

콜라겐으로 유발된 관절염에 대한 피록시캄 및 황금 가수분해물 복합 히드로겔의 항염 효과

김태균 · 안효초 · 윤미영 · 임재윤 · 채병숙 · 김대근 · 박병현* · 양재현#

우석대학교 약학대학, *전북대학교 의학전문대학원

(Received August 1, 2008; Revised August 22, 2008)

Anti-inflammatory Effects of Hydrogels Containing Piroxicam and Hydrolyzed Products of *Scutellariae Radix* on Collagen-induced Arthritis

Tae-Kyun Kim, Hyo-Cho Ahn, Mi-Young Yun, Jae-Yoon Leem, Byeong Suk Chae, Dae-Keun Kim, Byung-Hyun Park* and Jae-Heon Yang#

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

*Medical School, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract — In order to access the suppressive effects of piroxicam (PX) and hydrolyzed products of *Scutellariae Radix* (PSH) on arthritis, we investigated whether PSH gel could suppress the progression of collagen-induced arthritis. PX, one of nonsteroidal anti-inflammatory drugs has been used in the systemic and topical treatment in a variety of inflammatory conditions. *Scutellariae Radix*, one of the herbal medicines, was used for the purpose of anti-inflammatory and anti-bacterials. For the purpose of transdermal absorption of the hydrogel preparations, two classes of hydrogels (PX, PSH) were formulated with carbomer 940, diethylene glycol monoethyl ether, polyethylene glycol-8-glyceryl caprylate/caprate and triethanolamine. In carrageenan-induced edema in rat hind paws, inhibition of foot swelling was more increased in PSH than PX hydrogel. Rheumatoid factors including serum IgG, IgM and collagen specific antibody were present much lower in PSH gel treated mice than control. Histological examination revealed that PSH hydrogel inhibited infiltration of inflammatory cells into affected paw joint, compared with control. The PSH hydrogel would be a suitable preparation to increase transdermal treatment for anti-inflammatory effects on collagen-induced arthritis.

Keywords □ piroxicam, hydrolyzed products of *Scutellariae Radix*, anti-inflammatory effects, collagen-induced arthritis

피록시캄은 oxicam 계열의 비스테로이드성 소염진통제로서 류마티스 관절염, 골관절염, 강직성 척추염 등 국소염증 질환에 효과적으로 사용되고 있으며 나프록센, 디클로페낙, 인도메타신 등의 여러 비스테로이드성 소염제에 비해 반감기가 긴 것으로 보고되어 있다.¹⁾ 혈중 단백질결합률은 99% 이상이고 위장장애를 일으키는 부작용을 갖고 있지만 이러한 부작용은 약물의 경구투여 대신 경피 투여 방식으로 대치하여 사용 할 수 있다. 비록 경피를 통한 약물의 흡수는 용이하지 않지만 효과적인 약물 흡수 효과 증가에 대하여 Marks 등²⁾은 연고기체를 이용한 피록시캄의 경피 흡수를 연구하였고, Santoyo 등³⁾은 피부투과 촉진제를 사

용하여 *in vitro* 상에서 피록시캄의 경피 흡수를 보고하였다.

황금은 다년생 초본식물인 속썩은 풀(*Scutellaria baicalensis* GEORGI)의 주피를 벗긴 뿌리로써 한방에서는 청열, 해독의 목적으로 사용되어 왔으며 약리작용으로는 항균, 항염, 항알레르기, 담즙배설 촉진, 이뇨, 완하, 죽상동맥경화 방지, 위액분비 억제, 진정, 혈압강하 작용 등이 알려져 있는데, 이는 황금의 활성 성분인 baicalin 및 baicalein 등에 의한 것으로 보고되어 있다.⁴⁻⁶⁾ Kim 등⁷⁾은 β -glucuronidase에 의한 황련, 황금 공침물의 가수분해 및 생체이용률 증가에 대한 연구에서 황금중의 baicalin이 β -glucuronidase에 의하여 baicalein으로 가수분해되어 생체이용률이 증가됨을 보고하였고, Yang 등⁸⁾은 baicalein이 baicalin에 비하여 항산화효과 및 항염효과가 증강되는 것으로 보고하였다.

한편 류마티스성 관절염(Rheumatoid arthritis, RA)은 대표적으로 무릎이나 팔 등의 관절에 염증을 유발하는 자가면역성 질환

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 010-8245-8033 (팩스) 063-290-1812
(E-mail) yang787878@hanmail.net

환의 일종으로 유전적 또는 후천적의 원인으로 유발되기도 하며 면역세포의 불균형적인 분화가 그 원인인 것으로 알려져 왔다. 면역반응에서 협조 및 유도 역할의 CD4⁺ T cell 중 Th1 세포가 Th2 세포보다 과다 분화가 되어 그로 인한 자가면역성 염증 반응 증가로 인한 류마티스성 관절염이 유발되는 것으로 보고되어 있다. 류마티스성 관절염은 관절내의 활막세포(sinoviocytes)의 활성화로 인하여 만성 염증이 지속되어 판누스(pannus)를 형성하며, 이들은 연골과 관절의 비가역적인 파괴를 유발하게 된다고 보고되었다.⁹⁻¹¹⁾

본 연구에서는 항염, 진통의 효과가 있다고 알려진 피록시카프와 항균, 항염 및 항알레르기 작용이 보고된 황금을 가수분해하여 복합 히드로겔로 제조한 후 흰쥐의 족부종 억제율 측정, collagen 투여로 유발된 실험동물의 관절염(Collagen-induced arthritis, CIA) 부위의 면역세포의 양을 측정함으로써 류마티스 관절염에 대한 피록시카프 및 황금 가수분해물 복합 제제의 효과를 관찰한 후 그 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

시약 및 실험재료

황금(*Scutellariae Radix*)은 익산 보화당 한의원에서 구입, 음건하여 사용하였고, baicalin 및 baicalein(Sigma Chemical Co., U.S.A.)은 표준품을 사용하였다. Piroxicam, carbomer 940, propylene glycol 및 triethanolamine은 약전규격품을 사용하였고, glyceryl triacetate는 Sigma사(St. Louis, U.S.A)에서 구입하여 사용하였으며, diethylene glycol monoethyl ether(이하 DGME) 및 polyethylene glycol-8-glyceryl caprylate/caprate(이하 PGCC)은 Gattefossé사(France)의 제품을 사용하였다. Bovine type collagen은 Sigma(St. Louis, U.S.A) 제품을, IL-6와 TNF- α 는 ELISA(R&D system, U.S.A) kit, PE-anti-CD3 ϵ , PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b는 Pharmingen(Torreyana, Iraq) 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

실험기기로는 spectrophotometer(Shimazu UV-1201, Japan), flow cytometer(Becton Dickinson, U.S.A) 및 ELISA reader(Molecular devices, U.S.A) 등을 사용하였다.

실험동물

실험동물은 6주령의 DBA/1J mouse(웅성)를 Plus International Co.(England)에서 분양 받아 사용하였고, hairless mouse(웅성, 25 \pm 5 g)는 Charles River Lab.(U.S.A.)로부터 분양 받았으며, ICR계 마우스(웅성, 25 \pm 5 g) 및 S.D계 랫트(웅성, 150 \pm 20 g)는 Daehan Biolink(Korea)로부터 분양 받아 사용하였다. 사육실 온도는 25 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도는 55 \pm 10%를 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 하였으며 고형사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

Table I – Formulas of hydrogel preparations compounding piroxicam and hydrolyzed products of *Scutellariae Radix* extract

	PX	PSH
Piroxicam	0.5	0.5
<i>Scutellariae Radix</i> Ex.	0	4.0
Propylene glycol	15.0	15.0
PGCC*	5.0	5.0
DGME**	5.0	5.0
Carbomer 940	1.0	1.0
Ethanol	10.0	10.0
Triethanolamine	0.8	0.8
β -Glucuronidase	0	1,000 unit
Dist. Water	62.7	58.7
Total	100.0	100.0

PX gel : Piroxicam hydrogel. PSH gel : Piroxicam & *Scutellariae Radix* Extract hydrogel.

* : Polyethylene glycol-8-glyceryl caprylate/caprate.

** : Diethylene glycol monoethyl ether.

피록시카프 및 황금 히드로겔의 제조

피록시카프 및 피록시카프와 황금 가수분해물 복합 히드로겔의 제조(이하 PSH gel)는 Yang 등¹²⁾의 방법을 응용하여 제조하였다. 피록시카프와 황금 가수분해물 복합 히드로겔은 carbomer 940에 정제수를 가하고 24시간 동안 팽윤시킨 다음, 황금엑스 분말을 용해시켜 β -glucuronidase 1,000 unit를 가하고 50 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 가수분해물과 ethanol에 용해시킨 피록시카프를 혼합하고, 여기에 DGME 및 propylene glycol을 순차적으로 가한 후, triethanolamine을 적가 하여 pH 6.5로 만든 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치한 다음 PGCC를 가하여 겔체를 제조하였다. 피록시카프 히드로겔(이하 PX gel)은 carbomer 940에 정제수를 가하고 24시간 동안 팽윤시킨 다음, ethanol에 용해시킨 피록시카프에 DGME 및 propylene glycol을 순차적으로 가하여 혼합한 후, triethanolamine을 적가 하여 pH 6.5로 만든 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치한 후에 PGCC를 가하여 겔체를 제조하였다(Table I).

부종억제 실험

히드로겔의 부종억제 실험은 Winter 등¹³⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 부종 유발은 랫트의 오른쪽 족 저부에 1% λ -carrageenan을 증류수에 녹여 0.1 ml를 주사하여 유발시켰다. 약물 도포는 유발 1시간 전에 오른쪽 족저부에 각각 1회씩 도포하였다.

부종 측정은 plethysmometer를 이용하여 1% λ -carrageenan의 투여 전과 투여 후 6, 12, 24 및 48시간대에서 3회 반복측정하여 평균값으로 하였다. 부종율은 λ -carrageenan 주사 직후 및 각 시간대의 발 부피의 변화를 이용하여 다음 식으로 부종율(% swelling) 및 부종 억제율(% inhibition)을 산출하였다.¹⁴⁾

$$\text{부종률(\%)} = \frac{V - V_1}{V_1} \times 100$$

$$\text{부종억제율(\%)} = \left[1 - \frac{V_d}{V_c} \right] \times 100$$

V는 6, 12, 24 및 48시간 후의 발 부피이며, V1은 주사직후 발 부피, Vc는 대조군의 부종률, Vd는 처치군의 부종률이다.

Collagen에 의한 관절염 유발 실험

Collagen 유발 관절염(Collagen-induced arthritis, 이하 CIA) 실험은 Taneja 등¹⁵⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. Bovine type II collagen 에 0.01 mol/l의 acetic acid와 complete Freund's adjuvant를 혼합한 후 200 µg를 DBA/1J 생쥐에 피하 주사하고, 21일 후 동량을 boosting 하여 CIA 모델을 유발하였다. 실험군은 크게 DBA/1J 생쥐 6마리를 한 군으로 하였으며, collagen을 처리하지 않은 정상군과 CIA를 유발시킨 대조군, PX 및 PSH 투여군으로 나누었다. 정상군(이하 NR)과 대조군(이하 CIA)은 약물의 함유하지 않은 기제를 매일 1회 각각 도포하였고, PX 및 PSH 처리군은 각각의 겔을 환부에 도포하였다.

Paw joint의 면역 세포수 측정

Paw joint의 면역세포수 측정은 Kang 등¹⁶⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. DBA/1J 생쥐에서 joint를 적출하여 100 mesh로 세포를 분리하여 PBS로 5분간 원심분리(1,700 rpm)하여 2회 세척한 후 cell strainer에 통과시켜 세포 이외의 분해되지 않은 조직이나 불순물을 제거하였다. 그리고 관절은 잘게 chopping한 후 collagenase 1 mg/ml(in 2% FBS+RPMI 1,640)을 넣고 37°C shaker(180 rpm, 20 min.) 배양기에서 배양한 후 상층액을 회수하는 방법으로 4회 반복하였다. 여기에 각각 PE-anti-CD3ε, PE-anti-Gr-1, FITC-anti-CD11b를 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 flow cytometer의 cell quest 프로그램을 이용하여 백분율(%)로 분석한 후 총세포수를 적용하여 joint에서의 절대 세포수(absolute number)를 산출하였다.

혈청 내 사이토카인 분석

혈청내 사이토카인 분석은 Klimiuk 등¹⁷⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 4주간 index 값을 측정 후 ethyl ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈한 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 IL-6와 TNF-α의 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA, Endogen, U.S.A)로 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 µl(1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시

세척하였다. TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청내 항체 생성량 측정

혈청내 항체생성량 측정은 Carson 등^{18,19)}의 방법을 응용하여 실험하였다. IgG와 IgM 농도 측정은 CIA 실험 종료 후에 ELISA(Endogen, U.S.A)로 생성량을 측정하였다. 각 well에 CIA 생쥐의 혈청 100 µl(1/100 dilution)씩 분주하고, 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충 용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 µl를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 µl씩 분주하고 암소에서 30분간 방치한 후 50 µl의 stop 용액을 처리하고, ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Paw joint 병리 조직 검사

약물 투여 4주일 후에 각 군에서 관절을 분리하여 10% formaldehyde 용액에 고정한 후 세절하여 흐르는 물에 8시간 수세한 다음, epoxy에 포맷하고, 이것을 microtome으로 절편을 만들어 표준 방법에 의하여 Hematoxylin & Eosin과 collagen deposition 염색인 Masson-Trichrome 염색을 수행하였다.

통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

히드로겔의 제조

Yang 등¹²⁾에 의한 치자 엑스 가수분해물의 히드로겔 제조방법을 응용하여, 피록시감 단일 및 황금 가수분해물을 복합한 두 가지 히드로겔을 제조하였다. 겔화제로서는 Carbomer 940을 사용하였는데 이때의 pH는 3.0 이하로써 전혀 점성이 없었으나, triethanolamine을 교반하면서 적가하여 pH 6.5으로 조정하면 결과 점성이 높아졌으며 실온에서 2시간 방치한 후 4°C에서 24시간 방치시켰을 때 안정한 점도를 유지하였다. 외관은 미황색의 투명한 반고형 겔 상태를 유지하였고, 피부에 대한 도포성도 양호하였다.

부종 억제 효과

Winter 등¹³⁾에 의한 λ-carrageenan 유발 염증 치료효과 실험 방법을 응용하여 히드로겔제의 부종 억제효과를 비교했을 때, 랫트 족 저부의 부피를 측정된 결과, 대조군에서 6시간 후 2.30 ml로서 80% 이상 부피가 증가되었고, PX 겔 및 PSH 겔에서도 각

Table II – Comparison of swelling volume of hind-paw induced by carrageenan (1%) under PX and PSH hydrogels

Formulation	Time (h)				
	0	6	12	24	48
Control	1.27±1.40	2.30±0.02	1.86±0.03	1.53±0.03	1.37±0.02
PX	1.22±0.01	1.94±0.09**	1.68±0.07*	1.38±0.03*	1.22±0.04**
PSH	1.22±0.02	1.97±0.07**	1.61±0.02**	1.35±0.01**	1.20±0.02**

Each data represents the mean±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (**P*<0.05, ***P*<0.01).

각 1.94 ml 및 1.97 ml로 증가되었으나, 24시간 후에는 대조군이 1.53 ml인데 비하여 PX겔 및 PSH겔에서는 각각 1.38 ml, 1.35 ml로 감소하였고, 48시간 후까지 그 효과가 지속되었다(Table II). 한편, 12시간 후의 부종억제효과를 비교해보면, PX겔이 15.4%인 반면, PSH겔은 20.4%로 나타났고, 48시간 후의 부종 억제율

은 PX겔이 59.0%인 반면 PSH겔은 64.2%로 나타나 5% 정도 높은 성적을 보여주었다(Fig. 1). 이는 황금 가수분해물 중의 baicalein의 항염효과에 의해서 piroxicam 단일제제 보다 양호한 부종 억제율을 나타낸 것으로 생각된다.

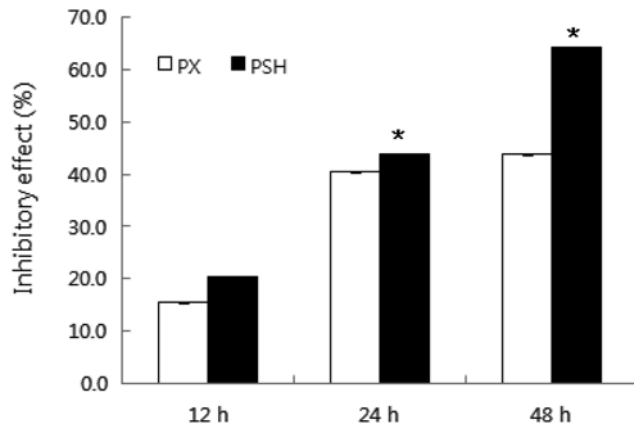


Fig. 1 – Inhibitory effects of formulations on swelling of rat hind-paw induce by carrageenan (1%). Each data represents the mean±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (**p*<0.05).

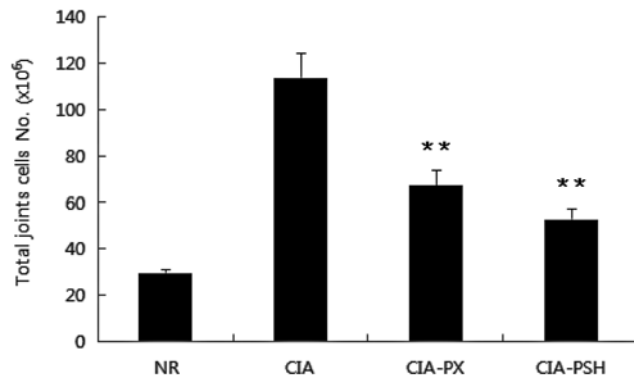


Fig. 2 – Effect of PSH on total cell number of paw joint in CIA mice. NR (Normal), CIA (Control), PX (1%), PSH (1%). Each data represents the mean±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (***p*<0.01).

Paw joint 중 면역세포에 미치는 영향

Kang 등¹⁶⁾의 방법에 따라 CIA mice에 8주간 PX 및 PSH를 도포한 후 paw joint에서의 총 면역세포수를 관찰한 결과, paw joint에서는 정상군이 31.2±1.20(×10⁶), 대조군이 114.0±10.8(×10⁶), PX(1%) 투여군이 67.6±4.15(×10⁶), PSH(1%) 투여군이 59.40±5.15(×10⁶)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다(Fig. 2).

Paw joint에서 CD3⁺ 세포수를 absolute number로 산출한 결과, 정상군이 12.3±3.2(×10⁵), 대조군이 137.8±35.1(×10⁵), PX (1%) 투여군이 46.0±4.1(×10⁵), PSH(1%) 투여군이 33.8±6.5(×10⁵)로 나타나, PX 및 PSH에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다(Fig. 3).

Paw joint에서 CD11⁺ 세포수를 absolute number로 산출한 결

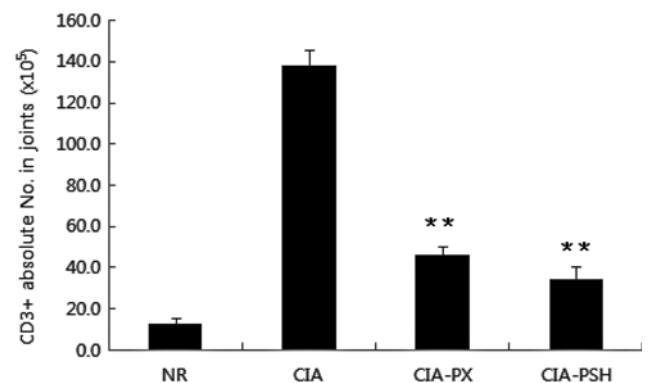


Fig. 3 – Effects of PSH on the absolute number of CD3ε⁺ cells in paw joint of CIA mice. Joint cells (×10⁵ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of PX & PSH. Cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3ε antibody, and analyzed by flow cytometer. NR (Normal), CIA (Control), PX (1%), PSH (1%). Each data represents the mean±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (***p*<0.01).

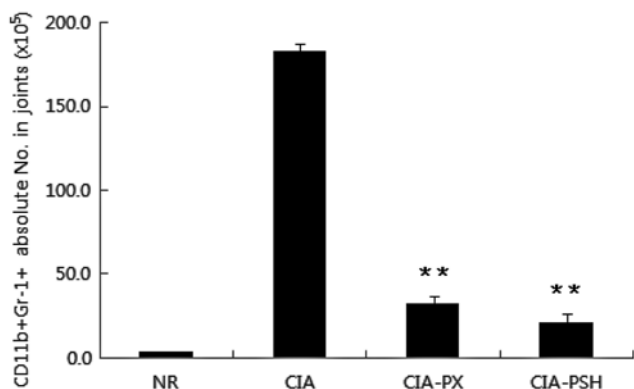


Fig. 4 – Effects of PSH on the absolute number of CD11b⁺/Gr-1⁺ cells of paw joint in CIA mice. Joint cells (×10⁵ cells/ml) from paw joint were isolated following 4-weeks administration of PX & PSH. Cells were incubated with FITC-conjugated anti-CD3ε antibody, and analyzed by flow cytometer. NR (Normal), CIA (Control), PX (1%), PSH (1%). Each data represents the mean ±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (***p*<0.01).

과, 정상군이 3.5±0.5(×10⁵), 대조군이 183.0±7.1(×10⁵), PX (1%) 투여군이 32.1±4.2(×10⁵), PSH(1%) 투여군이 21.0±5.2(×10⁵)로 나타나, PX 및 PSH 에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다(Fig. 4).

혈청 내 사이토카인 생성량에 미치는 영향

Klimiuk 등¹⁷⁾의 방법에 따라 혈청내 사이토카인 생성량을 측

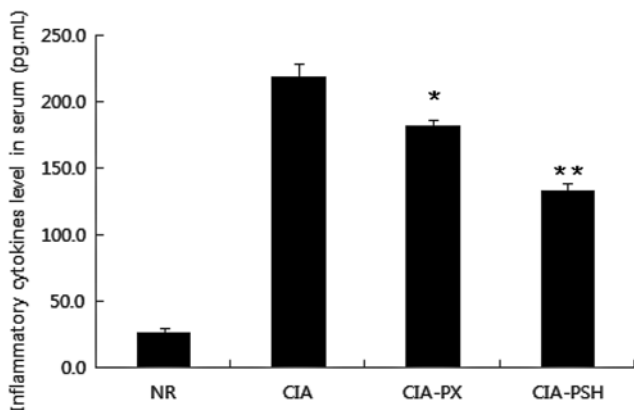


Fig. 5 – Effects of PSH on the serum levels of TNF-α in CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of TNF-α were determined using a commercially available ELISA method. Each data represents the mean ±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (***p*<0.01).

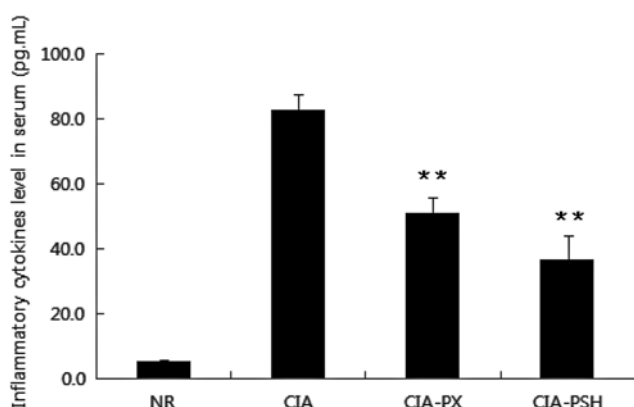


Fig. 6 – Effects of PSH on the serum levels of IL-6 in CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IL-6 were determined using a commercially available ELISA method. Each data represents the mean ±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (***p*<0.01).

정한 결과 TNF-α 생성량은 정상군이 26.6±3.0(pg/mL), 대조군이 219.0±9.9(pg/mL), PX(1%) 투여군이 181.7±4.5(pg/mL), PSH(1%) 투여군이 132.3±5.8(pg/mL)로 나타나 PX 및 PSH 에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다 (Fig. 5).

IL-6 생성량은 정상군이 5.5±0.4(pg/mL), 대조군이 82.9±4.5 (pg/mL), PX(1%) 투여군이 51.4±4.5(pg/mL), PSH(1%) 투여군이 36.8±7.6(pg/mL)로 나타나 PX 및 PSH 에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다(Fig. 6).

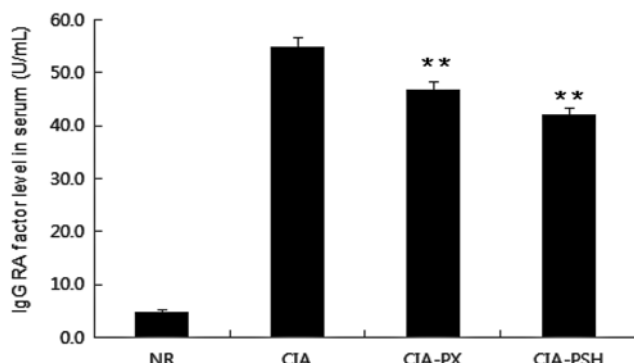


Fig. 7 – Effects of PSH on the serum levels of total Ig G in CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgG rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Each data represents the mean ±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01).

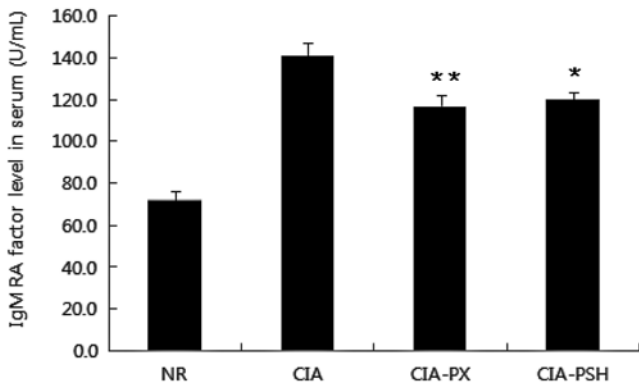


Fig. 8 – Effects of PSH on the serum levels of total Ig M in CIA mice. Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and serum was obtained by 10,000 rpm centrifugation and stored at -20°C until use. The levels of IgM rheumatoid factor were determined using a commercially available ELISA kit. Each data represents the mean±SE of 5 independent experiments. Statistically significant value compared with control group data by student's *t*-test (**p*<0.05, ***p*<0.01).

혈청내 항체 생성에 미치는 영향

Carson 등^{18,19}의 방법에 따라 항체 생성량을 측정된 결과 IgG 혈중 농도는 정상군이 4.7±0.5(pg/ml), 대조군이 54.8±2.5(pg/

ml), PX(1%) 투여군이 46.8±1.5(pg/ml), PSH(1%) 투여군이 42.0±1.3(pg/ml)로 나타나 PX 및 PSH 에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다(Fig. 7).

IgM 혈중 농도는 정상군이 72.1±7.3(pg/ml), 대조군이 141.0±1.8(pg/ml), PX(1%) 투여군이 117.2±4.8(pg/ml), PSH (1%) 투여군이 120.1±3.4(pg/ml)로 나타나 PX 및 PSH 에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 효과를 보여주었다 (Fig. 8).

Paw joint 조직학적 변화

Paw joint의 조직을 CIA 생쥐 모델에 4주간 PX, PSH를 투여하고, 실험 종료 후 생쥐의 관절을 적출하여 H&E 염색과 M-T 염색을 통하여 조직을 분석하였다. Fig. 9, 10의 B와 F는 CIA의 대조군으로 관절 활막세포의 hyperplasia의 침투가 일어나 연골과 뼈의 침하가 진행되었다. 그 외에도 활막의 파괴, 혈관의 확장, cartilage pannus junction 등을 관찰할 수 있다. PX 및 PSH(Fig. 9, 10) 투여군에서는 대조군에 현저하게 관찰된 synovial joint cavity(JC)에서의 염증을 관찰할 수 없었고, 또한 관절 주변에서도 역시 대조군에 비하여 면역세포의 침투나 연골의 침하, 그리고 활막세포의 손상이 상대적으로 감소하였다.

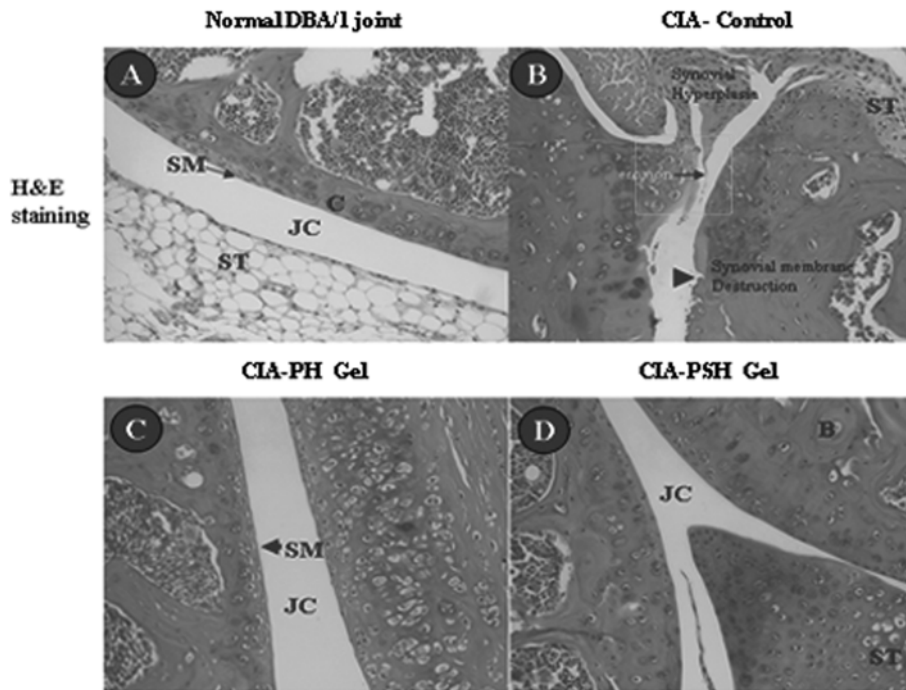


Fig. 9 – Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Hematoxylin-Eosin staining. Normal wild-type DBA/1 mouse (A), control; murine CIA (B), PX (C), and PSH (D) were analysis with histopathology of joints of murine CIA. Intra articular exudate, marginal erosion, necrotic chondrocytes, and relative loss of proteoglycans in the articular cartilage are present panel. JC, synovial joint cavity; SM, synovial membrane; CPJ, cartilage pannus junction; NB, new bone; IP, invasion pannus; E, erosion, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: ×200.

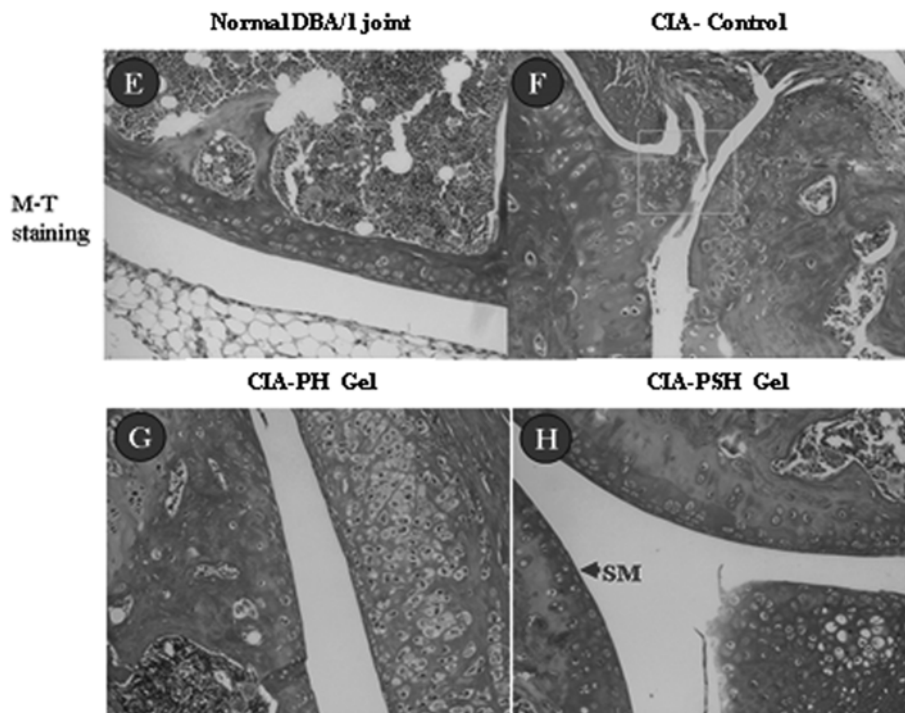


Fig. 10 – Histological section of paw joints from CIA mice. DBA/1J mice were sacrificed, their hind limbs were removed, and the paw were processed for histology and stained with Meisson Trichrome staining. Normal wild-type DBA/1 mouse (E), control; murine CIA (F), PX (G), and PSH (H) were analysis with histopathology of joints of murine CIA. Intra articular exudate, marginal erosion, necrotic chondrocytes, and relative loss of proteoglycans in the articular cartilage are present panel. JC, synovial joint cavity; SM, synovial membrane; CPJ, cartilage pannus junction; NB, new bone; IP, invasion pannus; E, erosion, and resulting in severe cartilage and bone degradation (arrow). Original magnifications: $\times 200$.

결 론

비스테로이드성 진통제인 piroxicam과 황금의 가수분해 추출물을 복합하여 히드로겔 제제를 제조한 다음 부종 억제율, 관절염에 대한 염증 억제 및 면역 조절 작용을 비교 검토한 결과 히드로겔 제제의 효과에 대하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

히드로겔 제제의 부종억제율은 PX 및 PSH겔 투여군에서 대조군에 비하여 높은 성적을 보여주었으며, PSH겔에서는 PX겔보다 더 높은 부종억제 효과를 나타내었다.

PSH겔은 대조군에 비하여 paw joint에 존재하는 $CD3^+$, $CD11b^+$ /Gr-1 세포수를 유의성 있게 감소시켰다.

PSH겔은 대조군에 비하여 혈액 중 존재하는 $TNF-\alpha$ 와 IL-6 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.

PSH겔은 대조군에 비하여 IgG 및 IgM의 혈중 항체를 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과, piroxicam 및 황금 가수분해물을 함유한 히드로겔은 piroxicam 단독 효과에 비해서 항산화 활성 및 류마티스성 관절염 치료효과를 높여줌으로써 생약 복합 외용제로써 개발 가치성이 높은 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(지역거점사업단육성사업/헬스케어기술개발사업단)이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Wiseman, E. H., Chang, Y. H. and Lombardino, J. G. : Piroxicam, a novel anti-inflammatory agent. *Arzneimittelforschung* **26**(7), 1300 (1976).
- 2) Marks, R. and Dykes, P. : Plasma and cutaneous levels after topical application of piroxicam gel: a study in healthy volunteers. *Skin Pharmacol.* **7**, 340 (1994).
- 3) Santoyo, S., Arellano, A., Ygartua, P. and Martín, C. : Penetration enhancer effects on the *in vitro* percutaneous absorption of piroxicam through rat skin. *Int. J. Pharm.* **117**, 219 (1995).
- 4) Lee, I. R. and Park, H. S. : Antimicrobial activity of *Scutellariae Radix* decoction. *Kor. J. Pharmacogn.* **18**(4), 249 (1987).
- 5) Kimura, Y., Kubo, M. and Tani, T. : Studies on *Scutellariae Radix*(3), Effects on lipid metabolism in serum, liver and fat

- cells of rats. *Chem. Pharm. Bull.* **29**(8), 2308 (1981).
- 6) Kimura, Y., Kubo, M. and Kusaka, K. : Studies on *Scutellariae Radix* (5), Effects on ethanol induced hyperlipemia and lipolysis in isolated fat cells. *Chem. Pharm. Bull.* **30**(1), 219 (1982).
 - 7) Kim, M. J., Kim, N. S., Kim, N. S., Kim, D. K. and Yang, J. H. : Improvement of hydrolysis and bioavailability of coprecipitated products of coptidis rhizoma and *Scutellariae Radix* by β -glucuronidase. *J. Kor. Pharm. Sci.* **33**(2), 91 (2003).
 - 8) Yang, J. H., Kim, D. K., Yoon, M. Y. and Ahn, J. K. : Antioxidative activity and therapeutic effect of the hydrogel preparations of *Scutellariae Radix* and zingiberis rhizoma on dermatitis. *J. Kor. Pharm. Sci.* **36**(4), 253 (2006).
 - 9) Jang, S. I., Kim, J. H., Kim, J. Y. and Bae, O. H. : Original articles : Suppressive effect of Kagam-bojungikgitang on collagen induced arthritis in DBA1J mice. *Kor. J. Herb.* **18**(3), 143 (2003).
 - 10) Bonney, R. C. : Treating autoimmune diseases; The market potential for new therapeutic options. *PJB Publication* 1 (2004).
 - 11) Veihelmann, A., Hofbauer, A., Krombach, F., Dorger, M., Maier, M., Refior, H. J. and Messmer, K. : Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology* **41**, 509 (2002).
 - 12) Yang, J. H. and Lee, N. H. : Skin permeation and crosslinking with biological tissue of the hydrolyzed products of *Gardeniae fructus* extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **35**(1), 7 (2005).
 - 13) Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. : Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **111**, 544 (1962).
 - 14) Swingel, K. F., Grant, I. J., Jaques, L. W. and Kyam, D. C. : Interaction of anti-inflammatory drugs in carrageenan-induced foot edema of the rat. *J. Pharmacol. Ther.* **172**, 423 (1974).
 - 15) Veena, T. and Chella, David, S. : HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J. Clin. Invest.* **101**, 921 (1998).
 - 16) Kang, Y. M., Zhang, X., Wagner, U. G., Yang, H., Beckenbaugh, R. D., Kurtin, P. J., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. : CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J. Exp. Med.* **195**(10), 1325 (2002).
 - 17) Klimiuk, P. A., Yang, H., Goronzy, J. J. and Weyand, C. M. : Production of cytokine and metalloproteinase in rheumatoid arthritis is T cell dependent. *Clin. Immunol.* **90**, 65 (1999).
 - 18) Carson, D. A., Chen, P. P. and Kipps, T. : New roles for rheumatoid factor. *J. Clin. Invest.* **87**, 379 (1991).
 - 19) Tighe, H., Chen, P. P. and Trucker, R. : Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mic. *J. Exp. Med.* **177**, 109 (1993).
 - 20) Chung, K. H., Kim, Y. I. and Yang, J. H. : Phonophoretic delivery of piroxicam. *J. Kor. Pharm. Sci.* **32**(4), 259 (2002).
 - 21) Rhee, J. S., Woo, E. R., Kim, N. H. and Lee, E. J. : A Study of Qualitative and Quantitative analysis of major ingredients in *Scutellariae Radix*. *Anal. Sci. & Tech.* **10**(2), (1997).
 - 22) Yang, J. H. and Lee, N. H. : Skin permeation and anti-inflammatory effects of hydrolyzed products of *Gardeniae fructus* extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **34**(2), 115 (2004).
 - 23) Miossec, P. : An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**, 218 (2004).
 - 24) Miossec, P. : Pro and anti-inflammatory cytokine balance in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **13**(Suppl, 12), S13 (1995).
 - 25) Park, S. N. : Antioxidative properties of baicalin, component from *scutellariae baicalensis georgi* and its application to cosmetics (I). *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **14**(5), 657 (2003).
 - 26) Choi, D. S., Kim, S. J. and Jung, M. Y. : Inhibitory activity of berberine on dna strand cleavage induced by hydrogen peroxide and cytochrome c. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(2), 452 (2001).