(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0070901
(43) 공개일자 2013년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/70 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0138153
(22) 출원일자 2011년12월20일
심사청구일자 2011년12월20일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
김미진
대구광역시 서구 비산2동 20-12번지
임남경
대구광역시 서구 중리동 중리시영 2차 12/103
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

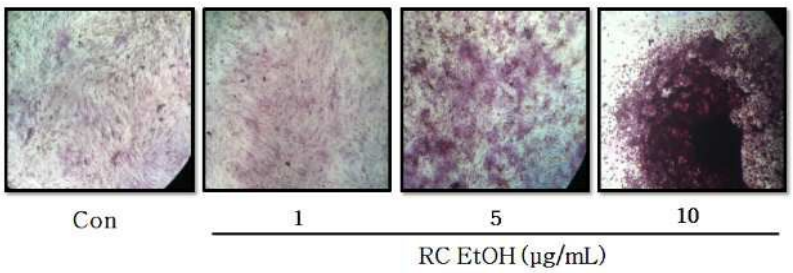
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **소리쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환 치료 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소리쟁이 추출물을 이용한 골 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 파골세포(osteoclast)의 분화 또는 활성을 감소시켜 골 흡수를 억제하고, 조골세포(osteoblast)의 분화를 촉진하여 골 생성을 촉진하는데 큰 효능을 발휘한다. 본 발명은 골다공증 및 암 세포의 골전이로 인하여 발생된 골 질환 예방 및 치료 효능을 가지는 소리쟁이 추출물의 의약 및 식품으로서의 기초적인 자료를 제공한다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

김현정

대구광역시 수성구 만촌3동 만촌우방1차 타운 103/1602

이진호

대구광역시 달서구 호산동 삼성한국형아파트 118/1803

이인선

대구광역시 수성구 황금동 368번지 롯데화성캐슬골드파크 1416/1803

유미희

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역e편한세상아파트 103/1810

이은주

대구광역시 북구 매천동 휴먼시아 211/705

박성진

대구광역시 수성구 지산동 녹원맨션 110/805

정영태

대구광역시 달서구 상인동 1590-1

정연섭

대구광역시 달성군 다사읍 박곡리 159

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-50379
부처명	한국연구재단
연구사업명	지역거점연구단
연구과제명	대사성질환 합병증 천연물 신약개발
주관기관	경북대학교 산학협력단
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄(CH_2Cl_2), 클로로포름($CHCl_3$), 헥산(Hexane) 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매의 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 골질환은 암세포의 골전이에 의해 초래되는 뼈의 손상, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 또는 대사성골질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 조골세포의 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 조골세포에서 알카리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), Runx 2(Runt-related transcription factor 2), 및 제2형 콜라겐(type II collagen)의 발현을 증가시키고, 오스테오칼신(Osteocalcin, OCN)의 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 파골세포의 활성 또는 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 소리쟁이 추출물은 RANKL(receptor activator of NFκB ligand)에 의해 유도되는 파골세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

(a) 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항 조성물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

(a) 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항 조성물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 골질환 개선용 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소리쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 치료, 예방 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리 몸에 뼈는 매우 역동적인 조직중의 하나로 물리적인 지지기능과 중요 장기의 보호기능 뿐만이 아니라, 생체내의 칼슘과 인의 항상성 조절에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 뼈는 파골세포에 의해 뼈가 흡수, 제거되고 이후 조골세포에 의해 연속적으로 새로운 뼈가 형성되는 지속적인 재형성 과정을 거치게 된다. 골 재형성 과정 중 골 흡수 과정은 10일 정도가 소요되며, 이후 조골세포가 이동하여 부착하고 증식, 분화하여 뼈를 형성하는 과정은 약 3개월 정도가 소요된다(1). 이러한 재형성 과정은 성장하는 동안 골 형성이 빠른 속도로 일어나 골량(bone mass)이 꾸준히 증가하여 골격 성숙화(skeletal maturation)을 형성하게 되지만, 나이가 들어감에 따라 점차적으로 골 흡수의 진행이 많아져 골량을 손실하여 결국 골다공증(osteoporosis)과 같은 골 질환(bone disease)이 나타나게 된다. 골다공증은 골량의 감소와 골조직의 퇴화 및 미세구조의 이상을 특징으로 하며 골강도를 약화시키고 골절의 위험성을 높이는 질환(2)으로, 전 세계의 골다공증으로 인한 고관절골절 환자 수는 1990년 130만 명에서 2000년 160만 명으로 25% 정도 증가하였으며(3), 2050년 이후에는 고령 인구의 증가로 인해 골다공증으로 인한 골절이 3배 이상 증가할 것으로 예상되고 있어 골다공증은 국내외의 주요 건강 문제 중의 하나로 대두되고 있다(4). 골다공증의 위험인자로 알려진 흡연(5), 고혈압(6), 당뇨(7) 등은 산화적 스트레스를 증가시키는 요인으로서 최근 산화적 스트레스와 골다공증이 상호 밀접한 관계가 있음이 밝혀지며(8, 9) 여러 연구들이 진행되고 있다. Garrett IR 등(10)은 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo)에서 유리기(free radicals)가 뼈 흡수와 파골형성에 영향을 준다고 보고했다. 더구나 유리기는 산화적 스트레스 반응의 전사인자인 NF-κB의 활성을 통해서 파골세포(osteoclast)의 활성을 증가시켜 뼈 흡수가 증가되게 한다고 알려져 있다(11). 또한 활성산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)은 파골세포의 활성도를 증가시키고 조골세포의 대사를 저해함이 보고(10,12)되기도 하였다. 그리고 골다공증 여성에서 혈중 항산화제의 농도가 감소되었으며(13), 항산화 비타민을 섭취한 경우 골밀도가 높다는 연구결과들이 보고되었다(14). 이러한 보고들을 종합해 볼 때 항산화물질의 함량이 골다공증의 효능에 영향을 미치는 것으로 보여진다. 현재 골다공증의 치료에는 칼슘 보충제, 비타민(vitamin) D 대사산물과 타이아자이드 이뇨제(thiazide diuretic) 요법, 칼시토닌(calcitonin) 요법, 비스포스포네이트(bisphosphonates) 요법, 에스트로겐(estrogen) 요법 등이 이용되고 있다. 그 중 파골세포의 기능을 억제하여 골 흡수를 줄이는 것이 골다공증의 치료에 주로 이용되고 있는데, 가장 대표적으로 사용되고 있는 약물이 비스포스포네이트(bisphosphonate) 제재이다(15). 이러한 비스포스포네이트(bisphosphonate) 약물은 파골세포의 세포사멸을 촉진하고 파골세포가 골 흡수 표면에서 골 흡수 기능을 수행하는데 기계적인 저해 효과를 가지는 것으로 알려져 있고(16), 또한 파골세포의 분화를 억제하는 기능이 있음이 보고되었다(17). 그러나 이러한 약제들은 이미 알려진 골다공증에 대한 효과에도 불구하고 하악골 괴사와 같은 심각한 부작용이 알려지면서(18) 부작용이 없는 대체 약물을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다. 또한 아직까지 감소된 골량을 완전히 회복시킬 수 있는 약물이 없어 골다공증은 치료보다 예방의 중요성이 강조되고 있다(19).

[0003] 한편, 우리 몸에 골을 형성시키는 세포인 조골세포는 골수에 존재하며 지방세포(adipocyte), 연골세포(chondrocyte), 근육세포(myocyte) 등으로 분화할 수 있는 전구세포인 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)로부터 기원한다. 중간엽 줄기세포에서 조골세포로의 분화는 BMP(bone morphogenetic protein)에 의하여 시작되며 골 기질을 이루는 수많은 골 기질 단백질들의 영향을 받게 되고, 이러한 골 기질 단백질들은 분화과정의 단계마다 특이적으로 발현이 된다. 전조골세포는 세포의 증식이 멈춘 후에 골 특이적 ALP(alkaline phosphatase)를 분비하고, 분화하는 과정에 가장 필수적인 골 기질 단백질은 골 단백의 85-90%를 차지하는 제1형 콜라겐(type I collagen)을 비롯한 프로테오글리칸(proteoglycans), 오스테오칼신(osteocalcin), 오스테오폰틴(osteopontin), 오스테오넥틴(osteonectin), BSP(bone sialro protein)을 합성하게 된다. 활성화된 조골세포는 ALP와 같은 효소의 합성을 통해 유기물인 뼈 기질 위에 칼슘과 인산의 염이 고도로 조직화된 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite) 결정을 운반하고 축적시키게 해서 골 형성을 이루게 한다. 따라서 조골세포의 ALP 활성도는 조골세포 분화의 효율적인 검정 방법으로 사용되고 있다(20). 또한 조골세포는 여러 사이토카인(cytokine)의 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절하는 기능을 담당한다(21). 파골세포는 골 대사 과정에서 뼈를 분해하는 주된 세포로서 최대 50여개의 핵을 가지는 거대 다핵세포(Multinucleated giant cell)이다. 또한

뼈의 표면에 부착하여 여러 가지 효소 및 산성질을 분비함으로서, 뼈의 석회질 파괴와 흡수에 중요한 역할을 수행한다(22). 파골세포는 조골세포에서 분비되는 사이토카인의 자극에 의해 분화되는데 Takami 등(23)에 따르면 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)와 M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)는 조골세포가 없는 환경에서 파골세포의 분화를 유도한다고 보고하였다. 따라서 RANKL과 M-CSF는 파골세포의 분화과정에 중요한 인자임을 알 수 있으며, 최근 보고된 연구들에 의하면 RANKL은 파골세포의 분화뿐만 아니라 기능, 생존, 파골세포의 융합 및 재흡수 조절에 중요한 인자임을 알 수 있다(24).

[0004] 소리쟁이(Rumex crispus L.)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년초식물로서 우리나라 전국 각지에서 자생하고 있으며, 들이나 밭둑, 개울가 등의 습한 곳에서 잘 자란다. 소리쟁이 잎은 양제엽이라고 불리며, '본초강목' 에서 양제엽은 곪은 부위나 부스럼에 붙이면 효능이 좋으며, 맛이 달고 성질은 미끄러우며 차고 독이 없다고 기록되어 있다. 또한 민간에서는 어린순을 생즙을 내어 먹거나 식용으로 이용되며, 장풍변비(腸風便秘), 설종(舌腫), 소화불량증, 장출혈 등에 효과가 있다고 알려져 있다. 소리쟁이 잎에는 플라보노이드의 일종인 케르시트린(quercitrin)이 들어있으며, 케르시트린(quercitrin)은 이뇨작용과 모세혈관을 강화시켜 주는 작용이 있어 동맥경화와 고혈압에 효과가 있다고 보고되었다(25). 그러나 소리쟁이 잎이 골 대사 조절이나 다른 생리기능성에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 인체에 안전한 것으로 인정되는 천연물로부터 골 감소 질환의 치료 및 예방 물질을 개발하기 위해 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물이 조골세포의 분화를 촉진하는 반면 파골세포의 분화 및 활성을 억제함으로써 골 감소 질환의 치료 및 예방뿐 만 아니라, 골 기능 개선용 기능성 식품 소재로 개발될 가능성이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 소리쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 소리쟁이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 개선용 식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

[0009] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 유효성분인 "소리쟁이(*Rumex crispus* L.)" 는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년초식물로서 우리나라 전국 각지에서 자생하고 있으며, 들이나 밭둑, 개울가 등의 습한 곳에서 잘 자란다. 소리쟁이 잎은 양제엽이라고 불리며, '본초강목' 에서 양제엽은 곪은 부위나 부스럼에 붙이면 효능이 좋으며, 맛이 달고 성질은 미끄러우며 차고 독이 없다고 기록되어 있다. 또한 민간에서는 어린순을 생즙을 내어 먹거나 식용으로 이용되며, 장풍변비(腸風便秘), 설종(舌腫), 소화불량증, 장출혈 등에 효과가 있다고 알려져 있다. 소리쟁이 잎에는 플라보노이드의 일종인 케르시트린(quercitrin)이 들어있으며, 케르시트린(quercitrin)은 이뇨작용과 모세혈관을 강화시켜 주는 작용이 있어 동맥경화와 고혈압에 효과가 있다고 보고되어 있다.

[0012] 본 명세서에서 용어 "소리쟁이 추출물" 은 소리쟁이의 다양한 기관 또는 부분(예: 잎, 꽃, 및 줄기 등)으로부터 추출하여 얻은 것을 의미하고, 바람직하게는 지상부, 가장 바람직하게는 잎으로부터 얻은 추출물을 의미한다.

[0013] 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 소리쟁이 추출물을 포함한다. 본 명세서에서 소리쟁이를 언급하면서 사용되는 용어 '추출물' 은 소리쟁이에 추출용매를 처리하여 얻은 추출 결과물뿐만 아니라 소리쟁이 자체를 동물에게 투여할 수 있도록 제형화(예컨대, 분말화)된 소리쟁이 가공물도 포함하는 의미를 갖는다.

[0014] 본 발명의 조성물에서 이용되는 소리쟁이 추출물을 소리쟁이에 추출용매를 처리하여 얻는 경우에는, 다양한 추

출용매가 이용될 수 있다. 바람직하게는, 극성 용매 또는 비극성 용매를 이용할 수 있다. 극성 용매로서 적합한 것은, (i) 물, (ii) 알코올(바람직하게는, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), (iii) 아세트산, (iv) DMFO(dimethylformamide) 및 (v) DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함한다. 비극성 용매로서 적합한 것은, 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, o-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함한다.

[0015] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 추출용매는 (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 부틸아세테이트, (h) 1,3-부틸렌글리콜, (i) 헥산 및 (j) 디에틸에테르를 포함한다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 추출물은 물, 메탄올, 에탄올 또는 이의 조합을 소리쟁이에 처리하여 수득한 것이다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 용어 '추출물' 은 상술한 바와 같이 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 추출물을 추가적으로 분획(fractionation)한 분획물도 포함한다. 즉, 소리쟁이 추출물은 상술한 추출용매를 이용하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 상술한 용매를 사용하여 추가 추출 분획한 분획물, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 소리쟁이 추출물에 포함되는 것이다.

[0017] 본 발명에서 이용되는 소리쟁이 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 소리쟁이 추출물은 조골세포의 분화를 촉진한다.

[0019] 하기 구체적인 일 실시예에 의하면, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 조골세포에서 알카리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), Runx 2(Runt-related transcription factor 2), 및 제2형 콜라겐(type II collagen)의 발현을 증가시키고, 오스테오칼신(Osteocalcin, OCN)의 분비를 증가시킨다.

[0020] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 소리쟁이 추출물은 파골세포의 활성 또는 분화를 억제한다.

[0021] 하기 구체적인 일 실시예에 의하면, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 RANKL(receptor activator of NFκB ligand)에 의해 유도되는 파골세포의 분화를 억제한다.

[0022] 본 발명의 소리쟁이 추출물은 조골세포의 분화를 촉진하고, 파골세포의 분화와 활성을 억제함으로써 골의 형성을 촉진시키는 작용을 하며, 이러한 작용을 통해 다양한 골질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 골질환의 예는 암세포의 골전이에 의해 초래되는 뼈의 손상, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 대사성 골질환, 골용해, 백혈구 감소증, 뼈의 기형, 고칼슘혈증 또는 신경압박 증후군이다.

[0024] 특히, 본 발명의 조성물은 골다공증 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타낸다. 골다공증은 원발성(일차성) 골다공증과 속원성(이차성)골다공증으로 나눌 수 있다. 원발성 골다공증은 칼슘과 비타민 D를 적절히 섭취하지 않거나 육체적 운동을 적절히 하지 않거나 흡연하거나 폐경기 이후 여성들이나 노년기의 남성들에게 주로 생길 수 있는 골다공증을 의미한다. 속발성 골다공증은 특정 질환이나 약물에 의해 골다골증이 유발되는 것을 의미한다. 이 경우 젊은 사람에서도 골다공증이 유발될 수 있으며, 질환이나 약물의 심각성과 노출된 기간에 비례하여 골강도가 감소하고 골절의 발생률이 증가한다. 질환으로는 갑상선 기능 항진증, 부갑상선 기능항진증, 쿠싱증후군(부신피질호르몬 과다분비질환), 조기폐경, 인위적 수술(난소 절제)에 의한 폐경, 성기능 저하증, 만성 간질환(간경화증), 류마티스 관절염, 만성 신부전증, 위절제수술 등을 들 수 있으며, 약물로는 스테로이드(부신피질호르몬제), 항경련제(간질약), 헤파린 등이 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 암세포 또는 암조직의 골 전이에 의한 골 질환 예방 및 치료에 뛰어난 효과를 나타낸다. 예를 들면, 상기 암세포 또는 암조직은 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 직장암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암, 자궁경부암, 자궁내막 암, 뇌암, 전립선암, 골암, 피부암, 갑상선암, 백혈병,

non-Hodgkin 임파선암, 부갑상선암 및 요관암 세포 또는 조직을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 파골세포(osteoclast)의 형성을 감소시키고, 파골세포에 의한 골 흡수(bone resorption) 및 골 파괴를 억제하는 효능을 나타낸다.

[0027] 파골세포는 혈액세포(조혈모세포)에서 발생된 세포로서, 혈액 내에 칼슘이 부족하거나 뼈를 재형성(bone remodeling)을 해야 하는 경우에 뼈를 파괴하는 기능을 가진다. 또한, 본 명세서 용어 '골 흡수'는 파골세포가 뼈에 강력한 산(acid) 및 단백질 분해효소를 분비하여 뼈를 분해하는 것을 의미한다.

[0028] 하기 구체적인 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본 발명의 소리쟁이 추출물은 조골세포에서 알카리성 인산분해효소(alkaline phosphatase), Runx 2(Runt-related transcription factor 2), 및 제2형 콜라겐(type II collagen)의 발현을 증가시키고, 오스테오칼신(Osteocalcin, OCN)의 분비를 증가시킨다. 알카리성 인산분해효소는 여러 가지 동종효소(기능은 같지만 구조가 약간씩 다른 효소형태)로서 신체의 여러 부위(특히 뼈와 간)에 정상적으로 많이 존재한다. 뼈를 형성하는 조골세포(osteoblast)에 많이 존재하며, 뼈의 병 진단과 치료효과 판정에 도움을 준다. 특히 뼈의 생성이 많아지는 모든 경우(예를 들면 골절, 종양에 의한 뼈의 파괴시 복구를 위해서 뼈의 형성이 촉진된다), 조골세포의 활동이 증가되고 조골세포의 효소인 알칼리성 인산분해효소의 활성도 역시 증가된다. 오스테오칼신(bone Gla protein: BGP)은 감마-카르복실글루타민산(γ-carboxylglutamate: Gla) 잔기를 2-3군데 함유하며 아미노산 49 잔기로 구성된 분자량 약 5,900 Da의 비타민 K 의존성 칼슘 결합 단백질이다. 뼈의 유기성분 중 90%는 콜라겐(collagen)이고 나머지 10%가 오스테오칼신, 오스테오넥틴(osteonectin), α-HS 당단백질(glycoprotein), 시아노단백질(cyanoprotein), 페투인(fetuin) 등의 비 콜라겐성 단백질이다. 뼈 속의 오스테오칼신은 국소 석탄화 조절을 하거나 뼈와 체액간의 Ca2+의 움직임을 제어하는등 뼈의 대사에 있어서 중요한 생리적 역할을 한다.

[0029] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 소리쟁이 추출물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 소리쟁이 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0031] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0032] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

[0033] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 ㎎/㎏ 범위 내이다.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제공될 수 있다.

[0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 소리쟁이 추출물의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식품학적 조성물이다.

[0037] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 소리쟁이 추출물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토

스, 수크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 소리쟁이 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0039] (ⅰ) 본 발명은 소리쟁이 추출물을 이용한 골 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0040] (ii) 본 발명의 조성물은 파골세포(osteoclast)의 분화 또는 활성을 감소시켜 골 흡수를 억제하고, 조골세포(osteoblast)의 분화를 촉진하여 골 생성을 촉진하는데 큰 효능을 발휘한다.

[0041] (iii) 본 발명은 골다공증 및 암 세포의 골전이로 인하여 발생된 골질환 예방 및 치료 효능을 가지는 소리쟁이 추출물의 의약 및 식품으로서의 기초적인 자료를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 다양한 용매를 사용하여 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 분말을 추출 및 분획하는 공정을 보여준다.

도 2는 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 에탄올 추출물의 MC3T3-E1 세포에서 세포생존율 및 ALP 활성에 대한 결과를 보여준다. ALP 활성은 세포외 효소로 측정하였다. MC3T3-E1 세포는 96웰 플레이트에서 70-80% 밀도로 접종하였고 10% FBS, 비타민C(100 μg/mL) 및 β-GP(5 mM)를 포함하는 α-MEM에서 1일간 배양하였다. ALP 활성은 총 단백질에 대해 정상화하였다. 생존세포는 MTT 분석에 의해 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 플레이팅하고 상이한 농도의 소리쟁이 에탄올 추출물(5 - 20 μg/mL)의 존재 또는 부존재 하에서 48시간 동안 배양하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대해 백분율 또는 배수로 표현하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 3은 MC3T3-E1 세포에서 세포 생존율 및 ALP 활성에 미치는 소리쟁이 추출물의 다양한 분획의 영향을 보여준다. ALP 활성은 세포외 효소에 의해 측정하였다. MC3T3-E1 세포는 96웰 플레이트에서 70-80% 밀도로 접종하였고 10% FBS, 비타민C(100 μg/mL) 및 β-GP(5 mM)를 포함하는 α-MEM에서 1 일간 배양하였다. ALP 활성은 총 단백질에 의해 정상화하였다. 생존세포는 MTT 분석에 의해 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 플레이팅하고 상이한 농도의 소리쟁이 에탄올 추출물(1-10 μg/mL)의 존재 또는 부존재 하에서 48시간 동안 배양하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대해 백분율 또는 배수로 표현하였다.

도 4는 MC3T3-E1 세포에서 세포외 매트릭스의 ALP에 대한 소리쟁이 에탄올 추출물의 영향을 보여준다. 세포는 10% FBS, 100 μg/mL 비타민 C 및 5 mM β-GP를 포함하는 α-MEM에서 배양하였다.

도 5는 MC3T3-E1 세포에 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 추출물을 15일간 처리한 후 콜라겐에 대한 염색을 행한 결과를 보여준다. 세포 매트릭스 콜라겐은 Van Gieson's 염색방법에 의해 염색을 행하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 6은 MC3T3-E1 세포에서 오스테오칼신(osteocalcin) 분비에 대한 소리쟁이 에탄올 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 세포를 1, 5, 10, 20 μg/mL의 소리쟁이 추출물의 다양한 농도로 20일간 처리하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 7은 MC3T3-E1 조골세포의 분화동안에 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 에탄올 추출물로 처리하여 ALP(alkaline phosphatase), Runx-2 및 제2형 콜라겐(type Ⅱ collagen, T2C) mRNA 수준을 측정한 결과이다. GAPDH는 내부대조군으로 사용하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 8은 MC3T3-E1 조골세포의 분화동안에 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 에탄올 추출물로 처리한 후 BSP (bone sialo protein) 단백질의 발현수준을 측정한 결과이다. β-액틴을 내부대조군으로 사용하였다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대해 배수로 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 9는 마우스 골수유래 파골세포의 증식 및 TRAP 활성에 대한 소리쟁이 에탄올 추출물의 영향을 측정한 결과이다. 패널 A는 마우스 골수유래 파골세포를 10-40 μg/mL의 소리쟁이 에탄올 추출물과 함께 48시간 배양한 결과

이다. 패널 B는 마우스 골수유래 파골세포를 소리쟁이 에탄올 추출물, RANKL(100 ng/mL), M-CSF(50 ng/mL)와 함께 72시간 배양한 결과이다. 데이터는 평균±S.D., 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 10은 소리쟁이 에탄올 추출물이 마우스 BMMs에서 RANKL-유도되는 파골세포 형성에 대해 미치는 영향을 측정한 결과이다. 마우스 BMMs를 소리쟁이 추출물의 존재 또는 부존재하에서, M-CSF(50 ng/mL), RANKL(100 ng/mL)와 함께 배양하였다. 세포를 고정하고 TRAP에 대해 염색하였다.

도 11은 소리쟁이 분획물이 마우스 골수유래 파골세포의 증식 및 TRAP 활성에 대해 미치는 영향을 측정한 결과이다. 패널 A는 마우스 골수유래 파골세포를 10-40 μg/mL의 소리쟁이 분획물과 함께 배양한 결과를 보여준다. 패널 B는 마우스 골수유래 파골세포를 소리쟁이 분획물, RANKL(100 ng/mL), M-CSF(50 ng/mL)와 함께 72시간 배양한 결과이다. 데이터는 평균± S.D., 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 12는 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 마우스 BMMs에서 RANKL-유도되는 파골세포의 형성에 미치는 영향을 측정한 결과이다. 마우스 BMMs를 M-CSF(50 ng/mL) 및 RANKL(100 ng/mL)와 함께, 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 존재 또는 부존재하에서 배양하였다. 세포를 고정한 후 TRAP에 대해 염색하였다.

도 13은 RANKL 신호전달에 있어서 MAPKs의 인산화에 대한 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 영향을 측정한 결과이다. Raw 세포들을 소리쟁이의 에틸아세테이트 분획물로 전처리하고, 지정된 시간 동안 RANKL(100 ng/㎖)으로 자극하였다. 세포 용해물을 c-fos, NFATc1, JNK, p-NF-κB, ERK 및 액틴에 대한 항체를 사용한 웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다. 데이터는 대조군에 대한 배수로 표현한 평균±S.D.으로 나타내었다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0044] **실시예**

[0045] **1. 시약 및 기기**

[0046] **1.1. 시약**

[0047] 시료 추출 및 분획에 사용된 용매인 에탄올, n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 n-부탄올은 J.T.Baker사(Mallinckrodt Baker Inc., Philipsburg, USA)의 특급시약을 사용하였다. 세포배양에 사용된 α-MEM(alpha-minimum essential medium), 항생제, 트립신-EDTA, FBS(fetal bovine serum)은 Gibco BRL(Gibco BRL, Grand island, N.Y., USA)로부터 구입하였으며, 세포 증식검사에 사용된 MTT[3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 시약은 Amresco사(Amresco, Solon Ind. Ohio, USA)의 제품을 사용하였다. ALP 효소 측정과 염색에 사용된 시약은 모두 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo., USA)로부터 특급 시약을 사용하였고, 오스테오칼신 샌드위치 ELISA 키트(osteocalcin sandwich ELISA kit)는 Biomedical Technologies(Biomedical Technologies Inc., MA, USA)로부터 구입하였다. PCR 실험에 사용된 프라이머는 Bioneer(Bioneer. Co., N.Y., USA)사로부터, RNA 함량추출을 측정하기 위하여 사용한 시약은 Trizol solution (Molecular Research Center, Inc. Ohio, USA), 1-브로모-3-클로로프로판은 Sigma사를 사용하였으며, RT-PCR 측정은 RT premix(Bioneer. Co., N.Y., USA), DNA 래더는 Promega(Promega Co., Madison, WI, USA)사의 제품을 구입하여 사용하였다. 면역블로팅(Immunoblotting) 분석에 사용된 Tris-Cl(trizma base), EDTA(ethylenedinitrilotetraacetic acid disodium salt), triton X-100, TEMED(N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine), 아크릴아미드(acrylamide), SDS(sodium dodecylsulfate), APS(ammonium persulfate), Tween-20, BCA kit(bicinchoninic acid kit) 등은 모두 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis. Mo., USA)로부터 구입하였고, ECL 검출 키트는 Amersham사(Amersham Bioscience., Buckinghamshire, England)로부터 구입하였다. 그리고 immobilon-P transfer membrane은 Millipore사(Millipore, Billerica., Billerica Massachucetts, USA)로부터 구입하였고, BSP 항체는 Abcam사(Abcam plc 332 Cambridge Science Park.,UK), 항-마우스 IgG와 항-래빗 IgG는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. 파골세포 분화에 사용한 시약인 RANKL과 M-CSF는 Peprotech사(Peprotech Inc., NJ, USA)로부터 구입하였다.

[0048] 1.2. 기기

[0049] 실험에 사용한 주요 기기는 로터리 진공증발기(Buchi, R-3000, Germany), 마이크로플레이트 분광기(Spectra max 340 pc, Molecular Device, USA), CO_2 인큐베이터(Model 3154, Forma Scientific, USA), PCR 기기(Mygenie96, Bioneer, USA), 미니-단백질 전기영동시스템(Bio-Rad Co., USA), 파워 서플라이(Bio-Rad Co., USA), 마이클로플레이트 진탕기(Finemixer SH2000, FINEPCR, Korea)를 사용하였다.

[0050] 2. 시료 조제

[0051] 2.1. 소리쟁이 추출물 제조

[0052] 실험에 사용된 소리쟁이 잎은 대구시 약령시장에서 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다. 먼저 시료 무게의 10배량(w/v)의 70% 에탄올로 24 시간 동안 정치 배양하여 총 3회 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.3, England)를 사용하여 2회 여과하고 상등액은 로터리 진공증발기(Buchi, R-3000, Germany)로 55℃에서 농축한 후 동결건조하여 에탄올 추출물로 사용하였다.

[0053] 2.2. 소리쟁이 추출물을 이용한 계통적 분획

[0054] 도 1에서와 같이 동결 건조한 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 에탄올 추출물을 20배(w/v)의 증류수에 녹인 후 n-헥산(hexane), 클로로포름($CHCl_3$), 에틸아세테이트(EtOAc) 및 부탄올(BuOH)을 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통 분획하였고 남은 수용성층은 농축하여 수 분획으로 감압 농축하여 진공하에서 남은 유기용매를 휘발시킨 뒤 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

[0055] 3. 소리쟁이의 항산화 활성 측정

[0056] 3.1. 총 폴리페놀 함량 측정

[0057] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(26)을 이용하여 탄닌산(tannnic acid)을 이용한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다. 즉, 각 시료 1 mg을 증류수 1 mL에 녹이고 10배 희석한 희석액 2 mL에 2배 희석한 폴린(folin) 시약 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치한 후 10% Na_2CO_3 2 mL을 넣고 1시간 반응시킨 후 마이크로플레이트 분광기(Spectra max 340 pc, Molecular Device, USA)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

[0058] 3.2. DPPH(α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성

[0059] 시료의 자유라디칼 소거활성은 Blois(27) 방법을 일부 변형하여 실시하였고, 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 160 μL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 40 μL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 녹인 99% 메탄올을 대조구로 하여 대조구에 대한 시료의 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었으며, 또한 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA를 사용하였다.

[0060] 3.3. ABTs radical cation decolorization 활성 측정

[0061] ABTs 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 ABTs radical cation decolorization 방법(28)에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6 -sulfonic acid) diammonium salt(ABTs)와 2.4 mM 포타슘 퍼설페이트(potassium persulphate)를 섞어 12시간 이상 암소에 방치하여 청록색의 ABTs 라디칼을 형성시킨 후, 라디칼 스톡 용액(radical stock solution)은 732 nm에서 흡광도 값이 0.07(± 0.02)이 되도록 흡광계수를 이용하여 PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4)로 희석한다. 이 용액 0.9 mL에 농도별로 제조한 각 시료용액 0.01

mL을 가한 후 실온에서 1분간 반응시킨 후, 반응액의 흡광도 변화를 732 nm에서 측정하였다. 각 시료의 유리 라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다.

[0062] **4. 소리쟁이 추출물 및 분획물의 골 형성능 측정**

[0063] **4.1. 세포배양**

[0064] 마우스 두개골 조골세포(Mouse calvaria osteoblastic cells)인 MC3T3-E1 세포는 ATCC(CRL-2593, USA)로부터 분양받아 사용하였다. α-MEM배지에 10% FBS와 1% 항생제를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 2-3일 마다 계대배양하고, 분화유도를 위해 5 mM β-글리세롤 포스페이트(Sigma, St. Louis, Mo, USA)와 100 μg/mL의 비타민 C(Sigma, St. Louis, Mo, USA)를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 3일마다 배지를 교환하였다(29).

[0065] **4.2. 세포증식 측정**

[0066] 시료의 세포증식과 독성을 측정하기위해 Green 등(30)의 방법에 따라 MTT[3-(3,4-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 분석을 실시하였다. MTT 분석은 미토콘드리아의 탈산수소효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 포르마잔(formazan)으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로, 생성된 포르마잔(formazan)의 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 조골세포는 배양한 세포를 0.4% 트립판 블루(trypan blue) 염색법으로 세포수를 측정한 후 1 X 10^4 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 200 μL씩 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 α-MEM 배지 180 μL를 첨가한 후 각각의 농도별 시료를 각 웰에 20 μL씩 넣었다. 시료의 최종 농도가 0, 5, 10, 20μg/mL이 되도록 배양액에 첨가하여 48시간동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 5 mg/mL 농도로 10μL를 각 웰에 가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상층액을 제거하고 각 웰에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정을 용해시켜 ELISA 리더(Spectra MAX M2, Molecular Device, USA)기기를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0067] **4.3. ALP(Alkaline phosphatase) 활성 측정법에 의한 조골세포 활성 검색**

[0068] 배양된 MC3T3-E1 세포를 1X10^4 세포/웰로 조정하여 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 분화유도배지로 교환하고 시료처리를 하였다. 시료추출물을 각 농도별로 처리하여 세포를 요일별로 배양한 후 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 μL씩 첨가하여 37℃, 30분간 용해시켰다. 용해된 세포의 상등액 5 μL는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 μL의 0.1 N 글리신(glycine)과 10 μL의 100 mM ρ-NPP(ρ-nitrophenylphosphate)를 첨가한 후 다시 37℃, 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 μL의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 ρ-NPP로부터 생성된 ρ-NP (ρ-nitrophenol)를 측정하여 ρ-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다(29).

[0069] **4.4. ALP 염색법에 의한 조골세포 활성도 검사**

[0070] ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 24웰에 1×10^5 세포/mL로 처리하고 추출물을 적정농도로 처리하여 시간경과에 따른 효소 활성을 측정하였다. 알카라인 포스파타아제 키트(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 염색하였다. 즉 배지를 제거하고 고정액(시트레이트-아세톤-포름알데히드)을 이용하여 약 30 초간 실온에 보관하였다가 45 초간 증류수로 씻어낸 다음, 준비된 디아조니움 용액(diazonium solution)(sodium nitrite : FRV-alakline : naphthol AS-BI alkaline solution = 1:1:1)을 첨가하여 약 15분간 실온에서 배양한 뒤 2분간 증류수로 세척하고 헤마톡실린 용액(hematoxylin solution)으로 2분간 다시 염색한 뒤 흐르는 물에 염색액을 철저히 씻어내고 현미경으로 관찰하여, 염색 부위를 확인하였다(31-33).

[0071] **4.5. 콜라겐 함량 검색**

[0072] 조골세포의 콜라겐 합성능력은 Tullberg-Reinert 등(34)의 방법에 따라 시리우스 레드 기반 비색분석(sirius red based colorimetric assay)를 이용하여 측정하였다. 먼저 배양한 조골세포를 PBS로 세척 후 bouin fluid로 1시간 고정하였다. 이 후 PBS로 세척하고 건조하여 시리우스 레드(sirius red) 염료 시약으로 1시간 동안 흔들어주며 염색하고 0.01 N HCl로 세척 후 0.1 N NaOH 200 μL을 첨가하여 용해시켜, ELISA 리더(Spectra MAX M2, Molecular Device, USA)기기를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, 콜라겐 함량은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0073] **4.6. 오스테오칼신 분비 측정**

[0074] 세포의 증식에 따른 조골세포의 특징 단백질 마커인 오스테오칼신(osteocalcin)의 생성을 측정하기 위하여 샌드위치 ELISA 분석 키트를 이용하여 실험하였다. 즉 MC3T3-E1 세포를 1 X 10^4 세포/웰로 96-웰 플레이트에 분주하였고, 24시간 후 분화 유도 배지와 시료를 처리하였다. 오스테오칼신이 피복된 웰에 20일간 배양한 배지 25μL와 오스테오칼신 항혈청 100 μL를 넣어 24시간 반응시킨 후 300 μL/웰 phosphate-saline 세정 완충액으로 세척하였다. 세척된 웰에 100 μL의 스트렙타비딘-호오스래디쉬 퍼옥시다아제 시약을 넣어 30분간 반응시키고 세척한 후 TMB 용액과 과산화수소 용액을 1:1 비율로 섞어 100 μL 첨가한 후, ELISA 리더로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0075] **4.7. RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골기질 유전자 발현 조사**

[0076] 총 RNA는 조골세포를 100Φ 디쉬에 1 X 10^6 세포/mL로 9일간 배양하여 TRI 시약(Molecular Research Center, Inc.)를 사용하여 분리하였다. 즉 배양된 세포에서 배지를 제거하고 PBS (pH 7.4) 10 mL로 두 번 세척한 후 TRI 시약을 처리하였다. 이것을 1.5 mL 튜브에 1 mL씩 담고 1-브로모-3-클로로프로판을 200 μL 첨가하여 30초간 볼텍스하여 원심분리(3,000 rpm, 15분, 4℃)하여 상등액을 취해 새로운 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 이상 방치하고 나서 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4℃)한 후 상등액을 제거하였다. 침전물에 75% 에탄올을 첨가하여 제거한 후 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 증류수를 첨가하여 65℃ 수조에서 10분간 반응시켜 침전물을 녹였다. 분리된 RNA는 분광기와 1% 포름알데히드 아가로스 젤 전기영동을 이용하여 정량하고 확인하였다. 분리한 총 RNA 2μg, superscript Ⅱ RT200 U, 0.5 μg 올리고 dT, 0.5 mM dNTP를 첨가하여 42℃에서 90분간 반응시킨 후 70℃에서 10분간 반응을 종결시켰다. 총 RNA를 역전사시키고 결과물인 cDNA는 하기 표 1의 프라이머들을 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR의 반응에는 2.5 U Takara Ex. Taq 중합효소, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP를 첨가하여 각각의 프라이머에 맞는 조건으로 실시하였다.

표 1

[0077]

Target gene	Fragment size(bp)	Oligonucleotides
Runx-2	250	F: 5'-CAGGAAGACTGCAAGAAGGCTCTGG-3' (서열번호 1)
		R: 5'-ACAAGGTGTCACTGCGCTGAAGA-3' (서열번호 2)
Type 2 collagen	172	F: 5'-CTCCGGCTCCTGCTCCTCTTA-3' (서열번호 3)
		R: 5'-GCACAGCACTCGCCCTCCC-3' (서열번호 4)
GAPDH	514	F: 5'-TGAGAACGGGAAGCTTGTCA-3' (서열번호 5)
		R: 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA-3' (서열번호 6)

[0078] **5. 소리쟁이 추출물 및 분획물의 골 흡수능 측정**

[0079] **5.1. 골수세포의 분리 및 파골세포 분화**

[0080] 4-5 주령된 ICR 마우스의 경골(tibia)을 적출하여, 양끝을 절단하고 α-MEM을 통과시켜 골수세포를 수집하고, 50 ng/mL macrophage-colony stimulation factor(M-CSF)를 처리하여 24시간 배양하였다. 미부착 세포를 α-MEM으로 세척한 후 96 웰에 5X10^4 세포/웰이 되도록 분주하고 50 ng/mL의 M-CSF가 첨가된 α-MEM 배지에 3일간 배양하였다. 그 후 50 ng/mL의 M-CSF와 100 ng/mL의 RANKL을 함께 처리하고, 시료를 농도별로 처리하여 4일간

배양하였다.

[0081] **5.2. 파골세포의 TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) 활성**

[0082] Hotokezaka 등(35)의 방법에 따라 TRAP 활성을 측정하였다. 96-웰에 $5X10^4$ 세포/웰이 되게 세포를 접종하고 분화인자와 시료를 처리하여 4일간 배양하였다. 배지를 제거하여 PBS로 세척한 다음 10% 포름알데히드로 고정한 세포에 기질 용액(1.36 mg/mL 4-니트로페닐 포스페이트 디소디엄 염, 10 mM 타르타르산염(tartrate), 50 mM 시트레이트 완충액 pH 4.6)을 100 μL씩 분주하여 37°C, 30 분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 새로운 플레이트에 옮기고 0.1 N-NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. TRAP 활성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

[0083] **5.3. TRAP 염색법에 의한 파골세포 활성도 검사**

[0084] TRAP 염색은 Hotokezaka 등(35)의 방법에 따라 확인하였다. 먼저 50 mM 타르타르산(tartrate acid)를 포함하는 50 mM 소디엄 아세테이트 완충액 10 mL에 1 mg/mL naphtol AS-MX phosphate와 N,N-dimethyl-formamide 100 μL를 첨가하여 염색액을 제조한 후 10% 포름알데히드로 고정한 세포에 염색액을 45 μL씩 분주하고 항온기에서 30분 동안 방치하여 현미경으로 관찰하였다.

[0085] **5.4. 웨스턴 블롯법에 의한 파골세포 분화 관련 단백질 발현 조사**

[0086] 소리쟁이 에탄올 추출물 및 그 분획물이 RANKL 관련 유전자 조절 인자인 c-fos, NFATc1과 JNK, ERK 등의 MAP 키나아제와 전사인자인 NF-κB의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. RAW 264.7 세포($1 X 10^6$ 세포/mL)을 6 웰 플레이트에서 α-MEM 배지를 이용하여 5% CO_2 항온기에서 24시간 배양한 후, 시료를 처리하여 배양하였다. 세포를 2-3회 PBS로 세척 후 1 mL의 용해 완충액을 첨가, 30분 - 1시간 동안 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화 한 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 사용하여 정량하였다. 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액은 단백질을 정량한 후 10% 러닝젤(running gel)과 4.5% 스택킹젤(stacking gel)을 이용하여 125 V 에서 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 실시하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 immobilon-P transfer membrane과 트랜스퍼 완충액(20% 메탄올, 25 mM Tris-HCl, 192 mM 글리신)를 사용하여 350 mA에서 120분간 트랜스퍼 시켰다. 단백질이 이동된 막(membrane)은 fast green solution으로 트랜스퍼의 유무를 확인한 후, 5% 탈지유 용액으로 블로킹하였다. 4℃에서 일차 항체의 발현 정도를 검토하기 위하여 TST 용액에 1:1000으로 희석하여 24 시간 반응시킨 후 TST로 3회 세정하였다. 계속하여 이차항체를 2 시간 반응시키고 다시 TST으로 3회 세정하였다. 증류수로 세척하고 막(membrane)에 ECL 검출 키트의 발색시약 Ⅰ과 Ⅱ를 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X-ray 필름에 노출하여 현상한 후 필름상의 밴드 농도를 관찰하였다.

[0087] **6. 통계처리**

[0088] 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 군간의 유의성 검정은 SAS 프로그램을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test 및 대조군과 추출물 처리군의 Student's *t*-test로 비교하였다. 통계처리 후 *p*값이 0.05 미만일 경우와 *p*값이 0.01 미만일 경우, *p*값이 0.001 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

[0089] **실험결과**

[0090] **1. 소리쟁이(Rumex crispus L.)의 항산화 활성 검색**

[0091] **1.1. 총 폴리페놀 함량 측정**

[0092] 식물에 존재하는 폴리페놀 화합물은 천연 항산화제로써 작용할 수 있다. 또한, 페놀성 화합물은 여러가지 식물

류에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 알려져 있으며 일반적으로 수용성이고 플라보노이드(flavonoid)류가 주를 이루며 단순한 페놀류, 페놀산류, 페닐프로파노이드류, 퀴논류 등을 포함한다(36). 최근에 이런 페놀성 화합물 등이 항산화(37), 항암(38), 당뇨병 예방(39) 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 소리쟁이 에탄올 추출물과 분획물을 탄닌산(tannic acid)을 기준물질로 하여 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 하기 표 2에 나타내었다. 폴리페놀의 함량을 측정한 결과 에탄올 추출물은 176.4±5.8 mg/g으로 나타났고, 분획물들은 에틸아세테이트(ethylacetate), 부탄올(butanol), 헥산(hexane), 클로로포름(chloroform) 및 물(water) 순으로 각각 703.9±75.6 mg/g, 303.4±28.1 mg/g, 206.8±18.5 mg/g, 181.8±13.8 mg/g, 33.5±0.3 mg/g으로 나타났다. 울릉도산 산채류 중 섬고사리 잎, 물엉겅퀴 잎의 폴리페놀 함량이 각각 120.7, 130.2 mg/g으로 보고된 결과(37)와 비교했을 때 소리쟁이 추출물 및 분획물에서 비교적 많은 양의 폴리페놀을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 특히 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물이 가장 많은 폴리페놀 화합물을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

표 2

[0093]

Rumex crispus L.	Total polyphenols (mg/g)[1)]
EtOH extract	176.4±5.8[2)]
Hexane fraction	206.8±18.5
Chloroform fraction	181.8±13.8
Ethyl acetate fraction	703.9±75.6
Butanol fraction	303.4±28.1
Water fraction	33.5±0.3

[0094] [1)]Milligrams of total polyphenol content/g of plants based on tannic acid as standard.

[0095] [2)]Each value is mean ± S.D. (n≥3)

[0096] **1.2. DPPH 자유 라디칼의 소거활성**

[0097] DPPH는 화학적으로 안정화된 자유 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 항산화활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 색깔이 변한다. 이것은 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다(40). 소리쟁이 에탄올 추출물 및 분획물들의 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 알아본 결과는아래 표 3에 나타내었다. 에탄올 추출물에서는 RC_{50}값이 13.0±1.1 μg/mL으로 나타났고, 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물은 RC_{50}값이 2.7±0.2 μg/mL으로 분획물 중 가장 소거능이 우수하였으며 합성항산화제로 널리 알려진 BHA보다도 더 높은 소거능을 나타내었다. 강력한 항산화능을 가진다고 알려진 로즈마리 추출물에서는 RC_{50}값이 5.1±0.1 μg/mL으로 나타났으며, 소리쟁이와 마찬가지로 로즈마리 역시 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물에서 RC_{50}값이 3.2±0.2 μg/mL으로 항산화능이 가장 높게 나타났다. 또한 항산화 물질인 아스코르브산(ascorbic acid)의 RC_{50} 값이 7.47±0.3 μg/mL으로 보고(41)된 것과 표 3 나타낸 소리쟁이 추출물 및 분획물의 DPPH 자유 라디칼 소거활성과 비교했을 때 소리쟁이 역시 매우 높은 DPPH 자유 라디칼 소거능을 가진 것으로 생각되며, 또한 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 DPPH 자유 라디칼 소거능을 보인 것은 높은 총 폴리페놀 함량과 에틸아세테이트 분획물에 함유된 여러 가지 색소류와 페놀류(42)에 의한 것으로 사료된다.

표 3

Rumex crispus L.	μg/mL	Scavenging effect (%)	RC_{50} (μg/mL)[1)]
EtOH extract	10	39.4 ± 2.8[2)]	13.0±1.1
	50	92.7 ± 0.8	
Hexane fraction	5	40.7 ± 0.5	35.8±0.6
	50	93.6 ± 2.1	
Chloroform fraction	5	30.2 ± 0.8	10.1±0.6
	25	88.4 ± 0.9	
Ethyl acetate fraction	10	58.8 ± 1.3	2.7±0.2
	25	92.4 ± 4.9	
Butanol fraction	10	40.4 ± 2.3	30.4±2.7
	50	94.7 ± 0.3	
Water fraction	100	39.7 ± 1.9	146.5±1.7
	250	78.9 ± 0.4	
BHA	1	14.9 ± 3.2	3.5±0.1
	10	91.9 ± 1.9	

[0098]

[0099] [1)]Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction

[0100] [2)]Each value is mean ± S.D. (n≥3)

[0101] **1.3. ABTs 자유 라디칼의 소거활성**

[0102] ABTs와 포타슘 퍼설페이트(potassium persulfate)를 암소에 방치하면 ABTs 라디칼이 생성되는데 추출물의 항산화력에 의해 ABTs 라디칼이 소거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색된다. 이와 같이 ABTs 라디칼 탈색반응은 이미 생성된 자유 라디칼의 제거 정도를 흡광도로 나타내어 ABTs 라디칼의 소거 활성능을 측정하는 방법으로 ABTs 라디칼 탈색 반응이 1분 안에 종료되므로 단시간에 측정할 수 있고, 소수성과 친수성 모두에 적용가능하다(43). 소리쟁이 에탄올 추출물 및 분획물들의 ABTs 자유 라디칼 소거활성을 알아본 결과는 아래 표 4와 같다. 소리쟁이 에탄올 추출물은 50 μg/mL의 농도에서 92%의 높은 ABTs 라디칼 소거 활성을 보였고, RC_{50}값은 21.4±1.2 μg/mL이었다. 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물은 각각 11.0±1.7 μg/mL과 10.4±0.9 μg/mL으로 분획물 중 ABTs 자유 라디칼 소거능이 가장 우수하였으며, 또한 헥산과 클로로포름 분획물도 우수한 소거능을 보임을 확인하였다. Trolox의 RC_{50}값은 7.3±0.8 μg/mL으로 에틸아세테이트와 부탄올 분획물과 소리쟁이 에탄올 추출물이 비교적 높은 ABTs 라디칼 소거 활성을 가진다는 것을 알 수 있었다. 또한 이 결과로 볼 때, 물 분획물을 제외한 나머지 층에서 항산화력이 우수하여, 소리쟁이에 여러 가지 항산화 물질이 다량 함유되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물은 높은 총 폴리페놀 함량, DPPH 자유 라디칼 및 ABTs 자유 라디칼 소거능이 우수한 강한 항산화 효능를 가진 시료로 생각된다.

표 4

[0103]

Rumex crispus L.	μg/mL	Scavenging effect (%)	RC_{50} (μg/mL)[1)]
EtOH extract	10	23.3 ± 6.8[2)]	21.4±1.2
	50	92.8 ± 0.6	
Hexane fraction	10	32.9 ± 1.3	20.3±0.9
	50	89.7 ± 0.8	
Chloroform fraction	10	28.6 ± 1.3	22.1±1.1
	50	88.6 ± 2.7	
Ethylacetate fraction	10	13.6 ± 1.9	11.0±1.7
	50	93.9 ± 0.4	
Butanol fraction	10	26.9 ± 0.5	10.4±0.9
	50	93 ± 0.1	
Water fraction	100	38 ± 1.4	134.5±9.1
	500	93.8 ± 0.1	
Trolox	1.3	8.3 ± 1.5	7.3±0.8
	15	93.4 ± 1.6	

[0104] [1)]Concentration required for 50% reduction of ABTs at 3 min after starting the reaction

[0105] [2)] Each value is mean ± S.D. (n≥3)

[0106] **2. 소리쟁이 추출물 및 분획물의 골 형성능 측정**

[0107] **2.1. 소리쟁이 추출물의 조골세포 증식 및 ALP 활성**

[0108] 마우스 두개골(calvaria)로부터 유래한 MC3T3-E1 조골세포는 생체 내에서 일어나는 조골세포의 증식, 분화, 석회화 등의 유사한 대사적인 특징을 가지고 있으며, 특히 세포막에 당단백질인 ALP를 가지고 있다(4). 골 조직에 많이 존재하는 ALP는 조골세포의 분화 초기에 나타나는 표지인자로써 기질 성숙기에 나타나기 시작하여 기질 성숙기 후반에 최대로 발현되며, 조골세포를 석회화 할 수 있는 조건을 만드는데 관여한다고 알려져 있으므로(44), 본 실험에서는 MC3T3-E1 조골세포를 이용하여 소리쟁이에서 조골세포의 증식과 분화 촉진효과를 측정하였다. 본 실시예에서는 소리쟁이 에탄올 추출물을 이용하여 조골세포의 증식과 세포독성을 측정하고, 분화표지 효소인 ALP활성을 측정하였다. 세포 생존율을 측정한 결과 도 2에서와 같이, 소리쟁이 에탄올 추출물 20 μg/mL 농도에서도 90% 정도의 세포 생존율을 보여 세포에 독성이 미치지 않는 이들 범위에서 실험을 진행하였다. 또한 조골세포 분화표지 효소인 ALP 활성을 측정하기 위해 아스코르브산(ascorbic acid)와 β-글리세롤 포스페이트가 혼합된 배지에 소리쟁이 추출물을 각 농도별로 희석한 후 혼합하여 MC3T3-E1 세포에 4, 9, 14일 동안 처리한 결과, 소리쟁이 에탄올 추출물은 처리 기간이 증가할수록 ALP의 활성이 증가함을 보였으며, 특히 소리쟁이 추출물을 10 μg/mL 농도로 9일간 처리시 2.85±0.38 nmol/mg 단백질으로 가장 높은 ALP 활성을 보이다가, 14일째에서 ALP활성이 2.1±0.23 nmol/mg 단백질 으로 ALP 활성이 감소함을 보였다(도 2 참조). 소리쟁이 에탄올 추출물 처리시 9일째에서 ALP 발현이 최대로 증가하고 14일째에서 감소한 것은 ALP가 기질 성숙기 후반에 최대로 발현된다는 보고(44)에 따라, 9일째에 기질 성숙기가 최대로 발현되어 14일째에서는 석회화가 일어나면서 ALP의 활성이 감소한 것으로 보인다. 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물은 조골세포 분화를 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0109] **2.2. 소리쟁이 분획물의 조골세포 증식 및 ALP 활성**

[0110] 조골세포 분화에 효과가 우수한 소리쟁이 에탄올 추출물을 순차 분획하여 얻은 분획물들을 이용하여 조골세포 성장에 미치는 영향과 ALP 활성 정도를 확인하여, 결과는 도 3에 나타내었다. 조골세포에 각각의 n-헥산, 클로

로포름, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물 분획물을 1 - 10 μg/mL의 농도로 처리하였을 때, 세포의 독성이 없음을 확인하여 이들 농도에서 다음 실험을 진행하였다. 소리쟁이 각 분획물을 처리하여 조골세포의 ALP 활성에 미치는 영향을 측정한 결과, 처리기간 4일째에 비해 9일째에 모든 처리군에서 ALP의 활성이 증가하였다. 그러나 각 분획물들은 대조구와 비교했을 때, ALP 활성에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 즉 소리쟁이 분획물은 소리쟁이 에탄올 추출물보다 조골세포 분화를 더 촉진하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 소리쟁이는 분획에 의한 분리된 단일 성분보다 소리쟁이 추출물의 여러 성분들이 복합적으로 조골세포 분화를 더 촉진시키는 것으로 생각된다.

[0111] **2.3. ALP 염색법에 의한 조골세포 활성**

[0112] ALP 효소의 염색 정도를 측정하기 위해 AP(alkaline phosphatate) 키트를 사용하여 측정하였다. 이때 Naphthol AS-BI phosphate 기질은 조직 내 존재하는 염기성 인산분해효소에 의해 가수분해되어 오르토포스페이트(orthophosphate)와 나프톨(naphthol)이 유도체로 유리된다. 유리된 나프톨(naphthol)은 반응액에 함유되어 있는 디아조니움(diazonium) 염과 즉시 결합하여 아조 염료(azo dye)를 형성하여 적색의 효소 활성 부위를 나타내게 되고, 이 적색부위를 현미경을 통하여 관찰하였다(23). 도 4에서 나타나는 바와 같이 소리쟁이 에탄올 추출물을 1-10 μg/mL의 농도로 처리하여 배양한 다음 세포내 ALP 효소의 염색정도를 살펴본 결과 시료를 처리하지 않은 대조군은 붉은 색의 효소가 많이 형성되지 않은 반면, 농도별로 시료를 처리한 군에서는 효소의 붉은 반점이 많이 형성된 것을 확인할 수 있었으며, 또한 농도별로 붉은 색의 효소가 증가하는 경향을 보였다. 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물은 조골세포 내 ALP 효소 활성을 유도한다는 것을 염색을 통해 재확인하였다.

[0113] **2.4. 콜라겐 함유량 측정**

[0114] 소리쟁이 에탄올 추출물이 조골세포의 분화를 증가시키는지 알아보고자 시리우스 레드 기반 비색분석(sirius red based colorimetric assay)를 사용하여 조골세포의 콜라겐 합성능을 측정하였다. 골 기질 단백질에 있어 가장 근간이 되는 단백질인 제1형 콜라겐은 전체 골기질의 90%를 이루고 있으며, 뼈의 탄성과 유연성을 유지시키며 다른 한편으로 구조적으로 지지역할을 한다. 뼈의 무기질화는 세포 혹은 세포외기질에 칼슘, 무기질이 침착되는 현상을 말하는데, 콜라겐 섬유가 구성하는 망사구조에 칼슘과 인이 침착하고 물과 혼합되어 수산화인회석(hydroxyapatite)이라는 단단한 무기물질을 형성하게 되어 콜라겐은 골 형성의 주요 마커로서 사용되고 있다(1). 따라서 조골세포주인 MC3T3-E1 세포에 소리쟁이 에탄올 추출물을 골 기질형성기간인 15일 동안 처리하여 콜라겐 함량을 측정하였다. 그 결과, 소리쟁이 에탄올 추출물을 농도별로 처리하였을 때, 콜라겐의 염색정도가 유의적으로 증가함을 관찰할 수 있으며, 소리쟁이 에탄올 추출물 10 μg/mL의 농도에서 콜라겐의 함량이 4배가량 증가함을 확인하였다(도 5). 조골세포의 분화를 촉진한다고 알려진 감국 에센셜 오일(essential oil)의 경우 10 μg/mL의 농도에서 대조구와 비교했을 때 1.14배 증가한다고 보고된 결과(45)와 감국 추출물의 200 μg/mL의 농도에서 콜라겐의 함량을 1.25배 증가시켰다는 보고(4)와 비교했을 때, 소리쟁이 에탄올 추출물의 처리시 콜라겐의 함량이 매우 높음을 알 수 있었다.

[0115] **2.5. 오스테오칼신 분비 측정**

[0116] 오스테오칼신(Osteocalcin, OCN)은 BGP(bone gla protein)이라고도 하며 칼슘과 결합하는 비타민 K 의존성 α-카르복시 글루탐산 단백질이다. OCN은 뼈의 대표적인 무기질인 수산화인회석(hydroyapatite)과도 결합하며 뼈와 상아질(dentin)에 매우 특이한 단백질로서 골아세포에서 생산되어 뼈의 세포외 기질에서 축적된다(26-28). 소리쟁이 에탄올 추출물을 20일간 농도별로 처리하여 인 비트로(*in vitro*)상에서 OCN의 함량을 측정한 결과는 도 6에 나타내었다. 그 결과, 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 소리쟁이 에탄올 추출물을 처리하였을 때 OCN의 함량은 증가하는 경향으로 나타났다. 또한 에탄올 추출물 1 μg/mL의 농도 처리에서는 대조군에 비해 OCN의 함량이 유의적으로 증가하지 않았지만, 5-20 μg/mL의 처리에서는 대조군에 비해 유의적으로 OCN 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 20 μg/mL의 농도로 시료를 처리하였을 때 약 1.6배의 OCN 함량증가를 확인하였다. OCN은 조골세포 분화 초기에는 발현되지 않으며 석회화가 시작되면서 발현이 급격히 증가한다고 알려져 있다(46). 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물을 조골세포에 20일 간 처리하면 석회화가 촉진되어 OCN 발현이 증가한 것으로 사료된다.

[0117] **2.6. RT-PCR법에 의한 조골세포 분화 관련 골 기질 유전자발현 조사**

[0118] 조골세포를 조절하는 인자 중 하나인 Runx-2 (runt-related transcription factor 2)는 조골세포의 분화 및 골격 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(47). Runx-2는 OSE 2 (osteoblast specific element 2) 요소와 결합하여 중요한 조골세포 특이적 유전자들인 OCN (osteocalcin), OPN (osteopontin), 제2형 콜라겐 (type Ⅱ collagen)과 같은 유전자들의 발현을 조절한다(44,48). ALP는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 세포외막과 석회화 조직의 기질소포에서 높은 농도로 발견되며 염기성 pH 8-10에서 최적의 활성을 나타낸다(49). 조골세포에 의한 석회화 과정에서 이 효소의 정확한 기능은 분명하지는 않지만, 유기인산염(organic phosphate)을 가수분해하고 국소적으로 PO_4 농도를 증가시킴으로써 석회화의 촉발제 역할을 하는 것으로 보고되었다(50). 또한, Stein등(51)은 ALP 활성도는 골세포 분화의 표지인자로써 조골세포의 분화정도를 판단하기 위해 측정해야 한다고 하였고, Torii(52) 등은 안티센스(antisense) RNA를 이용하여 ALP가 조골세포의 석회화에 관여하는 것을 입증하였다. Weiss(53) 등은 간/골/신장 타입 ALP 유전자의 선천적 결핍으로 인한 저인산효소증에서 골조직 석회화부전을 보고하였다. Fukayama와 Tashjian(55)은 ALP가 몇몇 조골세포주들에서 칼슘섭취에 관여하는 것으로 보고하였으며, 부갑상선호르몬의 신호전달의 조절에도 관여한다고 하였다. 이 밖에 여러 연구들에 의해 조골세포의 ALP 활성을 분화지표로 사용함에 따라, 본 연구에서도 소리쟁이 에탄올 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 살펴보기 위한 지표로 ALP 효소 활성을 앞서 측정하여 결과로 나타내었고, PCR에 의해 얻어진 골 기질 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과 도 7과 같았다. MC3T3-E1 세포의 9일간 배양에 따른 분화인자 mRNA 발현양을 나타낸 것으로 하우스키핑 유전자(house keeping gene)인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphste dehydrogenase)를 내부대조군(internal control)으로 비교하였다. 확인해 본 결과 대조군인 GAPDH는 일정하게 발현되는 것에 반해 소리쟁이 에탄올 추출물을 농도별로 처리하였을 때, ALP의 발현이 증가하였으며, 골 기질 단백질인 Runx-2, 제2형 콜라겐(type Ⅱ collagen) 발현이 대조군에 비해 높게 발현되었다. 앞서 나타낸 ALP 효소활성과 콜라겐 함량 측정결과에서도 그러하였듯이 소리쟁이 에탄올 추출물 처리 시 그 발현이 증가함으로서 조골세포의 분화가 촉진됨을 확인할 수 있었다.

[0119] **2.7. 웨스턴 블롯법에 의한 조골세포 분화 관련 단백질 발현 조사**

[0120] 조골세포를 9일 동안 배양하면서 분화를 유도하여 소리쟁이 에탄올 추출물을 처리하였을 때 발현되는 단백질의 변화를 웨스턴 블롯(western blot)법을 통해 알아보았다. BSP(Bone sialo protein)는 인결합 당단백질로서 디글루타민산 아미노산서열에 의해 수산화인회석에 결합할 수 있으며, Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열에 의해 세포부착을 중재할 수 있는 단백질로서, 이 유전자의 발현은 기본적으로 석회화 결합조직에 제한적으로 발현한다. BSP 유전자는 골, 상아질, 백악질의 초기 석회화에 중요한 역할을 하며, BSP 유전자의 발현은 골, 치아 및 백악질 형성의 초기에 높게 나타나고 수산화인회석 결정의 형성을 유핵화하는 것으로 알려져 있다(45). 조골세포에 소리쟁이 에탄올 추출물을 1-20 μg/mL의 농도로 처리하여 BSP 단백질 발현정도를 측정한 결과는 도 8과 같으며, 농도 의존적으로 BSP 단백질 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물은 ALP 활성을 증진시키며 골 기질 유전자들의 발현을 유도하는 것으로 보아 조골세포 분화에 우수한 시료로 확인하였다.

[0121] **3. 소리쟁이 추출물 및 분획물이 파골세포의 골 흡수능에 미치는 영향**

[0122] **3.1. 소리쟁이 추출물이 파골세포의 TRAP 활성에 미치는 영향**

[0123] TRAP은 파골세포가 골 흡수작용을 할 때 분비가 증가되고 ATP, 니트로페닐포스페이트(nitrophenyl phosphate)에서 높은 활성을 가지는 효소로 파골분화 정도를 측정할 수 있는 파골세포의 세포 화학적 표지효소(marker enzyme)이다. 따라서 소리쟁이 에탄올 추출물이 파골 세포 분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 골수에서 얻은 대식세포를 적정 농도의 M-CSF와 RANKL을 처리하여 파골 세포 분화를 유도하고 배양 조건에 맞춰 각각 소리쟁이 에탄올 추출물을 농도별로 처리하여 파골세포 증식 및 TRAP 효소활성을 검토한 결과는 도 9와 같다. 소리쟁이 에탄올 추출물을 처리하여 파골세포에 대한 세포독성이 없음을 확인하였고, TRAP 효소활성을 확인한 결과 농도가 증가할수록 TRAP 효소활성이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 가장 낮은 농도인 10 μg/mL에서 22.3±1.9%로 매우 높은 TRAP 효소 억제 활성을 나타내었고 20, 40 μg/mL의 농도에서는 각각 16.8±0.5%와 14.3±0.3%의 낮은 TRAP 효소활성을 보였다. 이는 아보카도 과피 추출물의 10, 50 μg/mL의 농도에서 TRAP 효소활성이 각각

53.7±4.6%, 15.3±5.7%로 보고된 것(55)과 비교해 볼 때, 소리쟁이 추출물이 TRAP 효소활성을 억제하여 파골세포의 분화를 감소시키는 우수 소재임을 확인하였다.

[0124] **3.2. 소리쟁이 에탄올 추출물의 파골세포 형성에 미치는 영향**

[0125] 파골전구세포에서 활성을 가지는 파골세포로 분화하게 되면, 파골세포는 탈산수소효소 활성을 가지게 되어 TRAP의 특이적인 활성을 가지게 된다(55). 이 TRAP의 활성을 측정함으로써 파골세포의 분화 정도를 측정할 수 있다. 마우스 골수세포를 파골세포로의 분화를 유도하면서 파골세포에 대한 TRAP효소 저해 활성이 우수한 에탄올 추출물을 TRAP 염색법을 이용하여 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 도 10과 같이, 소리쟁이 에탄올 추출물을 처리하지 않고 RANKL 만을 처리하여 파골세포로 분화를 유도한 대조구에서는 분화가 유도되어 다핵의 파골세포를 확인할 수 있었다. RANKL과 함께 소리쟁이 에탄올 추출물을 처리하여 분화를 유도한 결과 RANKL만을 처리한 대조구에 비해 다핵의 파골세포의 크기와 개수가 시료처리의 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 40 μg/mL 처리시에는 다핵의 파골세포를 거의 관찰할 수가 없었다. 이를 통해 소리쟁이 에탄올 추출물이 성숙된 파골세포의 형성을 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0126] **3.3. 소리쟁이 분획물이 파골세포의 TRAP 활성에 미치는 영향**

[0127] 소리쟁이 분획물에 대한 파골세포 생존율 및 TRAP 활성을 검토한 결과는 도 11에 나타내었다. 도 11에 나타나는 바와 같이, 일단 분획물에서 세포독성이 없음을 확인하였다. 또한 소리쟁이 분획물을 처리하여 TRAP 효소활성을 측정한 결과 물(water) 분획물의 경우 TRAP 효소 활성 억제능을 보이지 않았으며, 나머지 다른 분획물에서는 농도 의존적으로 TRAP 활성이 억제됨을 보였다. 특히 소리쟁이 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물은 20 μg/mL에서 13.91±3.12%로 가장 높은 억제능을 보였으며, 5-10 μg/mL의 농도에서는 각각 44.75±10.63%, 21.05±7.33%의 TRAP 활성을 보여 파골세포의 분화가 가장 크게 억제되었다(도 11). 그리고 소리쟁이 헥산(hexane)과 클로로포름(chloroform), 부탄올(butanol) 분획물의 20 μg/mL의 처리에서도 각각 14.35±7.68%, 23.76±3.92%, 20.02±11.13% 정도의 활성을 보여 파골세포의 분화를 억제함을 보였다. 따라서 소리쟁이의 물(water) 분획물을 제외한 나머지 층에서 파골세포에 대해 TRAP 활성을 저해하였으며, 특히 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물은 파골세포에 대한 TRAP 활성을 가장 크게 저해함을 확인하였다. 즉 소리쟁이 에틸아세테이트(ethyl acetate) 분획물에는 색소류와 폴리페놀류, 카르티노이드류 등의 항산화 성분들이 많이 함유되어(56) 이들 성분들이 파골세포 활성 억제에 영향을 준 것으로 사료된다.

[0128] **3.4. 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 파골세포 형성에 미치는 영향**

[0129] 마우스의 경골을 적출하여 수집한 골수세포를 파골세포로 분화시키기 위해서 RANKL(100 ng/mL)과 M-CSF(50 ng/mL)을 처리한 후, 파골세포에 대한 저해활성이 우수한 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물을 파골세포에 대한 독성이 나타나지 않는 5, 10, 20 μg/mL의 농도로 처리한 후, TRAP 염색법을 이용하여 파골세포 분화에 미치는 영향을 확인하였다. TRAP 염색을 통하여 파골세포를 염색하고 다핵의 성숙 파골세포의 형성을 확인한 결과, 농도 의존적으로 다핵의 파골세포 수가 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다(도 12). 특히, 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물 10 μg/mL의 농도에서 다핵의 성숙파골세포를 관찰할 수 없었으며, 20 μg/mL의 농도에서 분화가 크게 억제되어 전파골세포만이 관찰됨을 확인하였다.

[0130] **3.5. 웨스턴 블로팅 방법에 의한 파골세포 분화 관련 단백질 발현 조사**

[0131] 파골세포 분화에 필수적인 c-fos, NFATc1의 단백질 발현에 미치는 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 영향을 알아보기 위해, RANKL, M-CSF를 이용하여 파골세포 분화를 유도하면서 에틸아세테이트 분획물을 처리하거나, 처리하지 않은 경우에서 각각 c-fos, NFATc1의 발현을 측정하였다. 파골세포 분화를 유도한 후, 에틸아세테이트 분획물을 처리하지 않은 경우에서는 웨스턴블로팅(western blotting) 검사에서 c-fos, NFATc1의 단백질 발현이 증가하였는데, 에틸아세테이트 분획물을 처리한 경우에는 농도 의존적으로 c-fos, NFATc1의 단백질 발현이 현저하게 감소하였다(도 13). 파골세포 분화의 필수적인 RANKL에 의한 신호가 전달되면 p38, JNK, ERK 등의 MAP 키나아제와 전사인자인 NF-κB를 통해 파골세포의 분화 신호가 전달되는데, 에틸아세테이트 분획물을 처리하였을 경우 RANKL에 의한 신호 전달물질 중 NF-κB의 발현이 감소하였고, JNK, ERK 신호 역시 현저하게 발현이 감소하는

것을 관찰할 수 있었다(도 13). 이를 통해 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물의 파골세포 분화의 억제 효과는 RANKL의 자극에 이어지는 JNK, ERK 경로의 억제를 통해 이루어짐을 알게 되었다. 또한 Schreck R 등(11)에 따르면 자유라디칼(free radical)은 산화적 스트레스 반응의 전사인자인 NF-κB의 활성을 통해서 뼈 흡수가 증가된다고 보고한바 있다. 앞서 측정한 자유라디칼(free radical) 소거능 측정결과와 종합해 볼 때, 소리쟁이 에틸아세테이트 분획물에서 소거능이 매우 높았으며 따라서 자유라디칼(free radicals)의 소거를 통해 NF-κB의 활성을 저해하여 파골세포의 분화 억제 효과를 보이는 것으로 사료된다.

[0132] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0133] **참고문헌**

[0134] 1. Shin CS, Cho HY. Bone remodeling and mineralization. Kor. Endcrine Society 20(6): 543-555 (2005)

[0135] 2. Dawson-Hughes B, Looker AC, Tosteson ANA, Johansson H, Kanis AJ, Melton LJ. The potential impact of new national osteoporosis foundation guidance on treatment patterns. Osteoporos. Int. 21: 41-52 (2010)

[0136] 3. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fracture. Osteoporosis Int. 17(12): 1726-1733 (2006)

[0137] 4. Yune JH. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract on the activity and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. MS thesis, Duksung Women's University (2010)

[0138] 5. Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: Recognition of a major effect. Br. Med. J. 315: 841846 (1997)

[0139] 6. Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA, Siani A, Barba G, Mellone MC, Russo L, Farinaro E, Trevisan M, Mancini M, Strazzullo P. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: A prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. A prospective study of hypertension and the incidence of kidney stones in men. Lancet. 354: 971975 (1999)

[0140] 7. Christensen JO, Svendsen OL. Bone mineral in pre- and postmenopausal women with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. Osteoporosis Int. 10: 307311 (1999)

[0141] 8. Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2777-2781 (1980)

[0142] 9. Sohal RS, Allen RG. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. Exp. Gerontol. 25: 499-522 (1990)

[0143] 10. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. J. Clin. Invest. 85: 632-639 (1990)

[0144] 11. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. EMBO J. 10: 22472258 (1991)

[0145] 12. Fraser JHE, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston S. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. Bone 19: 223-226 (1996)

[0146] 13. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori C, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifci R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women : results of across-sectional study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 1523-1527 (2003)

[0147] 14. Morton D, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in

postmenopausal women. J. Bone Miner. Res. 16: 135-140 (2001)

[0148] 15. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. Science 289(5484): 15081514 (2000)

[0149] 16. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. Bone 18: 9-14 (1996)

[0150] 17. Kwak HB, Kim JY, Kim KJ, Choi MK, Kim JJ, Kim KM, Shin YI, Lee MS, Kim HS, Kim JW, Chun CH, Cho HJ, Hong GY, Juhng SK, Yoon KH, Park BH, Bae JM, Han JK, Oh J. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. Biol. Pharm. Bull. 32(7): 1193-8 (2009)

[0151] 18. Solomon DH, Rekedal L, Cadarette SM. Osteoporosis treatments and adverse events. Curr. Opin. Rheumatol. 21(4): 363-8 (2009)

[0152] 19. Rogers J. Estrogens in the menopause and postmenopause. N. Eng. J. Med. 280: 364-367 (1967)

[0153] 20. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. FASEB. J. 4: 3111-3123 (1990)

[0154] 21. Mone Z. Skeletal remodeling in health and disease. Nat. Med. 13(7): 791-801 (2007)

[0155] 22. Choi SA, Park ES, Rho JR. Molecular mechanism of osteoclast differentiation and function. Bulletin of Biotechnology CNU. 12: 65-73 (1999)

[0156] 23. Takami M, Kim N, Rho J, Choi Y. Stimulation by toll-like receptors inhibits osteoclast differentiation. J. Immunol. 169: 1516-23 (2002)

[0157] 24. Rho J, Takami, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems. Mol. Cells. 17: 1-9 (2004)

[0158] 25. Gunaydin K, Topcu G, Ion RM. 1,5-dihydroxy-anthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex crispus*. Nat. Prod. Lett. 16(1): 65-70 (2002)

[0159] 26. Folin O, Denis W. On phosphotungastic-phosophomolybdic compounds as color reagents. J. Biol. Chem. 12: 239-243 (1912)

[0160] 27. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1199-1202 (1958)

[0161] 28. Roberta RE, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999)

[0162] 29. Kim JW, Lee HJ, Kang JH, Ohk SH, Choi BK, Yoo YJ, Cho KS, Choi SH. The effect of cyclosporin a on osteoblast *in vitro*. J. Periodont. Res. 30: 747-757 (2000)

[0163] 30. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lympokines, J. Immunal. Meth. 70: 257-261 (1984)

[0164] 31. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J. Cellular. Biochemistry. 61: 609-618 (1996)

[0165] 32. Yoo MC, Han CS, Jang SG, Han IK. The effects of the several hormones on the MC3T3 osteoblast cells -*in vitro* study-. J. Korean Orthop. Assoc. 24: 879-888 (1989)

[0166] 33. Cho SH. The electron microscopic observation of the effects of estrogen on the osteoblast-like cell (Ros-17/2.8-5) differentiation. J. Korean. Soc. Menopause 1: 28-34 (1995)

[0167] 34. Tullberg-Reinert H. Jundt G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric micro assay: effects of transforming growth factor β2 and ascorbic acid 2-phosphate. Histochem. Cell Biol. 112: 271-276 (1999)

[0168] 35. Parfitt AM. Bone remodeling: relationship to the amount and structure of bone the pathogenesis and prevention of fractures. in: Riggs LB.: L.J Melton eds. Osteoporosis, cetiology, diagnosis and management. Reven press, New York. pp 45-93 (1988)

[0169] 36. Gomes A, Vedasiromoni JR, Das M. Sharma, RM. Ganguly DK. Anti- hyperglycemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. J. Ethnopharmacol. 45: 223-226 (1995)

[0170] 37. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. Kor. J. Food sci. Technol. 37: 233-240 (2005)

[0171] 38. Frankel EN, Huang S, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil in water emulsion. J. Agric. Food Chem. 44: 131-135 (1996)

[0172] 39. Luis A, Sanchen-Munoz B, Jose A, Fernandez L, Maria J. Liquid chromatograpic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. J. Chromatogr. A. 1120: 221-229 (2006)

[0173] 40. Al-sereiti MR, Abu-Amer KM. Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials. J. Exp. Biol. 37: 124-130 (1999)

[0174] 41. Yu MH, Chae IG, Jung YT, Jeong YS, Kim HI, Lee IS. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from *Rosmarinus officinalis* L. and their fractions. J. Life Sci. 3(21): 375-384 (2011)

[0175] 42. Woo WS. Research Techniques in natural products chemistry. Seoul pp. 10-29 (1995)

[0176] 43. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS, Kim MH. The antioxidant activities of the some commercial teas. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 723-727 (2003)

[0177] 44. Ducy P, Starburk M. Driemel M. A core binding factor-1 (Cbfa1) dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev. 13: 1025-1036 (1999)

[0178] 45. Chang KM, Choi EM, Kim GH. Chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. flower oil and effect on osteoblast MC3T3-E1 cells. Food Sci. Biotechno. 19(3): 815-819 (2010)

[0179] 46. Cho SB, Ha SY, Lee SR, Koh KJ. Effects of irradiation on the mRNA expression of the osteocalcin and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblast cell line. Kor. J. oral. Maxillofac. Radiol. 33: 179-85 (2003)

[0180] 47. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated bone morphogenic proteins, hedgehogs and Cbfa1. Endocrine Reviews. 21: 393-411 (2000)

[0181] 48. Kern B, Shen J, Starbuck M, et al. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type 1 collagen genes. J. Biol. Chem. 276: 7101-7107 (2001)

[0182] 49. Wlodarski KH, Reddish AH. Alkaline phosphatase as a marker of osteo inductive cells. Calcif. Tissue. Int. 39: 382-385 (1986)

[0183] 50. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. The phosphatidyl inositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralizaton initiation *in vitro*. J. Bone Miner. Res. 10: 568-573 (1995)

[0184] 51. Stein GS, Lian JB, Wijnen AJ, Montechino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. Am. Physiol. Soc. 76: 593-629 (1996)

[0185] 52. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. Cell Biol. Int. 20: 459-464 (1996)

[0186] 53. Weiss MJ, Ray K, Fallon MD, Whyte MP, Fedde KN, Lafferty MA. Analysis of liver/bone/kidney phosphatase mRNA, DNA and enzymatic activity in cultured skin fibroblasts from 14 unrelated patients with severe hypophosphatasia. Am. J. Hum. Genet. 44: 686-694 (1989)

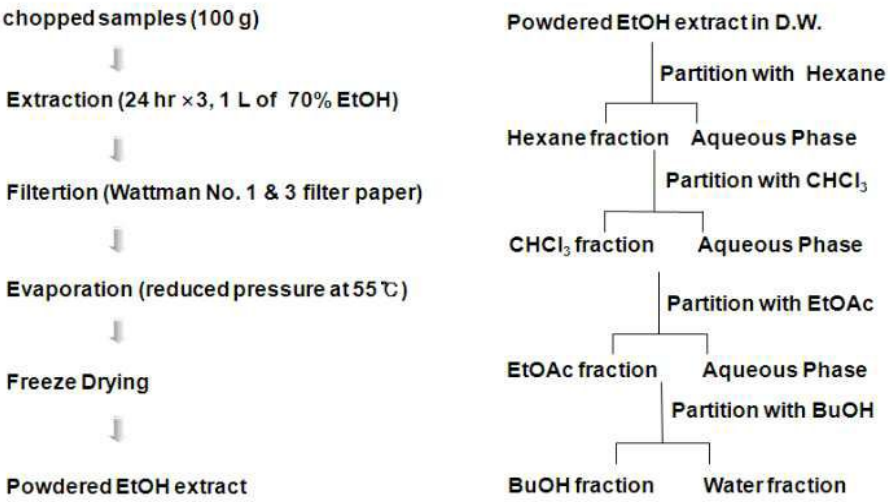
[0187] 54. Fukayama S, Tashjian AH. Stimulation by parathyroid hormone of $^{45}Ca^{2+}$ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. Endocrinology 126: 1941-1949 (1999)

[0188] 55. Kim MJ, Im NK, Yu MH, Kim HJ, Lee IS. Effects of extracts from sarcocarp, peels and seeds of avocado on osteoblast differentiation and osteoclast formation. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 40(7): 919-927 (2011)

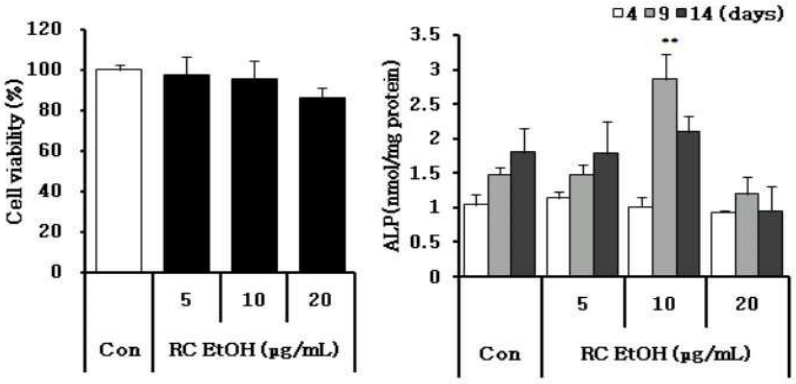
[0189] 56. Woo WS. Method for natural products chemistry. Seoul National University Press, Seoul, Korea. pp 1-29 (2001)

도면

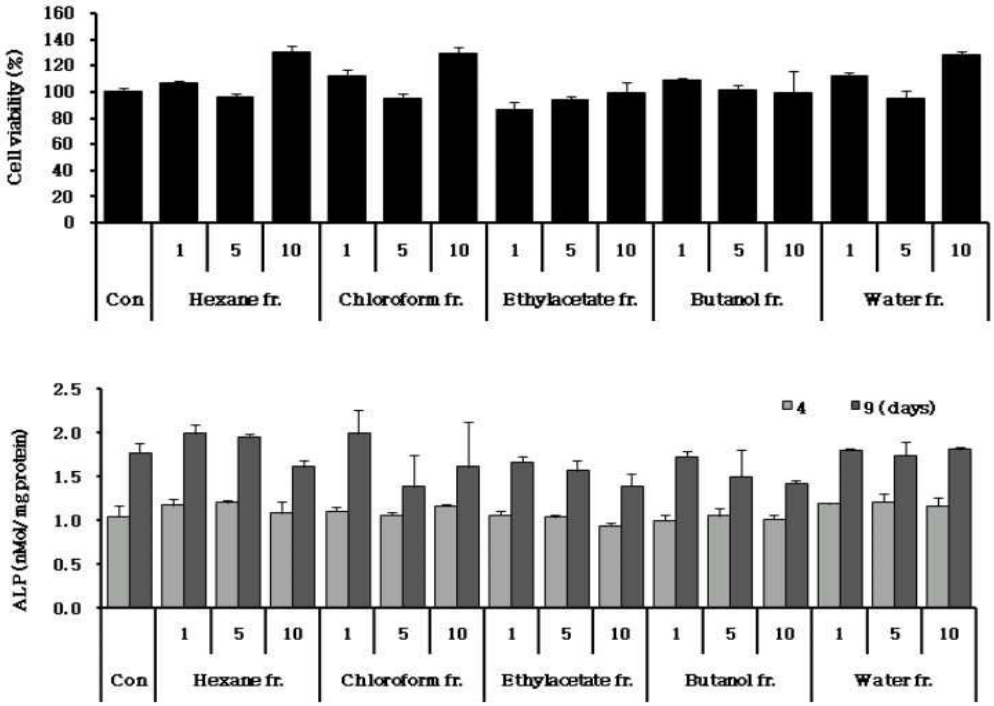
도면1



도면2

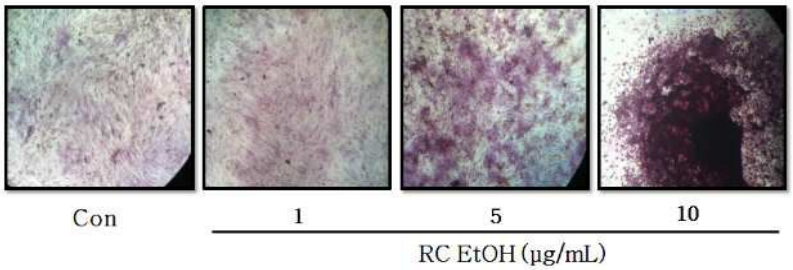


도면3

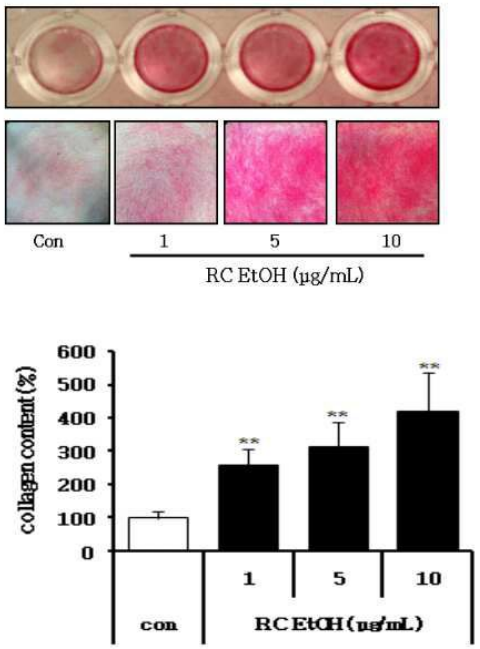

Cell viability (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 5 10 1 5 10 1 5 10 1 5 10 1 5 10
Con
Hexane fr.
Chloroform fr.
Ethylacetate fr.
Butanol fr.
Water fr.

ALP (nMol/mg protein)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4
9 (days)
1 5 10 1 5 10 1 5 10 1 5 10 1 5 10
Con
Hexane fr.
Chloroform fr.
Ethylacetate fr.
Butanol fr.
Water fr.

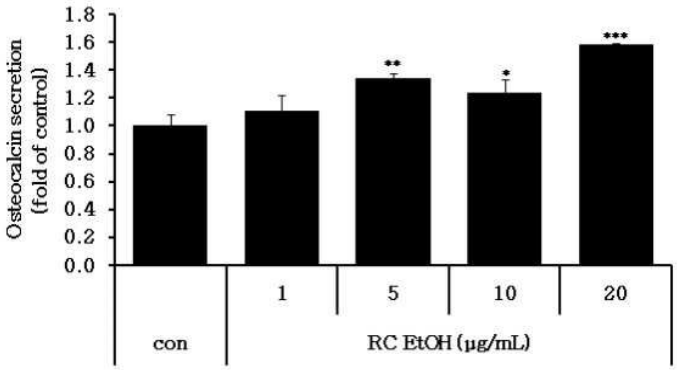
도면4


Con
1
5
10
RC EtOH (μg/mL)

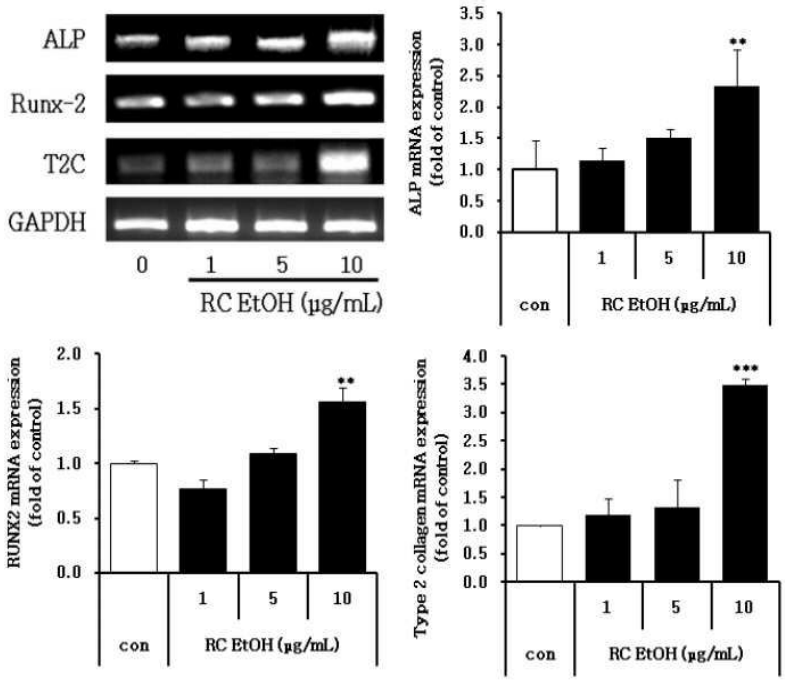
도면5


Con
1
5
10
RC EtOH (μg/mL)
collagen content (%)
600
500
400
300
200
100
0
**
**
**
1
5
10
con
RC EtOH (μg/mL)

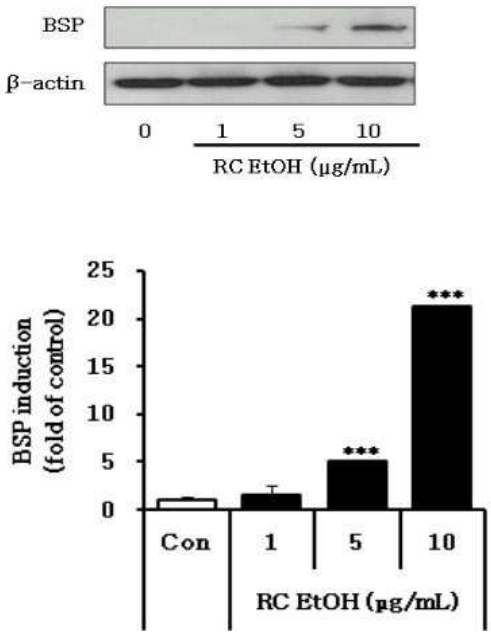
도면6


Osteocalcin secretion (fold of control)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
*
***
1
5
10
20
con
RC EtOH (μg/mL)

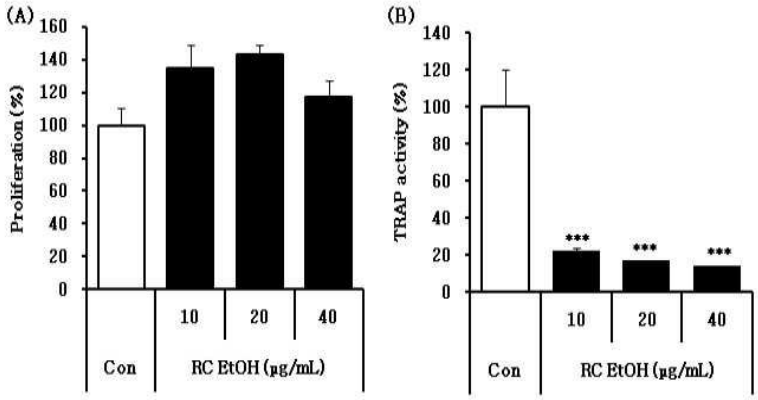
도면7


ALP
Runx-2
T2C
GAPDH
0
1
5
10
RC EtOH (μg/mL)
ALP mRNA expression (fold of control)
RUNX2 mRNA expression (fold of control)
Type 2 collagen mRNA expression (fold of control)
con
RC EtOH (μg/mL)

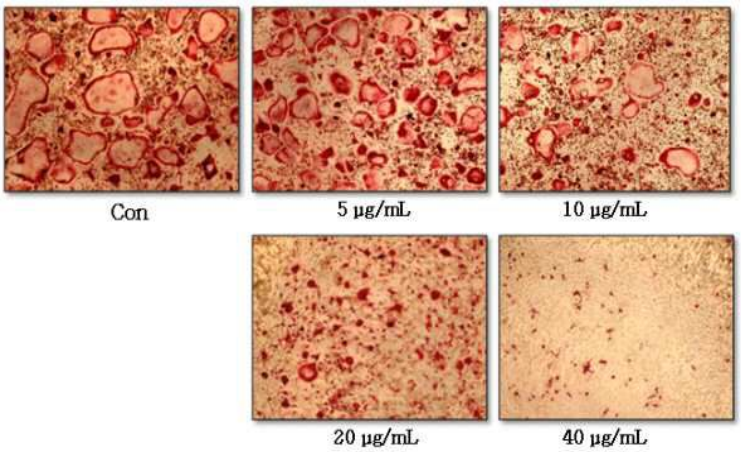
도면8


BSP
β-actin
0
1
5
10
RC EtOH (μg/mL)
BSP induction (fold of control)
Con
RC EtOH (μg/mL)

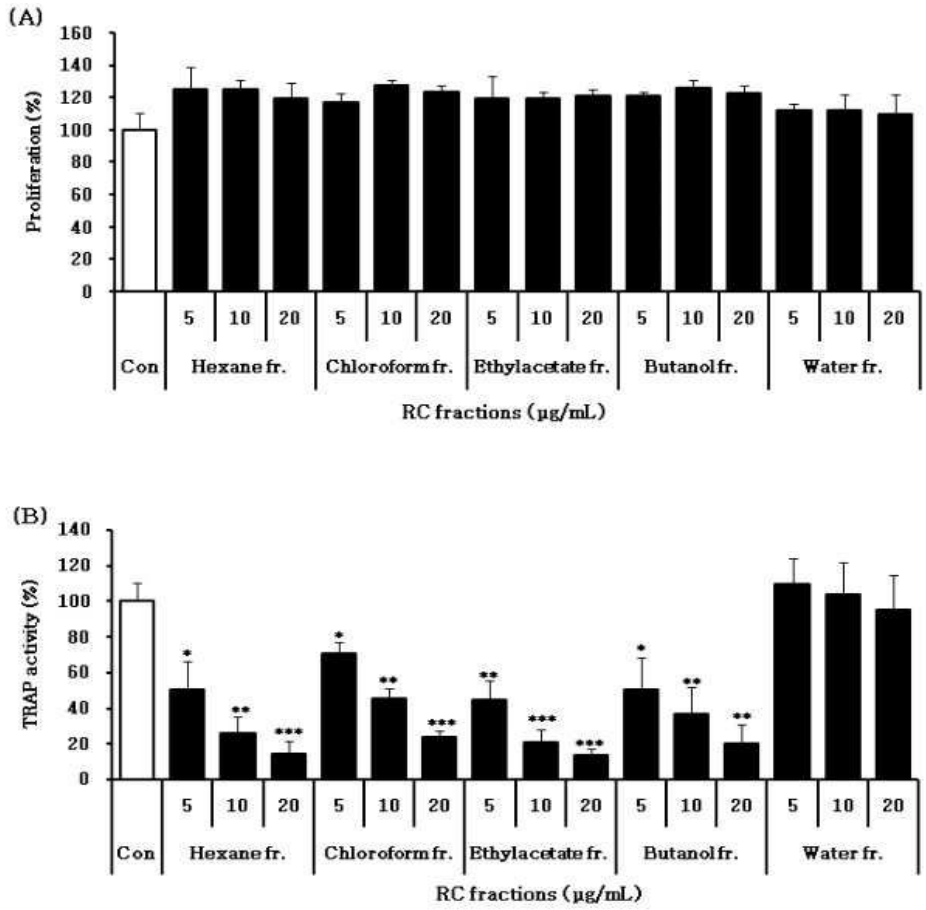
도면9


(A)
Proliferation (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
10
20
40
Con
RC EtOH (μg/mL)
(B)
TRAP activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
***
***
***
10
20
40
Con
RC EtOH (μg/mL)

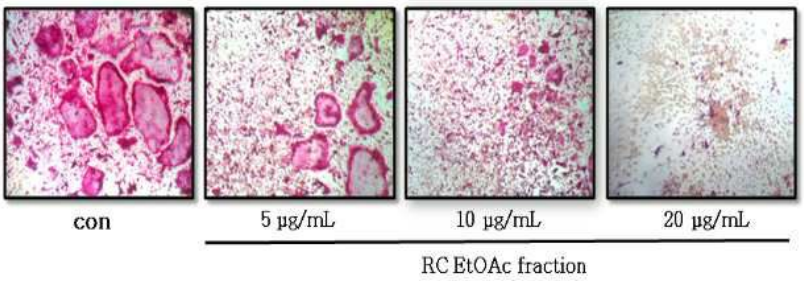
도면10


Con
5 μg/mL
10 μg/mL
20 μg/mL
40 μg/mL

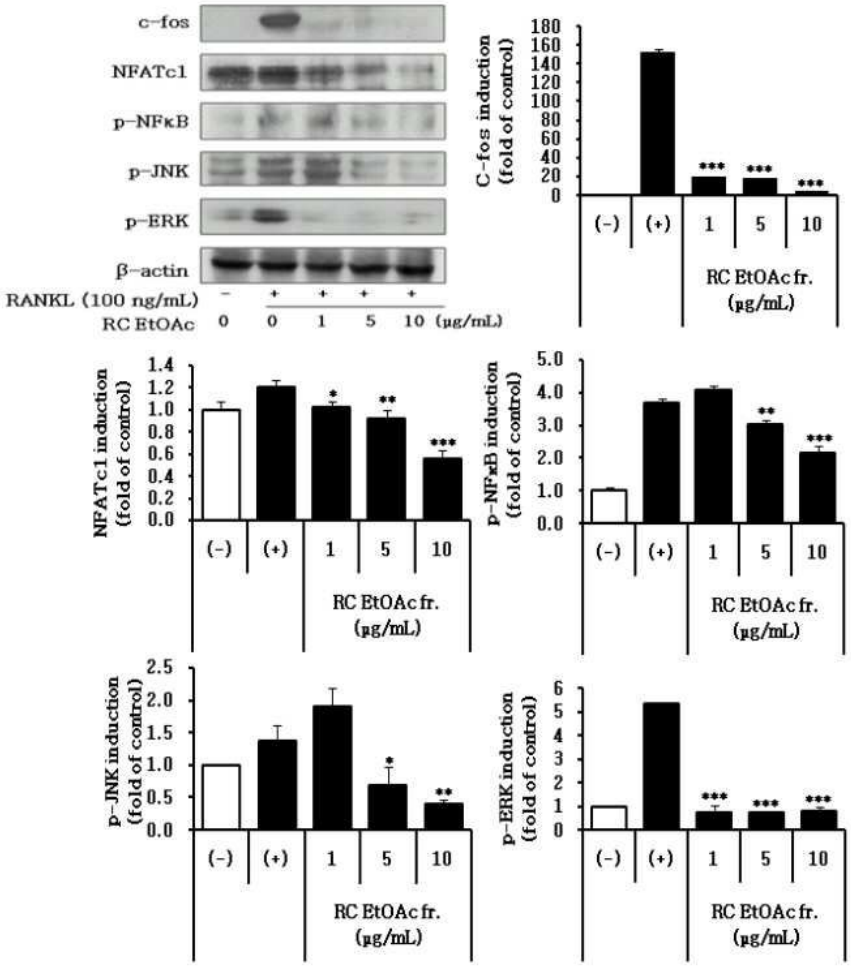
도면11


(A)
Proliferation (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
5 10 20 5 10 20 5 10 20 5 10 20 5 10 20
Con
Hexane fr.
Chloroform fr.
Ethylacetate fr.
Butanol fr.
Water fr.
RC fractions (μg/mL)
(B)
TRAP activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
*
**
***
5 10 20 5 10 20 5 10 20 5 10 20 5 10 20
Con
Hexane fr.
Chloroform fr.
Ethylacetate fr.
Butanol fr.
Water fr.
RC fractions (μg/mL)

도면12


con
5 μg/mL
10 μg/mL
20 μg/mL
RC EtOAc fraction

도면13



서 열 목 록

<110> Keimyung University Industry Academic Cooperation Foundation

<120> Composition for Treating or Preventing Bone Disease Comprising Extract From Rumex crispus L. As Active Ingredient

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

caggaagact gcaagaaggc tctgg 25

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 2

acaaggtgtc actgcgctga aga 23

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 3

ctccggctcc tgctcctctt a 21

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 4

gcacagcact cgccctccc 19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

tgagaacggg aagcttgtca 20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

ggaaggccat gccagtga 18