통계학적 유의성 있게 감소하였다(도 7).

[0149] 또한, 골 대사 표지자인 Osteocalcin 및 PINP와 골흡수 표지자인 CTX-1의 수준을 확인하였다.

[0150] 혈청 내 Osteocalcin 단백질 수준은 정상군 (4.78ng/ml)에 비하여 대조군이 2배 이상 감소하였고 (1.83ng/ml), 양성대조군 (4.92ng/ml), 칠면초 추출물 100 (2.35 ng/ml) 및 200 (3.277 ng/ml)은 대조군에 비하여 용량의존적으로 유의성 있게 증가하였다(도 8a).

[0151] 또한 전구 콜라겐의 연장 펩티드인 PINP(aminoterminal propeptide of type I procollagen)의 혈청 내 수준은 정상군 (710.44 pg/ml)에 비하여 대조군이 2배이상 감소하였고 (302.52 pg/ml), 양성대조군 (1342.98 pg/ml), 칠면초 추출물 100 (841.24 pg/ml) 및 200 (1041.05 pg/ml)은 대조군에 비하여 용량의존적으로 유의성 있게 증가하였다(도8 b).

[0152] 골 흡수 표지자인 CTX-1(Type I Collagen Cross-Linked C-Telopeptide)의 혈청 내 수준은 정상군(138.93

pg/ml)과 비교시 대조군 (378.22 pg/ml)에서 2배 이상 증가하였고, 양성대조군(259.80 pg/ml)에서는 대조군에 비하여 감소했으나 유의성은 없었고, 칠면초 추출물 200 투여군(184.47 pg/ml)에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(도 8C)

[0153] 혈청 내 phosphorus (인) 및 estradiol, 골 흡수 표지자인 pyridinoline의 수준을 측정한 결과로, 정상군 (phosphorus: 10.36mg/dL, estradiol: 135.69pg/ml)과 비교시 대조군(phosphorus: 4.63mg/dL, estradiol: 23.08pg/ml)에서 혈청 내 phosphorus와 estradiol (E2) 수준이 2배 이상 유의성 있게 감소하였고, 양성대조군 (phosphorus: 4.91mg/dL, estradiol: 92.50pg/ml)은 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있으나 통계학적 유의성은 없었다. 칠면초추출물 100(phosphorus: 5.50mg/dL, estradiol: 101.59pg/ml), 200(phosphorus: 6.12mg/dL, estradiol: 127.94pg/ml) 투여군에서 phosphorus 수준은 유의성있게 용량의존적으로 증가($p<0.05$, $p<0.01$)하였으나 Estradiol 수준은 대조군에 비하여 유의하게 증가하지 않았다(도 9a 및 b). 혈청 내 pyridinoline 수준은 정상군(23.02ng/ml)과 비교시 대조군(59.50 ng/ml)에서 2배 이상 유의성 있게 증가하였고 ($p<0.01$), 양성대조군 (33.83 ng/ml)은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소하였으며 ($p<0.05$), 실험군인 칠면초추출물 200 투여군(26.97 ng/ml)에서도 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다 (도 9c).

[0155] 1-13 골 Real-Time Quantitative PCR 분석

[0157] 랫드의 우측 대퇴골 일부를 분리하여 RNAzol^B 500 μ l를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 여기에 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15 초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리 한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75 °C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA합성에 사용하였다. 역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10U/ μ l) 2U/tube를 37°Clock에서 30분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5XRT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심침강하여 37°Clock에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. Real time quantitative PCR은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0159] 그 결과 IL-1 β mRNA 유전자 발현은 정상군 (0.02)에 비하여 대조 군이 현저한 증가를 보였고 (0.73), 양성대조군 (0.50), 칠면초 추출물 100 (0.31) 및 200 (0.28)은 대조군에 비하여 감소하였다.

[0160] IL-6 mRNA 유전자 발현은 정상군 (0.2)에 비하여 대조군이 현저한 증가를 보였고 (0.64), 양성대조군 (0.51), 칠면초 추출물 100 (0.41) 및 200 (0.37)은 대조군에 비하여 감소하였다.

[0161] TNF- α mRNA 유전자 발현은 정상군 (0.31)에 비하여 대조군이 현저한 증가를 보였고 (1.93), 양성대조군 (1.29), 칠면초 추출물 100 (1.15) 및 200 (1.05)은 대조군에 비하여 감소하였다 (도10).

[0162] COX-2 mRNA 유전자 발현은 정상군 (0.21)에 비하여 대조군이 현저한 증가를 보였고 (0.77), 양성대조군 (0.55), 칠면초 추출물 100 (0.38) 및 200 (0.37)은 대조군에 비하여 감소하였다.

[0163] NOS-2 mRNA 유전자 발현은 정상군 (0.11)에 비하여 대조군이 현저한 증가를 보였고 (1.26), 양성대조군 (0.57), 칠면초 추출물 100 (0.44) 및 200 (0.38)은 대조군에 비하여 감소하였다 (도11).

[0165] 대퇴부 조직 내 MMP-2 단백질 수준은 정상군 (8.02 ng/ml)에 비하여 대조군(46.10 ng/ml)이 현저한 증가를 보였고, 양성대조군 (28.56 ng/ml), 칠면초 추출물 100 (25.65 ng/ml) 및 200 (21.91 ng/ml)은 대조군에 비하여 감

소하였다(도 12a).

[0166] 대퇴부 조직 내 MMP-9 단백질 수준은 정상군 (7.21 ng/ml)에 비하여 대조군(22.07 ng/ml)이 현저한 증가를 보였고, 양성대조군 (7.71 ng/ml), 칠면초 추출물 100 (10.95 ng/ml) 및 200 (8.75 ng/ml)은 대조군에 비하여 감소하였다(도 12b).

[0167] 혈청 내 OPG과 RANKL의 수준을 측정한 결과, OPG 수준은 정상군(4.53 ng/ml)과 비교시 대조군 (1.74 ng/ml)에 비하여 2배 이상 유의성 있게 감소하였고($p<0.05$), 양성대조군인 양성대조군(2.71 ng/ml)에서 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었으며 칠면초추출물 100(2.54 ng/ml), 200(3.93 ng/ml) 투여군은 통계학적으로 유의성 있게 용량의존적으로 증가하였다(도 12 c). RANKL수준은 정상군(2.61ng/ml)과 비교시 대조군 (5.04 ng/ml)에서 2배 이상 유의성 있게 증가하였고, 양성대조군(4.68 ng/ml)에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었으며, 칠면초 추출물 200 (3.05 ng/ml) 투여군에서는 통계학적 유의성 있게 용량의존적으로 감소하였다(도 12d).

[0168] RANKL/OPG 비율의 증가는 뼈파괴를 가속화시켜 골다공증을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 정상군(0.63)과 비교시 대조군(3.26)에서 RANKL/OPG 비율이 4.4배 이상 유의성 있게 증가하였고, 양성대조군(1.72)과 칠면초 추출물 200(0.91) 투여군에서는 통계학적 유의성 있게 감소하였다(도 12e).

[0170] 1-14 대퇴골의 조직학적 검사

[0172] 희생한 랫드의 대퇴골을 절편하여 hematoxylin & Eosin 염색을 진행하여 조직학적 검사를 시행하였다. 정상군과 비교시 대조군에서 대퇴골의 피질두께 (cortical thickness), 소주골면적 (trabecular bone area), 및 골 밀도 (bone mineral density)가 감소하는 것을 확인하였고, 양성대조군과 칠면초 추출물 200 투여군은 대조군에 비하여 피질두께, 소주골면적, 및 골 밀도가 증가하는 것을 확인하였다(도 13)

[0173] 대퇴골에서 파골세포의 활성을 확인하기 위해 Tartrate acid phosphatase(TRAP) 염색을 수행하였다. 정상군과 비교시 대조군에서 대퇴골의 파골세포(화살표) 활성은 현저하게 증가한 것이 확인되었고 양성대조군과 칠면초 추출물 200 투여군은 대조군에 비하여 파골세포 활성이 감소되는 것을 확인하였다(도 14).

[0175] 1-15 Micro CT를 이용한 경골(tibia) 근위부의 골밀도와 구조적 변수들 측정

[0176] 희생 시 좌측 대퇴골의 골단 부위의 골 밀도를 모든 실험 동물에서 각각 측정하였다. 정상군($0.562\text{g}/\text{cm}^3$)과 비교시 대조군($0.314\text{g}/\text{cm}^3$)에서 대퇴골 골 밀도(BMD)가 감소하는 것을 확인하였고, 양성대조군($0.415\text{g}/\text{cm}^3$)은 대조군에 비해 2.96% 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었으며, 칠면초 추출물 200 ($0.436\text{g}/\text{cm}^3$) 투여군은 대조군에 비해 대퇴골 골 밀도가 38.8% 증가하는 것을 확인하였다(도 15a)

[0177] 12주간 실험종료 후 흰쥐의 우측 경골 근위부의 골다공증 관련 뼈의 구조적 변수(parameters) 중 관심 부위의 부피 안에서 골 용적 비율을 micro-CT를 이용하여 측정하였으며 골 용적비는 해면뼈가 차지하는 전체 영역과 실제로 뼈가 차지하는 영역을 3차원 메쉬로 나타낸 다음 메쉬가 차지하는 부피를 계산하였다. 정상군에서는 $46.99 \pm 2.714\%$ 였으나 대조군에서는 14.49 ± 3.814 로 정상군보다 69.1% 정도 골 용적비가 통계적으로 유의성 있게 감소하였으며 양성대조군은 $23.0 \pm 5.46\%$ 으로 대조군에 비하여 58.7% 증가하였으나 유의성은 없었다. 칠면초 추출물 200 투여군($24.64 \pm 4.2034\%$)은 대조군에 비해 대퇴골 골 용적비가 77.5% 증가하는 것을 확인하였다(도 15b).

[0178] 뼈 잔기둥 두께를 나타내는 값을 micro-CT를 이용하여 측정한 결과, 정상군에서는 $0.183 \pm 0.0047\text{mm}$ 였으나 대조군에서는 $0.110 \pm 0.0037\text{mm}$ 로 정상군보다 39.8% 정도 뼈 잔기둥 두께가 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였으나 양성대조군 군($0.117 \pm 0.0068\text{mm}$)과 칠면초 추출물 200($0.113 \pm 0.0031\text{mm}$) 투여군에서는 대조군과 차이가 나타나지 않았다(도 15c).

[0179] 뼈 잔기둥 수 (Tb.N (1/mm))를 나타내는 값을 micro-CT를 이용하여 측정한 결과, 정상군에서는 3.154 ± 0.1026 (1/mm)였으나 대조군에서는 1.289 ± 0.2957 (1/mm)로 정상군 보다 59.1% 정도 골 잔기둥 수가 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였으며 양성대조군은 1.895 ± 0.3353 (1/mm)으로 대조군에 비하여 47.0% 증가하였으나 유의성은 없었다. 칠면초 추출물 200 투여군은 2.163 ± 0.3617 (1/mm)으로 대조군에 비해 72.6% 증가하는 것을 확인하였다

(도 15d).

[0180] 뼈 잔기둥 간 거리(Tb.Sp (mm))를 나타내는 값을 micro-CT를 이용하여 측정한 결과, 정상군에서는 $0.375 \pm 0.0452(\text{mm})$ 였으나 대조군에서는 $1.174 \pm 0.1943(\text{mm})$ 로 정상군 보다 2.13배 정도 뼈 잔기둥 간 거리(mm)가 유의성 있게 증가하는 것을 확인하였으며 양성대조군은 $0.788 \pm 0.1645(\text{mm})$ 으로 대조군에 비하여 32.8% 감소하였으나 유의성은 없었다. 칠면초 추출물 200 투여군은 $0.630 \pm 0.1530(\text{mm})$ 으로 대조군에 비해 뼈 잔기둥 간 거리가 46.8% 증가하는 것을 확인하였다(도 15e).

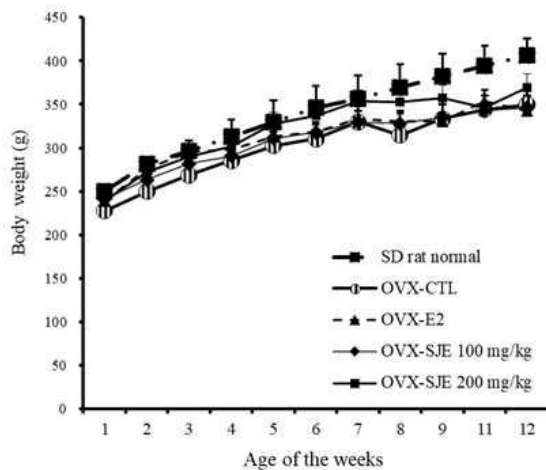
[0182] 1-16 통계분석

[0184] 모든 실험은 평균과 표준편차로 표시하였다. SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 유의수준 $p\text{-value} < 0.05$ 에서 검증하였다. 실험 집단 간 수치 데이터는 각 실험군 결과값은 mean $\pm$ standard deviation (SD)으로 나타 내었으며, 동물실험에서는 SPSS 11.0 software (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL)를 이용하여 일원배치 분산분석 (One-way analysis of variance; ANOVA) 후에 Duncan's multiple comparison tests로 유의성을 검증하였고, 세포실험에서는 독립표본 T-검정 (independent samples T-test)을 이용하여 유의성을 검증하였다. p 값이 0.05,

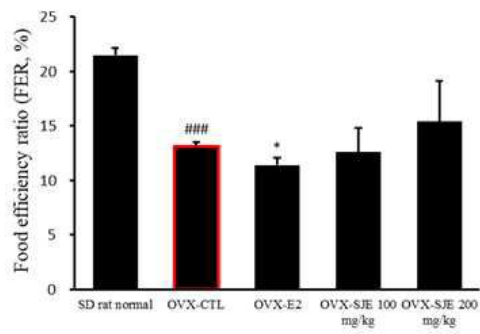
[0185] 0.01 혹은 0.001 보다 작은 경우를 구분하여 분석하였으며 ($\#p<0.05$, $\#\#p<0.01$, $\#\#\#p<0.001$ vs. SD-rat Nr ; $**p<0.01$ and $***p<0.001$ vs. OVX-CTL), 각 경우에 해당 시 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

도면

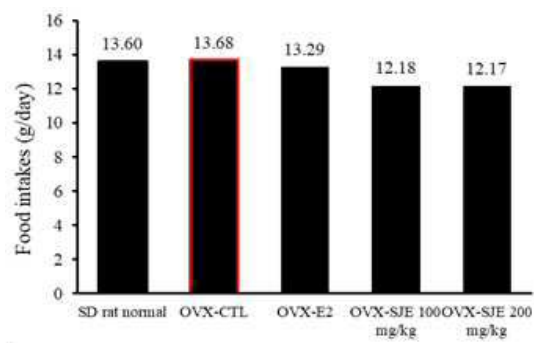
도면1



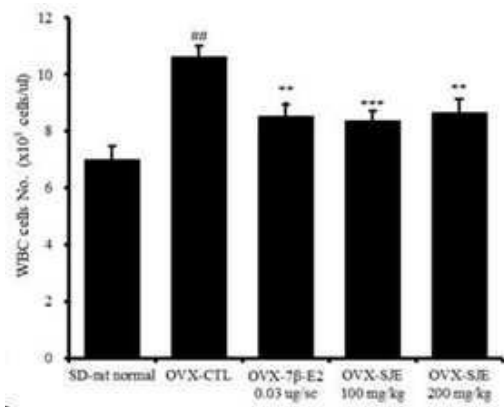
도면2a



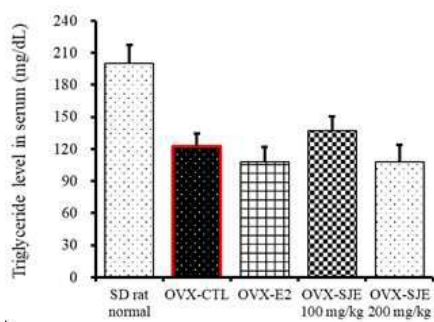
도면2b



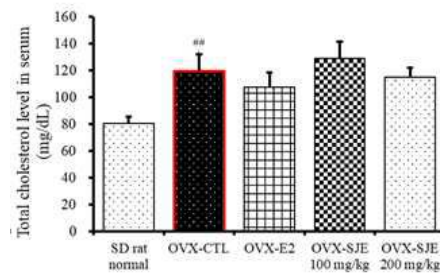
도면3



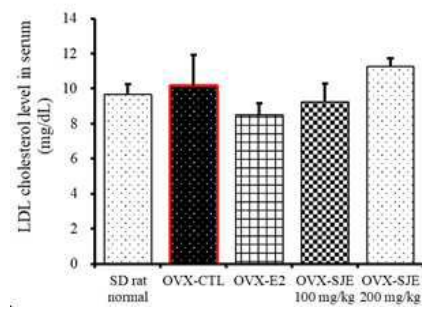
도면4a



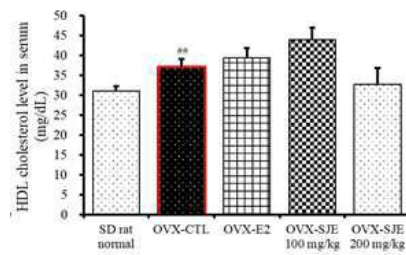
도면4b



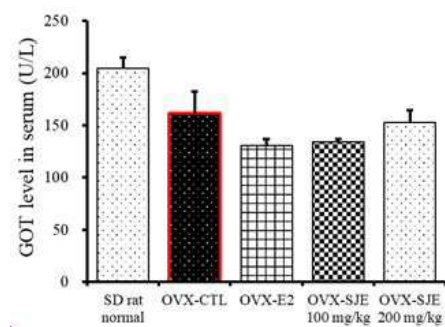
도면4c



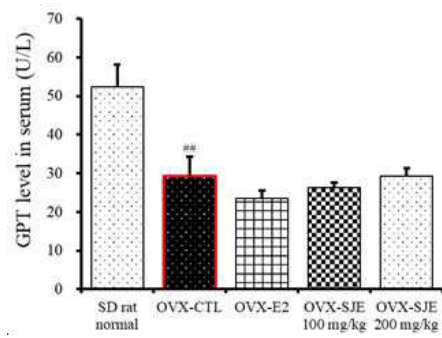
도면4d



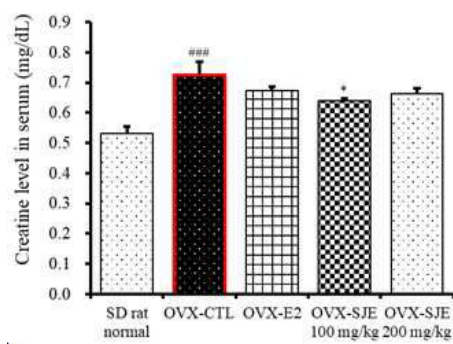
도면5a



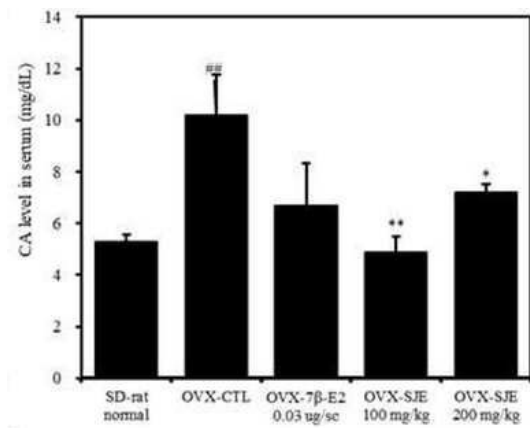
도면5b



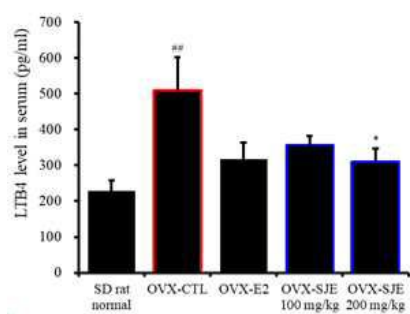
도면5c



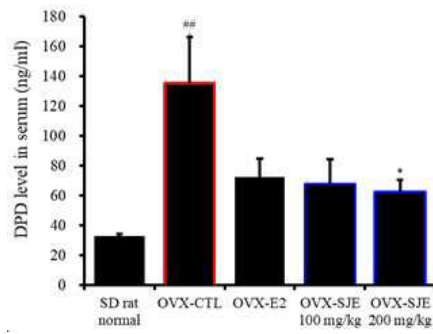
도면6



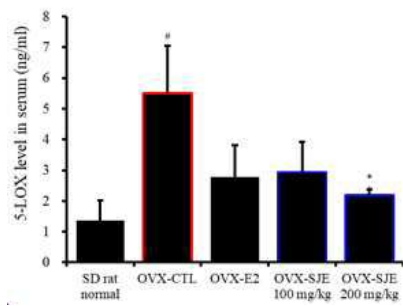
도면7a



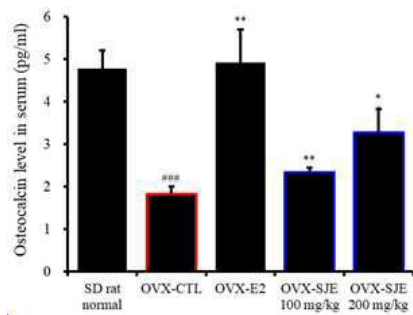
도면7b



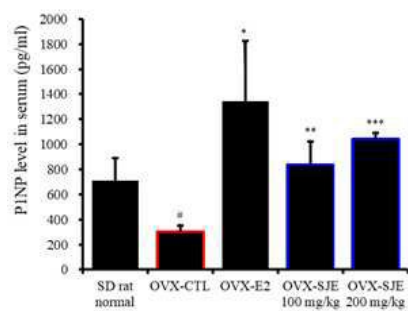
도면7c



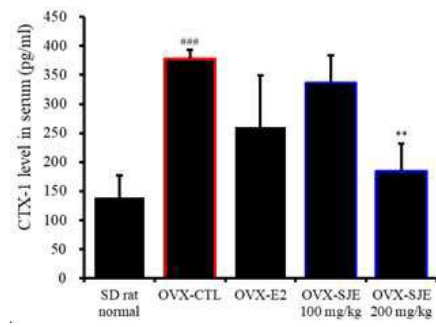
도면8a



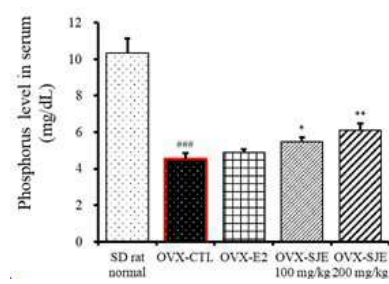
도면8b



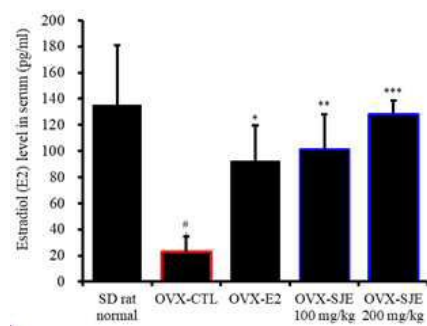
도면8c



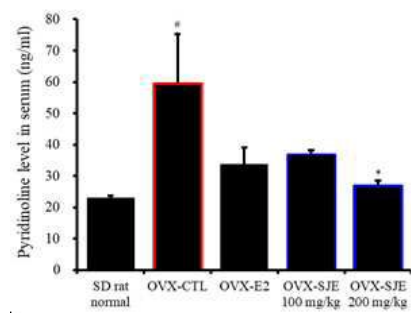
도면9a



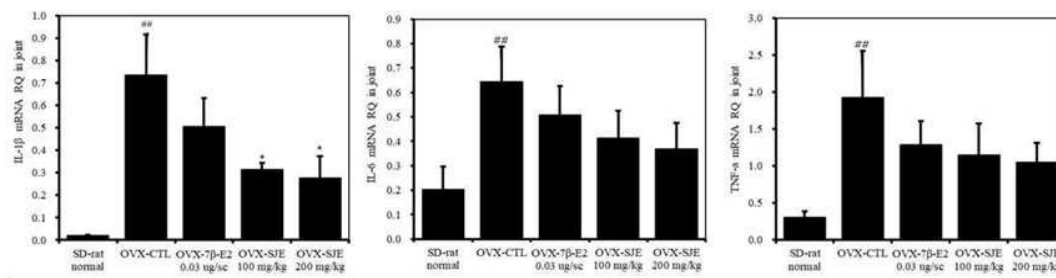
도면9b



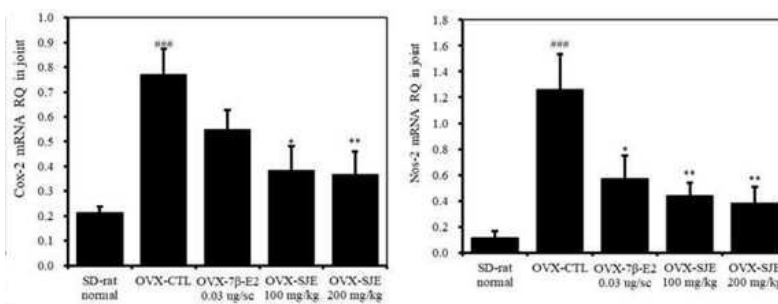
도면9c



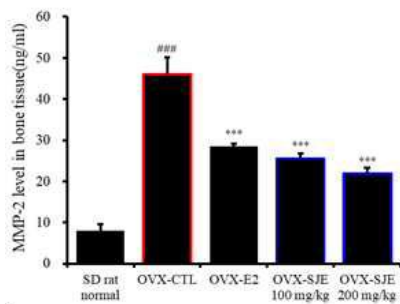
도면10



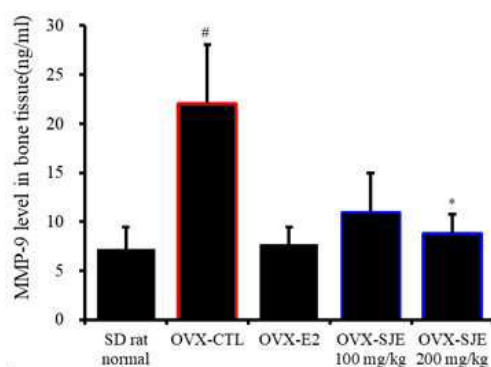
도면11



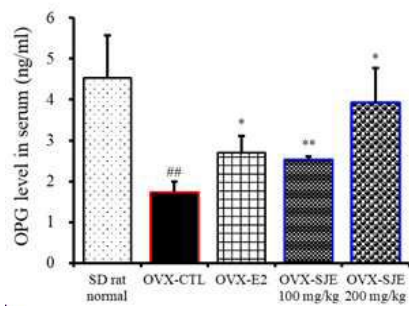
도면12a



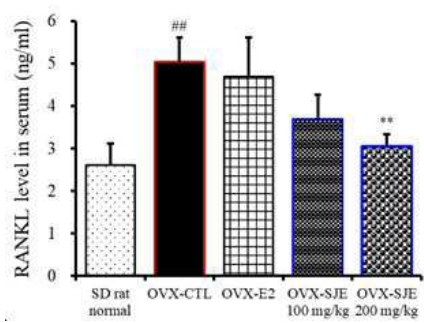
도면12b



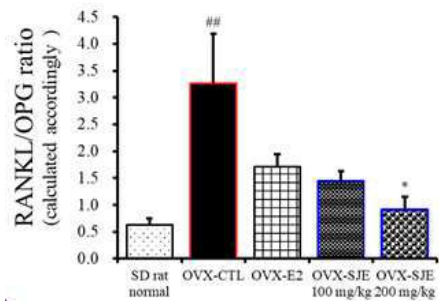
도면12c



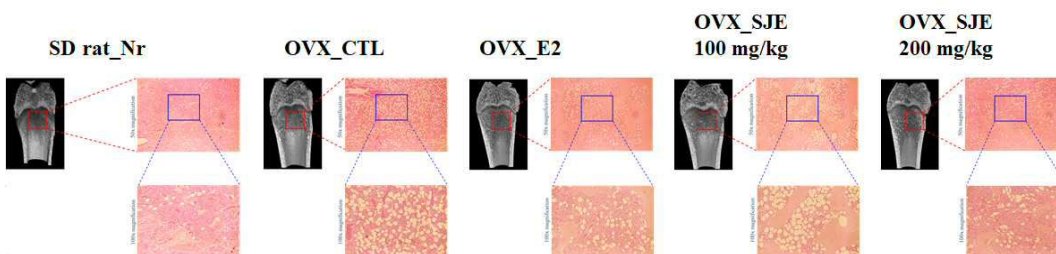
도면12d



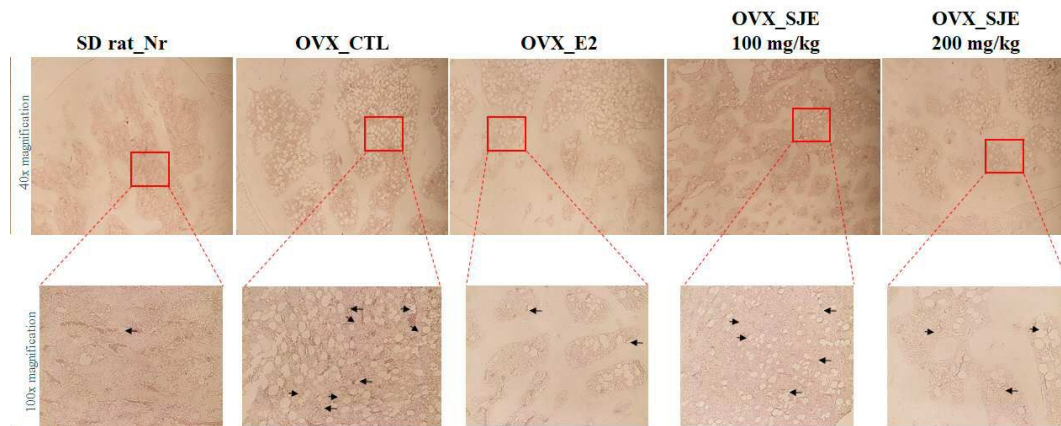
도면12e



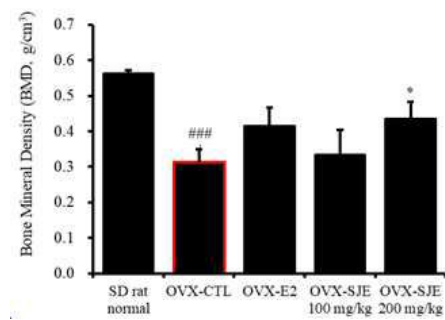
도면13



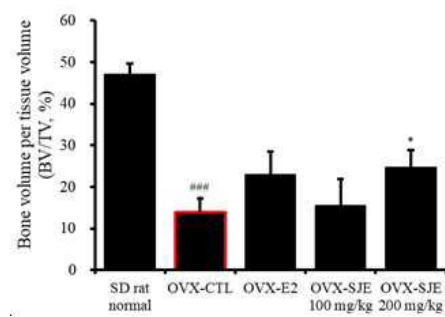
도면14



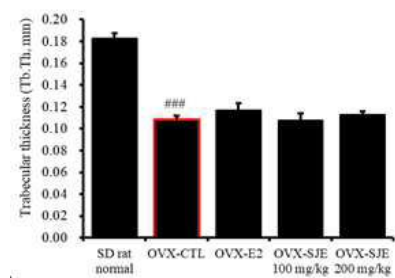
도면15a



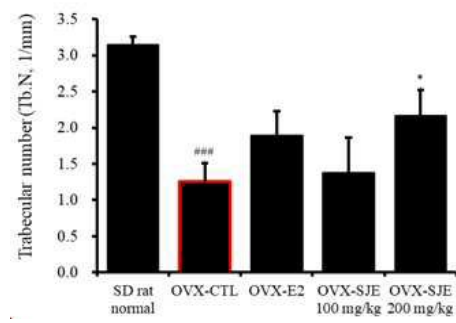
도면15b



도면15c



도면15d



도면15e

