

신규 생약 복합추출물에 의한 Prostaglandin E₂ 활성억제, 염증성 Cytokine 생성 저해 및 진통 작용에 관한 연구

권순용 · 이화성 · 이순혁¹ · 임군일² · 김시나³ · 김희석³ · 황성완³ · 황성연^{3*}
가톨릭대학교 성모병원 정형외과, ¹고려대학교 안암병원 정형외과,
²동국대학교 일산병원 정형외과, ³(주)KMSI 부설 한국과학기술연구소

Analgesic Effect and Inhibition of Prostaglandin E₂ Activity and Pro-inflammatory Cytokines Production by Ethyl Alcohol Extract from New Herbal Formula

Soon Yong Kwon, Hwa Sung Lee, Soon Hyuck Lee¹, Gun Il Im², Si Na Kim³,
Hee Seok Kim³, Sung Wan Hwang³, and Sung Yeoun Hwang^{3*}

Department of Orthopaedics, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea,
¹Department of Orthopaedics, Korea University Anam Hospital,
²Department of Orthopaedics, Dongguk University Ilsan Hospital,
³Korea Medical Science Institute

Abstract – New herbal formula (NHF) is the ethanol extract mixture of *Puerariae radix*, *Artemisia capillaries* and *Perilla frutescens*. We have investigated the effects on anti-inflammation by NHF and attempted acetic acid induced writhing to verify the analgesic effect. Macrophages and chondrocytes were obtained from mouse and rabbit. Inflammation was induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , interferon- γ , and lipopolysaccharide. NHF showed strong inhibitory efficacy against cytokine-induced proteoglycan degradation, PGE₂ production, NO production, and MMP-9 expression in rabbit articular chondrocyte. In the writhing test, NHF exhibited a dose-dependent inhibition of writhing. Furthermore, NHF increased the activity of SOD. NHF have anti-inflammatory and analgesic activities, and could be a good herbal medicine candidate for curing of osteoarthritis.

Key words – Anti-inflammation, Analgesic, PGE₂, MMPs, osteoarthritis

서 론

노인 인구의 증가로 인한 골관절염의 치료에 대한 관심이 높아지고 있으며, 실제 정형외과 진료 영역에서 상당 부분을 차지하고 있다. 관절염의 진행 정도가 심하여 인공관절 치환술 등 수술적 치료를 시행하기 전까지는 약물치료를 하는 것이 일반적이는데, 다양한 비스테로이드성 소염제(Nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)와 스테로이드 제제가 사용된다. 그러나 이 약제들은 소화기에 부작용을 일으키는 문제점을 갖고 있는데, 이는 위장 내벽을 보호하는 효소인 Cyclooxygenase-1 (COX-1)과 통증 및 염증을 일으키는

효소인 Cyclooxygenase-2 (COX-2)를 동시에 억제하기 때문이다.¹⁾ 그래서 근래에는 COX-1을 억제하지 않고, COX-2만을 억제하는 약제가 개발되어져 왔으며, 히알루론산 (hyaluronic acid), glucosamine, chondroitin sulfate 같은 제제 등이 소개되었다. 본 연구실에서 개발된 신규 생약 복합추출물은 오래 전부터 일반인들에게 널리 이용되어져 이미 안전성이 입증된 인진(*Artemisia capillaris*), 갈근(*Puerariae radix*) 및 차조기(*Perilla frutescens*)의 3가지 천연물에서 얻은 복합 추출 물질이다. 이 중 인진은 지방간, 간암, 간염, 황달 등 간질환의 치료와 예방 물질로 사용되었고, 더불어 식욕 증진, 소화 불량, 담낭염 등 위장 질환의 치료, 증풍, 혈액순환, 청혈 작용 등 순환 기계의 개선 및 당뇨병의 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 갈근은 항산화 작

*교신저자(E-mail) : onlysina@nate.com
(FAX) : 032-851-2508

용, 항염 작용, 혈압 강하 작용, 알코올 중독 예방 작용, 간 보호 작용, 숙취 억제 작용, 항천식 작용 등이 보고되었다. 또한 갈근은 뇌혈관과 관상동맥을 확장시킬 수 있어 뇌하수체 후엽 호르몬에 의해 발생하는 급성 심근 허혈을 예방할 수 있다. 특히 apigenin과 daidzein은 소염 효능이 있음이 밝혀졌고, 최근에 daidzein에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.²⁻⁷⁾ 차조기는 발한, 진해, 건위, 이뇨, 진정 및 진통제로 사용한다. 갈근 이외의 인진 및 차조기에는 특별한 소염, 진통 및 관절염과 관련된 보고는 되어 있지 않으나 소염 및 진통에 효능이 있는 apigenin을 함유하고 있어 퇴행성 관절염 치료제의 가능성을 지니고 있다.⁸⁻¹¹⁾ 저자들은 이와 같은 생약 제제의 작용을 이용해 골관절염의 약물 치료에 응용하고자 복합체를 추출해 *in vitro*, *in vivo* 실험을 시행, 우수한 결과를 보여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

추출 및 분획

본 연구에 사용한 신규 생약 복합추출물의 재료인 인진과 갈근은 경기도에 소재한 대영제약에서 구입하였고, 차조기는 경상북도에 소재한 옴니허브에서 구입하였다. 복합 추출물 구성약재 100 g (인진:갈근:차조기=3:3:4)을 환저 플라스크(round bottom flask)에 2.5 L 70% 에탄올을 가하여 60에서 2시간 2회 환류 추출하고 Whatman No.2 여과지로 여과한 후 여액을 감압 농축하고 동결 건조하여 신규 생약 복합추출물을 얻었다.

세포 배양

(1) 생쥐 대식세포(macrophage) - 생쥐 유래의 대식세포주인 RAW 264.7을 한국 세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS, 26140-079, Gibco, Co.), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 배지가 담겨 있는 24 well plate에 2×10^6 개의 세포를 접종하고, 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 습윤 조건 하에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에서 산화질소를 유도하기 위하여 대장균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)를 100 ng/ml의 농도로 투여하였다. 대조군에는 용매인 dimethylsulphoxide(DMSO)만을 처리하고, 실험군에서는 신규 생약 복합추출물 (100, 200 및 300 µg/ml) 처리 후, 20시간 동안 배양하였다.

(2) 토끼 관절 연골세포(chondrocyte) - 2~3 주령의 토끼 관절로부터 연골 조직을 분리하여 10% FBS-DMEM 배지를 이용해서 일차 세포배양을 시행하였다. 배양 후 1×10^6 개의 세포를 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co. USA)이 첨가된 10% FBS-DMEM 배지의 60 mm dish에 접종하고, 5~6일 동안 37°C, 5% CO₂ 습윤 조건 하에서 다시

배양하였다. 연골세포(passage 0)가 80% 정도 자랐을 때, 배지는 무혈청(serum-free) DMEM으로 바꾸고, 대조군을 제외한 모든 dish에 cytokine mixture(CM; 1 ng/ml IL-1β, 10 ng/ml TNF-α, 1 ng/ml IFN-γ, 1 µg/ml LPS)를 투여한 후 20분간 배양하였다. 대조군과 음성 대조군(CM)에는 용매인 0.05% DMSO만 처리하고, 실험군에는 신규 생약 복합추출물 (100, 200 및 300 µg/ml)을 처리 후, 20시간 동안 배양하였다.

아질산염(nitrite, NO₂⁻) 분석

염증성 cytokine들에 의해 활성화된 생쥐 대식세포와 토끼 연골세포 배양액에서 산화질소(nitric oxide, NO) 생성 저해 활성을 측정함으로써, 신규 생약 복합추출물의 항염증 효과를 확인하였다. 신규 생약 복합추출물은 100, 200, 300 µg/ml로 처리하였고, 염증을 일으키는 cytokine들에 의해 생성된 NO의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 Griess 시약[0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O]을 이용하여 측정하였다. 즉, 각각의 세포 배양 상층액 100 µl와 Griess 시약 100 µl를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백 다당(proteoglycan) 분해 억제 효과 분석

관절 조직의 주요 성분 중 하나인 단백질 다당에 대한 신규 생약 복합추출물에 의한 분해 억제 정도를 측정하였다. 토끼 연골 조직의 구성 성분인 단백질 다당의 분해를 유발시켜 배양액 내의 분해 산물인 glycosaminoglycan(GAG)을 1,9-dimethylmethylene blue(DMB) dye로 염색 후 발색된 정도를 525 nm에서 흡광도를 측정하고, chondroitin sulfate로 표준 정량하였다.

Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 정량 분석

신규 생약 복합추출물에 의한 COX-2의 활성 억제를 생쥐 대식세포 및 토끼 연골세포에서 확인하기 위해 PGE₂의 농도 변화를 확인하였다. 염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE₂의 농도변화를 assay kit(Amersham, U.K)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 정량하였는데, Goat anti-mouse immunoglobulin(Ig)가 부착되어 있는 96-well plate에 PGE₂ 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE₂-peroxidase conjugate와 mouse anti-PGE₂를 각각 50 µl씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline(PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE₂ 혹은 PGE₂-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 용액 150 µl를 가하여 실온에서 30분간 발색시키고, 1 M H₂SO₄ 100 µl를 가하여 반응을 중단시킨 다음

450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법은 시료의 PGE₂와 첨가된 PGE₂-peroxidase conjugate와의 경쟁 반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다.

Matrix Metalloproteinase(MMP) 활성 검사

염증성 변화에 의해 관절 연골 조직에서는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13의 활성이 증가하는데, 본 실험에서는 신규 생약 복합추출물의 관절 조직 분해 효소 활성 억제 효과를 확인하기 위하여 MMP-9의 활성에 관한 실험을 하였다. 세포 수집 후, 원심분리를 하여 상층액만 취한다. 상층액과 염료를 섞은 후, 37°C에서 1시간 동안 배양하고, 10% zymogram gel을 이용하여 100 V의 전압 하에 3시간 동안 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. Gel에서 SDS를 제거하기 위해 0.5% Triton X-100 용액으로 실온에서 30분 동안 3회 gel을 세척하고, developing buffer(0.05 M Tri-HCl, pH 7.0, 0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 1 M ZnCl₂, 0.02% NaN₃)에 담근 후, 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 0.25% Commassie Brilliant Blue(R250, Sigma-aldrich, USA)로 1시간 동안 염색한 후 탈색(25% ethanol, 8% acetic acid)하였다.

유해 활성 산소의 분해 효과 검사

각각의 well에 유해 활성 산소의 검출자(radical detector)를 200 µl 넣고, 제조된 신규 생약 복합추출물 10 µl를 첨가한다. 그 후 xanthine-xanthine oxidase를 첨가하여 유해 활성 산소기를 발생시킨 다음, 20분 동안 실온에서 배양하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 그 기울기의 변화 정도로 유해 활성 산소의 분해 정도를 비교하였다.

In vivo 진통 효과 검사

실험동물에서의 진통 효과를 관찰하기 위하여 intra-plantar formalin test 및 acetic acid writhing test를 실시하였다. 체중 20-22 gm의 생쥐 수컷 8마리를 1군으로 하여 시료 300 mg/kg과 600 mg/kg을 각각 경구 투여하였다. Intra-plantar formalin test는 생쥐의 뒷발 중 왼쪽 발바닥에 1% formalin을 10 µl 피하 주사하고, acrylic observation chamber(20 cm height, 20 cm diameter) 안에 넣은 다음 40분 동안 행동을 관찰하였다. 주사된 발바닥을 타다다 거리거나 핏거나 하는 등의 행동을 관찰 기록하였으며, 40분 중에 처음 5분은 1st phase라고 하고, 1st phase 후 15분부터 나머지 20분을 2nd phase라고 하였다.

Acetic acid writhing test는 경구투여 1시간 후에 0.6% 초산 생리 식염액 0.1 ml/10 gm 단위로 복강 내 주사하고, 주사 후 10분 후부터 10분간 각각의 쥐가 나타내는 통증 반

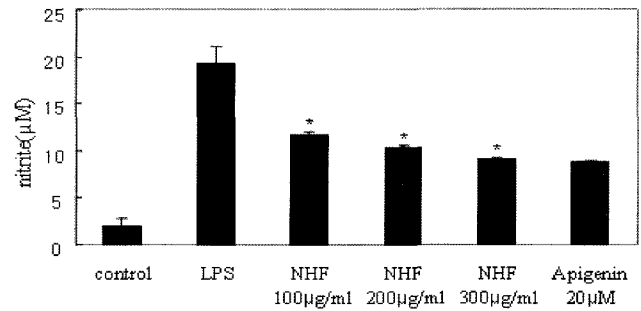


Fig. 1. Inhibition of NO production in LPS-induced RAW 264.7 cell by NHF. The cells were stimulated with cytokine (LPS; 100 ng/ml of lipopolysaccharide) and NHF was added at doses ranging from 100 to 300 µg/ml. The cells were incubated for an additional 20 h. Data are mean±S.D. of triplicate per treatment. *p<0.05: significantly different from the negative control (LPS).

응인 등을 쭉 펴거나 뒷다리를 몸 뒤로 완전히 뻗어 제치는 현상(writhing)을 보이는 횡수를 관찰하였다.

통계 분석

실험 결과는 mean±S.D.으로 표시하였으며, 음성 대조군(LPS 또는 CM)과 신규 복합 추출 분말 사이의 유의성은 paired student's t-test를 적용하여 각각 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

산화질소(NO) 생성 억제 효과

음성 대조군(LPS 또는 CM)에 비해 생쥐 대식세포에서는 농도-의존성 NO 생성 저해 효과를 보였으며(Fig. 1, *p<0.05), 특히, 300 µg/ml 처리군에서는 apigenin 20 µM과 같은 수준까지 저해 효과를 보였다. 또한, 토끼 연골세포에서도 생쥐 대식세포 실험에서와 같이 농도-의존성으로 NO 생성을 억제하였으며, 300 µg/ml 처리군에서도 apigenin 20 µM과 비슷한 수준으로 저해 효과를 보였다(Fig. 2, **p<0.01, ***p<0.001).

단백 다당(proteoglycan) 분해 억제 효과

음성 대조군(CM)의 경우는 단백질 다당의 분해 산물인 GAG 함량이 28.13±1.02 µg/mg으로서, 대조군(11.63±0.88 µg/mg)에 비해 유의성 있는 증가를 보여 염증성 cytokines에 의한 proteoglycan의 분해를 확인하였다. 신규 생약 복합추출물을 처리한 실험군에서는 농도의 증가에 따라 단백질 다당의 분해가 감소되는 것으로 나타났으며, 300 µg/ml(13.18±0.62 µg/mg) 농도에서는 Apigenin 20 µM(18.90±1.26 µg/mg)보다 우수한 억제효과를 보였을 뿐만 아니라, 대조군과 비슷한 수준으로 단백질 다당의 분해를 유의성 있게 저해하는 것은

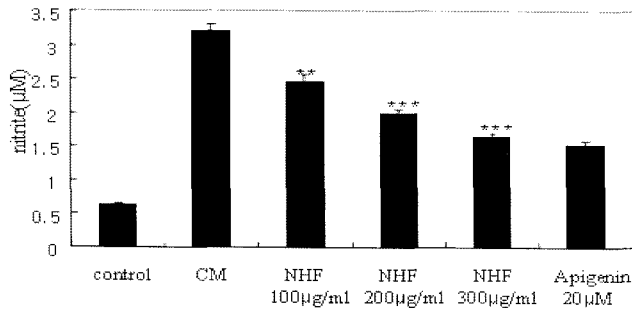


Fig. 2. Inhibition of NO production in rabbit articular chondrocytes by NHF. The cells were stimulated with cytokine mixture (CM; 1 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α , 1 ng/ml IFN- γ , 1 μ g/ml LPS) and NHF was added at doses ranging from 100 to 300 μ g/ml. The cells were incubated for an additional 20 h. Data are mean \pm S.D. of triplicate per treatment. **p<0.01, ***p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

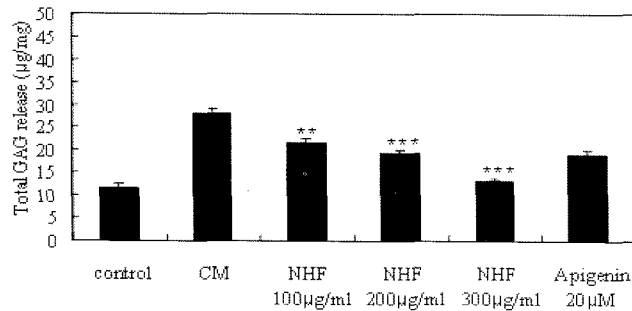


Fig. 3. Dose dependent inhibition of cytokines-stimulated proteoglycan release from rabbit articular chondrocytes by NHF. Apigenin (20 μ M) was added as the positive control. Proteoglycan release was measured 20 h after the addition incubation of NHF. Data are mean \pm S.D. of triplicate per treatment. **p<0.01, ***p<0.001 : significantly different from the negative control (CM).

로 관찰되었다(Fig. 3, *** p<0.001).

Prostaglandin E₂ 생성 억제에 미치는 영향

생쥐 대식세포에서는 염증성 cytokine을 처리하지 않은 대조군(21.62 \pm 3.22 pg/ml)에 비하여 처리한 음성 대조군 (LPS, 123.20 \pm 0.00 pg/ml)에서 PGE₂의 농도가 약 6배 증가 되었으며, 또한 음성 대조군에 비교해 신규 생약 복합추출 물을 처리한 실험군에서는 유의성 있는 감소 소견을 보였다(Fig. 4, ** p<0.001). 토끼 연골세포에서도 염증성 cytokine 을 처리하지 않은 대조군(6.72 \pm 0.65 pg/ml)에 비하여 처리 한 음성 대조군(CM, 160.62 \pm 13.39 pg/ml)에서 약 24배 증 가를 보였고, 이와 비교해 신규 생약 복합추출물을 처리한 군에서는 농도에 반응하여 감소하였다. 모든 농도에서 음성 대조군에 비해 농도-의존성의 유의성 있는 감소를 보였으

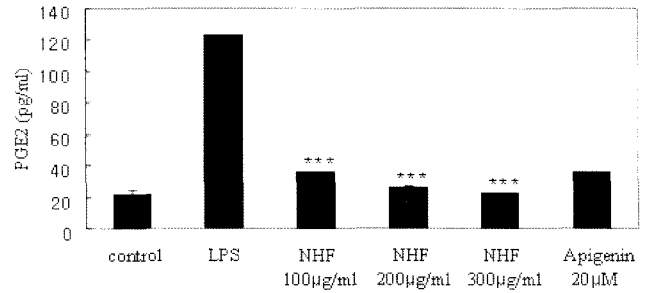


Fig. 4. Effect of NHF on PGE₂ production in RAW 264.7 cell. The cells were stimulated with LPS in the presence of absence of inhibitor of PGE₂. PGE₂ production was measured 20 h after the addition incubation of NHF. Data are mean \pm S.D. of triplicate per treatment. ***p<0.001: significantly different from the negative control (LPS).

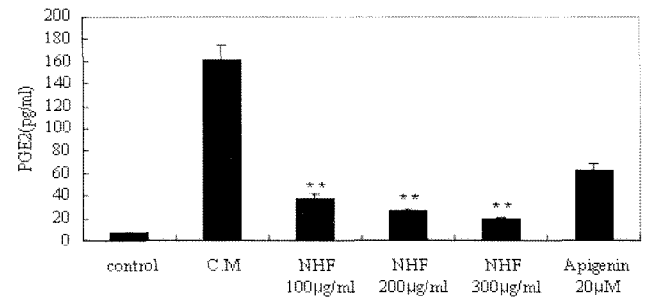


Fig. 5. Effect of NHF on PGE₂ production in rabbit articular chondrocytes. The cells were stimulated with cytokine mixture (CM) in the presence of absence of inhibitor of PGE₂. PGE₂ production was measured 20 h after the addition incubation of NHF. Data are mean \pm S.D. of triplicate per treatment. **p<0.01, ***p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

며, 양성 대조군(apigenin 20 μ M, 24.46 \pm 1.16 pg/ml)도 유의 적인 감소를 보였다(Fig. 5, ** p<0.01).

Matrix Metalloproteinase 활성도

염증성 cytokine에 의해 증가된 MMP-9의 활성이 신규 생 약 복합추출물에 의해 농도-의존적으로 억제되었으며, 200, 300 μ g/ml에서는 양성 대조군인 Apigenin 20 μ M의 수준까 지 감소되었다(Fig. 6).

유해 활성 산소의 분해 효과

Xanthine-xanthine oxidase에 의해 발생된 활성 산소를 제 거하여 생체를 보호하는 superoxide dismutase(SOD)를 측 정함으로써 유해활성산소의 분해 정도를 비교하였다. 신규 생약 복합추출물의 양이 증가할수록 SOD가 0.5 U/m에서 2.6 U/m으로 상승하는 소견이 관찰되어, 활성도가 농도-의 존적으로 증가하여 유해 활성 산소의 분해 효과가 증진됨

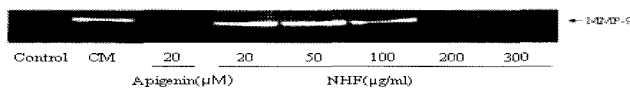
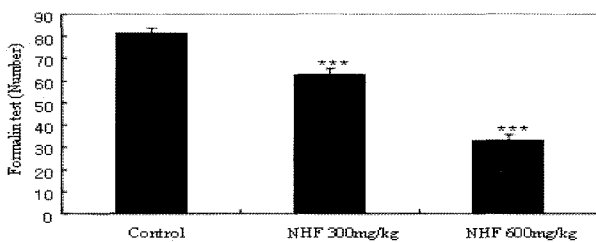


Fig. 6. Effect of NHF on enzyme expression of MMP-9. After treatment with cytokines and NHF, the culture media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue. The experiment was repeat in twice independently.

Table I. The activity of super oxide dismutase

NHF (µg/ml)	50	100	200	300
SOD (U/ml)	0.5	1.2	1.9	2.6

First phase



Second phase

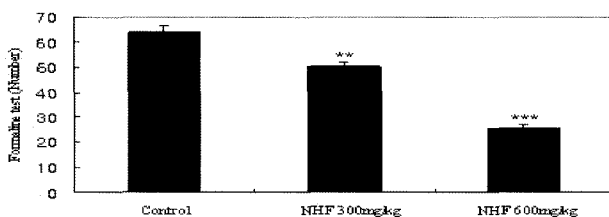


Fig. 7. Effect of NHF on the formalin-induced nociceptive behavioral response. The cumulative nociceptive response number of licking, shaking and biting the injected paw was measured the number during 0~5 min. (first phase) and 20~40 min. (Second phase). **p<0.01, ***p<0.001: significantly different from the control group. All value are mean±S.D. (n=8).

을 알 수 있었다(Table I, p<0.05).

진통 효과 실험 결과

Intra-plantar formalin test에서는 신규 생약 복합추출물 600 mg/kg 투여군에서 1st phase 뿐만 아니라 2nd phase 모두 대조군에 비교해 약 50% 정도의 진통 효능을 보였다(Fig. 7, **p<0.01, ***p<0.001). Acetic acid writhing test에서 대조군은 10분 동안에 19회의 writhing 증상을 일으켰으며, 신규 생약 복합추출물 300 mg/kg 투여군에서는 11.67±1.53회(35.0% 저해)로 감소를 보였고, 600 mg/kg 투여군에서는 9.0±1.41회(50.0% 저해)로 유의성 있는 억제 효과를 나타내어 진통 효과가 있음을 알 수 있었다(Table II, p<0.05).

Table II. Effect of NHF on the writhing syndrome in mice

	Writhing number	Inhibition rate (%)
Control	19.00±1.41	-
NHF (300 mg/kg)	11.67±1.53	35
NHF (600 mg/kg)	9.00±1.41	50

고 찰

모든 호기성 생물체는 산소를 이용한 에너지 대사 과정에서 항상 발생하는 활성 산소의 상해에 대하여 자기 방어 기전을 구비하고 있지만, 조직의 방어 능력을 초월한 활성 산소의 생성은 여러 질환의 원인이 되고 있다. 활성 산소는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소(³O₂)가 산화, 환원 과정에서 환원되어 생성되는 일중항산소인 과산화물 음이온(superoxide anion, ¹O₂⁻)과 과산화수소(H₂O₂), 아하이드록시 라디칼(·OH)과 같은 자유기(free radical)로서, 이들은 단백질, DNA, 효소 및 T 세포와 같은 면역 계통의 인자를 손상시켜 관절염을 비롯한 각종 질병을 유발시킨다. 골관절염의 치료로는 수술 전 스테로이드 제제 및 비스테로이드성 소염제를 복용하는 방법이 널리 사용되고 있으나, 위장관 등에 부작용으로 장기간 복용할 수 없는 문제점을 안고 있다. 최근 glucosamine, chondroitin sulfate 같은 보조제가 사용되고 있으나, 소염 및 통증의 경감이 전혀 없고, 장기간 투여가 필요하며, 퇴화가 이미 심하게 진행된 노인들에게서는 효과가 없다. 그러나 위장 장애 등의 부작용이 없어 소염 진통제와 함께 사용되고 있다.

골관절염이 진행되면, 염증 반응과 함께 연골이 파괴되어 활액 내로 단백 다당이 방출되며, prostaglandin E₂의 농도가 증가하여 통증을 유발하게 된다. 또한, 염증 부위에서는 과다한 양의 NO가 발생하여 세포 조직의 괴사를 촉진시킨다. 이러한 NO는 inducible nitric oxide synthetase(iNOS)에 의해 발생되는데, iNOS는 외부자극에 반응하여 생체를 방어하려는 목적으로 단시간에 과량의 NO를 생성하지만, 관절염과 같은 질환에서는 과잉 분비된 NO가 괴사, 통증 등의 이차적인 부작용을 일으키게 된다.¹²⁾ COX-2는 통증 유발물질인 prostaglandin을 합성하는 효소이며, 이는 NO를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진된다. 즉, 활액 내의 단백 다당 및 PGE₂의 농도를 감소시키고, iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 것, 관절 조직 분해 효소인 MMP의 활성을 억제하는 것은 골관절염 치료에 중요한 지침이 된다.¹³⁻¹⁹⁾ 이와 같은 점을 고려하여 독성이 없는 천연물에서 소염, 진통 및 연골 분해 억제 효능을 지닌 물질을 얻는다면 그 가치는 상당할 것이다.

본 연구에서 사용한 신규 생약 복합추출물의 구성 중 갈근에 대한 항산화 효능의 보고는 수 없이 많으며, apigenin 및 daidzein과 같은 소염에 효능이 있는 물질을 포함하고 있

고, 또한 염증 부위에서만 작용하는 효소인 COX-2의 활성을 억제하는 보고도 있다.^{8-11,20)} 따라서 저자들은 신규 생약 복합추출물에 대한 생쥐 대식세포, 토끼 연골세포 및 동물에서 골관절염 항염증 작용, 염증 유발 관련 효소 억제 작용, 관절 조직 분해효소 억제 작용 및 소염 진통 작용 등의 치료 작용을 확인하여 골관절염 치료 후보제로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 생쥐 대식세포 및 토끼 연골세포에 대해 염증성 cytokine으로 iNOS 발현을 유도한 후, 신규 생약 복합추출물에 의해 NO 생성이 억제되는 것을 알 수 있었고, DMB assay를 통해서 관절 조직의 중요 성분 중 하나인 단백 다당의 분해 억제 정도를 측정해 본 결과, 분해를 농도-의존적으로 저해할 뿐만 아니라 정상 세포인 대조군과 비슷한 수준까지 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 연골세포를 자극하고, 단백 다당을 생성시켜 연골을 재생시키거나 연골의 파괴를 막는 것과 관련될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 관절 연골 조직의 파괴에 관여하는 MMP-9이 역시 신규 생약 복합추출물의 농도에 따라 감소함을 확인할 수 있었는데, 이는 연골 조직에서 MMP 합성 및 활성화에 의해 파괴된 후 신규 복합 추출물이 항상성(homeostasis)을 유지시키고 균형을 이루게 하여 연골이 특이적 세포외 기질(extracellular matrix) 단백질을 정상적으로 합성할 수 있게 하는 것으로 생각된다. 이런 골관절염에 대한 항염증 및 관절 조직 분해효소 억제 작용뿐만 아니라, 진통에서도 우수한 효능이 있음을 확인하였는데, 이상과 같은 결과로 보아 신규 생약 복합추출물은 항산화 작용뿐만 아니라, 염증과 통증에 관련된 기전에 관여함으로써 소염, 진통 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 특히, 갈근, 인진, 차조기는 독성이 없어 모두 식품 원료로 사용하기 때문에 단일 물질의 투약으로 인한 독성으로 인한 안전성 문제를 지니고 있지 않아, 향후 소염, 진통 및 연골 재생 기능을 갖는 식품, 의약품, 생활용품 등의 기능성 소재로 활용될 수 있으리라 기대된다.

결 론

인진, 갈근 및 차조기의 복합 추출물인 신규 생약 복합추출물은 생쥐 대식세포 및 토끼 연골세포에서 iNOS, PGE₂, MMP-9를 효과적으로 저해하고, 단백 다당의 파괴를 억제시킬 뿐 아니라 진통 효과 실험에서도 활성을 나타냄으로써 향후 관절염 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Flower, R. J. (1999) New directions in cyclooxygenase research and their implications for NSAID-gastripathy. *Ital J. Gastroenterol.* **28**(4): 23-27.
2. Huh, L. H., Kim, H. C. and Lee, S. J. (1987) Studies on anti-inflammatory activity and its mechanism of daidzein. *J. Pharmaceut. Soc. Kor.* **31**(1): 164-163.
3. Lee, C. H., Han, S. H. and Min, S. G. (1995) The effects of Puerariae radix actechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nurt.* **24**(5): 713-719.
4. Lee, J. S., Kim, E. S. and Kim, S. W. (1999) Effects of extract of Puerariae radix on lipid peroxidation in ethanol-administered rats. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nurt.* **28**(4): 901-906.
5. Lin, R. C., Guthrie, S., Xie, C. Y. et al. (1996) Isoflavone compounds extracted from Pueraria lobata suppress alcohol preference in a pharmacogenetic rat model of alcoholism. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **20**(4): 659-663.
6. Oh, M. J., Lee, K. S., Son, H. Y. and Kim, S. Y. (1990) Antioxidative Components of Pueraria Root. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Tech.* **22**(7): 793-795.
7. Zeng, G.Y., Cheng, Y. S., Fan, L. L., Zhou, Y. P. and Zhang, L. Y. (1982) Pharmacologic studies on Radix puerariae: effects of puerariae flavones on coronary circulation, cardiac hemodynamics and myocardial metabolism in dogs. *Chinese, Med. J.* **95**(2): 145-150.
8. Kobayashi, T., Nakata, T. and Kuzumaki, T. (2002) Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Letters* **176**(1): 17-23.
9. Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* **58**(5): 759-765.
10. Kobayashi, T., Nakata, T. and Kuzumaki, T. (2002) Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Letters* **176**(1): 17-23.
11. Liang, Y., Huang, Y., Tsai, S., Lin-Shiau, S., Chen, C. and Lin, J. (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* **20**(10): 1645-1652.
12. Sandy, J. D., Brwon, H. L. G. and Lowther, D. A. (1978) Degradation of proteoglycan in articular cartilage. *Biochem. Biophys. Acta* **543**: 539-544.
13. Badger, A. M., Cook, M. N., Swift, B. A., Newmantraa, T. M., Gowen, M. and Lark, M. (1999) Inhibition of Interleukin-1 induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, Hymenialdisine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**: 587-593.
14. Elliott, S. and Cawston, T. (2002) The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic disorders. *Drug Aging.* **18**: 87-99.
15. Farrell, A. J., Blake, D. R., Palmer, R. M. and Moncada, J.

- (1992) Increased concentrations of nitric synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **51**: 1219-1222.
16. Lee, S. H., Seo, G. S. and Sohn, D. H. (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by butein in RAW 264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**: 125-132.
17. Nam, K. W., Je, K. G., Lee, J. G., Han, H. J., Kang, S. K. and Mar, W. C. (2003) Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) production by water-soluble sub-fractionated parts from Bee (*Apis mellifera*) Venom. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 383-388.
18. Park, B. J., Cho, M. G., Kim, K. G., *et al.* (1999) Effect of natural product on the inhibition of Lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 cell culture system. *Natural Product Sciences* **5**(3): 113-120.
19. Westacott, C. I. and Sharif, M. (1996) Cytokines in osteoarthritis: Mediators or markers of joint destruction. *Semin. Arthritis. Rheum.* **25**: 254-272.
20. Moon, T. C., Chung, K. C., Son, K. H., Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. (1998) Screening of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors from Natural Products. *Yakhak Hoeji* **42**(2): 214-219.

(2006년 5월 16일 접수)