



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년04월21일  
 (11) 등록번호 10-1030573  
 (24) 등록일자 2011년04월14일

(51) Int. Cl.

*A61K 36/03* (2006.01) *A61P 19/10* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0007912

(22) 출원일자 2011년01월26일

심사청구일자 2011년01월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR100833121 B1\*

KR1020040057103 A

KR1020060082214 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

(72) 발명자

허수진

경기도 안산시 상록구 사동 1405-18 하이즈빌라 202호

강도형

경기도 안산시 상록구 사1동 푸르지오 대우6차 620동 1801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아

전체 청구항 수 : 총 11 항

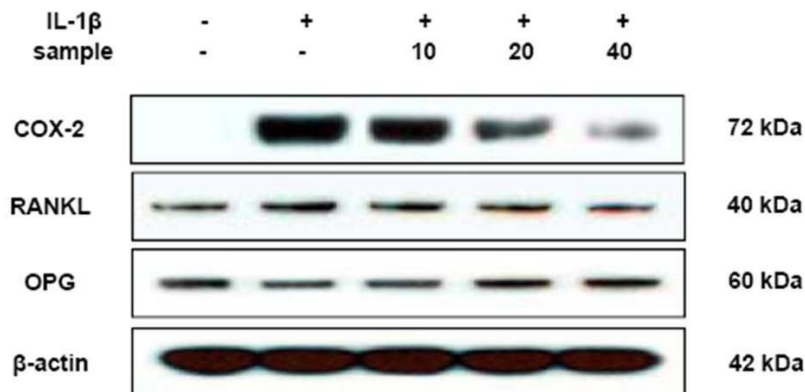
심사관 : 박종일

**(54) 파베기모자반(*Sargassum siliquastrum*) 추출물을 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 파베기모자반의 추출물 또는 분획물, 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물에 대한 것이다.

**대표도** - 도10



(72) 발명자

**김길남**

제주특별자치도 제주시 연동 290-2 학산맨션 403호

**윤원중**

제주특별자치도 제주시 노형동 1047-10

**오철홍**

제주특별자치도 제주시 이도2동 1177-5

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

파배기모자반(Sargassum siliquastrum) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 골관절염(osteoarthritis), 골다공증(osteoporosis), 골전이암 및 파젯병(Paget's disease)로 구성되는 군에서 선택되는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 파배기모자반 추출물은 파배기모자반을 물, 탄소수 4 이하의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트 및 디클로로메탄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하거나 분획하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 질환은 골다공증인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

오스테오프로티그린(OPG)의 활성을 촉진하거나 TRAP, Cath-K 및MMP-9로 구성된 군으로부터 선택되는 파골세포 형성인자를 저해하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 5

사가크로마놀 G(sargachromanol G)를 유효성분으로 포함하는 골관절염(osteoarthritis), 골다공증(osteoporosis), 골전이암 및 파젯병(Paget's disease)로 구성되는 군에서 선택되는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 6

제 5항에 있어서,

오스테오프로티그린(OPG)의 활성을 촉진하거나 TRAP, Cath-K 및MMP-9로 구성된 군으로부터 선택되는 파골세포 형성인자를 저해하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 사가크로마놀 G는 파배기모자반으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 8

파배기모자반(Sargassum siliquastrum) 추출물 또는 사가크로마놀 G(sargachromanol G)를 유효성분으로 포함하는 골관절염(osteoarthritis), 골다공증(osteoporosis), 골전이암 및 파젯병(Paget's disease)로 구성되는 군에서 선택되는 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

**청구항 9**

제 8항에 있어서,

상기 파배기모자반 추출물은 파배기모자반을 물, 탄소수 4 이하의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트 및 디클로로메탄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하거나 분획하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

**청구항 10**

제 8항에 있어서,

상기 사가크로마놀 G는 파배기모자반으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

**청구항 11**

제 8항에 있어서,

오스테오프로티그린(OPG)의 활성을 촉진하거나 TRAP, Cath-K 및MMP-9로 구성된 군으로부터 선택되는 파골세포 형성인자를 저해하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 파배기모자반 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물에 대한 것이다.

**배경기술**

[0002] 골(bone)은 특별한 연결 조직으로 골격시스템을 형성하며 신체를 기계적으로 지지하고 근육활동과 운동을 용이하게 하며 내장기관을 보호한다. 골은 골격을 유지하고 장기를 보호하는 이외에 생화학적 대사를 조절하는 기관으로써 형성, 흡수, 역전, 형성의 단계가 계속 반복하는 활발한 대사가 일어나는 역동적인 기관이다(Raisv et al. Am J Med, 72; 193-202, 1982). 이러한 골 흡수(bone resorption)와 골 형성(bone formation)이 되풀이되는 과정을 골 개축(bone remodeling)이라 한다.

[0003] 정상적인 경우 인체에서 파골세포(osteoclast)가 활성화되어 골을 흡수하면서 파괴하면, 조골세포(osteoblast)가 새로운 골을 형성한다. 파골세포는 세포 표면 위에 RANK(receptor of activated NF-κB)를 가지고 있는데, RANK는 조골세포가 분비하는 RANKL(receptor of activated NF-κB ligand)과 결합하여 활성화된다. 파골세포의 활동은 오스테오프로테그린(osteoprotegerin: 이하 "OPG"라 칭함)에 의하여 저해된다. OPG 역시 조골세포에서 분비되며 RANKL에 결합하여 RANK와 RANKL의 결합을 저해하여 파골세포의 활성화를 저해한다.

[0004] 상기 골 개축 과정에는 다양한 단백질들이 관여하는데, 이 중 매트릭스 메탈로프로티에이즈(matrix metalloproteinase: 이하 "MMP"라 칭함)는 기저막 성분을 분해하는 효소로서 현재 20가지 이상의 MMP가 발견되어 있다. MMP는 아연을 함유하며, 콜라겐(collagen), 프로테오글리칸(proteoglycan) 및 젤라틴(gelatin)과 같

은 거대 생체고분자들을 분해할 수 있는 엔도펩티다아제류(endopeptidase)로서 콜라게나제(collagenase), 젤라티나제(gelatinase), 스트로멜리신(stromelysin) 및 막형(membrane type) MMP로 크게 분류된다. 이들은 모두 전구효소(proenzyme) 형태로 합성된 후 일부분이 자체적으로 분리되면서 활성화된다.

[0005] 상기 조골세포와 파골세포의 작용으로 인한 골 개축 시, 골 형성 양이 선행된 골 흡수 양과 일치하면 골 양의 소실이 없어 골의 양을 유지하게 된다. 그러나, 어떤 이유로든지 골 형성량이 골 흡수량보다 적을 때(골 흡수가 증가하거나 또는 골 형성이 골 흡수보다 적을 때) 골량의 감소를 초래하게 되는데, 이러한 불균형은 골 질환을 유발한다.

[0006] 한편, 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*)은 갈조식물, 모자반목, 모자반과의 해조류로 한국과 일본에 주로 분포한다. 간조선부근에서 점심대에 걸쳐 바위위에 주로 붙어서 살고 있고, 길이가 보통 2-3m이나 수십 m까지 자라기도 한다. 계절과 지형에 따라 다양한 모양을 가지고 있지만 대체로 밀동의 잎은 폭이 넓고 2중의 톱니가 없으며 가지가 3릉형이고 파배기 모양으로 꼬여 있다. 윗부분에는 공기방울이 붙어 있어서 바닷속에서도 위로 곧게 뻗어 있다.

[0007] 본 발명자들은 파배기모자반의 추출물 및 분획물; 및 이로부터 분리한 사가크로마놀 G를 연구하던 중, 이들이 파골세포 형성인자를 저해하며, 골흡수를 저해한다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물; 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물; 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또다른 목적은 골흡수 관련 질환의 개선 및 치료 방법을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*) 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 파배기모자반을 추출하는 단계; 또는 사가크로마놀 G를 준비하는 단계를 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*) 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 파배기모자반을 추출하는 단계; 또는 사가크로마놀 G를 준비하는 단계를 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 파배기모자반 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 골흡수 관련 질환의 개선 및 치료 방법을 제공한다. 상기 환자는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있다.

### 발명의 효과

[0014] 본 발명의 파배기모자반 추출물 또는 사가크로마놀 G를 포함하는 조성물은 골다공증 등과 같은 골흡수 관련 질환의 예방, 개선 및 치료 효과를 갖는다.

**도면의 간단한 설명**

- [0015] 도 1은 파배기모자반 추출물 및 분획물의 수득 및 사가크로마놀 G(sargachromanol G)의 분리 과정을 나타낸다.
- 도 2는 MG-63 세포에 파배기모자반 추출물 및 분획물을 처리 시 세포 생존력을 나타낸다.
- 도 3은 MG-63 세포에 사가크로마놀 G를 처리 시 세포 생존력을 나타낸다.
- 도 4는 파배기모자반의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물(n-헥산, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, 부탄올 및 증류수) 분획물들의 MG-63 세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산 저해능을 보여준다.
- 도 5는 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물을 농도 별로 처리한 경우, MG-63 세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산 저해능을 보여준다.
- 도 6는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산 저해능을 보여준다.
- 도 7은 파배기모자반의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물(n-헥산, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, 부탄올 및 증류수) 분획물들의 MG-63 세포에서의 IL-6 생산 저해능을 보여준다.
- 도 8은 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물을 농도 별로 처리한 경우, MG-63 세포에서의 IL-6 생산 저해능을 보여준다.
- 도 9는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 IL-6 생산 저해능을 보여준다.
- 도 10은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 COX-2, RANKL 및 OPG 단백질 저해능을 나타낸다.
- 도 11은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 IκB-α 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 12는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 IκB-α 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 13은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p65 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 14는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p65 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 15은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p50 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 16는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p50 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 17은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 ERK 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 18은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 ERK 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 19는 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 JNK 단백질의 저해능을 나타낸다.
- 도 20은 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 JNK 단

백질의 저해능을 나타낸다.

도 21은 파베기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p38 단백질의 저해능을 나타낸다.

도 22는 파베기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 양을 달리하여 처리한 경우, MG-63 세포에서의 p38 단백질의 저해능을 나타낸다.

도 23은 파베기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G의 처리시 파골세포 형성인자의 mRNA 발현 저해능을 나타낸다.

도 24는 파베기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G의 처리시 파골세포 형성인자의 단백질 수준에서의 저해능을 나타낸다.

도 25는 사가크로마놀 G의 TRAP 생성 저해능을 나타낸다.

도 26은 사가크로마놀 G의 처리시 파골세포 형성이 저해되는 것을 TRAP 염색을 통하여 확인한 것이다.

도 27은 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 IκB-α 저해능을 나타낸다.

도 28은 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 p65의 저해능을 나타낸다.

도 29는 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 p50의 저해능을 나타낸다.

도 30은 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 ERK의 저해능을 나타낸다.

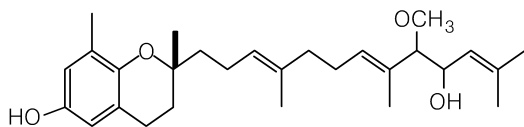
도 31은 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 JNK의 저해능을 나타낸다.

도 32는 파골세포 분화에 있어 사가크로마놀 G의 p38의 저해능을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0016] 본 발명은 파베기모자반(*Sargassum siliquastrum*) 추출물 또는 사가크로마놀 G(화학식 1)를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 파베기모자반을 추출하는 단계; 또는 사가크로마놀 G를 준비하는 단계를 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

**화학식 1**



[0017]

[0018] 또한 본 발명은 파베기모자반(*Sargassum siliquastrum*) 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 파베기모자반을 추출하는 단계; 또는 사가크로마놀 G를 준비하는 단계를 포함하는 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 아울러 본 발명은 파베기모자반 추출물 또는 사가크로마놀 G를 유효성분으로 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 골흡수 관련 질환의 개선 및 치료 방법을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

- [0021] 본 발명의 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*)은 자연에서 채취하여 이용할 수 있고, 양식하여 이용할 수도 있다. 본 발명의 파배기모자반은 신선한 상태로 이용할 수도 있으며, 동결건조, 자연건조 등을 한 상태로 보관하여 이용할 수도 있다.
- [0022] 상기 파배기모자반 추출물은 파배기모자반을 물 또는 유기용매로 추출하거나 분획한 것일 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 파배기모자반 추출물은 물, 탄소수 4 이하의 저급 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트 및 디클로로메탄으로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출하거나 분획한 것일 수 있다.
- [0023] 상기 골흡수 관련 질환은 골흡수가 과도하게 일어나거나 골생성 효율이 낮아져 골흡수와 골생성 사이에 불균형이 생긴 질환일 수 있다. 상기 골흡수 관련 질환은 골관절염(osteoarthritis), 골다공증(osteoporosis), 골전이암 및 파젯병(Paget's disease)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 파골세포 형성인자의 활성 또는 생성을 저해하거나 오스테오프로티그린(OPG)의 활성을 촉진할 수 있다. 상기 파골세포 형성인자는 TRAP, Cath-K 및MP-9로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 사가크로마놀 G(sargachromanol G)는 천연물에서 분리할 수 있으며, 합성하여 이용할 수도 있다. 상기 천연물은 파배기모자반일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 골흡수 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.1mg 내지 10g, 바람직하게는 10 mg 내지 5g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품이란 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 조성물을 첨가한 것도 포함된다.
- [0029] 본 발명의 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 조성물을 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 70 중량부, 바람직하게는 2 내지 50 중량부 첨가될 수 있다. 상기 골흡수 관련 질환 예방 및 개선용 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분



은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [0030] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.
- [0031] 상기 골흡수 관련 질환의 예방 및 개선용 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 이하, 본 발명을 다음의 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 발명의 범위가 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0033] <실험예 1> 재료 및 방법
- [0034] <1-1> 화합물 및 시약
- [0035] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 및 fetal bovine serum (FBS)은 Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY)로부터 취득하였다. PGE2 및 IL-6 ELISA 키트는 R&D systems, Inc. (St. Louis, MO) 및 BD biosciences (San Diego, CA)로부터 구입하였다. COX-2 및 iNOS 항체는 BD Biosciences (San Diego, CA, USA) 및 Calbiochem (San Diego, CA, USA)으로부터 구입하였다. NF-κB (anti-p50, anti-p65 및 anti-IκBα), MAPKs (anti-ERK1/2, anti-JNK 및 anti-p38) 및 파골세포 형성 인자(osteoclastogenic factors) (TRAP, MMP-9, TRAF6, anti-SFK, anti-Lyn, anti-MEK and anti-ATF2), 마우스 또는 토끼 항체들은 각각 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. PD98059 (a specific inhibitor of ERK1/2), SB203580 (a specific inhibitor of p38), SP600125 (a specific inhibitor of JNK), PDTC (a specific inhibitor of NF-κB) 및 다른 시약들은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.
- [0036] <1-2>파배기모자반 추출물의 취득 및 사가크로마놀 G(sargachromanol G)의 분리
- [0037] 해조류인 파배기모자반(Sargassum siliquastrum)은 2005년 10월 ~ 2006년 3월 사이에 한국의 제주도 연안에서 채취하였다. 샘플들은 수돗물로 3회 세척하여 표면의 염분, 착생식물 및 모래 등을 제거하고, 신선한 물로 주의 깊게 세척(rinse)하였으며, -20 °C의 의료용 냉동고에서 보관하였다. 냉동된 샘플들은 추출을 수행하기 전에 감압 하에 동결건조(lyophilize) 및 균질화(homogenize)를 실시하였다. 상기 분말화된 파배기모자반(400 g)을 80 % 메탄올 수용액으로 3 회 추출하고 여과하였다. 여과액을 진공 조건에서 증발시켜, 80 % 메탄올 추출물을 취득하였다. 이를 증류수에 용해하고, 디클로로메탄으로 분획하였다. 상기 디클로로메탄 분획물 9 g을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 혼합물(100:1-1:1)을 단계 용리액으로 하여 실리카 칼럼 크로마토그래피를 수행하여, 활성 분획을 분리하였다. 실리카 겔 크로마토그래피로부터 취득한 결합된 활성 분획은 80% 메탄올 수용액을 이용하여 Sephadex LH-20 칼럼으로 분별하고, 역상 HPLC로 최종적으로 정제하여 사가크로마놀 G(sargachromanol G)를 취득하였다(도 1).
- [0038] < 1-3> 세포 배양
- [0039] American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 인간 조골세포주인 MG-63 및 생쥐 (murine) 대식세포주인 RAW 264.7을 구입하여, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/mL), 및 streptomycin (100 μg/mL)을 첨가하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GIBCO Inc.)에서 보관하였다. 이들 세포들은 37 °C에서 95% air, 5% CO<sub>2</sub> 가습 공기 조건 하 포화 상태(subconfluence)에서 보관하였으며, 3-4일마다 계대배양하였다. 혈구계를 이용하여 세포의 수를 측정하였으며, trypan blue dye exclusion을 통

하여 생세포의 수를 확인하였다.

[0040] <1-4> 단백질 수준의 측정-이뮤노블롯팅 분석

[0041] 세포들이 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonident P-40, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 10 mM NaF, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 g/mL leupeptin] 내 용해되고, 30분 간 얼음 위에서 보관되었다. 상기 세포 용해물을 4 °C에서 15분간 12,000 × g로 원심분리하고, 상등액을 사용하기 전까지 -70 °C에서 보관하였다. Bradford 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 8-12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔로 용해물의 부분 표본(단백질 30-40 μg)을 분리하여, 글라이신 이동 버퍼[192 mM glycine, 25 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20% MeOH (v/v)]를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) 멤브레인 (BIO-RAD, HC, USA)으로 이동시켰다. 5% 무지방 건조 우유를 이용하여 비특이적 위치를 blocking한 후, 상기 멤브레인을 1차 항체(primary antibody)(1:1000)로 4 °C에서 밤새 배양하였다. 상기 멤브레인을 60분간 horseradish peroxidase와 콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 이차 항체(secondary antibody) (1:5000, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)로 60분간 배양하였다. enhanced chemiluminescence (ECL) 웨스턴 블롯팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech., NY, USA)로 상기 단백질을 검출하였다.

[0042] <1-5> Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색 및 분석

[0043] RANKL (100 ng/mL) 존재 하, 48-웰 조직배양 플레이트를 이용하여, 2.0 × 10<sup>4</sup> cells/well에 RAW 264.7 세포들을 96시간 동안 위치시켰다(plate). 3.7% 포르말린에서 10분 간 세포를 고정하고, 고정된 세포들을 PBS로 두 번 세척하여, 0.1% Triton X-100으로 1분간 permeabilization시켰다. TRAP 활성을 위하여 키트(Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)로 제조자의 지시에 따라 세포를 염색하였다. 37 °C에서 습기가 있고 빛으로 보호된 인큐베이터에서 1시간 동안 배양한 후, 세포들을 증류수로 3회 세척하였다. TRAP-양성 세포들은 어두운 빨간 색으로 나타났고, 3개 이상의 핵을 가진 TRAP-양성 세포들(다핵세포)은 조골세포로 확인되었다. 동일 조건 하, 48-웰 플레이트에서 18시간 동안 RAW 264.7 세포들(1.0×10<sup>5</sup> cells/mL)을 배양하였다. RANKL (100 ng/mL) 및 사가크로마놀 G를 배양된 세포에 첨가하여 72시간 동안 배양하였다. TRAP 분석 키트를 사용하여 TRAP 활성을 측정하는데, 상기 배지를 사용하였다. TRAP 분석은 그 후 ELISA 플레이트 리더를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0044] <1-6> 통계 분석

[0045] 스튜던트 t-검정 및 one-way ANOVA를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 데이터들은 최소 3회 수행된 독립적인 시험 결과를 이용하여, 평균±표준편차로 나타내었다. 0.005 이하의 P- values를 통계적으로 중요한 것으로 간주하였다.

[0046] <실험예 2> 세포 생존력

[0047] Lactate dehydrogenase (LDH) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석을 통하여 세포 생존력(Cell viability)을 측정하였다. LDH 유출은 세포질로부터 배지로 유출되는 세포질 LDH의 양의 작용으로써 세포막의 강도를 측정하는 것이다. LDH 활성은 젖산이 피루베이트로 전환되는 동안 NADH의 생산량에 따라 결정된다. 즉, 세포를 제거하기 위하여 상온에서 3 분간 12,000 rpm으로 배양 배지를 원심분리하였다. 상기 무세포(cell-free) 배양 배지(50 μL)를 모아, 세포 독성 탐지 키트의 반응 혼합물 50 μL와 함께 암소에서 상온 조건 하 30 분간 배양하였다. HCl (1N) 50 μL을 각각의 웰에 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. 490 nm에서 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 퍼센트 세포독성(percent cytotoxicity)은 대조군에 대한 상대값으로 결정하였다(Fernandez et al., 2006).

[0048] conventional MTT assay를 이용하여 세포 생존력을 측정하였다. 세포를 96-웰 플레이트에 넣고, 24시간 동안 배양한 후, 말 태반 배지에 24 시간 두었다. 웰마다 MTT 용액(10 mg/mL in phosphate buffered-saline, pH 7.4)을 50 μL 씩 첨가하고(최종 농도 0.5 mg/mL), 플레이트를 37 °C에서 4 시간동안 배양하여 formazan crystal을

완전히 용해하였다. Formazan의 가용화를 위하여 15% sodium dodesyl sulfate을 첨가하여 배양을 중단하고, microplate reader를 이용하여 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다( $OD_{570-630}$ ).

- [0049] 파배기모자반 추출물 및 분획물 처리시 조골세포의 생존력
- [0050] 파배기모자반의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매(n-헥산,  $CH_2Cl_2$ , EtOAc, 부탄올 및 증류수) 분획물들(50 ug/mL)을 MG-63 세포들에 처리하여 37 °C, 5%  $CO_2$  공기 조건 하 24시간 동안 배양한 후 MTT 분석을 수행한 결과는 도 2와 같다. 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ).
- [0051] 사가크로마놀 G 처리시 조골세포의 생존력
- [0052] MG-63 세포에 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu M$  처리한 후 37 °C, 5%  $CO_2$  공기 조건 하 24시간 동안 배양한 후 MTT 분석을 수행한 결과는 도 3과 같다. 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ).
- [0053] <실험예 3> 조골세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산량 저해능
- [0054] IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 및 LPS (1  $\mu g/mL$ )로 MG-63 세포( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)를 24시간 동안 자극하였다. ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 그 제조자의 지시에 따라배양 상등액 내 PGE<sub>2</sub> 수준을 측정하였다.
- [0055] 상기 분석은, PGE<sub>2</sub>-특이적 항체의 결합 부위의 수가 제한되어 있는데, 이에 대한 표지되지 않은 PGE<sub>2</sub>와 과산화효소(peroxidase)로 표지된 PGE<sub>2</sub>의 고정량 사이의 경쟁을 기초로 한 것이다. 450 nm에서 microplate reader 를 이용하여 상기 용액의 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회에 걸쳐 수행되었다.
- [0056] 파배기모자반 추출물 및 분획물 처리시 조골세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산량 저해 효과
- [0057] 파배기모자반의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물(n-헥산,  $CH_2Cl_2$ , EtOAc, 부탄올 및 증류수) 분획물들(50 ug/mL)을 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 상등액을 수거하여, 상등액 내 PGE<sub>2</sub> 농도를 ELISA로 측정하고, 세포독성은 LDH 방법으로 확인하였다(도 4). 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ). 파배기모자반의 추출물 및 분획물은 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해하는 것으로 나타났다.
- [0058] 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물 처리시 조골세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산량 저해 효과
- [0059] PGE<sub>2</sub> 생성 저해능이 뛰어난 것으로 확인된 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물을 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 각각 12.5, 25 및 50 ug/mL씩 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 상등액을 수거하여, 상등액 내 PGE<sub>2</sub> 농도를 ELISA로 측정하고, 세포독성은 LDH 방법으로 확인하였다(도 5). 그 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었으며(\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ), 분획물의 농도가 높을수록 PGE<sub>2</sub> 생성이 저해되는 것이 확인되었다.

[0060] 사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서의 PGE<sub>2</sub> 생산량 저해 효과

[0061] 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 씩 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 또한 ERK1/2의 선택적 저해제인 PD98059(20  $\mu$ M), p38의 선택적 저해제인 SB203580(20  $\mu$ M), JNK의 선택적 저해제인 SP600125(10  $\mu$ M) 및 NF- $\kappa$ B의 선택적 저해제인 PDTC(10  $\mu$ M)를 각각 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 그 후 상등액을 수거하여, 상등액 내 PGE<sub>2</sub> 농도를 ELISA로 측정하고, 세포독성은 LDH 방법으로 확인하였다(도 6)(PD: PD98059, SB: SB203580, SP: SP600125를 나타냄). 그 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,P<0.05; \*\*,P<0.01). 그 결과, 사가크로마놀 G는 PGE<sub>2</sub> 생성 저해능이 있었으며, 사가크로마놀 G의 양이 많아질수록 PGE<sub>2</sub> 생성이 저해되는 것이 확인되었다.

[0062] <실험예 4> 조골세포에서의 IL-6 생산 저해능

[0063] 샌드위치 ELISA를 이용하여 사이토카인의 생산량을 측정하였다. 처리 전 DMEM에서 에탄올(0.1 % 미만)로 사가크로마놀 G를 희석하였다. 24-웰 플레이트에서 18시간 동안 MG-63 세포( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)들을 배양한 후, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) 및 사가크로마놀 G를 24시간 동안 처리하였다. 마우스 ELISA 키트 (R & D Systems Inc, MN, USA)를 이용하여 450 nm에서 배지 내 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 IL-6 수준을 분석하였다. 모든 실험은 3회 수행되었다.

[0064] 파배기모자반 추출물 및 분획물 처리시 조골세포에서 IL-6 생산 저해 효과

[0065] 파배기모자반의 80% 에탄올 추출물 및 유기용매 분획물(n-헥산, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, 부탄올 및 증류수) 분획물들(50  $\mu$ g/mL)을 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 상등액을 수거하여, 상등액 내 IL-6 농도를 ELISA로 측정하였다(도 7). 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,P<0.05; \*\*,P<0.01). 그 결과, 파배기모자반의 추출물 및 분획물은 MG-63 세포에서 IL-6 생성을 저해하는 것으로 확인되었다.

[0066] 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물 처리시 조골세포에서 IL-6 생산 저해 효과

[0067] IL-6 생성 저해능이 뛰어난 것으로 확인된 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물을 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 각각 12.5, 25 및 50  $\mu$ g/mL씩 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 상등액을 수거하여, 상등액 내 IL-6 농도를 ELISA로 측정하였다(도 8). 그 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*,P<0.05; \*\*,P<0.01). 그 결과 파배기모자반의 디클로로메탄 분획물의 농도가 높을수록 IL-6 생성이 저해되는 것으로 나타났다.

[0068] 사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 IL-6 생산량 저해 효과

[0069] 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 씩 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하였다. 또한 ERK1/2의 선택적 저해제인 PD98059(20  $\mu$ M), p38의 선택적 저해제인 SB203580(20  $\mu$ M), JNK의 선택적 저해제인 SP600125(10  $\mu$ M) 및 NF- $\kappa$ B의 선택적 저해제인 PDTC(10  $\mu$ M)를 각각 MG-63 세포들( $1.5 \times 10^5$  cells/mL)에 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 24시간 동안 자극하

였다. 그 후 상등액을 수거하여, 상등액 내 IL-6 농도를 측정하였다(도 9)(PD: PD98059, SB: SB203580, SP: SP600125를 나타냄). 그 결과 값은 3회 반복 실험의 mean ± SEM로 나타내었다(\*, P<0.05; \*\*, P<0.01). 사가크로마놀 G는 IL-6 생산 저해능이 있었으며, 사가크로마놀 G의 양이 증가할수록 IL-6 생성 저해능도 증가하였다.

[0070] <실험예 5> 조골세포에서 COX-2, RANKL 및 OPG 단백질 양의 저해능

[0071] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 상기 세포들에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 씩 처리하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)로 72시간 동안 자극하였다. 단백질 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 측정하였다(도 10). 그 결과, 사가크로마놀 G의 농도가 높아질수록 COX-2 및 RANKL 단백질이 저해되었으며, OPG 단백질의 양은 증가하였다.

[0072] <실험예 6> 사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서의 I $\kappa$ B- $\alpha$ , p65, p50, ERK, JNK 및 p38 단백질 저해능

[0073] <6-1> 조골세포에서의 I $\kappa$ B- $\alpha$  저해능

[0074] 사가크로마놀 G의 처리 시간에 따른 조골세포에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  저해 효과

[0075] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40 uM)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. p-I $\kappa$ B- $\alpha$  (phosphorylated-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 및 pan-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 측정하였다(도 11). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할 수록 I $\kappa$ B- $\alpha$  저해 효과가 증가하는 것으로 나타났다.

[0076] 사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  저해 효과

[0077] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC (10 uM)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. p-I $\kappa$ B- $\alpha$  (phosphorylated-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 및 pan-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 단백질 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 확인하였다(도 12). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할 수록 I $\kappa$ B- $\alpha$  저해 효과가 증가하는 것으로 나타났다.

[0078] <6-2> 조골세포에서의 p65 저해능

[0079] 사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 NF- $\kappa$ B의 p65 저해 효과

[0080] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40 uM)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. P-p65 (phosphorylated-p-65) 및 Pan-p65의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 13). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할수록 p65의 저해 효과가 증가하였다.

[0081] 사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 NF- $\kappa$ B의 p65 저해 효과

[0082] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC (10 uM)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. P-p65 (phosphorylated-p-65) 및 pan-

p65의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 14). 그 결과, 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 p65의 저해 효과가 증가하였다.

[0083]

<6-3> 조골세포에서의 p50 저해능

[0084]

사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 NF-κB의 p50 저해 효과

[0085]

MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40 μM)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. P-p50 (phosphorylated-p50) 및 Pan-p50의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 15). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할수록 p50의 저해 효과가 증가하였다.

[0086]

사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 NF-κB의 p50 저해 효과

[0087]

MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 μM 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC (10 μM)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 5분간 자극하였다. P-p50 (phosphorylated-p50) 및 Pan-p50의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 16). 그 결과, 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 p65의 저해 효과가 증가하였다.

[0088]

<6-4> 조골세포에서의 ERK 저해능

[0089]

사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 ERK 저해 효과

[0090]

MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40 μM)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. P-ERK (phosphorylated-ERK) 및 Pan-ERK의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 17). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할수록 ERK 저해 효과가 증가하였다.

[0091]

사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 ERK 저해 효과

[0092]

MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 μM 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC (10 μM)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. P-ERK (phosphorylated-ERK) 및 Pan-ERK의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 18). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 ERK 저해 효과가 증가하였다.

[0093]

<6-5> 조골세포에서의 JNK 저해능

[0094]

사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 JNK 저해 효과

[0095]

MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40 μM)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1β (10 ng/mL)을 처리하여 20분간 자극하였다. P-JNK (phosphorylated-JNK) 및 Pan-JNK의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 19). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할수록 JNK 저해 효과가 증가하였다.

- [0096] 사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 JNK 저해 효과
- [0097] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 20분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 JNK의 선택적 저해제인 SP600125 (20  $\mu$ M)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 20분간 자극하였다. P-JNK (phosphorylated-JNK) 및 Pan-JNK의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 20)(SP: SP600125, 10, 20, 40은 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리한 것을 나타냄). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 JNK 저해 효과가 증가하였다.
- [0098] <6-6> 조골세포에서의 p38 저해능
- [0099] 사가크로마놀 G의 처리시 조골세포에서 JNK 저해 효과
- [0100] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G(40  $\mu$ M)와 함께 0-24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. P-p38 (phosphorylated-p38) and Pan-p38의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 21). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리 시간이 증가할수록 p38 저해 효과가 증가하였다.
- [0101] 사가크로마놀 G의 처리량에 따른 조골세포에서 p38 저해 효과
- [0102] MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 그 후, 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 씩 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 MG-63 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 p38의 선택적 저해제인 SB203580 (20  $\mu$ M)를 처리하여 24 시간 동안 전배양하고, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL)을 처리하여 10분간 자극하였다. P-p38 (phosphorylated-p38) and Pan-p38의 수준은 이뮤노블롯팅 방법을 이용하여 측정하였다(도 22).(SB: SB203580, 10, 20, 40은 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리한 것을 나타냄). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 p38 저해 효과가 증가하였다.
- [0103] <실험예 7> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화 시 파골세포 형성인자의 발현 저해능
- [0104] 사가크로마놀 G의 처리량에 따른 파골세포 형성인자의 mRNA 발현 저해 효과
- [0105] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 사가크로마놀 G를 10, 20 및 40  $\mu$ M씩 처리하고, RANKL(100 ng/mL)로 자극하여 72시간동안 배양하여 파골세포 분화 환경에서 파골세포 형성인자들(osteoclastogenic factors)의 mRNA 발현을 측정하였다(도 23). 그 결과 사가크로마놀 G의 처리량이 증가할수록 TRAP, Cath-K, MMP-9 등 파골세포 형성인자들의 mRNA 발현이 저해되는 것이 확인되었다.
- [0106] 사가크로마놀 G의 농도별 처리시 파골세포 형성인자의 저해 효과
- [0107] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 사가크로마놀 G를 10, 20 및 40  $\mu$ M씩 처리하고, RANKL(100 ng/mL)로 자극하여 72시간동안 배양하여 파골세포 분화를 유도하였다. 파골세포 형성인자들(osteoclastogenic factors)의 단백질 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 측정하였다(도 24).
- [0108] <실험예 7> 사가크로마놀 G의 TRAP 생성 저해능
- [0109] <실험예 7-1>사가크로마놀 G의 처리량에 따른 TRAP 생성 저해능

- [0110] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^5$  cells/mL)에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리하고, RANKL(100 ng/mL)로 72시간 자극하였다. 그 후 상등액을 수거하고, 파골세포 형성인자인 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)의 상등액 내 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였다(도 25). 결과 값은 3회 반복 실험의 mean  $\pm$  SEM로 나타내었다(\*, P<0.05; \*\*, P<0.01). 그 결과 사가크로마놀 G의 양이 증가할 수록 TRAP 생성이 저해되는 것이 확인되었다.
- [0111]
- [0112] <실험예 7-2>사가크로마놀 G의 파골세포 형성 저해능
- [0113] RAW 264.7 세포들( $12.0 \times 10^4$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리하고 RANKL(100 ng/mL) 및 LPS(0.5  $\mu$ g/mL)와 함께 96시간 동안 배양하였다. TRAP 활성 확인을 위하여 TRAP 염색 키트로 세포들을 염색하였다. 현미경( $\times 200$ )을 통하여 TRAP-양성 세포들이 확인되었다(도 26).
- [0114] <실험예 8> 사가크로마놀 G의 처리시 파골세포 분화에 있어, I $\kappa$ B- $\alpha$ , p65, p50, ERK, JNK 및 p38 단백질에 대한 저해능
- [0115] <실험예 8-1> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 저해능
- [0116] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC(10  $\mu$ M)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. P-I $\kappa$ B- $\alpha$  (phosphorylated-I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 및 Pan-I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 27). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.
- [0117] <실험예 8-2> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 p65의 저해능
- [0118] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC(10  $\mu$ M)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. P-p65 (phosphorylated-p65) 및 Pan-p65의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 28). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 p65의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.
- [0119] <실험예 8-3> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 p50의 저해능
- [0120] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40  $\mu$ M 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PDTC(10  $\mu$ M)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 10분간 자극하였다. P-p50 (phosphorylated-p50) 및 Pan-p50의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 29). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 p50의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.
- [0121] <실험예 8-4> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 ERK의 저해능
- [0122] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사



가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 PD98059 (20 uM)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. P-ERK (phosphorylated-ERK) 및 Pan-ERK 의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 30). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 ERK의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.

[0123] <실험예 8-5> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 JNK의 저해능

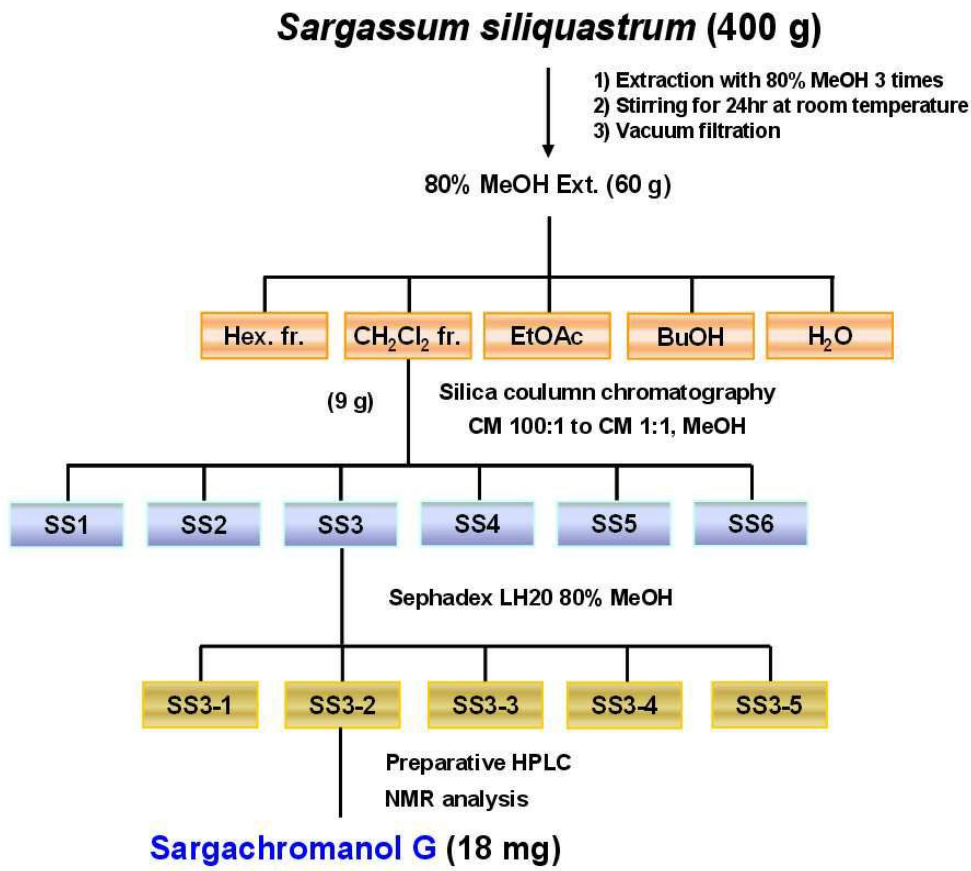
[0124] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 SP600125 (10 uM)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. P-JNK (phosphorylated-JNK) 및 Pan-JNK 의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 31). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 JNK의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.

[0125] <실험예 8-6> 사가크로마놀 G의 파골세포 분화에 있어 p38의 저해능

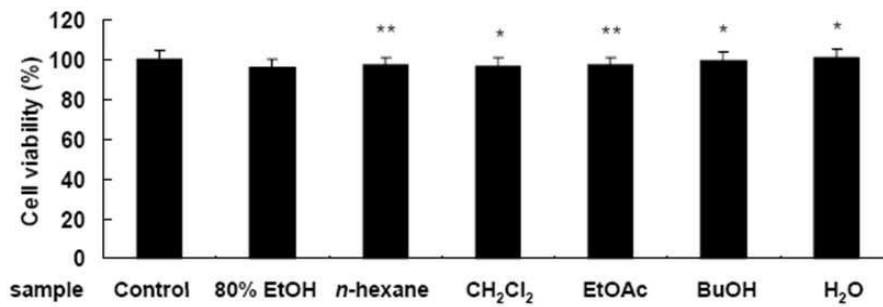
[0126] RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)을 18시간 동안 전배양하였다. 여기에 파배기모자반으로부터 분리한 사가크로마놀 G를 각각 10, 20 및 40 uM 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. 또한 18시간 동안 전배양한 RAW 264.7 세포들( $1.0 \times 10^6$  cells/mL)에 SB203580(20 uM)를 처리하여 24시간 동안 전배양한 후, RANKL(100 ng/mL)로 20분간 자극하였다. P-p38(phosphorylated-p38) 및 Pan-p38 의 수준은 이뮤노블롯팅 방법으로 확인하였다(도 32). 그 결과, 사가크로마놀 G가 파골세포 분화에 있어 p38의 활성을 저해하는 것이 확인되었다.

도면

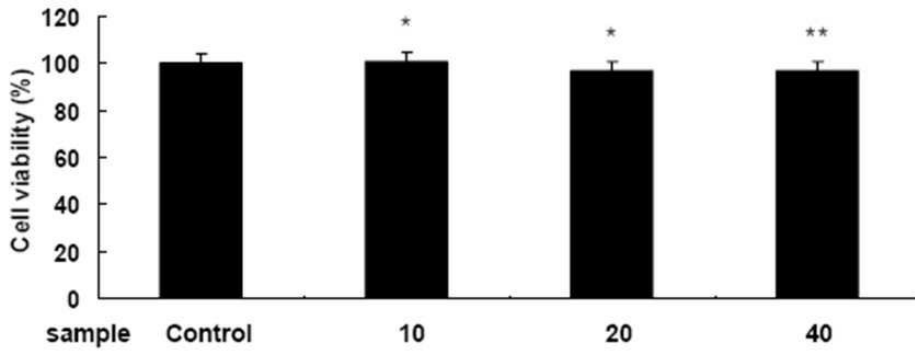
도면1



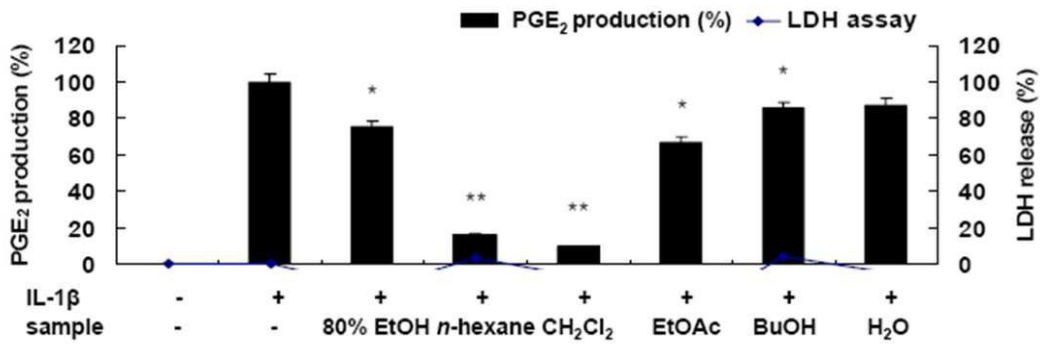
도면2



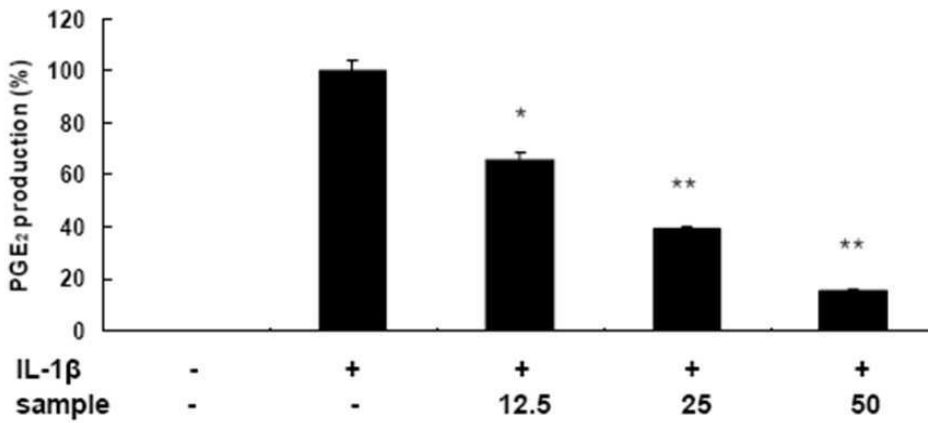
도면3



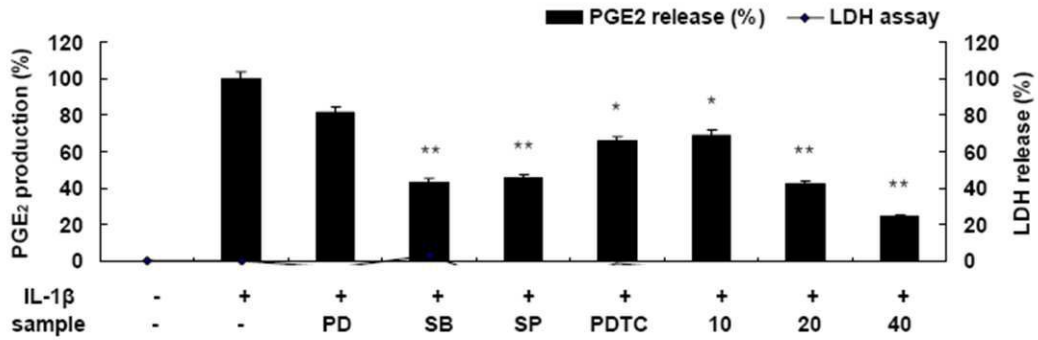
도면4



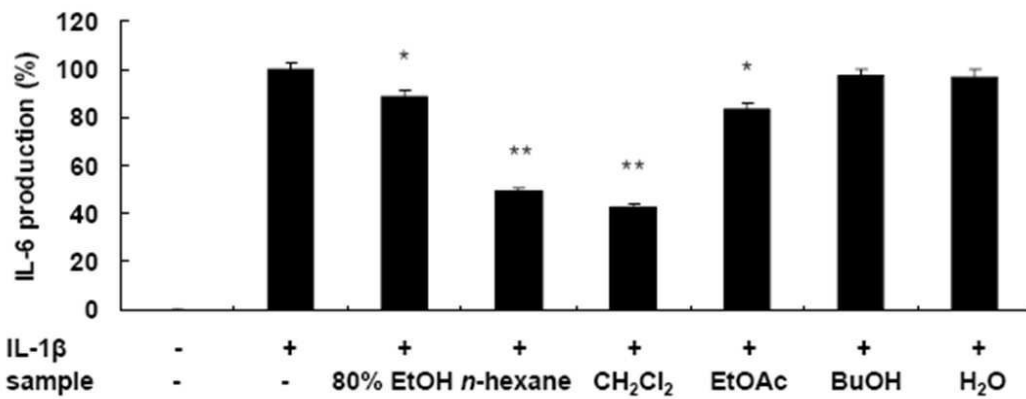
도면5



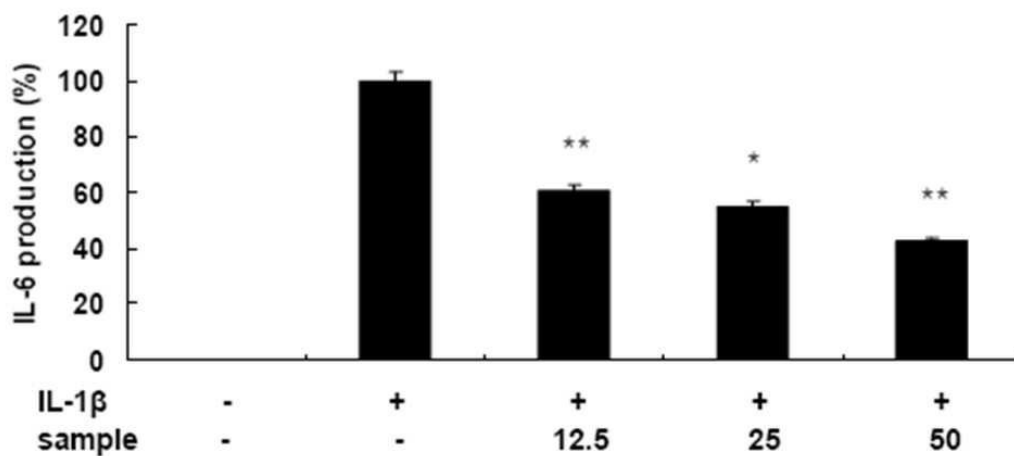
도면6



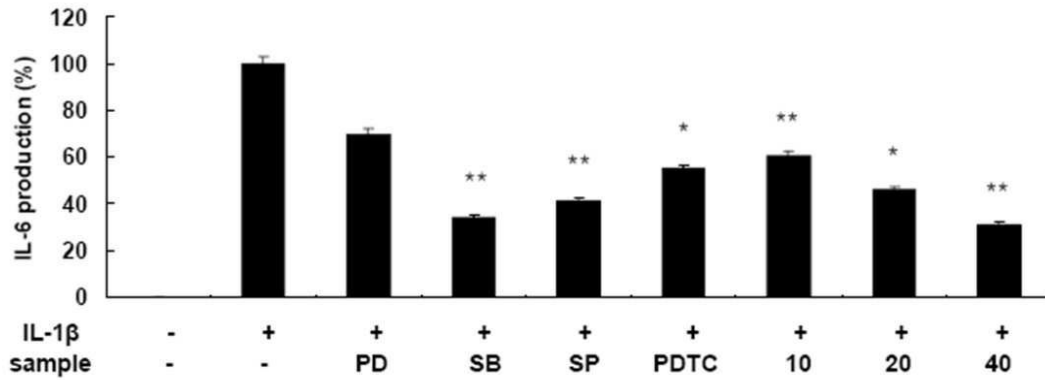
도면7



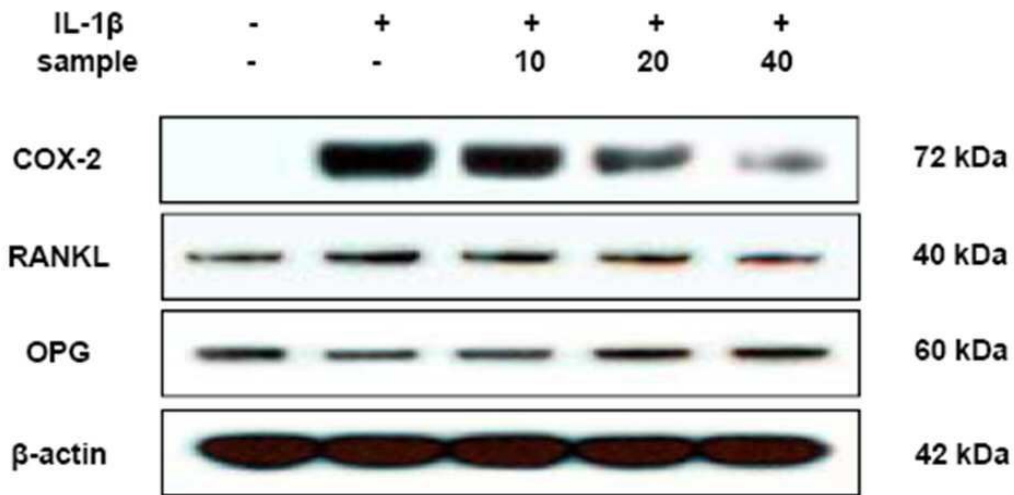
도면8



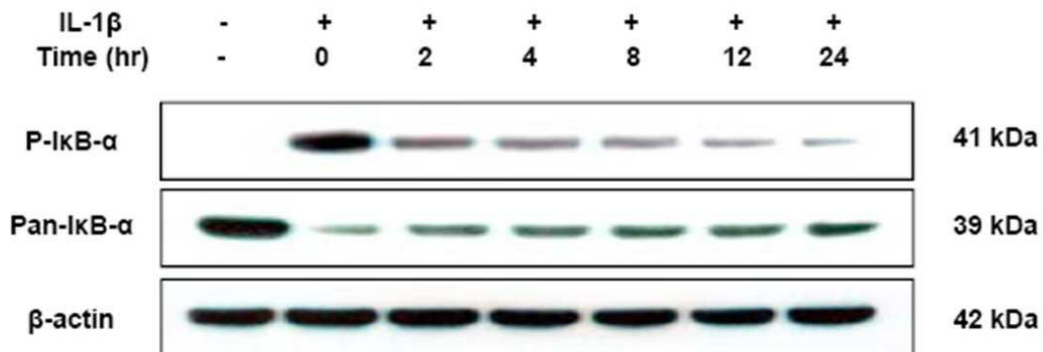
도면9



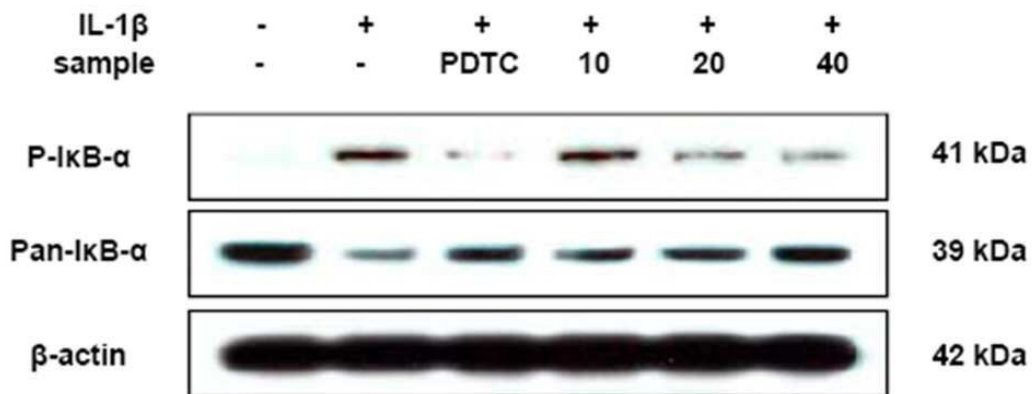
도면10



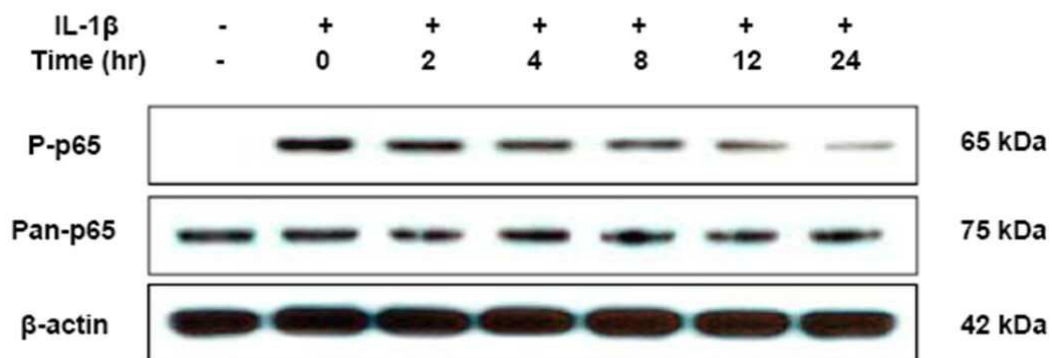
도면11



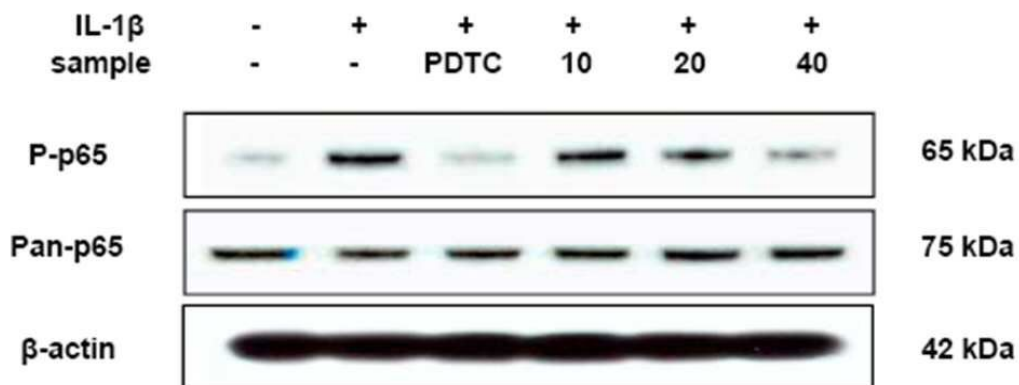
도면12



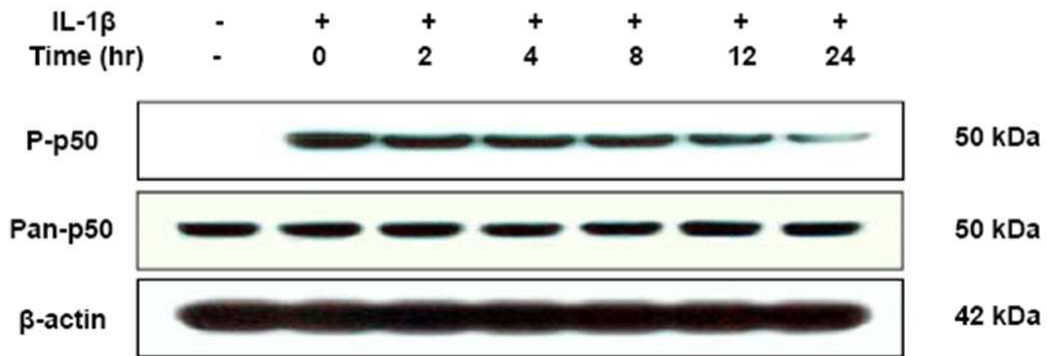
도면13



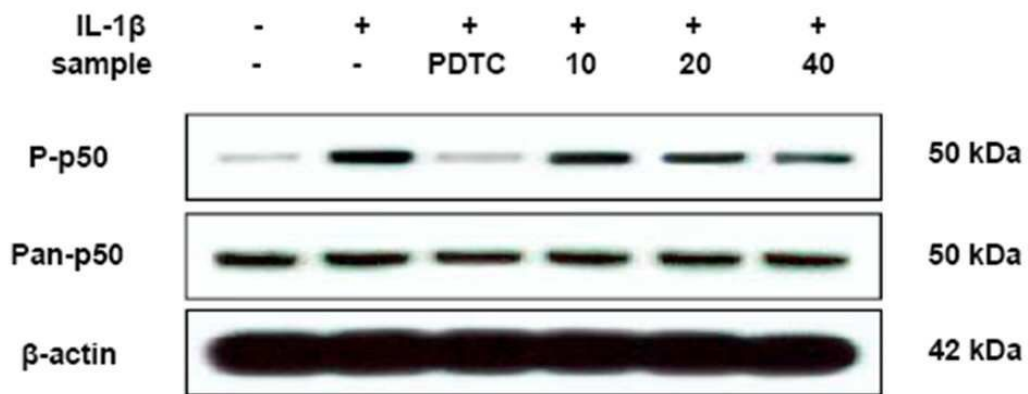
도면14



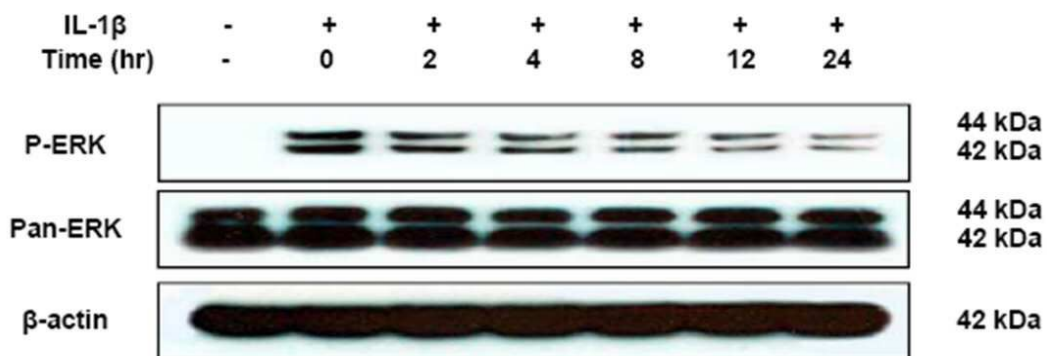
도면15



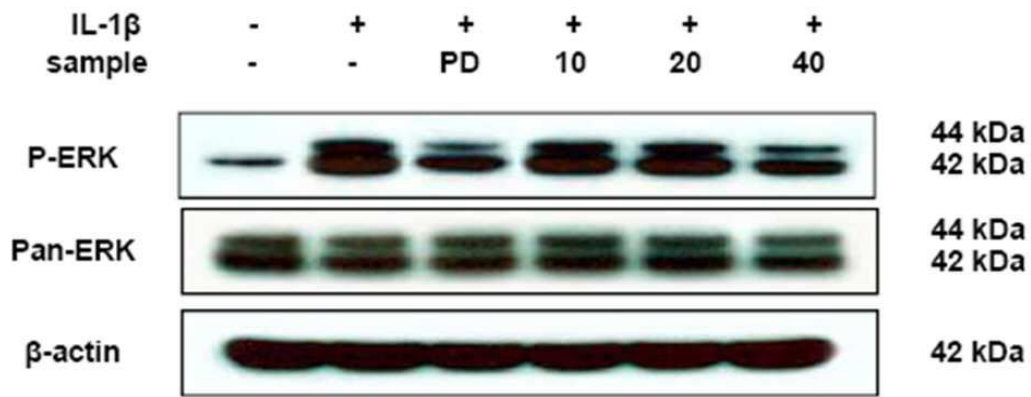
도면16



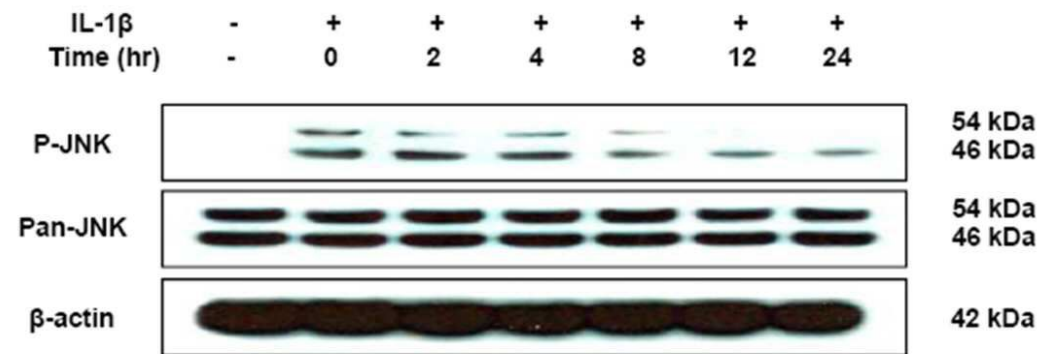
도면17



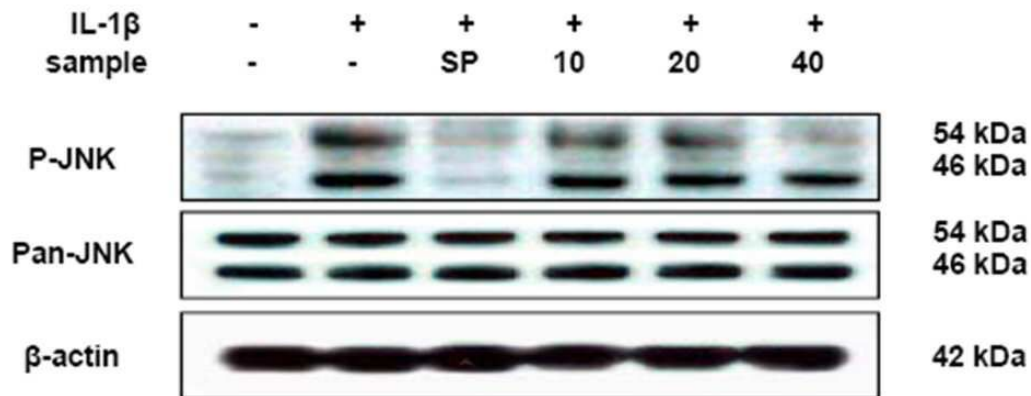
도면18



도면19

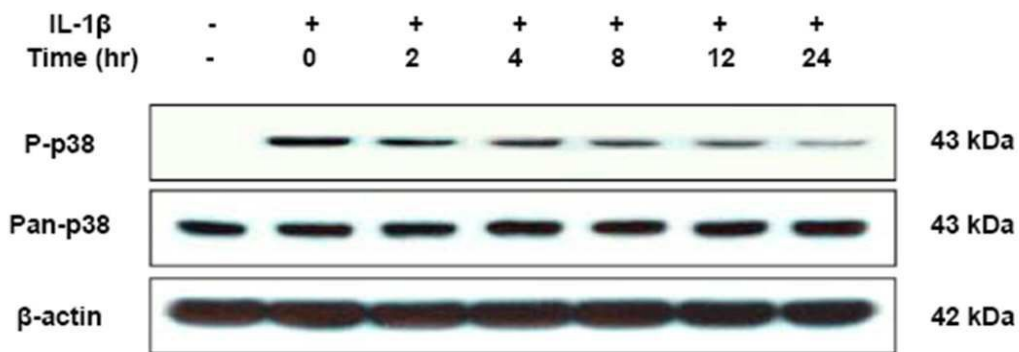


도면20

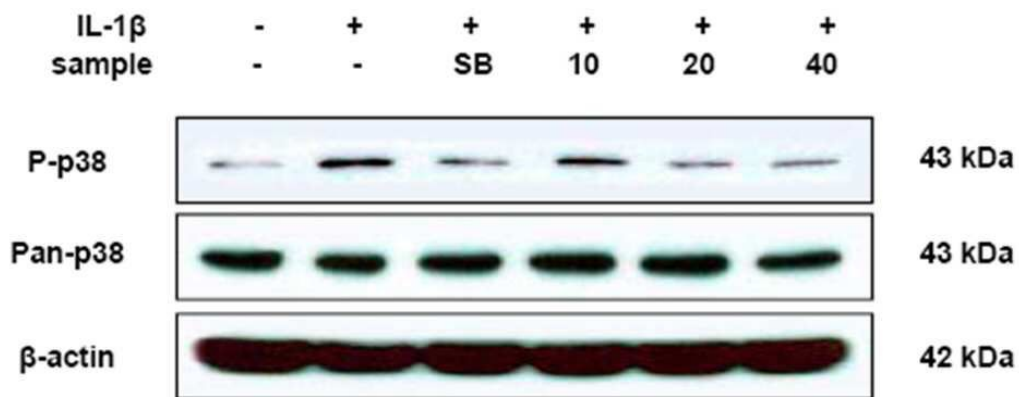




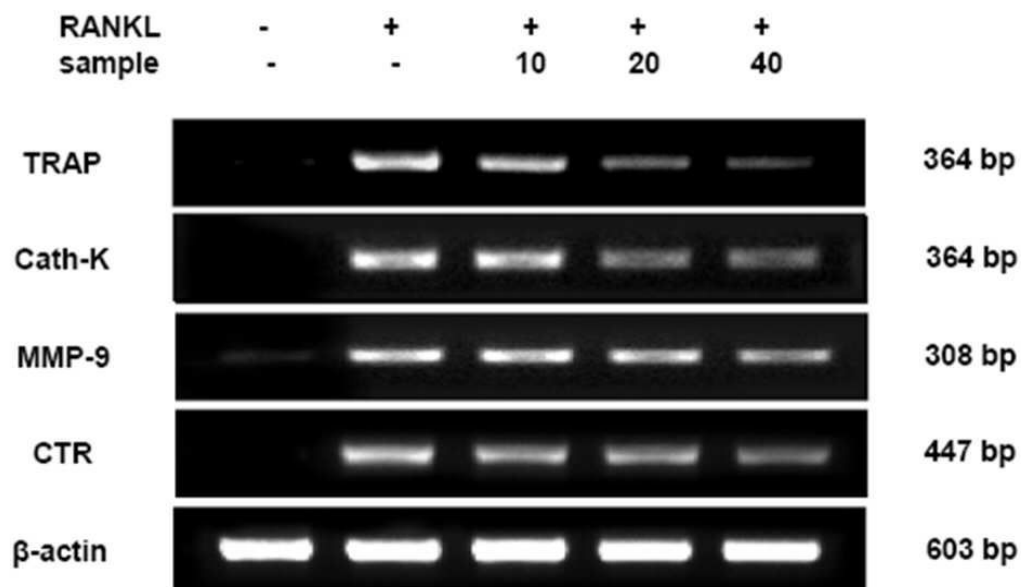
도면21



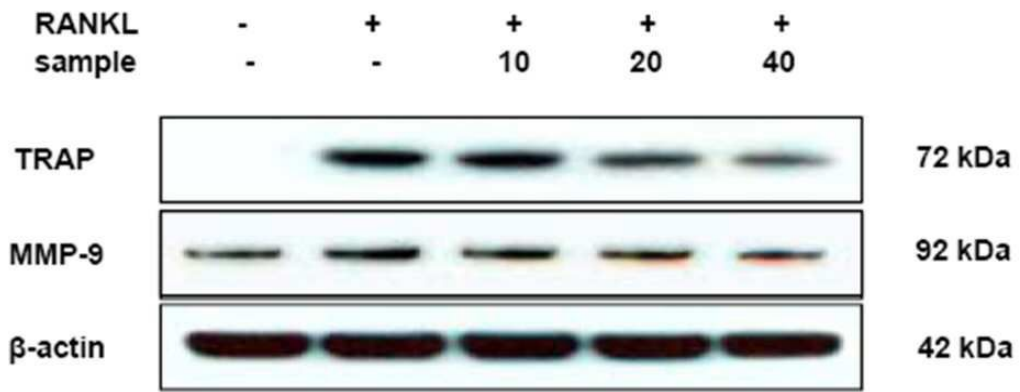
도면22



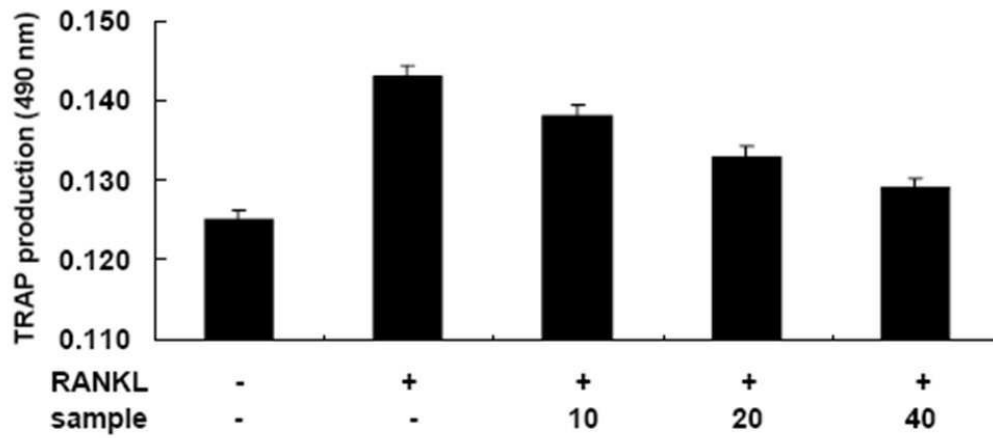
도면23



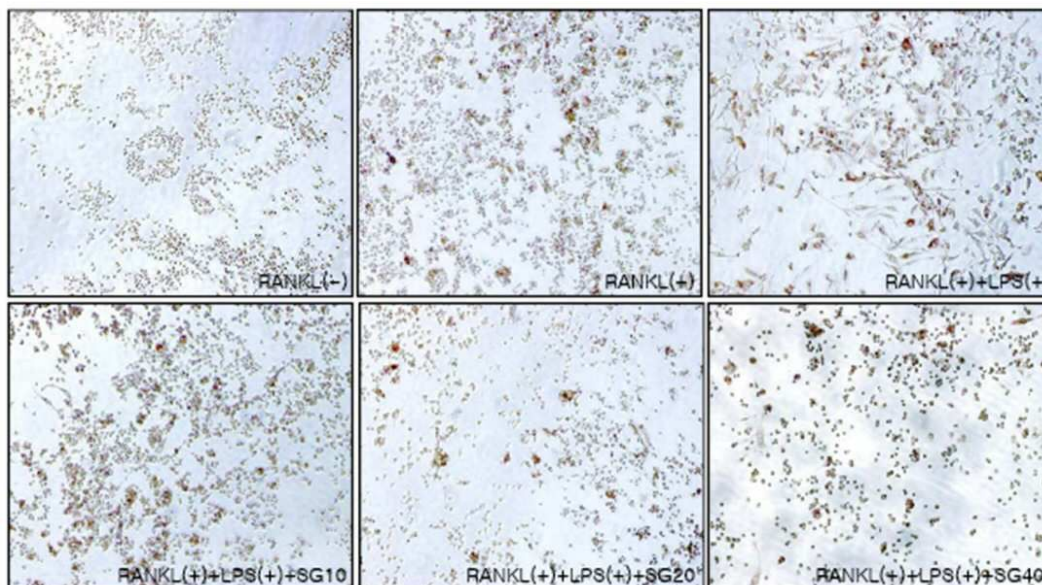
도면24



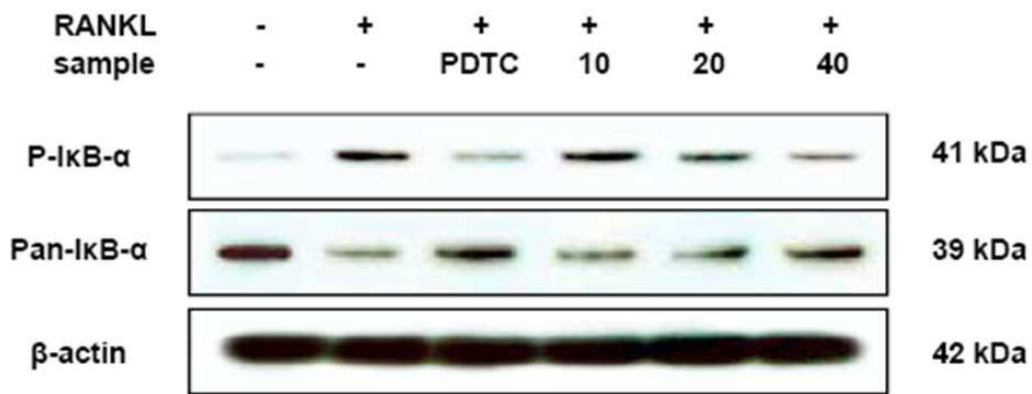
도면25



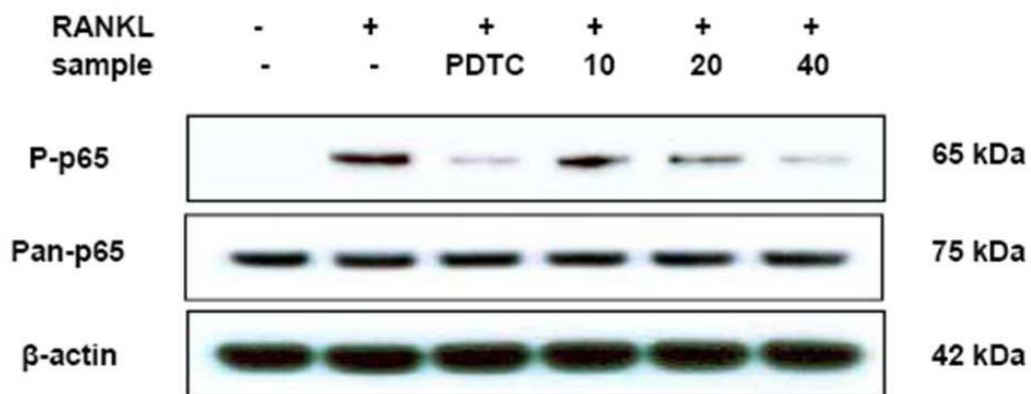
도면26



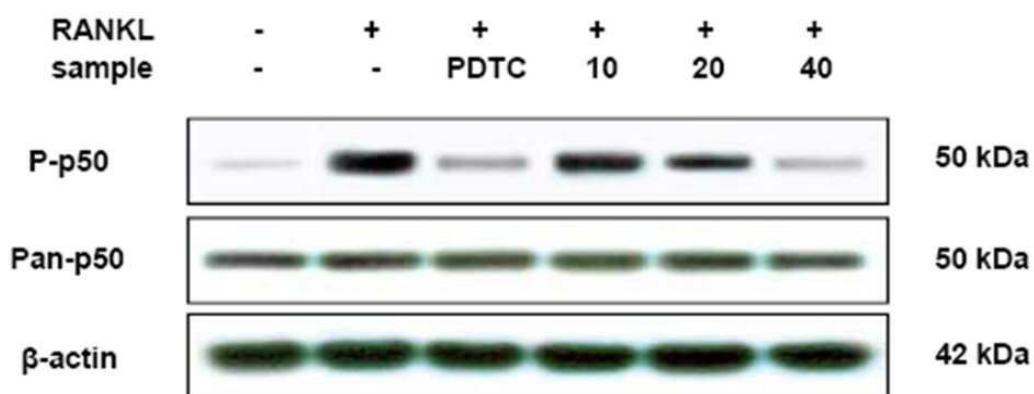
도면27



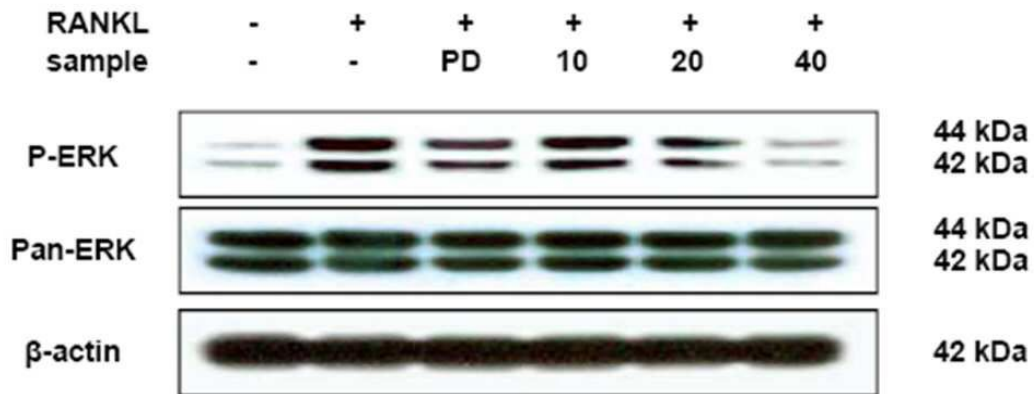
도면28



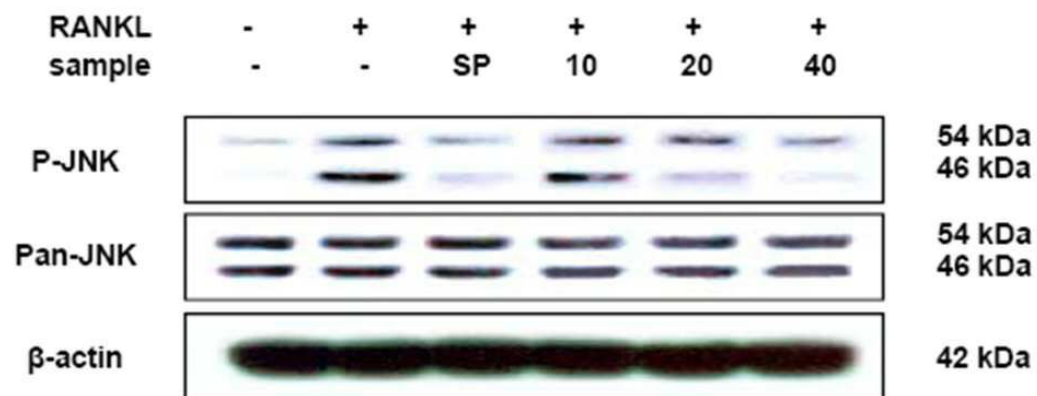
도면29



도면30



도면31



도면32

