

# 차조기추출물에 의한 염증성 cytokine 생성억제 및 진통작용에 관한 연구

김시나 · 이은정 · 이현지 · 남경숙 · 김희석 · 황성완 · 황성연\*

(주)KMSI 부설 한국의과학연구소

## Effect on Inflammatory-cytokines Production Inhibition and Analgesic Activity of *Perilla Frutescens* Extracts

Si Na Kim, Eun Jung Lee, Hyun Ji Lee, Gyeong Sug Nam, Hee Seok Kim, Sung Wan Hwang, Sung Yeoun Hwang\*

Korea Medical Science Institute, Incheon 994-43, Korea

Prostaglandins biosynthesis and nitric oxide production have been implicated in the process of inflammation and osteoarthritis. And nitric oxide (NO) activated the MMPs responsible for PG degradation in articular chondrocytes. Therefore, we have studied the effects on anti-inflammation and analgesic by ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *Perilla Frutescens* (EPF). EPF inhibited LPS plus inflammation-cytokines-induced proteoglycan (PG) degradation, matrix-metalloproteinase (MMP-2,9) expression in rabbit articular chondrocytes. Also, EPF have inhibitory effects on LPS or LPS plus inflammation cytokines-induced nitric oxide (NO) and PGE2 production in mouse macrophage and rabbit articular chondrocytes. These results suggest that EPF decreases PGE2, iNOS, MMPs activity and PG degradation in mouse macrophage and/or rabbit articular chondrocytes. *In vivo*, EPF was shown to have inhibitory effects on acetic acid-induced pain. The herbal extract with this profile, may have utility in the treatment of osteoarthritis.

Key words : Anti-inflammation, PGE2, iNOS, *Perilla Frutescens*, Osteoarthritis

### 서 론

차조기(소엽)는 꿀풀과에 속하는 일년생 풀로 중국이 원산지이며, 봄철에 씨를뿌려 재배하는 약초이나 식용으로 먹기도 한다. 줄기는 네모이며 성긴 털이 나 있고 잎은 꼭지가 길며 가장 자리는 성긴 톱니모양으로 여름철에는 줄기끝 엽액에서 줄기가 나와 담자색의 작은 꽃이 핀다. 소엽은 순형과(Labiatae)에 속하는 차조기와 그 밖의 근연 식물의 잎 및 끝가지를 건조한 것으로 중국원산이며 우리나라 각지에서 재배된다. 이는 일년생 초본으로 전체에 녹색을 띠며 특이한 방향이 있다. 주성분은 perilla aldehyde (55%), alpha-limonene, alpha-pinene 등이며 잎에는 cyanin, sterin과 종자에는 linolic, stearic, palmitic acid등이 있다. 이는 발한, 해열, 진해, 진통 소엽 증의 약리작용이 있다고 알

려져 있으며 신경통, 기관지염 등에 응용되어 왔다.<sup>1)</sup> 국내에서는 차조기에 관한 세포독성 및 항암작용에 관한 보고가 되어 있으며 같은 종류의 차조기가 자생하고 있는 이웃 일본에서는 차조기의 잎인 소엽을 갈아서 만든 소엽즙을 이용하여 다양한 실험을 수행하고 있다. 소엽즙은 염증부위의 호중성 백혈구 및 대식세포의 수와 질에 절대적으로 영향을 미쳐 탐식능을 증대시키고, 혈관내피세포의 부착능, 활성산소와 산생능 등을 활성화하는 것으로 알려진 보고와 TNF (tumor necrosis factor)의 분비량을 소엽즙 0.4ml/mouse를 단 1회 경구투여 함으로써 50%까지 감소시킨다고 보고 한 바 있으며, 소엽즙은 염증성 피부질환의 치료에 유용하다고 보고하였으나 관절염, 항염증 및 통증억제에 대한 연구보고는 찾아볼 수 없다.<sup>1-4)</sup> 우리나라 사람이 가장 많이 앓고 있는 만성질환의 하나인 관절염은 성인 인구의 약 2.5%에서 나타나며, 45세 이상에서는 관절염 유병률이 22.6%로 1위를 차지하고 있는 중요한 질병이다. 생체조직의 손상에 대한 능동적인 생체 방어 과정으로 설명되는 염증반응은 생체의 세포나 조직이 어떤 원인에 의하여 손상을 받으면 이에 대한 반응을 시작하여 손상

\* 교신저자 : 황성연, 인천시 연수구 송도동 7-20 한국의과학연구소

· E-mail : nexia@kmsi.co.kr, · Tel : 032-255-2500

· 접수 : 2006/01/13 · 수정 : 2006/02/16 · 채택 : 2006/03/21

을 극소화 시키고, 손상된 부위를 복구시키려는 일련의 생체반응을 일으키게 된다.<sup>5,6)</sup> 그러나 염증 매개 인자의 과생산은 류마티스성 관절염, 골관절염, 만성 간염, 폐선유화증 등과 같은 많은 염증성 질환에서 쉽게 발견되며 이들 질환의 병리현상에 대한 주요인이 된다.<sup>7,8)</sup> 따라서, 이러한 염증 유발 매개 인자에 대한 유전자 발현 및 활성의 저해방법은 다양한 염증성 질환을 예방하거나 억제할 수 있는 치료원리 및 방법이 될 수 있다. 또한 한약재와 같은 천연소재로부터 치료제를 발굴할 경우 부작용이 적고 안정성이 높기 때문에 천연물로부터 염증성 매개물질로 알려진 NO, PGE2, COX-2와 pro-inflammatory cytokines 등을 억제시킬 수 있는 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>9,10)</sup> 따라서, 본 연구에서는 차조기의 70% 에탄올 추출물로부터 ethyl acetate 층을 분리해내고, 그 분획을 사용하여 관절조직 및 동물에서 염증, 재생 및 통증 효과를 테스트해 본 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 대상 및 방법

### 1. 차조기의 추출 및 분획

본 연구에 사용한 차조기는 국내산으로써 영천에 소재한 옴니허브에서 구입하였다. 차조기 100 g을 환저플라스크 (round bottom flask)에 5배 (w/v)의 70% 에탄올을 가하여 60℃에서 2시간 2회 추출, 감압농축 하여 얻은 70% 에탄올 추출물을 hexane, ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH) 및 증류수 (H<sub>2</sub>O) 순으로 분획하여 각 분획물을 동결건조한 결과 다음과 같은 분말을 얻었다. 각각의 분획물에 대해 iNOS assay 및 PGE2 assay를 실시하여 생리활성이 우수한 EtOAc 분획물을 실험에 이용하였다 (Data not shown).

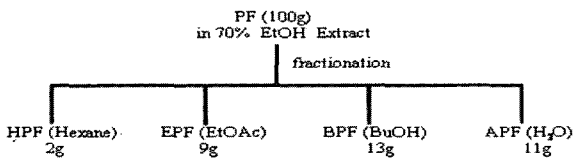


Fig. 1. Isolation procedure of ethyl acetate extract of *Perilla Frutescens*

### 2. 실험동물

primary culture에 사용한 뉴질랜드 화이트 토끼(수컷)와 초산 유발 마우스 진통 시험에 사용한 ICR 생쥐(수컷)는 중앙실험동물(서울 소재)에서 구입하였다. 토끼는 22 ± 2℃에서 1~2일간 사육한 후, 실험에 사용하였으며, ICR 생쥐는 20~22g으로 1주일간 동물실에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물실 내 명암은 12시간씩으로 자동조절 시켰고 사료와 물은 충분히 공급하였다.

### 3. 세포배양

#### 1) 마우스 대식세포주 (Raw 264.7)

마우스 유래의 대식 세포주인 Raw264.7을 한국세포주 은행

에서 구입하여 사용하였으며, 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum), 페니실린 (100U/ml) 및 스트렙토마이신 (100 µg/ml)을 포함한 24 well plate에 2 X 10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 분주하고 24시간동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 습윤조건하에서 배양하였으며, 계대배양은 2~3일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS)는 sigma로부터 구입하여 사용하였으며 대조군 (control)과 음성대조군 (CM)에는 용매인 DMSO (0.05%)만 처리하고 실험군에는 차조기 EtOAc 분획물 (0.8, 4.0 및 20.0 µg/ml) 처리 후, 16시간 동안 배양하였다.

#### 2) 토끼 연골조직 세포

2~3 주령의 토끼 무릎 관절로부터 연골조직을 분리하여 primary culture하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco, Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA)을 첨가하였으며, 1 X 10<sup>6</sup> 개의 세포를 60 mm dish에 접종하고, 5~6일 동안 온도 37℃, 습도 95%, 5% CO<sub>2</sub> 습윤조건하에서 배양하였다. 관절세포 (passage 0)가 70%~80% 정도 자랐을 때, 배지는 serum free DMEM으로 바꾸고, 대조군을 제외한 모든 dish에 cytokine mixture (CM, IL-1β 1 µg/ml, TNF- 10 ng/ml, IFN- 1 ng/ml, LPS 1 µg/ml)을 투여한 후 20분간 배양하였다. 대조군 (control)과 음성대조군 (CM)에는 용매인 DMSO (0.05%)만 처리하고 실험군에는 차조기 EtOAc 분획물 (0.8, 4.0 및 20.0 µg/ml) 처리 후, 16시간 동안 배양하였다.

### 4. Nitric oxide(NO) assay

염증을 일으키는 cytokine들에 의해 생성된 nitric oxide (NO)의 양은 세포배양액 중에 존재하는 nitrite (NO<sub>2</sub>)의 형태로 Griess 시약 [0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O]을 이용하여 측정하였다. 즉, 세포배양 상등액 100 µl 와 Griess시약 100µl 를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 비교하였다.

### 5. DMB assay

토끼 연골 조직의 구성 성분인 프로테오글리칸의 분해를 유발시켜 배양액 내의 프로테오글리칸의 분해 산물인 글루코사미노글리칸 (glucosaminoglycan, GAG)을 1,9-디메틸메틸블루 발색제 (1,9-dimethylmethylene blue dye, DMB)에 의해 발색된 정도를 525 nm에서 흡광도를 측정 후, chondroitin sulfate로 표준 정량하였다.

### 6. PGE2의 정량

염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE2의 농도 변화를 assay kit (Amersham, U.K)를 사용하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 정량하였다. Goat anti-mouse Ig가 부착되어 있는 96-well plate에 PGE2 표준액 또는 시료를 가한 후, PGE2-peroxidase conjugate와 mouse

anti-PGE2를 각각 50  $\mu$ l씩 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween 20을 함유한 phosphate buffered saline (PBS)로 항체와 결합하지 않은 PGE2 혹은 PGE2-peroxidase conjugate를 제거하였다. 항원-항체 복합체에 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 용액 150  $\mu$ l를 가하고 실온에서 30분간 발색시키고, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l를 가하여 반응을 중단시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법은 시료의 PGE2와 첨가된 PGE2-peroxidase conjugate와의 경쟁반응으로 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포배양액에 함유된 PGE2의 함량을 계산하였다.

### 7. Gelatin zymography

세포수집 후, 원심분리를 하여 세포 조각 (cell debris)은 제거하고 상등액만 취한다. 상등액 샘플과 염료를 섞은 후, 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 10% Zymogram gel을 이용하여 100 V의 전압을 가하여 3시간 동안 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel에서 SDS를 제거하기 위해 0.5% Triton X-100용액으로 실온에서 30분 동안 3회 gel을 세척하고, developing buffer (0.05 M Tri-HCl, pH7.0, 0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 1 M ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>)에 담근 후, 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 0.25% Commassie Brilliant Blue R250 (Sigma-aldrich, USA)으로 1시간 동안 염색한 후 탈색 (25% ethanol, 8% acetic acid) 하였다.

### 8. 진통 효과 테스트

체중 20-22 g의 ICR (Institute of Cancer Research)계 mouse 수컷 8마리를 1군으로 하여 시료 200 mg/kg과 400 mg/kg을 각각 경구투여하고, 1시간 후에 0.6% 초산생리식염액 0.1 ml/10 g 단위로 복강 내 주사하고, 주사 후 10분 후부터 10분간 각각의 쥐가 나타내는 통증 반응인 라이딩 (writhing: 등을 쭉 펴거나 뒷다리를 몸 뒤로 완전히 뻗어 제치는 현상)을 보이는 횟수를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

염증성 cytokine들에 의해 활성화된 토끼관절조직세포 (rabbit articular chondrocyte)의 배양액과 LPS (Lipopolysaccharide)로 유도된 마우스 대식세포 (Raw264.7)에서 생성된 NO<sub>2</sub>의 양을 Greiss 시약을 사용하여 NO생성 저해활성을 측정하였다. 차조기의 EtOAc 추출물은 0.8, 4.0, 20.0  $\mu$ g/ml로 처리하였으며 음성대조군 (CM 또는 LPS), 양성대조군은 항염증 물질로 알려져 있는 Apigenin 10  $\mu$ M의 농도로 실험을 진행하였다. 마우스 대식세포 (Raw264.7)에서 농도별로 각각 27.87%, 45.37%, 63.61%로 유의성 있는 NO생성 저해 효과를 나타내었다. (Fig. 2) 토끼관절조직세포에서는 2.57%, 8.95%, 43.38%로 농도의존적인 NO생성 억제 효과를 나타내었다. (Fig. 3) 특히, 마우스 대식세포 (Raw264.7)에서의 억제효과가 더 뛰어난 것으로 나타났다. 차조기 EtOAc 추출물 20.0  $\mu$ g/ml에서는 두 세포주 모두에서 양성대조군 apigenin보다 우수한 생성 저해효과를 보였다. 차조기 EtOAc 추출물의 IC<sub>50</sub>은 각각 5.88  $\mu$ g/ml, 23.05  $\mu$ g/ml로 나타났다.

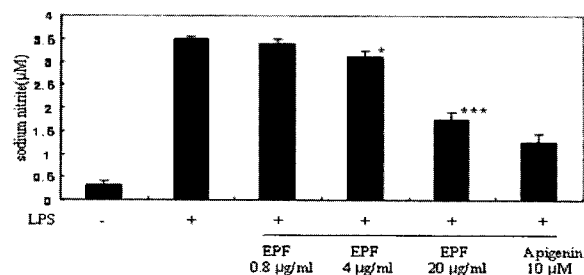


Fig. 2. Inhibition of NO production in Raw 264.7 cell by EPF. The cells were stimulated with LPS (Lipopolysaccharide) and EPF was added at doses ranging from 0.8 to 20  $\mu$ g/ml. The cells were incubated for an additional 16 h. Data are mean  $\pm$  S.D. of duplicate per treatment. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

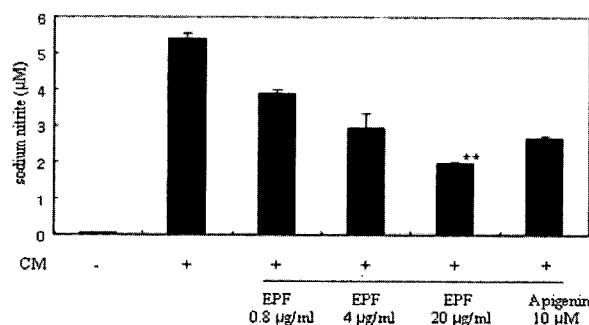


Fig. 3. Inhibition of NO production in rabbit articular chondrocytes by EPF. The cells were stimulated with cytokine mixture (CM: IL-1 $\beta$  1 ng/ml, TNF- $\alpha$  10 ng/ml, IFN- $\gamma$  1 ng/ml, LPS) and EPF was added at doses ranging from 0.8 to 20  $\mu$ g/ml. The cells were incubated for an additional 16 h. Data are mean  $\pm$  S.D. of duplicate per treatment. \*\*p<0.01: significantly different from the negative control (CM).

### 2. Proteoglycan (PG) 분해 억제 효과

관절조직의 주요 성분 중 하나인 proteoglycan의 분해 억제 활성실험을 통해서 염증성 cytokines에 의한 proteoglycan분해가 시료에 의해 억제되는 정도를 측정하였다. Fig. 4와 같이 차조기의 EtOAc 추출물이 20.0  $\mu$ g/ml (8.9  $\pm$  1.41  $\mu$ g/mg) 농도에서는 대조군 (control, 15.18  $\pm$  0.16  $\mu$ g/mg) 및 양성대조군 (13.20  $\pm$  0.85  $\mu$ g/mg)과 같은 수준으로 proteoglycan의 분해 산물인 GAG (glucosaminoglycan) 함량이 측정됨으로써 proteoglycan의 분해를 유의성있게 저해하는 것을 확인하였다 (p<0.01).

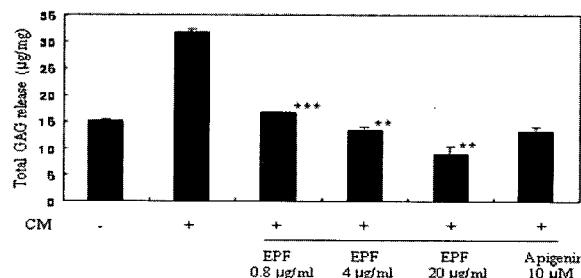


Fig. 4. Dose dependent inhibition of cytokines-stimulated PG release from rabbit articular chondrocytes by EPF. Apigenin was added as the positive control. PG release was measured 16 h after the addition incubation of EPF. Data are mean  $\pm$  S.D. of duplicate per treatment. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

### 3. PGE2 생성에 미치는 영향

LPS로 처리된 마우스 대식세포 (Raw264.7)와 염증성

cytokine- mixture (CM; IL-1 $\beta$  1 ng/ml , TNF- $\alpha$  10 ng/ml , IFN- $\gamma$  1 ng/ml I, 1  $\mu$ g/ml LPS)에 의해 활성화된 토끼관절조직 세포 (rabbit articular chondrocyte)에서 차조기 EtOAc 추출물의 농도에 따라 PGE2 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 마우스 대식세포 (Raw264.7)에서 차조기 EtOAc 추출물의 농도가 20  $\mu$ g/ml일 때, 302.7  $\pm$  11.87  $\mu$ g/ml로 음성대조군 (LPS, Lipopolysaccharide) 532.85  $\pm$  17.18  $\mu$ g/ml에 비하여 현저하게 감소 ( $p < 0.01$ ) 하였으며 (Fig. 5), 토끼관절조직세포 (rabbit articular chondrocyte)에서도 20  $\mu$ g/ml에서 30.58  $\pm$  1.81  $\mu$ g/ml로 음성대조군 (CM, cytokine mixture) 274.78  $\pm$  12.24  $\mu$ g/ml에 비하여 약 8배정도 감소하는 것 ( $p < 0.001$ )을 확인하였다. (Fig. 6) 위의 결과는 통증 유발 물질인 COX-2를 나타내는 지표인 PGE2의 농도변화를 확인한 실험으로서 차조기 EtOAc 추출물은 PGE2 생성 억제 효과가 우수함을 알 수 있다.

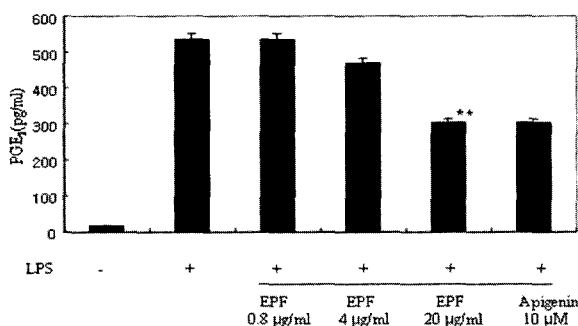


Fig. 5. Effect of EPF on PGE2 production in Raw 264.7 cell. The cells were stimulated with LPS in the presence of absence of inhibitor of PGE2. PGE2 production was measured 16 h after the addition incubation of EPF. Data are mean  $\pm$  S.D. of duplicate per treatment. \*\* $p < 0.01$ ; significantly different from the negative control (CM).

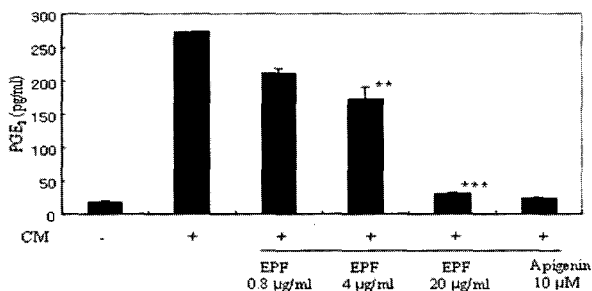


Fig. 6. Effect of EPF on PGE2 production in rabbit articular chondrocytes. The cells were stimulated with cytokines in the presence of absence of inhibitor of PGE2. PGE2 production was measured 16 h after the addition incubation of EPF. Data are mean  $\pm$  S.D. of duplicate per treatment. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; significantly different from the negative control (CM).

#### 4. Gelatin zymography

정상적인 연골세포는 연골 특이적 ECM (extracellular matrix) 단백질을 합성한다. 그러나 관절염과 염증상태에서는 연골조직내 MMPs의 발현 및 활성이 증가하게 되고 관절 조직 및 염증 상태는 가속화 시키게 된다. 이러한 현상은 염증성 cytokine에 의해 유발되게 된다. 따라서 본 실험에서는 토끼 관절조직세포에 염증성 cytokines에 의해 MMP-2, 9의 활성을 증가시키고 증가된 MMP-2, 9이 차조기 EtOAc 추출물에 의해서 감

소하는 정도를 확인하고자 하였다. Fig. 7에서처럼 염증성 cytokine에 의해 증가된 MMP-2, 9이 차조기의 EtOAc 추출물에 의해 감소하며 20  $\mu$ g/ml에서는 대조군 수준까지 감소되는 것을 확인하였다.

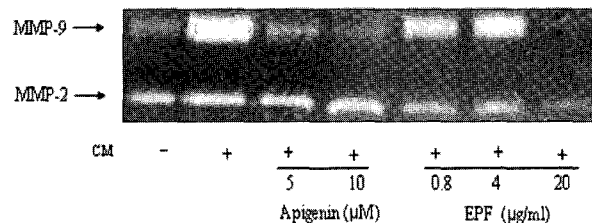


Fig. 7. Effect of EPF on enzyme expression of MMP-2 and MMP-9. After treatment with cytokines and EPF, the culture media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue. The experiment was repeat in twice independently.

#### 5. 초산 유발 마우스에서의 진통효과 테스트

초산 유발 마우스에서의 진통 효과에 미치는 결과는 다음과 같다. 대조군에서는 10분 동안에 15.66  $\pm$  1.52회의 writhing syndrom을 일으켰으며, 차조기의 EtOAc 추출물 200 mg/kg투여군에서는 14.00  $\pm$  1.00회로 감소를 보였고, 400 mg/kg투여군에서는 10.00  $\pm$  3.00회로 유의성 있는 억제효과를 나타내어 진통 효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 8,  $p < 0.05$ ).

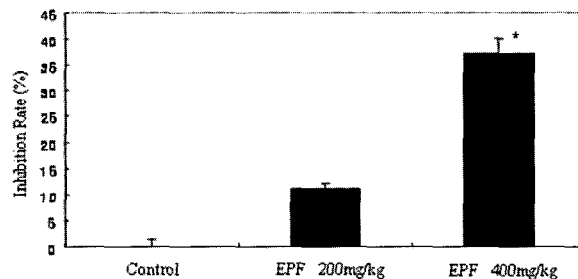


Fig. 8. Effect of EPF on the writhing syndrome in mice. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. Drugs were orally administered 1hour before the injection 0.6% acetic acid (0.1ml/ 10g). \* $p < 0.05$ ; significantly different from the control group.

## 고 찰

염증성 질환은 감염, 외상, 면역반응을 포함한 인체내의 반응이며 발열, 홍조, 부종, 통증 등의 급성 염증 증후가 있다.<sup>11)</sup> 골관절염을 유발하는 연골 파손 과정에서도, 염증이 유발되며, 이로써 염증 관련 효소의 방출을 야기시켜 연골손상을 가속화시키게 된다. 이과정의 염증반응의 화학매개물 중 prostaglandins과 nitric oxide는 염증의 진행과정에 중요한 매개 물질이 된다.<sup>12-15)</sup> 또한 관절염을 일으키는 또 하나의 중요한 타겟은 MMP (Matrix-matalloproteinase)이며 MMP및 염증성 cytokines 의해서 Proteoglycan이 분해되기도 한다. 연골세포는 sulfated proteoglycan (aggrecan)과 type II collagen 등의 연골 특이적 ECM 단백질을 합성하여 합성과 분해간에 균형이 유지된다. 그

러나 연골 ECM 합성 및 분해의 항상성은 퇴행성 관절염과 같은 질환의 연골조직에서는 우선 MMP 합성 및 활성화에 의해 파괴된다.<sup>16)</sup> 퇴행성 관절염 조직에서 MMP-1 (collagenase-1), MMP-2, MMP-3 (stromelysin-1), MMP-8 (neutrophil collagenase), MMP-9 (gelatinases), MMP-13 (collagenase-3) 등의 발현 및 활성이 증가하며 이러한 현상은 염증성 cytokines에 의해 유발된다.<sup>17,18)</sup> 따라서, 소염진통제 및 관절염 치료제 후보약재를 개발하기 위해서는 다음과 같은 작용기전에 근거하여 약효검색 및 작용기전 연구가 수행되어야 할 것이다. 본 연구소에서는 약 200여종의 한약재를 대상으로 소염 및 진통 활성이 있는 활성균을 선별하였고 그 중 하나인 차조기 추출물의 활성을 보고하게 되었다. 차조기 EtOAc 추출물을 마우스 대식세포와 토끼관절조직세포에서 iNOS에 의해 생성된 NO를 현저히 저해시켰다. 이는 염증반응에 의해 유발된 조직의 파괴 등을 저해할 수 있을 것으로 사료된다. 체내 염증 및 통증 반응은 iNOS 뿐 아니라, 과량의 PGE2의 염증인자가 COX-2에 의해 형성된다.<sup>17,22)</sup> 차조기 EtOAc 추출물의 PGE2의 생성량을 측정된 결과, 음성대조군 (LPS, CM)에 비하여 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 차조기 EtOAc 추출물은 COX-2의 활성저해에 기인하는 PGE2의 생성 억제제를 통해 염증 및 통증 반응에 관여하는 것으로 판단된다.<sup>23,24)</sup> 또한 토끼 연골조직세포에서 MMP-2, 9의 활성 및 PG 분해에 관한 실험을 실시한 결과, 농도 의존적으로 PG 분해를 억제하였다. 또한 관절조직을 파괴하는 MMPs 중 MMP-2, 9의 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 이는 염증성 cytokines에 의한 연골조직세포의 분해를 억제하게 되는 것으로 연골재생과 관련된 작용기전에도 영향을 줄 것으로 생각된다. 마지막으로 동물모델을 사용한 writhing test 에서도 농도의존적으로 통증을 억제하는 것을 확인함으로써 골관절염 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 이상과 같은 결과로 보아, 차조기 EtOAc 추출물은 한약재로 부작용이 적고 안정성이 높을 뿐 아니라 in vitro와 in vivo에서 탁월한 활성 및 효능을 나타내었기에 소염진통제 및 관절염 치료제의 후보물질이 되리라 예상된다.

## 결 론

본 연구에 사용된 차조기 (*Perilla Frutescens*)의 ethyl acetate 분획물은 약 200여개의 한약재를 대상으로 iNOS, PGE2 활성테스트를 통해 선별된 활성약재군 중 하나로 소염 및 진통과 관련된 iNOS, PGE2, PG, MMP-2,9 및 동물 모델인 초산유발 마우스 효과테스트에서도 뛰어난 활성을 나타내었다. 따라서, 실험동물을 이용한 부종억제 및 골재생 효능 검색 등의 좀 더 구체적인 작용기전 연구가 수행된다면 골관절염 치료제 천연물 신약 후보약재가 될 수 있으리라 생각된다.

## 참고문헌

1. Han, D.S., Chung, B.H., Yoo, H.G., Kim, Y.O., Baek, S.H. Studies on the cytotoxicity and antitumor activity of *Perilla*

*frutescens*. *Kor. J. Pharmacogn.* 25(3):249-257, 1994.

2. Hwang, H.J. Lee, Y.T., Chung, K.S. Drug resistance and R-plasmid of gram negative bacterial to *perillae herba* extracts and antimicrobial agents. *J. Pharm. Sci. S. W. U.*, 17, 17-40, 2001.

3. Choi, K.E., Kwag, J.S., Kim, Y.K., Baek, S.H., Han, D.S. Development of anticancer agents from Korean medicinal plants (parts 4). Antitumor activity of the butanol soluble fraction of *Perilla frutescens*. *Korean. J. Toxicol.* 13, 311-316, 1997.

4. Han, D.S., Yoo, H.G., Suk, K.J., Baek, S.H. Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants (part 3). *Korean. J. Toxicol.* 11, 229-234, 1995.

5. Yim, K.Y., Kim, Y.S. Study for Whuallak-tang to influence the inflammation and liver of the rat with arthritis. *Korean J. Oriental physiology & Pathology.* 18(3):819-824, 2004.

6. Jeong, C.S., Hyun, J.E., Kang, M.H., Sim, J.S., Son, M.J., Jung, S.H., Kim, J.H., Lee, K.S., Kim, Y.S. Anti-arthritic effect of a new diet-supplement containing red ginseng extract and glucosamine complex. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(4):327-334, 2003.

7. Hyun, E.A., Lee, H. J., Yoon, W. J., Kang, H. K., Kim, S. J., Yoo, E.S. Inhibitory effect of *Salvia officinalis* on the inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthesis in Murine macrophage Raw264.7. *Yakhak Hoeji.* 48, 159-164, 2004.

8. Sung, B.G., Park, Y.I., Kim, J.J., Lim, M.S., Kim, N.K., Lim, K.S. Analgesic effect of daebangpung-tang on a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Korean. J. Oriental Physiology & Pathology.* 16(1):124-132, 2002.

9. Jang, S.I., Kim, H.J., Kim, Y.J., Pae, H.O., Chung, H.T., Jeong, O.S., Kim, Y.C., Yun, Y.G. Kagam-bojungitang inhibits LPS-induced inflammatory mediators in Raw264.7 macrophages. *Korean. J. Oriental Physiology & Pathology.* 17(3):804-809, 2003.

10. Jeong, C.S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Alnus japonica*cortex ethanol extract. *Kor. J. Pharmacogn.* 34(3):233-236, 2003.

11. Yeom, M.J., Choi, B.H., Han, D.O., Lee, H.J., Shim, I.S., Kim, S.H., Hahm, D.H. In vitro inhibition of pro-inflammatory mediator mRNA expression by nephrite in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Korean. J. Oriental Physiology & Pathology.* 18(6):1622-1627, 2004.

12. Mbyundula, E.C., Bunnung, RA. D., Rainsford, K.D. Effects of cannabinoids in nitric oxide production by chondrocytes and proteoglycan degradation in cartilage. *Biochem. Pharmacol.* 69, 635-640, 2005.

13. Lee, H.C., Yeom, M.J., Kim, G.H., Han, D.O., Zhao, M.A., Shin, I.S., Lee, H.J., Choi, K.D., Hahm, D.H. In vitro study of anti-inflammatory effects of salvia miltiorrhiza extracts using luciferase reporter gene assay. Korean. J. Oriental Physiology & Pathology. 18(3):740-746, 2004.
14. Park, S.Y., Lee, H.J., Hyun, E.A., Moon, J.Y., Yang, H.C., Lee, N.H., Kim, S.J., Kang, H.K., Yoo, E.S. Inhibitory effect of eurya emarginata on the production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage Raw264.7. YakHak Hoeji. 47(5):311-318, 2003.
15. Lee, Y.S., Han, O.K., Shin, S.W., Park, J.H., Kwon, Y.K. Effects of water-extracted cyperus rotundus on the nitric oxide production and cytokine gene expression. Korean. J. Oriental Physiology & Pathology. 17(3):771-776, 2003.
16. Badger, A.M., Cook, M.N., Swift, B.A., Newman tarr, T.M., Gowen, M., Lark, M. Inhibition of interleukin-1-induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, Hymenialdisine. J Pharmacol Exp Ther. 290, 587-593, 1999.
17. Nam, K.W., Je, K.H., Lee, J.H., Han, H.J., Lee, H.J., Kang, S.K., Mar. W.C. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- and IL-1) production by water-soluble sub-fractionated parts from Bee (Apis mellifera) Venom. Arch. Pharm. Res. 5(26):383-388, 2003.
18. Kim, S.J., Park, H.E., Kim, H.P. Inhibition of nitric oxide production from lipopolysaccharide treated Raw 264.7 cells by synthetic flavones : structure-activity relationship and action mechanism. Arch Pharm Res., 27, 937-943, 2004.
19. Ha, H.K., Lee, J.H., Kim, C.S. Extracts of Rheum abdulatum L. inhibits COX-2 activities in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells. J. Applied. Pharmacol. 8, 73-77, 2000.
20. Lee, S.H., Seo, G.S., Sohn, D.H. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by butein Raw 264.7 cells. Biochem. Biophys. Commun. 323, 125-132, 2004.
21. Kim, J.Y., Park, S.W. Effect of geraniol on the proliferation of L1210 cells and ICR mouse macrophages, and the activities of superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities. Yakhak Hoeji. 48, 309-316, 2004.
22. Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis. 20(10):1945-1952, 1999.
23. Yoon, T.G., Byun, B.H., Kwon, T.K., Suh, S.I., Byun, S.H., Kwon, Y.K., Kim, S.C. Inhibitory effect of farfarae flos water extract on COX-2, iNOS expression and nitric oxide production in lipopolusaccharide-activated Raw264.7 cells. Korean. J. Oriental Physiology & Pathology. 18(3):908-913, 2004.
24. Han, D.O., Choi, B.H., lee, H.J., Shim, I. S., Kang, S.K., Hahm, D.H. In vitro studies on anti-inflammatory activity of nephrite. Korean. J. Oriental Physiology & Pathology. 19(4):977-981, 2005.