

항염작용을 갖는 신규 생약복합제 SKI306X의 분리 및 항염작용

박광식² · 김환수 · 안재석 · 김택수 · 박병욱 ·곽의종 · 한창균 · 조용백 · 김기협
신경인더스트리 생명과학 연구소
(Received May 11, 1995)

Preparation of Antiinflammatory Herbal Drug, SKI306X.

Kwang Sik Park², Hwan-su Kim, Jae Suk Ahn, Taek Soo Kim, Pyeong-uk Park,
Wie-jong Kwak, Chang-Kyun Han, Yong-baik Cho, and Key H. Kim
Life Science Research Center, Sunkyong Industries,
Suwon, Kyungki-Do, 440-745, Korea

Abstract—Antiinflammatory activities of the solvent fractionates of several herbal medicines were investigated and SKI306X was prepared from the active principles of three herbal medicines. *Prunella vulgaris*, *Trichosanthes kirilowii* and *Clematis mandshurica*. SKI306X was shown to have strong inhibitory effects on acetic acid-induced pain, carrageenan-induced paw edema and adjuvant-induced arthritis. LD50 of SKI306X was more than 5 g/kg in rat, so generally nontoxic. Chemical analysis revealed that oleanolic acid and rutin, which are known to have various antiinflammatory activities, were contained in it. These results suggest SKI306X may become a useful drug for the treatment of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis.

Keywords □ SKI306X, herbal medicines, antiinflammation

한국, 일본 및 중국을 비롯한 동양권에서는 오래전부터 風, 寒, 濕으로 인해 발생하는 痺證 (근육 관절의 동통 혹은 감각이 둔해지거나 없어지는 증세) 을 다스리는데에 여러 종류의 다양한 생약제가 이용되어 왔다. 기성 한약서의 기록에 의하면 이러한 비증은 여러 형태로 분류되어 있는데 즉, 질병의 통처가 일정치 않고 유주하는 증상을 行痺 (風痺), 동통이 극열하고 통처가 일정한 것을 痛痺 (寒痺), 동통이 고정되고 지체가 沈重하며 살갓의 감각이 둔해지거나 없어지는 형태를 着痺 (濕痺), 관절의 발적, 종창, 동통, 열감이 심할 때를 熱痺라하였다.^{1, 2, 3)} 이러한 증상은 현대 병리학적 관점의 염증 반응과 매우 유사하며 더 좁게는 갈초 혈행 장애 및 만성 류마티스 관절염의 증상과도 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 현재 만성 류마티스 관절염은 그 원인이 명확히 밝혀져 있지 않으며 따라서 질환을 효과적으로 조절할 수 있는 치료제도 개발되어 있지

않다. 이는 만성 류마티스 관절염의 병인과 증상이 매우 복잡하고 다양하여 이들 전체 병인을 효과적으로 조절하지 못하기 때문일 것으로 추정된다.^{4, 5)} 따라서 이들 비증을 다스리고자 예로부터 사용되었던 한의학적인 치료 개념과 한방 생약의 성분 및 활성 연구를 통하여 체내에서 다양한 기능을 발현할 수 있도록 고안된 새로운 생약 복합제를 개발하고자 본 연구에 착수하였다.

실험 방법

실험재료 및 시약 - 본 실험에 사용한 생약은 서울시 동대문구 소재 한약시장에서 구입하였다. 분석용 시약을 비롯한 대부분의 시약은 특급시약을 사용하였고 추출 용매등은 일급시약을 사용하였다.

실험동물 - 진통시험에는 6주 내지 8주령의 ICR계 생쥐를 사용하였으며 급성 염증 및 만성 염증시험에는 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 혈소판 응집억제 시험은 흰쥐의 혈액을 사용하였다.

² 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

검색 생약의 선정 - 동의보감, 본초강목, 향약집성방, 의학입문, 광제비급등의 한약서와 중약대사전, 도해향약(생약)대사전, 본초학등 국내외에서 출판된 약용 식물학 관련 서적을 기초로하여 항염증 작용이 있을 것으로 기록된 각종 생약을 분류하였으며 또한 염증 질환과 관련하여 국내의 학술지에 그 약리 작용이 보고된 생약을 조사 하였다. 한편, 600 여종 생약의 약효 및 처방에 관한 자료를 입력하여 자동 분류기능을 갖도록 자체적으로 제작한 데이터 베이스등을 근거로 각 생약의 효능별 분류를 실시하였다. 이러한 자료를 바탕으로 만성류마티스 관절염 치료제 개발을 위한 1차 생리활성 검색 대상 생약 53 종을 선정하였다.

식물재료 및 SKI306X의 추출 - 각 생약 100 g을 잘게 분쇄한 후 1.5 l의 물로 3회 열탕 추출하였다. 추출액은 감압 농축후 동결 건조하여 분말형태로 얻고 이를 1차 검색 시료로 사용하였다. 1차 검색후 실시된 2차 검색은 각 생약의 분획물에 따른 활성 비교시험을 위한 것으로서 열수 추출물 및 부탄올 분획물로 나누어 실시하였다. 부탄올 분획물은 생약 1 kg을 2회 열수 추출하고 추출액을 일정 용량이하로 감압 농축한후 동량의 수포화 부탄올로 3회 추출하여 얻었다. SKI306X의 추출은 선정된 3종 생약 위령선, 과루근, 하초를 일정 중량비로 혼합하고 열수로 추출하였다. 추출액을 여과하고 일정량 이하로 농축한 후 수포화 부탄올로 3회 추출하고 용매를 농축 제거한후 동결 건조하였다.

진통 시험 - 본 실험에 사용된 *in vivo* 진통 작용 시험은 Koster의 writhing method에 따라 실시하였다.⁶⁾ 간략히 설명하면, ICR 생쥐에 각 시료를 일정 용량으로 경구 투여한 다음 1 시간 후에 0.6% acetic acid 생리 식염수액을 체중 10 g 당 0.1 ml 용량으로 복강 주사하였다. 복강 주사후 10분 후부터 10분간 각각의 생쥐가 나타내는 stretching을 통각 지표로 사용하여 그 횟수를 측정하였다. 1차 검색시 생약의 투여량은 500 mg/kg으로 경구 투여하였으며 2차 검색시는 200 mg/kg으로 실시하였다. 각 실험군의 동물수는 8마리로 하였다.

급성 염증 시험 - 급성 염증 시험은 Winter 등의 방법에 따라 실시하였다.⁷⁾ 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐에 각 시료를 일정 용량으로 경구 투여하고 1시간후 기염제로서 1% carrageenan 용액 (0.1 ml/rat)을 좌측 뒷 발바닥에 피하 주사하였다. Carrageenan 주사후 발생하는 부종의 용적을 1시간 간격

으로 plethysmometer (UGO BASILE TYPE 7150)를 사용하여 측정하고 부종억제율을 산출하였다. 1,2차 검색 시험시는 carrageenan 투여 3시간 후의 부종억제율을 측정하여 평가하였고 시료는 1차 검색시는 500 mg/kg, 2차 검색시는 200 mg/kg 용량으로 경구 투여하였다.

만성 염증 시험 - 만성 염증 시험은 kubo등의 Adjuvant-induced arthritis 시험 방법에 따라 실시하였다.⁸⁾ 본 실험에서 사용한 만성 염증의 기염제로서는 열처리된 *Mycobacterium butylicum*을 mineral oil에 현탁시킨 Freund's complete adjuvant (Difco, 0.1 ml/200 g rat, FCA)를 사용하였다. 기염제 투여 하루 전부터 15일동안 200 mg/kg 용량의 시료를 매일 1회 투여하였으며 Adjuvant에 의해 발생하는 부종의 용적은 Plethysmometer를 사용하여 측정하였다.

혈소판 응집 시험 - sodium citrate 용액을 미리 채워둔 주사기를 이용하여 흰쥐의 복대 동맥으로부터 채혈하고 200 g에서 10 분간 원심분리한 후 상등액 Platelet Rich Plasma (PRP)를 얻었다. 일부 PRP를 2,000 g 에서 10분간 재 원심 분리하여 침전을 제외한 상등액 Platelet Poor Plasma (PPP)를 얻고 이때 얻은 PPP로 혈소판 응집 실험에 사용할 PRP를 혈소판수가 2×10^8 cell/ml 농도가 되도록 희석하였다. 혈소판 응집은 collagen으로 유도하였으며 응집의 정도는 Platelet aggregometer를 사용하여 turbidometric method에 따라 측정하였다.⁹⁾ 검색시 사용된 시료의 농도는 1 mg/ml 이었다.

hyaluronidase 활성 시험 - hyaluronidase의 활성은 이 효소의 작용으로 인해 기질인 potassium hyaluronate에서 절단된 N-acetylglucosamine을 glucosazoline 유도제로 변형시킨 후 *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMBA)로 발색시켜 파장 585 nm에서 흡광도를 측정함으로써 측정한다. 간략히 서술하면 hyaluronidase를 calcium이 존재하는 acetate buffer상에서 37°C로 20분간 preincubation하여 활성화시킨 후 각각의 검색시료와 기질로서 potassium hyaluronate를 가하여 약 40분간 계속 incubation하였다. 그후 NaOH와 potassium borate를 가하여 반응을 종결시키고 100°C로 가온후 DMBA로 발색시켜 흡광도를 측정하였다.¹⁰⁾ 검색시 시료의 농도는 1 mg/ml 이었다.

SKI306X의 지표성분 분석 - 생약 복합제인 SKI

Table I— Effects of water extracts from several herbal medicines on acetic acid-induced pain, carrageenan-induced edema, platelet aggregation(PLT) and hyaluronidase activity (HYA)

생약명	학명	명	사용부위	Pain ¹⁾	Edema ¹⁾	PLT ²⁾	HYA ²⁾
감국화	<i>Chrysanthemum indicum</i>		꽃	++	++	++	+
강활	<i>Angelica koreana</i>		뿌리	++	++	++	+
계혈등	<i>Milletiae lignum</i>		줄기	++	+	+	++
고본	<i>Northosmyrnum japonicum</i>		뿌리	+	+	++	+
고삼	<i>Sophorae angustifolia</i>		뿌리	+	++	+	+
골쇄보	<i>Davallia mariesii</i>		뿌리	+	++	+	+++
금은화	<i>Lonicera japonica</i>		꽃	+	+	+	++
누로	<i>Rhaponticum uniflorum</i>		뿌리	++	+	++	++
독활	<i>Aralia cordata</i>		뿌리	++	+	++	+
마치현	<i>Portulaca oleracea</i>		전초	+	++	++	++
만형실	<i>Vitex rotundifolia</i>		과실	++	++	++	+
목과	<i>Chaenomeles sinensis</i>		과실	++	++	+	++
목단피	<i>Paeonia moutan</i>		뿌리	++	++	+++	++
목방기	<i>Cocculus orbiculatus</i>		뿌리	++	++	++	+
목통	<i>Akebia quinata</i>		줄기	+	+	+	++
방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>		뿌리	+	+	++	+
백선피	<i>Dictamnus dasycarpus</i>		뿌리	+	++	+	++
백지	<i>Angelica davurica</i>		뿌리	++	+	++	+
비해	<i>Dioscored hypoglauca</i>		뿌리	++	+	+	+
사간	<i>Belamcanda chinensis</i>		뿌리	+	++	+	++
사상자	<i>Torilis japonicus</i>		과실	++	++	+	+
산두근	<i>Cajanus indicus</i>		뿌리	+++	+++	+	++
상지	<i>Morus bombycis</i>		줄기	+	+	+	++
세신	<i>Asiasarum heterotropoides</i>		전초	+++	+++	++	++
속단	<i>Phlomis umbrosa</i>		전초	+	+	+	+
승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i>		뿌리	++	+++	+++	+++
신이	<i>Magnolia kobus</i>		꽃	++	+	+	+
연교	<i>Forsythia suspensa</i>		과실	++	++	+++	++
우방자	<i>Arctium lappa</i>		씨앗	+	++	+++	+
위령선	<i>Clematis mandshurica</i>		뿌리	+++	++	++	++
인동등	<i>Lonicera japonica</i>		줄기	+++	+	+	++
인동엽	<i>Lonicera japonica</i>		잎	++	+	+	+
작약	<i>Phaconia japonica</i>		뿌리	+++	+	++	+
잠사			누에똥	+	+	+	+++
접골목	<i>Sambucus williamsii</i>		수피	++	+	+++	++
진교	<i>Justicia gendarussa</i>		뿌리	+++	+++	+	++
진피	<i>Aurantium nobilis</i>		수피	++	+++	+++	+
장이자	<i>Xanthium strumarium</i>		씨앗	+++	+	++	+
천마	<i>Gastrodia elata</i>		뿌리	+	+	++	++
천초자	<i>Rubia akane</i>		씨앗	++	++	+++	++
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>		뿌리	+++	+++	++	++
택란	<i>Lycopus lucidus</i>		잎	+	++	++	+++
토복령	<i>Smilax china</i>		뿌리	+	+++	+++	+++
패장	<i>Patrinia scabiosifolia</i>		전초	+	++	++	+++
포공영	<i>Taraxacum officinale</i>		전초	++	++	+	+++
하고초	<i>Prunella vulgaris</i>		꽃	+++	+++	+++	+++
함환피	<i>Albizzia julibrissin</i>		수피	+	++	+	+
해동피	<i>Erythrina indica</i>		수피	+	+++	++	++
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>		뿌리	++	++	+	+
현호색	<i>Corydalis turschaninovii</i>		뿌리	++	+	++	+
형개	<i>Shizonepeta tenuifolia</i>		전초	+	+++	++	+++
황남	<i>Scutellaria baikalensis</i>		뿌리	+++	+	+++	+++
회령	<i>Siegesbeckia orientalis</i>		잎, 꽃	+++	+++	+++	+++

+++ : strong inhibition (relative activity order: 1~11), ++ : moderate inhibition (relative activity order: 12~32), + : slight or no inhibition (relative activity order: 33~53), ¹⁾dosage: 200 mg/kg, p.o., ²⁾ test concentration: 1 mg/ml

Table II— Effects of water extracts(WF) and butanol fractionates(BF) on acetic acid-induced pain, carrageenan-induced paw edema, platelet aggregation(PLT) and hyaluronidase activity(HYA)

생약명	학명	Pain ¹⁾		Edema ¹⁾		PLT ²⁾		HYA ²⁾	
		WE	BF	WE	BF	WE	BF	WE	BF
산두근	<i>Cajanus indicus</i>	B	A	A	B	B	B	B	B
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	B	A	A	C	A	A	B	B
진교	<i>Justicia gendarussa</i>	A	A	A	B	B	C	B	B
회림	<i>Siegesbeckia orientalis</i>	C	A	A	B	B	A	A	A
하고초	<i>Prunella vulgaris</i>	C	A	A	C	C	A	A	A
위령선	<i>Clematis mandshurica</i>	A	A	C	B	C	A	B	B

¹⁾ Percent inhibition A: >25~50%, C: <25%, dosage: 200 mg/kg, p.o.

²⁾ Percent inhibition A: >70%, B: 40~70% C: <40%, test concentration: 1 mg/ml

306X 1 g 을 2N-H₂SO₄ (in 50% Ethanol) 1 l 에 녹인 후 환류 장치를 이용하여 가열 상태에서 2시간 동안 가수 분해시켰다. Ethanol을 감압 농축하여 제거 한 후 동량의 diethyl ether로 3회 추출하고 추출액을 동량의 H₂O로 세척하였다. 이후 diethyl ether를 제거하고 잔사를 methanol에 녹인 후 재결정 과정을 거쳐 Compound I을 얻었다. Compound I은 NMR, IR, Mass 및 HPLC등을 이용한 기기분석을 통해 구조 확인 작업을 하였다. 한편, flavonoid류의 확인을 위해서 UV 측정에 의한 peak 분석을 실시하였고 HPLC 분석을 통해 표준 물질과의 retention time을 비교하였다.

급성 독성시험 - SD계 흰쥐를 이용하였다. 투여가능 최대 용량인 체중당 5 g/kg 용량으로 하여 공비 × 0.66으로 3.3 g/kg, 2.2g/kg, 1.5 g/kg, 및 1.0 g/kg 모두 5개의 투여 용량군을 설정하고 1회 경구투여였다. SKI306X의 투여 액량은 20 ml/kg으로 하였다.

결 과

1차 검색 생약 53종 선정 및 항염작용 검색 - 자료 검토를 실시했던 약 600여종의 생약중 만성 류마티스 관절염 질환에 유의적으로 작용할 가능성이 높은 것으로 판단된 53종의 생약을 최종적으로 선정하였다. 선정된 1차 검색 생약은 한의학에서는 주로 祛風濕藥, 解表藥, 清熱藥 및 活血藥등으로 구분된 것들이었으며 그 생약명, 학명 및 사용부위를 Table I에 나타내었다. 생약 성분의 1차 항염 작용 검색은 우선적으로 열수 추출물에 대해 실시하였으며 *in vivo* 실험으로서 진통 시험 및 급성염증 억제 시험을 먼저 실시하였다. 대다수의 NSAID는 collagen등으로 유도한 혈소판 응집을 차단한다는 보고에 따라^{11, 12)} 각 생약 추출물에 대한 혈소판 응집 억제 시험을 시행하였으며 hyaluronidase 활성

억제 실험은 이 효소가 모세 혈관 투과성의 항진 및 염증 부위에서 결합 조직의 matrix를 분해함으로써 기염제로 작용한다는 보고에 근거하였다.^{13, 14)} 각 시험 항목의 결과는 대조군에 대한 억제율로 나타내었으며 개개 시료의 억제율을 순위 평가하였다. 억제율이 상위 20% 이내에 속하는 11위까지의 시료는 +++로 표시하였고, 다음 40%에 속하는 32위까지의 시료는 ++로 표시하였다. 억제능이 약하거나 거의 없는 하위 40%에 속하는 53위까지의 시료는 +로 표시하여 Table I에 나타내었다. 부중 억제 시험의 경우는 carrageenan투여 3시간후의 억제율을 산출한 값으로 평가하였다.

2차 검색 생약 6종 선정 및 항염작용 검색 - 53종의 생약 열수 추출물에 대한 1차 검색 결과에 따라 각 단방 생약의 특성을 파악하고 2차 검색 시험을 위한 6종 생약 선정 작업을 실시하였다. 생약 복합제 개발을 위해서는 특징적인 생리 활성을 보이는 단일 생약을 직접 배합하여야 할 것으로 생각되었다. 6종 생약 선정 기준으로는 1차 검색 결과외에도 현재 공개되지 않은 본 실험실의 연구 결과, 기성 한약서의 처방례 및 생산시의 경제성 등이 포괄적으로 고려되었다. 회림과 하고초의 경우 4항목에서 모두 고른 약리 활성을 나타내었으며 특히 하고초의 경우 hyaluronidase 활성 억제 작용이 매우 우수하였다. 천화분 (과루근), 진교 및 산두근은 강한 진통작용 및 소염작용을 나타내었으며 위령선은 진통 작용이 상대적으로 강하게 나타났다. 혈소판 응집 억제 시험과 hyaluronidase 활성 억제 시험 결과 이들은 *in vivo* 시험에 비해 상대적으로 변별 작용이 약하였으나 몇종의 생약은 매우 우수한 활성을 보였다. 이상과 같은 결과를 종합하여 산두근, 천화분, 진교, 위령선, 회림 및 하고초의 6종 생약을 선정하였으며 이들 생약에 대한 2차 생리 활성 검색 시험을 계속적으로 진행하였다.

2차 검색 대상으로 선정된 하고초, 회림, 산두근, 진

교, 천화분 및 위령선 각각에 대해 먼저 열수 추출을 시행하여 분말상의 열수 추출물을 얻었으며 열수 추출물에 대한 수포화 부탄을 분획을 실시하여 부탄을 분획물을 얻었다. 이들 시료에 대해 진통작용, 급성 염증 억제 작용, 혈소판 응집 억제 작용 및 hyaluronidase 활성 억제 시험을 실시하였으며 *in vivo* 시험 결과는 억제율이 50% 이상인 경우 A, 25~50%인 경우 B, 25% 미만인 경우 C로 평가하였다. *In vitro* 시험 결과에서는 억제율이 70% 이상인 경우 A, 40~70%인 경우 B, 40% 미만인 경우 C로 평가하였다 (Table II). 별도로 만성 염증 모델로서 adjuvant-induced arthritis에 대한 억제 작용 시험과 Randall-Selitto's test¹⁵⁾에 따른 압통 실험을 진행하였으며 6종 생약 분획물에 대한 heat-induced pain¹⁶⁾에 대한 반응 실험도 실시하였다. 그 결과 상기 6종 생약의 부탄을 분획물중 산두근, 천화분 및 위령선은 만성 염증에 의한 부종과 통증을 강력히 억제하는 것으로 나타났으며 6종 생약 공히 heat-induced pain에 대해서는 대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 억제력을 나타내지 않았다 (data not shown).

생약 복합제의 제조 - 만성 류마티스 관절염을 효율적으로 조절하기 위해서는 단일 병인에 작용하는 단일 물질보다는 생체내에서 다양한 생리활성을 발현하는 생약 복합제가 보다 효율적인 것이라는 가정하에 본 연구에서는 소염 및 진통작용을 기본으로하고 면역 조절작

용, 라디칼 소거작용, 말초 혈행개선등의 생리 활성을 다양하게 발현할 수 있도록 상기 6종 생약의 활성 분획을 이용한 생약 복합제의 개발을 시도하였으며, 그 결과 6종 생약중 위령선, 천화분, 하고초를 일정한 생약 중량 비로 혼합하여 열수 추출하고 동량의 수포화 부탄올로

Table III—Effects of several combinations on acetic acid-induced writhing

Group	Dose (mg/kg)	Writhing counts	%inhibition
Control	-	20 ± (5)	-
Aspirin	100	14 ± 1(3)**	30
	200	12 ± 2(5)**	40
	400	7 ± 1(2)**	65
COM I	100	14 ± 2(5)*	30
	200	11 ± 3(7)*	45
	400	8 ± 2(5)**	60
COM II	100	14 ± 2(5)*	30
	200	12 ± 1(3)**	40
	400	9 ± 2(6)**	55
COM III	100	13 ± 2(7)**	35
	200	12 ± 3(8)**	40
	400	10 ± 1(3)**	50
COM IV	100	12 ± 2(6)**	40
	200	9 ± 1(2)**	55
	400	8 ± 1(4)**	60

¹⁵⁾ obtained from 8 mice in each group. COM I, COM II, COM III and COM IV are described in the text.

Mean ± S.E.(S.D.) * (P<0.05), ** (P<0.01)

Table IV—Effect of several combinations on carrageenan-induced paw edema

Group	Dose (mg/kg)	Percent swelling after carrageenan injection				
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Control	-	29 ± 3	57 ± 5	76 ± 5	86 ± 7	86 ± 6
	100	25 ± 1	41 ± 2*	51 ± 4**	54 ± 3**	57 ± 3**
	200	21 ± 4	33 ± 3**	39 ± 3**	42 ± 3**	45 ± 2**
Aspirin	400	18 ± 4*	29 ± 5**	33 ± 5**	34 ± 5**	37 ± 4**
	100	25 ± 3	51 ± 5	64 ± 5	68 ± 5	65 ± 6*
	200	22 ± 2	45 ± 5	49 ± 6**	53 ± 6**	51 ± 7**
COM I	400	22 ± 1	42 ± 4*	47 ± 4**	49 ± 4**	46 ± 4**
	100	29 ± 2	58 ± 6	67 ± 6	72 ± 5	67 ± 5*
	200	25 ± 3	51 ± 6	62 ± 7	65 ± 6*	62 ± 6*
COM II	400	24 ± 2	42 ± 2*	54 ± 2**	61 ± 2**	57 ± 4**
	100	25 ± 3	49 ± 4	61 ± 4*	67 ± 7	64 ± 6*
	200	25 ± 2	50 ± 2	67 ± 3	72 ± 4*	68 ± 5*
COM III	400	25 ± 2	45 ± 4	55 ± 5*	60 ± 5**	56 ± 6**
	100	30 ± 3	50 ± 6	61 ± 4*	63 ± 6*	62 ± 6*
	200	27 ± 4	51 ± 4	59 ± 5	64 ± 6*	59 ± 5**
COM IV	400	25 ± 5	46 ± 3	53 ± 3**	54 ± 3**	52 ± 3**

* P: <0.05, ** : P<0.01, significantly different from control group. COM I, COMII, COM III and COM IV are described in the text.

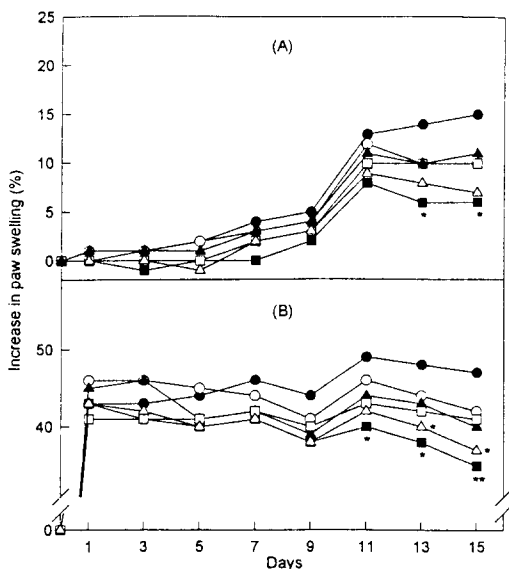


Fig. 1—Effects of combinations of herbal extract on FCA-induced arthritis in rat. A: left hind paw edema, B: right hind paw edema. Animals were daily treated with 200 mg/kg of extracts for 15 days. Each point represents the mean value obtained from eight rats. Control(●—●), aspirin(○—○), COM I(■—■), COM II(▲—▲), COM III(□—□), COM IV(△—△). COM I, COM II, COM III and COM IV are described in text. *: P<0.05 **: P<0.01. Significantly different from control group.

분획하여 제조한 생약 엑스가 만성 류마티스 관절염의 질환 조절에 보다 효과적으로 작용할 것으로 기대되어 이들 3종 생약의 활성 분획을 이용한 생약 복합제 개발에 착수하였다.

화고초, 천화분 및 위령선을 이용한 생약 복합제

Table V—Effects several extracts on acetic acid-induced writhing

Group	Dose (mg/kg)	Writhing counts (Mean value) ¹⁾	%inhibition
Control	-	20 ± 1(5)	-
ASP	100	16 ± 3(7)	20
	200	13 ± 3(8)**	35
	400	6 ± 1(3)**	70
PV	100	18 ± 1(4)	10
	200	15 ± 1(4)*	25
	400	14 ± 1(3)**	30
TK	100	15 ± 1(3)**	25
	200	13 ± 2(5)**	35
	400	11 ± 2(4)**	45
CM	100	14 ± 1(2)**	30
	200	13 ± 2(5)**	35
	400	10 ± 2(5)**	50
SKI 306X	100	13 ± 1(3)**	35
	200	12 ± 2(5)**	40
	400	9 ± 1(4)**	55

¹⁾ obtained from 8 mice in each group. ASPL aspirin, PV: *Prunella vulgaris*, TK: *Trichosanthes kirilowii*, CM: *Clematis mandshurica*. Mean ± S.E. (S.D.) *(P<0.05), ***(P<0.01)

Table VI—Effects of several extracts on carrageenan-induced paw edema

Group	Dose (mg/kg)	Percent swelling after carrageenan injection				
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Control	-	34 ± 3	51 ± 2	78 ± 4	86 ± 4	84 ± 4
ASP	100	24 ± 3*	38 ± 4*	57 ± 5**	60 ± 6**	60 ± 6**
	200	21 ± 2*	30 ± 2**	44 ± 3**	51 ± 5**	54 ± 6**
	400	18 ± 2**	27 ± 3**	39 ± 2**	41 ± 2**	40 ± 3**
PV	100	31 ± 4	47 ± 4	67 ± 3*	70 ± 3*	64 ± 4**
	200	38 ± 4	52 ± 4	70 ± 3	70 ± 4*	67 ± 3*
	400	30 ± 4	44 ± 5	58 ± 4**	57 ± 3**	55 ± 5**
TK	100	31 ± 2	51 ± 5	67 ± 8	70 ± 7	65 ± 7*
	200	31 ± 3	43 ± 6	62 ± 7	63 ± 6*	60 ± 5**
	400	31 ± 4	44 ± 5	56 ± 8	57 ± 6*	55 ± 5**
CM	100	33 ± 6	54 ± 7	73 ± 8	71 ± 10	67 ± 10
	200	31 ± 3	49 ± 6	66 ± 7	68 ± 7*	68 ± 6*
	400	30 ± 5	45 ± 5	61 ± 5*	62 ± 7*	56 ± 6**
SKI306X	100	29 ± 2	47 ± 5	59 ± 8*	58 ± 8**	54 ± 9*
	200	29 ± 5	44 ± 6	51 ± 6**	49 ± 7**	47 ± 7**
	400	27 ± 3	38 ± 3**	48 ± 5**	48 ± 5**	44 ± 5**

*P: <0.05, **: P<0.01, significantly different from control group. ASP: aspirin, PV: *Prunella vulgaris*, TK: *Trichosanthes kirilowii*, CM: *Clematis mandshurica*

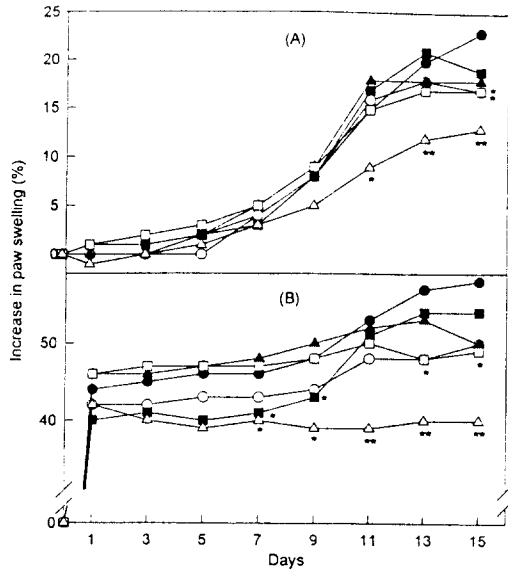


Fig. 2 — Effects of SKI306X and herbal extracts on FCA-induced arthritis in rat.

A: left hind paw edema, B: right hind paw edema. Animals were daily treated with 200 mg/kg of extracts for 15 days. Each point represents the mean value obtained from eight rats. control(●—●), aspirin(○—○), hot water extract of *Prunella vulgaris*(■—■), *Trichosanthes kirilowii*(▲—▲), *Clematis mandshurica*(□—□), and SKI306X(◇—◇). *: P<0.05, **: P<0.01. Significantly different from control group

4종의 활성 비교 - 위령선, 천화분, 하고초 3종의 건조 생약을 일정한 중량 비율로 혼합하여 추출하고 활성 분획만을 분리하여 서로 다른 생약 복합제 4종, COMI (1:2:1), COMII (5:1:1), COMIII (1:1:3), COMIV (1:1:1)를 제조하였다. 이들 복합제에 대해 진통작용, Carrageenan-유도 급성 염증 및 FCA-유도 만성 염증억제 작용을 비교 검토한 결과 이들 4종의 복합제는 시험 용량에서 모두 강한 진통작용을 나타내었으며 복합제간의 효력차는 크지 않았다 (Table III). 그러나 급성 염증 (Table IV) 및 만성 염증의 경우 (Fig.1), COMI 이 가장 우수한 효력을 나타내었다. COMI은 collagen으로 유도한 흰쥐 혈소판의 응집을 억제할 뿐만아니라 collagen에 의한 전혈 응고 작용에 대해서도 강한 억제 작용을 나타내었으며 superoxide anion에 대한 라디칼 소거 작용 및 면역 조절 작용등의 활성도 우수하였다 (data not shown). 따라서 본 연구에서는 하고초, 천화분, 위령선 건조 생약을

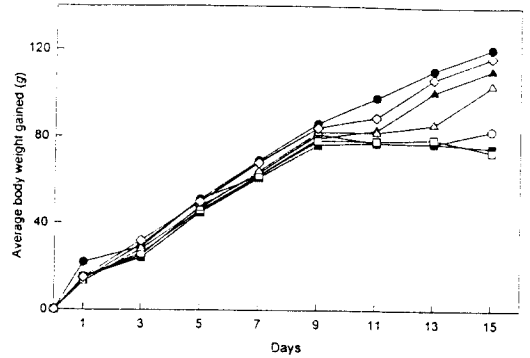


Fig. 3 — Weight gains of rats during the administration of SKI306X and herbal extracts. Animals were daily treated with 200 mg/kg extracts for 15 days. Each point represents the mean value obtained from eight rats. Naive control(●—●), FCA was not treated, control(○—○), aspirin (■—■), hot water extract of *Prunella vulgaris* (▲—▲), *Trichosanthes Kirilowii*(□—□), *Clematis mandshurica* (△—△), and SKI306X(◇—◇).

중량비 1:2:1 혼합하여 추출한 후 활성 분획물만을 분리하여 제조한 COMI을 SKI306X라 명명하고 향후 실험을 계속적으로 진행하였다.

SKI306X와 단방 생약의 활성 비교 - 기성 한약서의 처방에 의하면 위령선, 하고초, 천화분은 현대 약리학 개념의 염증 및 만성 류마티스 관절염을 완화 시키는데 널리 이용되어온 것으로 서술되어 있다. 이들로부터 제조한 SKI306X와 기성 한약서 처방에 따른 단방 생약제와의 비교 약효 실험을 실시하였다. 그 결과 SKI306X는 진통작용 (Table V), 급성염증시험 (Table VI) 및 FCA arthritis 시험 (Fig.2) 에서 단방 생약제에 비해 우수한 항염증 작용을 나타냄으로써 향후 이를 이용한 의약품 개발이 가능할 것으로 기대되었다. 특히 다른 실험 동물군과는 달리 SKI306X를 투여한 실험 동물군에서는 FCA 투여로 인한 체중 감소 현상이 일어나지 않았다 (Fig.3).

급성 독성 시험 -SKI306X에대한 경구 급성 독성 시험을 실시한 결과 전 시험 기간동안 대조군과 투여군 암, 수모두에서 폐사 및 비정상적인 임상증상이 관찰되지 않았고 모든 약물투여군에서 대조군에비해 유의성 있는 체중 변화가 나타나지 않았다. 따라서 흰쥐에서 경구투여시 SKI306X의 LD₅₀은 추정 임상 사용량의 1,000배인 5.0 g/kg 이상일 것으로 사료된다.

SKI306X의 지표성분 분석 - Compound I은 Li-

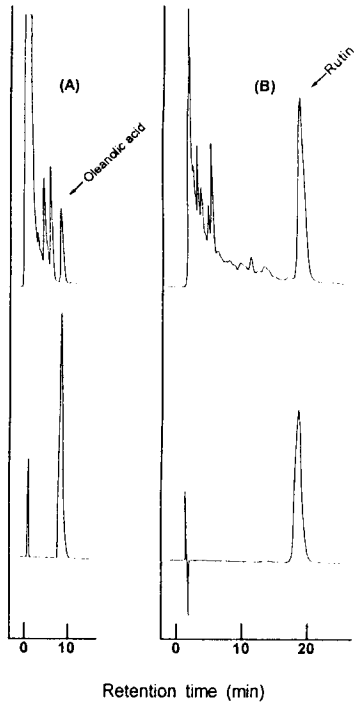


Fig. 4—Identifications of oleanolic acid(A) and rutin(B) in SKI306X by HPLC. A(upper: SKI306X, lower: oleanolic acid): Etheral extracts of acid-hydrolysates of SKI306X were injected on μ Bondapak- C_{18} column (10 μ m, 300 mm \times 4 mm I.d. Millipore), Eluent: Acetonitrile-Water(10:2, V/V), flow rate: 0.8 ml/min, detection: 213 nm. B(upper: SKI306X, rutin): Methanolic solutions of SKI306X were passed through Sep-Pak plus cartridge(silica, Millipore), then injected on m Bondapak- C_{18} column (10 mm, 300 mm \times 4 mm I.D. Millipore). Eluent: Water-Methanol-Acetic acid (70:30:5 V/V), flow rate: 1.0 ml/min, detection: 254 nm.

bermann-Buchard 반응에서 양성이고 IR spectrum에서 3424 (OH), 283 (CH), 1686 (COOH), 1458, 1388 (*gem-dimethyl*) 에서 흡수대를 나타내었다. $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과 δ 0.774, 0.778, 0.907, 0.912, 0.931, 0.998, 1.141에서 보이는 7개의 singlet은 7개의 methyl group을 나타낸 것이며 열분석 및 질량 분석등의 결과 Compound I은 triterpenoid인 oleanolic acid의 분석결과와 일치하였다. Oleanolic acid 표준품 (Sigma Chemical Co, St. Louis, U.S.A.)을 이용한 HPLC 정량 결과 SKI306X에 대한 지표성분으로서 oleanolic acid는 평균적으로 무게비 2% 이상의 함량을 보여 주었다 (Fig.4A). 또한 SKI306X는 sa-

ponin류외에도 라디칼 소거작용을 비롯한 다양한 항염증 작용을 갖는 것으로 알려져 flavonoid의 일종인 rutin을^{21, 22)} 함유하고 있는 것이 밝혀졌으며 분석 결과 중량비 0.2% 이상인 것으로 밝혀졌다 (Fig. 4B). 한편, SKI306X제조사 알콜류가 일정량 함유된 알콜성 수용액을 이용하여 일차 추출한 후 수포화 부탄올로 분획물을 제조하는 경우에도, 산 가수분해시의 지표 물질인 oleanolic acid와 rutin은 일정량 이상 함유되어 있었으며 그 약효 또한 열수 추출한 후 활성 분획을 얻는 경우와 동일한 결과를 얻었다 (data not shown).

고 찰

지금까지 생약 추출물의 생리활성 검색 실험은 주로 단일 약리 작용에 관한 검색이 주류를 이루었다. 그러나 질병의 유발원인이 매우 복잡 다양한 만성 류마티스 관절염의 경우에는 보다 다양한 생리활성을 갖는 물질을 검색할 때 비로소 효율적으로 질환을 조절할 수 있는 약물 개발이 가능할 것으로 판단되었다. 본 연구에서 이용한 위령선 (오아리), 천화분 (과루근, 하늘타리) 및 하고초 (꿀풀) 3종 한약재는 공히 각종 종기나 상처, 기관지염, 유선염, 편도선염 및 치부등의 일반적인 염증에 널리 사용되어 왔을 뿐만 아니라 특히 습비를 제거하는 작용이 있어 손발이 차거나 저린데, 무릎이 아파 걸지 못하는데, 허리와 어깨가 아픈데, 온몸에 힘이 없고 살같이 아픈데등 현대 병리학적 개념인 만성 류마티스 관절염의 증상과 유사한 질환에 이용되어 왔다. 그러나 기성 한약서나 관련 문헌에서는 대부분 이들 생약 각각에 대한 한방 의학적 약효와 제법에 대해서만 언급되어 있을 뿐 현대 의학적 관점에서의 만성 류마티스 관절염이 가지는 병태 생리학적 인자를 개선시킬 수 있는 지에 관한 구체적인 실험 자료는 보여주지 않고 있다. 더구나 이들 생약은 탕액제의 일반적 제법인 열탕 추출법으로 제조한 액제 혹은 생약 분말제로 이용되어 왔으며 이들 생약의 유효 성분을 규명하여 표준화 하고자 하는 노력은 미미하였다. 최근에 이르러서야 비로소 위령선의 혈압강화작용¹⁷⁾, 하고초의 항돌연변이원성 효과¹⁸⁾, 천화분 단백질의 면역조절기능¹⁹⁾등 약리 활성을 규명하려는 서양의학적 과학화가 시도되고 있으나 현재까지 본 연구에서 수행한 바와 같은 다양한 항염작용을 검색한 경우는 없었다. 본 연구에서는 3종 생약의 활성 분획을 분리하는 방법과 유효 성분의

추출 효율을 극대화하는 방안을 연구하였으며 그 방법에 의하여 제조한 SKI306X의 항염증 작용에 대해 구체적으로 연구하였다. 특히, 현대의학적 관점에서의 만성 류마티스 관절염의 원인이라 여겨지는 각종 병인을 정확히 파악하고, 이들 개개 병인을 극복하는 데 가장 우수한 한방 생약의 활성 분획을 적절히 조합한 생약 복합제를 개발함으로써 만성 류마티스 관절염을 보다 효율적으로 조절하고자 하였다. 風寒濕으로 인한 痺證을 개선 시키는 것으로 알려진 이들 3종 생약을 과학적으로 유용하게 이용하고자 노력한 결과 이들 3종 생약의 혼합 비율을 최적화하였으며 그 지표 성분으로는 saponin으로서 oleanolic acid와 flavonoid로서 rutin을 확인하였다. Oleanolic acid는 carrageenan으로 유도한 급성염증 및 adjuvant로 유도한 관절염 모델에 있어서도 매우 우수한 항염 작용을 가짐이 이미 보고되었을 뿐만 아니라 free radical에 의한 지질과산화도 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 사람 백혈구의 elastase의 작용을 억제하며 히스타민에 의한 혈관 투과성을 감소시킴으로써 type I allergic reaction을 억제할 수 있는 것으로 알려졌다.^{20, 23)} 또한 rutin은 은행잎 엑스에서 이미 알려진 바와 같이 flavonoid가 가지는 다양한 생리 활성을 발현할 것으로 기대된다.^{24, 25)}

본 연구에서는 SKI306X가 말초 혈행 개선작용과 라디칼 소거작용을 가지고 있을 뿐만 아니라, lipopolysaccharides 나 concanavalin A를 처리한 B cell, T cell의 증식을 억제함으로써 면역계의 과잉 반응에 의한 류마티스 관절염에도 긍정적 효과를 발현할 수 있을 것으로 기대되는 몇가지 실험 결과를 이미 얻은 바 있다. 또한 관절염의 주요 병인으로 인식되는 hyaluronidase, elastase 등에 의한 연골 조직 손상도 예방할 것으로 기대되며 이에 관한 지속적인 연구 결과를 바탕으로 하여 SKI306X는 부작용이 경감된 새로운 형태의 신규 생약복합제로서 만성 류마티스 관절염을 효율적으로 조절할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

1. 53종의 한방 생약 추출물에 대한 항염증 작용 실험 결과를 바탕으로 진통작용, 급성 및 만성 염증에 대한 작용이 우수한 신규 생약 복합제 SKI306X를 제조하였다.
2. 생약 복합제 SKI306X는 생쥐와 흰쥐에서 LD₅₀가

5 g/kg 이상으로 극히 안전하며 지표 성분으로 oleanolic acid와 rutin을 함유하고 있는 것이 밝혀졌다.

문 헌

- 1) 동의료보험찬위원회: 원본국역동의보감 (원저자: 허준), 학력개발사, 서울, p520 (1988).
- 2) 이상인, 안덕균, 신민교, 노승현, 이영중, 김선희: 한약 임상응용, 성보사, 서울 p177 (1986).
- 3) 相賀徹未: 중약대사전, 상해과학출판사, 소학관, 동경, (1985).
- 4) Lipsky, P. E.: Rheumatoid Arthritis, *Harrison's principles of internal medicine*, twelfth edition, Wilson J. E et al (eds), McGraw Hill Inc. New York, vol 2, p1437 (1991).
- 5) Mitchel, D. M. et al: Survival, Prognosis and cause of death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **29**, 706 (1986).
- 6) Koster, R., anderson, M. and de Beer, E. J.: Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **18**, 412 (1959).
- 7) Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W.: Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544 (1962).
- 8) Newbould, B. B.: Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Br. J. Pharmacol. Chemothera.* **21**, 127 (1963).
- 9) Feinstein, M. B. and Fraser, C.: Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. *J. Gen. Physiol.* **66**, 561 (1975).
- 10) Nathan, N., Arson, Jr. and Davidson, E. A.: Lysosomal hyaluronidase. *J. Biol. Chem.* **240** PC 3222 (1965).
- 11) Hamberg, M and Samuelsson, B.: Prostaglandin Endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**(9), 3400 (1974).
- 12) Mower, R. L., Landolfi, R. and Steiner, M.: Inhibition *in vitro* platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 357 (1984).
- 13) West, D. C., Hampson, I. N.: Angiogenesis induced by degradation product of hyaluronic

- acid. *Science*, **228**, 1324 (1985).
- 14) Comper, W. D. and Laurent, T. C.: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* **58**, 255 (1978).
 - 15) Randall, L. O. and Selitto, J. J.: A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **111**, 409 (1957).
 - 16) Woolfe, G. and MacDonald, A. D.: The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Dimerrol). *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **80**, 300 (1944).
 - 17) Ho, C. S., Wong, Y. H., and Chiu, K. W.: The hypotensive action of *Desmodium Styracifolium* and *Clematis chineisis*. *Am. J. Chin. Med.* **17** (3-4), 189 (1989).
 - 18) Horikawa, K., Mohri, T., Tanaka, Y. and Tokiwa, H.: Moderate inhibition of mutagenicity of benz[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by chinese medicinal herbs. *Mutagenesis* **9**, 523, (1984).
 - 19) Shaw, P. C. and Chan, W. L., and Yeung, H. W.: Minireview: trichosanthin—a protein with multiple pharmacological properties. *Life Sci.* **55** 253 (1994).
 - 20) Singh, C. B., Singh, s., Gupta, B. D. and Banerjee, S. K.: Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 458 (1992).
 - 21) Balanehru, S. and Nagarajan, B.: Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochemical. Int.* **24**, 981 (1991).
 - 22) Ying, Q. L., and Rinehart, A. R., and Simon, S. R., Cheronis, J. C.: Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. Evidence a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochemic. J.* **277**(Pt2), 521 (1991).
 - 23) Dai, Y., Hang, B. Q., Li, P. Z. and Tan, L. W.: Effects of oleanolic acid on immune system and type I allergic reaction. *Chung-Kuo-Tao-Li-Hsueh-Pao.* **10**, 381 (1989).
 - 24) Hanasaki, Y., Ogawa, S. and Fukui, S.: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 845 (1994).
 - 25) Elliott, M. Jr. and Chithan, K.: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. *The Flavonoids* Harbon, J. B.(eds), Chapman & Hall, London, p619 (1993).