

백두옹엑스 분획물의 소염진통작용

천선아,¹ 최병기,¹ 정춘식,² 이대위,³ 이은방^{3,*}

¹동덕여자대학교 약학대학, ²덕성여자대학교 약학대학, ³서울대학교 천연물과학연구소

The Anti-inflammatory and Analgesic Actions of the fractions from *Pulsatilla koreana* Root Extract

Seon Ah Cheon,¹ Byung Kee Choi,¹ Choon Sik Jeong,² Dawei Li³ and Eun Bang Lee^{3,*}

¹College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714,

²College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714,

³Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-470, Korea

Abstract – From our previous report, the water extract of *Pulsatilla koreana* root was found to have potent anti-inflammatory and analgesic actions in intravenous administration in animals. Among chloroform, ethyl acetate, butanol and water fractions which were obtained through successive fractionation of the extract, only the water fraction was found to have the antiinflammatory and analgesic actions. The fraction did not affect normal body temperature at the effective doses in mice and showed low acute toxicity of which LD₅₀ was less than 500 mg/kg i.v. in mice. It is interesting that its anti-inflammatory action might be attributed in part to inhibition of cyclooxygenase-1 and -2.

Key words – *Pulsatilla koreana*, Ranunculaceae, root, water extract, anti-inflammatory action, analgesic action, COX-1, COX-2, acute toxicity

전보¹⁾에서 저자들은 백두옹 추출물의 소염 진통작용 실험에서 메탄올 추출물 및 물 추출물이 동물에 경구투여시에 작용이 없으나 정맥투여시에 작용이 있으며 메탄올 추출물보다 물 추출물이 더욱 강력하다는 것을 보고한 바 있다.

본 연구는 물 추출물을 다시 분획하여 그 분획물에 대한 소염진통작용을 추기한 것이다. 실험 실시에 있어서 전보에서 지적한 바와 같이 중국에서 정맥투여 제제가 소개되어 있으므로²⁾ 이 실험에서도 정맥투여로서 효능실험을 실시하였다.

재료 및 방법

검체 – 이 실험에 사용한 백두옹은 시중 한약건재 상에서 구입하였고, 수육상에서 4시간씩 3회 추출 여과하고 여액을 감압농축하여 조말한 백두옹을 증류수로 수육상에서 6시간씩 3회 추출 여과하고 여액을 감

압농축하여 물 추출물을 얻었고, 이 건조 엑스를 chloroform, ethyl acetate 및 butanol로 계통적으로 분획을 실시하고 나머지 물층과 함께 감압농축하고 건조하여 검체로 하였다.

각 검체는 생리식염수에 용해하거나 1% CMC 용액에 현탁하여 투여하였다. 검액 조제시에는 생쥐의 경우에는 체중 kg당 10 ml가 투여되도록 하고, 흰쥐의 경우에는 체중 kg당 5 ml가 주입되도록 하였으며, 실험 직전에 조제하여 사용하였다.

시약 – Carrageenan(Type IV), Pontamine sky blue, Bovine serum albumin, Phenyl-*p*-benzoquinone, Brewer's yeast, Aspirin, Lipopolysaccharide, Calcium ionophore A23187는 Sigma Chem. Co. (USA)의 제품을 사용하였다. Sodium carboxymethyl cellulose (CMC)는 Junsei Chem. Co. (Japan)의 제품을, 단백질 분석용 시약은 Bio-rad (USA)의 것을, [1-¹⁴C] arachidonic acid는 Dupont Company (USA)의 제품을 사용하였다. HEL cell과 J774A.1 cell은 American Type Culture Collection (USA)을 사용하였으며, TLC

*교신저자 : Fax : 02-764-7497

aluminium sheet (silica gel 60W)는 E. Merck (Germany)의 제품을 사용하였다. 기타 시약 및 추출용매는 대한약전품 또는 분석용 일급시약을 사용하였다.

실험동물 - 체중 20~30 g의 ICR계 수컷 생쥐와 체중 100~250 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 서울대학교 천연물과학연구소로부터 공급받아 2주일 이상 적응시킨 후, 실험에 사용하였고, 사육시에는 삼양 유지의 고형사료 및 상수를 자유로이 섭취토록 하였다. 동물실 내 (22-25°C)의 명암은 12시간씩으로 자동조절시켰다.

소염작용실험

항부종작용 - Winter 등의 방법³⁾에 따라서 실시하였다. 즉, 체중 150-160 g의 흰쥐를 하룻밤 절식시킨 뒤, 뒷발의 용적(V_n)을 측정하였다. 1% 카라기난-생리식염액 0.1 ml를 흰쥐 뒷발바닥에 피하주사하고, 일정 시간 간격으로 뒷발의 용적(V_t)을 plethysmometer (Ugo Basile, Varese, Italy)로 측정하였다. 검체는 경구투여시에는 카라기난용액 주사 30분 전에 주입하였고, 정맥내로 투여할 때는 카라기난용액 주사 직전에 꼬리정맥으로 주입하였다. 부종 유발전의 용적(V_n)을 기준으로하여 그 증가율을 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{부종증가율(\%)} = \frac{V_t - V_n}{V_n} \times 100$$

부종의 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{부종억제율(\%)} =$$

$$\frac{\text{대조군의 부종증가율} - \text{투약군의 부종증가율}}{\text{대조군의 부종증가율}} \times 100$$

카라기난의 종류와 type은 여러 가지가 있으나, Sigma Chem. Co.의 type IV(λ)가 가장 강한 기염 물질이었으므로⁴⁾ 본 실험에서도 type IV를 사용하였다. 상기의 실험을 생쥐에 대하여도 실시하였다.

모세혈관투과성 억제작용 - Whittle 등의 방법⁵⁾에 준하여, 검체가 단백질 친화성 색소의 모세혈관 투과성에 미치는 영향을 검토하였다. 즉, 0.7% 초산-생리식염액을 0.1 ml/10 g씩 생쥐의 복강내에 주사하여 혈관투과성을 증대시키고, 30분 후에 pontamine sky blue 4%액 0.1 ml 씩을 꼬리에 정맥주사하였다. 30분 후, 복강 액을 채취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음, 자외부 흡수스펙트럼하에서 혈관투과

성의 정도를 검정하였다. 검체는 경구투여시에 초산-생리식염액 투여 30분 전에, 정맥투여시에는 초산-생리식염액 투여 직전에 주입하였다.

백혈구유주 억제작용 - 검체가 백혈구유주에 미치는 영향을 평가하기 위하여 CMC air-pouch법⁶⁾으로 실험을 실시하였다. 즉, 200-250 g의 흰쥐 7마리를 1군으로 하여 등부위의 털을 제거하고 소독하여 공기 8 ml를 피하주사하여 air-pouch를 형성시켰으며, 공기 낭이 형성된 24시간 뒤, 멸균된 2% CMC-생리식염액 5 ml를 공기낭 내에 주입하여 백혈구유주를 유발시켰다. 6시간 후 낭 속의 삼출액을 전액 취해서 계량한 후, 일정량을 취해서 이중의 백혈구를 Cell-Dyn 3500 (Abbott Co. Ltd., IL, USA)을 이용하여 계수하였다. 삼출액중 단백질의 양은 Bradford의 방법⁷⁾으로 정량하였다. 즉 삼출액 일정량을 취해 원심분리하여 백혈구를 침전시키고, 상정액 100 μ l와 Bio-rad 단백 분석용 염색시약 5 ml를 5분간 반응시킨 후, 610 nm에서 microplate reader (Molecular Devices Co. Ltd., USA)로 측정하였다. 이때 BSA를 표준물질로 하여 단백질량을 측정하였다. 검체는 낭 내 주입시 2% CMC-생리식염액에 함께 현탁시켜 주입하였고, 정맥내 투여시 2% CMC-생리식염액 투여직전에 주입하였다.

진통작용실험

Penyl-p-benzoquinone(PBQ)유발 writhing 증상 억제작용 - Hendershot 등의 방법⁸⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 25 g 내외의 생쥐에 0.02%의 phenyl-p-benzoquinone(PBQ) 에탄올수용액을 0.1 ml/10 g씩 복강주사한 5분후부터 10분간의 writhing증상의 발생수를 계수하였다. 이때 PBQ는 10 mg을 2.5 ml의 따뜻한 에탄올에 용해시킨 후, 50~60°C의 증류수를 가하여 전체양이 50 ml가 되도록 하였고 실험기간 동안 40°C를 유지하도록 하였다. 검체는 PBQ 주입 직전에 정맥내로 투여하였다.

Randall-Selitto법 - 체중 100-110 g의 흰쥐를 1군 8마리로 하여 Randall 및 Selitto⁹⁾ 방법에 준하여 실시하였다. 이 방법은 염증부위의 동통에 대한 감수성을 증대시켜 그 증대된 감수성이 진통제에 의해 억제되는 것에 기초한 것이다. 즉, 흰쥐를 하룻밤 절식시킨 뒤, analgesy meter (Ugo Basile, Varese, Italy)를 이용하여 300 g의 압력에서도 반응하지 않는 흰쥐를 먼저 제외시킨 다음, 20% brewer's yeast-생리식염수 현탁액 0.1 ml씩을 흰쥐의 발바닥에 피하주사하

여 염증을 유발시키고, 2시간 후에 검체를 투여한 다음, 일정시간 후에 analgesy meter로 동통역치(g)를 측정하였다. 동통역치는 흰쥐의 발바닥에 16 g/sec의 속도로 서서히 압력을 가하여, 흰쥐가 발을 빼려고 하거나 몸을 뒤틀 때를 동통반응으로 하였다. 또, Swingle의 방법¹⁰⁾에 따라서 약물 투여군의 각 동통역치가 대조군의 평균 동통역치의 표준편차의 2배보다 더 클 때를 동통의 억제작용 (protected)으로 하여 진통작용을 표시하였다.

Cyclooxygenase-1 억제작용

Prostaglandin류의 생합성 억제능을 찾기 위해서 radio-labelled arachidonic acid를 이용하여 생성된 metabolite들을 정량함으로써 억제효과를 검사하였다. Cyclooxygenase(COX)-1 assay에는 human erythroleukemia cell line(HEL)을 사용하였으며, Moroney 등¹¹⁾의 방법을 사용하였다. HEL세포주는 37°C, 5% CO₂ 및 100% 습도가 유지되는 인큐베이터에서 배양하였으며, 배지는 5% fetal bovine serum 및 100×antibioticantimycotic 용액을 함유한 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 3~4일간 배양시킨 HEL 세포주를 24-well microtiter plate에 2×10⁶ cells/well이 되도록 분주한 다음, 각 농도의 검체를 처리하여 상기와 같은 조건의 인큐베이터에 두었다. 이때, 검체는 DMSO에 용해시켰다. 24시간 후, 3000 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 침전물(cell)만을 취하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)과 혼합하였다. 다시 원심분리한 후 상등액은 버리고 저류된 cell만을 취하여 200 μl의 PBS를 넣고 잘 섞은 다음, 1 μM calcium ionophore A 23187과 [1-¹⁴C] arachidonic acid 용액 (in EtOH, 0.05 μCi/ml)를 넣은 후, 1M citric acid 10 μl를 넣어 pH를 3.5로 맞추고 10분간 반응시켰다. 이 혼합물 200 μl에 ethyl acetate 500 μl를 넣고 10분 동안 진탕하여 COX 대사산물인 prostanoid를 추출하였다. 25000 g에서 3분간 원심분리하여 ethyl acetate층을 얻어내고 speed vacuum dryer를 이용하여 30분 동안 농축한 다음, 다시 200 μl의 ethyl acetate에 녹여 TLC를 실시하였다. 이때, 전개용매는 CHCl₃-MeOH-HAc-H₂O (90:10:1:1)를 사용하였고, 실온에서 90분간 전개시켰다. ¹⁴C-labelled prostanoid의 검출을 위해 autoradiography를 수행하였는데 TLC plate를 Fuji BAS-III's imaging plate에 부착시켜 48시간 동안 두어 감광시켰다.¹²⁾ BAS-1500 bioimaging analyzer (Fuji Photo Film Co.

Ltd., Japan)를 사용하여 prostanoid bands를 정량하였다. 검체의 COX-1 억제 정도는 검체 대신 DMSO만 처리한 대조군의 ¹⁴C-labelled prostanoid의 양과 비교(% of control)하였다.

Cyclooxygenase-2 억제작용

COX-2 assay에는 lipopolysaccharide로 활성화시킨 mouse macrophage cells (J774A.1)을 사용하였다. 세포배양과 enzyme induction은 Arias 등¹³⁾의 방법에 준하였다. J774A.1 macrophage를 배양시킨 인큐베이터의 온도는 37°C로 하였으며, 100% 습도 및 5%의 CO₂가 유지되도록 하였다. 이때 배지는 5% fetal bovine serum 및 100×antibiotic-antimycotic 용액을 함유한 RPMI 1640 배지를 사용하였고, 150 cm² tissue culture flask에서 3~4일 배양하였다. 배양된 J774A.1 macrophage를 2×10⁶개/ml가 되도록 희석한 다음, 24 well plate에 1 ml씩 분주하고, 37°C의 인큐베이터에서 안정화시켜 cell이 plate 기벽에 잘 부착되도록 하였다. 24시간 후, COX-1의 활성을 배제하기 위하여 aspirin(최종농도 0.4 μg/ml)을 첨가하고, COX-2를 유도하기 위하여¹⁴⁾ LPS (2.5 μg/ml)를 넣은 다음, 각 농도의 검체를 주입하고 상기와 같은 조건의 인큐베이터에 두었다. 48시간 후에 COX-2 억제효과를 검토하였다. 이때, COX-2에 대한 검체의 억제효과의 판정은 COX-1 assay와 같은 방법으로 하였다. 즉, 위의 과정을 거친 cell에 1 μM calcium ionophore A 23187, [1-¹⁴C] arachidonic acid solution, 1M citric acid를 넣어 10분간 반응시켰다. 이 혼합물에 ethyl acetate를 첨가하여 arachidonic acid의 cyclooxygenase에 의한 대사산물인 prostanoid를 추출하였다. prostanoid는 TLC 전개 후 autoradiography (Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan)에 의해 정량하였다. 대조군과 검체처리군의 prostanoid의 양을 비교하여 검체의 COX-2 억제 정도를 검색하였다.

정상체온에 미치는 영향

숫컷 생쥐의 직장체온을 디지털 전자체온계 (Shibaura Electronics, Japan)로 측정한 다음, 안정적인 것을 선택하여 검체를 정맥투여하였다. 정맥투여 5분, 1시간 및 3시간 후에 직장체온을 다시 측정하여 변화를 관찰하였다.

급성독성실험

순화기간 중 건강하다고 판정된 흰쥐에 대하여 체

중을 측정하고 평균 체중에 가까운 개체들이 골고루 들어가도록 무작위법을 이용, 군분리를 실시하였다. 흰쥐 6마리를 1군으로 하여 검체를 349 및 500 mg/kg을 정맥주사한 후, 1주일까지의 사망수를 계수하였다. 이 때, 체중을 시험기간 중 4회 측정하였다.

통계학적 처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차로 나타내었고, 각 군간의 비교는 Student's t-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 p 값이 5% 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

물 엑스 각 분획물의 수율 - 백두옹 1791 g을 10 시간씩 3회 수욕상에서 물로 추출하여 얻은 침출액을 동결건조하였을 때, 377 g의 엑스를 얻어 21%의 수율을 나타내었다. 이 엑스로 분획을 실시하였을 때, chloroform 분획이 각각 1.0%, ethyl acetate 분획이 1.9%, butanol 분획이 27.4% 그리고 나머지 잔여 물 분획물이 69.7%로써 대부분이 butanol과 물 분획물로 나누었다.

항부종작용 - 물 추출물을 계통적으로 분획하였다. 각 분획물의 투여용량은 앞서 검색했던 물엑스 500 mg/kg에 해당하는 양을 각 수율에 따라 계산하여 정하였다. 카라기난유발 부종을 생쥐에 적용시켰을 때, 각 분획물의 억제결과는 Table I에 표시하였다. Chloroform, ethyl acetate 및 butanol 분획물 투여시에는 부종의 억제가 전혀 인정되지 않았다. 그러나 물 분

획물 투여시에는 1시간 및 2시간에서 대조군에 비하여 27.5% 정도를 억제하여 유의적인 차이를 보였지만, 3, 4시간에서는 비하여 약간 억제하였지만 유의적인 차이는 아니었다. 한편, 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군에서도 카라기난 주입 3시간째에만 유의적이었다. 흰쥐에 다시 각 분획물의 카라기난유발 부종을 적용시켜 그 효과를 비교하였다.

이 결과는 Table II에 나타내었는데, 생쥐에 카라기난을 주입했을 때와 마찬가지로 chloroform 분획, ethyl acetate 분획 및 butanol 분획의 투여시에는 부종을 억제하지 못하였다. 그러나 가장 높은 수율을 나타낸 물 분획물 349 mg/kg 투여시에는 카라기난 주입 후 1, 2, 3 및 4시간에 각각 대조군에 비하여 60.9%, 64.4%, 67.4% 및 63.8%의 높은 억제율을 보이며 유의적인 차이를 나타내었다. 이것은 부종 억제 정도가 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군과 비슷하였다. 이것으로 물 엑스의 소염작용은 물분획의 어떤 성분에 기인한 것으로 보인다.

모세혈관 투과성 억제 작용 - Table III은 물분획물의 모세혈관 투과성에 미치는 영향을 검토한 결과이다. Saline 투여군의 복강내에 삼출된 pontamine sky blue의 농도가 156.3 µg인데 비하여 물분획 175 mg/kg 투여시에는 78.9 µg으로써 49.5%를 억제하였으며, 349 mg/kg 투여시에는 67.0 µg으로써 57.1%의 높은 억제율을 나타내어 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 이것은 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군보다도 더 높은 억제 효과를 나타낸 것이다.

백혈구 유주 억제 작용 - CMC를 공기낭내에 주입한 6시간 후의 삼출액 중의 백혈구 수는 mm³당

Table I. The effect of the various fractions obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on carrageenan-induced paw edema in mice

Treatment	Dose (mg/kg, iv)	No. of animals	Increase(%) in paw volume			
			1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
Saline	—	7	80.0 ± 6.9	72.0 ± 7.9	67.2 ± 7.6	54.5 ± 9.2
CHCl ₃ fraction	5.0	7	73.0 ± 4.4 (8.7)	70.5 ± 3.7 (2.0)	55.8 ± 6.0 (17.0)	41.7 ± 4.2 (23.5)
EtOAc fraction	9.5	7	93.5 ± 8.0 (-17.0)	84.4 ± 7.3 (-17.3)	81.3 ± 5.2 (-21.1)	66.1 ± 6.1 (-21.3)
BuOH fraction	137	7	89.4 ± 8.9 (-11.8)	76.9 ± 5.7 (-6.8)	74.6 ± 5.5 (-11.0)	51.7 ± 5.6 (5.2)
Water fraction	349	7	58.0 ± 4.2* (27.5)	52.1 ± 4.4* (27.6)	49.9 ± 5.1 (25.8)	42.3 ± 5.7 (22.3)
Piroxicam	2	7	62.2 ± 7.3 (22.2)	54.4 ± 3.1 (24.4)	42.6 ± 5.3* (36.6)	34.6 ± 6.5 (36.5)

Significantly different from the saline group (*; p<0.05)
The figures in parentheses indicate inhibition ratios(%).

Table II. The effect of the various fractions obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on carrageenan-induced paw edema in rats

Treatment	Dose (mg/kg, iv)	No. of animals	Increase(%) in paw volume			
			1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
Saline	—	7	79.5 ± 4.4	95.5 ± 9.7	110.8 ± 5.8	104.8 ± 4.6
CHCl ₃ fraction	5.0	7	77.4 ± 7.2 (2.7)	90.6 ± 9.9 (5.1)	94.0 ± 5.6 (15.2)	92.4 ± 5.9 (11.8)
EtOAc fraction	9.5	7	74.6 ± 11.6 (6.2)	87.5 ± 9.8 (8.3)	96.0 ± 5.0 (13.4)	102.4 ± 7.0 (2.2)
BuOH fraction	137	7	67.5 ± 6.8 (15.1)	104.0 ± 7.3 (-8.9)	104.6 ± 9.3 (5.6)	116.7 ± 12.8 (-11.5)
Water fraction	349	7	31.1 ± 3.2* (60.9)	33.9 ± 2.6* (64.4)	36.1 ± 3.6* (67.4)	37.9 ± 3.5* (63.8)
Piroxicam	2	7	33.9 ± 2.0* (57.4)	32.9 ± 4.0* (65.5)	36.6 ± 5.1* (67.0)	34.3 ± 6.9* (67.3)

Significantly different from the saline group (*; p<0.01)

The figures in parentheses indicate inhibition ratios (%)

Table III. The effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on vascular permeability in mice

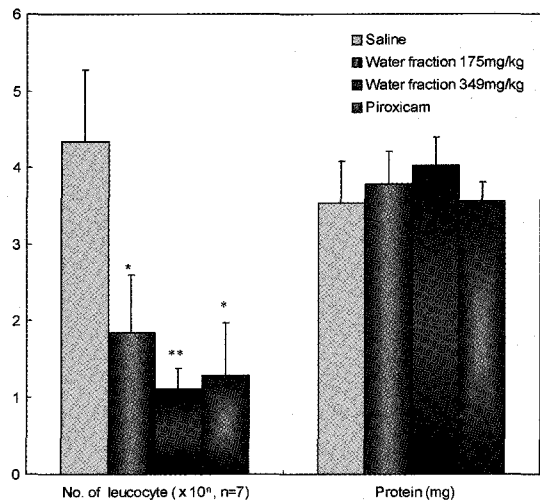
Treatment	Dose (mg/kg, iv)	No. of animals	Pontamine sky blue* (μg, M ± S.E.)	Inhibition (%)
Saline	—	7	156.3 ± 19.1	—
Water fraction	175	7	78.91 ± 2.5*	49.5
	349	7	67.0 ± 8.0*	57.1
Piroxicam	2	7	84.5 ± 5.8*	45.9

*; The quantities of pigment in peritoneal fluid were determined.

Significantly different from the saline group (*; p<0.01)

13499개로써 백혈구 유주가 일어났는데, pouch 내의 삼출액의 양과 단백질 함량은 대조군과 별다른 차이가 없었다. 그러나 백혈구 수는 물 분획물 175 mg/kg 투여시에 mm³당 5198개로써 대조군에 비해 61.5%나 억제되어 유의적인 차이를 보였다. 물 분획물 349 mg/kg 투여군은 mm³당 백혈구 수가 3559개로써 대조군에 비해 매우 유의적인 억제 효과를 나타내었으며, 그 억제 정도는 73.6%로써 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군이 68.7%의 억제율을 보인 것보다도 강력한 효과이다. 이 결과는 Fig. 1에 표시하였다.

PBQ유발 writhing증상 억제작용 - 앞서 냉수추출물이 나타낸 진통작용의 유효물질 확인을 위하여 각 분획물을 투여하였을 때, PBQ로 유발시킨 writhing 증상을 억제하는지의 여부를 검토하였다. 이 결과는 Table IV에 표시하였는데, 카라기난유발 부종실험의 경우와 마찬가지로 chloroform, ethyl acetate 및 butanol 분획물의 투여시에는 PBQ유발 writhing 증상을 전혀 억제하지 못하였다. 그러나 물 분획물 349 mg/kg을 투여하고 PBQ 주입 5분후부터 10분간의 writhing 증상의 발생수는 대조군에 비해 70% 이상의

**Fig. 1.** The effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on leucocyte emigration and protein exudation in CMC-pouch in rats.

Significantly different from the saline group (*; p<0.05, **, p<0.01)

높은 억제율을 나타내었다. 특히, PBQ 주입 10분후부터 5분간의 writhing 증상의 억제 정도는 84.2%로

Table IV. The analgesic effect of the various fractions obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on phenyl-*p*-benzoquinone-induced writhing syndrome in mice

Treatment	Dose (mg/kg, <i>iv</i>)	No. of animals	No. of writhing	
			0~5 min	5~10 min
Saline	—	7	26.3	10.9
Hexane fraction	2.5	7	23.3 (11.4)	9.7 (10.5)
CHCl ₃ fraction	2.5	7	30.0 (-14.1)	14.6 (-34.2)
EtOAc fraction	9.5	7	18.9 (28.3)	11.4 (-5.3)
BuOH fraction	137	7	16.9 (35.9)	9.9 (9.2)
H ₂ O fraction	349	7	7.7** (70.7)	1.7** (84.2)
Piroxicam	2	7	1.0** (96.2)	3.6* (67.1)

Significantly different from the saline group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)

The figures in parentheses indicate inhibition ratios(%).

써 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군보다도 더 강력한 억제효과를 보인 것이다.

Randall-Selitto 법 - Writhing증상 발생억제를 보인 물 분획물의 진통작용을 확인하기 위하여 Randall-Selitto법을 적용시켜 실험한 결과는 Table V와 같다. 진통작용이 지속적인 지의 여부를 판정하기 위하여 검체 주입 후 3시간까지의 동통역치를 측정하였다. 대조군의 염증을 유발한 발의 동통역치는 검체 투여 3시간까지 지속적으로 정상발에 비하여 동통역치가 현저히 낮아져 통증이 확실히 유발되었고 또, 지속적인 나타내었다. 물분획 175 mg/kg을 투여하였을 때, 2시간까지 동통역치가 100 이상을 나타내어 유의적인 효과를 보였고, 3시간째에도 93.4로써 2시간째보다 줄어들긴 하였으나 대조군에 비하여 유의적으로 동통역치가 높아졌다. 물 분획물 349 mg/kg 투여군은 투여 직후의 동통역치가 119.6으로써 대조군에 비해 유의적인 증가를 보였으며, 1, 2, 3시간째에는 모두 150 이상의 동통역치를 나타내었고 억제율(protected percent)도 각각 62.5%, 62.5% 및 87.5%로써 진통작용이 지속적인 효과를 보였다. 이것은 대조약물인 piroxicam 2 mg/kg 투여군보다도 더 강력한 효과이다.

Cyclooxygenase-1 억제효과 - HEL 세포주에서의 COX-1 활성에 대한 검체의 억제 작용 여부를 검토하였다. ¹⁴C-labelled arachidonic acid의 대사산물을 TLC하여 감광시켰을 때의 결과는 Fig. 2와 같다. DM SO만을 처리한 대조군은 arachidonic acid의 COX-1에 의한 대사산물인 prostaglandin F_{2α}, thromboxane B₂, prostaglandin E₂, prostaglandin A₂ 및 5-HETE 모두 진한 밴드를 나타내어 많은 양이 생성되었음이 보여진다. 그러나 검체를 처리하였을 때는 밴드의 색이 농도가 증가함에 따라 점점 흐려졌으므로 COX-1의 활성을 저해하여 각 대사산물의 생성양이

줄어들었음을 육안으로도 확인할 수 있었다. 이것을 정량하여 그 억제정도를 검정한 결과는 Fig. 3과 같다. 백두옹 냉수추출물의 물분획 10, 20, 40, 80, 160 및 320 μg/ml를 처리하였을 때, DMSO만을 처리한 대조군에 비하여 각각 57.5, 57.9, 58.0, 61.6, 62.8 및 63.2%를 억제함으로써 용량이 증가함에 따라 그 억제정도도 약간씩은 증가하였으나 용량의존적이라고 볼 수는 없었다. 이것은 10 μg/ml의 낮은 농도에서도 이미 57.5%의 강력한 억제효과를 나타내었기 때문인 것으로 보이며, IC₅₀도 10 μg/ml 이하의 아주 낮은 농도가 될 것으로 보인다.

Cyclooxygenase-2 억제효과 - COX-2에 대한 검체의 억제 작용을 검색해 본 결과는 Fig. 4에 표시하였다. LPS로 처리한 J774A.1 macrophage에서 검체는 COX-2의 activity를 약간 억제하는 것으로 나타났다. Cell에 검체를 전처리하였을 때 cell 독성은 없는 것으로 나타났으며, 미리 aspirin을 처치함으로써 COX-1의 활성을 제거한 상태에서 COX-2 활성의 억제 정도를 검토하였을 때, 백두옹 냉수추출물의 물분획 10, 20, 40, 80, 160 및 320 μg/ml를 처리하였을 때, 대조군 즉, 검체 대신 DMSO만을 처리하였을 때에 비하여 각각 16.6, 17.7, 23.7, 33.8, 39.4 및 46.3%를 억제함으로써 용량의존적으로 억제하는 것으로 나타났으나 강력한 억제효과는 아니었으며, IC₅₀은 320 μg/ml 이상이 될 것으로 보인다.

물 분획물이 정상체온에 미치는 영향 - 백두옹 냉수추출물의 물분획을 정맥내 투여하였을 때 정상체온을 하강시키는 지에 대한 결과는 Table VI에 표시하였다. 175 mg/kg을 정맥 투여한 경우에는 대조군과 비교하였을 때, 정상 직장온을 하강시키지 않는 것으로 나타났다. 그러나 349 mg/kg을 투여한 군에서는 투여후에 체온의 하강 경향을 나타냈으나 대조군에

Table V. The effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on Randall-Selitto assay in rat paw

Treatment	Dose (mg/kg, <i>iv</i>)	No. of animals	10 min				1 hr			
			Pain threshold (g)		Protected (%)	Pain threshold (g)		Protected (%)		
			Inflamed	Non-inflamed		Inflamed	Non-inflamed			
Saline	—	8	83.2 ± 7.1 [#]	179.4 ± 13.7	—	85.8 ± 6.0 [#]	169.4 ± 9.7	—	—	
Water fraction	175	8	113.2 ± 7.4 [*]	170.0 ± 21.5	25.0	115.7 ± 10.1 [*]	185.6 ± 27.1	37.5	37.5	
	349	8	119.6 ± 9.1 ^{**}	200.0 ± 23.8	37.5	154.4 ± 23.8 [*]	166.3 ± 25.5	62.5	62.5	
Piroxicam	2	8	117.6 ± 12.5 [*]	161.3 ± 16.9	25.0	123.8 ± 10.7 ^{**}	152.5 ± 12.2	37.5	37.5	

Treatment	Dose (mg/kg, <i>iv</i>)	No. of animals	2 hr				3 hr			
			Pain threshold (g)		Protected (%)	Pain threshold (g)		Protected (%)		
			Inflamed	Non-inflamed		Inflamed	Non-inflamed			
Saline	—	8	80.3 ± 5.3 [#]	163.8 ± 10.0	—	73.8 ± 4.9 [#]	163.8 ± 13.2	—	—	
Water fraction	175	8	105.6 ± 10.2 [*]	172.5 ± 18.9	37.5	93.4 ± 5.7 [*]	178.8 ± 25.8	37.5	37.5	
	349	8	152.5 ± 23.9 [*]	220.0 ± 24.3	62.5	156.6 ± 21.6 ^{**}	205.0 ± 32.6	87.5	87.5	
Piroxicam	2	8	107.4 ± 5.4 ^{**}	140.0 ± 10.4	37.5	125.8 ± 8.7 ^{**}	170.0 ± 18.7	87.5	87.5	

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from saline group (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)Significantly different from the non-inflamed paw of saline group (#; $p < 0.01$)

Pain threshold was determined at 10 min, 1 hr, 2 hr and 3 hr after drug treatment.

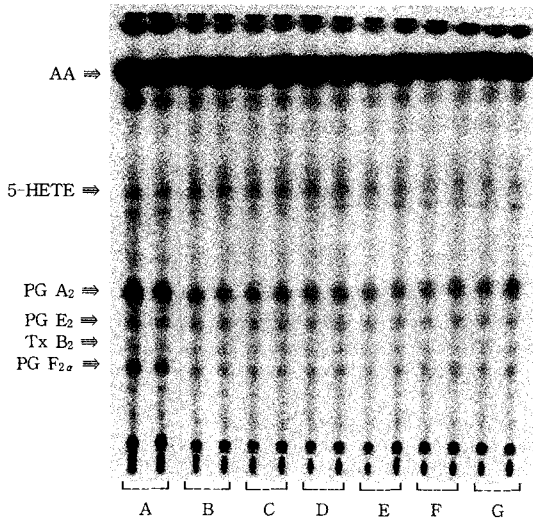


Fig. 2. Autoradiographed TLC-chromatogram of inhibitory effects of COX-1 by water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract in HEL cells. Lane A; DMSO (control). Lane B, C, D, E, F and G; 10, 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{g/ml}$ of water fraction.

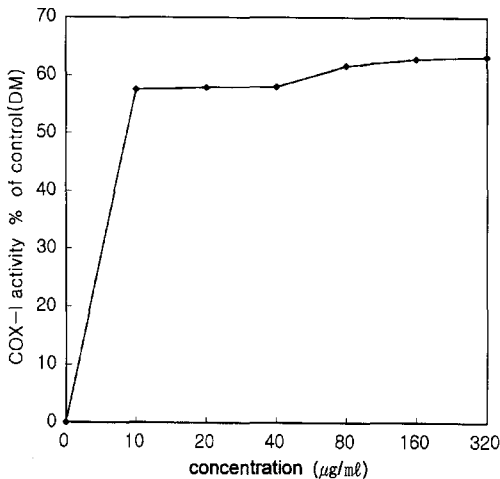


Fig. 3. Inhibitory effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract against COX-1 in HEL cells. Inhibition of COX-1 was determined in terms of the production of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$.

비하여 유의적인 것은 아니었으며, 검체를 투여한 24 시간 후에 다시 측정하였을 때는 정상으로 회복되어 있었고, 외관상의 관찰시 별다른 이상이 없었고, 이상 행동도 관찰할 수 없었다.

물 분획물의 급성독성 - 흰쥐에 물 분획물 500 mg/kg을 정맥투여하였을 때, 6마리중 2마리가 사망하였

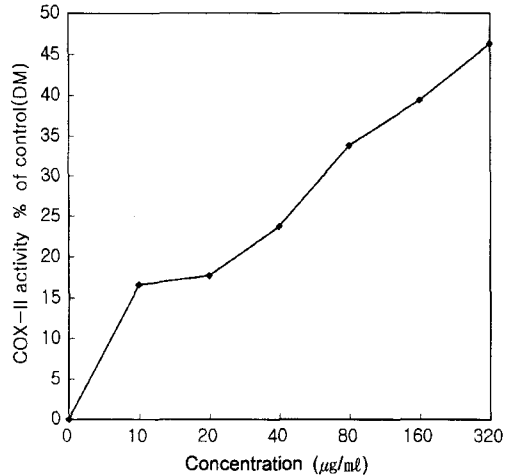


Fig. 4. Inhibitory effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract against COX-2 in J774A.1 macrophage. Inhibition of COX-2 was determined in terms of the production of prostaglandin E_2 .

고, 349 mg/kg을 투여하였을 때는 한 마리도 사망하지 않아 이 검체 정맥투여시 반수치사량(LD_{50})은 500 mg/kg 이상으로 나타났다(Table VII). 또한, 이 검체 투여시의 체중 변화는 Table VIII에 표시하였다. 검체 349 mg/kg을 투여하였을 때는 대조군과 비교하여 유의할 만한 체중의 감소가 인정되지 않았다. 그러나 500 mg/kg 투여군은 1~7일째에 모두 유의적으로 체중이 감소하였으나 4일째부터는 회복 경향을 보였다.

고 찰

이미 전보¹⁾에서 백두옹 엑스가 소염진통작용이 있음을 확인하였기에 이 엑스를 분획하여 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 물 분획물을 얻었다. 이들에 대한 항부종작용 실험결과, 물 분획물이 349 mg/kg의 용량에서 60~67%의 강력한 억제작용을 나타냈는데, 이는 물엑스로서 500 mg/kg에 해당된다. 그 밖의 분획물은 전혀 작용이 없었다. 따라서 혈관투과성 및 백혈구유주실험에서는 물 분획물에 대하여 175 및 349 mg/kg의 두 용량에서 실시한 바, 모두 유효한 작용을 인정할 수 있었다. 또, 진통작용 실험에서 물 분획물이 PBQ유발 writhing의 억제를 나타내었고 그밖의 분획물은 억제되지 아니하였다. 이것도 물엑스 500 mg/kg에 해당되는 용량에서 실시한 결과이다. 따라서, 물 분획물에 대하여 175 및 349 mg/kg의 두 용량에서 Randall-Selitto법으로 진통작용실험을 실시한 바,

Table VI. The effect of water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract on rectal temperature in mice

Treatment	Dose (mg/kg, iv)	No. of animals	Temperature (°C)			
			0 min	5 min	1 hr	3 hr
Saline	—	7	37.21 ± 0.11	37.23 ± 0.09	37.14 ± 0.08	37.16 ± 0.09
Water fraction	175	7	37.37 ± 0.11	37.40 ± 0.14	37.31 ± 0.13	37.29 ± 0.16
	349	7	37.26 ± 0.16	36.97 ± 0.23	36.36 ± 0.30	36.24 ± 0.38

All data represent the mean ± S.E.M.

Rectal temperature was determined at before, 5 mins, 1 hr and 3 hr after the drug treatment.

Table VII. Mortality of rats by water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract

Treatment	Dose (mg/kg, iv)	Hours after treatment						Days after treatment							Final Mortality		
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7			
Saline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
Water fraction	349	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6
	500	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2/6

Table VIII. Body weights changes of rats by water fraction obtained from the *Pulsatilla koreana* root extract

Treatment	Dose (mg/kg, iv)	Body weights (g, Mean ± SD)					days
		0	1	4	7	7	
Saline	0	171.8 ± 6.6	177.5 ± 7.9	205.7 ± 8.6	231.7 ± 10.1		
Water fraction	349	170.3 ± 6.5	175.7 ± 6.0	204.0 ± 6.9	229.5 ± 7.3		
	500	170.5 ± 6.7	159.6 ± 7.2*	169.8 ± 6.6*	193.5 ± 7.0*		

이 검체 175 mg/kg 투여시의 진통작용이 piroxicam 2 mg/kg의 용량과 유사함을 알 수 있었다. 현재까지 소염작용 물질들은 급성염증에서 손상된 조직의 세포나 염증에 관여하는 세포 또는 주화인자에 의해 유추된 백혈구의 세포막으로부터 물리화학적 및 생리적 자극에 의해 활성화된 phospholipase에 의해 유리되는 arachidonic acid의 cyclooxygenase 대사에 의한 prostaglandin류의 생합성을 억제하는 약물들이었다.¹⁵⁾ 그러나 이런 약물들은 급성염증에서의 증상들에 대해서는 치료효과를 가지고 있지만 류마치스 관절염과 같은 만성염증에서는 1차적인 염증현상만을 완화할 수 있고 면역학적 치료효과는 기대할 수 없다고 밝혀지고 있으며,¹⁶⁾ 현재는 arachidonic acid의 lipoxigenase 대사산물에 대한 연구가 활발하고, 이는 만성염증에서 어느 정도 효과를 보이고 있다고 한다.¹⁷⁾ Lipoxigenase에 의해 생성되는 물질들은 HETE, leukotriene B₄, leukotriene C₄ 등이며 만성염증의 병태 생리학적 현상에서 중요한 물질들이다.¹⁵⁾ Prostaglandin thromboxane, prostacyclin 같은 prostanoids의 생합성은 물리적, 화학적 및 호르몬 자극에 의하여 증강되고, 이러한 prostanoid 들은 염증의 주요 징후의 하나로서 중요하게 작용한다.¹⁸⁾ Prostaglandin류를 탄소수 20개의 prostanoid acid를 기본구조로 하며 C₈

과 C₁₂ 사이에 5개의 탄소로 된 고리를 가진 불포화 지방산으로 건선증,¹⁹⁾ 흉막염, 복막염,²⁰⁾ 관절염, 연골 연화^{21,23)} 등 주로 만성 염증질환에 관여하는 화학전달 물질이며 또한 천식 등의 알러지성 질환²⁴⁾에서도 대량 관찰된다. 이러한 prostanoid 합성의 조절에 중요한 역할을 하는 것이 cyclooxygenase(COX)이다. COX는 조직분포와 조절에 따라 COX-1과 COX-2의 두가지 이성질체가 존재한다.²⁵⁾ COX-1 (constitutive cyclooxygenase)이 vascular homeostasis, renal blood flow의 조절, glomerular filtration rate의 조절 등 생리학적 기능을 위한 prostanoids를 합성하기 위하여 일정하게 발현된다면,²⁶⁻³⁰⁾ COX-2 (inducible cyclooxygenase)는 염증반응이 일어나는 동안 monocytes와 fibroblasts같은 특정 세포 유형에서 growth factor, endotoxin, mitogen, cytokine등과 같은 inflammatory mediator들에 의해서 합성이 유도되는 것으로 보고되고 있다.^{31,32)} 따라서, COX-1 및 COX-2의 억제 효과를 실험한 바, 물 분획물은 ¹⁴C-labelled arachidonic acid로부터 생성된 prostanoid를 정량하였을 때, COX-1 및 COX-2에 대하여 억제효과를 나타내었으며, 특히 COX-1은 낮은 농도에서도 강하게 억제하는 것으로 나타나서 IC₅₀이 10 µg/ml보다도 훨씬 낮을 것으로 예상된다. Mitchell 등³³⁾은 aspirin의 IC₅₀이

COX-1에서 5 µg/ml이고, COX-2에서 100 µg/ml 이상인 것으로 보고하였다. 따라서 이 검체는 aspirin과 비슷한 COX 억제효과를 나타내는 용량에서, 소염 작용을 나타내게 하기위하여 검체를 정맥투여하는 경우에는 경구시보다 더 작은 용량을 투여하게 되므로, aspirin의 위손상을 방지하게 되어 더 바람직한 COX 억제제가 될 것으로 보인다. 이 물분획을 정맥내 투여하였을 때, 소염 및 진통작용을 나타내는 용량인 175 mg/kg 투여군에서 정상체온에 아무런 영향을 미치지 않음이 확인되었으며, 급성 독성 시험 시, 중간 치사량(LD₅₀)이 500 mg/kg 이상으로 나타났다. 그러므로, 백두옹 냉수추출물의 물분획은 소염 및 진통물질로서의 개발을 목표로하여 column chromatography에 의한 성분분리를 실시하여 순수물질을 분리할 가치가 있다고 사료되는 바이다.

결론적으로 백두옹 엑스의 물 분획물을 정맥내 투여하였을 때, 카라기난유발 부종을 지속적으로 억제하며, 모세혈관 투과성 억제 및 백혈구 유주 억제 작용을 가지는데 그 작용기전의 일부는 COX에 의한 prostanoids의 합성을 저해하는 것으로 생각된다. 또한, PBQ 유발 writhing을 억제하고 Randall-Selitto 법에 의한 동통을 억제하였으며 정상체온에 영향이 없는 용량에서 소염 진통효과를 인정할 수 있었다. 또, 급성독성은 LD₅₀이 500 mg/kg i.v. 이하이었다.

인용문헌

- Cheon, S.A., Choi, B.K. and Lee, E.B. (2000) The anti-inflammatory and analgesic actions of the root of *Pulsatilla koreana*. *J. Appl. pharmacol.* 8: 207-214.
- Wang, Y.S. (1983) Pharmacology and Application of Chinese Material Medica, 330-334, People's Medical Publ. House, Beijing.
- Winter, C.A., Risley, E.A. and Nuss, G.W. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 544-547.
- Kim, S. M. (1993) Pharmacological studies of *Torilis japonica* seed. M.Sc. Thesis, Sookmyung Women's Univ.
- Whittle, B.A. (1964) The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* 22: 246-253.
- Ishikawa, H., Mori, Y. and Tsurufuji, S. (1969) The characteristic feature of glucocorticoid after local application with reference to leucocyte migration and protein exudation. *Eur. J. Pharm.* 7: 201-205.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Hendershot, L.C. and Forsaith, J. (1959) Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J. Pharm. Exptl. Therap.* 125: 237-240.
- Randall, L.O. and Selitto, J.J. (1971) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111: 409-419.
- Swingle, K.F., Grant, T.J. and Kvan, D.C. (1971) Quantal response in the Randall-Selitto assay. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 536-538.
- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F. and Hout, J.R.S. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoid. *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 787-792.
- Najid, A., Simon, A., Cook, J., Chable-Rabinovitch, H., Delage, C., Chulia, A.J. and Rigaud, M. (1992) Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *FEBS* 3: 213-217.
- Arias, N.S., Keller, K. and Chadee, K. (1995) Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17: 582-589.
- O'Sullivan, M.G. Jr., Huggins, E.M., Meade, E.A., DeWitt, D.L. and McCall, C.E. (1992) Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1123-1127.
- Moyazawa, K., Mikami, T. (1985) Effects of some non-steroidal antiinflammatory drugs and other agents on cyclooxygenase and lipoxygenase activities in some enzyme preparations. *Japan. J. Pharmacol.* 38: 199-205.
- Huskinson, E.D., Willoughby, D.A., and Giroud, J.D. (1980) Inflammation, Mechanism and Treatment, MTP, 55, Lancaster, England.
- Ford-Hutchinson, A.W., Brunet, G., Savard, P. and Charleson, S. (1984) Leukotriene B₄, polymorphonuclear leucocytes and inflammatory exudates in the rat. *Prostaglandins* 28: 13-27.
- Moncada, S. and Vane, J.R. (1979) Pharmacology

- and endogeneous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30: 293-331.
19. Smith, W.L. and DeWitt, D.L. (1994) Differential interactions of prostaglandin endoperoxide synthase with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 3: 1-11.
 20. DeWitt, D.L., Meade, E.A. and Smith, W.L. (1993) PGH synthase isozyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 95(2A): 40S-46S.
 21. DeWitt, D.L., Harith, E.A., Kraemer, S.A. and Andrews, M.J. (1990) The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthase. *J. Biol. Chem.* 265: 5192-5198.
 22. Tsai, A., Hsi, L.C., Kulmacz, R.J., Palmer, G. and Smith, W.L. (1994) Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269: 5085-5091.
 23. Raz, A. and Needleman, P. (1990) Differential modification of cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin endoperoxide synthase by proteolytic digestion and hydroperoxides. *Biochem. J.* 269: 603-607.
 24. Ruf, H.H., Schuhn, D., Dietz, R., Nastainczyk, W. and Nielsen, M. (1992) Target size analysis of prostaglandin endoperoxide synthase. *Eur. J. Biochem.* 204: 1069-1073.
 25. Hla, T. and Neilson, K. (1992) Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7384-7388.
 26. Klein, T., Nusing, R.M., Pfeilschifter, J. and Ullrich, V. (1994) Selective inhibition of cyclooxygenase 2. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1605-1610.
 27. Mene, P., Simonson, M.S. and Dunn, M.J. (1989) Physiology of the mesangial cell. *Physiol. Rev.* 69: 1347-1423.
 28. Andrew, S., Tariq, M., William, W.C. and Mary, E.G. (1994) Induction of cyclooxygenase 2 in human synovial microvessel endothelial cells by interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 37: 495-503.
 29. Jim, B., Joan, C., Dan, I., Melody, C., Rebecca, M., Eric, O., Binh, N., Stan, T., Chinh, B., Jose, F., Hardy, C., Elliott S. and Chakk, R. (1994) Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochem. Biophys. Acta* 1209: 130-139.
 30. Van Der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H. and Van Dorp, D.A. (1977) Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta* 487: 315-331.
 31. Herschman, H., Fletcher, B. and Kujubu, D. (1993) TIS10, A mitogen-inducible glucocorticoid-inhibited gene that encodes a second prostaglandin synthase/cyclooxygenase enzyme. *J. Lipid Med.* 6: 89-99.
 32. Meade, E.A., Smith W.L. and DeWitt, D.L. (1993) Expression of the murine prostaglandin(PGH) synthase-1 and PGH synthase-2 isozymes in cos-1 cells. *J. Lipid Med.* 6: 119-129.
 33. Mitchell, J.A., Saunders, M., Barnes, P.J., Newton, R. and Belvisi, M.G. (1997) Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappaB) activation: role of arachidonic acid. *Mol. Pharmacol.* 51: 907-912.