

강활 에틸아세테이트 분획에 의한 PG 분해, iNOS, PGE₂, 활성 억제 및 진통효과

김시나 · 이현지 · 이은정 · 남경숙 · 김희석 · 황성완 · 황성연*

(주) KMSI 부설 한국외과학연구소

(Received January 23, 2006; Revised April 6, 2006)

Analgesic Activity and Inhibitory Effect of PG Degradation, iNOS and PGE₂ by Ethyl Acetate Fraction of *Angelica Koreana* Radix

Si Na Kim, Hyun Ji Lee, Eun Jeong Lee, Gyeong Sug Nam, Hee Seok Kim, Sung Wan Hwang and Sung Yeoun Hwang*
Korea Medical Science Institute, Incheon 400-103, Korea

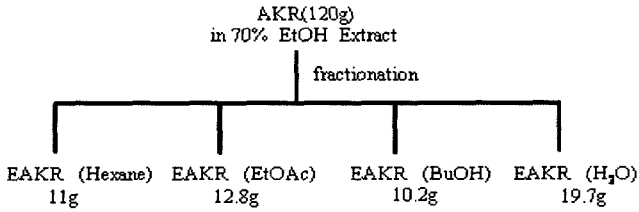
Abstract — Prostaglandins biosynthesis and nitric oxide production have been implicated in the process of inflammation. In this study, we investigated on the effects of ethyl acetate extract of *Angelica Koreana* Radix (EAKR) on the activities of prostaglandin E₂ (PGE₂), proteoglycan (PG) degradation and nitric oxide synthase (NO) in inflammation cytokines-activated rabbit articular chondrocytes. EAKR exhibited inhibitory activities on NO production and PGE₂ production as 73.08% and 89.49%, respectively at 20 µg/ml and inhibited the degradation of PG in a concentration-dependent manner. Zelin zymography analysis demonstrated that EAKR significantly inhibited MMP-2, 9 expression in chondrocytes. *In vivo*, EAKR was shown to have inhibitory effects on acetic acid-induced pain. This study suggests that modulation of PGE₂, NO, PG degradation and MMP-2, 9 by EARK may be important in the prevention of inflammation and osteoarthritis.

Keywords □ anti-inflammation, PGE₂, MMPs, *Angelica Koreana* Radix, osteoarthritis

강활은 Umbelliferae에 속하는 속근초로서 우리 나라의 한방에서는 예로부터 그 뿌리를 강활이라 하여 산한, 산풍, 제습, 지통하는 효능이 있어 풍한감모에 의한 두통, 풍습지통, 경배산통 등에 널리 이용되어 왔다.¹⁾ 강활의 성분으로는 koreanin, iso-imperatorin, oxypeucedanin, prangolarin, bergapton, imperatorin, osthol 등이 보고되어 있으며, 효능은 해열, 진통, 진경작용 등은 강활 메탄올추출물이 쥐에서 약한 진통작용이 있다고 보고하였으며, 물 추출물에서도 쥐에서 혈소판 응집억제작용이 있다고 보고된 바 있다.¹⁻³⁾ 또한, 강활 70% 에탄올 추출 후 Raw 264.7 cell line에서 염증성 cytokine의 한 종류인 TNF- α 의 생성을 억제한다는 보고가 알려져 있다.²⁾ 관절염 질환에서 연골조직의 파괴는 MMP 등에 의한 연골기질의 분해뿐만 아니라 연골세포의 탈분화에 의한 연골기질분자의 합성감소에도 관여한다. 또한 연골세포의 탈분화는 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 및 LPS 등의 염증성

cytokine에 의해 유발된다.⁴⁻⁶⁾ 특히 염증성 cytokine의 경우, 관절세포에서 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의한 nitric oxide(NO), PGE₂, MMPs 생성 및 PG의 파괴를 유도하게 됨으로서 염증 및 통증 반응을 유발하게 된다.⁷⁻⁹⁾ 연골조직의 퇴행은 점진적이고 비가역적으로 일어나 삶의 질을 떨어뜨리는 퇴행성 관절염의 가장 직접적인 원인이다. 우리나라에서는 방사선 소견상 55세 이상에서 80%, 70세 이상에서는 거의 전인구가 퇴행성 관절염을 나타내며 이 중 약 1/4 정도가 임상증세를 나타내는 대표적 퇴행성 질환이다. 지난 수십 년 동안 퇴행성 관절염의 치료를 위해 많은 연구와 노력이 있어왔지만 아직 그 병리적인 원인이나 치료방법이 개발되지 않고 있다.^{10,11)} 따라서, 본 연구에서는 강활의 70% 에탄올 추출물로부터 활성분획인 ethyl acetate 층을 분획하였고, 그 분획을 사용하여 *in vitro*에서 Griess reaction을 통한 NO 측정, 염증 및 통증 유발인자인 PGE₂ 활성 측정, DMB assay를 통한 PG 분해 활성 억제 정도를 측정하였다. 또한 *in vivo*에서는 통증유발 마우스를 이용하여 진통효과를 시험하였다. 그 결과, 긍정적인 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 032-255-2500 (팩스) 032-851-2508
(E-mail) nexia@kmsi.co.kr



Scheme 1 - Isolation procedure of ethyl acetate extract of *Angelica Koreana Radix*.

실험 방법

시료의 추출

본 연구에 사용한 강활은 국내산으로써 경기도에 소재한 대영 제약에서 구입하였다. 강활 120 g을 환저플라스크 (round bottom flask)에 5배(w/v)의 70% 에탄올을 가하여 60°C에서 2시간 2회 추출, 감압농축 하여 얻은 70% 에탄올 추출물을 hexane, ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH) 및 증류수(H₂O) 순으로 분획하여 각 분획물을 동결건조한 결과 다음과 같은 분말을 얻었다. 각각의 분획물을 염증성 cytokines 억제효과 검색의 시료로 사용하여 가장 활성이 뛰어난 EtOAc 분획물을 사용하였다(Data not shown).

실험동물

Primary culture에 사용한 뉴질랜드 화이트 토끼(수컷)와 통증 유발 마우스 진통 시험에 사용한 ICR 생쥐(수컷)는 중앙실험동물(서울 소재)에서 구입하였다. 토끼는 22±2°C에서 1~2일간 사육한 후, 실험에 사용하였으며, ICR 생쥐는 20~22 g으로 1주일간 동물실에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물실 내 명암은 12시간씩으로 자동조절 시켰고 사료와 물은 충분히 공급하였다.

세포배양

2~3주령의 토끼(수컷)를 에테르 마취 후, 양쪽 무릎 관절로부터 연골조직을 분리하여 primary culture하였으며, 10% fetal bovine serum(Gibco, Co., USA)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)을 첨가하였으며, 1×10⁶개의 세포를 60 mm dish에 접종하고, 5~6일 동안 온도 37°C, 습도 95%, 5% CO₂ 습윤조건하에서 배양하였다. 관절세포(passage 0)가 70~80% 정도 자랐을 때, 배지는 serum free DMEM으로 바꾸고, 무치치균을 제외한 모든 dish에 cytokine mixture(CM; IL-1β 1 μg/ml, TNF-α 10 ng/ml, IFN-α 1 ng/ml, LPS 1 μg/ml)을 투여한 후 20분간 배양하였다. 무치치균과 음성대조군(CM)에는 용매인 DMSO(0.05%)만 처리하고 실험군에는 EtOAc 분획물 (0.8, 4.0 및 20.0 μg/ml) 처리 후, 16시간 동안 배양하였다.

Griess reaction

토끼관절조직세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10⁶ cells/ml로 조절한 후, 60 mm dish에 접종하고, EtOAc 분획물(0.8, 4.0 및 20.0 μg/ml)과 cytokine mixture 를 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 생성된 NO(Nitric oxide)의 양은 Griess 시약을 이용하여 Liang¹²⁾ 방법에 따라 시행하였다. 세포배양액 중에 존재하는(NO₂)의 형태로 측정하였으며, 세포배양액 상등액 100 μl와 Griess시약 [0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine · 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H₃PO₄ in H₂O] 100 μl를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, sodium nitrite(NaNO₂)를 standard와 비교하여 NO 생성량을 확인하였다.

DMB assay

토끼 연골 조직의 구성 성분인 프로테오글리칸의 분해를 유발시켜 배양액 내의 프로테오글리칸의 분해 산물인 글루코사미노글리칸(glucosaminoglycan, GAG)을 Mbyundula⁵⁾ 방법에 준하여 측정하였다. 1,9-디메틸메틸렌블루 발색제(1,9-dimethyl-methylene blue dye, DMB)에 의해 발색된 정도를 525 nm에서 흡광도를 측정한 후, chondroitin sulfate로 표준 정량하였다.

PGE₂의 정량

세포내 PGE₂를 Ha¹³⁾ 방법에 준하여 측정하였다. 염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE₂의 농도변화를 assay kit(Amersham, U.K.)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법으로 정량하였다. Goat anti-mouse Ig가 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 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 용액 150 μl를 가하고 실온에서 30분간 발색시키고, 1 M H₂SO₄ 100 μl를 가하여 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법은 시료의 PGE₂와 첨가된 PGE₂-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다.

Gelatin zymography

MMP-2, 9의 활성 측정은 Fuchs¹⁴⁾ 방법에 준하여 시험하였다. 세포수집 후, 원심분리를 하여 세포 조각(cell debris)은 제거하고 상등액만 취한다. 상등액 샘플과 염료를 섞은 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 10% Zymogram gel을 이용하여 100 V의 전압을 가하여 3시간 동안 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel에서 SDS

를 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 μM ZnCl₂, 0.02% NaN₃)에 담근 후, 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 0.25% Commassie Brilliant Blue R250(Sigma-aldrich, USA)으로 1시간 동안 염색한 후 탈색(25% ethanol, 8% acetic acid) 하였다.

통증 유발 시험(Writhing syndrome)

마우스를 이용한 통증 유발 시험은 Moon¹⁾ 방법에 의해 이루어졌다. 체중 20~22 g의 ICR(Institute of Cancer Research)계 mouse 수컷 8마리를 1군으로 하여 시료 200 mg/kg과 400 mg/kg을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 0.6% 초산생리식염액 0.1 ml/10 g 단위로 복강 내 주사하고, 주사 후 10분 후부터 10분간 각각의 쥐가 나타내는 통증 반응인 파이딩(writhing: 등을 쭉 펴거나 뒷다리를 몸 뒤로 완전히 뻗어 제치는 현상)을 보이는 횟수를 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 mean±SD로 표시하였으며, 음성대조군(CM)과 강활 EtOAc 추출물(EARK) 사이의 유의성은 paired Student's *t*-test **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험 결과

NO(Nitric oxide) 생성 억제 효과

염증성 cytokine들에 의해 활성화된 관절조직의 배양액에서 생성된 NO₂의 양을 Greiss 시약을 사용하여 NO(Nitric oxide)저해 활성을 측정하였다. 강활의 EtOAc 추출물은 0.8, 4.0, 20.0 μg/ml로 처리하였고 음성대조군(CM, 5.35±0.13 μM)에 비해 각각 16.62%(4.46±0.17 μM), 39.20%(3.25±0.07 μM), 73.08%(1.44±0.07 μM)로 유의성 있는(****p*<0.001) NO 생성 저해효과를 나타내었다(Fig. 1). Apigenin의 IC₅₀은 9.86±0.09 μM(2.66±0.02 μg/ml)로 나타났으며, 강활 EtOAc 추출물은 6.74±0.07 μg/ml을 나타냈다.

Proteoglycan 분해 억제 효과

관절조직의 주요 성분 중 하나인 proteoglycan의 분해 억제 활성실험을 통해서 염증성 cytokines에 의한 proteoglycan 분해가 시료에 의해 억제되는 정도를 측정하였다. Fig. 2와 같이 무처리군(15.47±0.51 μg/mg), CM(31.48±0.73 μg/mg)과 비교하여 보면 강활 EtOAc 추출물은 0.8, 4.0, 20.0 μg/ml에서 각각 50.98% (15.42±2.25 μg/mg), 31.49%(12.12±1.73 μg/mg), 74.33%(8.07

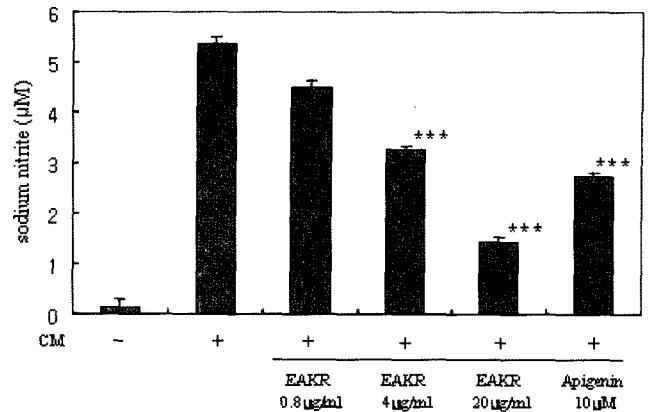


Fig. 1 – Inhibition of NO production in rabbit articular chondrocytes by EAKR. The cells were stimulated with cytokine mixture (CM; 1 ng/ml IL-1β, 10 ng/ml TNF-α, 1 ng/ml IFN-γ, 1 μg/ml LPS) and EAKR was added at doses ranging from 0.8 to 20 μg/ml. The cells were incubated for an additional 20 h. Data are mean±S.D. of duplicate per treatment. ****p*<0.001: significantly different from the negative control (CM).

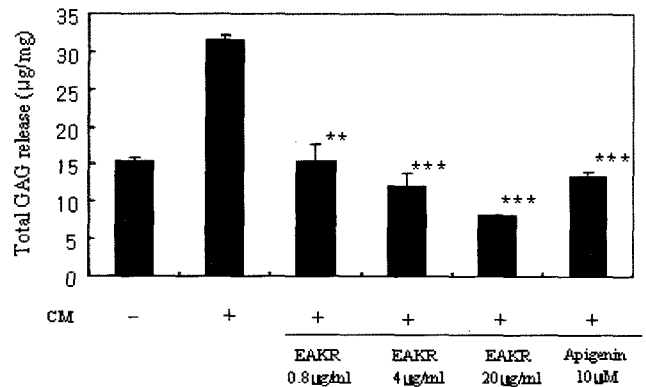


Fig. 2 – Dose dependent inhibition of cytokines-stimulated PG release from rabbit articular chondrocytes by EAKR. Apigenin was added as the positive control. PG release was measured 20 h after the addition incubation of EAKR. Data are mean±S.D. of duplicate per treatment. ***p*<0.01, ****p*<0.001: significantly different from the negative control (CM).

±2.25 μg/mg)으로 유의성 있는 저해효과를 나타내었다. 특히 4 μg/ml과 20 μg/ml에서는 무처리군 보다 더 낮은 수준으로 proteoglycan의 분해 산물인 GAG(glucosaminoglycan) 함량이 측정됨으로써 proteoglycan의 분해를 효과적으로 저해함을 확인하였다(***p*<0.01, ****p*<0.001).

PGE₂ 생성 억제에 미치는 영향

COX-2는 통증 유발 물질인 PGE₂를 합성하는 효소이며 이는 NO(Nitric oxide)를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진된다. COX-2를 나타내는 지표인 PGE₂의 농도는 염증성 cytokine을 처

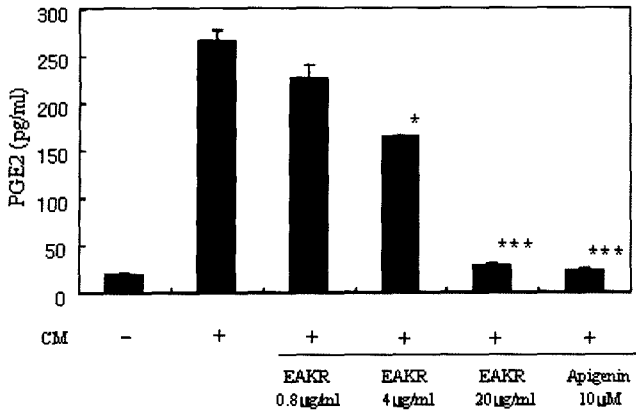


Fig. 3 – Effect of EAKR on PGE₂ production in rabbit articular chondrocytes. The cells were stimulated with cytokines in the presence of absence of inhibitor of PGE₂. PGE₂ production was measured 20 h after the addition incubation of EAKR. Data are mean±S.D. of duplicate per treatment. *p<0.05, ***p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

리하지 않은 무처치군(19.65±1.24 pg/ml)에 비하여 처리한 음성 대조군(CM, 267.72±9.98 pg/ml)에서 약 14배 이상 증가되어 통증 유발의 증가를 확인하였다. 반면에 음성대조군에 비교해 강활의 EtOAc 추출물을 처리한 군에서 농도 의존적인 감소를 확인하였다(Fig. 3). 특히, 20.0 μg/ml(29.05±2.38 pg/ml) 농도에서는 대조군과 비슷한 수준으로 유의성 있는 감소를 보여(***p<0.001), 통증 억제에 우수한 효과를 나타냈다.

Gelatin zymography

연골세포는 sulfated proteoglycan(aggreacan)과 type II collagen 등의 연골 특이적 ECM(extracellular matrix) 단백질을 정상적으로 합성한다. 그러나 질환상태의 연골조직에서는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13의 발현 및 활성이 증가하며 이러한 현상은 염증성 cytokine에 의해 유발된다. 본 실험에서는 Fig. 4에서와 같이 염증성 cytokine에 의해 증가된 MMP-2, 9이 강활의 EtOAc 추출물에 의해 감소하며 20 μg/ml에서는 무처치군 수준까지 감소되는 것을 확인하였다.

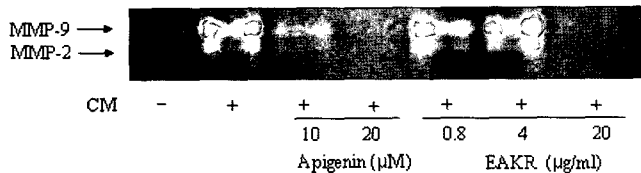


Fig. 4 – Effect of EAKR on enzyme expression of MMP-2 and MMP-9. After treatment with cytokines and EAKR, the culture media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue. The experiment was repeat in twice independently.

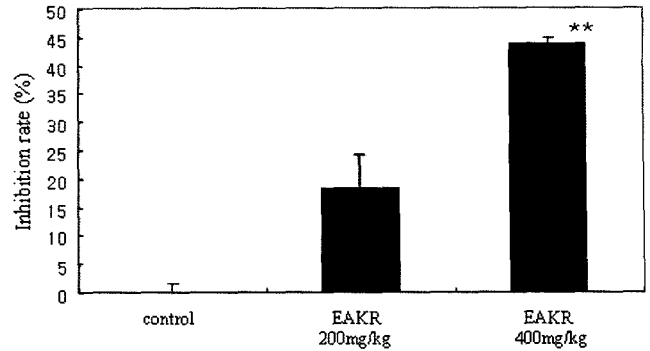


Fig. 5 – Effect of EAKR on the writhing syndrome in mice. Each value represents the mean±S.D. Drugs were orally administered 1 hour before the injection 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g). **p<0.01: significantly different from the control group.

통증 유발 마우스에서의 진통효과 시험

통증 유발 마우스에서의 진통 효과에 미치는 결과는 무처치군에서 10분 동안에 19.66±1.52회의 writhing syndrom을 일으켰으며, 강활의 EtOAc 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 18.40% 감소를 보였고, 400 mg/kg 투여군에서는 44.00%의 억제효과를 나타내어 진통효과가 탁월함을 있음을 알 수 있었다(Fig. 5, **p<0.01).

고 찰

고령화 사회에서 발생빈도가 가장 높은 퇴행성 질환인 골관절염의 제어를 위해 많은 연구와 노력이 있어 왔지만 아직 그 병리적 원인이나 근본적인 치료방법이 개발되지 않고 있다. 현재까지는 수술적 방법 외에는 항염증 및 통증완화를 목적으로 다양한 소염진통제가 사용되고 있으나, 소화성 궤양 등 위장관 장애의 문제점을 지니고 있어 장기간 복용이 불가능하고 근본적인 치료를 제시하지 못하고 있다. 이런 이유로 히알루론산, 글루코사민, 콘드로이틴과 같은 연골보호제가 개발되었으나, 개인적인 차이가 많으며, 세포 및 조직의 퇴행반응과 연골생성 촉진 및 재생유도 등에는 그 효과가 확립되지 않았고 또한 연골세포의 퇴행에는 아무런 영향이 없다.

최근 합성 의약품이 아닌 천연물에서 골관절염 치료제의 개발이 활성화 됨에 따라 많은 연구가 진행되어왔다. 중대황 추출물,¹³⁾ 행인 과루,¹⁵⁾ 서경탕,¹⁶⁾ 인삼,¹⁷⁾ 구미강활탕,¹⁾ 홍화자,¹⁸⁾ 사상자,¹⁹⁾ 창백산,²⁰⁾ 烏藥順氣散,²¹⁾ 참느릅나무 근피수침엑스,²²⁾ 계작지모탕,²³⁾ 참골담초²⁴⁾ 등의 소염 진통에 관한 수많은 연구결과가 발표되었음에도 아직까지 실용화되고 있는 천연물은 거의 없는 실정이다. 또한, Moon²⁵⁾ 등은 200종의 생약을 메탄올 추출 후, 물분획을 이용하여 COX-2 저해활성을 검색하였으며 사간, 원방풍 생약에서 가장 우수한 활성을 보였음을 보고하였다.

그밖에도 구미강활탕의 주요 구성 한약재인 강활에 대한 해열, 진통, 진경작용 등이 보고되어 있기는 하나, 거의 대부분의 논문은 동물에서의 효능검색에 머물러 있고 작용기전에 대한 연구가 미흡하여¹⁾ 본 논문에서는 진통효능과 함께 항염증 및 관절조직 분해효소에 미치는 영향을 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인함으로써 골관절염 치료 후보제로서의 가능성을 확인하고자 하였다.²⁶⁻²⁸⁾ Primary culture를 통해서 토끼 무릎으로부터 관절조직을 분리해내고 관절조직세포를 이용하여 실험을 진행하였다. 관절조직에 염증성 cytokine(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , LPS)에 의해 염증반응을 유발하여 NO 생성 저해 활성을 측정해 측정함으로써^{29,30)} 항염증 활성을 시험해 본 결과 강활 EtOAc 추출물은 농도의존적으로 NO 생성을 저해하는 것을 확인하였다. NO 생성저해 효과에 대한 IC₅₀은 6.74 \pm 0.07 μ g/ml의 탁월한 효과를 나타내었다. DMB assay 을 실시하여 PG(proteoglycan)의 분해 억제 정도를 확인한 결과, 강활의 EtOAc 추출물은 농도 의존적으로 PG 분해를 효과적으로 억제함을 확인하였으며, 4 μ g/ml에서는 양성 대조군인 Apigenin과 비슷한 수준으로 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이는 연골세포를 자극하고 proteoglycan을 생성시켜 연골을 재생시키거나 연골의 파괴를 막는 것을 의미한다.¹²⁾ 연골 조직에서는 MMP의 합성 및 활성화에 의해 그 항상성이 파괴된다. 퇴행성 관절염 조직에서 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13 등의 발현 및 활성이 증가하며 이러한 현상은 염증성 cytokine에 의해 유발된다.²⁹⁻³¹⁾ 이 중 zelatin zymography 방법을 통해 강활 EtOAc 추출물에 의한 MMP-2, MMP-9에 의한 변화를 측정해 본 결과 0.8, 4 μ g/ml에서는 유의적인 감소는 보이지 않았으나 20 μ g/ml에서는 무처리군과 같은 수준으로 저해된 것을 확인할 수 있었다. 이는 연골조직에서 MMP의 합성 및 활성화에 의해 파괴된 항상성을 강활 EtOAc 추출물이 그 항상성을 유지시키고 균형을 이루게 하여 연골 특이적 ECM 단백질을 정상적으로 합성함을 의미한다.^{8,9,31)} 또한 강활 EtOAc 추출물은 통증유발물질인 PGE₂ 생성을 농도의존적으로 감소시켰다. 또한 실험동물을 이용한 진통효과시험인 Writhing syndrome에서도 무처리군에 비하여 진통효과가 있음을 확인하였다. Moon²⁵⁾ 등의 보고에서는 강활의 COX-2의 억제율이 31%로 낮은 효과를 보였으나, 이런 결과는 강활 메탄올추출물을 용매별로 단계적으로 분획하고 그 중 물 분획물에 대해 저해활성을 검색하여 본 논문의 결과와는 다른 경향을 보인 것으로 사료된다.

이상과 같은 결과로 보아 강활을 70% 에탄올로 추출한 후 얻어진 활성 분획인 EtOAc 추출물은 소염 및 진통과 관련된 메커니즘에 효과적으로 관여함으로써 치료효과를 나타낼 것으로 기대된다.

결 론

강활(*Angelica Koreana Radix*)의 ethyl acetate 분획물(EAKR)

은 NO와 PGE₂의 생성을 농도의존적으로 저해하였으며, 염증성 cytokine들에 의한 PG 분해 억제효과를 나타내었다. Gelatin zymography에서도 EAKR에 의한 MMP-2와 MMP-9의 활성을 확인해 본 결과, MMP-2와 MMP-9 모두 20 μ g/ml에서 무처리군과 비슷한 수준까지 활성이 억제됨을 확인하였다. 또한 *in vivo* 시험인 통증 유발 마우스 진통효과시험에서도 유의성 있는 진통 억제 효과를 확인함으로써 소염진통제 및 관절염 치료제의 훌륭한 후보약재가 될 것으로 기대된다.

문 헌

- 1) Moon, H. J., Go, J. J. and Park, J. Y. : The anti-inflammatory and analgesic activities of *Gumiganghwaltang*. *Kor. J. Pharmacogn.* 1, 30 (1999).
- 2) Cho, J. Y., Lee, J. S., Park, J. S. and Park, M. H. : Isolation of inhibitory components on tumor necrosis factor- α production from *Angelica Koreana*. *Yakhak Hoeji* 2, 42 (1998).
- 3) Kwon, Y. S., In, K. K. and Kim, C. M. : Chemical constituents from the roots of *Ostericum koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* 3, 31 (2000).
- 4) Arner, E. C., Hughes, C. E., Decicco, C. P., Caterson, B. and Tortorella, M. D. : Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis. Cartilage.* 6, (1998).
- 5) Mbvundula, E. C., Bunning, R. A. D. and Rainsford, K. D. : Effects of cannabionoids on nitric oxide production by chondrocytes and proteoglycan degradation in cartilage. *Biochem. Pharmacol.* 69, (2005).
- 6) Badger, A. M., Cook, M. N., Swift, B. A., Newmantarr, T. M., Gowen, M. and Lark, M. : 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.* 2, 290 (1999).
- 7) Hyun, E. A., Lee, H. J., Yoon, W. J., Kang, H. K., Kim, S. J. and Yoo, E. S. : Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in murine macrophage Raw264.7. *Yakhak Hoeji* 2, 48 (2004).
- 8) Park, S. Y., Lee, H. J., Hyun, E. A., Moon, J. Y., Yang, H. C., Lee, N. H., Kim, S. J., Kang, H. K. and Yoo, E. S. : Inhibitory effect of *Eurya emarginata* on the production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage Raw264.7. *Yakhak Hoeji* 5, 47 (2003).
- 9) Nam, K. W., Je, K. H., Lee, J. H., Han, H. J., Lee, H. J., Kang, S. K. and Mar. W. C. : 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.* 5, 26 (2003).
- 10) Park, K. S., Kim, H. S., Ahn, J. S., Kim, T. S., Park, P. U., Kwak,

- W. J., Han, C. K., Cho, Y. B. and Kim, K. H. : Preparation of anti-inflammatory herbal drug, SKI306X. *Koreana. Yakhak Hoeji* **4**, 39 (1995).
- 11) Marnett, L. J. : Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res.* **52**, (1992).
 - 12) Choi, J. H., Choi, J. H., Kim, D. Y., Yoon, J. H., Youn, H. Y., Yi, J. B., Rhee, H. I., Ryu, K. H., Juug, K., Han, C. K., Kwak, W. J. and Cho, Y. B. : Effects of SKI306X, a new herbal agents, on proteoglycan degradation in cartilage explant culture and collagenase-induced rabbit osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage.* **10**, (2002).
 - 13) Ha, H. K., Lee, J. H. and Kim, C. S. : Extracts of *Rheum undulatum* L. inhibits COX-2 activities in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells. *J. Applied. Pharmacol.* **8**, (2000).
 - 14) Fuchs, S., Skwara, A., Bloch, M. and Dankbar, B. : Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage.* **12**, (2004).
 - 15) Pak, J. U., Moon, S. J., Moon, G. and Wn, J. H. : Effects of seman armenicae and Radix trichosanthis on the iNOS expression and superoxide formation in the RAW264.7 cells. *J. of Kor. Oriental Oncology* **1**, 5 (1999).
 - 16) Moon, Y. H., Go, J. J. and Lee, K. J. : Anti-inflammatory and analgesic activities of SEO-KYONG-TANG. *Kor. J. Pharmacogn.* **2**, 13 (2000).
 - 17) Cho, T. S., Lee, S. M., Jung, K. H., Lee, B. K., Lee, S. Y. and Park, J. D. : Studies on the anti-inflammatory activity of ginseng total saponin, protopanaxadiol and protopanaxatriol. *J. of Applied Pharmacol.* **7**, (1999).
 - 18) Seo, B. I., Lee, E. S., Park, J. H., Kim, S. C., Byun, B. H. and Choi, H. Y. : An efficacy of Korean and Chinese Carthami semen on analgesic effect, anti-inflammation and arthritis. *Kor. J. Herbology* **1**, 16 (2001).
 - 19) Lee, E. B., Cho, S. I., Kang, S. S., Kim, K. R. and Kim, T. H. : Isolation of Torilin from *Torilis japonica* fruit and its analgesic and anti-inflammatory activities. *Kor. J. Pharmacogn.* **2**, 30 (1999).
 - 20) Moon, Y. H., Park, Y. J. and Kim, S. M. : Studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of Chan-Back-San and Chil-Mi-Chang-Back-San. *Kor. J. Pharmacogn.* **2**, 29 (1998).
 - 21) Moon, Y. H., Lee, D. I. and Lee, S. Y. : Studies on the anti-inflammatory and analgesic activities of Ohyaksungisan. *Kor. J. Pharmacogn.* **3**, 27 (1996).
 - 22) Cho, S. K., Lee, S. G. and Kim, C. J. : Anti-inflammatory and analgesic activities of water extract of root bark of *Ulmus parvifolia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **3**, 27 (1996).
 - 23) Kim, S. S., Kim, H. K., Choi, J. W. and Lee, C. K. : Antiinflammatory, analgesic and antihyperuricemic effects of 'Cyejakjimo-Tang' in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **1**, 26 (1995).
 - 24) Hwang, G. J. and Kim, I. H. : Anti-inflammatory and analgesic activities of the root of *Caragana koreana*. *Kor. J. Pharmacog.* **4**, 14 (1983).
 - 25) Moon, T. C., Chung, K. C., Son, K. H. Kim, H. P., Kang, S. S. and Chang, H. W. : Screening of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors from natural products. *Yakhak Hoeji* **2**, 42 (1998).
 - 26) Lee, S. H., Seo, G. S. and Sohn, D. H. : Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by butein Raw 264.7 cells. *Biochem. Biophys. Commun.* **323**, (2004).
 - 27) Patel, R. N., Attur, M. G., Dave, M. N., Patel, I. V., Stuchin, S. A., Abramson, S. B. and Amin, A. R. : A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E₂ production. *J. Immunol.* **163**, (1999).
 - 28) Ferrandiz, M. L. and Alcazaraz, M. J. : Anti-inflammatory and inhibition arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents. Actions.* **32**, (1991).
 - 29) Kim, S. N., Kim, H. S., Nam, G. S., Hwang, S. W. and Hwang, S. Y. : Inhibition of inflammatory-cytokines production and prostaglandin E₂ activity by *Puerariae Radix* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **1**, 35 (2006).
 - 30) Kim, S. N., Kim, H. S., Nam, G. S., Hwang, S. W. and Hwang, S. Y. : The anti-inflammatory and analgesic activities of *Artemisia capillaris* Thunberg. *Kor. J. Pharmacogn.* **4**, 36 (2005).
 - 31) Marcet-paracios, N., Graham, K., Cass, C., Defus, A. D., Mayers, I. and Radomski, M. W. : Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1**, 307 (2003).