

나군대 잎의 약리 효과에 관한 연구

이송득 · 이상훈 · 최수완 · 권원준 · 김일혁*
국립보건안전연구원 생화학약리과, 중앙대학교 약학대학*

Pharmacological Actions of *Crinum folium*

Song Deuk Lee, Sang Hun Lee, Su Wan Choi, Won Jun Kwon and Il Hyuk Kim*

Department of Biochemical Pharmacology, NISR and
*College of Pharmacy, Chung-ang University

Abstract—*Crinum asiaticum* var. *japonicum* is a wild plant growing only in Jeju-island, Korea, and in Japan. The whole part of this plant has been known to have the pharmacological actions such as analgesic, anti-inflammatory, platelet-aggregation inhibitory, antitussive, and expectorant. With these assumed actions, the leaves (*Crinum folium*) of this plant has been used in the folk remedies for arthritis and arthralgia. There is, however, no scientific evidences for the pharmacological actions of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. In the present study, the analgesic, anti-inflammatory, and platelet-aggregation inhibitory actions of *Crinum folium* were evaluated using writhing test, tail-flick test, carrageenin antiedema test, *in vitro* thromboxane B₂ quantitation assay and *in vitro* platelet aggregation test. In order to obtain the partially purified fraction whose pharmacological action is excellent, the methanol extract of *Crinum folium* was fractionated consecutively into four biological fractions such as ether, ethyl acetate, butanol, and water fractions and their pharmacological actions of the fractions were investigated. Putting our results together, *Crinum folium*, especially ethyl acetate fraction was proven to have significant analgesic, anti-inflammatory and platelet-aggregation inhibitory actions by inhibition of prostanoids biosynthesis as one of its mechanism of action.

Keywords—*Crinum asiaticum* var. *japonicum* · *Crinum folium* · ethyl acetate fraction · analgesic and anti-inflammatory actions · platelet aggregation inhibitory action · thromboxane B₂ · prostanoids biosynthesis

나군대(*Crinum asiaticum* var. *japonicum* Baker)는 우리나라 제주도 지방과 일본에만 자생하는 야생 식물로서 전통한방문헌^{1,2)}에 의하면 나군대 잎이 진통, 소염, 혈소판응집억제 작용 및 진해, 거담효과등의 약리작용이 있는 것으로 알려지고 있다. 이에 본 물질이 민간 요법으로 특히 관절통 및 관절염의 치료제로 널리 사용되고 있으나, 실험 및 임상을 통해 본 물질의 약효

에 관한 과학적인 근거를 제공한 연구는 아직까지 없는 실정이다. 이에 민간요법 치료제의 과학화를 위한 기초자료를 제공하고, 천연물로 부터 신약 개발의 가능성을 부여한다는 목적하에 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 나군대 잎을 methanol로 추출한 후, ether, ethyl acetate, butanol 및 water로 순차적으로 추출하여 각각의 분획을 얻은 후,

methanol층 및 각 4개의 분획에 대해서 진통, 소염 효과 및 혈소판응집억제 효과를 평가하였다. 감염 및 여러 다른 요인에 의해 염증을 유발시키는 물질로는 kinin, histamine, serotonin 및 prostaglandins들이 있으며, 특히 prostaglandins (prostaglandin endoperoxides; prostanoids)는 염증시 나타나는 부종, 발적, 체온 상승 및 통증 유발등의 전반적인 염증 제증상과 직접적인 관련이 있을 뿐만 아니라, kinin 등의 다른 염증 유발물질의 작용을 배가시킨다는 점에서 염증반응과 가장 밀접한 물질로 여겨지고 있다¹⁶⁾. 본 연구에서는 세정 혈소판 현탁액을 제조하여 나균대잎 추출액 및 각 분획의 혈소판 응집시 prostaglandins 합성 억제 효과를 평가함으로써 소염효과를 판정하고자 하였는데, 이를 위해 혈소판에서 합성되는 주 prostaglandin인 thromboxane B₂와 전 prostaglandins의 양의 지표로 사용될 수 있는 malondialdehyde (MDA)를 정량 분석하였다. 이와 아울러 혈소판 응집 억제 실험과 *in vivo* 시험법으로 진통효과를 평가할 수 있는 시험법인 writhing test 및 tail-flick test를 실시하였으며, 소염효과를 평가할 수 있는 carageenin antiedema test도 실시하였다.

실험재료 및 방법

나균대잎의 추출 및 fractionation - 나균대잎 11.9 kg을 Fig. 1에서와 같은 방법으로 methanol로 추출한 후(총 980 g) 일부(26.75 g)는 약효 검색을 위하여 남겨 두고, ether, ethyl acetate, butanol 및 water로 순차적으로 추출하여 각각의 분획을 얻었다(Fig. 1). 먼저 나균대잎을 잘게 썰어서 적당량의 methanol을 가하여 끓여 나균대잎의 성분들을 추출한 후 rotatory evaporator(model RE-51, Yamata사)로 methanol은 증발시키고 동결건조하여 분말화하였다. 여기에 뜨거운 물을 가하고 동량의 ether를 가하여 잘 섞은 후 ether층을 취득하여 동결건조하여 이를 나균대잎의 ether분획으로 하였다. 하부 물층에 ethyl acetate를 가하여 같은 방법으로 ethyl acetate분획을 얻었다. 위와 같은 방법으로 butanol분획을 얻었으며 마지막까지 남

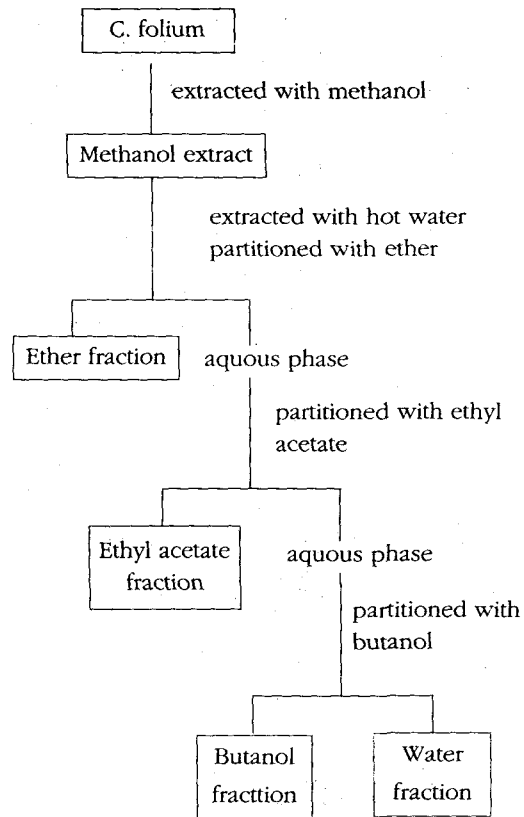


Fig. 1. Extraction and fractionation of *Crinum folium*

은 물층을 water분획으로 하였다.

Writhing test - 20-30g의 ICR 생쥐를 실험 시작전 4-6시간 동안 절식하고 나균대잎 methanol 추출액 및 4개의 분획에 해당하는 균을 각각 10 마리씩으로 설정하였다. 몸무게 10 g 당 건조 분말 10 mg에 해당하는 나균대잎 각 분획을 경구로 투여하고 40분 경과 후 0.6% 초산을 복강으로 투여(10 ml/kg of body weight)하고 10분 후부터 10분간 writhing 횟수를 측정하였다. 이때 나균대잎 methanol추출액 및 4개의 분획은 1% carboxymethyl cellulose 용액 ml당 0.1 g의 농도로 현탁하여 사용하여 투여하였고 대조군은 vehicle인 1% carboxymethyl cellulose용액만을 투여하였다. 또한 나균대잎 각 분획의 진통 효과를 비교 측정하기 위하여 양성대조군을 설정하였는데 양성대조군에는 aspirin (Aspegic^R, aspirin-lysin; 영진약품)을 물에 녹여 몸무게 kg당 300 mg 용량으로 경구 투여하였다.

Tail-flick test - Writhing test와 같이 ICR 마우스 10마리를 한군을 설정하고 Lineberry등³⁾의 방법에 의해 시행하였다. 먼저 각각의 나군대 앞 분획을 투여하기 전에, Tail flick type 821을 사용하여 생쥐를 고정대에 넣고 꼬리를 흠에 놓은 후 복사열을 꼬리에 조사하여 유해한 열자극을 피하기 위해 꼬리를 뜨는 시간을 측정하여 이를 각 나군대 앞 분획군에 대한 대조군의 실험치로 하였다. 다음 같은 생쥐에 writhing test와 같은 양, 같은 경로로 나군대 앞 추출액과 4개의 분획을 투여하고 30분 후에 tail flick시간을 측정하여 각 대조실험치와 비교 분석하였다.

Carrageenin antiedema test - 高木 등⁵⁾의 방법에 따라 130-150 g의 흰쥐를 한군당 5마리로 해서 1% carrageenin을 흰쥐 뒷발가락사이에 피하로 0.1 ml 주사하여 부종을 유발시켰다. 나군대 앞 추출액과 각 분획을 흰쥐 몸무게 10 g당 10 mg의 용량으로 각각 경구 투여하고 1시간 간격으로 5번 뒷발의 용적을 volume difference meter (Ugo Basile Co., Italy)로 측정하였으며 부종증가율⁶⁾을 계산하였다.

혈소판 응집시 혈소판으로부터 생성된 malondialdehyde (MDA) 정량 실험

가. 세정 혈소판 현탁액의 제조

몸무게 2.5 kg 가량의 토끼(New Zealand White 종)를 12시간 절식시킨 후 이정맥(ear vien)을 Xylene으로 확장시켜 혈액을 항혈액응고제(3.8% Sodium citrate, 1/10 vol.)가 포함된 용기에 채취하고 Ishikawa⁴⁾ 등의 방법을 이용하여 세정 혈소판 현탁액을 제조하였다. 채취한 혈액을 실온에서 180 xg로 20분간 원심 분리하여 상청액(platelet rich plasma; PRP)을 얻어 4°C에서 15분 동안 방치하였다. EDTA를 최종 농도가 1 mM되게끔 가한 후 4°C에서 2000 xg로 20분간 원심분리하여 침전물에 동량의 1 mM의 EDTA가 포함된 0.15 M phosphate 완충액(pH 7.4)으로 현탁시켰다. 다시 4°C에서 2000 xg로 15분간 원심분리하여 얻은 침전물에 적당량의 0.15 M phosphate 완충액(pH 7.4)를 가하고 platelet counter (Model S-plus, Coulter electronics사)로 혈소판 수를 측정한 후 혈소판의 농도가 400,000개/ μ l되게끔 완충액으로 희석하여 다음

실험에 사용하였다. 또한 모든 실험은 혈액을 채취한 후 4시간안에 실시하였다.

나. MDA 정량 실험

Thiobarbituric acid 방법⁷⁻⁹⁾에 의해 세정 혈소판 현탁액에서 MDA의 양을 측정하였다. 세정 혈소판 현탁액 0.4 ml에 10% dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 나군대 앞 분획들을 50 μ l 가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 혈소판 응집유도제인 thrombin을 5 U와 0.5 μ M CaCl₂를 가하여 혈소판으로부터 thromboxane A₂를 비롯한 prostaglandin endoperoxides의 생성을 촉진시켰다. 50% trichloroacetic acid 1 ml를 가하여 반응을 중단시킨 후 4°C에서 1500 x g로 5분간 원심분리하여 상청액을 얻었다. 0.6% thiobarbituric acid 1 ml를 가하고 100°C에서 30분간 가열하여 prostaglandin endoperoxides를 MDA로 전환시켰으며 전환된 MDA를 3 ml의 butanol로 추출하여 excitation wavelength 510 nm, emission wavelength 553 nm에서 spectrofluorimeter (SFM 25, Kontron사)로 측정하였다.

혈소판 응집시 혈소판으로부터 생성된 thromboxane B₂ (TxB₂) 정량 실험 - MDA 정량실험에서와 같은 방법으로 세정 혈소판을 제조하여 혈소판 응집을 유도하였다. 30분동안 응집 반응 후, 50% trichloroacetic acid 1 ml를 가하여 반응을 중단하고 원심 분리하여 침전물을 제거한 반응액을 가지고 Fitzpatrick 방법¹⁰⁾에 따라 radioimmunoassay (RIA) 방법으로 혈소판 응집시 생성된 thromboxane B₂를 정량하였다. 이때 thromboxane B₂정량에는 Amersham사의 thromboxane B₂ [³H] scintillation proximity assay (SPA) system (TRK 9519)을 사용하였다. 반응액 1 ml를 methanol과 water로 순차적으로 세척한 AmprepTM (RPN 1903, Amersham사) minicolumn에 적가하고 water, 10% ethanol 및 hexane으로 순차적으로 세척한 후, 5 ml의 methyl formate로 thromboxane B₂만을 용출하였다. 질소 가스로 methyl formate를 날려보낸 후, [³H]-labeled thromboxane B₂ 및 antiserum을 가하여 방사능을 측정하고 10⁹개 혈소판당 thromboxane B₂의 양을 μ g으로 계산하였다.

혈소판 응집 억제 효과 - 토끼 이정맥(ear

vein)에서 혈액(6 vol)을 채취하여 항응고제로서 ACD (acid-citrate-dextrose; 1 vol)를 가한 후 상온에서 $300 \times g$ 로 15분간 원심 분리하여 상청액을 취하고 다시 상온에서 $1100 \times g$ 로 15분간 원심분리 하였다. 상청액을 따라 버리고 침전물을 washing solution I (135mM NaCl/2.7 mM KCl/12 mM NaHCO_3 /0.3 mM NaH_2PO_4 /2.0 mM MgCl_2 /5.5 mM glucose/0.2 mM EGTA/0.35% BSA)으로 현탁한 후, 상온에서 15분간 방치하였다. 상온에서 $1100 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 생긴 침전물을 다시 washing solution II (135 mM NaCl/2.7 mM KCl/12 mM NaHCO_3 /0.3 mM NaH_2PO_4 /2.0 mM MgCl_2 /5.5 mM glucose/0.35% BSA)로 현탁하고 위와 같은 방법으로 원심분리하여 침전물을 세척하였다. 세척된 침전물에 혈소판의 농도가 9×10^8 개/ml 되게끔 suspending solution (135 mM NaCl/2.7 mM KCl/12 mM NaHCO_3 /0.3 mM NaH_2PO_4 /2.0 mM MgCl_2 /5.5 mM glucose/1.33 mM CaCl_2 /0.35% BSA)을 가하여 현탁한 후 실험에 사용하였다. Suspending solution 200 μ l에 세척된 혈소판 현탁액 50 μ l를 가하고 37°C 에서 1분간 반응 후 나군대 및 각 분획 및 이에 대한 control로 vehicle인 10% DMSO 10 μ l를 가하였다. 2분 후 혈소판 응집 유도제인 thrombin을 5 U 가한후, 혈소판 응집 정도를 platelet aggregometer (Lumiaggregometer, Chrono-log사)를 사용하여 light transmission(%) 정도로 평가하였는데 이때 PRP(platelet rich plasma)의 light transmission을 0%로 PPP(platelet poor plasma)의 light transmission을 100%로 하였다.^{11,12)}

실험결과

나군대 잎의 추출 및 분획 - 11.9 kg의 나군대 잎을 methanol로 추출하고 동결건조시켰을 때 980 g의 분말을 얻을 수 있었으며 이를 다시 ether, ethyl acetate, butanol 및 water 분획으로 순차적으로 분획하였을 때 각각의 건조 분말 무게가 207, 6.6, 16.77 및 168.42 g으로 측정되었다.

Writhing test - 대조군의 writhing 횟수의 평

균치가 15.44번인 반면 나군대 잎 methanol추출액을 투여한 군의 평균 writhing 횟수는 8.50번으로 대조군에 비해 44.9%만큼 writhing 빈도가 감소되었다. 또한 모든 나군대 잎 각 분획을 투여한 군에서도 대조군에 비해 writhing 빈도가 유의성있게 감소하였는데, 특히 butanol분획과 ethyl acetate분획을 투여한 군에서의 평균 writhing횟수는 각각 0.4 및 2.38회로 본연구에서 투여한 용량(300 mg/kg of B.W.)의 aspirin보다 훨씬 뛰어난 진통 효과를 보이는 것으로 평가되었다. 또한 ether분획 및 water분획의 진통 효과는 양성대조군에서 사용한 aspirin의 효과와 비슷하였다(Table 1).

Tail-flick test - 각 군을 10마리씩으로 설정하여 나군대 잎의 methanol추출액 및 각 분획을 투여하기 전과 후의 tail-flick 시간을 측정하여 본 약제의 의한 진통 효과를 판정하였다. 그 결과 나군대 잎의 methanol 추출액은 유의성있게 tail-flick시간을 연장시키는 효과가 있었으며, 이들 분획들 중에 water층을 제외한 모든 분획에서 대체로 효과가 있는 것처럼 보였으나, ethyl acetate층에서만 유의성있는 결과를 보였다(Table 2).

Carrageenin antiedema test - 나군대 잎 추출액은 부종을 감소시키는 효과가 뚜렷하지 않았으나, 나군대 잎의 ethyl acetate 분획 및 butanol분획은 뚜렷한 부종 억제 효과를 보여, ethyl acetate를 투여한 군에서는 carrageenin 주사 후 1시간, 2시간 및 3시간에 의미있게 낮은 부종증가율을 보였다. 또한 butanol을 투여한 군에서는 carrageenin 주사 후 2시간, 3시간 및 5시간에 의미있게 부종이 억제되었다(Fig. 2).

혈소판 응집시 혈소판으로 부터 생성된 malondialdehyde (MDA) 정량 실험 - 세정 혈소판 현탁액(혈소판 농도: 5×10^5 개/ μ l)을 제조하여 혈소판 응집시 유출되는 prostaglandin endoperoxides으로 부터 MDA의 양을 측정하였는데, positive control로서 aspirin을 5 μ M 첨가하였을 때 까지 MDA생성량이 현저히 감소하였으나, 나군대 잎 각 분획을 첨가하였을때는 의미있는 결과를 얻지 못했다.

혈소판 응집시 혈소판으로 부터 생성된

Table 1. Analgesic effects of *C. folium* and its fractions in acetic acid writhing test

	writhing frequency (mean±SE)	percent inhibition (%)
Control	15.44 ± 1.30	0
Methanol extract	8.50 ± 1.65*	44.9
Ether fr.	7.77 ± 1.40*	49.7
Ethyl acetate fr.	2.38 ± 1.33*	84.6
Butanol fr.	0.40 ± 0.24*	97.4
water fr.	8.77 ± 1.33*	43.2
Aspirin (300 mg/kg)	8.33 ± 2.64*	46.0

Mice of each group were treated (p/o) with each fraction (10 mg/10 g B.W.) of *C. folium*. Forty minutes later, 0.6% acetic acid(10 ml/kg) was intraperitoneally injected and after then, the measurement of writhing frequencies for 10 min. was carried out.

*Significantly different from control at $p < 0.01$

Table 2. Analgesic effects of *C. folium* and its fractions in tail-flick test

	reaction time (sec)		percent of analgesia (%)
	before (T_0) administration	after (T_1) administration	
Methanol extract	2.76 ± 0.11	4.42 ± 0.32*	22.84 ± 4.20
Ether fr.	2.75 ± 0.28	3.05 ± 0.34	9.88 ± 4.34
Ethyl acetate fr.	3.79 ± 0.24	7.04 ± 0.68*	51.88 ± 11.54
Butanol fr.	2.73 ± 0.20	5.83 ± 1.21	31.66 ± 14.71
water fr.	3.01 ± 0.18	3.10 ± 0.71	1.29 ± 1.78
Aspirin (300 mg/kg)	3.17 ± 0.38	4.54 ± 0.56	21.26 ± 7.13

Values are mean ± SE

Percent of analgesia(%) = $\frac{T_1 - T_0}{T_c - T_0} \times 100$ (T_c : maximal reaction time, cut off time, 10 sec)

*Significantly different from control at $p < 0.05$, statistics was carried out by paired t-test

Thromboxane B₂ (TxB₂) 정량 실험 - 세정 혈소판을 나균대 잎 추출액 및 각 분획과 15분간 37°C에서 반응시킨 후, thrombin을 첨가하여 30분동안 혈소판 응집에 의해 생성된 TxB₂의 양을 측정하여 이를 소염 및 혈소판 응집 억제 효과를 평가하고자 하였다. 나균대 잎 methanol추출액을 10% DMSO에 녹여 추출 분말 0.5 mg에 해당하는 양을 첨가하였을때 10⁹개 혈소판당 TxB₂양의 평균치는 13.69 ug으로서, vehicle인 10% DMSO(최종농도 1%)만을 첨가한 control에서의 평균치 89.98 ug에 비해 TxB₂의 합성이 현저히 감소되었다. 나균대 잎 분획중에서는 ethyl acetate분획과 butanol분획이 비교적 낮은 농도(최종첨가량 0.005 mg)에서도 현저한 TxB₂ 합성

억제 효과(각각 16.23 및 24.48 ug/10⁹ platelet)를 보였다(Fig. 3).

혈소판 응집 억제 효과 - Control의 light transmission이 69%인데 반해 나균대 잎 methanol 추출액의 light transmission은 40%로 나균대 잎이 thrombin에 의한 혈소판 응집을 억제하는 효과가 뚜렷하였다. 또한 나균대 잎의 활성 분획중에서는 ethyl acetate 분획의 혈소판 응집 억제 작용이 가장 뚜렷하였으며(light transmission = 36%) 다른 분획의 혈소판 응집 억제 효과는 비교적 미약하였다(Table 3).

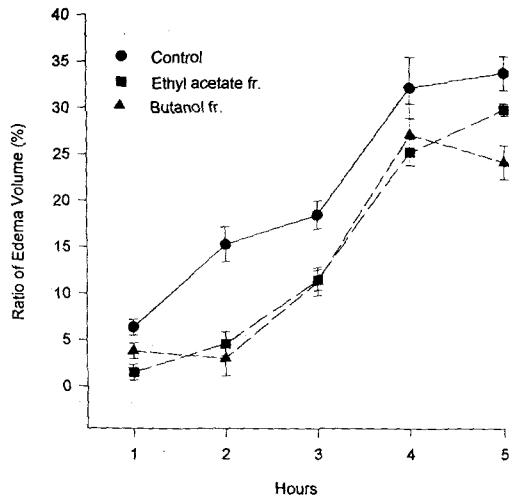


Fig. 2. Anti-inflammatory effects of *C. folium* and its fractions on carrageenin induced edema of rat hind paw.
 Ratio of paw edema volume (%) = $\frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100$ (V_o , original paw volume before injection of carrageenin; V_t , paw volume at t hour after injection of carrageenin).

고 찰

본 연구에서는 나군대 잎이 민간 요법으로 관절통 및 관절염에 사용될때 특히 현저한 치료효과를 보인다는 점을 감안하여 문헌상 나타난 나군대 잎의 여러가지 효과 중에서 진통 및 소염 효과를 실험적으로 확인해 보고자 하였다. 이를 위해 나군대 잎을 methanol로 추출한 후, 이로부터 ether, ethyl acetate, butanol 및 water로 순차적으로 추출하여 각각의 분획을 얻은 후, methanol 추출액 및 각 4개의 분획의 진통, 소염 효과를 평가하였는데, 먼저 *in vivo* 시험법으로 진통효과를 평가할 수 있는 시험법인 writhing test 및 tail-flick test를, 소염 효과를 판정할 수 있는 carrageenin antiedema test를 실시하였으며, 또한 세정 혈소판 현탁액을 제조하여 염증 반응과 깊은 관련이 있는 prostaglandin endoperoxides (prostaglandins; prostanoids)양을 평가 하기 위하여 malondialdehyde (MDA) 및 혈소판의 주 prostanoid인 thromboxane B₂

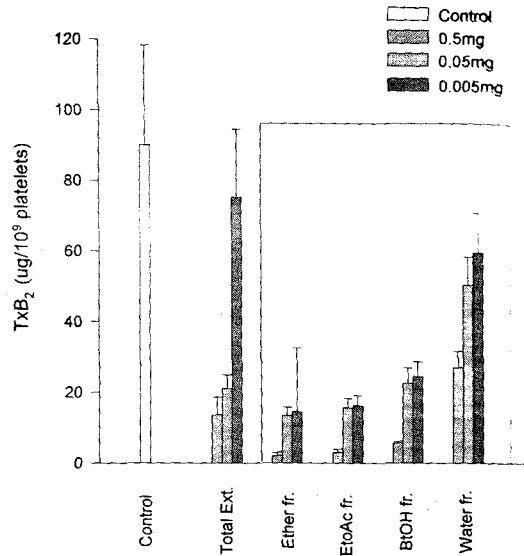


Fig. 3. Effects of *C. folium* and its fractions on platelet thromboxane B₂ production induced by thrombin. After washed platelets were preincubated for 15 min. at 37°C., platelet aggregation was induced by thrombin (5 U) for 30 min. Then, the amounts of TxB₂ were determined by radioimmunoassay(RIA).

를 정량 분석하였다.

감염 및 여러 다른 요인에 의해 염증을 유발시키는 물질로는 kinin, histamine, serotonin 및 prostaglandins들이 있으며, 특히 prostaglandins는 염증시 나타나는 부종, 발적, 체온 상승 및 통증 유발등의 전박적인 염증 제증상과 직접적인 관련이 있을 뿐만 아니라, kinin 등의 다른 염증 유발물질의 작용을 배가시킨다는 점에서 염증반응과 가장 밀접한 물질로 여겨지고 있으며¹⁶⁾, 이에 현재까지 개발된 대부분의 소염제는 prostaglandin을 합성하는 효소인 phospholipase 및 cyclooxygenase의 억제제들이다. 본 연구에서는 세정 혈소판 현탁액을 제조하여 나군대 잎 추출액 및 각 분획의 혈소판 응집시 prostaglandin 합성 억제 효과를 평가함으로써 소염효과를 판정하고자 하였는데, 이를 위해 혈소판에서 합성되는 주 prostaglandin인 thromboxane B₂와 전 prostaglandins의 양의 지표로 사용될

Table 3. Effects of *C. folium* and its fractions on platelet aggregation induced by thrombin

	amount	light transmission(%)
control		69
Methanol extract	(0.1 mg)	40
Ether fr.	(0.1 mg)	57
Ethyl acetate fr.	(0.1 mg)	36
Butanol fr.	(0.1 mg)	58
water fr.	(0.1 mg)	63
Aspirin	(0.1 μ mol)	62

Values are means of duplicates. Aggregation was measured as percent light transmission, using the light transmission of PRP as 0% and that of PPP as 100%; the values shown are the maximal % light transmission within 5 min. after thrombin was added.

수 있는 MDA를 정량 분석하였다. MDA는 lipid peroxide 등의 free radical에 의한 조직 손상을 평가할 수 있는 지표^{13,14,15,17}일 뿐만 아니라, 실험적으로 acid상태에서 열을 가하면 MDA의 정상적인 전구체인 prostaglandin H₂뿐만 아니라 모든 prostaglandin들로부터 MDA가 형성되므로, 이를 측정하면 prostaglandin들의 전량을 평가할 수 있어 염증의 지표로 사용된다 하였다^{4,7,8,18,19}. 본 연구에서는 양성대조로 사용한 aspirin을 5 μ M 첨가하였을 때까지 혈소판으로부터 MDA의 합성이 현저히 감소하였으나, 나군대 및 각 분획을 첨가하였을 때는 의미있는 결과를 얻지 못했다. 이는 나군대 및 methanol 추출액 및 각 분획 모두에서 그 고유의 색깔이 MDA를 thiobarbituric acid로 발색했을 때 나타나는 색깔과 비슷하였을 뿐만 아니라, 이 색깔이 가열하는 과정을 통해 더욱 진해지기 때문이었다. 나군대 및 추출액과 각 분획을 각각 세정 혈소판 현탁액과 15분간 미리 반응시킨 후, thrombin으로 혈소판 응집을 유도하여 혈소판 응집시 혈소판으로부터 합성되는 TxB₂를 정량하였을 때, 나군대 및 methanol추출액을 10% DMSO에 녹여 추출 분말 0.5 mg에 해당하는 양을 첨가하였을 때 혈소판으로부터 TxB₂의 합성량이 vehicle인 10% DMSO(최종농도 1%)를 첨가한 con-

trol(89.93 μ g/109 platelet)에 비해 현저히 감소되어(13.69 μ g/109 platelet) 나군대 및 추출액을 억제하는 성분이 포함되어 있음을 시사하였다. 나군대 및 추출액을 ether, ethyl acetate, butanol 및 water로 분획하여 각 분획의 소염 효과를 평가하였는데, 각 분획을 고농도로 첨가하였을 때는(최종 첨가량; 0.5 mg) ether와 ethyl acetate분획의 TxB₂ 합성억제 효과가 우수하였으며 낮은 농도로 첨가하였을 때는(최종첨가량; 0.005 mg) ethyl acetate분획과 butanol분획의 효과가 현저하여 ethyl acetate분획이 농도에 관계없이 뚜렷한 TxB₂ 합성 억제 효과를 보이는 것으로 나타났다. 또한 혈소판 응집 실험에서 나군대 및 추출액과 ethyl acetate 분획은 혈소판 응집을 직접적으로 억제하는 결과를 보였는데 이런 결과들은 나군대 및 그 분획이 prostaglandins의 합성에 대한 억제제로 작용함으로써 진통, 소염 및 항혈소판응집작용을 나타냄을 입증한다. 본 연구에서는 혈소판의 TxB₂ 합성의 억제 정도를 평가함과 아울러 1% carrageenin으로 흰쥐 뒷발에 부종을 유발한 후 나군대 및 추출액과 각 분획을 경구 투여하여 나군대 및 추출액과 각 분획의 소염 효과를 판정하였는데 그 결과 나군대 및 추출액은 부종을 감소시키는 효과가 뚜렷하지 않았으나, 나군대 및 ethyl acetate 분획 및 butanol분획은 뚜렷한 부종 억제 효과를 보였다. 또한 본 연구에서는 나군대 및 추출액의 소염 효과와 더불어 진통효과를 *in vivo* 실험법인 writhing test와 tail-flick test를 통해 평가하였다. 마약성 및 비마약성 진통제 모두에서 효과가 확실한 실험법인 writhing test에서 나군대 및 추출액은 의미있는 진통 효과를 보였으며, 네개의 분획중에서는 butanol 및 ethyl acetate분획의 진통 효과가 특히 뚜렷하였으며, ether 분획 및 water 분획의 진통 효과는 다소 약해 aspirin을 몸무게 kg당 300 mg을 경구 투여했을 때와 비슷한 진통 효과를 보였다. 마약성 진통제에 특히 우수한 효과를 보이는 tail-flick test에서는 나군대 및 추출액 및 각 분획의 진통효과가 writhing test보다 뚜렷하지 않았으며, 나군대 및 네개 분획중에서 ethyl acetate분획에서만 의미있는 진통 효과를 보였다. 본 연구 결과를 종합하여 볼 때, 나군대

잎의 진통 효과 측정시 tail-flick test보다 writhing test에 더 의미있는 결과를 보인다는 점에서, *in vitro* test에서 나군대 잎이 혈소판 응집을 억제하고 prostaglandins의 합성을 저해한다는 점에서 나군대 잎의 진통 효과는 중추 신경을 억제하여 진통효과를 보이는 마약성 진통제보다는 비마약성 진통제와 같은 기전에 기인한 것으로 여겨진다. 즉, 나군대 잎은 phospholipase 또는 cyclooxygenase 등의 prostaglandin 합성에 관련된 효소의 활성을 억제함으로써 소염 및 혈소판 응집 억제 효과를 나타내는 것으로 보여진다. 또한 나군대 잎을 네개의 분획으로 나누어 각 분획의 진통 소염 효과를 평가하였을 때, 모든 실험에서 정확히 동일한 결과를 보이지는 않았으나 ethyl acetate 분획이 가장 우수한 진통 소염효과를 가지는 것으로 판단되어진다.

본 연구에서는 민간 요법으로 관절통 및 관절염의 치료제로 사용되고 있는 나군대 잎의 진통 소염 효과를 과학적으로 증명하고자 하였으며, 본물질로부터 진통 소염 효과를 가지는 단일 성분을 추출하여 새로운 진통 소염제 개발의 토대를 마련하고자, 네개의 분획으로 분리하여 각 분획의 진통 소염 효과를 판정하였다. 그 결과 water분획을 제외한 세개의 분획에서 진통 소염 효과가 입증되어 나군대 잎의 진통 소염 효과가 단일, 또는 몇몇의 성분에 의한다고는 볼 수 없으나, 나군대 잎으로부터 신약 개발의 가능성은 나군대 잎의 각 분획 특히, 진통 소염 효과가 가장 뚜렷한 ethyl acetate분획의 성분의 분석 및 정제를 통하여 가능 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 민간요법으로 관절통 및 관절염의 치료제로 널리 사용되고 있는 나군대 잎의 진통, 소염 및 항혈소판응집 효과에 대해 과학적인 근거를 제공하고 이로 부터 신약개발의 가능성을 부여하고자, 나군대 잎의 methanol 추출액과 네개의 각 분획으로 writhing test, tail-flick test, carrageenin antiedema test, 혈소판 응집시 생성된 MDA와 TxB_2 의 정량 실험 및 혈소판응집 억제 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 진통 효과를 판정하는 실험법인 writhing test에서 나군대 잎의 methanol추출물은 의미있는 진통 효과를 보였으며, 네개의 분획중에서는 butanol 및 ethyl acetate분획의 진통 효과가 특히 뚜렷하였다.

2. 마약성 진통제에 특히 우수한 효과를 보이는 tail-flick test에서는 나군대 잎 추출액 및 각 분획의 진통효과가 writhing test보다 뚜렷하지 않았으며, 나군대 잎 네개 분획중에서 ethyl acetate분획에서만 의미있는 진통 효과를 보였다.

3. 소염효과를 판정하는 실험인 carrageenin antiedema test에서 나군대 잎의 ethyl acetate분획과 butanol분획은 carrageenin에 의해 유도된 부종을 의미있게 억제하는 결과를 보였다.

4. 나군대 잎 및 각 분획에 대하여 혈소판 응집시 혈소판으로부터 TxB_2 합성의 억제 정도를 평가하였을 때, 나군대잎의 methanol 추출액은 TxB_2 합성을 현저히 억제하여 진통 및 소염효과를 지니는 것으로 사료되며, 나군대 잎 분획중에서는 ethyl acetate 분획이 전반적으로 뚜렷한 TxB_2 합성억제 효과를 보이는 것으로 나타났다.

5. 나군대 잎 methanol 추출액과 ethyl acetate분획은 직접적으로 혈소판 응집을 현저히 억제하는 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼때 나군대잎, 특히 ethyl acetate분획은 prostaglandins의 합성을 억제함으로써 소염, 진통 및 혈소판 응집 억제효과를 나타내는 것으로 사료된다.

(1995년 2월 27일 접수)

참고문헌

1. 宋柱澤: 韓國資原植物, 미도문화사, 1264-1265 (1983).
2. 김재길: 원색천연약물대사전, 남산당, 496 (1984).
3. Lineberry, C.G.: *In Methods in Animal Experimentation*, Vol. VI, Academic Press, 237-262 (1981).
4. Ishikawa, S., Manabe, S. and Wada, O.: Miconazole inhibition of platelet aggregation

- by inhibiting cyclooxygenase, *Biochem. Pharmacology*, **35**(11), 1787-1792 (1986).
5. 高木敬次郎, 原田正: 작약의 약리학적 작용, *藥學雜誌*, **89**, 887-892 (1969).
 6. Winter, C.A. and Flataker, L.: *J. Pharmac. Exp. Ther.* **150**, 165 (1965).
 7. Manabe, S., Wada, O., Matsui, H., Takada, M., Kobayashi, N. and Maekawa, T.: Triphenyltin fluoride *in vitro* inhibition of rabbit platelet collagen-induced aggregation and ATP secretion and Blockage of arachidonic acid mobilization from membrane phospholipids, *Biochem. Pharmacology*, **32**, 1627-1634 (1983).
 8. Clerck, F.D. and Nueten J.M.V.: Platelet-mediated vascular contractions. inhibition by flunarizine, a calcium-entry blocker, *Biochem. Pharmacology*, **32**, 765-771 (1983).
 9. McMillan R.M., MacIntyre, D.E. and Gordon J.L.: Simple, sensitive fluorimetric assay for malondialdehyde production by blood platelets, *Thrombosis Res.*, **11**, 425-428 (1977).
 10. Fitzpatrick, F.A., Gorman, R.R., Guire, J.C., Kelly, R.C., Wynalda, M.A. and Sun, F.F.: A radioimmunoassay for thromboxane B₂, *Anal. Biochem.*, **82**(1), 1-7 (1977).
 11. Detwiler, T.C. and Feinman, R.D.: Kinetics of the thrombin induced release of adenosine triphosphate by platelets. comparison with release of calcium, *Biochemistry* **12**, 2462 (1973).
 12. Feinman, R.D., Lubowsky, J., Charo, I and Zabinski, M.P.: The immunoaggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets, *J. Lab. Clin. Med.*, **90**(1), 125-129 (1977)
 13. Snell, K. and Mullock, B.: *In Biochemical toxicology*, IRL press, 132-151 (1987).
 14. Willmore, L.J. and Rubin, J.J.: Formation and focal brain edema induced by subpial injection of FeCl₂ into rat isocortex, *Brain Res.*, **246**, 113-119 (1982).
 15. Ciuffi, M., Gentilini, G., Franchi-Micheli, S. and Zilletti, L.: Lipid peroxidation induced in vivo by iron carbohydrate complex in the rat brain cortex, *Neurochem. Res.*, **16**(1), 43-49 (1991).
 16. Bowman, W.C. and Rand, M.J.: *In testbook of pharmacology*, 2nd ed. Blackwell scientific publications, **12**, 39-12.40 (1980).
 17. Guidet, B. and Shah, S.V.: Enhanced in vivo H₂O₂ generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure, *Am. J. Physiol.*, **257**, F440-F445 (1989).
 18. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *In Free radicals in biology & medicine*, 2ed, Clarendon press, Oxford, 403 (1989).
 19. 김옥희, 양지선, 이소영, 강석연, 박정식, 이상섭: 8-paradol 및 haloperidol 등 중추신경계 작용 약물을 이용한 약리 시험에 관한 연구, *국립보건안전연구원보*, **2**, 227-240 (1989).