(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0010942
(43) 공개일자 2013년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/882 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0071744
(22) 출원일자 2011년07월20일
심사청구일자 2011년07월20일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 봉의산길22번길 29, 한림대학교 생명과학관 8513호 (옥천동)
김정례
강원도 춘천시 봉의산길22번길 29, 한림대학교 생명과학관 8512호 (옥천동)
임순성
강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)
(74) 대리인
김지형

전체 청구항 수 : 총 5 항

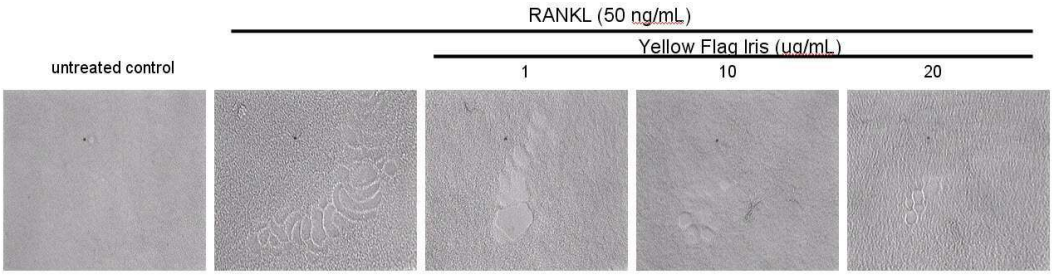
(54) 발명의 명칭 **노랑꽃창포 추출물을 함유하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물에 관한 것으로서, 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조하여 제조된 것을 특징으로 한다.

상기의 방법으로 제조된 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물은 노랑꽃창포 추출물이 골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키고, 제 I 형 콜라겐 분비 증가 및 석회화를 촉진시키며, 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키고 골흡수를 억제시킴으로써 골다공증으로 인한 골흡수를 감소시킴은 물론이며 골형성을 촉진함으로써 골다공증 개선 및 예방할 수 있는 성분으로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 노랑꽃창포 추출물은 노랑꽃창포에 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조하여 제조된 것을 특징으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

조골전구세포의 분화단계에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키며, 제 I 형 콜라겐 분비 증가와 함께 칼슘 석회화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 골다공증 치료 및 예방용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

대식세포의 파골세포 분화단계에서 파골세포 생성을 억제시키고, TRAP의 활성을 감소시키며, 골흡수를 억제시키는 것을 특징으로 하는 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 골다공증 치료 및 예방용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 노랑꽃창포 추출물은 총 중량에 대하여 0.001~5%의 양으로 함유되는 것을 특징으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 골형성을 도모하는 조골세포 분화를 촉진시키고 골흡수를 도모하는 파골세포의 분화를 억제시키는 노랑꽃창포 추출물(yellow flag iris)을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물에 대한 것이다.

[0002] 더 상세하게는, 노랑꽃창포 추출물은 골형성에 관여하는 조골전구세포(마우스 섬유아세포인 MC3T3-E1)의 분화 초기단계에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키고, 제형 콜라겐(typecollagen) 생성을 촉진시키며, 조골세포의 석회화를 증가시킨다. 또한, 대식세포(마우스 대식세포인 RAW264.7)를 파골세포로 분화시키는 과정에서 노랑꽃창포 추출물이 파골세포의 형성과정에서 촉진되는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)을 감소시키며, 골흡수를 감소시킨다.

[0003] 이로써 노랑꽃창포 추출물은 부작용이 없으면서 성장기에 성장발달장애시 골형성의 도움이 될 뿐만 아니라, 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 증강시킬 수 있고, 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 개선 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 골강도의 약화로 골절의 위험성이 증가하게 되는 골격계질환으로 정의하고 있으며, 골강도는 골량과 골질에 의해 결정된다. 골량은 20대 중반 또는 30대 초반의 청장년 시기에 일생 중 최대 골량이 형성되고 그 이후 연령 증가에 따라 골 손실이 진행된다. 30대에서 50대까지는 대체로 골량이 유지되며, 이는 오래된 뼈는 제거되는 골흡수와 새로운 뼈를 형성하는 골형성이 항상성이 이루어지기 때문이다.

[0005] 골(bone)은 형성과 흡수가 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로 여러 가지 종류의 자극에 반응한다. 이런 골 대사는 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 활성정도에 따라 오래된 뼈가 파괴, 흡수되거나 새로운 뼈가 형성되는데, 정상적인 경우 이들 세포의 상호작용에 의해 골개조(bone remodeling)가 일어난다. 하지만, 이러한 골흡수와 골형성의 항상성은 여성의 경우 폐경 이후 급격한 골 손실이 더 일어나게 되어 균형이 깨지기 쉬우며, 노화로 골 형성 기능이 퇴화됨에 따라 골손실이 지속됨에 따라 골다공증이 일어나게 된다. 골다공증은 초기에 급격히 진행되는데 골흡수로 인해 골 손실이 일어나게 되지만, 골형성이 불충분하여 일어나기도 하므로 조골전구세포가 조골세포로 분화하는 능력에 의해서도 결정된다. 이에 조골세포의 분화를 촉진하거나 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 감소시키는 것이 필요하다.

[0006] 최근 급속한 경제성장과 의학의 발전은 고령화 사회로의 진입을 가속시키고 있으며, 이에 따른 관련된 만성질환으로 고통받는 노인 인구가 빠르게 증가하고 있다. 노인인구의 증가에 따라 더불어 나타나는 대표적인 질환이 골다공증이다. 현재 골다공증의 예방과 개선 목적으로 식물성 에스트로겐이 폐경 후 골다공증의 예방을 위한 대안으로서의 기능성이 제시되고 있으며, 기타 스테로이드 제재 등을 병행해서 개선한다.

[0007] 뼈를 생성하는 역할은 조골세포(osteoblast)가, 뼈를 파괴하는 역할은 파골세포(osteocast)가 담당하게 된다. 성숙된 파골세포는 다핵세포이며, 조혈모세포에서 기원이 된다. 파골세포의 분화는 조골세포에 의해서 이뤄지게 되며, 조골전구세포는 다양한 인자, 즉 뼈 형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein; BMP) 및 전환성장인자 베타 (transforming growth factor-β TGF-β)들에 의해서 분화된 조골세포는 단백질 및 비단백질 성분을 분비하고 골기질형성을 유도하여 뼈세포로 존재한다.

[0008] 뼈에서 발현이 되는 염기성 인산분해효소의 활성화는 석회화하는 연골과 함께 빠르게 성장하는 골에 있어서 초기 석회화에 관여하는 칼슘 수송에 요구되며, 석회화를 위해 이용되는 칼슘은 염기성 인산분해효소에 의해 조절된다는 보고가 있다. 조골세포는 콜라겐과 같은 결체섬유나 오스테오칼신(osteocalcin) 등의 골기질을 합성하고, 석회화는 인산과 칼슘을 농축하여 결정을 형성하게 되면서 일어난다.

[0009] 골기질 단백질에 있어서 제1형 콜라겐 (type I collagen)은 골기질의 90%를 이루고 있다. 콜라겐이 대부분을 차지하는 뼈의 기질 단백들은 구조적으로 지지 역할을 하고 있으며, 콜라겐 섬유 사이에 미네랄 유리(mineral crystal)이 침착되어 무기질화가 일어난다.

[0010] 조골세포는 파골세포의 분화에 필수적인 대식세포 콜로니 자극인자 (macrophage-colony stimulation factor, M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor-kB ligand (RANKL)을 생성하며, 핵을 하나 가진 파골 전구세포는 M-CSF와 RANKL에 의해 자극을 받아서 연속적인 분화과정으로 거대다핵세포로 분화한다. 분화된 파골세포는 뼈의 표면으로 단백질분해효소 등을 분비하여 뼈 표면을 산성화를 유도함으로써 뼈의 구성성분인 단백질과 미네랄을 분해하여 뼈를 파괴한다.

[0011] 파골세포(osteoclast)를 가장 활성화하는 가장 중요한 RANKL은 파골전구세포 및 파골세포에 위치한 수용체인 RANK과 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진한다. 즉, 단핵세포의 전구체들이 융합하여 골흡수(bone resorption)를 담당하는 다핵 파골세포로 분화할 수 있으며, 골흡수는 산성화에 의한 무기질의 용해와 단백질분해효소에 의한 기질단백질의 용해과정으로 가수분해효소를 분비하여 골조직에 존재하는 무기질과 유기물을 용해시키고, 콜라겐 분해효소, 시스테인 단백 분해효소 등이 골흡수에 관여한다.

[0012] 골다공증의 예방 및 개선제로 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져 있으나 골형성 촉진제의 발명은 아직 미미하며 또한 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이며, 폐경 여성에게서는 에스트로겐 투여가 골다공증 개선에는 효과적이나 유방암의 발생을 증가시키고 동맥경화성 질환을 증가시킨다는 보고가 있으며, 장기간의 투여가 필요한 골다공증 개선제들은 부작용을 일으킬 가능성이 높다.

[0013] 골다공증의 예방 및 개선제로 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져 있으나 골형성 촉진제의 발명은 아직 미미하며 또한 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이다. 또한, 노랑꽃창포에 대한 연구

는 대부분 수질정화에 관련된 발명이고, 꽃창포에 대한 생리활성물질로서의 연구는 미미한 실정이다. 염기성 인산분해효소의 활성을 증가와 함께 석회화를 촉진시켜 골다공증 개선를 위한 골형성을 촉진시킬 수 있는 골형성 촉진제로서의 용도에 대해서는 보고된 바 없다.

[0014] 노랑꽃창포는 외떡잎식물 백합목 붓꽃과의 여러해살이풀로서, 유럽 원산이며 연못가에 많이 심으며 뿌리줄기는 짧고 수염뿌리는 황갈색이다. 꽃줄기는 가지가 갈라지며 높이 60~100cm이다. 잎은 길이 약 1m이고, 나비 2~3cm이다. 상기 노랑꽃창포는 건위, 진정, 진통, 해소, 거담, 항진균제, 두통, 혈액순환, 류머티즘, 구충제, 강장제, 향료 등에 이용된다.

[0015] 본 발명자들은 노랑꽃창포 추출물이 조골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 억제시키는 활성을 증가시키는 것은 물론이며, 제형 콜라겐 분비 증가와 함께 석회화를 촉진시키는 활성을 확인하고, 대식세포의 파골세포 분화과정에서 골흡수에 관여하는 TRAP 활성의 억제와 골흡수를 감소시킴으로써 노랑꽃창포 추출물이 골형성을 촉진시키고 골흡수를 골다공증 개선제로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조하여 제조된 것을 특징으로 한다.

[0017] 노랑꽃추출물이 성장기에 성장발달장애시 골형성의 도움이 될 뿐만 아니라, 골형성 단계에서 조골세포의 분화를 촉진시키고 골흡수에 관여하는 파골세포의 분화를 억제시키고 골흡수를 감소시켜 골다공증과 같은 골질환의 치료와 예방을 위한 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물은 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 제조하여 제조된 것을 특징으로 한다.

[0019] 또, 상기 노랑꽃창포 추출물은 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 것을 사용한 용매추출에 의해 제조하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또, 상기 노랑꽃창포 추출물은 총 중량에 대하여 0.001~5%의 양으로 함유되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명으로 노랑꽃창포 추출물은 제공하여, 노랑꽃창포 추출물이 골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키고, 제 Ⅰ형 콜라겐 분비 증가 및 석회화를 촉진시키며, 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키고 골흡수를 억제시킴으로써 골다공증으로 인한 골흡수를 감소시킴은 물론이며 성장기에 성장발달장애시 골형성을 촉진시킬 수 있는 효능이 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 조골전구세포의 초기 분화단계에서 나타나는 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성에 대한 노랑꽃창포 추출물의 촉진효과를 나타낸 결과이다. 그래프의 수치는 염기성 인산분해효소의 활성을 흡광도 측정 후 정량화 한 것이다.

도 2는 분화과정에 있는 조골전구세포에서 제형 콜라겐 분비(collagen type I)에 대한 노랑꽃창포 추출물의 촉진효과를 나타낸 결과이다. 웨스턴블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 조골세포의 분화과정에서 나타나는 석회화에 대한 노랑꽃창포 추출물의 효능에 대한 결과이다. Alizarin Red S stain 결과이며, 이것을 광학현미경 촬영 후 흡광도를 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 노랑꽃창포 추출물이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하여 파골세포의 생성을 억제시키는 것을 나타낸 결과이다. 그림은 파골세포의 생성정도를 TRAP 염색결과이다.

도 5는 RAW264.7 대식세포를 파골세포로 분화시킨 후 골흡수정도를 골흡수 면적을 통해 노랑꽃창포가 골흡수를 억제하는 것을 나타낸 결과이다. 파골세포로 분화가 되면서 골흡수를 위해서 골분해 효소 등을 분비하는 것을 칼슘과 인이 코팅되어진 배양기에서 골흡수 면적을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조하여 노랑꽃창포 추출물을 제조하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 상기 노랑꽃창포는 외떡잎식물 백합목 붓꽃과의 여러해살이풀로서, 유럽 원산이며 연못가에 많이 심으며 뿌리줄기는 짧고 수염뿌리는 황갈색이고, 꽃줄기는 가지가 갈라지며 높이 60~100cm이며 잎은 길이 약 1m이고, 나비 2~3cm이다. 또한, 상기 노랑꽃창포는 건위, 진정, 진통, 해소, 거담, 항진균제, 두통, 혈액순환, 류머티즘, 구충제, 강장제, 향료 등에 이용된다.

[0025] 또한, 상기 노랑꽃창포에 용매를 혼합하여 추출할 때, 상기 용매는 물, 알코올, 아세톤, 헥산, 에틸아세테이트 중 하나 또는 둘 이상을 혼합한 것을 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올을 사용하는 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 그리고 또한, 상기 노랑꽃창포를 추출할 때, 가스 고압 추출기를 이용하는 것이 바람직하다. 상기 가스 고압 추출기는 추출시간이 짧고 추출액의 회수량이 많은 장점이 있다.

[0027] 여기서, 상기 용매를 혼합하여 사용할 때 물 100중량부에 알코올 100~150중량부, 아세톤 100~150중량부, 헥산 100~150중량부, 에틸아세테이트 100~150중량부 중 하나 또는 둘 이상을 혼합하여 사용하는 것이다.

[0028] 그리고, 상기 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하는 것은 상기 노랑꽃창포가 용이하게 추출될 수 있도록 하기 위한 혼합비율이며, 상기 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합한 후 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열하는 것 또한 반복된 실험을 통하여 노랑꽃창포 추출물을 원활하게 추출하기 위함이다.

[0029] 만약, 상기 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합한 후 60℃ 미만에서 가열할 경우에는 가열시간도 오래 걸릴 뿐 아니라 상기 노랑꽃창포의 유효한 성분이 충분히 용출되지 못할 수 있으며, 70℃를 초과하여 가열할 경우에는 높은 온도로 인하여 상기 노랑꽃창포의 유효한 성분이 변질 될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 노랑꽃창포에 용매를 중량대비 1 : 10~20의 비율로 혼합하여 60~70℃에서 3~5시간 동안 가열한 후, 여과 및 농축하고 동결건조함으로써 추출이 더욱 원활하게 이루어지게 된다.

[0031] 본 발명의 노랑꽃창포 추출물을 유효성분으로 하는 골다공증 개선 및 예방용 조성물은 골형성을 도모하는 조골세포 분화를 촉진시키고 골흡수를 도모하는 대식세포에서 파골세포의 분화를 억제시켜 골다공증 개선 및 예방용 조성물을 제공한다.

[0032] 더 상세하게는 노랑꽃창포 추출물은 골형성에 관여하는 조골전구세포(마우스 섬유아세포인 MC3T3-E1)의 분화 초기단계에서 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase)의 활성을 증가시키고, 제Ⅰ형 콜라겐(type Ⅰ collagen) 생성을 촉진시키며, 조골세포의 석회화를 증가시킨다. 또한, 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 생성을 억제하고, TRAP 활성을 억제하며 골흡수를 억제시킨다. 이로써 노랑꽃창포 추출물은 부작용이 없으면서 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 증강시키고 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 감소시킬 수 있는 골다공증 개선 및 예방할 수 있는 조성물을 제공한다.

[0033] 상기 노랑꽃창포 추출물은 총 중량에 대하여 0.001~5%의 양으로 함유되는 것을 특징으로 한다.

[0034] 여기서, 상기 노랑꽃창포 추출물을 총 중량에 대하여 0.001중량% 미만 함유할 경우에는 그 효과를 기대할 수 없

고, 5중량% 초과하여 함유할 경우에는 안전성, 또는 제형상의 제조에 어려움이 있기 때문이다.

[0035] 그리고, 유효한 효과와 안정성 및 제형 안정성을 고려하면 상기 노랑꽃창포 추출물을 총 중량에 대하여 0.01~3.0 중량%가 바람직하다.

[0036]

[0037] 그리고, 본 발명에 의한 조골세포의 분화 촉진용 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 구체적으로 음료, 분말, 농축, 캡슐 제형 또는 의약 제형일 수 있다.

[0038] 본 발명의 노랑꽃창포 추출물이 골전구세포에서 조골세포로 분화하는 과정에서 염기성 인산분해효소의 활성을 증가시키고, 제Ⅰ형 콜라겐 분비 증가 및 석회화를 촉진시킴으로써, 그리고 대식세포의 파골세포로 분화 과정에서 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키고 골흡수를 억제시킴으로써 골다공증으로 인한 골흡수를 감소킴은 물론이며 성장기에 성장발달장애시 골형성을 촉진시키는 활성을 나타내는 것이다.

[0039]

[0040] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[0041] 실시예 : 노랑꽃창포 추출물 제조

[0042] 노랑꽃창포 추출물 500g에 5L의 메탄올을 용매로 첨가하여 추출했다.

[0043] 이 추출과정 중 추출기는 가스 고압 추출기를 사용하여 50℃에서 진행되었고 4시간 동안 추출했다. 상기 방법으로 추출된 노랑꽃창포는 여과와 농축과정을 거쳐 동결건조 후 이 발명의 증명에 사용되기 위해 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)에 녹여 사용하였다.

[0044] 실험 1 : 세포배양 실험

[0045] (1-1) 마우스 조골전구세포(MC3T3-E1) 배양

[0046] 마우스 조골전구세포(MC3T3-E1)는 10% fetal bovine serum (FBS)와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Minimum Essential Medium Alpha Medium (α-MEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 조골세포로 분화하기 위하여 10 mM glycerol-2-phosphate와 50 μg/ml ascorbic acid을 첨가한 배지에서 노랑꽃창포 추출물을 최대 15일간 각각 처리하였다.

[0047] (1-2) 마우스 대식세포(RAW264.7) 배양

[0048] 마우스 대식세포(RAW264.7)는 ATCC(USA)에서 구입하여 배양하였다. RAW264.7은 10% FBS와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 파골세포로 분화하기 위하여 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에서 노랑꽃창포 추출물을 5일 동안 처리하였다.

[0049] 실험 2 : 노랑꽃창포 추출물에 의한 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활성 증가

[0050] 염기성 인산분해 효소 활성을 측정하기 위해 5.0×10^4 밀도의 조골전구세포에 노랑꽃창포 추출물을 처리하였다. 배양 처리한 세포를 0.2% Triton X-100 으로 용해시켜 14,000×g 에서 10분간 원심분리하였다. 96well plate에 세포 lysate를 분주하고 6 mM p-nitrophenyl phosphate 과 1 mM $MgCl_2$이 포함된 0.5 M Tris-HCl (pH 9.9) 용액

을 넣고 37℃ 에서 1시간 동안 배양하였다. 0.1 N NaoH를 첨가하여 반응을 중지키시고, p-nitrophenyl phosphate의 가수분해물은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질은 Lowry 정량방법으로 측정하였으며, 염기성 인산분해효소 활성은 nmol p-nitrophenol(PNP)/min/mg protein으로 측정하였으며 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

[0051] 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0052] 도 1에 나타낸 바와 같이 조골전구세포에서 염기성 인산분해효소 활성은 분화배지로 배양하여 분화시키는 동안에 증가되었고, 노랑꽃창포 추출물(도 1)을 처리한 조골전구세포에서는 더욱더 그 활성이 증가되는 것으로 나타났다.

[0053] 실험 3 : 노랑꽃창포 추출물에 의한 제Ⅰ형 콜라겐 분비 증가

[0054] <웨스턴블롯>

[0055] 조골전구세포의 제Ⅰ형 콜라겐의 생성 정도를 측정하기 위해 2.5×10^5 밀도의 MC3T3-E1 조골전구세포에 노랑꽃창포 추출물을 처리하였다. 제Ⅰ형 콜라겐의 분비능을 측정하기 위하여 분화과정의 세포배양으로 수확한 세포배지를 준비하였다. 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 6% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질띠(bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% bovine serum albumin (BSA)에 3시간 동안 blocking하였다. 제Ⅰ형 콜라겐 단백질의 일차항체(polyclonal rabbit anti-human antibody, Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoReasearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 제Ⅰ형 콜라겐 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0056] 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0057] MC3T3-E1 조골전구세포를 분화하는 과정에서 6일간 노랑꽃창포 추출물을 함께 처리하면, 분화된 조골세포에서 제Ⅰ형 콜라겐의 분비가 증가하고 노랑꽃창포 추출물(도 2)은 분화된 조골세포에서 더 많은 제Ⅰ형 콜라겐이 분비시켰다.

[0058] 실험 4 : 노랑꽃창포 추출물에 의한 석회화 증가

[0059] <Alizarin Red S 염색법>

[0060] 조골세포에 의한 석회화 정도를 측정하기 위해 5×10^4 밀도의 MC3T3-E1 조골전구세포에 노랑꽃창포 추출물을 처리하였다. 분화배지로 분화하는 과정에서 노랑꽃창포 추출물로 처리된 세포를 PBS로 2회 세척 후 4℃에서 70% ethanol로 1시간 동안 고정시켰다. 40 mM Alizarin Red S (pH 4.2, Sigma Co.) 용액으로 10 분간 염색하고, 증류수로 충분히 세척하여 calcium nodule 형성 정도를 광학현미경으로 관찰하였다. 염색정도를 정량하기 위하여 10% (W/V) cetylpyridinium chloride이 녹아있는 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액으로 녹여낸 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0061] 도 3은 노랑꽃창포 추출물(도 3)은 분화된 MC3T3-E1 조골세포에서 calcium nodule 형성을 증가시켜 석회화를 촉진시켰다.

[0062] 실험 5 : 노랑꽃창포 추출물의 파골세포 생성 억제

[0063] <TRAP 염색법>

[0064] TRAP 염색을 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7 세포를 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에 실리비닌을 처리하였다. 배양이 끝난 Triton x-100 을 10초간 처리하였다. Triton x-100을 제거한 후 PBS로 세척한 후 Leukocyte Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma Co.)를 이용하여 37℃에서 30분간 염색시킨 후 TRAP 양성인 파골세포 형성을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0065] 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0066] 도 3에 나타난 바와 같이 RANKL로 대식세포를 분화시키는 과정에서 노랑꽃창포 추출물을 처리하게 되면 파골세포의 생성이 억제되는 것으로 나타났다.

[0067] 실험 6 : 노랑꽃창포의 골흡수 억제

[0068] <골흡수 억제 측정>

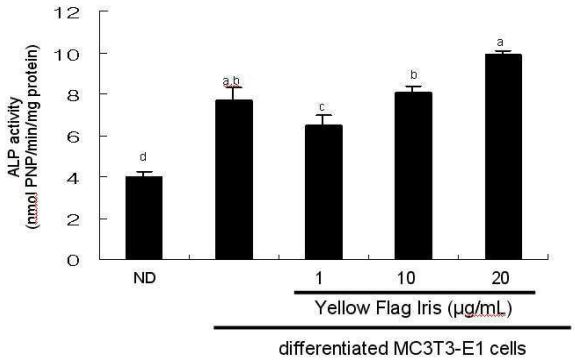
[0069] 파골세포의 TRAP 활성을 측정하기 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7 세포를 상아질 조각(dentine slice) 위에 놓고 RANKL을 첨가한 배지에 노랑꽃창포 추출물을 처리하였다. 배양이 끝난 후, 파골세포를 제거하고 흡수된 부분을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0070] 그 결과는 도 5에 나타내었다.

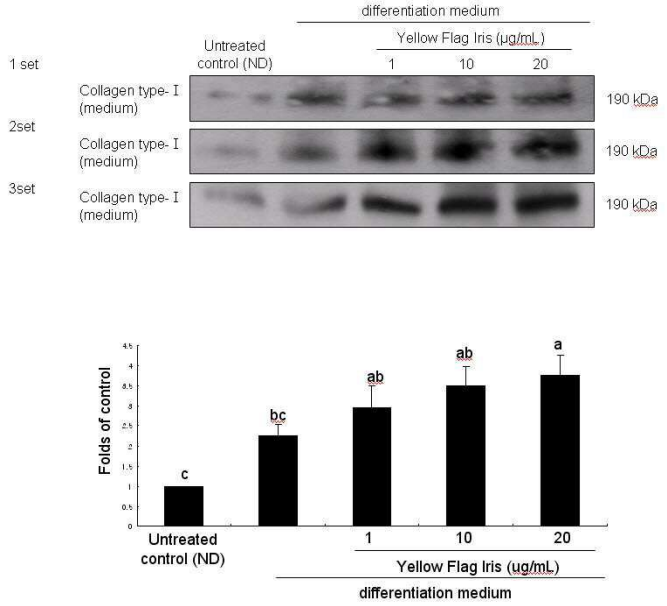
[0071] 5일간 배양된 RAW264.7세포에서 RANKL을 처리하여 분화시키면 함께 처리된 노랑꽃창포 추출물에 의하여 증가된 골흡수 면적이 감소되었다.

도면

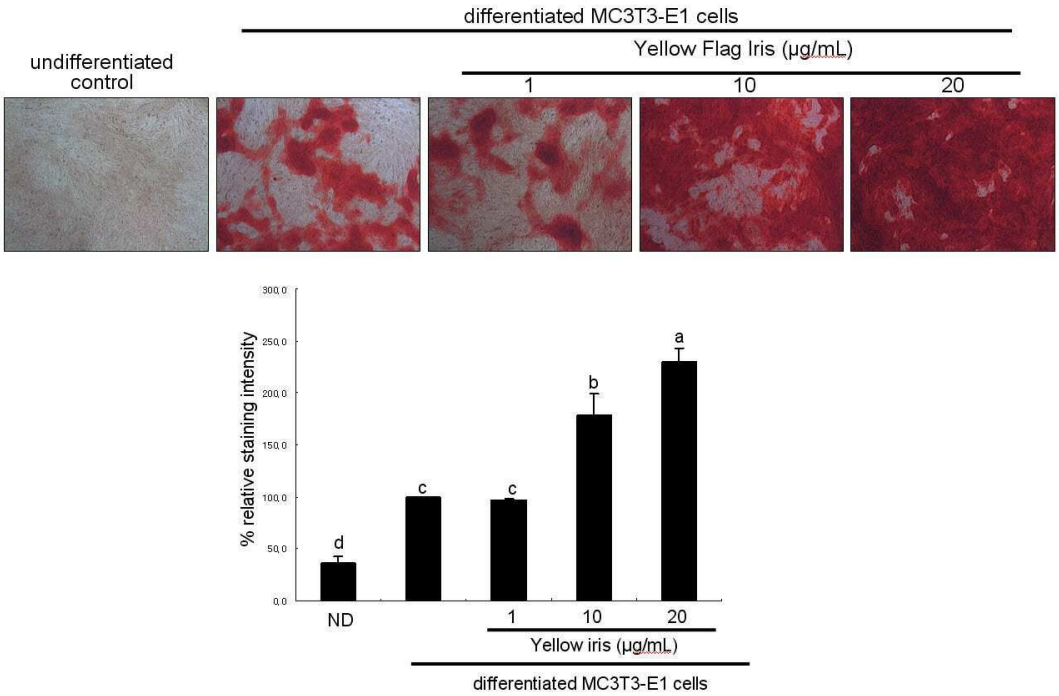
도면1



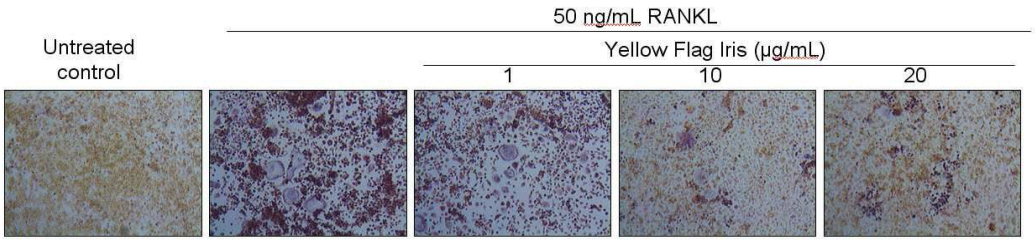
도면2


differentiation medium
Yellow Flag Iris (μg/mL)
Untreated control (ND)
1
10
20
1 set
Collagen type- I (medium)
190 kDa
2set
Collagen type- I (medium)
190 kDa
3set
Collagen type- I (medium)
190 kDa
Folds of control
c
bc
ab
ab
a
Untreated control (ND)
1
10
20
Yellow Flag Iris (ug/mL)
differentiation medium

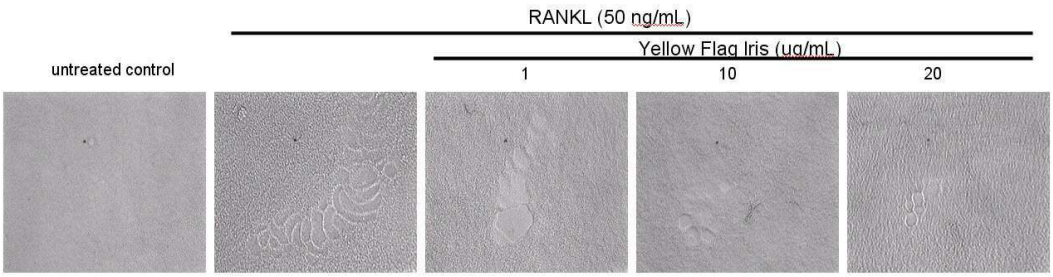
도면3


differentiated MC3T3-E1 cells
undifferentiated control
Yellow Flag Iris (μg/mL)
1
10
20
% relative staining intensity
d
c
c
b
a
ND
1
10
20
Yellow iris (μg/mL)
differentiated MC3T3-E1 cells

도면4


50 ng/mL RANKL
Untreated control
Yellow Flag Iris (μg/mL)
1
10
20

도면5


RANKL (50 ng/mL)
untreated control
Yellow Flag Iris (ug/mL)
1
10
20