

세가지 생약복합추출물, AIF의 연골 및 뼈 보호 효능

장순화* · 이병의 · 정동식 · 한정현 · 박정애 · 심성보 · 김세원 · 김정근
(주)오스코텍 기업부설 연구소

Cartilage and Bone Protection Effect of AIF, a water extract from three herbs

Sun-Hwa Chang*, Byung-Eui Lee, Dong-Sik Jung, Jeong-hyun Han,
Jung-Ae Park, Sung-Bo Shim, Se-Won Kim, and Jung-Keun Kim.

Research Institute, Oscotec Inc., 2-17 Omok-ri, Seonggeo-eup Cheonan, Choongnam, 330-831, Korea

Abstract – AIF has been formulated using three herbs known to have anti-inflammatory and anti-osteolytic effects. In this study, the potential therapeutic effects of AIF for osteoarthritis were assessed *in vitro* and *in vivo*. The effects of AIF on the cartilage and bone protection (MMP-13 expression, GAG degradation, OPG release) were examined, *in vitro*. In addition, the therapeutic effect of AIF was evaluated using a chemical-induced osteoarthritis rat model. Rats were injected with iodoacetate intraarticularly in one knee joint and treated with the oral administration of 100 mg/kg AIF-glucosamine once a day for 3 weeks. And then, destruction of cartilage and bone was evaluated by histopathological assessment. AIF significantly inhibited the production of MMP13 and GAG in a dose dependent manner *in vitro*. Also, AIF increased the production of OPG. In OA rat model, the AIF-glucosamine treated group reduced cartilage destruction, compared to vehicle or glucosamine treated group. AIF showed potent protective effects for the destruction of cartilage and bone, *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that AIF contains effective compound(s) which may modify the progression of arthritis.

Key words – AIF, cartilage protection, bone protection

관절염 관련 질환은 전세계 인구의 약 12% 이상이 고통을 겪고 있는 대표적인 퇴행성, 난치성 질환으로 국내에도 약 200만명 이상의 환자가 있는 것으로 알려져 있다. 관절염은 관절, 뼈, 연골 조직 또는 척수에 영향을 주어 영구적인 조직 손상, 기형, 퇴화 및 장애를 일으키는 만성 염증을 특징으로 한다.^{1,2)} 관절염은 퇴행성 관절염(osteoarthritis), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis), 관절의 류마티즘 또는 콜라겐 질환으로 크게 분류된다. 관절염 질환 중 가장 환자 비율이 높은 퇴행성 관절염은 모든 관절에서 발생할 수 있으며, 손이나 발관절, 슬관절, 고관절에서의 발생율이 높다. 퇴행성 관절염은 평균 수명이 증가되면서 유병율이 꾸준히 증가되고 있으며, 60세 이상 인구의 30% 정도가 퇴행성 관절염 환자로 추정된다. 퇴행성 관절염은 심장 질환 다음으로 높은 사회적 경제적 손실을 가져오는 것으로 20세기에 인류의 삶의 질을 저해하는 가장 중요한 질환으로 대두될

것으로 예상되고 있다.¹⁾

현재까지 관절염의 병인은 명확하게 밝혀지지 않았으며, 이 질환을 효과적으로 치료할 수 있는 치료제는 없는 상태이다. 다만, 관절염의 증상을 개선하는 약과 수술들이 시행되고 있으며, 이러한 약물들은 일정한 약리작용을 나타내고 있으나, 여러 가지 부작용이 보고되고 있어, 새로운 작용점 및 약물구조를 가지면서 독성과 부작용이 적은 효과적인 관절염 예방 또는 치료제 개발이 절실히 요구되고 있다.^{1,2)}

한국을 비롯한 동양권에서는 오래 전부터 관절염 증상이 비증이라는 질병과 유사하여 비증을 치료하는 방법인 풍(風), 한(寒), 습(濕)을 다스리는 방법으로 다스려져 왔다. 본 저자들은 관절염을 치료하기 위한 치료제 개발을 기성 한약서와 전통 문헌을 바탕으로 천연 추출물들에서 찾고자 연구를 수행하던 중 삼칠, 숙지황, 가시오가피가 각각 항염증과 연골 및 뼈 파괴 억제 효능이 우수함을 발견하였다. AIF는 이 세가지 천연물, 삼칠, 숙지황, 가시오가피의 열수추출물로 이 세가지 천연물은 동양권에서 2천년 이상 사용되어져 온 전

*교신저자(E-mail): sunhwa@oscotec.com
(FAX): 041-555-7668

통 소재로 안전성이 이미 잘 알려진 소재이다.³⁾ 최근 저자들은 AIF에 대한 *in vitro* 및 collagen-induced arthritis model에서의 항염증 효능과 류마티스 관절염 억제 효과를 발표하였다.⁴⁾

본 연구는 AIF의 연골 및 뼈 파괴 억제 효능을 검증하여 연골 및 뼈 파괴와 관련된 질환 치료제로의 사용 가능성을 평가하고자 진행하였다. 저자들은 AIF의 연골 및 뼈 파괴 억제 효능을 이들 구성 성분들의 발현 및 활성에 미치는 영향을 *in vitro* 와 퇴행성 관절염 동물에서 각각 평가하였다.

재료 및 방법

AIF 제조 - AIF의 세가지 천연물 원재료들은 각각 중국 운남 원산의 분말화한 삼칠(Notoginseng Radix)과 숙지황(Rehmanniae Radix Preparata) 및 가시오가피(Acanthopanax Root Bark)를 풍산 제약(Andong, Korea)에서 구입하였다. 세가지 천연물들은 각각의 지표물질 함량을 HPLC로 측정하여 원재료의 품질을 평가하였다. 삼칠 지표물질은 ginsenoside Rb₁, 숙지황 지표물질은 stachyose, 가시오가피 지표물질은 eleutheroside E[(-)-syringaresinol-4,4'-O-β-D-digluconide]이다.

AIF는 다음과 같은 두가지 방법으로 제조하였다. 제조 방법 1)은 삼칠 분말을 물(증류수)로 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출한 후 동결 건조하여 추출물 분말 (Fxp)을 만들었다. 숙지황과 가시오가피는 4:1 (wt:wt) 비율로 혼합한 후 정제수 10배수를 가하여 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 이 추출액을 여과한 후, 삼칠 분말 추출물 (Fxp)과 균일하게 혼합하였다. 마지막으로, 혼합액을 건조하여 갈색의 AIF를 얻었다. 제조 방법 2)는 삼칠, 숙지황, 가시오가피를 5:4:1 (wt:wt:wt) 비율로 혼합한 후 20배수의 정제수를 가하여 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 이 추출액을 여과한 후 건조하여 AIF를 얻었다.

MMP-13 발현 실험 - 사람의 연골 육종 세포주 (Human chondrosarcoma cell line)인 SW1353 세포를 이용하여 MMP-13의 발현을 western blotting 방법으로 평가하였다. 사용된 사람의 연골 육종 세포주인 SW1353 세포 (ATCC No. HTB-94)는 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)을 첨가한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배지에서 배양하여 사용하였다. 배양된 세포를 96-well plate에 well 당 5×10^5 개가 되도록 분주하였다. 24시간 후 PBS로 씻은 후 FBS가 없는 DMEM 배지에서 24시간 동안 다시 배양하였다. 세포에 배양액으로 희석한 AIF를 다양한 농도로 1시간 동안 처리한 후 종양괴사인자-α (TNF-α)를 20 ng/ml로 첨가하였다. 24시간 후 세포 안의 MMP-13 양을 western

blotting 방법을 이용하여 측정하였다. 즉, cell lysate를 10% SDS-PAGE로 분리 한 후 membrane에 이동시켰다. Membrane을 TBS-T (10 mM Tris-buffered saline, 0.05% Tween-20, pH 7.2)로 1회 세척 후 Blocking solution (3% Skim milk)으로 1시간 동안 방치하였다. 1시간 후 TBS-T로 2회 세척 후 1:3,000~5,000으로 희석한 human MMP-13에 대한 단일 항체 (Chemicon, USA)로 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 3회 세척하고 HRP가 결합된 goat anti-mouse IgG (Promega, USA)를 희석하여 1시간 동안 다시 반응시켰다. 1시간 후 다시 membrane을 3~4회 세척한 후 ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham, USA)을 이용하여 확인하였다.

GAG 분비 실험 - 토끼의 연골조직을 이용하여 배양액 안의 proteoglycan의 분해산물인 glucosaminoglycan (GAG) 양을 측정하였다. 즉, 12주령의 뉴질랜드 흰토끼의 양쪽 뒷다리 관절로부터 연골조직을 분리한 후 연골조직을 24시간 동안 10% FBS를 첨가한 DMEM (Gibco BRL, USA) 배지에서 배양하였다. 24시간 후 연골조직을 48-well plate에 20~25 mg/well로 넣은 후 72시간 동안 다시 배양하였다. 0.5% FBS가 첨가된 DMEM에서 24시간 동안 배양된 연골 조직에 세포 배양액으로 희석한 AIF를 다양한 농도로 처리하고 1시간 뒤 IL-1β (100 ng/ml) 를 처리하였다. 48시간 후 배양액을 blyscan dye와 반응시켜 656 nm에서 흡광도를 측정함으로써 GAG 양을 측정하였다.

OPG 분비 실험 - 사람의 골육종 세포주인 MG63 세포를 이용하여 OPG 양을 측정하였다. 사람의 골육종에서 유래된 세포주인 MG63 세포를 well 당 1×10^4 개가 되도록 96-well plate에 분주하고 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액을 사용하여 24시간 배양하였다. 그 후 0.5% FBS가 포함된 DMEM에 추출물을 여러 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액 안의 OPG 양을 OPG-ELISA kit (Oscotec Inc.)을 사용하여 측정하였다.

퇴행성 관절염 동물 모델에서의 효능 평가 - 일반적인 퇴행성 관절염 유도 방법으로 알려진 iodoacetate를 주사하여 퇴행성 관절염 동물 모델을 유도하였다.⁵⁾ 즉, 8주령된 랫트를 마취한 뒤, 오른쪽 다리 관절 부위를 제모하고 관절부위에 sodium mono-iodoacetate (10 mg/ml) 25 ul를 glass syringe (26gague)를 이용하여 주사하였다. 퇴행성 관절염을 유발한 뒤 3일 후부터 시료를 하루에 한번 3주 동안 경구 투여하였다. 시료 투여 3주 후 개체들을 희생하여 오른쪽 다리 관절 조직을 10% formalin buffer (4°C, 3일)로 고정시켰다. 고정이 완료된 조직을 10% EDTA 용액에서 2주 동안 탈회한 다음, paraffin block을 제조하였다. Paraffin block

Table I. The comparison of AIF manufacturing process 1 and AIF manufacturing process 2

Manufacturing process	Stand material			Release of TNF- α from THP-1 cells (% to Con.)		
	Range of stand material (mg/g)			Conc. of AIF (mg/ml)		
	Ginsenoside Rb ₁	Stachyose	Eleutheroside E	0.2	0.6	2
1	18.48	0.93	0.07	68.9 \pm 1.9	35.4 \pm 1.3	13.6 \pm 1.0
2	18.25	0.95	0.08	66.3 \pm 0.9	33.9 \pm 1.6	10.6 \pm 0.8

으로 만든 각각의 sample을 4~5 μ m으로 자른 다음 safranin O-fast green으로 염색하여 연골의 손상정도를 평가하였다.

통계처리 - 본 연구에서 통계처리는 Student's *t* test 방법을 사용하였으며, 값은 평균과 표준오차로 나타내었다. 대조군에 비해 $p < 0.001$ 인 값을 유효성 있는 값으로 표기하였다.

결 과

AIF 제조 및 지표물질 분석 - 위 실험 방법에서 설명한 것과 같이 제조 방법 1)과 제조 방법 2)로 각각 제조한 AIF의 품질은 세가지 천연물의 지표물질 양을 HPLC를 사용하여 측정함으로써 평가하였다. 즉, 제조 방법 1)로 제조한 AIF에는 각 천연물의 지표물질이 다음과 같이 함유되어 있으며, 제조 방법 1)과 제조 방법 2)로 제조한 AIF에서 유의한 수준의 차이를 보이지 않았다. 삼칠 지표물질 ginsenoside Rb₁ 18.44 mg/g, 숙지황의 지표물질 stachyose 0.93 mg/g, 가시오가피의 지표물질 eleutheroside E 0.07 mg/g. 또한 두 가지 방법으로 제조한 AIF의 TNF- α 분비억제 효능도 유의한 수준의 차이를 보이지 않았다(Table I). 본 연구에서는 제조 방법 1)과 제조 방법 2)로 제조한 AIF가 지표물질 함량 및 효능에서 유의한 차이를 보이지 않아 제조 방법 1)로 제조한 AIF를 이용하여 아래와 같은 실험을 진행하였다.

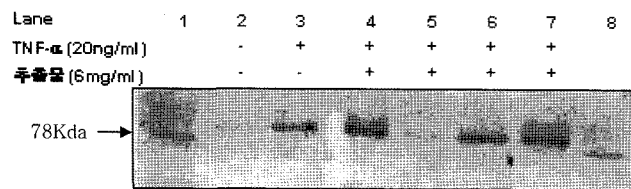


Fig. 1. Effect of AIF on the production of MMP-13 from SW1353 cells.

SW1353 cells were cultured in the presence or absence of AIF for 24 hours. The level of MMP-13 in the cell lysate was determined by the Western blot. Each lane represents the protein marker (1, 8), negative control (2, cell culture medium), positive control (3, treated with TNF- α), *Eleutherococcus senticosus* extract (4), AIF (5), *Panax notoginseng* (*Burk.*) *F. H. Chen* extract (6) and *Rehmannia glutinosa* Libosch extract (7). The data shown are representative of two independent experiments with similar results.

AIF가 MMP-13 발현에 미치는 영향 - MMPs는 활막에 존재하여 조직의 기질을 분해하는 효소로, 특히 MMP-13은 연골세포와 류마티스 관절염의 활막 섬유아세포에서 분비되는 효소로 Type II collagen을 분해하는 주요 효소이다.^{6,7)} AIF가 MMP-13의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 SW1353 세포에 TNF- α 로 MMP-13의 발현을 유도하면서 AIF를 처리한 결과, AIF 6 mg/ml을 처리한 경우, MMP-13의 발현이 현저하게 억제되었다(Fig. 1). 동일 실험에서 AIF를 구성하는 천연물 각각의 추출물을 처리한 경우에는 MMP-13의 발현이 미비하게 억제되거나 영향이 없었다. 이 실험에서 세포 독성은 관찰되지 않았다(data not shown).

AIF가 GAG 분비에 미치는 영향 - Glucosaminoglycan (GAG)는 연골조직을 구성하는 성분으로 proteoglycan이 분해되어 생기는 물질이다.⁸⁾ AIF가 proteoglycan의 분해에 미치는 영향을 알아보기 위해 토끼의 연골조직을 배양하면서 AIF를 농도별로 처리한 후 세포 배양액 안의 GAG 양을 측정하고, 농도 의존적으로 GAG 분비량을 감소시켰으며, 특히, 2 mg/ml과 6 mg/ml 농도에서는 각각 20%와 40% 수준으로 통계적으로 유의하게 감소시켰다(Fig. 2).

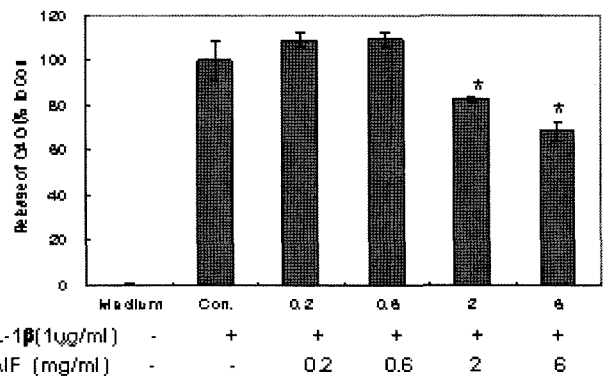


Fig. 2. Effect of AIF on the production of GAG from cartilage explant culture.

Cartilage explants were cultured in the presence or absence of AIF for 48 hours. The amount of released GAG was determined in the culture supernatant by using Blyscan dye. The data represent a mean \pm S.E. of triplicate cultures. The data shown are representative of three independent experiments with similar results. * $p < 0.001$.

AIF가 OPG 분비에 미치는 영향 - OPG는 조골세포로부터 분비되어 파골세포의 분화와 활성을 억제하여 뼈의 파괴를 막는 물질로 보고되었다.^{9,10)} AIF가 OPG 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 조골세포에 AIF를 농도별로 처리한 후 세포 배양액 안의 OPG 분비량을 측정된 결과, 농도의존적으로 OPG 분비를 촉진하였으며, 특히 0.6 mg/ml과 2 mg/ml 농도에서 각각 1.5배와 2.8배 수준으로 통계적으로 유의하게 증가시켰다 (Fig. 3). 이 실험에서 세포 독성은 관찰되지 않았다.

AIF의 퇴행성 관절염 동물모델에서의 효능 평가 - 위 *in vitro* 실험 결과들은 AIF가 연골 파괴를 억제할 수 있는 효능이 있음을 암시함으로써 저자들은 AIF의 연골 파괴 억제 효능을 퇴행성 관절염 동물모델 중의 하나인 sodium monoiodoacetate로 유도한 퇴행성 관절염 동물모델을 이용하여 *in vivo*에서 AIF의 효능을 평가하였다. Sodium monoiodoacetate를 관절 강에 주사 한 지 3일 후부터 글루코사민 (50 mg/kg)과 AIF-글루코사민 혼합제제(AIF+글루코사민, 1:1, 100 mg/kg)를 경구로 하루에 한번 3주 동안 각각 투여하였다. 3주 후 조직학적 분석 실험을 진행한 결과, 글루코사민과 AIF-글루코사민 혼합제제 투여군은 각각 대조군 (DW 투여군)보다 연골 기질의 구성 성분인 proteoglycan을 염색하는 safranin-O 염색이 진하고, 연골 전체 부위에 고르게 분포하였다. 또한 동일량의 글루코사민이 투여된 글루코사민 투여군과 AIF-글루코사민 혼합제제 투여군에서는 글루코사민 단독 투여군보다 AIF-글루코사민 혼합제제를 투

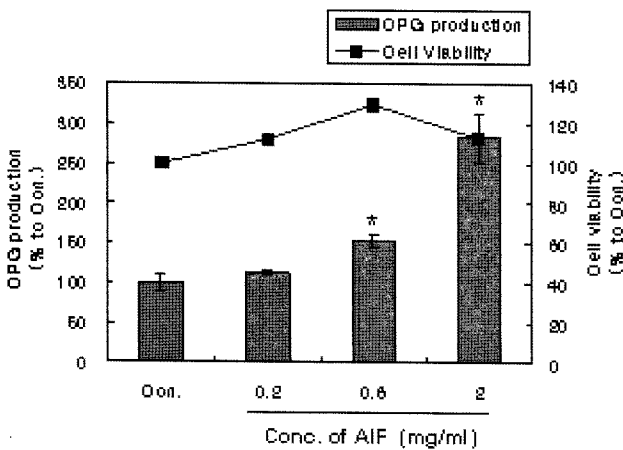


Fig. 3. Effect of AIF on the production of OPG from MG63 cells. MG63 cells were cultured in the presence or absence of AIF for 24 hours. The amount of released OPG was determined in the culture supernatant by using ELISA. The data represent a mean±S.E. of triplicate cultures. The data shown are representative of three independent experiments with similar results. **p*<0.001.

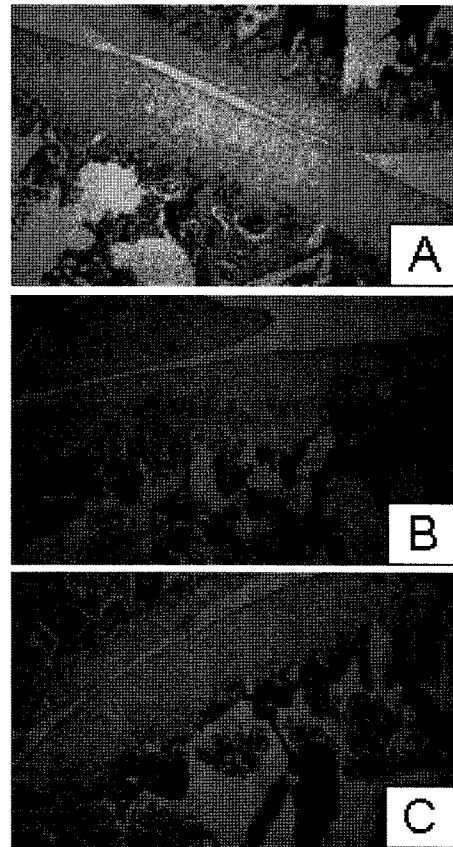


Fig. 4. Effect of AIF treatment on histological analysis in chemical-induced osteoarthritic rats. Right knee from control vehicle (distilled water)-treated (A) or AIF-glucosamine mixture-treated (B), glucosamine-treated (C) OA rats on day 24 after iodoacetate injection were examined by safranin O-fast green staining. Original magnification×100. Representative stainings from each group of 5 rat are shown.

여한 군에서 safranin-O 염색이 진하고 proteoglycan의 함량이 높았다(Fig. 4).

고 찰

관절염은 아직까지 정확한 병인이 밝혀지지 않은 질병으로 통증과 염증의 증상과 함께 연골 및 뼈 파괴가 발생하는 질병이다. 관절염과 관련하여 현재까지 주로 통증과 염증을 중심으로 연구가 진행되어 왔으나, 최근, 연골 및 뼈 파괴에 관한 연구의 중요성이 부각되고 있다.^{11,12,13)}

본 연구에서는 삼칠, 숙지황, 가시오가피의 열수추출물인 AIF의 연골 및 뼈 파괴 억제 효능을 *in vitro* 실험과 동물 실험을 통하여 평가함으로써 관절 기능 개선 효과를 확인하고자 하였다. 본 연구에 사용된 AIF는 세가지 천연물의 열수추출물로, 열수추출물 제조 방법에 따라 최종 추출물의 지표물질 함량과 효능에서 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table I).

삼칠(*Panax notoginseng* F. H. Chen)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 가을에 채취하여 뿌리를 사용하는 약재로 우리나라를 비롯한 동양에서 심혈관 질환, 염증, 지혈 등의 목적으로 사용되어 왔으며 최근에 ginsenoside와 notoginsenoside 같은 dammarane계 사포닌이 생리 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 주성분으로는 ginsenoside Rb₁, Rg₁, Rg₂, notoginsenoside R1, R2, Fa, Fc 등이 알려져 있으며, 우수한 소염, 진통 및 지혈작용이 있어 간염을 비롯한 많은 염증질환에 유효할 뿐만 아니라 외상, 절상으로 생긴 출혈과 내출혈에 유효한 것으로 보고되어져 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 숙지황은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 지황(*Rehmannia glutinosa*)의 뿌리를 황주(黃酒)에 적신 후 찌서 말린 것으로 한방에서 약재로 사용되고 있으며, 허리와 무릎이 시리고 아픈 증상이나 월경이상, 어지럼증 등을 치료하고 각종 만성 병 중 몸이 허약하여 나타나는 내열(內熱), 인후건조(咽喉乾燥), 갈증 등의 증상에 쓰여져 왔다. 또한 지황은 약재의 가공방법에 따라 생지황, 건지황 및 숙지황으로 분류된다. 주요 성분으로 β -sitosterol, stigmasterol과 campesterol 등을 포함하는 phytosterol류, 당류, 아미노산, iridoid glycosides, inorganic elements등이 보고되어 있으며,¹⁷⁾ 이 중 iridoid glycosides는 free radical을 제거할 수 있는 항산화 효과를 가지고 있다고 보고되었다.¹⁸⁻²⁰⁾ 가시오가피(*Eleutherococcus senticosus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하며 뿌리와 줄기 및 가지의 껍질을 한방에서 약재로 사용하고 있다. 가시오가피는 자양강장,²¹⁾ 강정, 진경 및 신진대사 활성작용이 있는 생약으로, 위궤양의 억제,²²⁾ 항염작용,²³⁾ 면역억제작용²⁴⁻²⁶⁾ 등의 효과가 있다고 알려져 있다. Eleutherosides A-G 화합물, 정유 그리고 다당류가 주요한 성분이며, eleutheroside B (syringin)와 eleutheroside E (syringaresinol di-O- β -D-glucoside; liriodendrin)가 활성 성분으로 보고되었다.^{21,27)}

본 연구에서는 AIF의 연골 및 뼈 파괴 억제 효능을 *in vitro* 에서 MMP-13 발현, GAG 분비 그리고 OPG 분비에 미치는 영향과 퇴행성 관절염 동물 모델에서 평가하였다. 그 결과, AIF는 연골 기질 구성 성분들을 분해하는 효소인 MMP-13의 발현을 억제하는 효능이 우수하고(Fig. 1), 연골의 주요 구성성분인 proteoglycan의 분해를 억제하는 효능이 뛰어나며(Fig. 2), hyaluronidase 활성을 감소시키는 효능이 있으므로(data not shown), AIF는 연골조직 손상을 예방할 것으로 기대된다. 또한, 퇴행성 관절염 동물모델을 통한 동물 실험 결과, AIF를 혼합한 글루코사민 제제(AIF-글루코사민 혼합제제)를 경구 투여한 경우, proteoglycan의 분해를 억제하고 연골 보호 및 재생 효능이 우수하였다(Fig. 4). 더욱이, 본 연구 결과, AIF는 뼈 파괴 억제 물질로 보고된 OPG의 분비를 촉진시키는 효능이 우수한 것으로 밝혀져(Fig. 3), AIF는 연골 파괴 억제와 더불어 뼈 파괴를 억제할 수 있는 효능도 있을 것으로 기대된다.

결론

본 연구 결과, 세가지 천연물의 혼합 추출물인 AIF는 MMP-13의 발현과 proteoglycan의 분해를 억제하는 효능이 우수하며, hyaluronidase 활성을 억제하는 효능과 함께 뼈 파괴를 억제하는 OPG 분비를 조골세포로부터 촉진시키는 효능이 우수하였다. 또한 퇴행성 관절염 동물을 대상으로 한 동물 실험에서 AIF에 의한 연골 보호 효과가 우수하였다. 따라서 세가지 천연물의 혼합 추출물인 AIF는 연골 및 뼈 파괴를 억제할 수 있는 유효한 물질을 함유하고 있어 관절 기능 개선 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Wieland, H. A., Michaelis, M., Kirschbaum, B. J. and Rudolph, K. A. (2005) Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov.* **4**: 331-344.
2. Alarcon, G. S. (2001) Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* **27**: 269-282.
3. Bone Cho Kang Mook [Compendium of material medical] 1978.
4. Chang, S. H., Sung, H. C., Choi, Y. L., Ko, S. Y., Lee, B. E., Baek, D. H., Kim, S. W. and Kim, J. K. (2005) Suppressive effect of AIF, a water extract from three herbs, on collagen-induced arthritis in mice. *Int Immunopharmacol.* **5**: 1365-1372.
5. Janusz, M. J., Hookfin, E. B., Heitmeyer, S. A., Woessner, J. F., Freemont, A. J., Hoyland, J. A., Brown, K. K., Hsieh, L. C., Almstead, N. G., De, B., Natchus, M. G., Pikul, S. and Taiwo, Y. O. (2001) Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage.* **9**: 751-760.
6. Goldring, S. R. (2003) Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* **42**: 1-16.
7. Westhoff, C. S., Freudiger, D., Petrow, P., Seyfert, C., Zacher, J., Kriegsmann, J., Pap, T., Gay, S., Stiehl, P., Gromnica-Ihle, E. and Wernicke, D. (1999) Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**: 1517-1527.
8. Kim, H. A., Cho, M. L., Choi, H. Y., Yoon, C. S., Jhun, J. Y., Oh, H. J. and Kim, H. Y. (2006) The catabolic pathway mediated by toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocyte. *Arthritis Rheum.* **54**: 2152-2163.
9. Asagiri, M. and Takayanagi, H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**: 251-264.
10. Theill, L. E., Boyle, W. J. and Penninger, J. M. (2002)

- RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 795-823.
11. Takayanagi H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* **7**: 292-304.
 12. Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J. and Raynauld, J. P. (2006) Most recent developments in strategies to reduce the progression of structural changes in osteoarthritis: today and tomorrow. *Arthritis Res Ther.* **8**: 11-14.
 13. Walsh, N. C., Crotti, T. N., Goldring, S. R. and Gravallesse, E. M. (2005) Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev.* **208**: 228-251.
 14. Yoshikawa, M., Morikawa, T., Yashiro, K., Murakami, T. and Matsuda, H. (2001) Bioactive saponins and glycosides. XIX. Notoginseng (3): immunological adjuvant activity of notoginsenosides and related saponins: structures of notoginsenosides-L, -M, and -N from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen. *Chem Pharm Bull.* **49**: 1452-1456.
 15. Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueno, T., Yashiro, K., Hirokawa, N., Yamahara, J., Matsuda, H., Saijioh, R. and Tanaka, O. (1997) Bioactive saponins and glycosides. VIII. Notoginseng (1): new dammarane-type triterpene oligoglycosides, notoginsenosides-A, -B, -C, and -D, from the dried root of *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen. *Chem. Pharm. Bull.* **45**: 1039-1045.
 16. Kim, D. S., Chang, Y. J., Zedk, U., Zhao, P., Liu, Y. Q. and Yang, C. R. (1995) Dammarane saponins from *Panax ginseng*. *Phytochemistry.* **40**: 1493-1497.
 17. Zhao, Y., Wen, X. S., Cui, J. and Wu, W. H. (2006) Extraction and salting-out purification of alpha-galactosidase and beta-glucosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. *Zhong. Yao. Cai.* **29**: 137-139.
 18. Raju, B. L., Lin, S. J., Hou, W. C., Lai, Z. Y., Liu, P. C. and Hsu, F. L. (2004) Antioxidant iridoid glucosides from *Wendlandia formosana*, *Natural Product Res.* **8**: 357-364.
 19. Sridhar, C., Subbaraju, G. V., Venkateswarlu, Y. and Venugopal, R. T. (2004) New acylated iridoid glucosides from *Vitex altissima*. *J. Natural Products.* **67**: 2012-2016.
 20. Kim, S. S., Son, Y. O., Chun, J. C., Kim, S. E., Chung, G. H., Hwang, K. J. and Lee, J. C. (2005) Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. *Redox. Rep.* **10**: 311-318.
 21. Awang DV. (1996) Siberian ginseng toxicity may be a case of mistaken identity. *Can. Med. Assoc. J.* **155**: 1237-1239.
 22. Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S. (1996) Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer unrestrained cold water stressed rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 1227-1230.
 23. Wang, J. Z., Tsumura, H., Shimura, K. and Ito, H. (1992) Antitumor activity of polysaccharide from a Chinese medicinal herb, *Acanthopanax giraldii* Harms. *Cancer Lett.* **65**: 79-84.
 24. Wang, J. Z., Mao, X. J., Ito, H. and Shimura, K. (1991) Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta. Med.* **57**: 335-336.
 25. Shen, M. L., Zhai, S. K., Chen, H. L., Luo, Y. D., Tu, G. R. and Ou, D. W. (1991) Immunopharmacological effects of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on experimental animals. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**: 549-554.
 26. Shan, B. E., Yoshita, Y., Sugiura, T. and Yamashita, U. (1999) Suppressive effect of Chinese medicinal herb, *Acanthopanax gracilistylus*, extract on human lymphocytes in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **118**: 41-48.
 27. Takasugi, N., Moriguchi, T., Fuwa, T., Sanada, S., Ida, Y., Shofi, J. and Saito, H. (1985) Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its rectal temperature, body and grip tones, motor coordination, and exploratory and spontaneous movements in acute stressed mice. *Shoyakugaku Zasshi.* **39**: 232-237.

(2007년 6월 20일 접수)