

홍삼추출물과 글루코사민 복합제제의 관절염에 미치는 영향

정춘식¹ · 현진이¹ · 강민희¹ · 심준수 · 손미진 · 정상훈 · 김종훈² · 이광승³ · 김영식*
서울대학교 약학대학/천연물과학연구소, ¹덕성여자대학교 약학대학, ²이우양행, ³농협중앙회 고려인삼창

Anti-arthritic Effect of a New Diet-Supplement Containing Red Ginseng Extract and Glucosamine Complex

Choon Sik Jeong¹, Jin Ee Hyun¹, Min Hee Kang¹, Joon-Soo Sim, Mi Jin Son, Sang Hoon Jung,
Jong Hoon Kim², Kwang-Seong Lee³, and Yeong Shik Kim*

Natural Products Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

¹College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

²EE WOO YANGHAENG Co., Seoul 138-180, Korea

³Insam Processing Center, National Agricultural Cooperative Federation, Geosan-gun, Chungbuk, Korea

Abstract – We evaluated the anti-arthritic effect of a new diet-supplement product containing red ginseng, glucosamine, shark cartilage, ascorbic acid and manganese chloride for the relieving arthritic symptoms. Anti-inflammatory activities of the aqueous extract of red ginseng (250 and 500 mg/kg), glucosamine (240 mg/kg) and shark cartilage (240 mg/kg) were tested individually on vascular permeability and carrageenan-induced paw edema. Glucosamine and shark cartilage showed the inhibition of vascular permeability by 29.6 and 32.9%, respectively. Red ginseng (500 mg/kg) and shark cartilage showed the inhibition of carrageenan-induced paw edema at 0.5, 1, 2 and 3 hr. The supplement (red ginseng mixture: RGM) composed of red ginseng (43.5%), glucosamine (25.0%), shark cartilage (25.0%), ascorbic acid (5.0%) and manganese chloride (1.5%) was prepared and its inhibitory activities including vascular permeability and carrageenan-induced paw edema were comparable to anti-inflammatory drugs such as diclofenac and ibuprofen. It was also tested on adjuvant-induced arthritis in rats as one of chronic arthritic tests and Randall-Selitto assay as an analgesic test. RGM showed the inhibition against the swelling of rat paws induced by *Mycobacterium tuberculosis* at a dose of 1,500 mg/kg. Determination of cytokines of the sera sampled from arthritis-induced animals indicated that RGM increased the levels of interferon- γ and interleukin-6, representing the immunostimulatory effect by red ginseng. RGM treatment moderately reduced the production of NO in RAW 264.7 cells in a dose-dependent manner. Taken together, these results support that RGM can be applicable for the improvement of arthritic symptoms as a new diet-supplement.

Key words – arthritis, red ginseng, glucosamine, shark cartilage, diet-supplement

관절에 일어날 수 있는 흔한 질환으로는 골관절염(osteoarthritis)과 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) 및 다발성 관절염(polyarthritis)이 있다. 골관절염은 동통과 경직으로 인해 중년기 이후 만성적인 무능력의 가장 흔한 원인이며, 기본적인 병리학적 과정은 염증성인 류마티스 관절염과 달리 변성성이다.¹⁾ 일반적으로 류마티스라 하면 만성 류마티스 관절염(chronic rheumatoid arthritis)을 의미하며 이러한 질환은 관절을 중심으로 전신에 분포되어 있는 결합조직에

대한 질환이므로 발병 원인의 규명이 어려운 난치성 질환으로 알려져 있다. 만성 류마티스 관절염의 발병률은 인종 및 지리적 위치에는 차이가 없으나 여자가 남자보다 발병률이 높으며 특히 35세에서 45세 사이에 발병률이 가장 높으나, 나이가 들어감에 따라 남녀차가 감소된다. 활막의 활동성 만성염증으로 수족이 뻣뻣하고 관절부위에 통증, 종창(swelling), 변형(degeneration)이 일어나며 무릎, 손가락 등에 피하결절까지 일으킨다.²⁾ 주원인은 명확하지 않으나, 각종 감염설, 비타민 결핍설, 호르몬의 부조화와 면역학적 인체반응설 등이 제기되어 왔다.³⁾

*교신저자(E-mail) : kims@plaza.snu.ac.kr
(FAX) : 02-765-4768

류마티스성 관절에서 결합조직의 변화는 모세혈관의 손상 및 활세포(synovial cell)의 증식으로 시작되며 이때 결합조직 안쪽으로 림파구(lymphocyte)의 침윤이 생기면서 섬유모세포(fibroblast) 및 대식세포(macrophage) 등이 증가하고 림파구와 단핵구(monocyte)의 세포성 면역반응이 강하게 일어난다. 림파구와 단핵구에서 분비되는 각종 인자들은 다형핵 호중구(polymorphonuclear neutrophil)를 유주시키고 단핵구와 섬유모세포를 더욱 활성화시켜 염증반응을 심화시킨다. 활성화된 단핵구는 탐식작용(phagocytosis)이 증가되고 염증반응의 매개체인 prostaglandin 그리고 plasminogen activator, collagenase, lysosomal enzyme 등을 분비하여 관절부위의 조직을 파괴시킨다. 관절염을 유발하는 cytokines에는 interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor α (TNF- α), granulocyte/macrophage colony stimulating factor, interleukin-6 (IL-6) 등이 주로 대식구나 섬유모세포에서 생산되어 면역반응의 촉발에 관여한다.

인삼 *Panax ginseng* C. A. Meyer (*Panax schinseng* Nees)은 오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 뿌리로, 수 천년동안 동양권에서 여러 질병의 치료에 보조적으로 사용되어져 왔고, 여러 연구에서 인삼의 사포닌이나 추출물을 투여한 만성 염증 동물에서 IL-1 beta나 IL-6의 mRNA 레벨을 감소시키거나⁴⁾ 면역작용을 조절하는데 영향을 주는 것으로 보고된 바 있다.⁵⁻⁶⁾ 그러나, ginsenoside Ro에 대한 항염증 연구에 따르면 ginsenoside Ro는 초산에 의한 혈관투과성 증가를 억제하고 compound 48/80이나 carrageenan으로 유도된 급성 부종을 감소시켰지만, 관절염 모델의 랫트에서는 부종 감소 효과가 없는 것으로 보고된 바 있다.⁷⁾ 홍삼은 6년근 수삼을 찌서 건조시켜 수분 함량 14% 이하가 되도록 가공한 것으로 제조과정 중 갈색화 반응이 촉진되어 농담갈색의 색상을 띠며 단단한 형태로 원형을 유지시킨 인삼이다. 홍삼은 가공과정을 통한 수분감소로 세균과 곰팡이, 미생물의 오염을 막고, 부피와 무게를 감소시켜 저장, 운반이 용이하다. 인삼의 대표적 유효성분인 사포닌 정량방법과 품질관리의 발달로 가공과정에서 사포닌의 분해를 최대한 억제하게 되었고, 사포닌의 maltol, ginsenoside Rh₂ 등 유효성분이 추가로 생성되어지며 특히 홍삼은 항산화 활성⁸⁾ 및 소염작용⁹⁾도 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다. 글루코사민(glucosamine)은 골관절염이나 상해로부터의 손상을 보수하기 위해 필요한 물질을 관절에 제공한다. 특히 글루코사민은 연골의 주 구성성분인 proteoglycan내의 glycosaminoglycan의 전구물질이며, 그 외 소화기, 순환기 내의 기초점막, 관절부위의 활액, 인대, 건을 포함한 신체조직의 대부분을 이루는 물질이다. 상어연골은 회분, 단백질, 탄수화물, 수분, 섬유질, 인 등으로 구성되어 있다. 이 성분은 포

함되어 있는 것으로 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)이 있으며, 이것은 연골에 탄성을 주는 거대한 proteoglycan의 일부이다. 많은 연구에 따르면 약한 골관절염에 아스피린이나 ibuprofen과 같은 비스테로이드성 관절염 치료제와 유사한 정도로 통증을 완화시키고 연골의 퇴행을 늦추는 결과가 보고되었다. 상어연골은 또한 신생혈관 억제작용을 한다고 알려져 있다.¹⁰⁾

현재 류마티스성 관절염의 치료로, 항염과 진통소염제(NSAIDs 등)를 일차적으로 선택하고, 만성화 또는 전신증상의 발생시 항류마티스 제제나 면역억제제(cyclophosphamide, azathioprine, 6-mercaptopurine, chlorambucil, methotrexate)를 사용한다.¹¹⁾ 본 연구에서는 홍삼 물 추출물과 글루코사민 및 상어연골분말 각각에 대하여 일차적으로 항염증 활성과 항관절염 활성을 확인한 후 항산화제인 ascorbic acid와 류마티스 관절염 효능인자인 MnCl₂를 복합하여 제제를 제조한 다음 제제의 항관절염, 면역강화 및 진통 효능이 있는지 동물 실험과 병리조직으로 확인하고 생리활성에 있어서의 다양한 약물활성이 기대되는 기전을 설명하기 위하여 관절염 유발 동물의 혈청 내에 존재하는 IL-6와 interferon- γ (INF- γ)의 수준(level)과 NO의 생성억제력을 정량적으로 분석하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기 - 홍삼은 농협중앙회 고려 인삼창으로부터 제공받아 물 추출 후 동결 건조한 분말을 사용하였으며, 글루코사민, 상어연골분말은 (주)이우양행으로부터 제공받았다. 실험 시 홍삼(250, 500 mg/kg), 글루코사민(240 mg/kg), 상어연골분말(240 mg/kg) 각각의 항염증 효과를 확인 후, 홍삼, 글루코사민, 상어연골과 함께 항산화제인 ascorbic acid와 류마티스 관절염 효능인자인 MnCl₂를 복합하여 만든 제제(Red Ginseng Mixture: RGM)를 사용하였다 (홍삼 물 추출물 43.5%, 글루코사민 25.0%, 상어연골 25.0%, ascorbic acid 5%, MnCl₂ 1.5%).

그 외의 시약으로 carrageenan, complete Freund's adjuvant, diclofenac, zymosan, Evans blue, indomethacin, ibuprofen, lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma Chem.의 제품이었고, gum arabic (Duksan Chemical), carboxymethyl cellulose (CMC, Junsei Chemical)을 사용하였으며, 검체는 식염수에 현탁하여 경구로 투여하였다. Cytokine 분석에 사용한 시약 및 항체들은 Endogen (USA)으로부터 구입하였으며 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

사용한 기기로는 plethysmometer와 analgesymeter는 Ugo Basile (Italy)회사의 제품이고, UV spectrophotometer (Jasco,

Japan), thickness gauge (Mitutoyo Co., Japan)를 사용하였다.

실험동물 - (주)샘타코에서 분양받은 체중 170-180 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 및 체중 25-28 g의 ICR계 웅성 생쥐를 서울대학교 천연물과학연구소 실험동물 사육실에서 2주 이상 사육하여 적응시킨 뒤 실험에 사용하였으며, 사육장은 인공조명에 의하여 조명 시간을 아침 8시부터 저녁 8시까지 12시간으로 조절하였으며 실내 온도는 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

소염작용

초산 유발 생쥐 모세혈관투과성 실험 - Whittle 등의 방법¹²⁾에 따라서 검체가 단백질 친화성 색소인 Evans blue의 모세혈관 투과성에 미치는 영향을 검토하였다. 체중 32-34 g의 웅성 생쥐에 약물을 경구투여 하고, 30분 후에 1% Evans blue 용액 0.3 ml/mouse씩을 꼬리정맥에 주사하였다. 20분 후에 0.6% 아세트산-생리식염수액을 0.1 ml/10 g씩 복강 내 주사하여, 혈관 투과성을 증대 시키고, 20분 후 복강 내부를 10 ml의 생리식염수액으로 씻은 다음 채취하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 610 nm 자외선 흡수 스펙트럼 하에서 혈관 투과성의 정도를 분석 하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 경구투여하여 비교 검정하였다.

Carrageenan 유발 생쥐 부종 실험 - Winter 등의 방법¹³⁾에 따라서 생쥐에 carrageenan에 의해 유발된 부종 억제 실험을 실시하였다. 32-34 g 웅성 생쥐를 한 군으로 하여 뒷 발바닥에 1% carrageenan 0.03 ml를 피하주사하여 부종을 유발시키고, 검체는 carrageenan 주사 30분 전에 경구투여 하였다. Carrageenan 주사 후부터 일정시간 간격으로 부종의 용적을 thickness gauge로 측정하는 다음, 주사 전의 용적을 기준으로 하여 부종 증가분(유발 후 뒷발 용적-유발 전의 뒷발 용적)과 증가율((유발 후 뒷발 용적-유발 전의 뒷발 용적)/유발 전의 뒷발 용적 $\times 100$)을 계산하여 부종 억제 정도를 검정하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 경구투여하여 비교 검정하였다.

항관절염 실험

Adjuvant 유발 흰쥐 관절염 실험 - 체중 180-220 g 웅성 흰쥐 8마리를 한 군으로 하여 Claude 등의 방법¹⁴⁾에 따라 adjuvant 유발 관절염 실험을 실시하였다. 0.1 ml/rat의 complete Freund's adjuvant를 흰쥐의 오른쪽 뒷 발바닥에 피하주사 하였고, 5, 8, 12, 15 및 18일 째 되는 날 뒷발 용적을 plethysmometer를 이용하여 측정하였으며, 검체는 adjuvant를 투여한 날부터 10일간 투여하였다. 대조약물로는 20 mg/kg의 diclofenac을 사용하였다.

진통실험

Randall-Selitto assay - 진통실험은 체중 180-220 g의 웅성 흰쥐 8마리를 한 군으로 하여 Randall 및 Selitto¹⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 이 방법은 염증부위의 동통에 대한 감수성을 증대시켜 그 증대된 감수성이 진통제에 의해 억제되는 것에 기초한 것이다. 즉, 흰쥐를 하룻밤 절식시킨 뒤, analgesymeter를 이용하여 300 g의 압력에도 반응하지 않는 흰쥐를 먼저 제외시킨 후, 그 후 20% brewer's yeast-생리식염수 현탁액 0.1 ml씩을 흰쥐의 발바닥에 피하주사 하여 염증을 유발 시키고, 2시간 후에 검체를 투여한 다음, 일정시간 후에 analgesymeter로 동통역치(threshold, g으로 표시)를 측정하였다. 동통역치는 흰쥐의 발바닥에 16 g/sec의 속도로 서서히 압력을 가하여, 흰쥐가 발을 빼려고 하거나 아파서 몸을 뒤틀 때를 동통반응으로 하였다. 진통작용은 대조군 동통역치에 대한 %를 구함으로써 나타내었다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 사용하였다.

Cytokines 분석 - Adjuvant 유발 관절염 실험 3주째에 혈액을 채취하여 실온에서 응고시키고 4°C 에서 overnight 한 후 2,000 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 측정 시까지 검체는 영하 80°C 에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 혈청 내의 IL-6와 INF- γ 의 양을 효소면역법(Enzyme-Linked Immunosorbant Assay)으로 정량하였다. 정제된 IL-6 (or INF- γ) 코팅 항체를 4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 PBS (pH 7.4)에 희석하였고, 각각의 96-well microplate에 100 μl 씩 첨가하였다. 96-well을 실온($20-25^\circ\text{C}$)에서 overnight 배양하였고, 각각의 well에 있는 코팅 용액을 완전히 제거한 후 분석 용액(4% BSA in PBS, pH 7.4)을 200 $\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 세척 용액(50 mM Tris, 0.2% Tween-20, pH 8)으로 well을 3번 세척하고 물기를 완전히 제거한 후 표준농도의 IL-6(or INF- γ)와 분석할 혈청을 각각 50 $\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하였다. 1시간 동안 실온에서 배양한 후 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 로 분석용액에 희석한 바이오틴이 결합된 검출 항체(biotin-labelled detection antibody)를 각각 50 μl 씩 첨가하고, 실온에서 다시 반응시켰다. 1시간 후 세척 용액으로 3번 세척하고, 완전히 물기를 제거한 후 분석 용액에 1:8000으로 희석한 HRP-conjugated streptavidin을 100 $\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하였다. 96-well을 30분 동안 실온에서 배양하고, 세척 용액으로 3번 세척한 후 물기를 완전히 제거하였다. TMB 기질 용액을 100 $\mu\text{l/well}$ 씩 첨가하고, 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 100 $\mu\text{l/well}$ 의 반응 정지액(0.18 M H_2SO_4)을 각각 첨가한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 혈청 내의 IL-6와 INF- γ 의 양을 분석하였다.

NO 생성에 미치는 영향 - RGM의 항염활성을 확인하기

위해 NO 생성 억제 실험을 수행하였다. 실험에 사용되는 세포로는 생쥐유래 대식세포 RAW 264.7 세포주(ATCC)를 사용하였으며, DMEM 배지를 사용하여 2×10^5 세포수/ml 농도로 24웰 플레이트에 각각 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 하루 동안 세포를 배양한 후 RGM을 1, 10 및 50 µg/ml 농도로 처리한 후 2시간 후에 LPS를 1 µg/ml 농도로 처리하여 22시간 동안 배양하였다. 산화질소 생성 억제 물질인 indomethacin을 (30 µM) 농도로 처리하여 양성 대조군으로 사용하였고, LPS만 처리한 것을 음성 대조군으로 사용하였다. 생쥐유래 대식세포 RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 형태로 측정하였다. 구체적으로, 배양한 세포의 상등액 100 µl에 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphthylethylenediamine-HCl, 5% (v/v) phosphoric acid] 100 µl를 혼합하여 96 웰 플레이트에 분주한 후 10분 동안 반응시켜 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Carbon clearance test - 검체의 면역력 강화여부를 확인하기 위해 carbon clearance 실험은 Wagner 등의 방법¹⁶⁾을 부분적으로 개변하여 수행하였다. 32-36 g의 웅성생쥐 10마리를 한 군으로 하여 검체는 3일간 하루에 한 번, 실험 30분 전에 투여하고 실험을 실시하였다. 생쥐에 carbon suspension (1% gelatin을 포함한 PBS에 rotiring ink를 8배 희석) 10 ul/g(b.w.)의 용량으로 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 정맥 주사 후 3, 6, 9, 12분이 되는 때에 안와정맥으로부터 채혈하여, 혈액 20 µl를 0.1% sodium carbonate 1.5 ml에 희석한 다음 UV spectrophotometer 660 nm에서 optical density를 측정하였다. 흡광도의 -log E 값을 구하여, 검체 투여군(RCtr)의 대조군(RCc)에 대한 regression coefficient ratio (RCR=RCtr/ RCc)를 구하였다. 대조약물로는 50 mg/kg의 zymosan을 사용하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 계산하였다. 각 군 간의 유의성 검정은 Student's t-test를 사용하였고, p값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

초산 유발 생쥐 모세혈관 투과성에 대한 효과 - 홍삼(250, 500 mg/kg), 글루코사민(240 mg/kg), 상어연골분말(240 mg/kg), 각각의 초산유발 생쥐 모세혈관 투과성에 대한 영향을 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 모세혈관 투과성에 대하여 각 검체는 유의성 있는 억제 작용을 나타내지는 않았으나 대조군 84.5 µg/mouse 를 나타낸 것에 비하

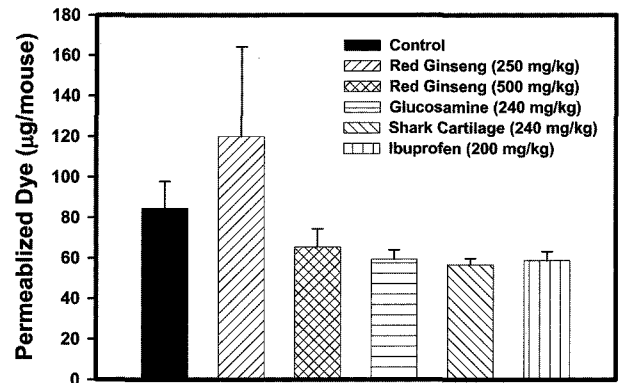


Fig. 1. Effect of red ginseng, glucosamine, and shark cartilage on vascular permeability in mice (n=5).

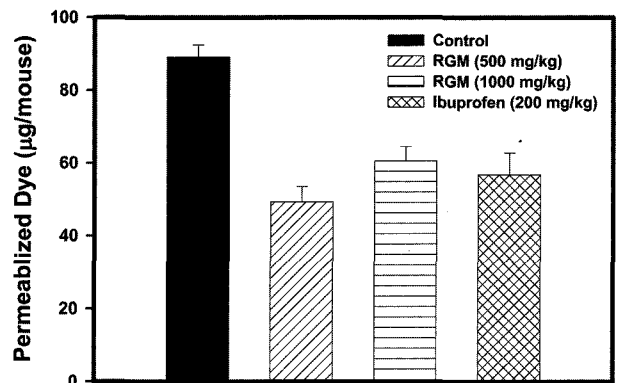


Fig. 2. Effect of red ginseng mixture on vascular permeability in mice (n=8).

여 글루코사민과 상어연골분말 240 mg/kg의 용량에서 각각 59.5과 56.7 µg/mouse 를 나타내어 29.6 및 32.9%의 저해 효과를 나타내었으며 대조약물인 ibuprofen 군은 58.8 µg/mouse로 30.4%의 저해 효과를 나타내었다. 제제 RGM 500, 1000 mg/kg을 투여한 결과 각각 49.3 µg/mouse, 60.6 µg/mouse의 투과력을 보여 44.6%, 32.0%의 저해작용을 보여주었다(Fig. 2).

Carrageenan 유발 생쥐 부종에 대한 효과 - 홍삼(250, 500 mg/kg), 글루코사민(240 mg/kg), 상어연골분말(240 mg/kg), 각각의 carrageenan 유발 생쥐 부종실험에 대한 영향을 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 홍삼 500 mg/kg 투여 시 30분, 1, 2, 3시간에 대조군과 비교하여 각각 19.5, 29.1, 13.0, 20.3%의 지속적인 부종억제 효과를 나타내었다. 상어연골분말도 30분, 1, 2시간에 12.2, 4.5, 6.8%의 억제작용을 나타내었으며, 3시간에는 30.8%의 억제효과를 나타내었다. 대조약물인 Ibuprofen은 3시간째에 37.9%의 억제효과를 나타내었다. 제제 RGM 500, 1000 mg/kg을 투여한 결과 모두 3시간이 경과되면서 부종이 대조군에 비하여 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 3시간 대에 있어서 RGM 500 mg/

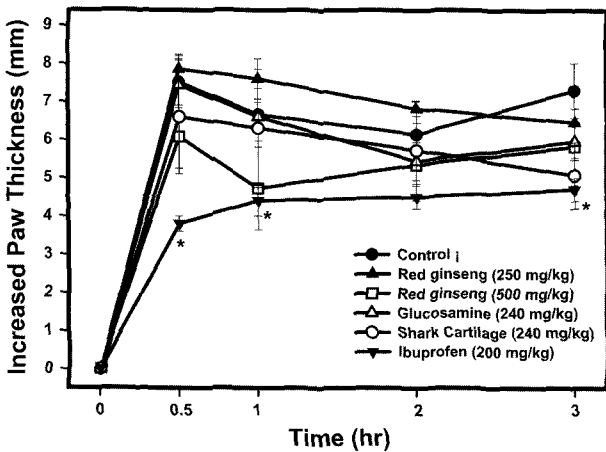


Fig. 3. Effect of red ginseng, glucosamine, and shark cartilage on carrageenan-induced paw edema in mice (n=5). * $p < 0.05$; significantly different from the control group.

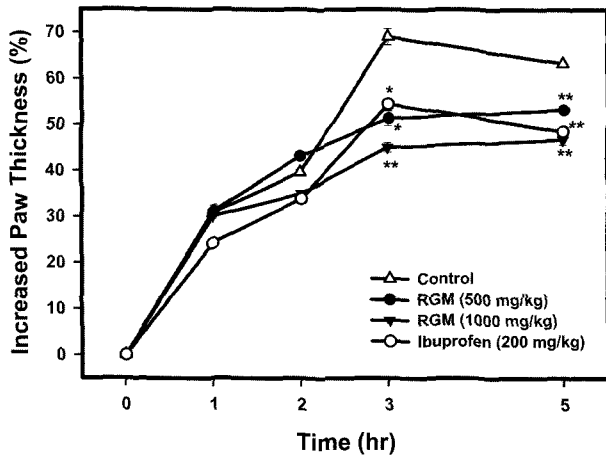


Fig. 4. Effect of red ginseng mixture on carrageenan-induced paw edema in mice (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from the control group.

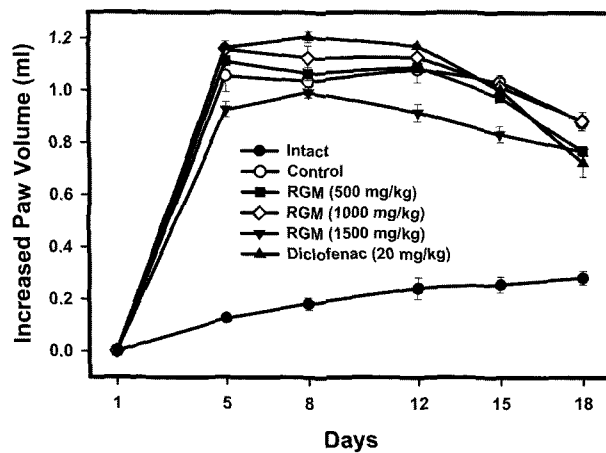


Fig. 5. Effect of red ginseng mixture on adjuvant-induced arthritis in rats (n≥8).

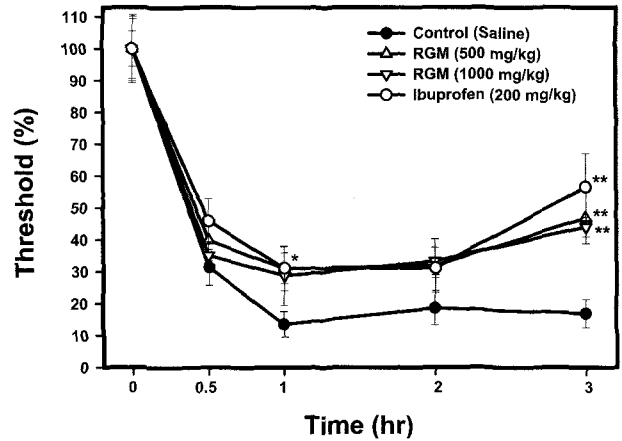


Fig. 6. Effect of red ginseng mixture on Randall-Selitto assay in rats (n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from the control group. The percentage increase in pain threshold was calculated by subtracting the applied force of saline from the applied force of the sample group which was divided by the applied force of saline.

kg은 52% RGM 1,000 mg/kg은 45% 증가하여 대조군에 비해 제제 RGM이 부종을 완화시킬 수 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

Adjuvant 유발 흰쥐 관절염에 대한 효과 - 제제 RGM의 adjuvant 유발 흰쥐 관절염에 대한 효과 시험을 실시한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 제제 RGM 1,500 mg/kg 용량으로 10일간 투여한 경우, 5일째에 14.3%, 12일째 15.1%, 15일째 17.5% 및 18일째에 13.3%의 억제율을 나타냄으로써 대조군에 비하여 지속적으로 관절염 억제 효과를 나타내었다. 반면에 대조약물인 diclofenac 투여군은 18일째에 16.7% 억제율을 나타내었다.

진통시험에 대한 효과 - 제제 RGM의 진통효과 및 지속 여부를 확인하기 위하여 Randall-Selitto assay를 실시한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 대조군은 yeast 주사 후 30분, 1, 2, 3시간째 까지 동통 역치가 꾸준히 감소하였던 반면 용량간의 차이는 나타나지 않았으며 RGM 500 mg/kg 투여 시 30분, 1, 2, 3시간에 각각 33.3, 63.6, 45.2 및 70.5%의 진통효과를, 1,000 mg/kg 투여 시 1, 2, 3시간에 각각 61.3, 47.1 및 61.1%의 진통효과를 나타내었다. 특히 RGM 500 mg/kg은 1시간 및 2시간에 대조 약물인 ibuprofen 200 mg/kg과 거의 유사한 진통 효과를 보였다.

Cytokines 분석 - 제제 RGM의 작용기전을 규명하기 위해 cytokines인 IL-6와 INF- γ 의 분석을 실시한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. RGM 투여군의 경우 용량 의존적인 IL-6와 INF- γ 생성의 증가를 보여주었고, 특히 RGM 1,000 및 1,500 mg/kg을 투여하였을 때 관절염 대조군의 수치에 비해 통계학적으로 유의적인 차이를 나타냈다.

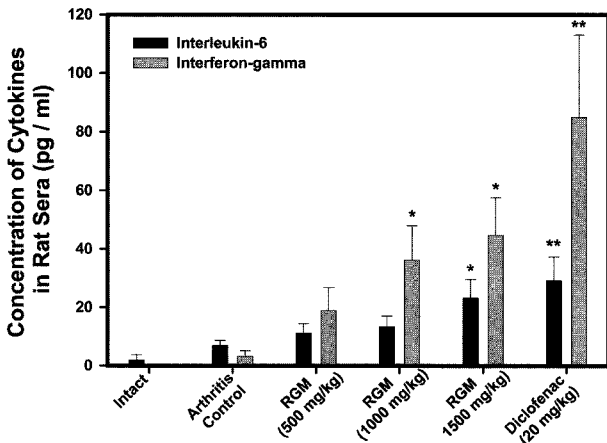


Fig. 7. Production of IL-6 and INF- γ in sera sampled from rat (n \geq 5). * p <0.05, ** p <0.01; significantly different from the control group.

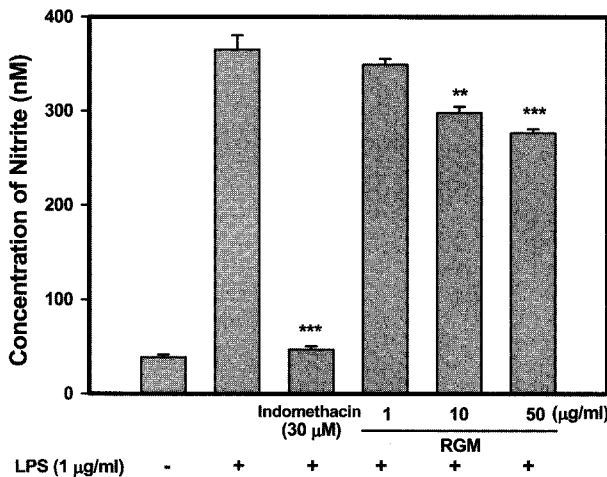


Fig. 8. Production of nitric oxide in RAW264.7 cells (n=3).

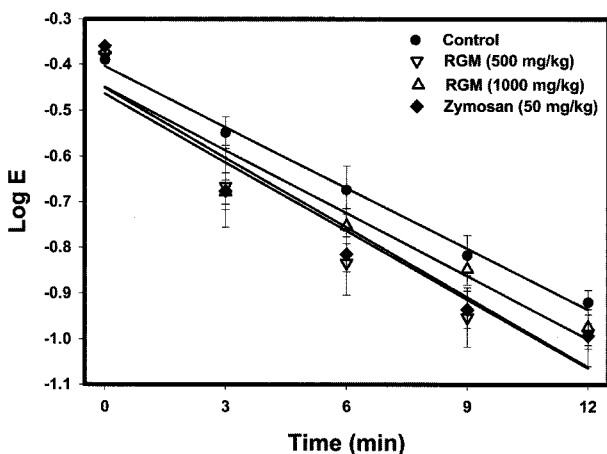


Fig. 9. Effect of red ginseng mixture (RGM) on carbon clearance in mice (n \geq 8). Regression coefficient ratio (RCtr/RCc): RGM 500 mg/kg, 1.13, active; RGM 1,000 mg/kg, 1.04, active; zymosan 50 mg/kg, 1.15, active.

NO 생성 - RAW 264.7 세포에 LPS 단독으로 처리한 경우 생성된 NO의 양이 440 nM 정도로 아주 많은 양이 생성된 반면, 양성 대조군인 indomethacin (30 μ M) 및 RGM (1, 10, 50 μ g/ml)을 처리한 경우 생성된 산화질소의 양이 유의성 있게 감소하였다. 또한, 홍삼 추출물의 농도가 증가함에 따라 산화질소의 생성이 억제되었다(Fig. 8). 또한 위의 세 용량의 투여군에서 세포 독성이 나타나지 않았다.

Carbon clearance test - 제제 RGM의 면역 증강작용을 확인하기 위하여 carbon clearance test를 실시한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 제제 RGM 500 및 1,000 mg/kg 투여시(RCtr) 대조군(RCc)에 대한 regression coefficient가 1.13 및 1.04로 나타남으로써 면역 증강작용이 확인되었다. 대조 약물인 zymosan의 regression coefficient는 1.15였다.

고찰

홍삼 물 추출물과 글루코사민, 상어연골 각각에 대하여 일차적으로 항염증 활성을 확인한 후, 홍삼추출물, 항산화제인 ascorbic acid와 류마티스 관절염 효능인자인 MnCl₂을 첨가하여 항관절염 제제를 제조한 후 제제의 항관절염, 면역강화 및 진통 효능이 있는지 동물실험과 병리조직으로 확인하고, 생리활성에 있어서의 다양한 약물활성이 기대되는 기전을 설명하기 위하여 cytokines 의 *in vitro* 분석을 실시하였다. 염증(inflammation)은 침해자극으로부터 시작하여 치유에 이르는 반응으로 조직 장애에 대한 방어 및 회복을 위한 목적 반응이다. 염증의 4가지 주요한 증상은 발적, 종창, 열감, 동통이라고 할 수 있다. 염증의 원인으로는 물리적 자극, 화학적 자극과 같은 외인적 인자나 각종 병원성 미생물에 의한 감염과 이종항원의 감염에 의한 알레르기 반응 등이 있다.

염증 부중에 있어서 모세혈관투과성이 항진되는 것은 혈장성분이 혈관 외로 누출하는 것에 의해 일어나는 증상으로 염증의 초기단계인 모세혈관투과성에 미치는 작용에 의하여 항염증 효과를 검증한다. 따라서 혈관투과성 항진의 염증병태모델의 작성을 위하여 기염제로써 acetic acid를 투여하고, 투과성 항진의 지표로 복강 내로 유출하는 Evans blue의 색소량을 지표로 하였다. 홍삼, 글루코사민, 상어연골분말 각각 및 RGM의 초산유발 생쥐 모세혈관 투과성에 대한 영향을 실험한 결과, 각 검체는 대조군과 비교하여 글루코사민과 상어연골 각각 29.6 및 32.9%의 억제율로, 대조 약물인 ibuprofen 투여군보다 유사한 효과를 나타내었다. Carrageenan은 해조류로부터 얻을 수 있는 sulfated polygalactan으로, 특히 λ -carrageenan은 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 급만성 염증을 일으키는 특성을 가지

고 있으며,¹⁷⁾ plasmin을 활성화시켜 kinin의 생성을 항진시키는 특성이 있다. 홍삼, 글루코사민, 상어연골 각각 및 RGM의 carrageenan 유발 흰쥐 부종실험에 대한 영향을 실험한 결과, 홍삼 투여시 30분, 1, 2, 3시간에 대조군과 비교하여 지속적인 부종억제 효과를 나타내었으며, 상어연골분말도 30분, 1, 2, 3시간에 부종 억제작용을 나타내었다. 또한 제제 RGM의 500, 1,000 mg/kg에서 부종이 완화됨을 확인하였다.

Pearson 등¹⁸⁾의 보고에 따르면, 만성 염증 유발에 사용한 Freund's complete adjuvant 시약은 Mycobacterium tuberculosis의 사균과 기타 혼합물로 이루어진 것으로 생체 내에서 항원·항체반응에 의한 지연형 allergy를 유발함으로써 만성관절류머티즘 또는 베체트증과 같은 만성 관절염을 유발시킨다고 하였다. 또한 실험적 염증 중에서 비교적 만성적 경과를 취하고 그 발현기전에 면역계가 관여하는 것이 인정되고 있는 것이 흰쥐 adjuvant 유발 관절염이다. 본 증의 증상이나 병리학적 소견에서 보면 사람의 류마티스제 평가에 많이 이용되고 있다.¹⁹⁾ 제제 RGM에서의 adjuvant 유발 흰쥐 관절염에 대한 효과 시험을 실시한 결과, 5일째에 14.3%, 12일째에 15.1%, 15일째에 17.5% 및 18일째에 13.3%의 억제율을 나타냄으로써 대조군에 비하여 지속적으로 관절염 억제효과를 나타내었으며 이는 면역증강의 결과와 일치함이라 할 수 있다.

또한 이 실험을 통한 효과를 병리 조직학적으로 확인한 관절염 유발군의 관절 부위의 연골 손상과 연골의 밀도의 감소에 비해 제제 RGM 500 mg/kg, 1000 mg/kg 투여군의 경우 정상조직과 비교 시 조직학적 변화가 거의 없거나 매우 낮음을 알 수 있었다. 특히 RGM 1500 mg/kg 투여군의 정상조직과 차이가 없었다(결과 미제시).

진통실험의 대표적인 예 라고 할 수 있는 Randall-Selitto 법은 소염성 진통제에서 마약성 진통제까지 넓게 적용시킬 수 있는데, 마약성 진통제에서는 정상발과 염증발, 양쪽의 역치를 모두 상승시키지만, 말초에 작용점을 가지는 소염성 진통제는 염증발의 동통역치만을 상승시킨다. 제제 RGM의 진통효과를 확인하기 위하여 Randall-Selitto 시험 결과 RGM 500 mg/kg 투여 시 30분, 1, 2, 3시간에 진통효과를, 1,000 mg/kg 투여 시 1, 2, 3시간에 진통 효과를 나타내었으며, 특히 RGM 500 mg/kg은 1시간 및 2시간에 대조 약물인 ibuprofen 200 mg/kg 과 거의 유사한 진통 효과를 나타내었다. 실험 시 효모에 의해 발생하는 검체 투여군에서 발바닥의 부종이 육안으로 확인하기에도 현저히 감소한 바, 항염증 작용을 통한 진통효과인 것으로 간주된다.

일반적으로 염증반응의 억제에 있어서 cytokine의 증가에 대해서는 홍삼추출물의 면역증강에 기인하는 것으로 보인

다. 이러한 면역증강의 in vivo 결과로서 제제 RGM의 면역증강작용을 확인하기 위하여 carbon clearance test를 실시한 결과, RGM 500 및 1,000 mg/kg 투여 시 대조군에 대한 regression coefficient가 1.13 및 1.04로 나타남으로써 면역증강작용이 확인되었다. 면역세포들 중에서 macrophage는 항원의 존재 시 탐식작용 및 cytokine의 생성 및 염증반응을 매개함으로써 면역계에서 가장 중요한 역할을 하고 있다.²⁰⁾ RGM 처리시 indomethacin보다는 약하지만 macrophage 세포주인 RAW 세포에서 염증반응의 중요한 인자인 NO의 생성을 농도의존성으로 유의성 있게 억제함은 RGM이 염증반응을 조절할 수 있음을 보여주고 있다.

결론적으로, 항관절염 제제인 RGM의 항관절염 효과와 진통 효능이 확인되었으며 면역강화활성을 확인함으로써 홍삼을 주재료로 하는 관절보호 및 진통소염제의 개발가능성을 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Govan, A. D. T., Macfarlane, P. S., and Callander, R. (1991) Pathology Illustrated 3rd ed, 811-821, Churchill Livingstone, London.
- 김창중(1991) 병태생리학, 664-667. 한림상사, 서울.
- Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guideline (1996). *Arthritis Rheum.* **39**(5): 713-722.
- Yu, S. C. and Li, X. Y. (2000) Effect of ginsenoside on IL-1 beta and IL-6 mRNA expression in hippocampal neurons in chronic inflammation model of aged rats. *Acta Pharmacol. Sinica* **21**: 915-918.
- Sonoda, Y., Kasahara, T., Mukaida, N., Shimizu, N., Tomoda, M., and Takeda, T. (1998) Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of Panax ginseng. *Immunopharmacology* **38**: 287-294.
- Cabral de Oliveira, A. C., Perez, A. C., Merino, G., Prieto, J. G., and Alvarez, A. I (2001) Protective effects of Panax ginseng on muscle injury and inflammation after eccentric exercise. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **130**: 369-377.
- Matsuda, H., Samukawa, K., and Kubo, M. (1990) Anti-inflammatory activity of ginsenoside Ro. *Planta Med.* **56**(1): 19-23.
- 권용훈, 김경현, 전철, 성금수, 장재철(2000) 홍삼 추출물 투여가 생쥐간에서 항산화 효소 활성과 지질 과산화에 미치는 효과. *고려인삼학회지*, **24**(1): 29-34.
- 위재준, 김시관, 성노현, 황석연, 정화숙 (1999) TCDD 투여로 급성독성을 유도한 웅성 기니피크에 있어 홍삼의 방어 효과에 대한 병리 조직학적 연구. *고려인삼학회지*, **23**(4): 222-229.
- Lee, A. and Langer, R. (1983) Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis. *Science* **221**(4616): 1185-

- 1187.
11. 김호연(1996) 류마티스 관절염 치료의 최근 경향. *Korean J. Med.* **51**: 271-279.
 12. Whittle, B. A. (1964) The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**: 246-253.
 13. Winter, C. A., Risley, E. A., and Nuss, G. W. (1962) Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 544-547.
 14. Claude, V. W., Lois, A. L., and Marvin, D. S. (1969) Comparative bioassay of drugs in adjuvant-induced arthritis in rats: flufenamic acid, mefenamic acid, and phenylbutazone. *Arthritis Rheum.* **12**: 472-482.
 15. Randall, L. O. and Selitto, J. J. (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **111**(4): 409-419.
 16. Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A., Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Yurdu, M., and Heur, Y. H. (1984) Immunostimulant action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants. Preliminary communication. *Arzneimittelforschung* **34**: 659-661.
 17. Bonney, R. J., Grey, I., Lin, T. Y., Meyenhofer, M. F., Acevedo, W., and Davies, P. (1978) Mononuclear phagocytes from carrageenan-induced granulomas. Isolation, cultivation, and characterization. *J. Exp. Med.* **148**(1): 261-275.
 18. Pearson, C. M., Waksman, B. H., and Sharp, J. T., (1961) Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of Mycobacterial adjuvant. *J. Exp. Med.* **133**: 485-509.
 19. 문영희, 노은미(2001) 마행 의감탕의 소염, 진통, 해열작용, *생약학회지*, **32**(3): 242-247.
 20. Marcil, A., Harcus, D., Thomas, D. Y., and Whiteway, M. (2002) *Candida albicans* killing by RAW264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect. Immun.* **70**: 6319-6329.

(2003년 11월 10일 접수)