

Aloe vera peel 추출물에 의한 구강염증 저해 효과의 효소학적 평가

박정순¹ · 류일환 · 이갑상*

원광대학교 생명자원과학부, ¹원광보건대학 치위생과

Enzymological Evaluation of Oral Inflammation inhibitory activity by Aloe vera peel extract

Chung-Sun Pack¹, Il-Hwan Ryu and Kap-Sang Lee*

Collage of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University

¹Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science College

To evaluate antiinflammation of *Aloe vera* peel, antiinflammation substances were extracted from *Aloe vera* peel and identified, and we investigated the effect of the its substance the inhibitory effect on the activity of hyaluronidase, elastase, collagenase and prostaglandin endoperoxide synthase. The water extract from *Aloe vera* peel were successfully purified with solvent fractionation, silica gel column chromatography, preparative thin layer chromatography and UV spectrometer. Two purified active substances were identified as aloe-emodin and barbaloin by Mass Spectrometer, ¹H-NMR and FT-IR. Aloe-emodin and barbaloin. IC₅₀ values of aloe-emodin and barbaloin against hyaluronidase activity were 40 and 70 µg/mL, respectively. Leucocyte elastase, which is related to the destruction of various tissue, IC₅₀ values of them were 50 and 60 µg/mL, respectively. IC₅₀ values of aloe-emodin and barbaloin against collagenase activity were 40 and 60 µg/mL, respectively. and IC₅₀ values of aloe-emodin and barbaloin aganist the prostaglandin endoperoxide synthase, which play an important role in inflammatory reactions, were 40 and 70 µg/mL, respectively. Inhibitory effects of aloe-emodin, barbaloin and aspirin against carrageenan paw edema were 74.9, 52.9 and 51.9% as inhibiton percentage, respectively, at dose of 100 mg/kg and that of indomethancin was 49.7 at dose of 10 mg/kg. Cell cytotoxicity of barbaloin against human gingival cells was lower than that of aloe-emodin. Aloe-emodin and barbaloin did not show cytotoxicity against human gingival cells at concentration of 1.0 and 5.0 µg/mL, However, aloe-emodin and barbaloin showed less cytotoxicity than chlorhexidine, which usually have been used as the agent of anticaries and antiinflammation. These results suggested that aloe-emodin and barbaloin from *Aloe vera* peel have the effect of anticaries and antiinflammation.

Key words: Antiinflammation, *Aloe vera* peel, hyaluronidase, elastase collagenase, prostaglandin endoperoxide synthase

서 론

구내염은 구강내 피부 조직, 치은 및 치주 조직 등 모든 조직에 이학적, 화학적, 세균학적 변화를 수반하는 것이 특징이다. 염증을 유발하는 요인은 여러 가지 요인이 있으나 미생물 감염에 의한 유발 및 자가 면역 질환에 의한 염증이 주된 발생원인으로 분류된다⁽¹⁾. 염증 발현의 생화학적 변화를 살펴보면 외부의 감염이나 피부조직의 손상에 의해 모세혈관이 손상되면 활세포(synovial cell)의 증식이 활발하게 일어나게 되고 결합 조직 내부로 lymphocyte의 침윤이 일어나

며 이로 인해 섬유모세포(fibroblast) 및 대식세포(macrophage)가 증가한다. 이로 인해 임파구에서 분비되는 인터루킨(interlukin)은 effector 임파구를 활성화시키고 hyaluronidase, elastase 및 collagenase와 같은 각종 분해효소 및 prostaglandin등이 염증 매개물의 형성을 촉진하여 결합조직을 파괴시키게 되어 염증이 발병되고 진행되는 것으로 알려져 있다^(4,6). 이들 염증의 발병에 관여하는 각종 효소들은 mucopolysaccharide를 절단하는 효소의 일종으로 hyaluronic acid의 glucosidic 결합을 절단하여 N-acetylglucosamine 및 glucuronic acid를 생성하는 Hyaluronidase(Hyaluronoglucosaminidase. EC. 3. 2. 1. 35), 염증 반응의 화학적 매개물로 알려진 prostaglandin류의 생합성에 관여하는 cyclooxygenase 및 hydroperoxidase활성을 갖는 prostaglandin endoperoxide synthase(EC. 1. 14. 99. 1), 그리고 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이상조직에서는 그 효소의 활

*Corresponding author : Kap-Sang Lee, College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea
Tel: 82-63-850-6675
Fax: 82-63-850-6675
E-mail: LKS6675@hanmail.net

성이 극히 높아 조직 파괴에 직접적인 원인이 되는 효소인 elastase(E.C 3. 4. 21. 37) 및 체내 collagen을 분해하는 metalloproteinase로 collagen대사와 조직파괴에 중요한 역할을 담당하는 collagenase(E.C.3.4.24.3)가 관여하는 것으로 알려져 있다^(7,8). 이중 Hyaluronidase와 prostaglandin endoperoxide synthase는 간염, 치주염, 관절염의 염증 부위에서 효소 활성이 현저히 증가하며 결합조직의 matrix 분해에 의한 기염제로 작용한다는 측면에서 이 효소는 치주염을 포함한 각종의 염증 반응에 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있다. 특히 염증 치료에 사용되고 있는 비스테로이드성 항염제인 aspirin, indomethacin 등은 Hyaluronidase 및 prostaglandin endoperoxide synthase활성을 현저히 저해하는 작용기전이 알려져 있으며, 치주염등 염증조직에서 극히 다량의 collagenase가 검출된다고 알려져 있으나⁽⁷⁻¹⁵⁾, 일련의 임상 효소학적 관점에서 항염증 활성을 종합적으로 검토한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구자들은 *Aloe vera* 가공 산업에서 산업 폐기물로 생성되는 *Aloe vera* 껍질중 구강 질환을 유발하는 *Streptococcus mutans*균에 대하여 항균활성이 우수한 물질을 분리·정제하여 이물질이 aloe-emodin 및 barbaloin임을 규명하고, 그 항균 활성 및 sucrose를 기질로 하여 치태 형성에 직접적으로 관여하는 GTase(glucosyltransferase) 저해 효과를 확인하여 기보고 하였다^(16,17).

본 연구는 염증의 유발 및 심화, 조직파괴에 직접 관여하는 임상효소에 대한 저해효과를 탐색하여 구강내 염증 치료제 개발의 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

Aloe vera 껍질의 전처리

Aloe vera 껍질을 1~2 cm 정도의 크기로 절단하여 70°C에서 8시간 열풍 건조하였다. 건조된 *Aloe vera* 껍질은 상온에 보관하면서 매번 실험시 물 추출 또는 알코올 추출을 하여 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

본 실험에 사용한 column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh ASTM, Merck Art 7743)을 사용하였으며, preparative TLC로는 Kieselgel 60(Merck Art 5745)를 사용하였다. TLC spot 확인은 UV 365 nm 파장에서 5% ethonolic-KOH를 발색시약으로 사용하여 확인하였다. 추출 용매는 덕산 이화학의 1급 시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 hyaluronidase, leucocyte elastase, collagenase는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며 시판되지 않는 prostaglandin endoperoxide synthase는 소정액량으로부터 crude enzyme를 분리하여 사용하였다. 효소활성 측정에 이용되는 potassium hyaluronate, N-acetylglucosamine, p-dimethylaminobenzaldehyde, DEAE-sephadex, hematin, NNN'N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dichloride, arachidonic acid, triethanolamine, 4-nitroaniline, Suc-Ala-Ala-Ala-4Na, 4-phenylazobenzoyloxy-carbonyl-pro-leu-gly-pro-D-arg(PZ), tetracycline, N-acetyl-L-cysteine는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다.

항염증 성분의 추출, 분리 및 구조 분석

Aloe vera 껍질로부터 항염증 성분의 분리정제는 사전에 보고된 저자들의 방법^(16,17)에 따라 *Aloe vera* 껍질 1kg을 15배 용량의 메탄올로 60°C에서 8시간 환류 추출한 후 감압 농축한 메탄올 extract(fr. 1)를 적정량의 물에 용해시키고 ethyl acetate, ether, chloroform, butanol, isopropanol 등의 용매를 순차적으로 사용하여 분획하였다. 활성을 갖는 ethyl acetate 추출물을 silica gel column chromatography(2 kg, i.d 100 mm×500 mm), preparative thin layer chromatography를 행하여, fr. A와 Fr. B를 분리하고, UV/VIS 분광광도계(Secomam S1000, USA)를 이용한 UV spectrum, 질량분석은 Mass Spectrometer(JEOL JMS-DX 303, USA)로 분석하였으며, ¹H-NMR 분석은 Bruker AM 300 MHz Spectrometer (USA)를 사용하여 측정하였다. IR Spectrum은 Digilab Division FTS-165 FT-IR spectrometer를 이용하여 분석한 결과 aloe-emodin과 barbaloin으로 판명되어 이후 실험에 사용하였다.

Hyaluronidase 활성 측정

Hyaluronidase(Sigma Chemical Co., USA)를 0.2 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹여 1 mL당 8unit로 제조하였다. 준비된 hyaluronidase 용액 50 µL에 calcium chloride 용액을 0.1 mL 넣어 37°C에서 20분간 방치하여 hyaluronidase를 활성화시켰다. 이 반응액에 0.25 mL의 potassium hyaluronate를 넣고 시료용액 0.1 mL를 넣어 총 용량을 0.5 mL로 만든 다음 잘 혼합하고 37°C에서 40분간 반응시켰다. 이때 대조군은 시료용액 대신 0.2 M acetate buffer(pH 3.5) 0.1 mL를 넣었다. 효소 반응을 중지시키기 위하여 4 N sodium hydroxide 0.1 mL와 0.4 M potassium borate 0.1 mL를 넣어 주었다.

이 용액에 ethanol에 녹인 67 mM p-dimethylaminobenzaldehyde를 3 mL 넣고 37°C에서 20분간 방치하여 유리된 N-acetylglucosamine을 발색시킨 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 에탄올에 의해 결정화된 침전물을 제거하고 585 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽¹⁵⁾. 효소의 활성 저해율은 다음 식에 의해 산출하여 IC₅₀ 값으로 평가하였고 이때 IC₅₀은 효소 활성을 50% 저해하는 농도이다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{\text{control OD}_{585} - \text{sample OD}_{585}}{\text{control OD}_{585}} \times 100$$

Leucocyte elastase의 활성 측정

leucocyte elastase(Sigma Chemical Co., USA)를 1 M NaCl-0.1% Brij35를 함유한 tris완충액으로 희석하여 단백질 농도가 2 mg/mL가 되도록 제조하였다. 효소의 활성 측정은 400 µL의 triethanolamine buffer(TEA, 0.5 M/L, pH 8.0; 0.05% Na₂S₂O₅, 0.25% polyethylene 6000)와 leucocyte elastase 효소액 100 µL, 증류수 300 µL 및 *Aloe vera* 껍질 추출물 100 µL를 시험관에 담고 플라스틱 spatula를 이용하여 조심스럽게 혼합한 후 기질인 Suc-Ala-Ala-Ala-4Na 용액 (3 mM/L of dimethylsulfoxide) 100 µL를 첨가하였다. 그 후 플라스틱 spatula를 이용하여 조심스럽게 혼합하여 5분간 반응시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽¹⁹⁾. 이때 효소의 1 unit는 분당 1 µM 4-nitroaniline이 방출되는 것으로 정의하

였으며, 효소의 활성저해율은 다음식에 의해 산출하여 IC₅₀ 값으로 평가하였고 이때 IC₅₀은 효소활성을 50% 저해하는 농도이다.

$$b_1 = \frac{0.104}{V_1} \times (\Delta A/\Delta t - \Delta A_1/\Delta t) \text{ Inh. U/L}$$

b₁ = 저해활성 농도 Inh. U

V₁ = 저해용액의 부피

ΔA = 저해작용이 없는 반응에서의 흡광도 변화

ΔA₁ = 저해제 존재하에서 흡광도 변화

nh. U/L = 효소 1 unit를 저해하는 저해제의 양

Collagenase 활성 측정

기질용액은 20 mM CaCl₂가 함유된 0.1 M tris aminomethan buffer(pH 7.1)에 4-phenylazobenzyloxy-carbonyl-pro-leu-gly-pro-D-arg(PZ) 1 mg을 용해시켜 제조하였으며 효소 용액은 1 mL 증류수에 collagenase 0.15 unit를 용해시켜 제조하였다. 효소의 활성 측정은 다음과 같이 Aloe vera 추출액 0.05 mL와 기질 용액 0.4 mL를 37°C에서 3분간 예열시킨 후 0.05 mL의 효소액을 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 25 mM citric acid 용액 1 mL를 첨가하여 효소 반응을 정지시킨 다음, ethyl acetate 5 mL로 lipophilic 물질을 추출하여 비색정량하였다⁽²⁰⁾. 효소의 활성 저해는 다음의 수식에 따라 산출하여 IC₅₀값으로 평가하였으며 이때 IC₅₀은 효소활성을 50% 저해하는 농도이다.

$$\text{저해율(\%)} = (A - B)/A \times 100$$

A: 대조군의 ethyl acetate층의 흡광도

B: 실험군의 ethyl acetate층의 흡광도

Prostaglandin endoperoxide synthase의 활성 측정

Arachidonic acid 대사의 율속 단계(rate-limiting step)인 fatty acid cyclooxygenase 활성과 prostaglandin hydroperoxidase 활성이 동일한 단백질인 prostaglandin endoperoxide synthase에 의해 촉매되기 때문에 두 종류의 활성이 복합된 분석법으로 효소활성을 측정하였다. 즉 100 μL의 효소, 10 μL의 20 μM hematin, 100 μL의 시료 및 0.1 M tris buffer(pH 8.0)을 넣어 총 액량이 1 mL가 되도록 하였다. 37°C에서 5분간 방치한 후 여기에 10 mL의 20 mM NNN'N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dichloride 와 10 μL의 arachidonic acid를 넣고 611 nm에서 흡광도의 변화 속도를 측정하였다. 비특이적인 흡광도 변화는 위의 반응 혼합물 중에서 arachidonic acid를 제외한 효소반응으로 측정하여 이것을 보정해 주었다.

Prostaglandin endoperoxide synthase의 활성 1 unit는 1분동안 1 μM의 NNN'N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dichloride를 산화시키는데 필요한 효소량으로 정하고 흡광도 변화에서 unit 산출은 다음과 같은 식에 의해 산출하여 IC₅₀값으로 평가하였다. 이때 IC₅₀은 효소활성을 50% 저해하는 농도이다. Prostaglandin endoperoxide synthase의 specific activity는 단백질 mg당 unit 수로 나타내었으며 단백질량은 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다⁽²¹⁾.

$$\text{Unit(s)} = (\Delta A_{611}/\text{min})/13.5$$

ΔA₆₁₁: 파장 611 nm에서 흡광도 변화

13.5: NNN'N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dichloride 산화형과

환원형간의 milimolar extinction coefficient

Carrageenan 족부종 억제 측정

Aloe vera 껍질 성분 및 점질분의 항염증 활성은 체중 110~130 g의 7주령 Wister계 웅형(♂) 쥐 5마리를 1군으로 하여 실험을 진행하였다. 생리식염수를 복강내에 투여하고 30분 후 1% carrageenan saline solution 1mL를 오른쪽 뒷 발바닥에 피하주사하여 부종을 유발하였다. 1% carrageenan saline solution을 주사하기 직전과 주사후 1시간 간격으로 5시간까지 다리의 용적을 측정하였다. 1% carrageenan saline solution 투여 전에 대한 투여후의 다리 용적의 증가분을 부종율로 하여 (I)식에 의해 산출하였으며, 이 수치를 바탕으로 (II)식으로 저해율을 산출하여 항염증 활성을 측정하였다⁽²²⁾.

$$\text{부종율(\%)} = (E_c - E_o)/E_o \times 100 \tag{I}$$

E_o = 1% carrageenan saline solution 투여전 용적

E_c = 1% carrageenan saline solution 투여후 용적

$$\text{억제율(\%)} = (S_o - S_c)/S_o \times 100 \tag{II}$$

S_o = 시료 비투여군의 부종율

S_c = 시료 투여군의 부종율

인체치은 세포의 독성 평가

Aloe vera에서 추출, 정제한 aloe-emodin과 barbaloin이 인체치은 섬유모세포의 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 김⁽²³⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 계대 배양을 통해 활성화된 인체치은 섬유모세포를 Trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA, Gibco/BRL, USA)용액으로 처리하여 세포 부유액을 만든 다음 원심분리하여 single cell들을 회수하였다. 회수된 cell을 microtest plate의 well(1×10⁴ cells/well)에 옮겨 1% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco/BRL, USA)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco/BRL, USA)로 CO₂ Incubator(37°C., CO₂, 5%, 습도, 100%, Vision)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액 중 부착되지 않은 세포를 제거하기 위해 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 세척한 후 aloe-emodin과 barbaloin이 처리된 DMEM(1% FBS 포함)과 함께 배양하였다. 배양후 phosphate buffer solution(PBS)로 용해한 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., USA) 용액을 250 μL 씩 각 well에 넣고 4시간 동안 CO₂ Incubator에서 배양하였다. 배양액 중 MTT용액을 제거하고 formazon 결정을 용해시키기 위해 DMSO(Dimethyl Sulfoxide, Sigma Co., USA)를 200 μL씩 첨가한 후 96 well plate로 옮겨 ELISA analyser(Spectra MAX 250, Molecular Devices, Co., USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 독성을 평가하였다⁽²⁴⁾. 실험결과는 대조군에 대한 백분율로 다음식에 준하여 계산하였고 SAS system에 의해 통계처리하였다.

$$\text{세포활성도(\%)} = \frac{\text{실험 well의 흡광도}}{\text{대조 well의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

항염증 성분의 분석

Aloe vera 껍질로부터 항염증 활성을 갖는 fr. A는 Rf 0.92의 적색형광을 띠었고, fr. B는 Rf 0.7-0.5 부근의 녹색형광을 나타내었으며, 이때 추출수율은 fr. A가 0.17%, fr. b가 0.31%이었다. 이들 물질에 대한 UV spectrum을 측정된 결과, 분획 A의 UV spectrum은 222.7, 255.4, 286.4, 432.2 nm에서 강한 흡수대를 나타내었으며, 분획 B는 217, 252.6, 269.6, 295, 358.1 nm에서 강한 흡수대를 나타내었다. 또한 FT-IR spectrum을 분석한 결과 fr. A는 3300cm⁻¹에서 OH group, 1600 cm⁻¹대의 aromatic C=C가 확인되었으며, 1028, 1084 cm⁻¹에서 C-O group이 확인되었고, fr. b는 3300 cm⁻¹에서 OH group, 1675 cm⁻¹에서 C=O와 1600 cm⁻¹대의 aromatic C=C가 확인되었으며 1036, 1059, 1084 cm⁻¹에서 C-O group이 확인되었다.

또한 ¹H-NMR spectrum을 분석한 결과 fr. A는 7~8 ppm 사이에 나타나고 있는 aromatic protons들의 피크 패턴과 또 12 ppm 근처에 나타나고 있는 피크로부터 anthracene 모핵의 1, 8번이 -OH기로 치환되고 3번에 치환된 -CH₂-의 proton은 4.62 ppm에서 확인할 수 있었으며 7.80 ppm의 triplet은 6번 proton으로, 2개의 doublet중 더 저자장에서 나타나고 있는 7.70 ppm 피크는 이웃 ring의 carbonyl group과의 conjugation을 받고 있는 5번 proton으로 확인되었다. 11.94 ppm의 broad singlet은 1,8번의 hydroxy기의 proton으로 확인하였으며, 양상 또한 표준물질과 일치하여 aloe-emodin으로 동정하였다. 또한 fr. B는 4.53 ppm에서 나타나는 doublet를 11번 -CH₂의 proton으로, 4.56 ppm에서 나타나는 singlet은 10번 proton으로 확인되었다. 6~8 사이에 aromatic ring proton들이 나타나고 11.8 ppm 근처의 피크들은 C-glucosylated aloe-emodin anthracene nucleus에서 나타나는 유사한 proton series 때문인 것으로 보여지며, 이것은 10번 탄소가 β-glucose와 conjugation

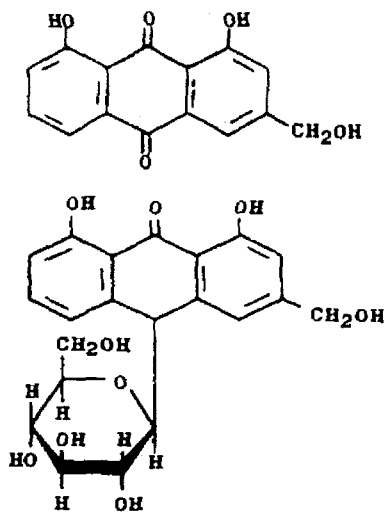


Fig. 1. Structure of aloe-emodin and barbaloin

Table 1. Inhibitory effect on hyaluronidase activity of extracts from *Aloe vera* peel

Materials	IC ₅₀ (μg/mL)
Aloe-emodin	40
Barbaloin	70
Indomethacin	8
Aspirin	80
Acetyl-L-cysteine	400
Tetracycline	500

으로 결합되어 있는 것으로 보여지며, 표준물질과의 비교에서도 일치하는 양상을 보여 barbaloin으로 동정하였다. 이들의 mass spectrum을 분석한 결과 aloe-emodin은 분자이온 피크로부터 분자량이 270임을 확인하였고 benzylic alcohol에서 CO가 떨어져 나가고 생긴 [M-29]⁺ 피크를 m/z = 241에서 확인하였다. barbaloin은 분자량이 418임을 확인하였으며 anthrone류에서 강하게 나타나는 [C₁₅H₁₂O₄]⁺의 피크가 m/z = 256에서 base peak로 나타났다. 그 구조식은 Fig. 1과 같다.

Hyaluronidase에 대한 저해 활성

Hyaluronidase활성에 대한 *Aloe vera* 추출물의 저해효과를 측정된 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. aloe-emodin은 40 μg/mL, barbaloin은 70 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. 항염제로 주로 사용되고 있는 indomethacin과 aspirin은 각각 8 μg/mL, 80 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었으며, 항염증 활성이 있는 것으로 알려진 acetyl-L-cysteine 및 tetracycline은 각각 400 μg/mL와 500 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. *Aloe vera* 추출물인 barbaloin은 현재 사용되고 있는 비스테로이드성 항염증제인 aspirin과는 비슷한 항염증 효과가 있으며, aloe-emodin의 경우에는 약 2배의 효과가 있어 aloe-emodin과 barbaloin은 비교적 결합조직의 염증 발생 및 염증의 심화를 사전에 막을 수 있는 효능을 가진 것으로 판단된다. 반면 현재 염증치료제로 사용되고 있는 aspirin과 비스테로이드성 항염제인 indomethacin의 경우와 비교하여 낮은 효소 활성 저해를 나타내었으나 indomethacin이 위점막 손상, 위궤양 등의 위장관 장애 및 중추신경장애, 심혈관계 및 신기능 장애, 간기능과 호흡기 장애 등 다양한 부작용을 유발하는 것을 감안한다면 아주 우수한 결과라고 판단된다.

Leucocyte elastase에 대한 저해 활성

Leucocyte elastase활성에 대한 *Aloe vera* 추출물의 저해효과를 측정된 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. aloe-emodin은 50 μg/mL, barbaloin은 60 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. 항염제로 주로 사용되고 있는 indomethacin과 aspirin은 각각 50 μg/mL, 100 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었으며, 항염증 활성이 있는 것으로 알려진 acetyl-L-cysteine 및 tetracycline은 각각 700 μg/mL와 800 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다.

이러한 결과는 현재 류마치스 질환의 치료제로 이용되고 있는 비스테로이드성 항염제(non-steroidal antiinflammatory drugs)가 염증의 유발 및 진전에만 우수한 효소활성 저해를 보이고 있는 것을 감안한다면 관절 조직의 파괴를 막는 효능을 함께 갖고 있는 *Aloe vera*의 효과는 상당히 주목할 만

Table 2. Inhibitory effect on leucocyte elastase activity of extracts from *Aloe vera* peel

Materials	IC ₅₀ (μg/mL)
Aloe-emodin	50
Barbaloin	60
Indomethacin	50
Aspirin	100
Acetyl-L-cysteine	700
Tetracycline	800

Table 3. Inhibitory effect on collagenase activity of extracts from *Aloe vera* peel

Materials	IC ₅₀ (μg/mL)
Aloe-emodin	40
Barbaloin	60
Indomethacin	50
Aspirin	100
Acetyl-L-cysteine	700
Tetracycline	800

한 결과라 할 수 있다.

실질적으로 aloe-emodin은 indomethacin과 거의 같은 효소 활성 저해를 보였으며, aspirin보다 2배가량 높은 효소활성 저해를 보였다.

Collagenase에 대한 저해 활성

Collagenase활성에 대한 *Aloe vera* 추출물의 저해효과를 측정한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다. aloe-emodin은 40 μg/mL, barbaloin은 60 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. 항염제로 주로 사용되고 있는 indomethacin과 aspirin은 각각 50 μg/mL, 100 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었으며, 항염증 활성이 있는 것으로 알려진 acetyl-L-cysteine 및 tetracycline은 각각 700 μg/mL와 800 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. Aloe-emodin은 indomethacin에 비해 약간 높은 효소활성 저해를 보였으며 aspirin보다는 2배 이상의 높은 효소활성 저해를 보였다. Barbaloin은 indomethacin보다는 약간 낮았고 aspirin보다는 높은 효소활성 저해를 보였다.

Prostaglandin endoperoxide synthase에 대한 저해 활성

prostaglandin endoperoxide synthase활성에 대한 *Aloe vera* 추출물의 저해효과를 측정한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다. aloe-emodin은 40 μg/mL, barbaloin은 70 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. 항염제로 주로 사용되고 있는 indomethacin과 aspirin은 각각 10 μg/mL, 45 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내었다. Aloe-emodin은 aspirin과 비슷한 효소활성 저해를 보였으나 항염증 활성이 있는 것으로 알려진 acetyl-L-cysteine 및 tetracycline은 각각 400 μg/mL와 750 μg/mL의 IC₅₀값을 나타내어 aspirin, indomethacin에 비해 비교적 낮은 효소활성 저해를 나타내었다. 그러나, 이들은 앞에서 열거한 일련의 심각한 부작용을 동반하기 때문에 이 부작용을 최소화 할 수 있는 *Aloe vera*를 그 우위에 둘 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. Inhibitory effect on prostaglandin endoperoxide synthase activity of extracts from *Aloe vera* peel

Materials	IC ₅₀ (μg/mL)
Aloe-emodin	40
Barbaloin	70
Indomethacin	10
Aspirin	45
Acetyl-L-cysteine	400
Tetracycline	750

Table 5. Antiinflammatory activity of *Aloe* materials

Materials	Dose (mg/kg, i.p)	Sweelling(%)	Inhibition(%)
Control	-	62.6±4.5	0
Aloe-emodin	100	29.5±3.2	52.9
Barbaloin	100	15.7±1.8	74.9
Indomethacin	10	31.5±1.8	49.7
Aspirin	100	30.1±0.6	51.9

Carrageenan 족부종 억제 효과

분리된 성분의 carrageenan 족부종 억제 효과는 체중 110~130 g의 7주령 Wister계 웅형(♂) 쥐를 사용하여 부종을 및 억제율을 측정하여 항염증제로 이용되고 있는 indomethacin 및 aspirin과 비교한 결과는 Table 5에 나타내었다.

Aloe-emodin은 100 mg/kg의 투여량으로 52.9%의 억제효과를 나타내었으며 이 억제효과는 indomethacin의 약 1/10이었으며, Aspirin과는 유사한 활성을 보였다. 반면 barbaloin의 경우 100 mg/kg의 투여량으로 74.9% 억제효과를 나타내었으며 이 억제효과는 indomethacin의 약 1/5이었으며, Aspirin의 약 1.5배 효과를 나타내어 비교적 우수한 항염증 활성을 갖는 것으로 판단된다.

인체치은세포에 대한 독성 평가

구내염등 항염증 활성이 있는 것으로 평가된 aloe-emodin과 barbaloin의 인체치은 섬유모세포에 대한 독성여부를 평가하기 위해 측정한 세포활성의 결과는 Table 6과 같다. 즉 aloe-emodin과 barbaloin의 첨가 농도가 증가함에 따라 세포의 활성은 감소하였으며 aloe-emodin에 비해 barbaloin의 독성이 비교적 낮은 것으로 평가되었다. aloe-emodin의 경우에

Table 6. Cell activity of aloe-emodin and barbaloin on human gingival fibroblast cell

Concentration (μg/mL)	Relative cell activity ¹⁾ (%)	
	Aloe-emodin	Barbaloin
0	100.0±0.95 ^{a2)}	100.0±1.57 ^a
1	100.5±0.07 ^a	101.0±0.77 ^a
5	99.7±0.59 ^a	101.2±0.27 ^a
10	16.1±3.43 ^b	30.8±3.31 ^c
20	18.3±6.38 ^b	37.6±2.44 ^b

¹⁾Cell activity was measured after 24 hour of incubation.

²⁾Mean±standard deviation and means with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

첨가농도가 1, 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포의 활성은 대조군에 대한 상대적인 활성값으로 100.5%, 99.7%, 16.1% 및 18.3%로 나타났으나 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가 농도에서는 대조군과 유의적인 차이($p < 0.05$)가 없는 것으로 평가되었다. Barbaloin의 경우의 세포활성은 1, 5, 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 101%, 101.2%, 30.8% 및 37.6%로 나타났으며 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가 농도에서는 aloe-emodin과 같이 대조군과 유의적인 차이($p < 0.05$)가 없었다. 그러나 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가농도에서 aloe-emodin과 barbaloin은 모두 세포활성에 유의적인 저해 현상을 나타내었는데 이는 현재까지 치아우식 및 치주병 예방 치료제로 사용되고 있는 항생제 및 항균제들이 갖는 공통적인 문제점으로 대두되어 왔던 것이다. 즉 chlorhexidine(항균 농도 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 인체치은 세포에 대해 독성을 나타내고 있음에도 불구하고 현재 치아우식 및 치주병 예방 치료제로 가장 널리 사용되고 있다⁽²⁵⁾. 장 등⁽²⁶⁾은 chlorhexidine이 1.0 및 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 인체치은 세포의 활성을 75.2 및 99.7% 정도 감소시키는 것으로 보고하고 있어 본 연구에서 추출, 정제한 aloe-emodin이나 barbaloin 보다 더 강력한 독성을 나타내는 것으로 평가되었다. 또한, Heidemann⁽²⁷⁾의 보고에 의하면 aloe-emodin은 CHO(Chinese hamster ovary cell)의 chromosome aberration test와 Sallmonella reverse mutation test의 *in vitro* test에서만 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 독성을 나타내었으며, Chinese hamster V79 cell과 NMRI mice bone marrow cell의 micronucleus test, wister rat bone marrow chromosome aberration test, mouse spot test 등 *in vivo* test에서 2000 mg/kg의 농도까지 독성을 나타내지 않았다고 보고하였다.

따라서 *Aloe vera* 껍질에서 추출, 정제한 aloe-emodin과 barbaloin은 현재 가장 보편적으로 사용되고 있으며 치아의 착색, 구강상피세포의 박리 및 미각이상 등의 여러 가지 부작용을 초래하는 chlorhexidine의 대체 예방제제로 가능성이 있을 것으로 사료된다.

요 약

Aloe vera 껍질로부터 구내염 등 항염증제제를 개발하기 위해 항염증 활성이 있는 분획을 분리, 동정하고, 염증과 관련된 효소활성에 대한 저해효과를 조사하였다.

Aloe vera 껍질의 추출물을 용매에 따라 분획하였고, 활성이 우수한 ethylacetate층을 silica gel column chromatography 및 preparative thin layer chromatography를 통해 두 가지 활성물질을 정제하였다. 정제된 두 가지 물질은 UV spectrum과 FT-IR, ¹H-NMR, 및 Mass spectrum 분석을 통해 aloe-emodin과 barbaloin으로 동정하였다. *Aloe vera* 분획물의 hyaluronidase 활성저해를 측정된 결과는 aloe-emodin은 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, barbaloin은 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. Leucocyte elastase 활성 저해를 측정된 결과는 aloe-emodin은 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, barbaloin은 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. Collagenase 활성 저해를 측정된 결과는 aloe-emodin은 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, barbaloin은 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 값을 나타내었다. 또한 prostaglandin endoperoxide synthase 활성 저해를 측정된 결과는 aloe-emodin은 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, barbaloin은 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 값을

나타내었다. 쥐를 이용한 carrageenan측 부종 억제효과는 aloe-emodin의 경우 100 mg/kg의 투여량으로 52.9%의 억제효과를 나타내었으며, 이 억제효과는 indomethacin의 약 1/10이었으며, aspirin과는 유사한 활성을 보였다. 반면 barbaloin의 경우 100 mg/kg의 투여량으로 74.9%의 억제효과를 나타내었으며 이 억제효과는 indomethacin의 약 1/5이었으며, aspirin의 약 1.5배 효과를 나타내어 우수한 항염증 활성을 갖는 것으로 판단된다. 인체치은세포에 대한 독성은 aloe-emodin보다 barbaloin이 적게 나타났으며 이 두 가지 물질은 1 및 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 독성이 전혀 나타나지 않으나 10 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 독성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 상용되고 있는 chlorhexidine에 비해서는 유의적으로 독성이 적은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 aloe-emodin 과 barbaloin은 항우식 및 항염증 활성이 우수할 뿐만 아니라 치은세포의 독성이 비교적 낮아 구강병 예방제제로의 개발 가능성이 우수하다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2001년도 원광보건대학 교내 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee, M.S. Clinical periodontology for the dental hygienist. pp 78-88, Songsan Publication, Seoul, Korea (1985)
2. Natvig, J.B. and Mellbye, O.J. Immunology in the pathogenesis of leumatoid arthritis. Triangle. 18: 39(1979)
3. Littinac, B.H. Immunological consideration in connective tissue diseases. Triangle. 19: 53(1980)
4. Deby, C. Metabolism of polyunsaturated fatty acids, precursors of eicosanoids. In prostaglandins; Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids(P. B. Curtis-prior, ed). pp.1-36. Churchill Livingstone, New York(1988)
5. Paco-Asciak, C.R. Characterization of enzyme in prostanoid synthesis. In prostaglandins; Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoid(P. B. Curtis-prior, ed). pp. 37-45. Churchill Livingstone, New York(1988)
6. Shimizu, T. and Wolfe, L.S. Arachidonic acid cascade and signal transduction. J. Neurochem. 55: 1(1990)
7. Both, G.J., Siok, C.J. and Ozols, J. Structural characteristics of prostaglandin synthetase from sheep vesicular gland. J. Biol. Chem. 255: 1301(1980)
8. Dewitt, D.L., Rollins, T.E., Day, J.S., Gauger, J.A. and Smith, W.L. Orientation of the active site and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 256: 10375(1981)
9. Kulmacz, R.L. Topology of prostaglandin H synthase. J. Biol. Chem. 264: 14136(1989)
10. Yamamoto, S. Mammalian lipooxygenases; molecular and catalytic properties. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acid. 35: 219(1989)
11. Rainsford, K.D. Inhibition of eicosanoid metabolism. In prostaglandins; Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids(P. B. Curtis-prior, ed). pp. 52-68. Churchill Livingstone, New York(1988)
12. Bowery, B. and Lewis, G.P. Inhibition of functional vasodilation and prostaglandin formation in rabbit adipose tissue by indomethacin and aspirin. Br. J. Pharmacol. 47: 305(1973)
13. Deby, C., Descamps, M., Binon, F. and Bacq, Z.M. Correlation

- between antiinflammatory properties and inhibition of prostaglandin synthesis in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1089(1975)
14. Flower, R.J. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol. Rev.* 26 : 33(1974)
 15. Raz, A. and Needleman, P. Differential modification of cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin endoperoxide synthase by proteolytic digestion and hydroperoxides. *J. Biochem.* 269: 603(1990)
 16. Park, C.S., Shin, Y.S., Ryu, I.H. and Lee, K.S. Antimicrobial activity of *Aloe vera* peel against *Streptococcus mutans* JC-2(1). *Korean J. Food Nutr.* 13: 139-145(2000)
 17. Park, C.S., Shin, Y.S., Ryu, I.H. and Lee, K.S. Isolation and purification of antimicrobial active substances from *Aloe vera* peel(II). *Korean J. Food Nutr.* 13: 146-151(2000)
 18. Kakegawa, H., Mastsumeto, H., End, K., Satoh, T., Nonaka, G.I. and Nishioka, I. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cell. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 5079(1985)
 19. Tschesch, H., Engelbrecht, S. and Wenzel, H.R. Leukocyte elastase method of enzymetic analysis. 3rd ed. pp. 176-184. Verlag Chem.(1986)
 20. Brown, J.H. and Pollock, S.H. Inhibition of elastase and collagenase by antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Mod.* 135: 792(1970)
 21. Collier, J.G. Flower, R.J. Effect of aspirin on human seminal prostaglandin, pp. 852-853. *Lancet.* (1971)
 22. Norio, N. and Hideo, N. Active components having anti-inflammatory and analgesic activities from armeniaceae semen, pruni japonicae semen and almond seeds, *Shoyakugaku, zasshi.* 42: 81-88(1988)
 23. Kim, S. S. Effect of tannin and vitamin B6 on the growth and attachment to the test tube wall of *Streptococcus mutans* 10449. wonkwang graduated thesis(1991)
 24. Park, C.S. Shin, Y.S. Effect of Phellodendri cortex L. on the activity of glucosyltransferase and human Gingival cell, growth and membrane permeability of *Streptococcus mutans* JC-2. *J. Korean Acad. Dental Health.* 19: 447-456(1995)
 25. Lander, P.Z., Newcomb, G.M., Seymour, G.J. and Dowell, R.N. The antimicrobial and clinical effects of a single subgingival irrigation of chlorhexidine in advanced periodontal lesions. *J. Clin. Periodont.* 13: 74-80(1986)
 26. Jang, B.S., Chung, C.P., Son, S.H. and Bae, K.H. The effect of honoliol and magnolol on the antimicrobial, bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production. *J. Korean Acad. Periodontology.* 23: 145-158(1993)
 27. A. Heidemann, H.G. and Miltenburger, C.M. The Genotoxicity status of Senna *Pharmacology.* 47: 178-186(1993)

(2001년 5월 10일 접수)