

고요산동물에서의 익지인의 요산저하 효과

이영실^{1#}, 김지연¹, 김승형², 김동선^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한의약융합연구부, 2 : 대전대학교 동서생명과학연구원

Hyperuricemic effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* extracts

Young-Sil Lee^{1#}, Jiyoun Kim¹, Seung-Hyung Kim², Dong-Seon Kim^{1*}

1 : KM Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Dajeon 34054, Republic of Korea

2 : Institute of Traditional Medicine and Bioscience, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon 34520, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : Hyperuricemia is a metabolic disease characterized by elevated blood uric acid levels, and its prevalence is rapidly increasing worldwide. *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (AO) belonging to Zingiberaceae is one of well-known traditional medicines in China and Korea, and has been used to treat intestinal disorders, urosis, diuresis, and chronic glomerulonephritis traditionally. However, the effect of AO has not been studied. In this study we investigated the anti-hyperuricemic effect of AO, and the mechanisms underlying the effect in potassium oxonate (PO)-induced hyperuricemic rats.

Methods : To examine the anti-hyperuricemic effects of the AO extract, serum uric acid levels were analyzed in normal and PO-induced hyperuricemic rats. The mechanism underlying the effects of the AO extract on uric acid levels was studied through xanthine oxidase (XOD) activity test and uric acid uptake assay *in vitro*. The chemical finger printing of the AO extract was analyzed using HPLC-DAD.

Results : The AO extract significantly reduced serum uric acid levels in normal as well as PO-induced hyperuricemic rats. It also significantly inhibited the uptake of uric acid in oocytes and human embryonic kidney cells (HEK293) expressing urate transporter (URAT)1, but not XOD activity *in vitro*. The chemical finger printing analysis of the AO extract showed nootkatone as a main component.

Conclusion : The AO extract exhibits anti-hyperuricemic effects, and these effect were accompanied by increasing excretion of uric acid in kidney. Therefore, the AO extract could be used for prevention or treatment of hyperuricemia and gout.

Key words : *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, Hyperuricemia, Xanthine oxidase, Urate transporter

I. 서 론

통풍(痛風)은 고요산혈증(高尿酸血症)으로 발가락 등의 관절 부위에 바늘모양의 요산결정이 축적되어 통증을 유발하는 병으로 수명의 증가 및 식생활의 서구화로 인해 통풍 발병 환자가

증가하고 있는 심각한 질병중의 하나이다. 고요산혈증(高尿酸血症)은 대사성 질환의 하나로, 퓨린 대사의 최종 산물인 요산의 혈중농도가 증가되어 체내에 과포화를 이룬 상태이다. 고요산혈증은 요산의 과잉 생성 또는 배설의 장애로 인해 기인된다고 알려져 있다^{1,2)}. 최근에는 고요산혈증이 통풍 뿐만 아

*Corresponding author : Dong-Seon Kim, KM Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Dajeon 34054, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9639 · Fax : +82-42-863-9578 · E-mail : dskim@kiom.re.kr

#First Author : Young-Sil Lee, KM Convergence Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Dajeon 34054, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9671 · Fax : +82-42-863-9578 · E-mail : rheeys04@kiom.re.kr

· Received : 14 October 2017 · Revised : 24 October 2017 · Accepted : 15 November 2017

나라 고지혈증, 당뇨, 고혈압 및 심장질환 등의 대사성 질환과의 관련성도 보고됨에 따라 혈중 요산 조절에 대한 관심이 증가하고 있다³⁾.

현재 통풍 예방 및 치료를 위하여 혈중 요산 농도를 낮추는 약물들이 주로 사용되고 있으며, 대표적인 의약품들로는 xanthine oxidase 효소활성을 저해하여 요산 생성을 억제하는 allopurinol과 febuxostat, 신장에서 요산 재흡수를 억제하여 요산 배설을 촉진하는 benzbromarone과 probenecid 등이 있다. 하지만 이런 약들은 위장관(胃腸管) 장애(障礙), 피부발진(皮膚發疹), 심장질환, 간독성 등의 부작용이 보고되고 있다⁴⁾. 이러한 부작용으로 인해 사용에 제한을 받고 있어 부작용이 없는 안전한 통풍 및 고요산혈증 치료제의 개발이 요구되고 있다.

익지인(益智仁, *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 익지(*Alpinia oxyphylla* Miquel)의 성숙한 과실로서 비위(脾胃)를 따뜻하게 하고 신(腎)을 보(補)하며 정기(精氣)를 고삽(枯澁)하는 등의 효능으로 소변불금(小便不禁), 노립(勞淋), 방광허한(膀胱虛寒), 하혈(下血), 신허(腎虛), 탈정(脫精) 등을 위한 처방에 사용되어 왔다^{5,6)}. 현대의 효능연구로는 음경해면체 평활근 이완⁷⁾, 항균⁸⁾, 항당뇨⁹⁾, 항골다공증¹⁰⁾ 효과가 알려져 있으며, 익지인의 주요성분으로는 nootkatone, nootkatol, yakuchione A 와 B, gingerol, aromadendrene, patchoulene, guaiol, zingiberol, oxyphyllone A 와 B, rhamnocitrin, staphylionoside D 등이 알려져 있다¹¹⁻¹²⁾. 따라서 본 연구에서는 한약처방에 다빈도로 사용되는 300여종의 한약재들을 대상으로 탐색한 결과 익지인의 우수한 혈중요산 저하효과를 나타냄을 확인하여 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 약재 수집 및 추출물 제조

익지인(중국)은 광명당 제약(한국)에서 구입하여 사용하였다. 익지인 200 g을 2 l 의 70% 에탄올에 70~80℃에서 3시간 동안 환류 추출 및 여과하였다. 추출용액을 감압 농축하여 익지인 추출물 18.47 g을 수득하였고 수득률은 9.24%였다.

2. 고요산동물모델에서의 효능평가

1) 실험동물

7주령의 숫컷 Sprague-Dawley (SD) 계통의 랫트를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 기본사료(AIN-76A diet)와 물을 자유롭게 공급하면서 온도(25±2℃), 습도(50±5%) 및 12시간 명암주기의 사육환경에서 1주일 동안 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 동물실험은 동물보호법 및 한국한의학연구원 동물실험윤리위원회 규정에 따라 관리하였다.

2) 고요산동물모델 제조 및 시료 투여

고요산동물을 유발하기 위해 potassium oxonate을 0.1M

sodium acetate (pH5.0)가 함유된 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액으로 적정한 후 150 mg/kg의 용량으로 복강 주사하였으며, 정상대조군은 0.1M sodium acetate (pH5.0)가 함유된 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액을 복강 주사하였다. 실험군은 정상대조군(NC), 고요산동물군(PO), 50, 100 mg/kg 및 200 mg/kg 익지인 추출물 투여군(AO), 양성대조군(allopruolol, AP)으로 구분하였으며, 정상대조군과 고요산동물군은 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액을 경구 투여 하였고, 익지인 추출물은 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액에 현탁하여 50, 100과 200 mg/kg의 용량으로 투여하였고 allopruolol은 10 mg/kg의 용량으로 PO의 복강투여 30 분전에 5일 간 경구 투여 하였다.

3) 정상동물에서의 시료 투여

정상동물을 정상대조군(Normal Control, NC), 300 mg/kg 익지인 추출물 투여군(AO), 양성대조군(allopruolol)으로 구분하였으며, 정상대조군은 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액을, 익지인 추출물은 0.5% sodium carboxymethylcellulose 용액에 현탁하여 300 mg/kg의 용량으로, allopruolol은 10 mg/kg의 용량으로 경구 투여 하였다.

4) 혈액 수집

고요산동물모델과 정상동물에서의 혈액 채취는 각각 시료의 경구 투여 2시간과 4시간 후 에틸에테르로 마취하여 심장천자법으로 채혈하여 수집하였으며, 수집된 혈액은 3,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 -70℃에 보관하였다가 분석하였다.

5) 요산 측정

혈청 내 요산의 농도는 효소시약 측정용 키트(Biovision, USA)를 이용하여 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

3. In vitro Xanthine oxidase 저해 활성 분석

1) 시약

Xanthine oxidase, potassium phosphate buffer, xanthine sodium salt 와 allopurinol은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2) 잔틴옥시데이즈 활성 평가

Xanthine oxidase(XOD) 저해활성은 Noro 등 (1983)¹³⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 50, 25 mg/ml로 녹인 시료 1 µl를 가하고 8.3 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2) 100 ml에 100 µM xanthine sodium salt 를 녹인 기질용액 179 µl를 첨가 하였다. 여기에 xanthine oxidase(0.4 U/ml) 20 µl를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 uric acid 함량을 295 nm에서 흡광도를 측정하였다(SpectraMax M2, Molecular Devices, USA). XOD 저해 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율을 백분율(%)로 표기하였다.

4. *In vitro* Urate transporter(URAT)1 수송 활성 저해능 측정

1) URAT1을 발현하는 oocytes 시스템에서의 수송활성 저해능 평가

URAT1 유전자가 삽입되어 있는 플라스미드를 제한효소로 선형화시키고, 이를 주형으로 cRNA를 제작하였다. 북방산 개구리(*X. laevis*)로부터 채취한 oocytes에 제작한 cRNA를 미세 주사한 뒤, 26-48시간 배양하여 수송단백이 발현되도록 하였다. URAT1 수송에 대한 익지인 추출물의 저해 활성을 평가하기 위해, 우선 pyrazinecarboxylic acid 1 mM 이 함유된 ND96 solution(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES(pH7.4))을 처리하여 상온에서 1시간 pre-incubation 한 후, 기질인 [¹⁴C]Uric acid 20 μM 와 익지인 추출물 20, 50 100 및 200 μg/ml 농도로 처리 한 후 상온에서 1시간 반응 시켰다. 실험 종료 후 oocytes를 세척한 후 10% SDS 및 0.1 N NaOH 용액을 가하여 oocytes를 녹인 뒤 cocktail mixture를 가하여 oocytes 내 방사능량을 측정하였다¹⁴⁾. URAT1 대표적 저해제 benzbromarone 50 μM을 처리하여 저해 정도를 비교하는 양성 대조군으로 사용하였다.

2) Transient HEK293-URAT1 세포 시스템에서의 수송활성 저해능 평가

Human embryonic kidney cells (HEK293)은 10% fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μg/ml) 를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, USA)배지를 사용하여 37°C, 50% CO₂ 조건에서 배양하였다. HEK293 세포를 24 well plates에 1.2 × 10⁵ cells/well 의 밀도로 분주 한 다음 24시간 동안 안정화 시킨 후에 URAT1-pcDNA3.1과 lipofectamin 2000 (Invitrogen, CA)를 혼합하여 transfection을 수행 하여 24시간 동안 HEK293 세포에 URAT1을 과발현 시켰다. 배지를 제거 후 pyrazinecarboxylic acid 1 mM 이 함유된 DPBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline)을 처리하여 37°C waterbath에 20분간 pre-incubation 시킨 후 기질인 uric acid과 익지인 추출물 100, 200 및 500 μg/ml 을 가하고 10 분간 반응 시켰다. Ice-cold DPBS로 세척하여 반응을 종료시킨 후, 70% acetonitrile 첨가 하여 세포를 용해시켜 세포 내 축적된 uric acid의 농도는 LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다. 세포내로 유입한 uric acid양은 과발현되지 않은 대조군에 대한 백분율(%)로 표기하였다. URAT1 대표적 저해제 benzbromarone 100 μM 을 처리하여 저해 정도를 비교하는 양성 대조군으로 사용하였다.

3) 세포 생존을 측정

URAT1이 과발현된 HEK293세포에서 익지인 추출물의 세포 생존율에 대한 영향을 조사하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 환원법을 이용하여 측정하였다. URAT1이 과발현된 HEK293세포는 상기에 기술한 방법으로 제작하였으며, 세포에 200, 500 및 1000 μg/ml을 10 분간 처리 후 MTT 염색물질을 가하여 2시간 동안 배양 한 후 세포를 DMSO로 용해시켜 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 정상 대조군 (0 μg/ml, 비처리군) 의 세포생존에

대한 익지인 추출물 처리군의 세포생존 정도를 백분율로 환산하여 세포생존율(%)로 표기 하였다.

5. High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

HPLC 기기는 Waters 1500 Series System, Waters 2998 PDA Detector(Waters, Worcester, MA, USA), Luna C18 (5 μM, 250×4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였으며 분석에 사용된 모든 용매는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 HPLC급 용매를 사용하였다. 이동상으로는 아세트나이트릴과 0.1% phosphoric acid용액을 사용하여 1 ml/min의 유속으로 시료 10 μl를 주입하여 gradient condition으로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 1과 같다. 분석시료는 254 nm에서 크로마토그램을 추출하여 nootkatone 피크 면적을 얻은 다음 표준화합물의 검량 곡선으로부터 함유량을 계산하였다. Nootkatone의 함량 분석은 3회 반복 실험하여 계산하여 평균±표준편차로 나타내었다.

Table 1. Mobile Phase Condition for HPLC-UV Analysis

Time (min)	% A (Acetonitrile)	% B (0.1% phosphoric acid in H ₂ O)
Initial	5	95
40	95	5
41	95	5
43	5	95
45	5	95

6. 통계 처리

각 실험군 결과 값은 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 처리군간 통계적 유의성은 통계프로그램 Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., USA)을 이용하여 ANOVA로 검정한 후, 사후 분석으로 Dunnet's test를 실시하여 p<0.05 이하의 수준에서 유의성이 있다고 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 고요산 동물 및 정상 동물모델에서의 익지인 추출물의 혈청 요산 저하 효과

고요산동물모델에서 혈청 내 요산 농도는 정상대조군과 비교하여 볼 때 고요산동물군에서 유의하게 증가하였다 (p<0.005). 익지인 추출물 50, 100 및 200 mg/kg 농도의 투여는 각각 17.6%, 23.5% 및 34.4%의 요산저하 효과를 보였으며, 특히 200 mg/kg 익지인 추출물을 투여군에서 요산 농도의 유의한 감소를 보였다 (p<0.05, Fig.1A). 양성대조군인 allopurinol 투여군에서도 65.3%의 현저한 요산 농도가 저하가 관찰되었다(p<0.005). 다음으로, 정상동물에서 익지인 추출물의 요산

저하효과를 조사한 결과, 300 mg/kg 농도의 익지인 추출물은 정상대조군과 비교시 49.8%의 요산 농도 저하 효과를 보였으며

($p < 0.01$, Fig.1B), 양성대조군 역시 현저하게 요산 농도를 저하시켰다($p < 0.005$).

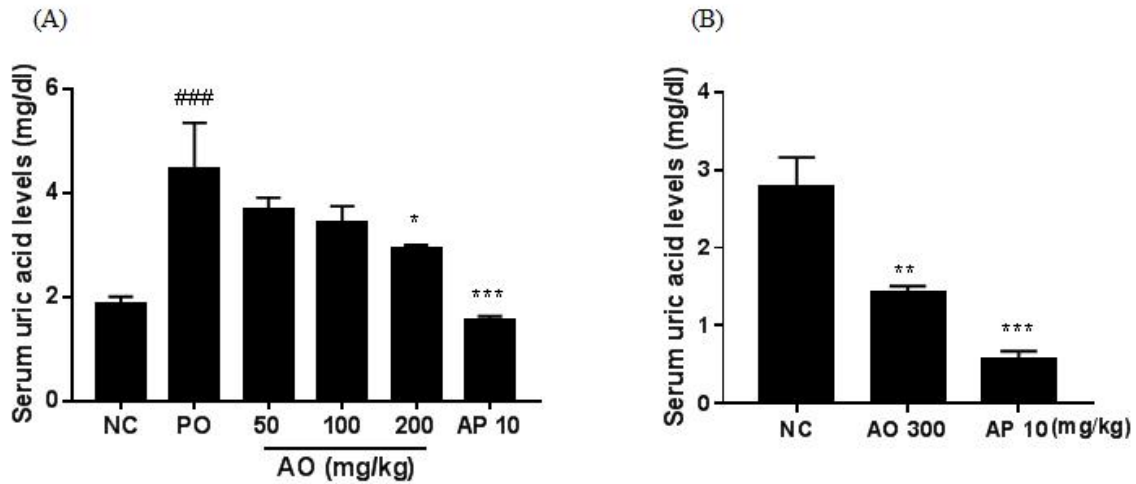


Fig. 1. Effects of AO extract on serum uric acid levels in PO-induced hyperuricemic rats (A) and normal rats (B). PO (150 mg/kg) injection for 1 h was followed by various dose of the AO extract and AP were given to the rats via oral gavage for 5 days. NC, normal control group; PO, potassium oxonate-induced hyperuricemia group; AO: 70% ethanol extract of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; AP 10: 10 mg/kg allopurinol. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=5). ###p<0.005 vs. the NC group; *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.005 vs. the PO group.

2. In vitro XOD활성에 대한 익지인 추출물의 효과

익지인 추출물의 Xanthine생성에 대한 영향을 조사하기 위해 XOD 억제 효능을 탐색하였으며 allopurinol을 대조약물로 사용하여 Table2에 결과를 나타내었다. 익지인 추출물의 XOD 저해활성을 측정한 결과, 125 및 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 저해 활성을 나타내지 않았다.

Table 2. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of AO extract

Samples	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	XOD inhibitory activity (%)
AO	125	-0.68 ± 0.79
	250	0.83 ± 2.06
Allopurinol	10	82.22 ± 0.65

AO : *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* 70% ethanol extract. Data are expressed as the mean \pm SEM.

3. URAT1을 발현하는 oocytes 시스템에서 익지인 추출물의 수송활성 저해능 평가

URAT1을 과발현시킨 oocyte에서 익지인 추출물의 URAT1에 의한 요산 수송 저해 활성을 평가하였다. URAT1을 과발현시킨 대조군에서 oocytes 내의 요산량은 과발현시키지 않은 대조군과 비교 시 유의하게 증가하였으며($p < 0.005$), 익지인 추출물 20, 50, 100과 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도는 URAT1을 과발현시킨 대조군과 비교 시 농도 의존적으로 각각 2.0%, 36.1%($p < 0.05$), 51.2%($p < 0.01$) 및 53.7%($p < 0.005$)의 활성 저해 효과를 보였으며, 익지인 추출물 50, 100과 200 $\mu\text{g/ml}$ 은 유의하게 URAT1에 의한 요산 수송 활성 저해효과를 보였다(Fig.2).

또한, URAT1 수송체의 대표적 저해제인 benzbromarone 50 μM 역시 URAT1 수송활성이 저해되는 것을 확인하였다.

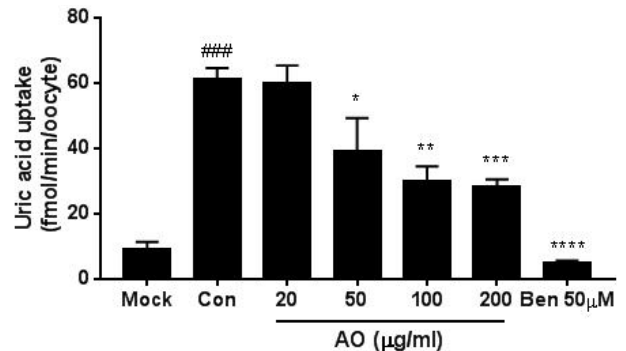


Figure 2. Concentration dependent inhibitory effects of AO extract on uric acid uptake in oocytes expressing URAT1. Oocytes transfected with URAT1 were treated with a at various concentration (0, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) for 1 h. Oocytes were lysed and uric acid concentration was measured by counting the radioactivity in liquid scintillation counter. Mock: nontransfected oocytes; Con: URAT1-transfected oocytes; AO: 70% ethanol extract of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*; Ben: Benzbromarone. Data are expressed as the mean \pm SEM. ###p<0.005 vs. the Mock; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 and ****p<0.001 vs. the Con.

4. URAT1을 발현하는 HEK293 세포에서의 익지인 추출물의 수송활성 저해능 평가

익지인 추출물의 신장세포에서의 URAT1에 의한 수송 저해 활성을 일시적으로 URAT1을 과발현시킨 HEK293세포에서 평가하였다. URAT1을 과발현시킨 대조군에서의 세포내 요산 농도는 과발현시키지 않은 대조군과 비교시 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.005$), 100, 200과 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 익지인 추

출물은 URAT1를 과발현시킨 대조군과 비교 시 각각 35.0%, 50.1%($p < 0.01$), 58.7%($p < 0.01$)의 저해 활성을 보였으며, 200과 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의한 저해 활성이 확인되었다 (Fig. 3A). 게다가 양성대조군 benzbromarone 100 μM 에 의한 URAT1의 유의한 수송 활성 저해 효과가 관찰되었다($p < 0.005$).

5. 세포 생존율에 대한 익지인 추출물의 효과

익지인 추출물의 HEK293-URAT1 세포 독성에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군과 비교 시, 익지인 추출물 100, 200과 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포 생존에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig. 3B).

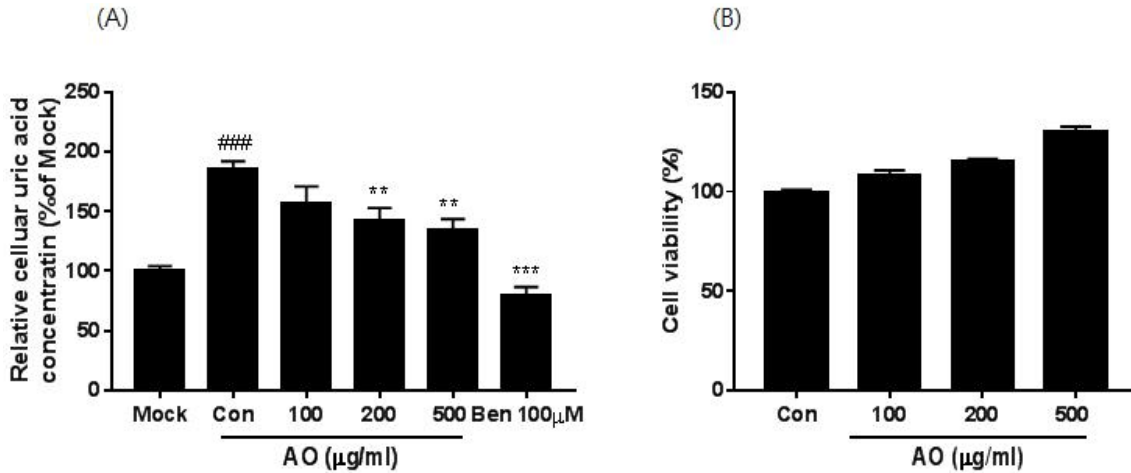


Fig. 3. Inhibitory effects of AO extract on uric acid uptake (A) and cell viability (B) in HEK293 cells expressing URAT1. HEK 293 cells transfected with URAT1 were treated with a at various concentration (0, 100, 200 and 500 $\mu\text{g/ml}$) for 10 min. (A) Uptake of uric acid into cells was analyzed by LC-MS/MS. (B) The cell viability was measured by MTT assay. Mock: nontransfected cells; Con: URAT1-transfected cell; AO: 70% ethanol extract of Alpiniae Oxyphyllae Fructus; Ben: Benzbromarone. Data are expressed as the mean \pm SEM. ### $p < 0.005$ vs. the Mock; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$ vs. the Con.

6. 익지 추출물의 지표성분 함량

익지인 추출물의 HPLC 분석을 통해 nootkatone를 확인하였으며, nootkatone의 함량 $7.08 \pm 0.65 \text{ mg/g}$ 으로 나타났다(Fig. 4).

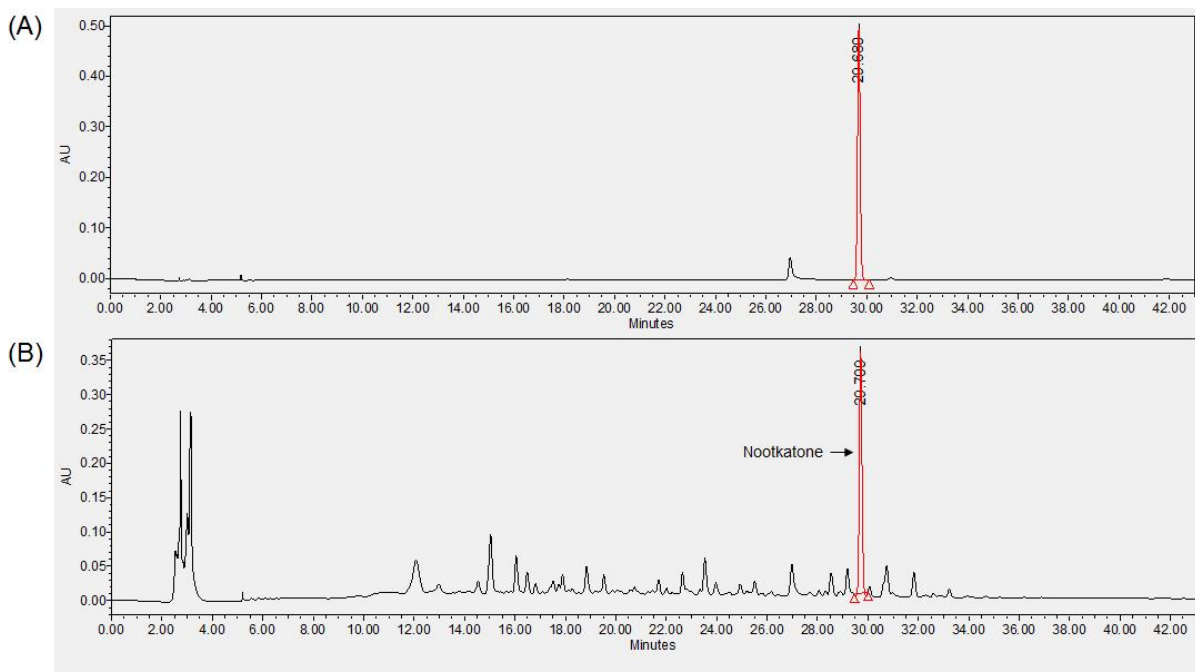


Fig.4. HPLC-UV Chromatogram of Nootkatone standard (A) and AO extract (B). UV peaks of nootkatone was detected at 254 nm.

IV. 고 찰

고요산혈증은 요산이 체내에 과다하게 축적되어 야기되는 질병으로, 통풍을 유발할 수 있다고 알려져 있으며, 최근에는 식생활의 서구화로 인해 고요산혈증 및 통풍 환자가 증가하고 있다고 보고되고 됨에 따라 이들의 질병을 개선할 수 있는 안전한 천연물 소재에 대한 관심이 증가하고 있다^{1,2)}. 따라서, 본 연구에서는 익지인 추출물의 혈청 내 요산 저하 효과 및 작용 기전에 대해 평가하고자 하였다.

익지인 추출물은 고요산동물모델에서 농도의존적으로 혈청 내 요산 농도를 감소시키는 경향을 보였으며 200 mg/kg 농도에서는 유의한 요산 농도의 감소가 관찰되었다. 게다가, 정상동물에서도 익지인 추출물에 의해서 요산 농도가 현저하게 감소되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 익지인 추출물이 혈청 내 요산 농도를 저하시켜 고요산혈증을 개선할 수 있다는 것을 나타낸다. 게다가, 최근 보고에 따르면, 고혈압 환자의 약 20~40%는 고요산혈증이 있고, 통풍 환자의 25~50%의 환자는 고혈압이 있으며^{15,16)}, 고요산혈증은 고혈압과 유의적인 관계가 있음이 보고되었다¹⁷⁾. 또한 고요산혈증 환자에서 만성신부전 발생률이 증가한다고 보고되어 있다¹⁸⁾. 따라서 익지인 추출물의 고요산혈증 저하효과는 통풍 뿐만 아니라 고혈압 및 만성신부전의 예방 및 치료에도 도움이 될 것으로 사료된다.

인체 내의 요산의 농도의 항정성은 요산의 생성과 배설에 의해서 조절된다. 요산의 생성은 주로 간에서 퓨린 대사과정에서 생성되는데, 이 과정에 요산생합성의 촉매반응을 조절하는 효소 XOD가 관여한다고 보고되어 있다. XOD는 hypoxanthine과 xanthine을 요산으로 산화를 촉매하는 역할을 한다. 따라서 XOD 억제제는 요산 생합성을 억제하므로 고요산혈증 및 통풍 치료에 사용될 수 있다^{19,20)}. 또한, 익지인 추출물이 정상동물에서 요산생성 억제제인 allopurinol과 유사하게 혈청 내 요산 농도를 저하시키는 것이 확인되었다. 이러한 사실에 기초하여 익지인 추출물의 XOD활성에 대한 저해 효과를 관찰하였으나, 본 연구에서 익지인 추출물은 XOD 저해 활성이 없음을 확인하였다. 이러한 결과는 익지인 추출물의 혈청 내 요산 저하효과는 XOD 저해 활성을 통한 요산 생성 억제효과가 관여하지 않는 것으로 사료된다.

인체 내에는 생성된 요산을 allanotion으로 분해시키는 효소 uricase가 존재하지 않는 관계로 요산의 항정상태를 유지하기 위해서는 체내의 요산이 배설되어야 하며, 이러한 요산 배설의 70%는 신장의 근위세뇨관에 분포하여 요산의 재흡수를 조절하는 URAT1이라는 선택적 요산 수송단백질에 의해 그 배설이 조절된다²¹⁻²²⁾. 또한, 통풍의 90%는 소변을 통한 요산의 배설 기능 이상으로 발생한다는 보고되어 있다²³⁾. 따라서 본 연구에서는 익지인 추출물이 요산의 배설 기능을 촉진시킬 수 있는지를 평가하고자 URAT1의 수송 저해활성을 측정하였다. 그 결과, 익지인 추출물이 URAT1을 과발현시킨 oocytes와 인간 유래 신장세포주 HEK293세포에서 URAT1에 의한 uric acid의 수송 활성을 저해시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 익지인 추출물의 혈청 내 요산 저하효과는 URAT1 활성 저해를 통한 요산의 재흡수 억제가 관여되어 있음이 사료된다. 그러나 향후 동물모델에서 소변에서의 요산농도 및 신장에서의 수송 단백질 발현에 대한 연구가 추가로 수행될 필요가 있다고

여겨진다.

HPLC 성분 분석 결과를 통해 익지인 추출물에 nootkatone이 주요성분으로 함유되어 있는 것을 확인하였다. Nootkatone의 항염증 효과가 보고되었으나^{24,25)}, XOD활성 혹은 URAT1의 수송활성에 대한 연구는 보고되지 않았다. 향후 nootkatone 및 익지인 성분들에 대한 요산 저하 효과에 대한 연구가 필요하다.

이상의 결과를 살펴볼 때 익지인 추출물은 정상동물 및 고요산동물모델에서 요산 저하 효과를 나타내었으며, 이러한 요산 저하 효과는 요산배설 촉진을 통해 조절되어진다고 사료된다.

V. 결 론

전통적으로 사용된 한약재이면서 식품의 원료로 사용되는 익지인의 추출물의 요산 저하 효과에 대한 조사하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 익지인 추출물은 정상동물 및 고요산동물 모델에서 혈청 내 요산 농도를 유의하게 저하시키는 것을 확인하였다.
2. 익지인 추출물은 요산생성에 관여하는 xanthine oxidase의 저해 활성이 없음을 확인하였다.
3. 익지인 추출물은 요산 재흡수에 관련하는 운송체 URAT1을 과발현하는 oocytes와 HEK293세포에서 농도의존적으로 URAT1에 의한 요산 수송 활성을 저해시키는 것을 관찰하였다.

이상의 결과, 익지인 추출물이 신장에서의 요산의 재흡수를 조절하여 혈청 내 요산 농도를 저하시킬 수 있음을 나타내며 고요산혈증 및 통풍을 개선 위한 한약 처방에 적용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 한국한의학연구원 고유 과제인 '통풍예방 및 개선 건강식품의 효능 및 기전 연구 (K17731)'와 '통풍치료 한의약 기술개발(K17030)'의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Boffetta P, Nordenvall C, Nyren O, Ye W. A prospective study of gout and cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2009 ; 18 : 127-132.
2. Huang J, Wang S, Zhu M, Chen J, Zhu X. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food Chem Toxicol.* 2011 ; 49 : 1943-1947.

3. Dalbeth N, So A. Hyperuricaemia and gout: state of the art and future perspectives. *Ann Rheum Dis*. 2010 ; 69 : 1738–1743.
4. Choi IA, Hong SJ. Updates in the management of gouty arthritis. *The Korean Journal of Medicine*: 2009; 76: 151–162.
5. *Alpinia oxyphylla* Miq. Korean Traditional Knowledge Portal, Available from : URL : <http://www.koreantk.com/ktkp2014/medicine/medicine-view.view?medCd=M0009449>
6. Kim JH, Kim YS, Lee SH, Choi G, Jeong SI, Ju YS. Chemical Components of herbal medicines in Ungok Herbalogy 2nd ed. Jeonju : Woosuk Press, 2016 : 236
7. Park SY. The Relaxation Effects of *Alpinia Oxyphyllae* Fructus on isolated Corpus Cavernosum smooth muscle. *The Korea Journal of Herbology*. 2015 ; 9: 71–79.
8. Kim MS, Lee DC, Hong JE, Chang IS, Cho HY, Kwon YK, Kim HY. Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2000 ; 32 : 949–958
9. Xie Y, Xiao M, Li D, Liu H, Yun F, Wei Y, Sang S, Du G. Anti-diabetic effect of *Alpinia oxyphylla* extract on 57BL/KsJ db-/db- mice. *Exp Ther Med*. 2017 ; 13 : 1321–1328.
10. Ha H, Shim KS, Kim T, Lee CJ, Park JH, Kim HS, Ma JY. Water extract of the fruits of *Alpinia oxyphylla* inhibits osteoclast differentiation and bone loss. *BMC Complement Altern Med*. 2014 ; 14 : 352.
11. Ku BH. Illustrated book of Dongguibogam. Seoul : Minjung Publishing Co. 1993 : 232.
12. Xie BB, Hou L, Guo BL, Huang WH, Yu JG. The compounds from n-butanol fraction of *Alpinia oxyphylla*. *Yao Xue Xue Bao*. 2014 ; 9 : 1569–1573.
13. Noro T, ODA Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S. Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull*. 1983 ; 31 : 3984–3987.
14. Kang HJ, Song IS, Shin HJ, Kim WY, Lee CH, Shim JC, Zhou HH, Lee SS, Shin JG. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. *Drug Metab Dispos*. 2007; 5 : 667–675.
15. Becker MA, Jolly M. Hyperuricemia and associated diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2006 ; 32 : 275–293.
16. Kahn HA, Medalie JH, Neufeld HN, Riss E, Goldbourt U. The incidence of hypertension and associated factors: the Israel ischemic heart disease study. *Am Heart J*. 1972 ; 84 : 171–182.
17. Ward HJ. Uric acid as an independent risk factor in the treatment of hypertension. *Lancet* 1998 ; 352 : 670–671.
18. Tomita M, Mizuno S, Yamanaka H, et al. Does hyperuricemia affect mortality? A prospective cohort study of Japanese male workers. *J Epidemiol* 2000 ; 10 : 403–409.
19. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*. 2010 ; 120 : 1791–1799.
20. Unno T, Sugimoto A, Kakuda T. Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 93 : 391–395.
21. Ahn SO, Ohtomo S, Kiyokawa J, Nakagawa T, Yamane M, Lee KJ, Kim KH, Kim BH, Tanaka J, Kawabe Y, Horiba N. Stronger Uricosuric Effects of the Novel Selective URAT1 Inhibitor UR-1102 Lowered Plasma Urate in Tufted Capuchin Monkeys to a Greater Extent than Benzbromarone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016 ; 357 : 157–66.
22. So A, Thorens B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*. 2010 ; 120 : 1791–1799.
23. Wortmann RL. Gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 ; 14 : 281–286.
24. Choi HJ, Lee JH, Jung YS. (+)-Nootkatone inhibits tumor necrosis factor α /interferon γ -induced production of chemokines in HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 ; 447 : 278–284.
25. Tsoyi K, Jang HJ, Lee YS, Kim YM, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Kwak JH, Lee DU, Chang KC. (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus rotundus* increase survival rates in septic mice due to heme oxygenase-1 induction. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137 : 1311–1317.