(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월07일
(11) 등록번호 10-2672417
(24) 등록일자 2024년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/40 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/40 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0180599
(22) 출원일자 2021년12월16일
심사청구일자 2021년12월16일
(65) 공개번호 10-2023-0091468
(43) 공개일자 2023년06월23일
(56) 선행기술조사문헌
JP2003171303 A
KR101502465 B1

(73) 특허권자
가톨릭관동대학교산학협력단
강원도 강릉시 범일로579번길 24(내곡동, 가톨릭관동대학교)
(72) 발명자
임소연
인천광역시 서구 보석로 31, 파크자이더테라스 103동 406호
이세형
인천광역시 서구 청라한울로 17, 한라비발디 384동 2403호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

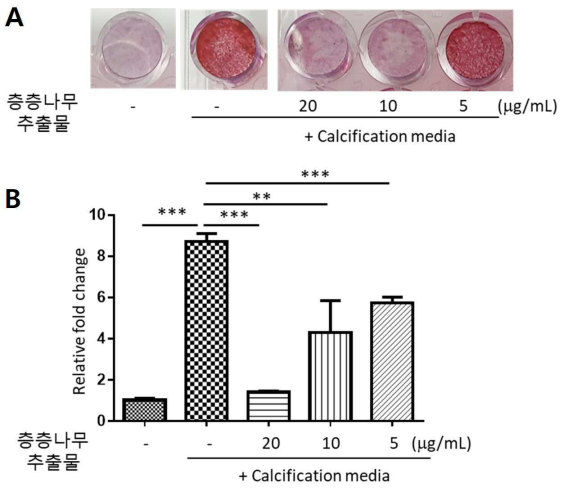
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **층층나무 추출물을 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로 상기 층층나무 추출물은 세포 독성은 없으면서 혈관세포에 칼슘이 쌓이는 것을 억제하는 효과가 있으므로 상기 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 13/12 (2018.01)
A61P 19/10 (2018.01)
A61P 3/06 (2018.01)
A61P 7/02 (2018.01)
A61P 9/12 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)

(72) 발명자
김상우
인천광역시 중구 하늘별빛로 112, 화성파크드림 893동 2101호(중산동)
최정원
인천광역시 중구 하늘별빛로 112, 화성파크드림 893동 2101호(중산동)
김일권
서울특별시 서대문구 수색로 100, DMC래미안e편한세상 206동 501호
송병욱
서울특별시 강서구 양천로69길 65, 강변성원아파트 102동 705호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465027707
과제번호	HI18C0661010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	첨단의료기술개발(R&D)
연구과제명	생체 내 분화제어용 복합강화 줄기세포 지지체를 이용한 연골재생기술 개발
기 여 율	20/100
과제수행기관명	가톨릭관동대학교 산학협력단(분사무소)
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345332787
과제번호	NRF-2021R1I1A2052006
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	보호연구지원사업
연구과제명	혈관석회화와 골다공증의 동시발생에 있어서 세포외 소포체의 작용기전 연구
기 여 율	80/100
과제수행기관명	가톨릭관동대학교 산학협력단(분사무소)
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄소수 1 내지 3의 알코올을 용매로 하여 추출된 층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 층층나무 추출물은 메탄올 추출물인, 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 층층나무 추출물은 층층나무 줄기 추출물인, 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 파골세포 분화 억제 활성을 추가로 갖는 것인, 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 혈관 석회화는 골다공증, 고지혈증, 노화, 신장 질환, 고혈압, 심혈관계 질환 또는 혈전에 의해 유발된 것인, 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 층층나무 추출물은 메탄올 추출물인, 혈관 석회화의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 층층나무 추출물을 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 혈관 석회화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 혈관은 체액을 지속적으로 순환시키는 기관으로 산소 및 영양분 등을 조직에 공급하고, 이산화탄소나 노폐물을 조직으로부터 받아 처리하는 기능을 수행한다. 혈관 석회화(vascular calcification)는 혈관에 칼슘 및 인산 등의 무기질이 침착된 것으로 혈관의 경직도를 증가시켜 혈관 파열을 초래한다. 이러한 혈관 석회화는 동맥경화, 당뇨, 만성신부전 환자에게서 흔히 발견되며, 칼슘 축적 억제기 전의 소실, 골 형성 유도, 혈액 내 핵화 복합체, 및 세포사멸 등을 혈관 석회화의 주된 원인으로 보고 있으나, 그 정확한 기전은 아직까지 밝혀져 있지 않다.

[0004] 특히, 심혈관계 석회화는 고혈압, 심부전, 급성 관상동맥증후군과 판막 질환의 악화에 기여하며, 이로 인한 여

러 가지 합병증(심장 돌연사, 심근 경색, 협심증 및 허혈성 심부전 등)을 유발한다. 또한, 폐경기 이후의 여성에서는 골다공증 외에도 혈관 석회화가 발생한다. 그러나 혈관 석회화의 정확한 기전은 아직까지 밝혀져 있지 않아 이에 대한 예방 및 치료제도 아직 개발되어 있지 않은 실정이다. 따라서, 혈관 석회화의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 국내 등록특허 제10-2331735호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 천연물 유래의 혈관 석회화 억제 물질을 찾기 위해 연구한 결과, 층층나무 추출물이 세포 독성은 없으면서 혈관세포에 칼슘이 쌓이는 것을 억제한다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 혈관 석회화의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관 석회화를 억제시키거나 이의 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0012] 본 발명에서 "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 혈관 석회화에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0013] 층층나무(*Cornus Controversa*)는 층층나무과에 속하는 낙엽 교목으로 가지가 층층으로 달려서 수평으로 퍼진다. 열매가 이뇨작용이 있는 것으로 알려져 있으나, 혈관 석회화 억제와 관련된 효능은 알려진 바가 없다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 추출 대상을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 농축 또는 여과시킨 제제를 의미하며, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조(crude) 정제물 또는 정제물일 수 있다.

[0015] 상기 층층나무 추출물은 통상의 기술분야에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는 이에 제한되지는 않으나, 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0016] 본 발명에서, 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올, 디클로로메탄, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 메탄올일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구체예에서는, 건조된 층층나무 줄기 부위를 메탄올에 담근 뒤 소니케이션을 반복하고, 감압 건조시켜 제조된 추출물을 사용하였다 (실시예 1).

[0018] 한편, 이러한 층층나무 추출물은 조성물의 총 중량 기준으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.05 내지 20 중량%로 포함될 수 있다.

[0019] 혈관 석회화는 혈관 내에 칼슘 및 인산 등의 무기질이 침착되어 혈관의 경직도가 증가되는 것을 의미하며, 결과적으로는 혈관의 파열을 초래할 수 있다. 본 발명에서, 혈관 석회화는 관상 동맥, 대동맥 및 기타 혈관의 석회화를 포함하며 혈관벽의 내막 석회화, 중막 석회화, 심장판막 석회화 및 저항성 칼슘 형성(calciphylaxis, calcific uremic arteriolopathy)을 포함한다.

[0020] 내막 석회화는 이상지질혈증, 염증 및 내막 비후와 연관되어 죽상동맥경화증을 초래하는데, 내부 혈관벽에 불안

정하고 파열될 수 있는 플라크를 형성하여 폐쇄성 혈관질환을 유발한다. 이에 비하여, 중막 석회화(Mφnckeberg's arteriosclerosis)는 주로 당뇨병 또는 만성 콩팥병에서 흔한데 당뇨, 칼슘 대사기전 이상 또는 신장 질환 등으로 인하여 골 형성 촉진 인자들이 혈관에 발현되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 혈관내강 협착이 없이도 발생할 수 있으므로, 주로 혈관 경직화를 유발하여 심혈관 질환 합병증 발생을 높인다.

[0021] 본 발명에서, 상기 혈관 석회화는 골다공증, 고지혈증, 노화, 신장 질환, 고혈압, 심혈관계 질환 또는 혈전에 의해 유발된 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 층층나무 추출물은 혈관세포에 칼슘이 침착되는 것을 억제하며, 파골세포의 활성화 또한 억제한다. 따라서, 상기 조성물은 혈관 석회화 억제 활성뿐만 아니라 파골세포 분화 억제 활성을 추가로 추가로 나타낸다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아, 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 피부 도포, 정맥내, 피하, 복강 내 주사 또는 국소에 적용)할 수 있으나, 경구 투여하는 것이 바람직하다.

[0025] 경구 투여의 목적으로 본 발명의 유효성분을 정제, 캅셀제, 츄잉정, 분말제, 액제, 현탁제 등의 제제로 제형화하는 경우, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산이칼슘 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 붕해제, 스테아르산마그네슘과 같은 활택제, 슈크로스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 0.1 ㎎/㎏ 내지 200 ㎎/㎏, 바람직하게는 1 ㎎/㎏ 내지 50 ㎎/㎏ 용량으로 1일 1회, 또는 1일 3회로 분할하여 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[0027] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 양상은 층층나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관 석회화의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 혈관 석회화의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물은 상술한 약학 조성물에서 기술한 바 있는 층층나무 추출물을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0031] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 단독으로 사용하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 이 밖에도 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 층층나무 추출물의 혼합량은 그의 사용 목적 (예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물 전체의 중량을 기준으로 15중량% 이하, 바람직하게 0.0001 내지 10 중량%로 첨가될 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.

[0032] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상기 유효성분을 필수 성분으로서 함유하는 것 외에, 탄수화물 식품 (곡류, 서류, 두류, 설탕, 및 엿류 등), 단백질 식품 (육류, 난류, 우유류, 어패류, 대두, 및 땅콩 등), 유지식품 (식물성유지, 동물성유지, 및 마아가린 등) 등과 함께 제공될 수 있다. 또한, 필요에 따라 비타민 식품 (녹황색 채소

류, 과일류, 간, 어패류 등), 무기질 식품 (뼈째 먹는 작은 생선류, 해조류, 식염, 우유 등)을 추가로 함유할 수 있다.

[0033] 상기 외에 본 발명의 기능성 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 영양제 등의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 층층나무 추출물은 세포 독성은 없으면서 혈관세포에 칼슘이 쌓이는 것을 억제하는 효과가 있으므로 혈관 석회화의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 인간 동맥 평활근 세포를 석회화 세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포 내 칼슘을 염색한 결과(A) 및 염색 정도를 정량한 결과(B)이다.

도 2는 인간 동맥 평활근 세포를 석회화 세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포를 현미경으로 관찰한 결과(A) 및 세포 내 실제 칼슘 농도를 정량한 결과(B)이다.

도 3은 인간 동맥 평활근 세포를 석회화 세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포 증식 수준(A) 및 세포 독성 수준(B)을 확인한 결과이다.

도 4는 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 TRAP을 염색한 결과(A) 및 한 세포에 3개 이상, 또는 10개 이상의 핵을 가지는 TRAP+ 파골세포의 비율(B)을 확인한 결과이다.

도 5는 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 파골세포의 활성을 측정한 결과이다.

도 6은 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포 증식 수준을 확인한 결과이다.

도 7은 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포 독성 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1: 층층나무 추출물 제조**

[0041] 층층나무 줄기 추출물(KPM044-091)은 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB; 대한민국, 대전) 산하의 한국 식물 추출물 은행(Korea Plant Extract Bank; 대한민국, 대전)에서 수득하였다.

[0042] 상기 추출물은 다음과 같이 제조되었다. 2017년 강원도 양평군에서 채취한 층층나무 줄기(샘플 번호: KRIB 0086494)를 그늘에서 건조시킨 후, 건조된 줄기 90 g을 메틸 알코올(99.9%, HPLC 등급) 1리터에 넣고, 실온에서 울트라소니케이터 (SDN-900H, SD-ULTRASONIC CO., LTD)로 하기 단계를 30회 반복하였다: 사이클당 40KHz, 1500W, 15분. 울트라소니피케이션 120분. 이후 필터링 (Qualitative Filter No.100, HYUNDAI MICRO CO., LTD)하고 감압 건조시켜 층층나무 추출물 (8.0 g)을 수득하였다.

[0044] **실시예 2: 층층나무 추출물의 혈관 석회화 억제 효과**

[0045] **2-1. 알리자린 레드 염색 및 정량**

[0046] 동맥 경화반 내에 존재하는 석회화증을 대상으로 층층나무 추출물의 영향을 다음과 같이 확인하였다. 석회화의 증가는 심혈관 질환(cardiovascular event)의 증가와 연관이 있다.

[0047] 동맥 내 병리학적 자극에 의해 석회화 세포로 분화할 수 있는 혈관세포인 인간 동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cell)를 플레이트에 분주하고, 석회화 세포 분화배지(angiotensin II 포함)를 14일 동안 처리하였다. 층층나무 추출물은 3일마다 5, 10 또는 20 ㎍/㎖ 농도로 처리하였다.

[0048] 14일 후 칼슘을 염색할 수 있는 알리자린 레드(alizarin red)로 세포를 염색하여 석회화 정도를 확인하고, 10% 아세트산으로 염색된 알리자린 레드를 추출하여 농도를 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 그 결과, 층층나무 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 층층나무 추출물 처리군에서는 처리 농도에 의존적으로 석회화가 억제된 것을 확인할 수 있었다 (도 1; p***<0.001, p**<0.01).

[0050] **2-2. Calcium assay**

[0051] 세포 내 실제 칼슘 농도를 정량한 결과, 대조군과 비교하여 층층나무 추출물 처리군에서는 처리 농도에 의존적으로 세포 내 칼슘 농도가 감소하는 것을 알 수 있었다 (도 2; p***<0.001).

[0053] **2-3. WST assay (cell viability assay) 및 LDH assay (cell cytotoxicity assay)**

[0054] 동맥 내 병리학적 자극에 의해 석회화 세포로 분화할 수 있는 혈관세포인 인간 동맥 평활근 세포(human aortic smooth muscle cell)를 플레이트에 분주하고, 석회화 세포 분화배지(angiotensin II 포함)를 14일 동안 처리하여 석회화 세포로의 분화를 유도하였다. 층층나무 추출물은 3일마다 5, 10 또는 20 ㎍/㎖ 농도로 처리하였다.

[0055] 14일 후 세포 증식 능력을 평가하기 위해 세포 배양 배지에 EZ-Cytox Kit (두젠바이오(DoGenbio), 대한민국)의 테트라졸리움 (tetrazolium) 염을 첨가하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, 층층나무 추출물을 20 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때 세포수가 약간 감소하나, 석회화 배지에 의해 인간 동맥 평활근 세포가 분화될 때 세포수 증가가 둔화되는 현상이 있으므로 이러한 감소는 유의미한 차이가 아닌 것을 알 수 있었다 (도 3A; p***<0.001, p<0.01).

[0056] 또한, 14일 후 세포에서 방출된 젖산 탈수소효소(lactose dehydrogenase, LDH)를 Lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Detection Kit (Takara Bio Inc, 일본)로 측정한 결과 대조군과 층층나무 추출물 처리군에 차이가 거의 없는 것을 확인하였다 (도 3B).

[0058] **실시예 3: 층층나무 추출물의 파골세포 활성화 억제 효과**

[0059] **3-1. TRAP 염색**

[0060] 48-웰 플레이트에 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포를 각 웰당 $3x10^3$개씩 분주하고, 파골세포 분화 유도물질인 RANKL(receptor activator of NK-κB ligand)을 40 ng/㎖ 농도로 처리하여 분화를 유도하였다. 이후 2일마다 배지를 교체하면서 총 4일동안 배양하고, 배지를 교체할 때 층층나무 추출물을 같이 처리하였다.

[0061] 4일 후 분화된 세포를 고정액으로 상온에서 5분 동안 고정시키고 증류수로 여러 번 세척하였다. 타타르산 나트륨(sodium tartrate)과 산성 인산분해효소(acid phosphatase)의 기질 용액을 혼합하고, 상기 준비된 혼합액을 세포에 처리하여 파골세포 분화 마커인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphate)을 염색하였다. 염색은 건조 방지를 위해 플레이트의 뚜껑을 덮은 뒤 37℃에서 15분 내지 45분 동안 진행하였다. 이후 염색약을 버리고 증류수로 3번 세척하여 반응을 중단시켰으며, 현미경으로 관찰한 뒤 사진을 찍어 이미지 J 프로그램으로 염색된 세포의 수를 계산하였다.

[0062] 실험 결과, RANKL만 처리한 대조군과 비교하여 층층나무 추출물 처리군에서는 파골세포의 분화가 억제된 것을 알 수 있었다. 구체적으로 파골세포의 활성은 뼈의 기질인 칼슘-포스페이트(calcium-phosphate)를 녹이는 것으로 판명하는데, 도 4A에서 하얀 구멍들이 파골세포가 활성화되어 기질을 녹여낸 것이다. RANKL 처리에 의해 늘어난 하얀색 구멍의 수 및 평균 면적이 층층나무 추출물 처리에 의해 감소하고 작아진 것을 알 수 있다 (도 4A).

[0063] 또한, 파골세포는 다수의 핵을 가지는 것이 특징이므로 한 세포에 3개 이상(N≥3), 또는 10개 이상(N≥10)의 핵을 가지는 $TRAP^+$ 파골세포의 비율을 계산하였다. 그 결과, RANKL만 처리한 대조군과 비교하여 층층나무 추출물 처리군에서는 3개 이상(N≥3), 또는 10개 이상(N≥10)의 핵을 가지는 $TRAP^+$ 파골세포의 비율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (도 4B).

[0065] **3-2. Pit assay**

[0066] RAW264.7 세포가 RANKL 처리에 의해 파골세포로 분화되었을 때의 활성을 확인하기 위해 Bone resorption assay kit (CSR-BRA-48KIT, COSMOBIO)를 사용하였다. 구체적으로 칼슘-포스페이트 층을 함유한 뼈 모사 매트리스가 도포되어 있는 배양접시 위에 RAW264.7 세포를 분주하고, 파골세포 분화 유도물질인 RANKL을 40 ng/㎖ 농도로 처리하여 분화를 유도하였다. 이후 2일마다 배지를 교체하면서 총 4일동안 배양하고, 배지를 교체할 때 층층나무 추출물을 같이 처리하였다. 6일 후 5% 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite)을 5분 동안 처리하여 배양접시에 붙어 있는 파골세포를 제거하였다. 배양접시는 물로 추가로 세척한 후 건조시키고, 각 웰의 사진을 찍은 후 파골세포가 뼈 모사 매트리스를 분해하여 형성된 분해 면적(pit area)을 이미지 J로 측정하였다. 상기 분해 면적은 파골세포의 활성과 비례한다.

[0067] 측정 결과, RANKL만 처리한 대조군과 비교하여 층층나무 추출물 처리군은 5 및 10 ㎍/㎖ 농도로 처리했을 때 분해 면적이 감소한 것을 확인하였다 (도 5).

[0069] **3-3. WST assay (cell viability assay)**

[0070] 대식세포에 RANKL을 처리하면 파골세포로 분화 및 활성화되어 세포수가 늘지 않으며, 3개 이상의 세포가 서로 합체되는 현상이 발생한다. 따라서, 세포 미토콘드리아 활성에 근거한 WST assay를 실시하면 세포의 죽음과 관계없이 대조군과 비교하여 RANKL 처리군에서는 전체 측정값이 줄어들게 되며, 측정값의 감소를 통해 대식세포가 파골세포로 분화한 것임을 유추할 수 있다.

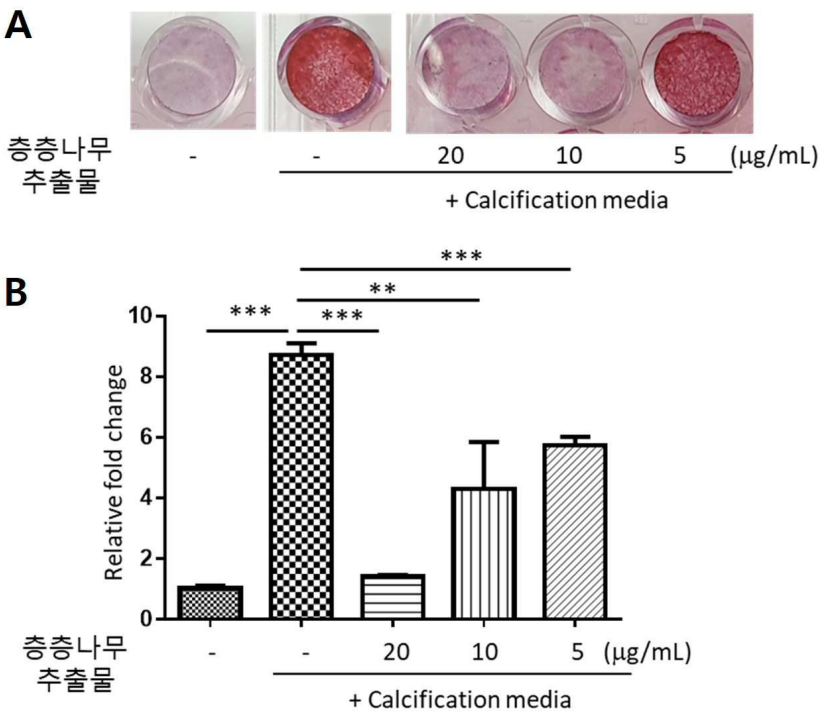
[0071] RAW264.7 세포에 RANKL과 층층나무 추출물을 같이 처리한 결과, 층층나무 추출물이 대식세포가 서로 합체되는 현상은 억제하지 못하는 것을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0073] **3-4. LDH assay (cell cytotoxicity assay)**

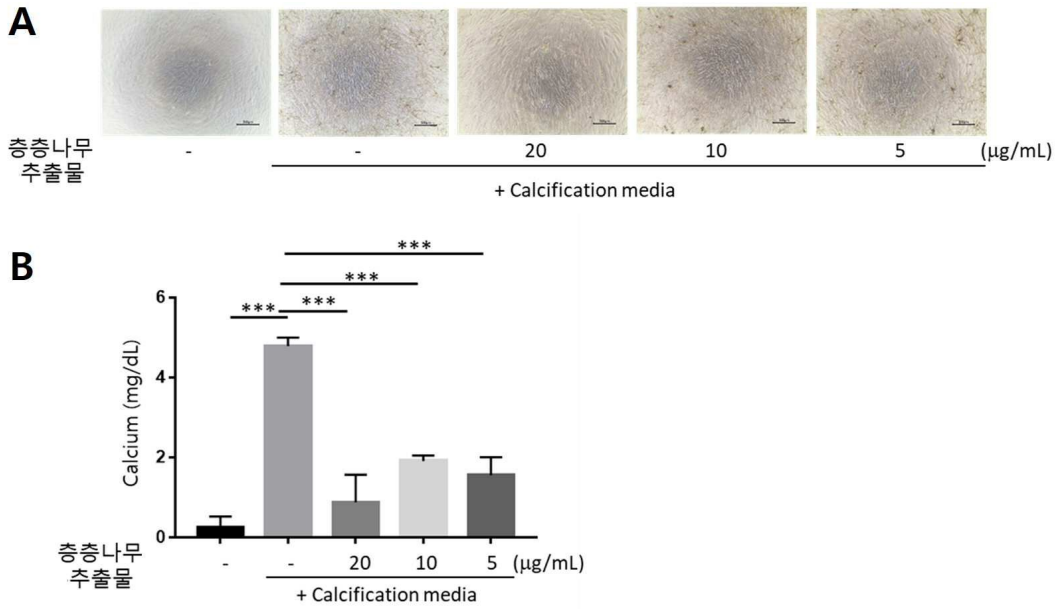
[0074] 또한, RAW264.7 세포에 RANKL과 층층나무 추출물을 같이 처리한 후 세포에서 방출된 젖산 탈수소효소(LDH)를 측정하는 LDH assay를 수행하였다. 그 결과, RANKL 및 층층나무 추출물 모두 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

도면

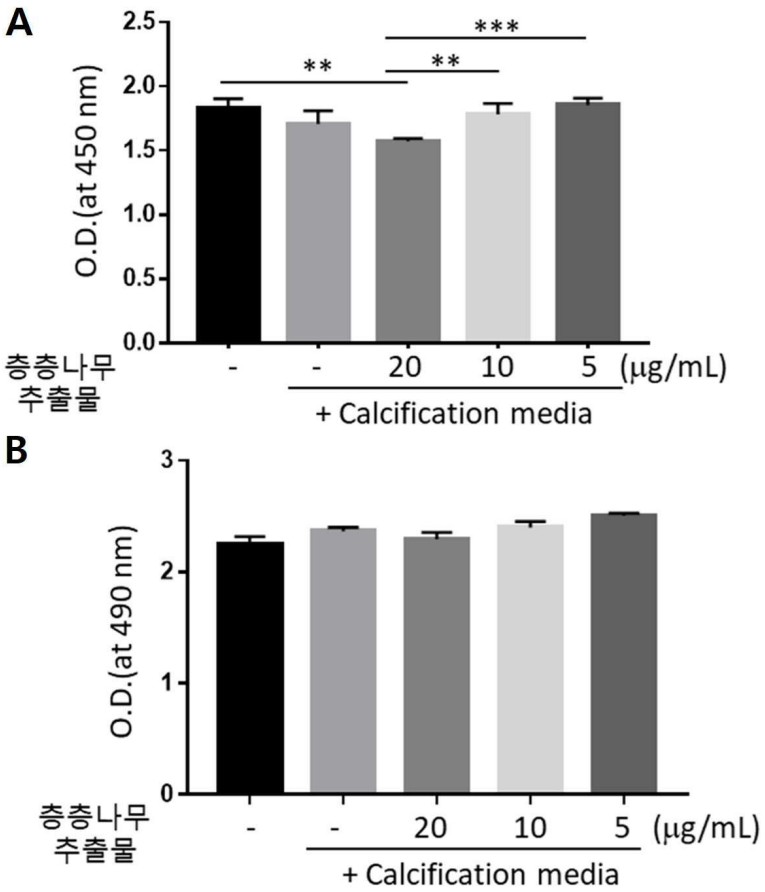
도면1



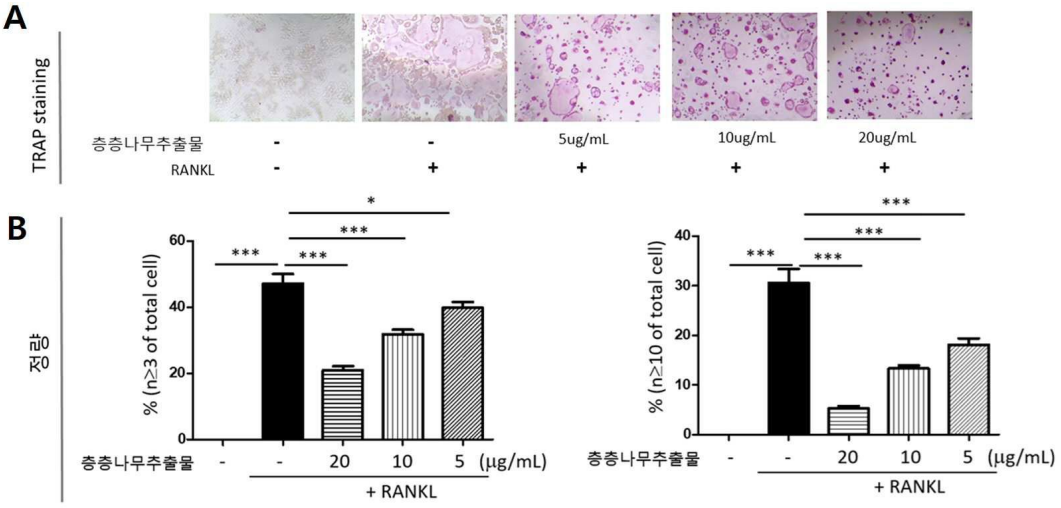
도면2


A
층층나무
추출물
-
-
20
10
5
(μg/mL)
+ Calcification media
B
Calcium (mg/dL)
0
2
4
6
***
***
***
***
층층나무
추출물
-
-
20
10
5
(μg/mL)
+ Calcification media

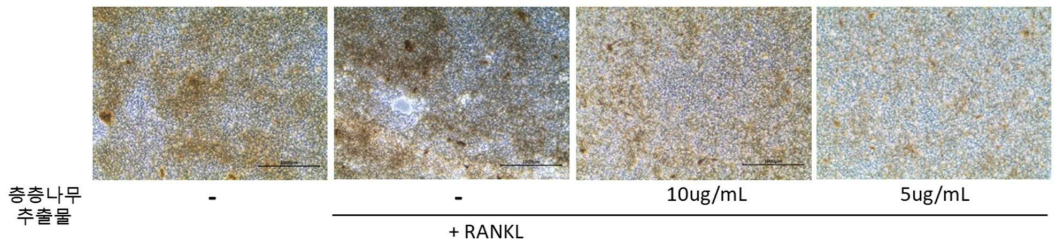
도면3


A
O.D.(at 450 nm)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
**
**
***
층층나무
추출물
-
-
20
10
5
(μg/mL)
+ Calcification media
B
O.D.(at 490 nm)
0
1
2
3
층층나무
추출물
-
-
20
10
5
(μg/mL)
+ Calcification media

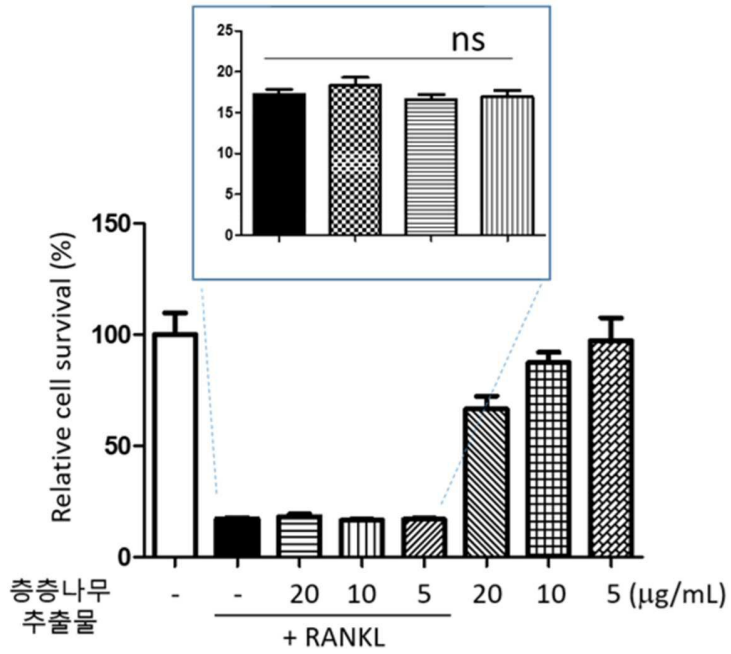
도면4


A
TRAP staining
층층나무추출물 - - 5ug/mL 10ug/mL 20ug/mL
RANKL - + + + +
B
정량
% (n≥3 of total cell)
% (n≥10 of total cell)
층층나무추출물 - - 20 10 5 (μg/mL)
+ RANKL

도면5


층층나무
추출물
- - 10ug/mL 5ug/mL
+ RANKL

도면6


ns
Relative cell survival (%)
층층나무
추출물
- - 20 10 5 20 10 5 (μg/mL)
+ RANKL

도면7

