



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 36/481 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0084832

(43) 공개일자 2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2006-0017094

(22) 출원일자 2006년02월22일

심사청구일자 2006년02월22일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 이재동
서울특별시 동대문구 이문동 426번지 삼성래미안APT 204-1601호
박동석
서울 송파구 문정2동 웨미리아파트 210동 1503호
백용현
서울 강남구 대치동 청실아파트 3동 1005호
허정은
서울 서대문구 연희동 712번지 14-6
양하루
서울 도봉구 창동 북한산아이파크 520동 803호

(74) 대리인 신동인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 황기 추출물을 포함하는 혈관형성 촉진 및 골유합 효과를 갖는 골절의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 함유하는 골절의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 황기 추출물은 혈관세포 증식, 이동, 분화 및 성장인자의 분비 촉진에 의한 혈관 형성 촉진 효과와 조골세포의 증식 및 분화 촉진, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 촉진, 혈관내피세포성장인자 (VEGF) 분비 촉진, 골기질의 발현 및 분비 촉진, 골석화 (osteocalcification) 및 무기질 침착 (mineralization) 촉진에 의한 조골세포 증식 효과, 골절 부위의 조골세포 증식 및 골재생 관련 유전자의 발현 증가에 의한 골유합 효과가 탁월하므로, 골절의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 이용될 수 있다.

대표도

도 12

특허청구의 범위

청구항 1.

황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 치료용 약학조성물.

청구항 2.

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

청구항 3.

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

청구항 4.

혈관 형성 및 조골세포 증식으로 인한 골유합 효과를 나타내는 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 5.

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

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혈관형성 촉진 및 조골세포 증식에 의한 골유합 효과를 갖는 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 함유하는 골절의 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

혈관신생 (angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고있는 내피세포의 이동 (migration)과 세포간 장벽인 세포외기질 (ECM; extracellular matrix)을 통과하는 침윤 (invasion), 성장 (proliferation), 혈관이 만들어지는 단계인 분화 (tube-like formation)의 단계를 거치며 이에 대한 유도물질과 억제물질 간의 균형에 의하여 정교하게 조절되는 것으로 알려져 있다 (Schott RJ and Morrow LA, *Cardiovasc. Res.*, 27(7), pp1155-1161, 1993). 이는 고도로 조절되는 과정으로 상처치유과정 및 배 또는 황체 엑스의 발생을 제외한 정상상태에서는 거의 일어나지 않는다 (Folkman J and Shing Y, *J. Biol.Chem.*, 267(16), pp10931-10934, 1992). 전반적으로 혈관형성은 연관된 기저막의 효소에 의한 퇴화로 시작되는 몇 가지의 단계와 연관되어 있다. 게다가, 혈관신생에는 혈소판-유래성장인자 (platelet-derived growth factor), 골형성단백질-2 (BMP-2; bone morphogenic protein-2), 혈관내피세포성장인자 (VEGF; vascular endothelial growth factor), 및 섬유아세포성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor), FGF-2 같은 혈관신생인자에 의한 적절한 자극이 필요하다 (Folkman J and Shing Y, *J. Biol.Chem.*, 267(16), pp10931-10934, 1992; Ferrara N, *Recent Prog. Horm. Res.*, 55, pp15-35, 2000; Burgess WT and Maciag T, *Annu. Rev. Biochem.*, 58, pp575-606, 1989).

혈류공급의 영향을 비교적 많이 받는 근골격계에서도 혈관생성의 중요성이 부각되면서 치료성 혈관신생이 각광을 받기 시작하였고, 골유합, 골형성, 골이식, 국소 허혈성 골괴사 등에서 이미 혈관형성의 촉진이 치료에 도움을 주는 것으로 알려져

활용되고 있는 실정이다 (안재훈 등, *대한정형외과학회지*, 34, pp631-642, 1999). 모세혈관에서 혈장단백질을 투과를 증가시키는 사이토카인 (cytokine)으로서, 세포의 분열과 이동을 촉진하고 세포소멸의 억제를 통해 새로 형성된 혈관의 생존을 유지시키며, 혈관세포의 이동을 촉진시켜 새로운 세포의 발생 및 분화를 촉진시키는 VEGF는 최근 연구에서 뼈 성장의 조절에 대한 역할에 많은 관심이 집중되었으며, BMP-2 보다 조골세포의 증식에 더 강력한 유도활성을 갖는다고 보고되었다 (Midy V and Plouet J, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199(1), pp380-386, 1994). 또한 스타틴 (statin)이 VEGF 및 BMP-2 같은 골 동화 요소의 발현을 촉진시키고, 이에 따라 조골세포 (osteoblast)의 증식 및 석회화 (calcification)를 촉진됨이 보고되었다 (Maeda T. et al., *Endocrinology*, 144(2), pp681-692, 2003).

bFGF는 세포의 이동, 분화 및 많은 종류의 발생과정과 연관된 유사분열인자, 혈관신생인자 및 생존인자로 많은 종류의 세포 및 조직에서 다면발현의 역할을 한다 (Dembinska-kiec A et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1740(2), pp222-239, 2005). 게다가 최근 연구에는 상처의 치유법으로써 bFGF의 사용 (Tsuboi R and Rifkin DB, *J. Exp. Med.*, 172(1), pp245-251, 1990), 허혈성 심장혈관질환 (Murayama T et al., *Exp. Hematol.*, 30(8), pp967-972, 2002; Horvath KA et al., *Ann. Thorac. Surg.*, 74(2), pp481-486, 2002) 및 골절치유 (Nakamura T et al., *J. Bone Miner. Res.*, 13(6), pp942-949, 1998)에 적용가능하며, 임상실험이 진행중이라 보고되고 있다.

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

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

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

황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.)는 콩과 (Fabaceae)에 속하는 다년생초본으로 산지에 자라고 약초로 흔히 재배된다. 한국에는 황기속 (*Astragalus*)에 제주도에서 자라는 탐라황기 (*A. adsurgens*), 꽃이 자주색인 자주황기 (*A. dauricus*), 백두산 지역의 고원에서 자라는 개황기 (*A. uliginosus*) 등을 비롯해 5종(種)이 자라고 있다. 한약재로 쓰이는 황기는 황기의 뿌리로 가늘고 긴 원뿔형·원구형 또는 몽둥이 모양이다. 길이 10~ 80 cm, 지름은 0.2~ 15 mm로 흔히 분기되어 있다. 겉면은 담백색을 나타내고 회갈색의 코르크층이 군데군데 있으며, 단단하고 절단면은 섬유성이며, 세로 절단면은 백색이고 중심부는 유황색을 띠고 있다. 봄 또는 가을에 채취하여 건조시킨다. 성분으로는 교질, 점액질, 전분, 자당, 포도당, 섬유소, 비타민 B 등이 알려져 있다. 성질은 약간 따뜻하고 독이 없으며 맛은 달다.

한방에서는 생약재로 사용하는데, 주로 비경 (脾經), 폐경 (肺經)에 작용하며, 아울러 신경 (腎經), 대장경 (大腸經) 및 삼초경 (三焦經)에도 작용한다. 황기의 효능으로는 보기승양 (補氣升陽), 고표지한 (固表止汗: 피부의 방어기능을 강화하여 땀을 멈추게 하는 치료법), 이수소종 (利水消腫: 배뇨를 원활하게 하여 부은 것을 가라앉게 하는 치료법), 탁독배농 (托毒排膿: 기혈을 보익하는 약물을 사용하여 정기를 보조해서 병독을 밖으로 밀어냄으로써 내부의 농을 배출하는 치료법) 등이 있다. 따라서 황기는 만성쇠약, 특히 비위기 (脾胃氣) 허약에 효과가 있으며, 중추신경계의 흥분작용 효과도 있다. 피로, 무력감, 음성저하, 맥연완 (脈軟緩) 등의 증상이 있을 때 복용하면 좋은데 장기간 다량 복용해야 효과가 있다. 탈항 (脫肛), 자궁탈 (子宮脫), 내장하수 (內臟下垂), 자궁출혈 등의 중기하함 (中氣下陷: 비장의 기능이 약화된 것이 더욱 악화됨)의 증상이 있을 때도 사용한다. 체질을 개선하고 전신 근육의 긴장을 높임으로써 효과를 나타낸다. 말초신경마비, 뇌졸중의 후유증인 반신불수, 만성관절류머티즘, 결관절주위염 등에 사용하는데 이들은 기혈양허 (氣血兩虛)로 인해 순환장애가 생기는 동통이나 혈비 (血痺)이다. 기행즉혈행치혈선치기 (氣行則血行治血先治氣)라는 관점에서 황기를 써서 기를 보충한다. 황기는 고표의 주약이므로 표허자한 (表虛自汗: 기운이 부족하여 피부의 방어기능이 튼튼하지 못해 저절로 땀이 나는 증상)에 사용한다. 신장염에도 사용하는데 황기는 이뇨하여 부종을 없앨 뿐 아니라 단백뇨를 낮추고 전신의 영양상태를 개선한다. 황기는 오랫동안 혈어 있는 화농증에 사용한다. 현대의학적으로 보면, 항균작용과 인체의 저항력 증가로 인하여 자케 배농되어 유합하기 쉽게 하는 것이다.

최근 연구보고에 따르면 면역력을 높여주며 조혈기능을 높여줌으로써 방사선치료를 받고 있는 암환자의 치료 및 회복에 도움을 주는 처방에 사용한다고 보고되었으며 (Cheng XD et al., *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 36(3), pp211-217, 2004), 난소 절제술을 실시한 동물모델 (OVX rat model)에 황기 추출물을 경구투여함으로써 골대사 작용을 촉진시키는 결과 등이 보고된 바 있다 (Kim C et al., *Arch. Pharm. Res.*, 26(11), pp917-924, 2003). 그러나 현재까지 황기의 골유합, 골재생 활성화에 의한 골절 치료 효과가 교시되거나 개시된 바는 없다.

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

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

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

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

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

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 에탄올과 물의 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 황기 추출물은 하기와 같이 수득 될 수 있다.

본 발명의 황기를 세절하여 준비한 시료 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 5 내지 15배 분량의 물, 에탄올, 메탄올 등과 같은 C₁ 내지 C₄의 저급 알콜 또는 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:5의 혼합비(v/v)를 갖는 물과 에탄올의 혼합용매로, 실온에서 약 0.5 내지 48시간, 바람직하게는 1 내지 30시간 동안 교반 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 상온 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여, 바람직하게는 상온 추출한 후 수득한 추출액을 여과, 감압농축 또는 건조하여 본 발명의 황기 추출물을 수득할 수 있다.

상기 제조공정으로 얻어진 본 발명의 황기 추출물은 혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)의 증식, 이동, 분화 및 성장인자의 분비를 촉진하여 혈관 형성 촉진 활성을 나타내었으며, 조골세포인 Saos-2세포의 증식, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 증가, 혈관내피세포성장인자 분비 촉진, 골기질인 오스테오칼신 (OCN), 오스테오폰틴 (OPN) 및 I형 콜라겐 (Col I; type I Collagen)의 분비 및 유전자 발현 촉진, 골석화 (osteocalcification) 및 무기질 침착 (mineralization) 촉진에 의한 조골세포 증식 효과를 나타내었으며, 골절동물모델에서도 상기 시험관 내 (*in vitro*) 및 세포 내 (*in vivo*) 실험의 결과와 동일한 효과를 나타내며 골유합 활성을 가져 골절의 예방 및 치료효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

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

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

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

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

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

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

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

또한, 본 발명은 혈관 형성 및 조골세포 증식으로 인한 골유합 효과를 나타내는 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물을 유효성분으로 함유하는 골절의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

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

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

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

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 황기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 황기 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

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

실시예 1. 황기 추출물 제조

경희의료원 한방병원에서 구입하여 약 1.0 cm 정도의 크기로 세절한 황기 250 g에 2 ℓ의 50 % (v/v) 에탄올을 가해 고루 섞은 후, 실온에서 24시간 침지하였다. 상층액을 여지 (Whatman paper, Whatman, USA)로 거른 후 감압농축기 (Eyela, Tokyo, 일본)를 이용하여 농축한 후, -20 °C에서 동결 건조하여 분말상태의 황기 추출물 35 g을 수득하였다 (이하 AM이라 명명함). 수득한 AM은 디메틸설폭시화물 (DMSO)에 녹여 사용하였고, 최종 DMSO의 농도는 배양 배지의 0.5 % 이하로 하여 실험에 사용하였다.

참고예 1. 세포 배양

1-1. 혈관세포의 배양

경희의료원 산부인과에서 제공받은 산모의 탯줄 정맥으로부터 하기의 과정으로 혈관세포를 분리하였다. 코드 버퍼 (Cord buffer; 0.2% glucose phosphate buffered saline)로 혈관을 세척 후, 0.2 % I형 콜라게나아제 (type I collagenase, Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 정맥에 약 5 ml 가량 넣은 후 37 °C에서 5분간 방치했다. 실온에서 코드 버퍼 20 ml을 정맥에 넣고 반대편으로 분리되어 나온 혈관세포를 수집하고, 다시 한번 코드 버퍼만을 혈관에 주입하여 37 °C에서 반응시킨 후 혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)를 수집하고 세척하여, 0.1 % 젤라틴 (gelatin)이 코팅된 조직배양용 T75 플라스크에 주입하였다. 배양배지는 EGMTM-2 완전배지 (EGMTM-2 complete medium, Cambrex, MD, USA)를 이용하였으며, 37 °C 및 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하고, 컨플루언트 (confluent) 상태가 되면 트립신 (Trypsin-EDTA)을 처리하여 세포를 분리하여 계대배양하고, 3 내지 6 세대 (passage) 까지의 세포를 실험에 사용하였다.

1-2. 조골세포의 배양

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

참고예 2. 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

트리졸 시약 (TRIzol reagent, Invitrogen Corporation, CA, USA)을 이용하여 RNA를 준비하였다. 1 µg의 총 RNA, Oligo (dT)₁₂ 프라이머, dNTP (10 mM), 0.1M 디티오프레이톨 (DTT, dithiotreitol), 역전사효소 (Promega, USA) 및 RNase 저해제에 완충액을 첨가하여 역전사 (reverse transcription) 반응을 42 °C에서 60분간 수행하였다. 상기에서 합성된 각각의 cDNA와 하기 표 1 및 서열번호 1 내지 10에 기재된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응 (PCR; Polymerase Chain Reaction)은 cDNA 0.5 µg, 2.5 unit의 Taq 중합효소 (TaKaRa TaqTM, Takara, Japan), 1.5 mM dNTP, 1× 완충액 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 각 프라이머쌍 20 pmol씩을 섞고 증류수로 총부피를 10 µl로 맞추는 다음 기계 (TaKaRa Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 실시하였다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.8 % 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고 EtBr (ethidium bromide)로 염색하여 특정 밴드 (band)를 확인하였다. 서열번호 9 및 10의 프라이머를 이용한 PCR 산물인 베타-액틴 (β-Actin)을 지표유전자로 사용하였고, Gel-Doc EQ (BIO-RAD Laboratories, Milan, Italy)를 이용하여 정량하였다.

[표 1]

유전자		프라이머의 서열
VEGF	정방향	5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3'
	역방향	5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3'
OPN	정방향	5'-CAGCCATGAATTTACAGCC-3'
	역방향	5'-GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'

OCN	정방향	5'-CATGAGAGCCCTCACA-3'
	역방향	5'-AGAGCGACCCCTAGAC-3'
Col I	정방향	5'-TGACCTCAAGATGTGCCACT-3'
	역방향	5'-GGGAGTTTCCATGAAGCCAC-3'
β -Actin	정방향	5'-CCATCATGAAGTGTGACGTG-3'
	역방향	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'

참고예 3. 골절 (fracture) 동물 모델

SD계 랫트 (Sprague-Dawley rat, 중앙실험동물, Japan) 에 65 mg/kg의 펜토바비탈 (pentobarbital, 유한양행, 대한민국)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 오른쪽 다리를 면도하고 세척하였다. 0.05 mL의 페니실린 (Penicillin, 유한양행, 대한민국)을 왼쪽 다리의 대퇴부의 근육내로 주사한 후 오른쪽 무릎을 고정하고 슬개골 (patella) 측면을 일직선으로 절개하여 슬개골을 옆으로 젖히고 대퇴골과 (femoral knee condyles)를 노출시켰다. 대퇴골 과부 (Condyles) 사이로 바늘 (20G needle)을 삽입하여 도관 (canal)을 만든 후에 K-강선 (kirschner wire; 1mm in diameter, 2.8cm in length)을 대퇴골과 내부 (intercondyles portion)를 통해 골수강관 (intramedullary canal)으로 삽입하였다. 무릎 관절 (knee joint)을 봉합한 후 랫트의 대퇴골 (femur)에 골절장치 (fracture apparatus)를 이용, 힘 (bending force)을 가하여 골절 (fracture)을 유발하였으며, 방사선 사진 (radiograph)을 통하여 골절되지 않은 표본 (improper fracture sample)은 제외시켰다.

골유합 모델은 1주, 2주, 3주의 세 그룹으로 나누고 각 그룹을 대조군 (control group)과 AM 투여군으로 나누었다. 대조군은 물을, AM 투여군은 본 발명의 AM을 물에 녹여 경구투여 하였다 (120 g/day/kg). 투여가 끝난 후 실험을 위해 각 그룹 랫트의 골절된 대퇴골 뿐만 아니라 비교군으로서 정상 대퇴골도 함께 수거 (harvest)하였다.

참고예 4. 통계분석

모든 실험 결과는 평균± 표준편차 (SD)로 나타내었고, 스튜던트 t검정법 (Student's t-test)를 사용하여 $p < 0.05$ 수준 이하에서 유의성을 인정하였다.

실험예 1. AM의 혈관형성 촉진 활성 측정 (*in vitro*)

1-1. 혈관세포 증식 측정

혈관세포의 증식 정도는 BrdU 어세이 방법을 이용하여 측정하였다 (Magaud JP et al., *J. Immunol. Methods*, 21:106(1), pp95-100, 1988).

상기 참고예 1-1에서 수득한 혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)를 0.1 % 젤라틴으로 코팅된 96-웰 플레이트에 5×10^3 세포수/웰의 농도로 분주하고 EGMTM-2 완전배지를 이용하여 배양하였다. 배양 24시간 후 배지를 제거하고 2 %의 FBS 및 3 unit/mL의 헤파린 (heparin, Sigma, USA)이 첨가된 EBM 배지 (endothelial basal medium, Cambrex, MD, USA)로 교체함과 동시에, AM 처리군은 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 AM을 처리하고, 양성대조군은 5 ng/mL의 bFGF (R&D system Inc., MN, USA)를 처리하였다. 72시간 배양 후 10 μL 의 BrdU (Roche, USA)를 각 웰에 첨가하고 6시간 더 배양한 후, 세포를 고정하고 anti-BrdU-POD를 100 μL 첨가하여 반응시킨 후, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질 100 μL 를 사용, 발색하여 반응을 종료하였다. AM 첨가에 따른 세포 증식 정도는 ELISA 판독기 (Molecular Devices, USA)를 이용, 480 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 시료처리군의 흡광도의 %로 표시하여 하기 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 AM은 농도 의존적으로 혈관세포의 증식을 촉진시켰으며, 고농도 (100 $\mu\text{g/mL}$) 처리 시에도 세포 독성에 영향을 미치지 않으며 성장을 유의하게 증가시켰다.

1-2. 혈관세포의 이동 측정

혈관세포의 이동은 혈관형성 촉진을 나타내는 지표로 활용된다. 혈관세포의 이동 정도 측정은 화학주성 이동 어세이 (chemotactic migration assay) 방법을 이용하여 측정하였다.

성장인자로 알려진 섬유아세포성장인자 (bFGF; Basic Fibroblast Growth Factor)는 세포의 성장을 촉진하는 heparin 결합 성장인자의 하나로, 시험관 내 (*in vitro*) 실험에서 다양한 형태의 세포의 증식을 야기하며, 생체 내에서는 확실한 혈관 신생 활성을 입증하므로, bFGF를 양성대조군으로 사용하여 실험을 실시하였다.

혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)는 계대배양하여 4 내지 5 세대 (passage)의 세포를 사용하였다. 48-웰 보이든 챔버 (48-well chemotaxis chamber, Neuro Probe, USA)의 챔버 아래 칸 (lower chamber)에 1×10^6 세포수/ml 농도의 혈관세포를 30 μ l씩 분주하고 젤라틴 (gelatin)이 코팅된 막으로 덮어 2 시간 배양하였으며, 챔버 위칸 (upper chamber)에는 양성대조군인 bFGF 10 ng/ml 및 AM 25 μ g/ml을 각각 분주한 후 2 시간 배양하였다. 배양 후 막을 고정시키고, 디프 퀵 용액 I & II (Diff Quik solution I & II, Sysmex Co., Kobe, Japan)를 사용하여 염색 후 현미경 (Axiovert 200, ZEISS, Germany)으로 관찰하고 사진촬영 (100x)하여 이동한 혈관세포의 개수를 세었다.

하기 도 2에 나타난 바와 같이, AM 처리군은 bFGF 처리군과 유사한 혈관세포 이동 활성을 나타내어 본 발명의 AM이 뛰어난 혈관세포 이동 촉진 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

1-3. 혈관세포의 분화 측정

혈관세포의 분화 정도는 유사관 형성 어세이 (tube-like formation assay) 방법을 이용하여 측정하였다.

마트리젤이 코팅된 48-웰 플레이트 (Becton Dickinson, USA)에 혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)를 2×10^4 세포수/웰의 농도로 분주하고 AM 25 μ g/ml 및 양성대조군인 bFGF 10 ng/ml을 각각 처리하여 튜브가 형성되는지를 관찰하면서 배양하였다. 약 12~ 16시간 후 양성대조군인 bFGF의 처리군이 완전히 튜브를 형성하면 세포를 고정하고, 디프 퀵 용액 I (Diff Quik solution I, Sysmex Co., Kobe, Japan)으로 핵을 염색한 후 현미경 (Axiovert 200, ZEISS, Germany)으로 관찰 및 촬영 (100x)하여 도 3a에 나타내고, 사이언 이미지 (Scion image, Meyer instruments., Inc., USA)로 정량한 결과를 도 3b에 나타내었다.

실험결과, 하기 도 3에 나타난 바와 같이 AM 처리군은 양성대조군인 bFGF 처리군과 유사한 관형성 활성을 나타내어, 본 발명의 AM이 뛰어난 혈관세포 분화 활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

1-4. 성장인자 발현정도 측정

혈관세포에 AM 처리시 섬유아세포성장인자 (bFGF; Basic Fibroblast Growth Factor) 발현에 어떤 영향을 미치는지를 효소결합 면역측정법 (ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay)을 이용하여 알아보았다.

48-웰 플레이트에 혈관세포인 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC; Human umbelical vein endothelial cell)를 1×10^4 세포수/웰 농도로 분주하여 배양한 후 각각의 웰에 AM을 0.1 내지 100 μ g/ml 농도로 처리하고 72 시간 배양하였다. 배양액을 제조한 인간 섬유아세포 성장인자 (rhFGF; recombinant human fibroblast growth factor) 항체가 표지된 플레이트 (bFGF ELISA kit, R&D systems INC., MN, USA)에 100 μ l 분주하여 반응시켰다. 반응시킨 세포를 세척한 후, 퍼록시다제가 부착된 염소 항-마우스 면역글로불린 G (peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, R&D systems INC., MN, USA)와 반응시킨 후 세척하고, TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 기질을 이용하여 발색시킨 후 반응을 종료하고, ELISA 판독기 (Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 혈관세포의 bFGF의 발현정도를 확인하였다.

실험결과 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 AM은 세포내의 성장인자인 bFGF의 발현을 농도 의존적으로 증가시키며, 낮은 농도에서도 성장인자의 발현을 유의하게 증가시켜 혈관세포의 증식에 탁월한 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

실험예 2. AM의 혈관형성 촉진 활성 측정 (*in vivo*)

생체 내 AM 처리에 의한 혈관형성 정도를 알아보기 위해 매트리지 겔 플러그 어세이 (Matrigel plug assay)를 수행하였다.

6주된 웅성 C57BL6 마우스 (샘타코, 오산, 경기도)에 매트리지겔 (Matrigel, Becton Dickinson, USA)을 주입하였다. 이때, 음성대조군에는 0.5 ml의 매트리지겔, 양성대조군에는 10 ng/ml의 bFGF를 혼합한 매트리지겔 0.5 ml, 그리고 실험군에는 50 μ g/ml의 AM을 혼합한 매트리지겔 0.5 ml을 쥐의 피하에 각각 주입하였다. 7일 후, 실험쥐를 희생하고 매트리지겔 플러그를 적출하여 10 % 포르말린으로 고정시켜 파라핀으로 포매 (embedding)한 후 절편화 (paraffin section)하였다. 현미경 관찰을 위해 파라핀 절편은 헤마톡실린-에오신 염색 (H-E staining, hematoxylin-eosin staining) 하였으며, 실험에 관한 사전 정보를 갖고 있지 않은 병리학자들에게 염색 부분에 대해 진단하게 하였다. 또한, 신생혈관형성의 정량을 위해 헤모글로빈 진단 키트 (Youngdong Diagnostics, Youngin, Korea)를 이용하여 사용자 지침서에 따라 헤모글로빈 (Hb) 존재량을 정량하였다.

실험결과 도 5a에 나타난 바와 같이, 50 μ g/ml AM을 처리한 매트리지겔에서 육안으로 확인 가능한 유의적인 혈관형성을 관찰할 수 있었으며, 도 5b에 나타난 바와 같이, 성장인자인 bFGF 처리군보다도 AM 처리군에서 헤모글로빈 농도가 유의하게 증가 되어있으므로 나타나 본 발명의 AM이 혈관형성에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

실험예 3. 조골세포 증식 측정

AM의 조골세포의 증식에 대한 영향은 WST-8 어세이 방법을 이용하여 측정하였다 (cell counting kit-8, Dojindo molecular technologies, Tokyo, 일본). 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포인 Saos-2 세포를 1×10^4 세포수/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 분주한 후 42시간 배양하고, AM을 농도별 (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml)로 100 μ l씩 첨가한 후 72시간 배양하였다. 10 μ l의 WST-8 (water-soluble tetrazolium salt; 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)을 첨가하고 약 2시간 더 배양하여 포르마잔이 형성되어 발색되면 ELISA 판독기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 시료처리군의 흡광도의 %로 측정하여 하기 도 6의 그래프에 나타내었다.

상기 실험 결과 도 6에 나타난 바와 같이, AM은 0 내지 100 μ g/ml 농도의 범위에서 3일동안 Saos-2 세포의 생존율에 영향을 미치지 않아, 세포독성이 없는 안전한 약물임을 확인할 수 있었다.

실험예 4. 알칼리 포스파타제 (ALP)의 활성 측정

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

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

실험결과 하기 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 AM은 조골세포에 처리 3일 경과 후, 농도 의존적으로 ALP 활성을 증가시키고, 10 μ g/ml에서 최대의 효과를 나타냄을 확인할 수 있었으며, 이로서 AM이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

실험예 5. 혈관내피세포성장인자 (VEGF) 분비 정도 측정

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

48-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 1×10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후 각 웰에 AM을 농도별 (0 내지 100 μ g/ml)로 처리하고 72 시간 배양하였다.

5-1. AM의 VEGF 분비 촉진 활성 측정

VEGF 발현량을 정량하기 위하여 상기 세포배양액을 수집하여 -70°C 에 보관하였다. VEGF 정량은 ELISA 키트 (VEGF ELISA kit, R&D systems INC., MN, USA)를 이용하여 수행하였다. 항체가 표지된 키트의 플레이트에 상기 배양액을 $100\ \mu\text{l}$ 씩 분주하여 반응시키고 인산염완충액 (PBS)으로 세척하여 퍼옥시다제가 부착된 염소 항-마우스 면역글로불린G (peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG, R&D systems INC., MN, USA)와 반응시키고 다시 세척하였다. 기질 (TMB; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 이용하여 발색시키고 반응을 종료시킨 후 ELISA 판독기를 이용하여 $450\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하여 하기 도 7에 나타내었다.

실험결과 도 7에 보이는 바와 같이, 본 발명의 AM은 혈관생성촉진인자인 VEGF 분비를 농도 의존적으로 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 이로써 AM이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

5-2. AM의 VEGF 유전자 발현 촉진 활성 측정

참고예 2의 역전사 증합효소 연쇄반응 (RT-PCR; Reverse transcription polymerase chain reaction) 법을 이용하여 AM을 처리한 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2 세포의 VEGF 유전자 발현정도를 알아보았다.

도 8a에 나타난 바와 같이, VEGF 유전자 발현은 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 AM 처리 후 배양 3일, 7일, 14일째 모두 증가하였다. 또한, 도 8b에 나타난 바와 같이, AM (0, 0.01, 0.1, 1, 10, $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$) 및 양성대조군인 VEGF ($25\ \text{ng}/\text{ml}$) 처리 후 14일간 배양 시 VEGF 유전자 발현은 AM 농도 의존적으로 증가하였으므로, 상기 결과로부터 AM이 조골세포의 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

실험예 6. AM의 골기질 분비 촉진 활성 측정

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

48-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 1×10^4 세포수/웰의 농도로 분주하여 배양한 후, 각 웰에 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 AM을 처리하고 14일간 배양하였다. 3일 간격으로 배양액을 교환하였으며, 3일째에 배양액을 수집하여 I형 콜라겐의 분비 활성을 측정하고, 3일, 7일 및 14일째 세포로부터 RNA를 추출하여 OCN, OPN, Col I 유전자의 발현정도를 RT-PCR하여 분석하였다.

6-1. 골기질의 분비 측정

48-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2를 1×10^4 세포수/웰 농도로 분주하여 배양한 후 각 웰에 AM을 농도별로 처리하고 72 시간 배양하였다.

Sircol 콜라겐 어세이 (Sircol collagen assay kit, Biocolor Ltd., Belfast, N. Ireland)법을 이용하여 콜라겐 분비 정도를 측정하였다. 피크린산 (picric acid)에 녹은 Sirius Red를 함유한 염색약 $0.5\ \text{ml}$ 을 배양액 $100\ \mu\text{l}$ 와 섞은 후 30분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후 생성된 복합체 (collagen-dye complex)을 $12,000\ \text{rpm}$ 에서 10분간 원심분리하여, Alkari sircol 용액으로 용해한 후 $540\ \text{nm}$ 에서 흡광도를 측정하였고, 표준값 (standard curve)을 정량한 후 시료의 콜라겐 양을 정량하였고, 퍼센트로 환산하여 표시하였다.

실험결과 하기 도 9a에 나타난 바와 같이, 7일째 I형 콜라겐의 분비는 거의 증가하지 않았으나, 14일째에는 I형 콜라겐의 분비가 증가하였고, 도 9b에 나타난 바와 같이 AM 처리 후 14일째 측정 결과, AM 농도 의존적으로 유의하게 분비가 증가하였다.

6-2. 골기질 유전자의 발현 측정

참고예 2의 RT-PCR 방법을 이용하여 OCN, OPN 및 Col I 유전자의 발현정도를 알아보았다. 도 10a에 나타난 바와 같이, 각 유전자의 발현은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 AM 처리 시 3일에서 7일까지는 영향을 받지 않았으나, 14일에는 현저한 증가를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, AM (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 양성대조군인 VEGF (25 ng/ml) 처리 후 14일간 배양 시 OCN, OPN 및 Col I 유전자의 발현이 증가하였으므로 (도 10b 참조), 상기 결과로부터 AM이 골세포의 성장 및 분화를 촉진함을 알 수 있었다.

실험예 7. 칼슘의 침착 촉진 활성 측정

칼슘의 침착 정도는 골석화 (osteocalcification) 및 무기질 침착 (mineralization)를 확인하는 척도로 침착 정도가 증가하면 조골세포의 분화 및 골형성이 활발함을 알려준다. 본 발명의 AM의 투여가 칼슘의 침착을 활성화하는지 여부를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 하였다.

24-웰 플레이트에 조골세포-유사 (osteoblast-like) 세포주인 Saos-2 세포를 1×10^4 세포수/웰의 농도로 분주하고 1 % 우태아혈청 (FBS, Gibco BRL, USA)와 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin, Gibco BRL, USA), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아스코르빈산 (ascorbic acid, Sigma, USA) 10 mM β -글리세롤포스페이트 (β -glycerolphosphate, Sigma, USA)가 첨가된 배지 조건으로 배양한 후, 각 웰에 AM을 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하여 약 14일간 배양하였으며, 3일 간격으로 배양액을 교환해 주었다. 배양 후 메탄올로 세포를 고정시키고, 0.4 % 알리자린 레드 S (Alizarin Red S, Sigma, USA) 시약으로 염색하여 칼슘의 침착 정도를 확인하였으며, 현미경 (Axiovert 200, ZEISS, Germany)으로 관찰 후 사진촬영 (200x)하였다.

실험 결과, 세포 내 칼슘 침착은 AM 처리 14일 후부터 현저히 관찰할 수 있었으며 (도 11a 내지 11c 참조; a: 음성대조군, b: AM 처리군, c: VEGF 처리군), AM 농도 의존적으로 세포 내 칼슘 침착이 증가함을 정량적으로 측정하여 확인할 수 있었다 (도 11d 참조).

실험예 8. 골절동물모델의 조직학적 형태관찰

면역조직화학적 염색을 위해 참고예 3에서 수득한 랫트의 대퇴골 (femur) 조직 샘플을 10 % 포르말린 고정액으로 고정하고 파라핀으로 포매 후, 5 μm 두께로 절단하여 리신이 코팅된 슬라이드 (poly-L-lysine-coated glass slide)에 접착시켰다. 이후 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 헤마톡실린 및 에오신 (Hematoxylin & Eosin)으로 염색하였다.

실험결과 정상 대퇴골에 비하여 AM을 1주, 2주간 경구 투여한 랫트의 대퇴골에서 골절회복에 따른 세포증식 등이 관찰되었다 (도 12 참조).

실험예 9. 골절동물모델의 면역조직화학적염색 (Immunohistochemical staining).

골절동물모델의 대퇴골 부위 골절 회복에 있어 세포증식항원 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 발현을 알아보기 위하여 면역조직화학적염색을 실시하였다. 상기 실험예 8의 파라핀 블록을 5 μm 두께로 절단한 조직절편을 리신이 코팅된 슬라이드 (poly-L-lysine-coated glass slide)에 접착시킨 후 PCNA 항체 (antibody for proliferating cell nuclear antigen, Pharmingen, USA)를 이용하여 면역조직화학적염색을 실시하였다.

면역조직화학적염색은 우선 조직 절편의 파라핀을 제거하고 여러 농도의 에탄올로 수화시킨 다음, 3 % 과산화수소수 (H_2O_2)로 10분간 반응시켜 내인성 퍼옥시다제 활성 (endogenous peroxidase activity)를 저해시킨 후 단백질분해효소 K (proteinase K, Zymed Laboratories Inc., san francisco, CA)를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 처리하였다. 트리스완충액 (TBS; Tris-buffered saline, pH7.4)으로 세척하고 protein block serum-free solution (DakoCytomation, Denmark)으로 20분간 반응시킨 다음, 희석제 (antibody diuent, Dakocytomation, Denmark)를 사용하여 1:1000 비율로 희석한 세포증식항원에 대한 단클론항체 PC10 (PCNA monoclonal antibody, BD pharmingen, San Diego, CA)을 최종농도 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되도록 사용하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 (overnight) 반응시켰다. 그 후 조직 슬라이드를 Dakocytomation LSAB system을 사용하여 스트렙타비딘-비오틴-퍼옥시다제 복합체 (streptavidin-biotin-peroxidase complex)를 만들고 디아미노벤지딘 (DAB; diaminobenzidine, Dakocytomation, Denmark) 용액으로 발색한 후 헤마톡실린으로 대조염색 (counterstaining)하였다.

상기 실험 수행 후, 한 절편 내에서 염증반응 부위 (inflammatory reaction area), 막내 골형성 부위 (intramembraneous ossification area), 연골형성 부위 (chondrogenesis area), 연골내 골형성 부위 (endochondral ossification area)로 각각 나누어 PCNA 양성세포 및 음성세포를 각각 세어 증식 정도를 %로 하기 표 2에 나타내었다. 또한, 이들 각각의 조직형태 및 세포증식을 사진촬영 하여 하기 도 13 내지 도 16에 나타내었다. 1주간 AM을 투여한 군에서는 음성대조군에 비하여 염증반응 부위 (inflammatory reaction area), 막내 골형성 부위 (intramembraneous ossification area)에서의 세포증식이 각각 3배, 4배씩 증가하였고, 2주간 AM을 투여한 군에서는 음성대조군에 비하여 연골형성 부위 (chondrogenesis area), 연골내 골형성 부위 (endochondral ossification area)의 세포증식이 각각 3.8배, 3.6배씩 증가하였다.

[표 2]

	염증반응부위 (%)	막내 골형성 부위 (%)	연골 형성 부위 (%)	연골내 골형성 부위 (%)
1주 - 대조군	13.4	16.5	13.9	9.9
1주 - AM 투여군	36.5	64.3	24.9	14.3
2주 - 대조군	15.3	19.3	17.6	15.8
2주 - AM 투여군	18.5	25.7	66.9	57.6

실험예 10. 골절동물모델에서 골재생 관련 유전자의 발현 분석.

골재생과 관련된 골기질 유전자인 OCN, OPN 및 Col I의 발현 정도를 RT-PCR 방법을 이용, 분석하여 AM의 골절 치유능을 알아보았다.

트리졸 시약 (TRIzol reagent, Invitrogen Corporation, CA, USA)을 사용하여 상기 참고예 3의 랫트 대퇴골 (femur)의 RNA를 준비하였다. 역전사반응은 키트 (Reverse transcription system, Promega, madison, USA)를 이용하였으며, RNA 10 μ g, 역전사효소 (AMV Reverse transcriptase) 12 unit, RNase 저해효소 (RNasin RNase inhibitor) 20 unit, 프라이머 (oligo(dT)₁₂ primer) 0.25 μ g, 0.7 mM dNTPs, 5 mM 염화마그네슘 (MgCl₂), 완충액 (Reverse transcription 1X buffer)의 조성으로 42 °C에서 60분간 수행하였다. 수득한 각각의 cDNA는 DNA 중합효소 (Taq DNA polymerase, Promega, madison, USA) 1.25 unit, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.8 pM 프라이머, 1X 완충액 (PCR buffer)의 조성으로 중합효소연쇄반응 (PCR; polymerase chain reaction)을 실시하였다. PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 3 및 서열번호 11 내지 18에 나타내었으며, PCR 주기의 횟수와 프라이머의 결합온도 (AT; annealing temperature) 및 PCR 산물의 크기는 하기 표 4에 나타내었다. PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2 % 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하고 EtBr (ethidium bromide)로 염색하여 특정 밴드 (band)를 확인하였으며, 지표 유전자로는 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 사용하였다.

상기 실험결과, 7일 및 14일간 AM을 투여한 실험군의 OCN, OPN, Col I 유전자 발현은 음성대조군 대비하여 증가하였고, 14일간 AM을 투여한 실험군이 7일간 AM을 투여한 실험군에 비하여 유전자 발현 증가가 탁월하게 나타났다 (도 17 참조; a: 7일, b: 14일).

[표 3]

유전자	프라이머의 서열
GAPDH	정방향 5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTGG-3'
	역방향 5'-CATGAGGTCCACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'
OCN	정방향 5'-GAGGACCCTCTCTCTGCTCACTCTGCTGGC-3'
	역방향 5'-GTGGTGCCATAGATGCGCTTGTAGGCGTCC-3'
OPN	정방향 5'-CTCGGATGAATCTGACGAATCTCACCATTG-3'
	역방향 5'-CTTACTCTTAGGGCTAGGACTAGCTTGTGTC-3'
Col I	정방향 5'-TGGTCTTGGAGGAAACCTTTGC-3'
	역방향 5'-AGTATCTCCTTTGGCACCATC-3'

[표 4]

유전자	Cycle	AT (°C)	Size (bp)
GAPDH	30	65	579
OCN	30	62	360
OPN	30	58	506
Col I	40	58	379

실험예 11. 랫트에 대한 경구투여 반복투여 독성실험

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

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

그 결과, 시험물질을 투여한 모든 동물에서 특기할 만한 임상증상이나 폐사된 동물은 없었으며, 체중변화, 혈액검사, 혈액 생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명에 따른 AM은 모든 랫트에서 2000 mg/kg 까지 독성변화를 나타내지 않으며 경구 투여 최소 치사량 (LD₅₀)은 2000 mg/kg 이상인 안전한 물질로 판단되었다.

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

제제예 1. 산제의 제조

AM 20 mg

유당 100 mg

탈크 10 mg

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

제제예 2. 정제의 제조

AM 10 mg

옥수수전분 100 mg

유당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

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

제제예 3. 캡셀제의 제조

AM 10 mg

결정성 셀룰로오스 3 mg

락토오스 14.8 mg

마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

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

제제예 4. 주사제의 제조

AM 10 mg

만니톨 180 mg

주사용 멸균 증류수 2974 mg

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

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

제제예 5. 액제의 제조

AM 20 mg

이성화당 10 g

만니톨 5 g

정제수 적량

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

제제예 6. 건강 식품의 제조

AM 1000 mg

비타민 혼합물 적량

비타민 A 아세테이트 70 μg

비타민 E 1.0 mg

비타민 B1 0.13 mg

비타민 B2 0.15 mg

비타민 B6 0.5 mg

비타민 B12 0.2 μg

비타민 C 10 mg

비오틴 10 μ g

니코틴산아미드 1.7 mg

엽산 50 μ g

판토텐산 칼슘 0.5 mg

무기질 혼합물 적량

황산제1철 1.75 mg

산화아연 0.82 mg

탄산마그네슘 25.3 mg

제1인산칼륨 15 mg

제2인산칼슘 55 mg

구연산칼륨 90 mg

탄산칼슘 100 mg

염화마그네슘 24.8 mg

상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

제제예 7. 건강 음료의 제조

AM 1000 mg

구연산 1000 mg

올리고당 100 g

매실농축액 2 g

타우린 1 g

정제수를 가하여 전체 900 ml

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

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

발명의 효과

본 발명에 따른 황기 (*Astragalus membranaceus* BGE.) 추출물은 혈관세포 증식, 이동, 분화 및 성장인자의 분비 촉진에 의한 혈관형성 촉진 활성을 나타내며, 조골세포의 증식 및 분화 촉진, 알칼리 포스파타제 (ALP) 활성 촉진, 혈관내피세포 성장인자 (VEGF) 분비 촉진, 오스테오칼신 (OCN), 오스테오폰틴 (OPN) 및 I형 콜라겐 (Col I ; type I Collagen)의 골기질 분비 및 유전자 발현 촉진, 골식화 (osteocalcification) 및 무기질 침착 (mineralization) 촉진에 의한 조골세포 증식 효과, 골절 부위의 조골세포 증식 및 골재생 관련 유전자의 발현 증가에 의한 골유합 활성을 가지므로, 골절의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 황기 추출물의 농도별 처리에 의한 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)의 증식 정도를 나타낸 그래프이고,

도 2는 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)의 황기 추출물 처리군 및 대조군의 이동정도를 나타내는 사진 (a) 및 이동한 세포의 개수를 비교한 그래프 (b)이고,

도 3은 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)의 황기 추출물 처리군 및 대조군의 분화정도를 나타내는 사진 (a) 및 분화되어 형성된 혈관의 개수를 비교한 그래프 (b)이며,

도 4는 사람 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)에 황기 추출물의 농도별 처리에 따른 섬유아세포성장인자 (bFGF; basic fibroblast growth factor)의 발현 증가를 나타낸 그래프이고,

도 5는 마트리젤 플러그 절편을 헤마톡실린-에오신 (Hematoxylin-Eosin)으로 염색하여 황기 추출물의 생체 내 혈관형성 촉진활성을 확인한 사진(a) 및 황기추출물 처리군과 대조군의 헤모글로빈의 농도를 비교한 그래프(b)이며,

도 6은 황기 추출물의 농도별 처리시 조골세포 (Saos-2)의 생존 정도 및 알칼리 포스파타아제 (ALP) 활성 정도를 나타낸 그래프이고,

도 7은 황기 추출물의 농도별 처리시 조골세포 (Saos-2)에서 혈관생성촉진인자 (VEGF)의 분비 활성을 나타낸 그래프이며,

도 8은 조골세포 (Saos-2)에서 혈관성장인자 (VEGF)의 유전자 발현 정도를 황기 추출물의 처리 시간별 (a), 처리 농도별 (b)로 나타낸 도이고,

도 9는 조골세포 (Saos-2)에서 I 형 콜라겐 분비 정도를 황기 추출물의 처리 시간별 (a), 처리농도별 (b)로 나타낸 도이고,

도 10은 조골세포 (Saos-2)에서 골기질 관련 유전자인 오스테오칼신 (OCN), 오스테오폰틴 (OPN), I 형 콜라겐 (Col I)의 발현 정도를 황기 추출물의 처리 시간별 (a), 처리농도별 (b)로 나타낸 도이고,

도 11은 조골세포 (Saos-2)에서 칼슘의 침착 정도를 알리자린 레드 S (Alizarin Red S) 용액으로 염색한 도 (a:음성대조군, b: 황기추출물 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군, C: VEGF 50 ng/ml 처리군) 및 황기 추출물의 농도별 처리시 무기질 침착 정도를 나타낸 그래프(d)이며,

도 12는 골절동물모델의 정상 대퇴골 (a), 황기 추출물 0일 투여한 골절 대퇴골 (b), 황기 추출물 7일 투여한 골절 대퇴골 (c), 황기 추출물 14일 투여한 골절 대퇴골 (d)의 조직 절편을 헤마톡실린-에오신으로 염색한 도이고,

도 13은 골절동물모델의 골절 대퇴골 조직의 염증반응 부위 (inflammatory reaction area)를 염색하여 나타낸 도로서, 황기 추출물의 7일 투여군 (a,c) 및 14일 투여군 (b,d)을 헤마톡실린-에오신 염색 (a,b) 및 면역염색 (c,d)한 도이며,

도 14는 골절동물모델의 골절 대퇴골 조직의 막내 골형성 부위 (intramembraneous ossification area)를 염색하여 나타낸 도로서, 황기 추출물의 7일 투여군 (a,c) 및 14일 투여군 (b,d)을 헤마톡실린-에오신 염색 (a,b) 및 면역염색 (c,d)한 도이고,

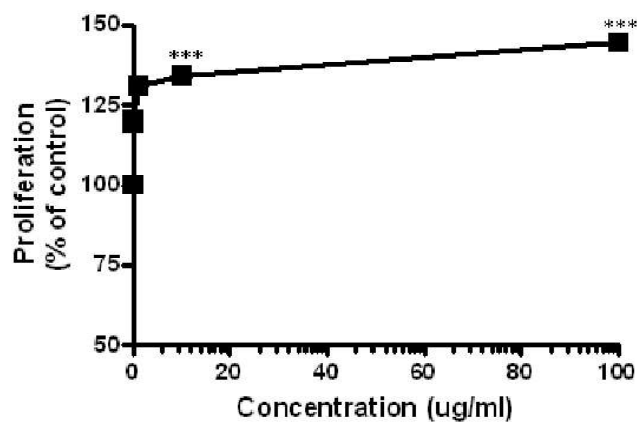
도 15는 골절동물모델의 골절 대퇴골 조직의 연골형성 부위 (chondrogenesis area)를 염색하여 나타낸 도로서, 황기 추출물의 7일 투여군 (a,c) 및 14일 투여군 (b,d)을 헤마톡실린-에오신 염색 (a,b) 및 면역염색 (c,d)한 도이며,

도 16은 골절동물모델의 골절 대퇴골 조직의 연골내 골형성 부위 (endochondral ossification area)를 염색하여 나타낸 도로서, 황기 추출물의 7일 투여군 (a,c) 및 14일 투여군 (b,d)을 헤마톡실린-에오신 염색 (a,b) 및 면역염색 (c,d)한 도이고,

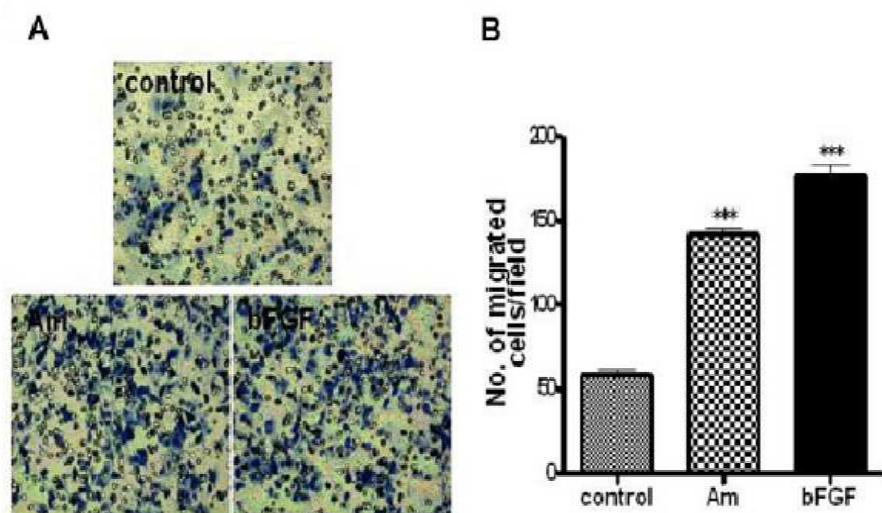
도 17은 골절동물모델 대퇴골에서 골재생 촉진 관련 유전자들의 발현 정도를 나타내는 도이다.

도면

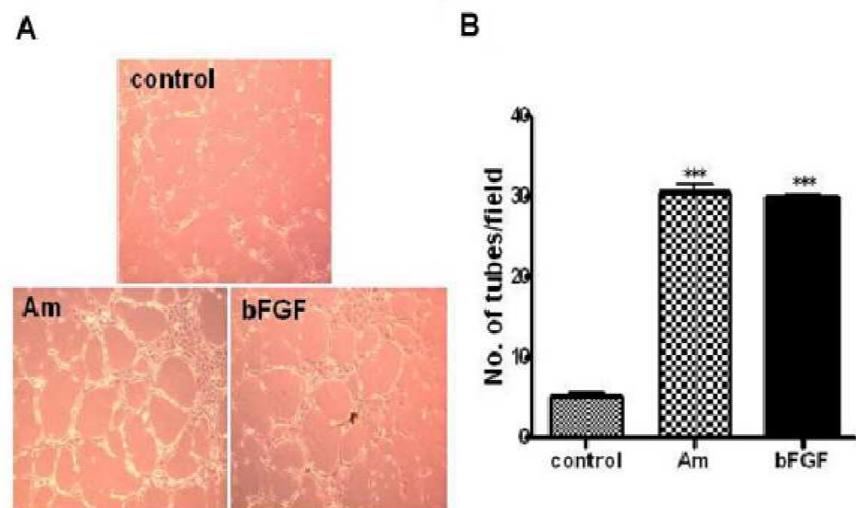
도면1



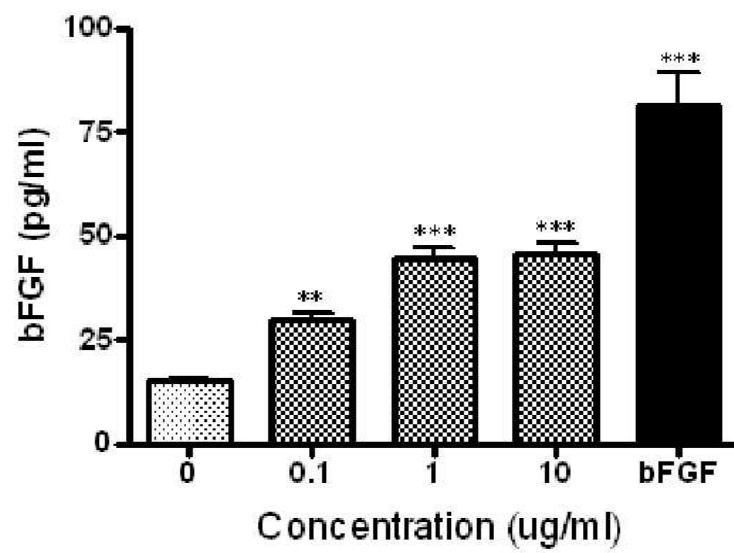
도면2



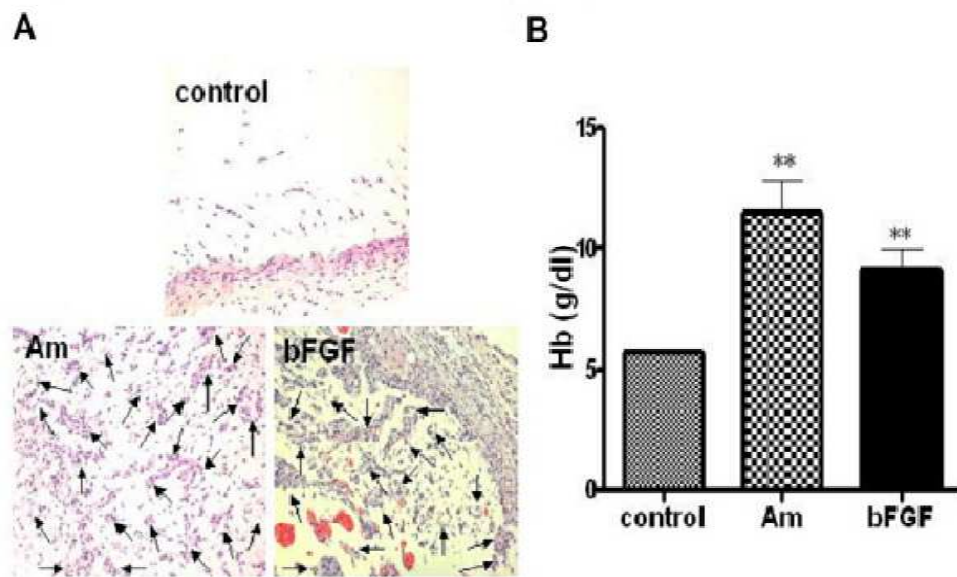
도면3



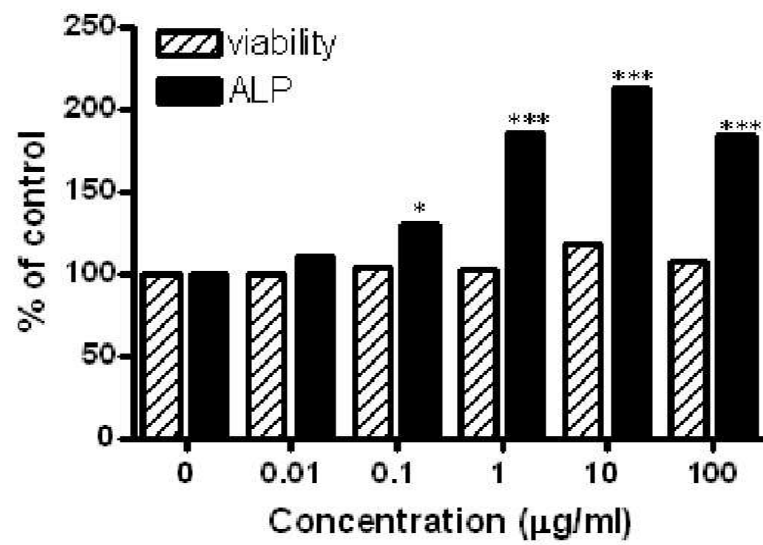
도면4



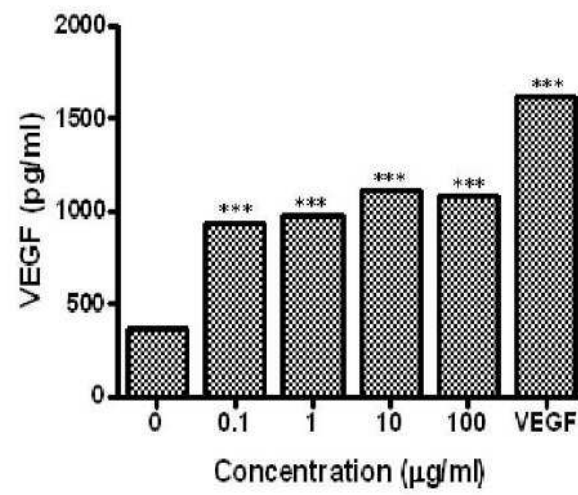
도면5



도면6

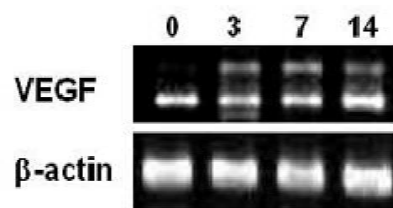


도면7

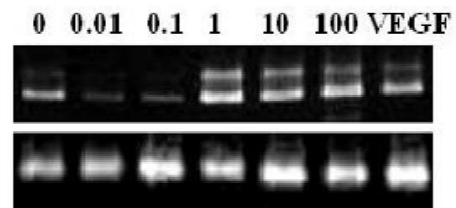


도면8

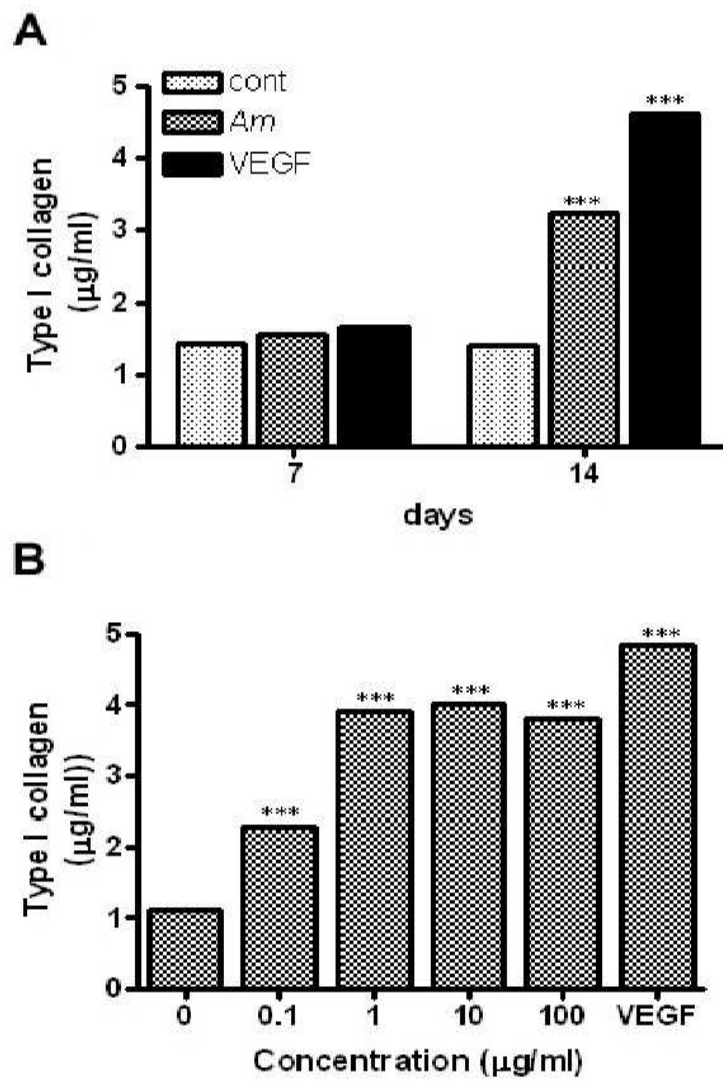
A



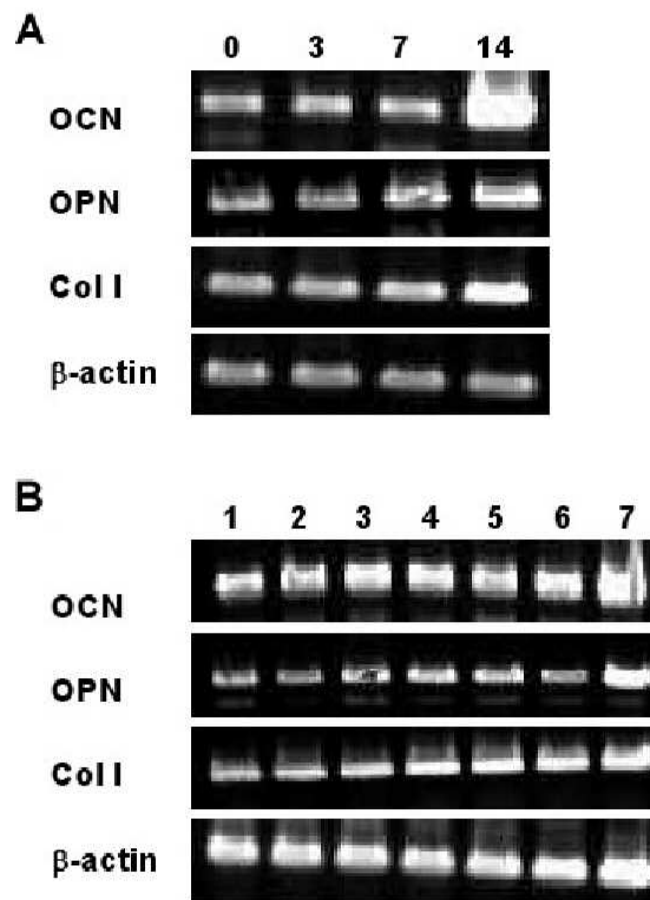
B



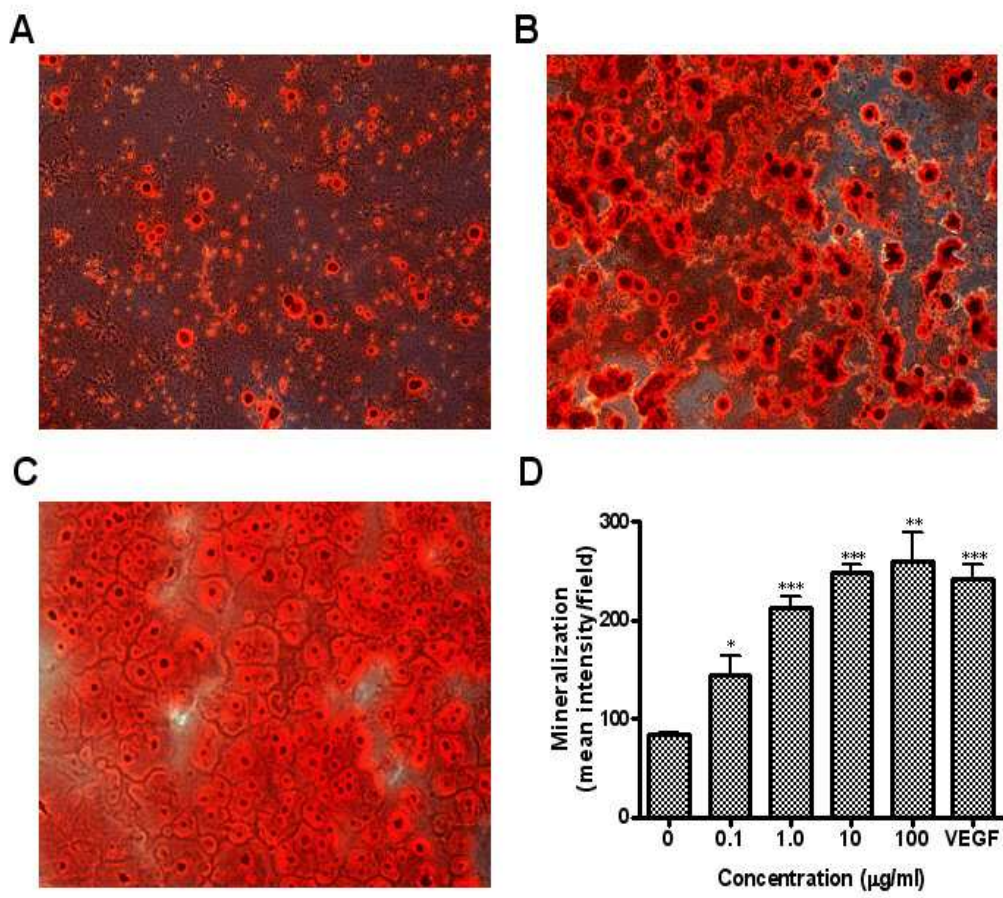
도면9



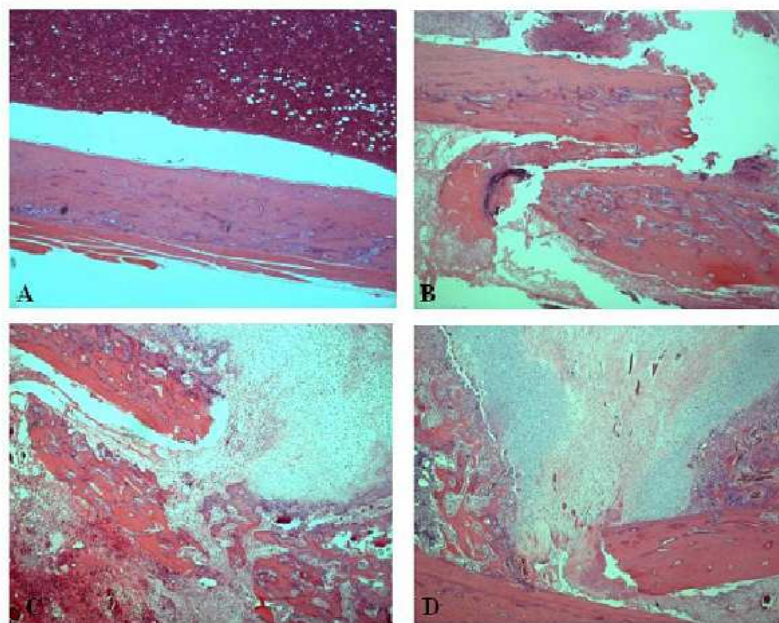
도면10



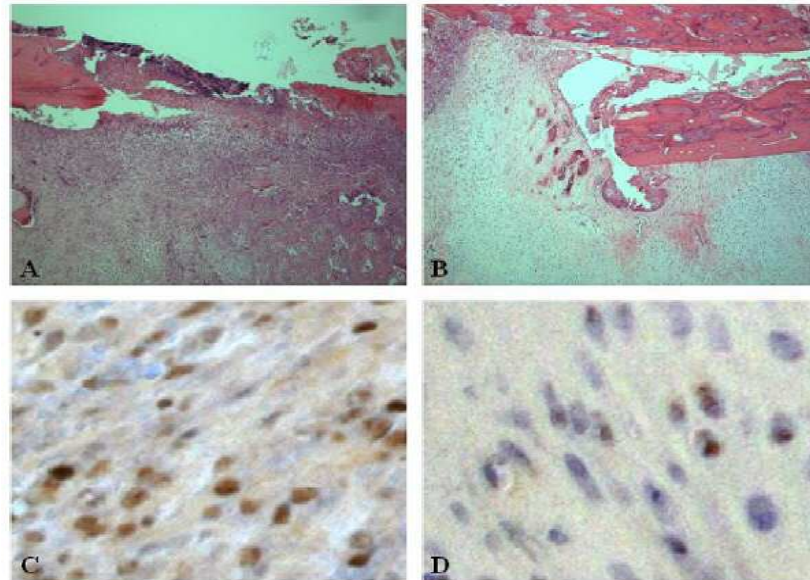
도면11



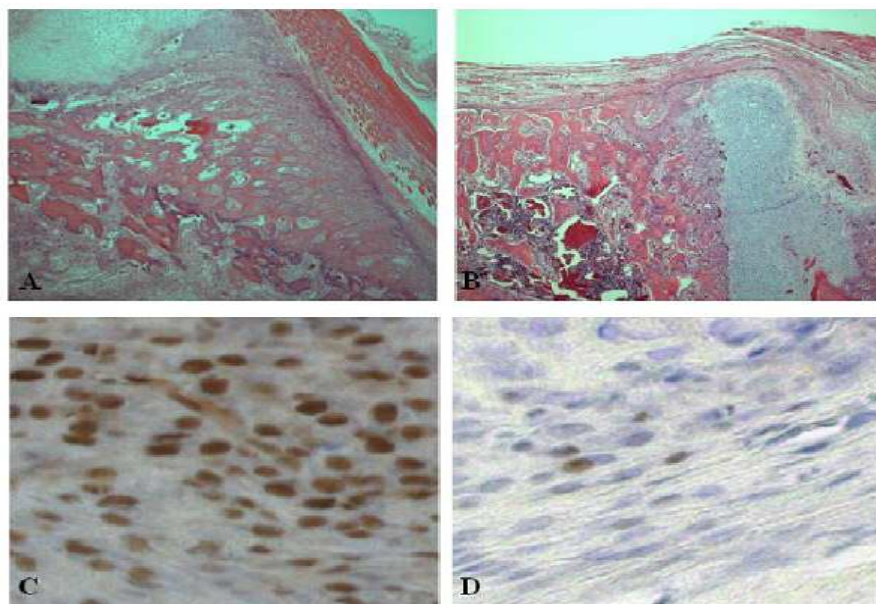
도면12



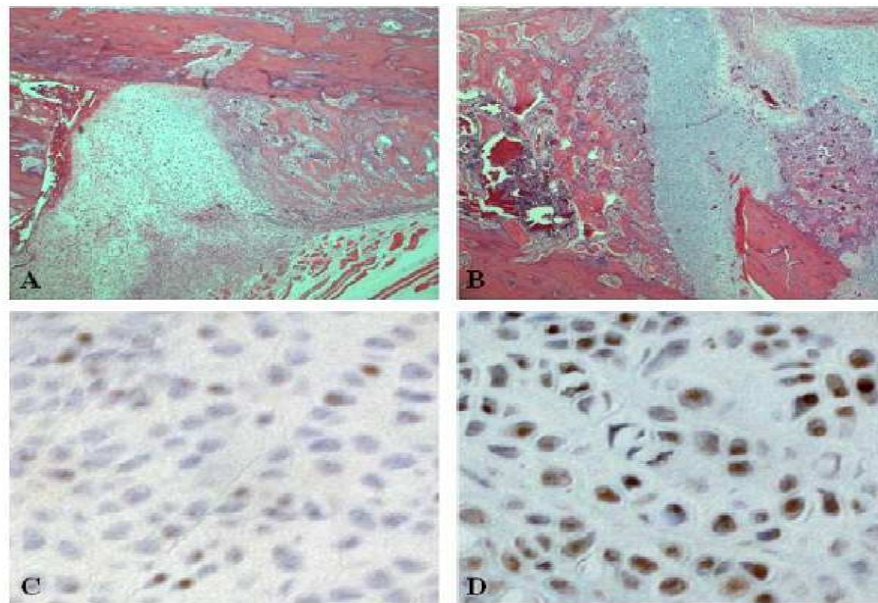
도면13



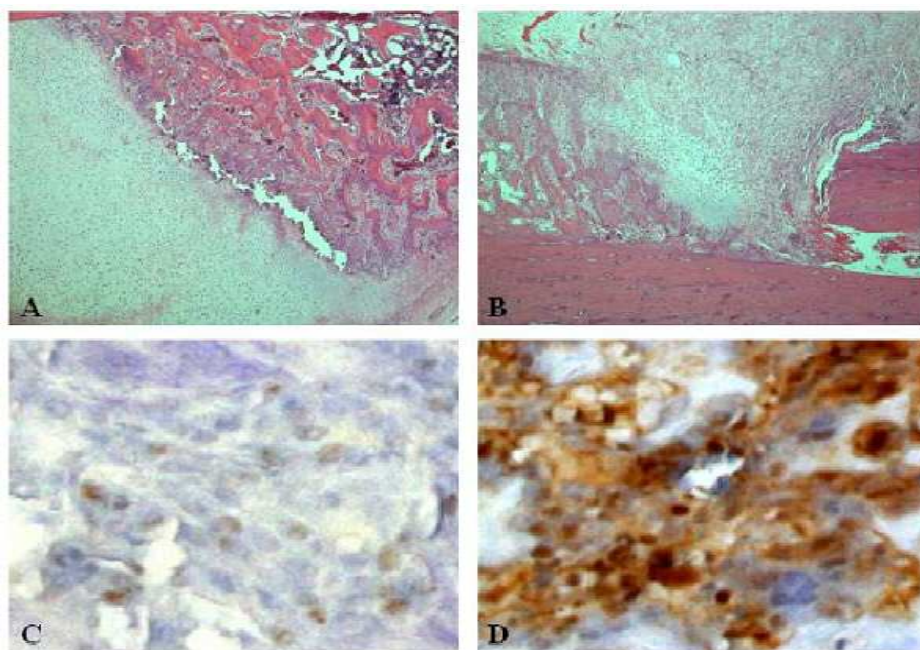
도면14



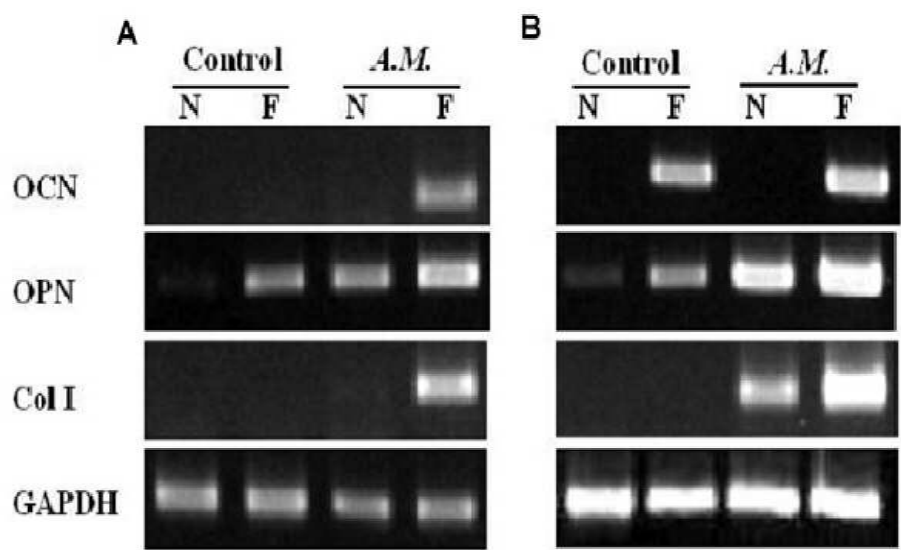
도면15



도면16



도면17



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Kyunghee University

<120> Composition comprising the extract of Astragalus membranaceus BGE. showing angiogenesis promoting activity and bone healing activity for preventing and treating fracture

<130> DIF/2006-01-0010/SY

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VEGF forward primer

<400> 1

ctgtgcaggc tgctgtaacg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VEGF reverse primer

<400> 2
gttcccga aa ccctgaggag 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN forward primer

<400> 3
cagccatgaa ttacacagcc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN reverse primer

<400> 4
gggagtttcc atgaagccac 20

<210> 5
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN forward primer

<400> 5
catgagagcc ctaca 16

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN reverse primer

<400> 6
agagcgacac cctagac 17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Col I forward primer

<400> 7
tgacctcaag atgtgccact 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Col I reverse primer

<400> 8
gggagtttcc atgaagccac 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin forward primer

<400> 9
ccatcatgaa gtgtgacgtg 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> beta-actin reverse primer

<400> 10
acatctgctg gaaggtggac 20

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDH forward primer

<400> 11
cctggccaag gtcattccatg acaactttgg 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GAPDH reverse primer

<400> 12
catgaggtcc accaccctgt tgctgtagcc 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN forward primer 2

<400> 13
gaggaccctc tctctgctca ctctgctggc 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OCN reverse primer 2

<400> 14
gtggtgccat agatgcgctt gtaggcgtcc 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN forward primer 2

<400> 15
ctcggatgaa tctgacgaat ctcaccattc 30

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OPN reverse primer 2

<400> 16
cttactctta gggctctagga ctagcttgtc 30

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Col I forward primer 2

<400> 17
tggtcttgga ggaaactttg c 21

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Col I reverse primer 2

<400> 18

agtatctcct ttggcaccat c

21