(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년01월14일
(11) 등록번호 10-2911925
(24) 등록일자 2026년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/04 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/04 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0008879
(22) 출원일자 2023년01월20일
심사청구일자 2023년01월20일
(65) 공개번호 10-2024-0116635
(43) 공개일자 2024년07월30일
(56) 선행기술조사문헌
JP2012201681 A

(73) 특허권자
가톨릭관동대학교산학협력단
강원특별자치도 강릉시 범일로579번길 24(내곡동, 가톨릭관동대학교)
(72) 발명자
임소연
인천광역시 서구 보석로 31, 103동 406호(청라동, 청라파크자이더테라스1단지)
이세형
인천광역시 서구 청라한울로 17, 384동 2403호(청라동, 청라 한라비발디)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

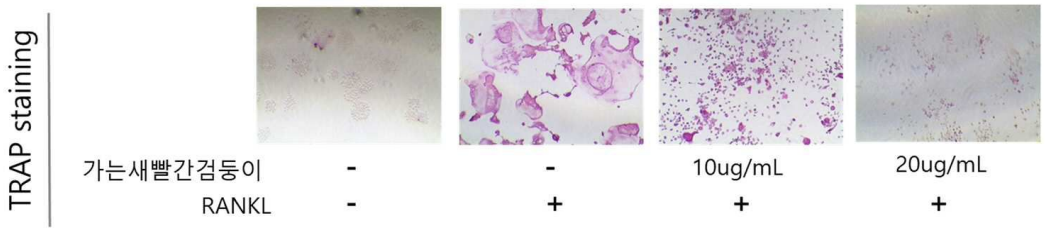
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **가는새빨간검둥이 추출물을 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 대식세포의 파골세포로의 분화를 억제하고, 파골세포의 활성을 저해하는 효과가 있으므로 상기 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 19/08 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)
(72) 발명자
김상우
인천광역시 중구 하늘별빛로 112, 893동 2101호(중산동, 화성파크드림)
최정원
인천광역시 중구 하늘별빛로 112, 893동 2101호(중산동, 화성파크드림)
김일권
서울특별시 서대문구 수색로 100, 206동 501호(북가좌동, DMC 래미안 e편한세상)
송병욱
서울특별시 강서구 양천로69길 65, 102동 705호(염창동, 강변성원아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345349383
과제번호 2021R1I1A2052006
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 보호연구자지원사업
연구과제명 혈관석회화와 골다공증의 동시발생에 있어서 세포외 소포체의 작용기전 연구
기 여 율 80/100
과제수행기관명 가톨릭관동대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465035491
과제번호 HI18C0661010022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 첨단의료기술개발
연구과제명 생체 내 분화제어용 복합강화 줄기세포 지지체를 이용한 연골재생기술 개발
기 여 율 20/100
과제수행기관명 가톨릭관동대학교
연구기간 2018.04.30 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 골 질환은 골다공증, 치주 질환, 골감소증, 골괴사 및 골용해로 이루어진 군에서 선택되는, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올, 디클로로메탄, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택되는 용매로 추출된 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 에탄올 추출물인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 대식세포의 파골세포로의 분화 또는 파골세포의 활성을 억제하는, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 DC STAMP(dendritic cell specific transmembrane protein), OSCAR (osteoclast-associated receptor), TRAP 및 NFATc1 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 1)로 이루어진 군에서 선택되는 파골세포 분화 마커의 발현을 억제하는 것인, 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

상기 골 질환은 골다공증, 치주 질환, 골감소증, 골괴사 및 골용해로 이루어진 군에서 선택되는, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올, 디클로로메탄, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택되는 용매로 추출된 것인, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 에탄올 추출물인, 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 가는새빨간검둥이(*Neorhodomela munita*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인간의 뼈는 조골세포(osteoblast), 골세포(osteocyte), 파골세포(osteoclast)로 이루어져 있다. 이중 조골세포는 증식기, 골 기질 형성기, 석회화기를 거쳐 골조직을 형성하는 역할을 수행한다. 또한 파골세포는 골을 흡

수하는 역할을 수행한다. 성장이 끝난 성인의 뼈는 파골세포에 의해 오래된 뼈를 제거하고 조골세포에 의해 새로운 뼈로 대체하는 골 흡수와 생성을 지속적으로 반복 재생하면서 골재형성 과정이 일어난다.

[0004] 이러한 골 흡수와 생성에 균형이 깨지면 골다공증(osteoporosis)이 발생한다. 골다공증은 골 형성과 골 흡수의 평형이 깨져 뼈의 질량이 감소하고 뼈 조직의 미세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로 뼈를 구성하는 미네랄(특히 칼슘)과 기질이 감소한 상태이다. 골 미세구조 사이의 간격이 넓어지고 미세구조가 얇아져 조그만 충격에도 뼈가 쉽게 골절될 위험이 증가한다. 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있는데, 특히 여성은 폐경기에 이르면 호르몬 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다.

[0005] 이러한 골다공증을 치료하기 위하여 호르몬, 알렌드로네이트(alendronate), 칼시토닌(calcitonin), 라록시펜(raloxifene), Na-F, 칼시트리올(calcitriol) 또는 비스포스포네이트(bisphosphonate) 제제 등을 투여하게 된다. 그러나 골다공증의 치료는 장기간이 필요하며 상기 약물을 장기 복용하게 됨으로써 요로결석, 자궁내막암, 유방암 등과 같은 부작용이 초래될 가능성이 높아진다.

[0006] 이에 최근에는 다른 부작용 없이 골 손실을 최소화하면서 골 형성을 촉진할 수 있는 천연물에 대한 연구가 활발하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2014-0022588호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기와 같은 상황에서, 본 발명자들은 골다공증과 같은 골 관련 질환을 개선할 수 있는 천연물을 발굴하기 위하여 노력한 결과, 가는새빨간검둥이 추출물이 파골세포 분화 및 활성 억제 효과를 갖는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증과 같은 골 질환을 개선/치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 골 관련 질환, 예를 들어 골다공증과 같은 질환에 치료 효과를 갖는 물질로 가는새빨간검둥이 추출물을 발굴하였다. 구체적으로 대식세포에 파골세포 분화 유도물질인 RANKL(receptor activator of NK-κB ligand)을 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하면서 상기 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리하자 대식세포의 파골세포로의 분화가 억제되는 것을 알 수 있었다 (도 1 및 2). 또한, 파골세포 분화 마커의 발현 및 파골세포의 활성 또한 가는새빨간검둥이 추출물에 의해 억제되었다 (도 3 내지 5).

[0013] 따라서, 본 발명의 일 양상은 가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 가는새빨간검둥이 (*Neorhodomela munita* 또는 *Neorhodomela aculeata* (Perestenko) Masuda 1982)는 홍조식물문 (*Rhodophyta*), 진정홍조강 (*Florideophyceae*), 빨간검둥이과 (*Rhodomelaceae*), 새빨간검둥이속 (*Neorhodomela*)에 속하는 해조류의 일종으로 국내 동해안, 서해안 및 남해안의 조간대에 서식한다. 엽체는 흑갈색으로 검은색에 가까우며 연골질의 기둥 모양으로 자라면서 작은 가지를 불규칙적으로 내는데 작은 가지에는 가시모양으로 돌기가 많이 난다.

[0015] 가는새빨간검둥이 추출물에는 항염증, 항균 효과가 있으며 미국 화장품협회가 발간하는 국제화장품 원료집에 등재되어 있다. 그러나 골 질환의 예방 또는 치료와 관련된 효과는 아직까지 알려진 바 없다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물(extract)"은 추출 대상을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 농축 또는 여

과시킨 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.

[0017] 상기 가는새빨간검둥이 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.

[0018] 본 발명에서, 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올, 디클로로메탄, 아세톤 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에서는, 건조된 가는새빨간검둥이 전체를 에탄올에 담근 뒤 초음파 처리를 반복하고, 감압 건조시켜 제조된 추출물을 사용하였다 (실시예).

[0020] 한편, 가는새빨간검둥이 추출물은 조성물의 총 중량 기준으로 0.0001 내지 90 중량%로 포함될 수 있으나 이에 제한되지 아니한다. 예를 들어, 가는새빨간검둥이 추출물은 조성물의 총 중량 기준으로 0.0001 내지 80 중량%, 0.001 내지 70 중량%, 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 상기 골 질환은 골다공증(osteoporosis), 치주 질환(periodontal disease), 골연화증(osteomalacia), 골감소증(osteopenia), 골결손, 골위축(bone atrophy), 골괴사, 골절(fracture), 골용해(osteolysis), 골관절염(osteoarthritis) 및 골형성 부전증(osteogenesis imperfecta)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 골다공증일 수 있다.

[0022] 본 명세서에 사용된 용어, "골다공증"은 뼈를 구성하는 미네랄(특히 칼슘)과 기질이 감소하여 뼈 조직의 미세구조가 퇴화하고, 결과적으로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 상태를 말한다. 파골 작용이 조골 작용보다 증가된 경우 골 재형성의 균형이 깨져서 발생하며, 원인으로는 칼슘 흡수 장애, 비타민 D 결핍, 약물 부작용, 운동부족, 과음, 폐경, 우울증 등이 있다. 특히 여성의 경우 폐경기 이후 에스트로겐 분비량이 감소하면 활성산소가 세포에 축적되어 골 손실이 촉발되는 것으로 알려져 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0024] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 가는새빨간검둥이 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 제조된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용 액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0025] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 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. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 다른 양상은 상기 가는새빨간검둥이 추출물을 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 식품 조성물은 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일한 성분을 사용하므로 이 둘 사이에 중복

되는 내용은 명세서의 과도한 기재를 피하기 위하여 생략한다.

[0030] 본 발명에서, 상기 식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽, 음료 또는 환의 형태로 제공될 수 있으며, 유효성분인 가는새빨간검둥이 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0031] 상기 식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0032] 상기 식품 조성물은 식품 제조시에 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 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 및 합성 향미제를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 양상은 상기 가는새빨간검둥이 추출물을 이용한 시험관내 파골세포 분화 억제용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 가는새빨간검둥이 추출물은 RANKL 처리에 의하여 유도되는 대식세포의 파골세포로의 분화를 효과적으로 억제하였으므로 파골세포 분화 억제 용도로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 따른 가는새빨간검둥이 추출물은 대식세포의 파골세포로의 분화를 억제하고, 파골세포의 활성을 저해하는 효과가 있으므로 골 질환의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리한 후 TRAP을 염색한 결과이다.

도 2는 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리한 후 한 세포에 3개 이상, 또는 10개 이상의 핵을 가지는 TRAP+ 파골세포의 비율을 확인한 결과이다.

도 3은 대식세포에 파골세포 분화 유도물질(RANKL)과 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리한 후 파골세포 분화 및 활성화 마커인 DC STAMP(dendritic cell specific transmembrane protein), OSCAR (osteoclast-associated receptor), TRAP 및 NFATc1 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 1)의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

도 4는 도 3의 결과를 그래프로 표시한 것이다.

도 5는 대식세포를 파골세포로 분화시키면서 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리한 후 파골세포가 뼈 모사 매트리스를 분해하여 형성된 분해 면적을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 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.

[0042] **실시예: 추출물 제조**

[0043] 가는새빨간검둥이 추출물 (MABIK NP30210062)은 국립해양생물자원관 해양추출물뱅크를 통해 분양 받았다. 상기 추출물은 다음과 같이 제조되었다. 2021년 충청남도 태안군에서 채취한 가는새빨간검둥이 (*Neorhodomela munita* (Perestenko) Masuda)를 3회 수세하고 동결건조시켰다. 건조된 가는새빨간검둥이 파우더 30g을 70% 에탄올 400 ㎖에 넣고, 상온에서 초음파추출기(40KHz, 60분)로 3회 반복 추출하였다. 얻어진 추출물을 필터링하고 농축시켜 최종 800 ㎎의 추출물을 수득하였다. 이하 실험에서는 해당 분말을 DMSO에 녹여 사용하였다.

[0045] **실험예 1: 파골세포 활성화 억제**

[0046] **2-1. TRAP 염색**

[0047] 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 가는새빨간검둥이 추출물을 같이 처리하였다.

[0048] 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.

[0049] 실험 결과, RANKL만 처리한 대조군과 비교하여 가는새빨간검둥이 추출물 처리군에서는 파골세포의 분화가 현저히 억제된 것을 알 수 있었다 (도 1).

[0050] 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 가는새빨간검둥이 추출물 처리군에서는 3개 이상(N≥3), 또는 10개 이상(N≥10)의 핵을 가지는 $TRAP^+$ 파골세포의 비율이 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (도 2).

[0052] **2-2. 파골세포의 분화 마커 확인**

[0053] 6-웰 플레이트에 RAW264.7 세포를 각 웰당 $3x10^4$개씩 분주하고 가는새빨간검둥이 추출물을 10 또는 20 ㎍/㎖ 농도로 1시간 동안 전처리하였다. 이후 각 웰에 RANKL을 40 ng/㎖ 농도로 처리하고, 2일마다 배지를 교체하면서 총 4일동안 배양한 뒤 트라이졸(trizol)로 세포를 회수하였다. 회수한 세포에서 트라이졸-클로로포름 방법으로 mRNA를 분리하고, 나노-드랍(nano-drop)으로 정량하였다. 이후 분리한 mRNA 500 ng을 주형으로 cDNA 합성 키트(올리고 dT 프라이머)를 사용하여 cDNA를 합성하고, 합성한 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 진행하였다. RT-PCR은 어닐링 56℃에서 30초 및 신장 72℃에서 1분 사이클을 총 35회 진행하였다. RT-PCR에 사용한 프라미어 서열은 다음과 같다:

[0054] DC-STAMP F (서열번호 1): TTGAACCGAGCTGCATTCCT;

[0055] DC-STAMP R (서열번호 2): GCACTACCTTGGCCTTACCT;

[0056] OSCAR F (서열번호 3): CCCAGTCTGTCTTGCGGTAG

[0057] OSCAR R (서열번호 4): TCTGGGTTGGAGGGTCCTAA

[0058] TRAP F (서열번호 5): CTCCTGCCTGTTCTCTTCCCA

[0059] TRAP R (서열번호 6): AAGAGAGAAAGTCAAGGGAGTGGC

[0060] NFATc1 F (서열번호 7): GGAGAGTCCGAGAATCGAGAT

[0061] NFATc1R (서열번호 8): TTGCAGCTAGGAAGTACGTCT

[0062] GAPDH F (서열번호 9): CAAGGTCATCCATGGACAACTTTG

[0063] GAPDH R (서열번호 10): GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

[0065] 그 결과, 파골세포 분화 및 활성화 마커인 DC STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein), OSCAR (osteoclast-associated receptor), TRAP 및 NFATc1 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 1)의 mRNA 수준이 가는새빨간검둥이 추출물 처리군에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 3 및 도 4).

[0067] **2-3. Pit assay**

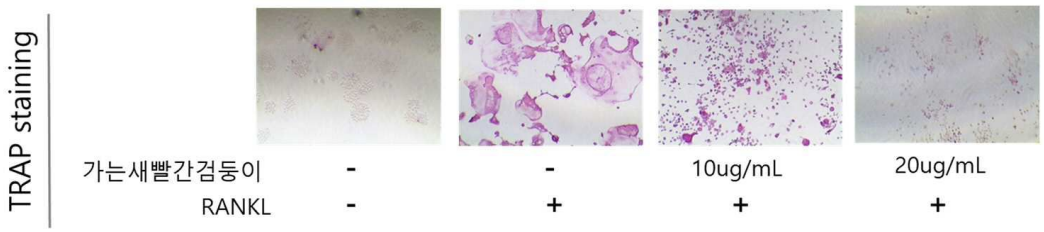
[0068] RAW264.7 세포가 RANKL 처리에 의해 파골세포로 분화되었을 때의 활성을 가는새빨간검둥이 추출물이 억제할 수 있는지 Bone resorption assay kit (CSR-BRA-48KIT, COSMOBIO)를 사용하여 확인하였다. 구체적으로 칼슘-포스

페이트 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 4일 동안 배양하고, 배지를 교체할 때 가는새빨간검둥이 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.

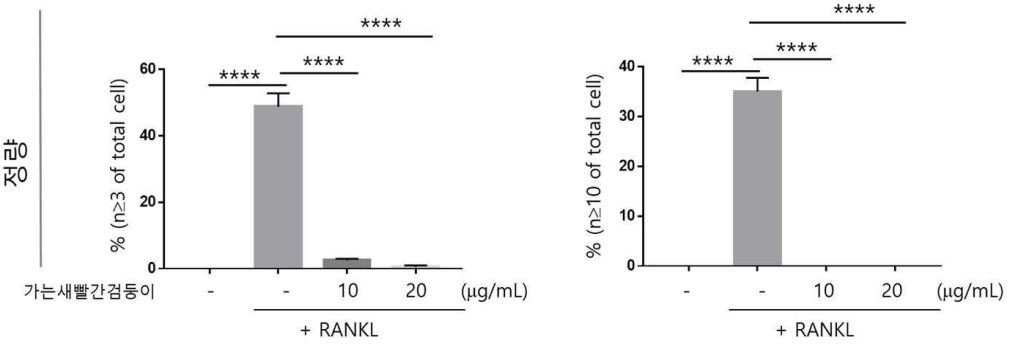
[0069] 측정 결과, RANKL만 처리한 대조군과 비교하여 가는새빨간검둥이 추출물 처리군에서는 처리 농도 10 ㎍/㎖부터 유의미한 분해 면적 감소를 보이는 것을 확인하였다 (도 5).

도면

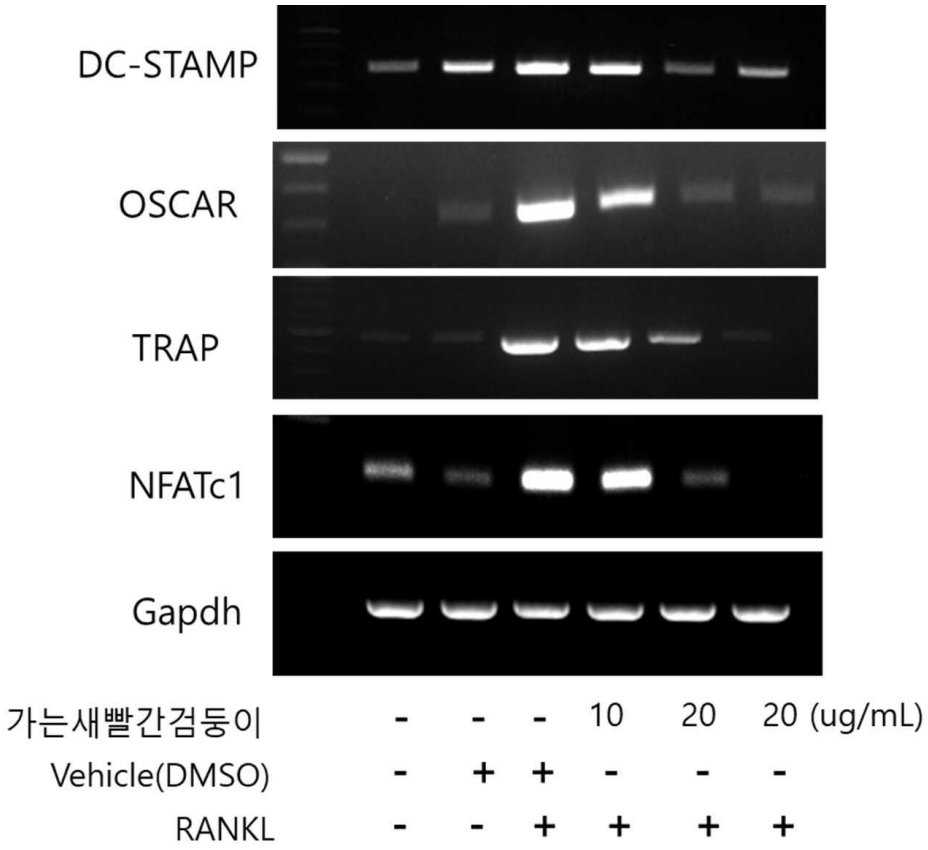
도면1



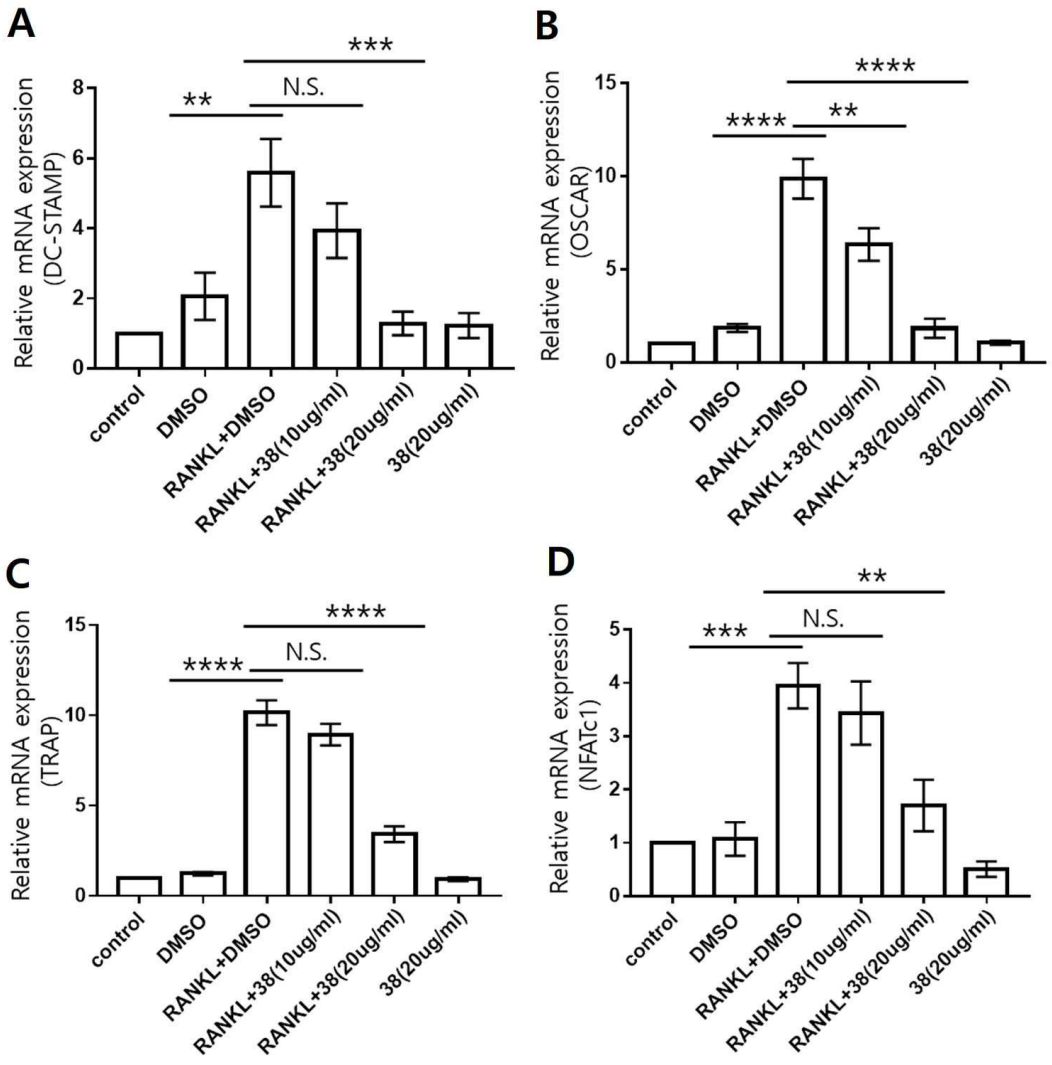
도면2



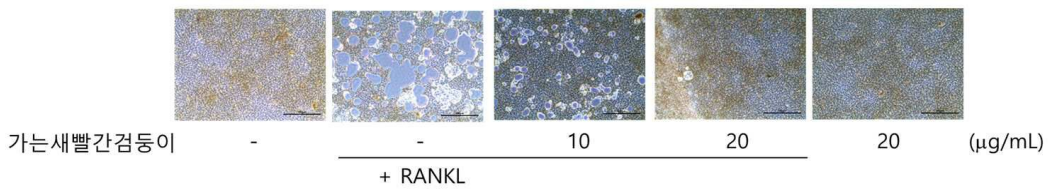
도면3


DC-STAMP
OSCAR
TRAP
NFATc1
Gapdh
가는새빨간검둥이 - - - 10 20 20 (ug/mL)
Vehicle(DMSO) - + + - - -
RANKL - - + + + +

도면4


A
Relative mRNA expression (DC-STAMP)
B
Relative mRNA expression (OSCAR)
C
Relative mRNA expression (TRAP)
D
Relative mRNA expression (NFATc1)
control
DMSO
RANKL+DMSO
RANKL+38(10ug/ml)
RANKL+38(20ug/ml)
38(20ug/ml)
N.S.

도면5


가는새빨간검둥이
-
-
10
20
20
(μg/mL)
+ RANKL

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.