

한약복합물 HT008이 흰쥐 관절염 모델에 미치는 효과

임동욱¹, 김미연^{1,2}, 송미경¹, 김지영¹, 이동현¹, 박주연², 부영민¹, 김호철^{1,2*}

1: 경희대학교 한의과대학 본초학교실 2: 뉴메드 한의과학기술연구소

Effect of New Herbal Mixture, HT008 on Arthritis Rat Model

Dong Wook Lim¹, Mi-Yeon Kim^{1,2}, Mikyung Song¹, Jiyoung Kim¹,
Donghun Lee¹, Juyeon Park², Youngmin Bu¹, Hocheol Kim^{1,2*}

1: Dept. of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

2: Korea Institute of Science and Technology of East Medicine, NeuMed Co Ltd

ABSTRACT

Objectives : This study was conducted to investigate the effect of HT008, a multi-herbal mixture consisting of 3 herbs, *Eleutherococcus senticosus*, *Angelica sinensis*, and *Scutellaria baicalensis* on arthritic model in rats.

Methods : The anti-inflammatory and analgesic activities were observed by utilizing the following models: carrageenan-induced edema of the hind paw of rats, acetic acid-induced writhing response in mice. The perimeter of the paw was measured before injection and then at 1, 2, 4, 6 h after injection of 1% λ -carrageenan. The HT008 at five dose levels (10, 30, 100, and 300 mg/kg) and distilled water given 30 min to treatment groups and control group, before λ -carrageenan injection. In the writhing test, the mice received 0.7% acetic acid solution in normal saline injected intraperitoneally at a dose of 10 ml/kg. The number of writhes was counted starting 10 min after injection.

Results : HT008 at four dose levels (30, 100, and 300 mg/kg) significantly decreased the carrageenan-induced rat paw edema perimeter. *E. senticosus* and *S. baicalensis* extracts reduced acetic acid-induced writhing response in mice. Also *A. sinensis* extracts significantly decreased the carrageenan-induced rat paw edema perimeter.

Conclusions : These results show that HT008, a multi-herbal mixture has both anti-inflammatory activity and analgesic effects in vivo arthritic model, and suggest that HT008 could be a good therapy to treat human osteoarthritis.

Key words : HT008, anti-inflammation, paw edema, carrageenan, writhing syndrome, *Eleutherococcus senticosus*, *Angelica sinensis*, *Scutellaria baicalensis*

서론

관절의 연골조직이 파괴되는 관절염은 류마티스성 관절염과 퇴행성 관절염으로 크게 구별되며, 그 중에 퇴행성 관절염은 일명 골관절염(Osteoarthritis, OA)으로 전 세계 65세 이상의 인구에서 약 50% 이상의 발병률이 나

타날 정도로 가장 흔한 질환 중의 하나이다¹⁾. 노령화 인구가 급속도로 증가함에 따라 골관절염 환자 수가 증가하고 있으며, 골관절염 장애에 따른 노동력 상실과 지속적인 치료를 위한 의료비의 계속적인 증가는 사회적 문제로 나타나고 있다²⁾. 우리나라의 경우에는 75세 이상 인구 1,000명당 320명으로 대표적 성인병인 고혈압 227

* 교신저자 : 김호철, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실

· Tel : 02-961-0419 · E-mail : hckim@khu.ac.kr

· 접수 : 2009년 11월 23일 · 수정 : 2009년 12월 10일 · 채택 : 2009년 12월 21일

명, 당뇨 83명보다 월등히 높은 환자수를 나타내고 있다³⁾.

골관절염은 염증(inflammation)으로 인하여 연골아래 골 및 활액막에 퇴행성 변화가 나타나면 신경인성 염증(neurogenic inflammation)의 기전을 통해 통증이 수반되는 경우가 많으며^{4,5)}, 종창, 강직, 통증, 발적 및 관절운동 범위제한 등의 주요증상이 나타난다⁶⁾.

염증은 복잡한 병리 생리학적인 과정으로 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중 자극성 물질에 대한 생체 방어기전의 발현이라고 할 수 있으며⁷⁾, 기존의 항염증제는 크게 스테로이드성과 비스테로이드성 항염증제로 구분된다⁸⁾, 현재 시장에는 염증반응의 주요 증상인 발열, 발적, 동통, 부종 등의 치료를 위하여 비스테로이드성 항염증제를 많이 사용하는데, 특히 골관절염 치료에 쓰이는 비스테로이드성 항염증제의 작용 기전은 cyclo-oxygenase (COX)를 억제하는 것으로 알려졌다⁹⁾. 이러한 관절염 치료에 사용되고 있는 비스테로이드성 항염증제는 경구투여, 근육주사의 형태로 사용되며 약 30% 정도의 통증 억제 효과를 나타내고 있으나, 장기 투여 시 위장 장애, 신장 독성과 같은 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많아 장기간 사용이 불가능하기 때문에 비교적 부작용이 적은 항염증제의 개발이 요구되고 있는 실정이다^{10,11)}. 최근에는 골관절염 치료에 있어서 부작용이 거의 없는 천연물질을 많이 선호하는 추세이며^{12,13)}, 천연물로부터 항염증 효과가 있는 성분을 분리하려는 연구가 활발히 진행되고 있다^{14,15)}.

HT008은 한의학에서 痛風, 痛痺, 歷節風 등 관절염 치료에 사용되었던 한약재 중 항염효과가 있는 —가시오가피, 중국 당귀, 황금을— 3종의 약재를 효과적인 비율로 배합하여 만든 새로운 복합 처방이다. HT008의 구성약재들에 대한 선행연구로 가시오가피(*Eleutherococcus senticosus*) 추출물은 항스트레스 효과와¹⁶⁾, *in vitro* 항염증 효과가 보고되어 있으며¹⁷⁾, 특히 국소 뇌 허혈을 유발시키는 MCAo 동물 모델에서 COX-2를 억제하는 효과가 보고되어 있다¹⁸⁾. 중국 당귀(*Angelica sinensis*)는 그 추출물이 항염증 작용이 있다고 보고되었으며¹⁹⁾, coumarin 유도체 성분이 중국 당귀로부터 많이 연구되었는데, 이러한 유도체들은 항암 작용²⁰⁾, 뇌신경보호 작용²¹⁾, 등의 효과가 보고되어 있다. 황금(*Scutellaria baicalensis*)은 신경보호 작용²²⁾과 실험동물에서 기억증진 효과가 보고되어 있고²³⁾, 항염증 작용에서 황금추출물이 COX-2에 의해 생성되는 prostaglandin E2 (PGE2) 활성을 억제시킨다는 연구가 보고되어 있다^{24,25)}. 또한 HT008은 air-pouch 모델에서 염증을 유발하는 cytokine을 억제하는 효과에 대하여 미국 펜실베이니아대학의 공동연구를 통해 그 결과를 보고한 바 있다²⁶⁾.

따라서 항염증 효능이 우수한 본 복합물을 관절염 치료제로 개발하고자, 관절염 염증모델과 진통모델에서의 억제효능을 평가하였다. 즉 λ -carrageenan 염증을 유발된 HT008을 10, 30, 100, 및 300 mg/kg 용량으로 실험이 진행되기 30분 전에 각각 1회씩 경구투여 하고, 흰쥐 족

부위에 λ -carrageenan 주입 후 증가하는 부종 부피를 측정하였으며, 동일한 실험모델에서 HT008 구성 한약재의 배합비율을 다르게 하여 나타나는 부종억제 효과를 관찰하고자 하였다. 또한 생쥐 복강에 초산으로 유발한 Writhing syndrome 진통억제 실험²⁷⁾에서 HT008을 구성하고 있는 각 개별약재의 진통효과를 관찰 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 한약재는 가시오가피(*Eleutherococcus senticosus* (RUPR.et MAX.) HARMS, 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGI, 중국당귀(*Angelica sinensis* (OLIV.) DIELS.의 각 건조한 뿌리를 사용하였다. 이 약재들은 경동시장에서 구입하여 경희대학교 한의과대학 본초학교실에서 검증을 받아 사용하였다. HT008 구성하는 각 개별약재를 10배수의 70% 알코올(주정)로 82±5°C에서 3시간씩 2회 가온 환류 추출한 후 감압농축하여 농축액을 동결 건조하였다. 이때의 3종 약재의 평균 추출수율은 가시오가피 8.72%, 당귀 35.77%, 황금 47.92%였다. 얻어진 각 동결건조분말을 배합비에 따라 Table 1과 같이 시료를 제조하였다.

Table 1. Extracts Powder Mixing Ratio of HT0

Source	Mixing ratio type		
	Sample I	Sample II	Sample III
<i>E. senticosus</i>	5	3	3
<i>A. sinensis</i>	4	2	4
<i>S. baicalensis</i>	1	1	1

2. HPLC를 이용한 HT008 구성약재의 지표성분분석

HT008의 구성약재 3종 가시오가피, 중국당귀, 황금 각각의 성분인 eleutheroside E 0.1%, ligustilide 1%, baicalin 7% 이상 함유한 약재를 사용하였다. HT008 구성약재의 지표성분분석을 위한 가시오가피의 표준물질인 Eleutheroside E는 Chromadex社, 황금의 표준물질인 Baicalin과 중국당귀의 표준물질인 Ligustilide는 Waco社 제품을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 컬럼은 Varian C₁₈ Column (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m)이며, Waters 시스템은 600 controller와 996 PDA detector를 사용하였으며, 검출파장 205 nm에서 확인하였다. 용매 유속은 1 mL/min로 유지하고, 이동상은 Acetonitrile (A)과 0.5% phosphoric acid (B)를 사용하여 분석시간 0~60분간 5~50%의 Acetonitrile (A)로 농도구배로 진행 후, 70분까지 이동상 A를 70%로 증가시키고 이어 10분간 70%로 유지하였다. HT008의 지표성분인 eleutheroside E, ligustilide, baicalin

의 함량을 각각 HPLC로 동시 분석하였으며 시료 타입 III인 배합비 5:4:1의 시료의 분석 크로마토그램은 Fig. 1 과 같다.

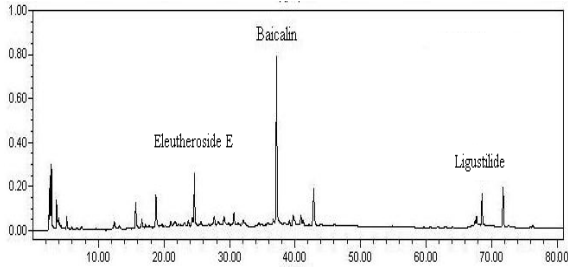


Fig. 1. HPLC chromatogram of HT008 (sample III-type) Eleutheroside E from *E. senticosus*; baicalin from *S. baicalensis*; ligustilide from *A. sinensis*

3. 실험동물 및 약물투여

생후 3주령(체중 100~120 g) 된 수컷 흰쥐 Sprague-Dawley (SD)계 및 생후 5주령(체중 25~33 g) ICR계 생쥐를 샘타코에서 공급받아 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 온도 22 ± 2°C 습도 55 ± 10%, 조명 시간 12시간(07:00~19:00) 조건하에 1주일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안 음식과 물은 충분히 공급하였고, 실험동물이 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 여러 가지 배합비로 제조된 HT008과 각 개별약제를 증류수에 녹인 후 실험이 진행되기 30분 전에 각각 1회씩 경구투여 하였다.

4. Acetic acid에 의한 진통 실험

ICR 생쥐를 각 군으로 나누고 0.7% acetic acid를 0.1 mL/10 g로 복강 내 주사하고, 주사 10분 후부터 10분간의 writhing syndrome(복벽의 수축과 뒷다리의 신전에 따른 골반의 회전으로 이루어지는 뒤틀림 반응)의 횟수를 계측하였다. HT008을 구성하고 있는 각 개별약제 추출물을 300 mg/kg 농도로 경구투여 하였으며, 대조군은 2차 증류수를, 양성 대조군은 ibuprofen 100 mg/kg을 각각 경구투여 하였다.

5. Carrageenan에 의한 항부종작용 실험

실험동물에 급성 관절염을 유발하기 위하여 흰쥐의 오른 쪽 발 저부에 생리 식염수로 용해시킨 1% λ-carrageenan (Sigma Chemical, USA) 50μl 를 0.5 cc 인슐린 주사기를 사용하여 주입하였다. 부종 측정은 Plethysmometer (7140, UGO, Italy) 를 사용하였으며, 1% λ-carrageenan 투여 전과 투여 후 1, 2, 4 및 6 시간에 각각 흰쥐 오른 발의 부피를 1마리 당 2회 반복 측정하여 평균값으로 정하였다 (Fig. 2). 실험동물은 2차 증류수를 투여한 대조

군, ibuprofen 100 mg/kg를 투여한 양성 대조군 및 HT008을 투여한 실험군으로 나누어, 1% λ-carrageenan 을 주입 30분 전에 존대를 이용하여 경구투여 하였다. 부종율(Edema rate %)은 1% λ-carrageenan 주사 후, 각 시간대의 흰쥐 발 부피 변화를 측정하여 다음 식으로 부종 증가율(%)을 산출하였다.

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

V는 1% λ-carrageenan을 주사 전 2회 측정된 발의 평균 부피이며, V1는 λ-carrageenan을 주사 후 1, 2, 4 및 6시간에서 2회 반복 측정된 발의 평균 부피이다. 급성 관절염 유발 약물을 주입하기 전에 모든 실험동물은 예비실험과정을 거쳐 측정기구에 적응하도록 하였다. 빛을 싫어하는 흰쥐의 습성을 참고하여, 모든 실험동물은 실험이 진행되는 암실에서 1시간 이상 적응시킨 후 실험을 진행하였다.

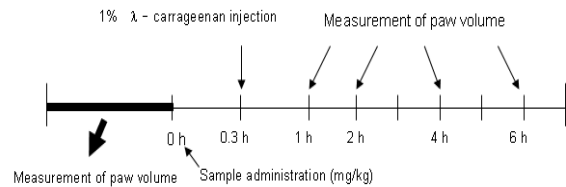


Fig. 2. Experimental design of arthritis rat model

6. 통계처리

결과 통계처리는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 평균치간이 유의성은 Student's t-test 를 이용한 후 p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. HT008 구성하고 있는 개별약제의 부종억제 및 통증억제 효과

HT008을 구성하고 있는 가시오가피, 중국 당귀, 황금을 동일한 용량 300 mg/kg로 경구투여한 지 30분 후에 0.7% acetic acid를 복강주사하여 10분 후부터 10분간 writhing syndrome 횟수를 측정된 결과, 2차 증류수를 투여한 대조군은 42.2 ± 2.3회였으며, ibuprofen 100 mg/kg을 투여한 양성대조군은 22.4 ± 4.8 횟수의 움직임으로 나타나, 대조군에 비해 유의적인 통증억제 효과가 나타났다. 가시오가피, 중국 당귀, 황금 투여군의 경우 각각 30.5 ± 5.2, 37.3 ± 2.8, 30.2 ± 3.3 횟수의 움직임이 나타났으며, 가시오가피와 황금 투여군은 대조군에 비해 유의적인 통증억제 효과가 나타났지만, 중국 당귀 복용군은 유의적인 통증억제 효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

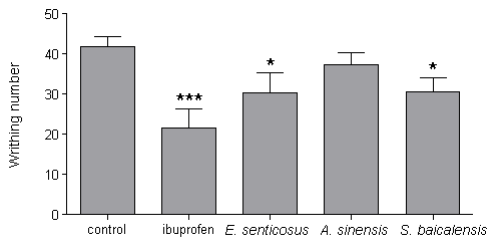


Fig. 3. Numbers of acetic acid induced writhing syndrome in mice

Ibuprofen treatment group was administrated orally at dose of 100 mg/kg. *E. senticosus*, *A. sinensis*, and *S. baicalensis* treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. The values are mean ± SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (***: $p < 0.001$. *: $p < 0.05$).

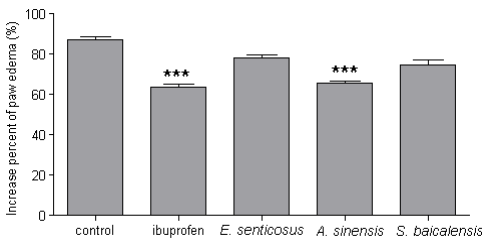


Fig. 4. Paw edema percent of λ-carrageenan induced rat model

Edema value was measured at 4 hour after 1% λ-carrageenan injection. Ibuprofen treatment group was administrated orally at dose of 100 mg/kg. *E. senticosus*, *A. sinensis*, and *S. baicalensis* treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. The values are mean ± SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (***: $p < 0.001$).

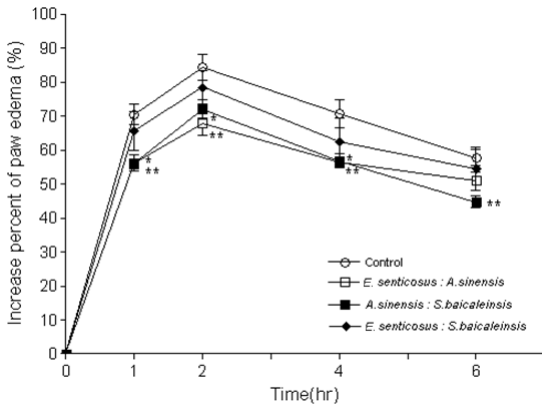


Fig. 5. Paw edema percent of λ-carrageenan induced rat model

Edema value was measured at 1, 2, 4, and 6 hours after 1% λ-carrageenan injection. Treatment groups were administrated orally at dose of 30 mg/kg. The values are mean ± SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (**: $p < 0.01$. *: $p < 0.05$).

1% λ-carrageenan 을 흰쥐 오른발 피하 주입 4시간 후 나타나는 부종을 측정 한 결과 대조군의 경우 87.1 ± 1.9%의 부종 증가율이 나타났으며, ibuprofen 100 mg/kg

를 투여한 양성대조군은 63.5 ± 1.4%로 대조군에 비해 유의한 부종억제 효과가 나타났다. 가시오가피, 중국 당귀, 황금 투여군의 경우 각각 78.2 ± 1.5%, 65.6 ± 2.0 %, 74.6 ± 2.7 %의 부종 증가율로, 가시오가피와 황금 투여군의 경우 대조군에 비해 유의적인 부종 억제 효과가 나타나지 않았으나, 중국 당귀의 경우 뚜렷한 부종 억제 효과가 나타났다(Fig. 4). 이에 복합물의 효능을 평가하고자 동일한 모델에서 각각 가시오가피와 중국 당귀, 중국 당귀와 황금, 가시오가피와 황금 추출물을 동일한 비율로 섞어, 동일한 투여 용량 30 mg/kg으로 실험한 결과 중국 당귀를 포함하고 있는 2가지 약제구성 투여군에서 각 시간대별로 대조군에 비해 유의성 있는 부종 억제 효과가 단일약제에서의 효과와 동일한 경향을 보였다(Fig. 5).

2. HT008 구성약제의 추출물배합 비율에 따른 부종억제 효과

HT008을 구성하는 3가지 약제의 추출물 배합 비율을 다르게 하여 우수한 배합비를 찾자 수행한 시험결과는 Fig. 6와 같다. 4 종류의 배합비로 구성하여 투여용량 100 mg/kg로 투여하였을 때, λ-carrageenan 주사 1시간 제부터 가시오가피, 중국 당귀, 황금 추출물을 5:4:1로 배합하여 투여한 군에서 효과를 보였으며, 대조군에 비해 λ-carrageenan 투여후 1, 2, 4시간에서 각각 28.2 ± 4.3%, 35.5 ± 5.6%, 33.4 ± 2.7%로 뚜렷한 부종억제 효과가 나타났다. 이러한 결과로 λ-carrageenan 투여 후 전 기간 동안 부종이 우수하게 억제되었음을 알 수 있었다. 반면 3:2:1로 구성된 배합비에서 λ-carrageenan 주입 후 2시간 때에 대조군에 비해 약 30% 이상 유의성 있게 부종 억제 효과가 나타났으나, 다른 배합비에서는 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

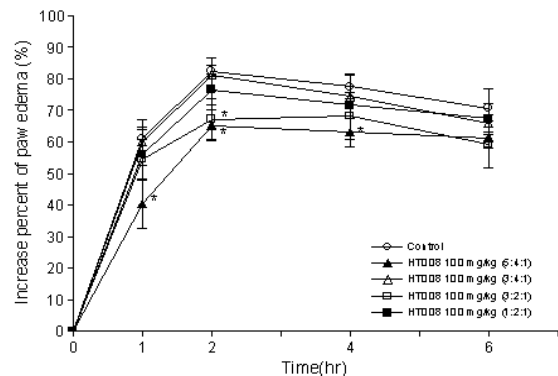


Fig. 6. Paw edema percent of λ-carrageenan induced rat model

Edema value was measured at 1, 2, 4, and 6 hours after 1% λ-carrageenan injection. HT008 treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. The values are mean ± SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group (*: $p < 0.05$).

3. HT008의 투여용량에 따른 부종 억제 효과

가시오가피, 중국 당귀, 황금 추출물 배합 비율을 5 : 4 : 1로 정한 HT008의 부종억제 효과를 양성 대조군인 ibuprofen 100 mg/kg 투여군과 비교하였다. 2차 증류수를 경구 투여한 대조군은 1% λ -carrageenan을 흰쥐 오른발 피하 주입 후, 1시간 후에 약 75% 이상 부종이 진행되면서 그 최대 증가율(%)은 2시간 대에 나타났다. 이후 6시간까지 실험이 진행되면서 흰쥐 오른발의 부종 상태가 조금 억제되는 경향이 보였지만, λ -carrageenan 투여 전 정상 상태보다 약 70% 이상 부종 상태가 유지 되었으며, 양성 대조군인 ibuprofen 100 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 2, 4, 6시간에서 각각 $33.2 \pm 6.7\%$, $36.5 \pm 8.9\%$, $52.3 \pm 5.9\%$ 로 부종이 유의성 있게 억제되었다. 특히 HT008 300 mg/kg 투여군에서 부종 유발 2시간에 양성 대조군인 ibuprofen 투여군과 유사한 부종 억제 효과가 나타났다(Fig. 7). 이상의 결과는 타 연구자의 반복 교차(cross checking) 실험에서도 HT008의 부종 억제 효과가 나타났다(data not shown).

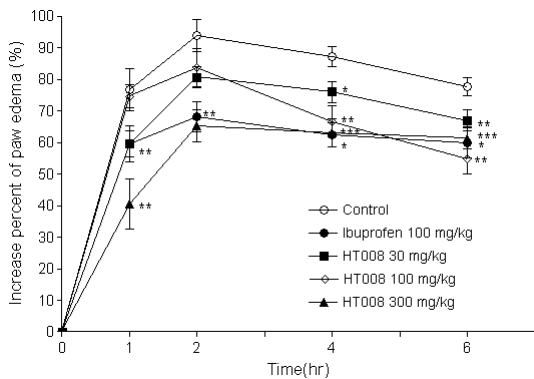


Fig. 7. Paw edema percent of λ -carrageenan induced rat model

Edema value was measured at 1, 2, 4, and 6 hours after 1% λ -carrageenan injection. HT008 treatment groups were administrated orally at dose of 300 mg/kg. The values are mean \pm SD. Data were analyzed by Student's t-test compared between control group and treated group(***: $p < 0.001$. **: $p < 0.01$. *: $p < 0.05$).

고찰 및 결론

한약 복합물 HT008의 항염증 효과를 관찰하기 위하여 λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성 관절염 모델에서 HT008을 경구투여하였을 때, 30, 100, 및 300 mg/kg 용량에서 대조군에 비해 유의하게 부종억제 효과가 나타났다. HT008을 구성하고 있는 가시오가피, 중국 당귀, 황금을 300 mg/kg 용량으로 각각 경구투여하였을 때, 중국 당귀 투여군에서 뚜렷한 부종억제 효과가 나타났고, 초산 유발 통증실험에서 가시오가피와 황금 투여군에서 유의한 통증억제 효과가 나타났다.

일반적으로 관절염은 염증을 동반하며 통증을 일으키는 것으로, 관절염의 치료에 있어서 염증과 통증에 대한 치료가 매우 중요하다²⁸⁾. 관절염의 통증 조절과 증상 완화에 많이 사용되고 있는 비스테로이드성 항염증제의 작용 기전은 cyclo-oxygenase (COX)를 억제하는 것으로 COX는 현재 COX-1과 COX-2의 2가지 동종효소가 존재하는 것으로 알려져 있다. COX-1은 대부분의 조직에 존재하고 위 세포 보호, 혈소판 응집, 혈관 항상성과 신장 혈류량 조절 등의 많은 생리학적 기능을 수행 한다²⁹⁾. COX-2는 정상조직에서 존재하지 않지만 외부 여러 자극에 의해 나타나는 유도 효소로서 염증과 통증에 중요한 역할을 하는 prostaglandin의 생성을 조절하고, 염증 부위에서의 COX-2 발현은 평상시 보다 10~80배 증가된다고 보고되었다³⁰⁾. 따라서 비스테로이드성 항염증제 투여 시 나타나는 위장관 출혈과 같은 혈액학적 부작용은 COX-1 억제에 의한 것으로 알려져 있고, 항염증 효과는 COX-2의 억제에 기인되는 것으로 알려져 있다^{31,32)}.

염증은 여러 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체방어기전이며³³⁾, 급성 염증반응의 대표적인 모델인 carrageenan 염증유도모델은 여러 항염증제 검색법 중 하나이다³⁴⁾. Carrageenan은 *Chondrus crispus* (Irish sea moss) 해조류부터 추출한 sulfated polygalactose로서 Kappa(κ)와 lambda(λ)의 2가지 fraction으로 구성되며, 이 중에서 염증유발에 유효한 fraction은 lambda(λ) fraction으로 보고되었다³⁵⁾. λ -carrageenan에 의한 염증 시 histamine, kinins, serotonin, prostaglandin E 등이 나타나며, λ -carrageenan에 의한 염증 초기 반응에는 histamine 및 serotonin 등에 의한 충혈을 일으키고, 이후 bradykinin에 의해 지속적인 부종을 수반하는 염증반응이 나타나는 연구 결과가 보고되었다³⁶⁾. 특히 흰쥐 족 부위에 λ -carrageenan으로 유발한 염증 모델은 급성 관절염 모델로서 그 의미를 두어 골관절염에 따른 부종 억제 작용을 확인하고자 할 때 사용된다³⁷⁾. λ -carrageenan으로 염증이 유발된 흰쥐 족부에서 COX-2 mRNA가 발현 되었으며, 선택적 COX-2 억제제를 사용하여 염증을 억제할 수 있고, COX-1 mRNA의 발현은 증가되지 않았다고 보고되었다³⁸⁾. 따라서 λ -carrageenan으로 유발한 급성 관절염 모델에서 부종억제 효과가 나타나면, COX-2 억제제 전으로 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성 관절염 모델에서 HT008을 경구 투여 하였을 때 30, 100, 및 300 mg/kg의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 부종의 크기가 억제 되었다. 특히 저농도인 HT008 30 mg/kg 투여군에서 부종 유발 2시간에, 대조군에 비해 부종 억제율이 약 35%로 양성대조군인 ibuprofen 100 mg/kg 투여군과 유사한 효과가 나타났다. 또한 반복 교차(Cross checking) 실험에서도 HT008을 10, 30, 100 mg/kg 투여한 약제군은 각 시간대별로 대조군에 비해 유의성 있게 부종이 억제 되었다. 특히 HT008을 구성하는 가시오가피, 중국 당귀, 황금 3가지 약제의 배합 비율

이 5 : 4 : 1일 때 그 효능이 나타났다.

이미 선행연구에서 HT008이 BALA/c 생쥐의 air-pouch 모델에서 염증유발인자인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), PGE₂를 억제하고, 항염증 작용을 가지는 prostaglandin D₂를 증가시키는 것으로 보고되었으므로³⁶⁾, 이러한 결과들을 살펴 볼 때, λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성 관절염 모델에서 HT008이 여러 염증 인자를 억제하는 기전으로 부종을 억제 하는 것이라 생각 된다.

흰쥐 급성 관절염 모델에서 부종을 억제시키는 HT008 효능에 각 개별약제가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 HT008을 구성하는 3가지 약제 중 1 가지씩을 제외 하여 가시오가피와 중국 당귀, 중국 당귀와 황금, 가시오가피와 황금 3군으로 나누어 동일한 용량 30 mg/kg로 투여한 결과 중국 당귀를 포함하고 있는 2가지 약제 구성 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 부종 억제 효과가 나타났다. 또한 동일 동물모델에서 HT008을 구성하고 있는 각 개별약제를 300 mg/kg 용량으로 투여한 결과 중국 당귀와 황금 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 부종억제 효과가 나타났는데, 특히 중국 당귀의 경우 뚜렷한 부종억제 효과를 나타냈다. 또한 중국 당귀 추출물이 air-pouch 모델에서 염증발현인자로 잘 알려진 TNF- α , IL-6, IL-1 β 등을 억제시키는 효능이 보고되었다³⁹⁾. 따라서 HT008의 흰쥐 급성 관절염 모델에서 나타난 부종억제 효능은 HT008을 구성하고 있는 약제 중 중국 당귀의 항염증 효과가 크게 작용하는 것으로 생각된다.

HT008을 구성하고 있는 가시오가피, 중국 당귀, 황금을 생쥐에 동일한 용량 300 mg/kg로 경구 투여 30분 후 0.7% acetic acid 주사 10분 후 10분간 writhing syndrome의 회수를 측정 한 결과 가시오가피와 황금 투여군에서 대조군에 비해 유의한 통증억제 효과를 확인 하였지만, 중국 당귀 투여군은 유의한 통증 억제 효과가 나타나지 않았다. 따라서 λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성 관절염 모델에서 부종억제 효능을 보인 HT008은 항염증 작용뿐만 아니라 염증에 따른 통증 또한 억제할 수 있을 것이라 생각된다.

관절염의 치료를 위해서는 염증에 대한 치료뿐만이 아니라 관절염에 동반되는 통증을 조절하는 것이 매우 중요하므로, 초산으로 유발된 생쥐에 writhing syndrome의 회수를 측정 한 실험에서 통증억제 효과가 나타난 가시오가피, 황금과 λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성 관절염 모델에서 부종억제 효과를 보인 중국당귀로 구성된 HT008은 골관절염 치료에 있어서 항염증 효과와 염증에 따른 통증을 억제시키는 효과를 기대 할 수 있다.

결론적으로 단일약제 검색을 통해 새롭게 구성한 HT008 복합처방에 대하여 배합구성비에 대한 고찰을 통해 5 : 4 : 1이라는 배합비에서 λ -carrageenan으로 유발한 흰쥐 급성관절염 모델에서 부종을 가장 효과적으로 억제시키는 것으로 증명되었으며, 그 관련 기전은 염증을 일으키는 인자들인 cytokines들을 저해함으로써 나타나는 것으로

판단된다. 또한 구성 약제인 가시오가피와 황금 개별 추출물이 생쥐 통증모델에서 진통 억제 효과를 나타내어 본 HT008 복합처방은 항염증 및 진통 모두에 효과적인 것으로 판단된다.

따라서 한약 복합물 HT008은 골관절염 환자가 복용시 그 염증을 억제하고 통증을 억제 시키는 효과가 있을 것으로 기대 할 수 있으며, 인체에서 COX-2 억제제들이 보이는 위장관련 부작용이 없는 천연물 기원의 골관절염 치료제로서 개발 가능성이 높은 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 2단계 두뇌한국21사업과 보건복지가 족부 보건의료기술진흥사업의 지원(과제고유번호 : A081071)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Metcalf MH, Larson RV. Painful disorders of the thigh and knee. In Bonica's management of pain. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. 2001 ; 1593-613.
2. Dunlop DD, Manheim LM, Yelin EH, Song J, Chang RW. The costs of arthritis. British Journal of Rheumatology. 1996 ; 35 : 781-90.
3. 한국보건사회 연구원 : 국민건강 영양조사. 2001.
4. Couture R, Cuello AC. Studies on the trigeminal antidromic vasodilation and plasma extravasation in the rat. J Physiol. 1984 ; 346 : 273-85.
5. Ferrell WR, Russell NJW. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fiber afferents the anesthetized cat. J Physiol. 1986 ; 379 : 407-23.
6. 대한정형외과학회 편저. 정형외과학. 서울 : 최신의 학사. 2003 ; 1133-5.
7. 유태무, 이숙경, 저수연, 송승애, 류항목, 이은방, 양지선. Students on the antiinflammatory effects of natural products. 응용약물학회지. 1998 ; 6 : 269-75.
8. Goldman L, Claude Bennett J. TEXTBOOK of MEDICINE. Pennsylvania : WB Saunders Company. 2000 : 114-8.
9. Cashman JN. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. Drugs 1996 ; 52 : 801-20.
10. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirine/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analstis. Gastroenterology. 2003 ; 124 : 47-56.
11. Pascucci RA. Use of nonsteroidal anti-inflammatory

- drugs and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: indications and complications. Journal of American Osteopath Association. J. Ethnopharmacol. 2002 ; 102 : 487-9.
12. Ignacimuthu S, Prakash BN, Pandikumar P. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth an ethnomedicinal plant in acute and chronic animal models of inflammation. J. Ethnopharmacol. 2009 ; 125 : 356-60.
 13. Jia W, Gao WY, Cui NQ, Xiao PG, Anti-inflammatory effects of an herbal medicine (Xuan-ju agent) on carrageenan-and adjuvant-induced paw edema in rats. J Ethnopharmacol. 2003 ; 89 : 139-1.
 14. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. 약학회지. 1998 ; 42(2) : 214-9.
 15. Fujikawa A, Yamaguchi I, Morita H, Takeda Nishibe. Protective effects of *Eleutherococcus senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. Biol Pharm Bull 1996 ; 19 (9) : 1227-30.
 16. Jung HJ, Park HJ, Kim RG, Shin KM, Ha J, Choi JW, Kim HJ, Lee YS, Lee KT. *In vivo* anti-inflammatory and antinociceptive effects of liriocendrin isolated from the stem bark of *Eleutherococcus senticosus*. Planta Med. 2003 ; 69 (7) : 610-6.
 17. Tokiwa T, Yamazaki T, Sakura S. Anti-inflammatory effect of eleutheroside E from *Eleutherococcus senticosus*. Food and food Ingredients Journal of Japan. 1996 ; 211-3.
 18. Bu Y, Jin ZH, Park SY, Baek S, Rho S, Ha N, Park SK, Kim H. Siberian ginseng reduces infarct volume in transient focal cerebral ischaemia in Sprague-Dawley rats. Phytother Res. 2005 ; 19 (2) : 167-9.
 19. Cho CH, Mei QB, Shang P, Lee SS, So HL, Guo X, Li Y. Study of the gastrointestinal protective effects of polysaccharides from *Angelica sinensis* in rats. Planta Med. 2000 ; 66 (4) : 348-51.
 20. Kim HH, Bang SS, Choi JS, Han H, Kim IH. Involvement of PKC and ROS in the cytotoxic mechanism of anti-leukemic decursin and its derivatives and their structure-activity relationship in human K562 erythroleukemia and U937 myeloleukemia cells. Cancer Lett. 2005 ; 223 (2) : 191-201.
 21. Kang SY, Lee KY, Sung SH, Kim YC. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. J Nat Prod. 2005 ; 68 (1) : 56-9.
 22. Kim YO, Leem K, Park J, Lee P, Ahn DK, Lee BC, Park HK, Suk K, Kim SY, Kim H. Cytoprotective effect of *Scutellaria baicalensis* in CA1 hippocampal neurons of rats after global cerebral ischemia. J Ethnopharmacol. 2001 ; 77 (2-3) : 183-8.
 23. YZ Shang, H Miao, JJ Cheng and JM Qi. Effects of amelioration of total flavonoids from stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi on cognitive deficits, neuronal damage and free radicals disorder induced by cerebral ischemia in rats. Biol Pharm Bull. 2006 ; 29 (4) : 805-10.
 24. Zhang DY, Wu J, Ye F, Xue L, Jiang S, Yi J, Zhang W, Wei H, Sung M, Wang W, Li X. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis*. Cancer Res. 2003 ; 63 (14) : 4037-43.
 25. Jung SM, Schumacher HR, Kim H, Kim M, Lee SH, Pessler F. Reduction of urate crystal-induced inflammation by root extracts from traditional oriental medicinal plants: elevation of prostaglandinD2 levels. Arthritis Res. Ther. 2007 ; 9 (4) : R64.
 26. Kim YK, Kang HJ, Lee KT, Choi JG, Chung SH. Anti -inflammation activity of *Actinidia polygama*. Arch Pham Res 2003 ; 26(12) : 1061-6.
 27. Koster R. Varicose veins; pathogenetic, etiological & clinical aspects of exert testimony. Medizinische. 1959 ; 4 (4) : 148-2.
 28. 박한석, 박지용, 한희철, 임혜자, 장성호, 윤석민. 백서의 급성 관절염 모델에서 Diclofenac, SC-560 NS-398의 말초 진통 및 항염증 효과 대한마취과학회지. 2004 ; 46 : 336-41.
 29. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 15 2001 ; (5) : 801-20.
 30. Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. FEBS Lett. 1996 ; 390(2) : 165-9.
 31. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. Scand J Rheumatol. Suppl. 1996 ; 102 : 9-21.
 32. Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. J Rheumatol Suppl. 1997 ; 49 : 6-8.
 33. 유태무, 이숙영, 정수연, 송상애, 류항복, 이은방, 양지선. Students on the anti-inflammatory effects of natural products. 응용약물학회지. 1998 ; 6 : 269-75.
 34. Saito H, Nomura Y. Screening methods for drug evaluation. Tokyo : Hirokawa Publishing Company. 45-82.
 35. Chough YS, Kim ND, Kim SA. Aspirin과

- Prednisolone 병용투여 시의 항염증 및 해열작용에 관한 연구. 약학회지. 1978 ; 22(3) : 128-37.
36. B Costa, M Colleoni, S Conti, D Parolaro, C Franke, AE Trovato and G Giagnoni. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 369 (3) : 294-9, 2004.
37. 이운숙, 박지용, 임혜자. 흰쥐의 급성관절염 모델에서 NSAIDs의 말초 진통 효과와 Cyclooxygenase-1 과 Cyclooxygenase-2의 발현. *대한마취과학회지.* 2004 ; 47 : 862-9.
38. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *USA : Proc Natl Acad Sci.* 1994 ; 91 : 12013-7.
39. Shin S, Jeon JH, Park D, Jang JY, Joo SS, Hwang BY, Choe SY, Kim YB. Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Angelica gigas* in a Carrageenan-air pouch inflammation model. *Exp Anim.* 2009 ; 58 (4) : 431-6.