



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0089471
(43) 공개일자 2015년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A61K 36/18 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0010131

(22) 출원일자 2014년01월28일

심사청구일자 2014년01월28일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김수관

광주광역시 서구 풍암중앙로 68, 104동 503호(풍암동 금호아파트)

박상연

광주 서구 풍암순환로 86, 103동 107호 (풍암동, 삼능남양아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김은구, 송해모

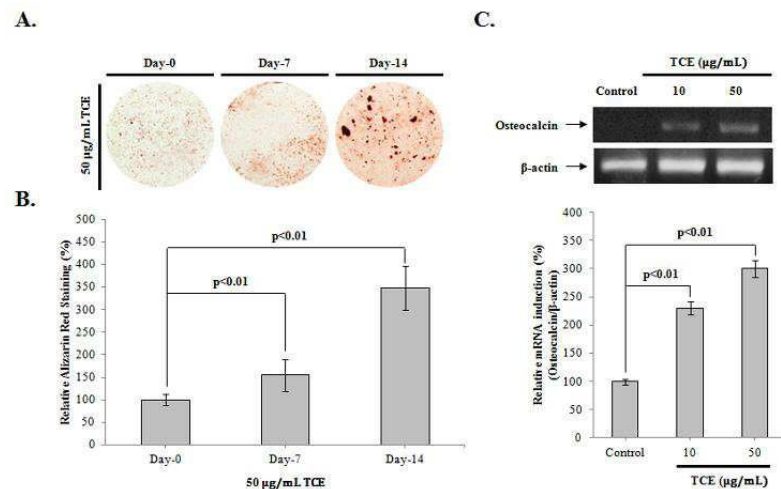
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 가자 추출물을 함유하는 골형성제

(57) 요약

본 발명은 골형성제에 관한 것으로, 구체적으로 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하며, 더욱 구체적으로는 조골 세포의 증식 및 활성화에 효과적으로 작용하는 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호

김재성

광주광역시 북구 일곡로 80번지 102동 1401호

오지수

광주광역시 동구 운림길 27, 남해오네뜨 101-202

정재용

광주광역시 동구 무등로 374 계림동 두산위브 113동 501호

문대선

광주 광산구 왕버들로132번길 35, 605동 901호 (수완동, 대방노블랜드6차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008940

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역혁신센터사업

연구과제명 치과용 정밀장비 및 부품지역혁신센터

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 골형성제는 조골세포 증식 활성을 갖는 골형성제.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 골형성제는 콜라겐(Collagen) 증식 활성을 갖는 골형성제.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 골형성제는 상기 콜라겐 중 콜라겐 I(Collagen I) 또는 콜라겐 X(Collagen X) 증식 활성을 갖는 골형성제.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 골형성제는 오스테오칼신(Osteocalcin) 증식 활성을 갖는 골형성제.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 골형성제는 염기성 인산분해효소(Alkaline phosphatase; ALP) 활성을 갖는 골형성제.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 가자 열매 추출물은 유기용매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제.

청구항 8

건조된 가자 열매를 세척하는 제 1단계;

상기 제 1단계에서 얻어진 세척된 가자 열매를 분쇄하는 제 2단계; 및

상기 제 2단계에서 얻어진 분쇄된 가자 열매 중량의 1 내지 10배량의 유기용매를 가하여 추출물을 수득하는 제 3단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 골형성제용 가자 열매 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 가자 추출물을 함유하는 골형성제에 관한 것이다. 구체적으로, 가자 추출물을 이용하여 조골세포의 활성 및 증식을 통한 골형성능을 향상시키는 골형성제에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 골조직은 교원질(Collagen), 비교원성단백질(Noncollagenous proteins) 및 무기질인 수산화인회석(Hydroxyapatite, HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) 등으로 구성된 세포 외 기질(Extracellular matrix)과 조골세포(Osteoblast), 파골세포(Osteoclast), 골세포(Osteocyte) 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서, 조골세포와 파골세포의 작용을 매개로 일생동안 지속적인 형성과 흡수를 반복하며 골재형성 과정을 반복한다.
- [0003] 조골세포는 뼈의 신생(新生)에 관여하는 세포로서 과립구계(顆粒球系)나 적아구계(赤芽球系)의 세포부담은 크고 핵(核)이 편재하며, 형질세포와 닮은 형태를 말한다. 이러한 조골세포는 인접하는 세포나 골조직을 향하여 세포질 돌기를 늘리며 골세포 등과 간극결합을 하고, 이것에 의해 칼슘(Ca) 이온을 비롯하여 여러 가지 물질을 이동, 또는 호르몬 등의 자극을 골조직을 구성하고 있는 세포에 빠르게 전달시킨다.
- [0004] 골격계는 크게 다른 두 가지 구조를 포함하는 기관이다. 골의 외부는 석회화된 기질인 견고한 결합조직으로 구성되어 있으며 내부는 골수로 불리는 세포성 결합조직으로 이루어져 있다. 그리고 골조직은 생체의 주요한 지지 조직으로 충분한 강도를 요하며 골강도는 기본구조인 수산화인회석(HA)의 인산칼슘 결정이 질서 있게 배열하여 기질 단백질에 의해 형성되는 골의 기질이 된다. 이러한 골격계는 조골세포에 의한 골기질 단백질 합성 작용과 파골세포에 의한 무기질화된 뼈의 흡수가 연계되어 일어나는 골개조(Bone remodeling)가 일생동안 계속되며 평형을 유지하게 된다.
- [0005] 현대인들에게는 스트레스, 흡연, 음주, 환경오염물질, 방사선 등의 유해물질에 다양한 경로로 노출이 되어 인체 면역기능이 상당히 약화되어 있다. 또한, 유전적, 생리적, 환경적 인자의 변화와 더불어 조골세포의 활성도가 약화되어 골형성이 감소되거나 파골세포의 활성도 강화로 골흡수가 증가되는 경우, 또는 두 가지 요소가 동시에 작용되는 경우에 골대사질환이 발생하게 된다.
- [0006] 대표적인 골대사질환의 골다공증(Osteoporosis)은 골대사에 이상을 일으키는 질환이나 약물복용 유무에 따라 원발성과 속발성으로 나눌 수 있으며, 원발성 골다공증은 다시 폐경 이후 급격한 에스트로젠(estrogen) 감소로 인해 골흡수가 증가되어 골량이 감소하는 제 1형 폐경성 골다공증(Postmenopausal osteoporosis; type I osteoporosis)과 70세 이후 골흡수는 그리 심하지 않으나 골형성능이 감소하여 골량 감소를 초래하는 제 2형 노인성 골다공증(Senile osteoporosis; type II osteoporosis)으로 분류할 수 있다. 폐경성 골다공증의 치료를 위해 투여되는 에스트로젠(estrogen)은 생체 내에서 성호르몬의 기능 외에도 조골세포의 에스트로젠 수용체-알파(estrogen receptor- α ; ER- α) 혹은 에스트로젠 수용체-베타((estrogen receptor- β ; ER- β)와 결합한 후 핵으로 이동하여 골대사에 관여하는 국소인자 유전자의 전사활성을 조절할 뿐만 아니라, 콜라겐(Collagen) 발현, 칼슘과 인 대사에 관여하는 염기성 인산분해효소(Alkaline phosphatase; ALP)의 활성 및 성장인자인 인슐린 유사 성장 인자-I(Insulin-like growth factor-I; IGF-I)의 생성과 유전자의 발현을 증가시킴으로써 골형성에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 그리고 조골세포를 자극하여 골의 석회화(mineralization)를 촉진하고, 파골세포의 생성을 촉진하는 RANKL(Receptor activator for nuclear factor κ B ligand)의 분비를 억제하여 새로운 파골세포의 생성을 억제하는 한편, 기 생성된 파골세포의 세포사멸(Apoptosis)를 촉진하는 것으로 보고된 바 있다. 하지만 장기간 사용 시 오심, 체중증가, 불규칙한 자궁출혈, 자궁내막암 및 유방암과 같은 부작용을 유발하기도 하여 최근에는 그 위험성을 보완하기 위해 다른 부작용 없이 골손실을 최소화하면서 골형성을 촉진할 수 있는 한약재 및 식품 등의 천연물 유래 활성성분을 이용한 대체요법 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0007] 현재 콩과식물(Legumes)과 곡물(Whole grains)에 널리 존재하는 제니스테인(Genistein), 다이드제인(Daidzein)을 비롯하여, 루테올린(Luteolin), 아피제닌(Apigenin), 레스베라트롤(Resveratrol) 등의 에스트로젠(Estrogen) 유사 효과 등이 보고되고 있으며, 이를 다량 함유한 식품의 섭취를 통한 식물성 에스트로젠(Phytoestrogen) 대체요법이 시도되고 있다. 이렇듯 다양하게 유발되는 건강문제를 해결할 방안으로 생약제제에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다. 이는 생약제제에 대한 관심 증가는 현대의학이 가지고 있는 질병치료의 한계 및 합성의약품이 지니는 부작용 등 여러 문제점을 대체의학으로서 기대가 증가하고 있기 때문이다.
- [0008] 가자(*Terminalia chebula Retzius*; *T. chebula Retzius*)는 인도, 미얀마, 말레이시아, 중국 사천성 등에 자생하는 열대성 큰키나무로서 성숙한 열매에서 씨를 제거하고 말린 과실이다. 성상은 긴 원형 또는 난원형이고 길이 2 ~ 4cm, 지름 2 ~ 2.5cm이다. 표면은 황갈색이고 조금의 광택이 나며 세로로 능선이 5 ~ 6 줄 융기해 있고 불규칙적인 주름이 나있으며, 기부(基部)에는 원형의 과병(果柄)의 흔적이 있고 질은 단단하며 과육은 두께가 2 ~ 4 mm 다갈색 또는 황갈색을 띠고 있다. 과핵(果核)이 붙어 있지 않아 쉽게 박리되며, 긴 방추형이고 길이는 1.5 ~ 2.5cm, 지름은 1 ~ 1.5cm이며 담황색을 띠고 거칠고 단단하다. 핵각(核殼)의 두께는 3 ~ 4mm이고, 핵각(核殼)을 깨면 막질(膜質)의 내종피가 보이며 자엽(子葉)은 2편, 백색이고 겹쳐 감겨있다. 약성은 쓰고 조금 떼

으며 따뜻한 성질을 가지고 있으며, 이명으로는 가여록(訶黎勒, *Chebulinic fructus*) 이라는 약재로 사용되고 있다. 이에 대한 주요 약리활성물질로써는 체불린산(Chebulinic acid), 코리라진(Corilagin), 글루코갈린(Glucogallin), 테르체빈(Terchebin), 엘라그산(Ellagic acid) 등이 함유되어 있다고 알려져 있다. 한방 약리 효능으로는 수렴(收斂)작용, 지혈, 전해제로서 만성 후두염, 장출혈, 치루 출혈, 후두 결핵, 부녀자궁출혈, 만성 자궁염, 대하(帶下), 이질, 구해천급(久咳喘急), 실음(失音) 등의 증세에 사용되고 있다. 또한 삼(澁)한 맛과 온(溫)한 약성은 허약한 장관(腸管)을 따뜻하게 하므로 설사와 이질을 그치게 하여, 폐의 기능이 감퇴되어 일어나는 천식, 해수 및 오랜 기침으로 음성이 변한 것을 치료한다고 한다. 이 밖에도 가자는 적혈구를 응집시키는 물질, 적혈구 응집소라고 불리는 렉틴이 존재한다고 알려져 있다. 렉틴(Lectin)은 면역계가 발달되지 않는 식물계, 미생물계 및 하등 척추동물에서 항체 대신 외부 침입에 대한 자기 방어 기작으로 생성되는 물질로 세포막 표면의 당과 결합하여 적혈구나 다른 여러 종류의 세포들을 응집시키는 성질을 가지고 있다고 한다. 일반적으로 렉틴은 포유동물의 적혈구에 대하여 선택적으로 혹은 비선택적으로 응집현상이 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0009] 약리학적 연구로 가자의 과실에는 탄닌(Tannin)이 함유되어 있어 수렴지사(收斂止瀉) 작용이 있다고 보고된 바가 있으며, 녹농균, 디프테리아균, 황색포도상구균, 용혈성연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 알려져 있다.

[0010] 그러나, 가자 추출물을 이용하여 조골세포의 활성 및 증식을 통한 골형성능을 향상시키는 것에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Anderson JJB, Garner SC. Phytoestrogen and bone. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 1998;12(4):543-557.

(비특허문헌 0002) Setchell KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J clin Nutr. 1998;68:1333-1346.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하여 조골세포의 활성 및 증식을 통한 골형성능을 향상시키는 골형성제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하여 조골세포의 활성 및 증식을 통한 골형성능을 향상시키는 골형성제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 골형성제용 가자 열매 추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제는 조골세포의 증식 및 활성화에 효과적으로 작용하여 골형성능이 향상됨을 확인하였다. 또한, 본 발명의 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제는 콜라겐(Collagen), 오스테오칼신(Osteocalcin) 및 염기성 인산분해효소(ALP)의 증식 및 활성화에 효과적으로 작용하여 골형성능이 향상됨을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가자 열매 추출물을 제조하는 절차를 나타낸 흐름도이다.

도 2는 정상세포와 MC3T3-E1에서 가자 추출물의 독성평가를 수행한 결과이다.

도 3은 가자 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 확인하기 위한 염기성 인산효소분해(ALP) 활성을 측정한 결

과이다.

도 4는 가자 추출물의 조골세포 분화효과를 확인하기 위한 골형성능을 평가한 결과이다.

도 5는 가자 추출물의 골형성 단백질 유전자 발현을 확인하기 위한 콜라겐(Collagen) 함량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명의 일부 실시예들을 예시적인 도면을 통해 상세하게 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가지도록 하고 있음에 유의해야 한다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0018] 또한, 본 발명의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제 1, 제 2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다. 어떤 구성 요소가 다른 구성요소에 "연결", "결합" 또는 "접속"된다고 기재된 경우, 그 구성 요소는 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되거나 또는 접속될 수 있지만, 각 구성 요소 사이에 또 다른 구성 요소가 "연결", "결합" 또는 "접속"될 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.
- [0019] 본 발명의 골형성제는 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 것으로 조골세포의 증식 및 활성화에 효과적으로 작용하는 골형성제를 제공한다. 상기 가자 열매 추출물은 유기용매 추출물일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 골형성제는 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 것으로 콜라겐(Collagen) 또는 오스테오칼신(Osteocalcin) 증식 및 활성화에 효과적으로 작용하는 골형성제를 제공한다. 상기 콜라겐은 콜라겐 I(Collagen I) 또는 콜라겐 X(Collagen X)일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 골형성제는 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 것으로 염기성 인산분해효소(Alkaline phosphatase; ALP) 활성화에 효과적으로 작용하는 골형성제를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 건조된 가자 열매를 세척하는 제 1단계; 상기 제 1단계에서 얻어진 세척된 가자 열매를 분쇄하는 제 2단계; 및 상기 제 2단계에서 얻어진 분쇄된 가자 열매 중량의 1 내지 10배량의 유기용매를 가하여 추출물을 수득하는 제 3단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 골형성제용 가자 열매 추출물의 제조방법을 제공한다. 상기 유기용매는 알코올이 바람직하며, 특히 탄소수 1 ~ 4의 알코올이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 가자 열매 추출물을 유효성분으로 하는 골형성제의 골형성능을 확인하기 위한 세포 배양 및 각종 실험방법은 다음과 같다.

[0024] 실시예 1: 실험방법

[0025] 1. 시약

[0026] 세포배양에 사용된 Minimum Essential Medium (a-MEM)는 Gibco (BRL, Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 세포 증식검사에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) 시약 그리고 염기성 인산분해효소(ALP) 측정과 염색에 사용한 시약은 모두 SIGMA(Sigma co, St. louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Polymerase Chain Reaction (PCR)에 사용된 Primer는 Bioneer (Bioneer. Co., N.Y, USA)사로부터, RNA추출을 위하여 사용한 시약은 Trizol solution (Molecular Research Center, Inc. Ohio, USA), Chloroform (JUNSEI, JAPAN), 2-Propanol (SIGMA, USA)를 사용하였으며, Reverse transcriptase - PCR은 Roche Script Reverse Transcriptase(Bioneer, co., NY., USA), cDNA 합성은 M-MLV cDNA Synthesis kit (Enzymomics Co., KOREA), DNA ladder는 Nanohelix (Nanohelix Co., KOREA)사의 제품을 구입하여 사용하였다.

[0027] 2. 가자 추출물의 제조

[0028] 건조한 가자 열매 과육 500g을 물로 수세하여 1차 증류수로 다시 수세한 후, 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 99%의 에탄올을 5배 용량으로 첨가하여 50℃에서 약 10시간 초음파처리(KODO, FD8508)한 후, 여과지로 여과한 다음, 감압농축장치(IKA, RV10B) 플라스크에 담아 농축하였다. 이상과 같은 과정을 3회 반복하여 추출물을 조제하였다.

며, 최종적으로 농축된 시료를 초저온 냉동고(-80℃: Ilshin Lag Co, FD8508)에서 12시간 반응시킨 후, 동결 건조기(Ilshin Lag Co. FD8505)로 동결 건조하여 사용하였다.

3. 조골세포 및 정상세포의 배양

MC3T3-E1 세포(RCB1126, ostoblast-like cell line from C57BL/6 mouse calvaria)는 세포 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% 항생제 (100 U/ml penicillin-100μg/ml streptomycin)를 함유한 α-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 37℃, 5% CO₂ 이하에서 배양하며 세포밀도가 70%정도 포화되면 0.02% EDTA-0.05% Trypsin 용액을 사용하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 분화유도를 위하여 10mM β-glycerol phosphate 50μg/ml, ascorbic acid를 첨가하여 분화유도배지로 사용하였으며, 6일간 배지를 교환해주었다.

Human Normal Oral Keratinocyte (HNOK)는 ScienCell Research Laboratories (ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 HNOK 배양 방법은 제조회사로부터 제공된 세포 배양법 및 성장인자가 포함된 Keratinocyte Growth Media (KGM, Clonetics Co., San Diego, CA) 로 5% CO₂, 95% 습도가 유지되는 항온항습기에서 배양하였다.

4. 조골세포의 증식률 및 세포 독성 분석

시료의 농도별 처리에 따른 조골세포의 증식 정도는 3-(3,4-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-disphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. MTT assay는 Mitochondria의 탈수소효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 Formazan으로 환원되는 원리를 이용하여 생성된 Formazan을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 현탁시킨 후 이에 대한 상대적인 흡광도로 세포증식률을 비교하였다.

먼저 96well plate에 1×10⁵/well의 조골세포를 분주하여 2일간 배양한 후, 시료의 최종 농도가 3, 10, 30, 100 및 200μg/ml이 되도록 배양액에 첨가하여 20시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 5mg/ml 농도로 20μl 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양한 후 배지를 제거하고 DMSO를 200μl씩 첨가하여 생성된 불용성의 Formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Biotek Instruments Ltd., KOREA)로 540nm에서 흡광도 (Optical Density, OD)를 측정하였다. 세포의 증식률은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

5. 염기성 인산분해효소 (Alkaline phosphatase; ALP) 활성 측정

염기성 인산분해효소(ALP)의 활성측정은 p-nitrophenyl phosphate의 가수분해 반응에 염기성 인산분해효소(ALP)가 촉매로 작용하는 원리를 이용하여, 가수분해 산물인 p-nitrophenyl의 양을 측정함으로써 염기성 인산분해효소(ALP)의 농도를 산출하는 방법이다. MC3T3-E1 세포를 2×10⁴ cell/well 농도로 96well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 5mM β-glycerophosphate와 50μg/ml ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 48시간 배양하였다. 배양한 세포는 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline(DPBS)로 세척한 후 0.1% Triton X-100을 첨가해 30분간 세포를 lysis시킨 후 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하고 염기성 인산분해효소(ALP) kit (아산제약)를 사용하여 염기성 인산분해효소(ALP) 활성을 측정하였다. 단백질량은 상등액 50μl 중 5μl를 취하여 96well plate에 넣은 후 BCA protein assay kit를 이용하여 정량하였고, p-nitrophenol의 흡광도 (Optical Density, OD)로부터 산출한 활성도를 정량한 단백질량으로 나누어 단위단백질 함량 당 효소 활성도 (Unit/mg protein)를 산출하였다. 효소활성은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

6. 콜라겐 함량 측정

조골세포의 콜라겐 합성능력은 Tullberg-Reinert 등의 방법에 따라 Sirius red-based colorimetric assay를 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 48well plate에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10mM β-glycerophosphate와 50μg/ml ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화

를 유도하고, 6일 후 각 농도별 시료와 배양한 세포는 DPBS로 세척한 후 주로 동물조직 고정에 사용되는 Bouin's fluid (Saturated picric acid : 35% Formaldehyde : Glacial acetic acid = 15 : 5 : 1)로 1시간 고정하였다. 이 후 3 차 증류수로 세척한 후 건조하여 Sirius red 염색액(1mg/ml saturated picric acid)으로 1 시간 동안 흔들어주며 염색하고 0.01N HCl로 세척한 후 0.1N NaOH 0.2ml을 첨가하여 용해시켜 ELISA reader (Biotek Instruments Ltd, KOREA)를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜라겐 함량($\mu\text{g per } 2 \times 10^4$ cell)은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0039]

7. 석회화(Mineralization) 측정

[0040]

골(Bone) 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 Calcuim에 높은 흡착력을 가지고 있다. 이것은 무기질화된 세포의 세포외 기질에 염색되므로 무기질화된 양과 염색된 정도가 상호 비례한다. MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cells/well 농도로 6cm diameter에 분주한 후 세포가 90% 포화되게 자라면 10mM β -glycerophosphate와 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbic acid를 함유한 배지로 교환하여 2일마다 배지를 갈아주며 분화를 유도하고, 7일 후 각 농도별 시료 처리군과 시료 및 0.3mM H_2O_2 를 함께 처리한 군으로 나누어 24시간 배양하였다. 분석을 위해 배지를 제거하고, DPBS로 세척한 뒤, 70% EtOH로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. 세포를 고정시킨 후 40mM Alzarine red (AR) solution으로 10분간 염색하고 DPBS로 세척한 뒤 염색된 정도를 ELISA reader (Spectra MAX M2, Molecular Device, USA)를 이용하여 561nm에서 흡광도를 측정하였다. 석회화(Mineralization) 정도는 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

[0041]

8. Total RNA 분리 및 정량

[0042]

세포를 RNase free water로 washing 세척한 후 1ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200 μl 의 Chloroform을 넣고 ice에서 반응시켰다가 12,000rpm으로 원심분리하여 상층액 500 μl 를 분리하였다. 0.5ml Isopropyl alcohol을 가하여 -20°C 에서 12시간을 침전시킨 후 12,000rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 80% 에탄올로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 -80°C 에서 저장하였다.

[0043]

9. cDNA 제조

[0044]

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 Total RNA 액 1 μl (1 μg RNA)에 dNTPs (deoxyribonucleoside triphosphates) 2 μl , DTT (Dithiothreitol) 2 μl , Reaction buffer 4 μl , Reverse transcriptase (RT) Enzyme 1 unit/ μl , RNase inhibitor 0.5 μl , Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 8.5 μl 를 넣은 후 혼합한 다음 37°C 에서 1분간 Incubation하였다. Primer가 Annealing 하도록 4°C 에서 약 5분간 방치한 다음, RT buffer, dNTP, RNase inhibitor, DTT (100nM), Reverse transcriptase (M-MLV 200 unit/ μg)을 첨가하여 혼합하였다. 이 후, 42°C 에서 90분간 Incubation 한 후, 95°C 에서 5분간 처리한 후 합성된 cDNA를 정량 PCR을 위한 Template로 사용하였다.

[0045]

10. PCR (Polymerase Chain Reaction) 분석

[0046]

PCR은 total volume 20 μl 에 10X PCR buffer, 10mM dNTPs, 10pmole의 GAPDH, Collagen I, Collagen X, Osteocalcin primer를 각각 넣은 혼합액에 cDNA와 1 Unit의 Taq polymerase (Promega, NY, USA)을 넣어 PCR을 시행하였으며 각각의 유전자에 대한 Primer Sequence 및 반응 조건은 하기 표 1과 같다.

[0047]

증폭된 PCR 산물을 1.0% Agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 Band를 Density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 각각의 유전자에 대한 증감여부를 분석하였다.

[표 1] PCR primer sequence and PCR condition

Gene name	Primer sequence		Reaction Condition				PCR product size	NCBI gene Number
	Forward	Reverse	Cycle number	Denaturation	Annealing	Extension		
GAPDH	5'-AACTTTGGCATT GTGGAAGGGCTC-3'	5'-TGGAAGAGTGGG AGTTGCTGTTGA-3'	38	94°C (40 초)	55°C (20 초)	75°C (50 초)	382bp	NT_039595.8
Collagen I	5'-TGGCATAGCAAC TAAGGGCCTCAA-3'	5'-TGAAGCCTGATC CAGGTAGCCTTT-3'	35	95°C (20 초)	55°C (40 초)	72°C (40 초)	204bp	NM_000089.3
Collagen X	5'-TGGCATAGCAAC TAAGGGCCTCAA-3'	5'-TGAAGCCTGATC CAGGTAGCCTTT-3'	35	95°C (20 초)	55°C (40 초)	72°C (40 초)	478bp	NM_000493.3
Osteocalcin	5'-TCATGTCCAAGC AGGAGGGCAATA-3'	5'-TGACATCCATAC TTGCAGGGCAGA-3'	35	95°C (20 초)	63°C (40 초)	72°C (40 초)	223bp	NM_007541.2

실시예 2: 가자 열매 추출물의 세포 독성 분석

가자 열매 추출물이 조골세포 증식에 미치는 영향을 분석하기 전에 정상세포와 MC3T3-E1에서 가자 열매 추출물의 독성평가를 수행하였다. 정상세포의 독성평가는 도 2A, 2B와 같이 배양전 HNOK와 MC3T3-E1에 가자 열매 추출물 0, 10, 50 및 100 μ g/ml를 각각 처리 후 24시간 후에 MTT 방법으로 세포독성을 분석한 결과 10 μ g/ml, 50 μ g/ml에서 대조군과 유사한 세포생존율을 나타내었으며 도 2C와 같이 100 μ g/ml은 대조군에 비하여 약 5%의 세포생존율이 감소하였으나 큰 차이는 없었다.

실시예 3: 염기성 인산분해효소(ALP) 활성 측정

염기성 인산분해효소(ALP)는 칼슘과 인 대사에 관여하는 효소로서, 세포외막과 석회화 조직의 기질세포에서 높은 농도로 발견되며 염기성 pH 8-10에서 최적의 활성을 나타낸다. 가자 열매 추출물의 조골세포 활성 및 분화효과를 확인하기 위한 지표로 염기성 인산분해효소(ALP) 활성을 측정한 결과 도 3A와 같이 10, 50 및 100 μ g/ml 농도에서 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 100 μ g/ml 농도에서 가장 많이 염기성 인산분해효소(ALP) 활성이 나타내는 것을 확인하였다.

실시예 4: 석회화(Mineralization) 측정

조골세포의 분화를 확인하기 위해 Alizarine Red S staining을 이용하여 골 형성능을 평가하였다. MC3T3-E1에 가자 추출물 50 μ g/ml를 0, 7 및 14일 동안 처리한 결과 도 4A와 같이 석회화 결절(mineralized nodule)이 형성됨을 확인하였다. 또한 colorimetric spectrophotometry을 이용하여 도 4B와 같이 석회화를 정량한 결과 7, 14일에 석회화 되는 양이 증가하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 MC3T3-E1에 가자 추출물 0, 10 및 50 μ g/ml를 24시간 동안 처리하여 오스테오칼신의 함량을 quantitative PCR로 확인하였다. 그 결과 도 4C와 같이 가자 열매 추출물 10 μ g/ml, 50 μ g/ml를 처리하였을 때 Osteocalcin의 발현이 대조군에 비해 향상된 것을 확인하였다.

실시예 5: 콜라겐(Collagen) 함량 측정

가자 열매 추출물 처리시 콜라겐 함량은 도 5A와 같이 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며 50 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 60.92%의 함량 증가를 나타내었다. 조골세포의 초기 분화 지표인 염기성 인산분해효소(ALP) 활성 측정 결과에서와 마찬가지로 가자 열매 추출물이 조골세포의 콜라겐 합성능을 증가시키는 것을 확인할 수 있다.

PCR에 의해 얻어진 골기질 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과 도 5B와 같이 MC3T3-E1 세포의 6일간 배양에 따른 분화 인자 mRNA 발현양을 나타낸 것으로 Collagen Type I 및 Collagen Type X 발현이 대조군에 비해 높게 발현되었다.

상기 살펴본 바와 같이, 가자 열매 추출물의 독성평가를 수행한 결과 실험군에서 모두 대조군과 유사한 세포생존율을 나타내어 가자 열매 추출물의 골형성제로 사용의 제약은 없는 것을 확인하였다. 가자 열매 추출물의 염

가성 인산효소분해(ALP) 활성을 측정한 결과 실험군 모두 대조군에 비해 농도 의존적인 증가 경향을 나타내고 있으며, 특히, 가자 열매 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 많이 염기성 인산효소분해(ALP) 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0060]

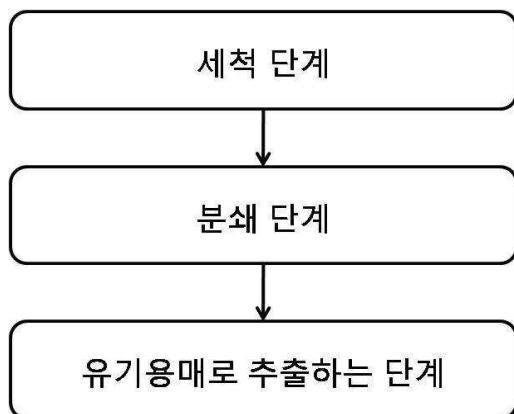
가자 열매 추출물의 조골세포 증식을 측정한 결과 실험군 모두 대조군에 비해 세포 증식을 확인하였으며, 특히 가자 열매 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 많은 세포 증식을 보이는 것을 확인하였다. 가자 열매 추출물의 콜라겐 증식을 측정한 결과 실험군 모두 농도 의존적인 증가 경향을 보였으며, 특히 가자 열매 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 콜라겐이 가장 많이 증식된 것을 확인하였다. 또한, 가자 열매 추출물의 골기질 단백질을 측정한 골기질 단백질 중 Collagen Type I, Collagen Type X 및 오스테오칼신의 발현이 향상된 것을 확인하였다.

[0061]

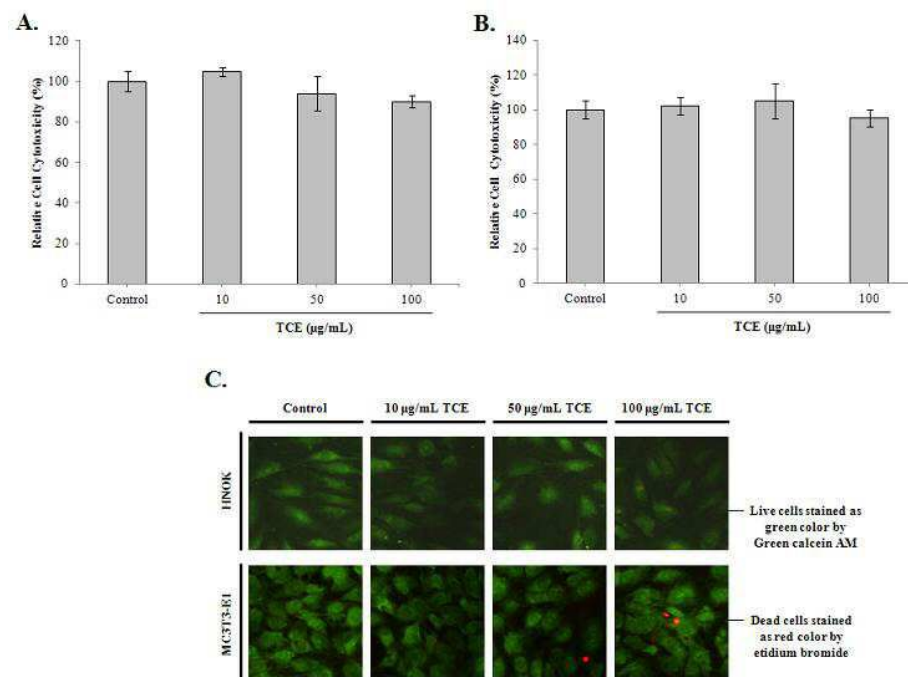
즉, 가자 열매 추출물은 조골세포의 증식과 골형성 단백질 유전자의 발현에 있어 효과적으로 작용하며, 가자 열매 추출물이 골형성능에 효과가 있음을 확인하였다.

도면

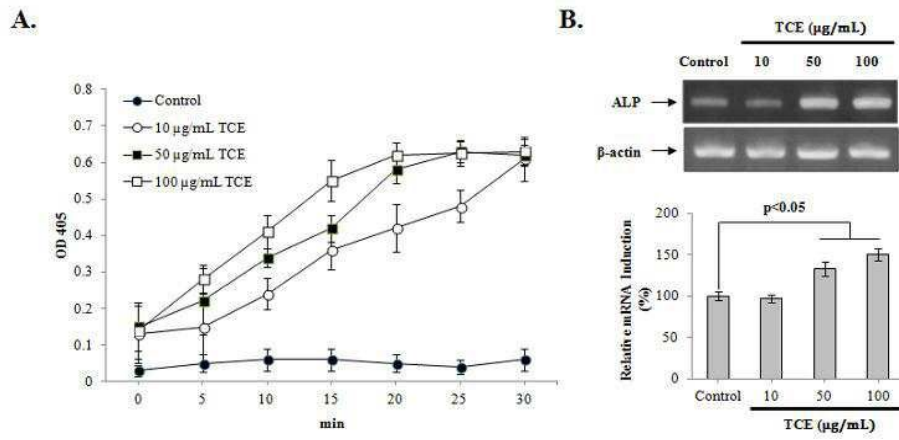
도면1



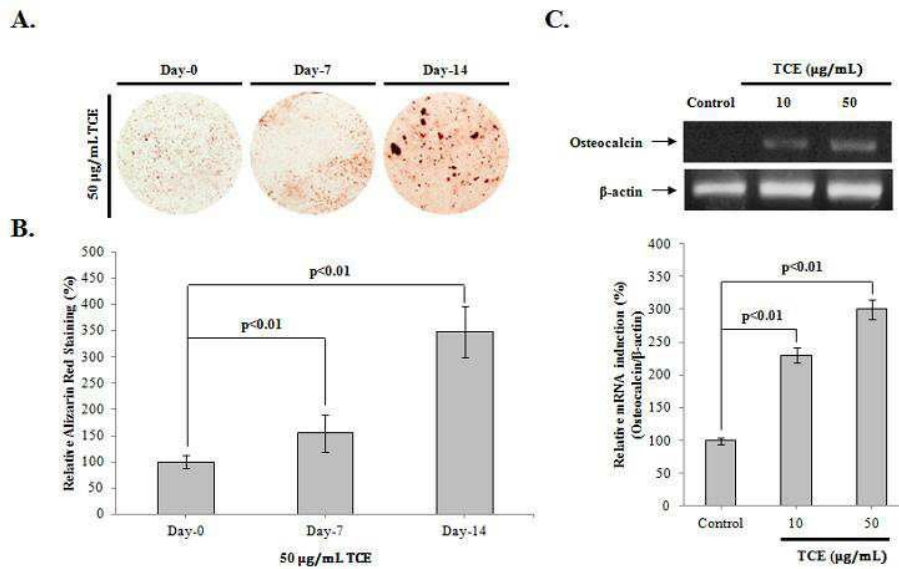
도면2



도면3

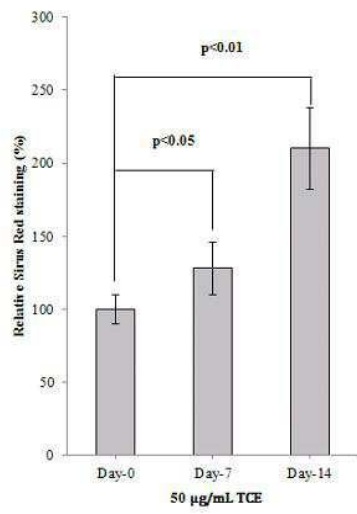


도면4



도면5

A.



B.

