

갈근 추출물에 의한 염증성 Cytokine 생성 억제 및 Prostaglandin E₂ 활성 저해에 관한 연구

김시나 · 김희석 · 남경숙 · 황성완 · 황성연[†]

(주)KMSI 부설 한국의과학연구소

Inhibition of Inflammatory-cytokines Production and Prostaglandin E₂ Activity by *Puerariae Radix* Extracts

Si-Na Kim, Hee-Seok Kim, Gyeong-Sug Nam, Sung-Wan Hwang and Sung-Yeoun Hwang[†]

Korea Medical Science Institute, Incheon 406-130, Korea

Abstract

The ethanol extracts of *Puerariae Radix* inhibited cyclooxygenase-2 (COX-2) activity in bone marrow derived mast cells (BMMC). COX-2 is responsible for the production of large amounts of proinflammatory prostaglandins (PGs) at the inflammatory site. We have investigated the anti-inflammatory effect of ethyl acetate fraction from 70% ethanol extract of *Puerariae Radix* (EPR), and attempted acetic acid induced writhing to verify the analgesic effect. Inflammation was induced by interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS). EPR showed strong inhibitory efficacy against cytokine-induced proteoglycan degradation, prostaglandin E₂ (PGE₂) production, nitric oxide (NO) production, and matrix-metalloproteinases (MMPs) expression in mouse macrophage and rabbit articular chondrocyte. In the writhing test, EPR (200~400 mg/kg) exhibited a dose-dependent inhibition of writhing. The results indicate that EPR have anti-inflammatory and analgesic activities, and could be a good herbal medicine candidate for treating of osteoarthritis (OA).

Key words: *Puerariae Radix*, anti-inflammation, analgesic, PGE₂, osteoarthritis

서 론

골관절염(osteoarthritis)은 퇴행성 관절염(degenerative arthritis)이라 불리우는 가장 흔히 볼 수 있는 관절염으로 중년 또는 노년에 주로 발생하는 체중부하관절을 많이 침범하여 관절연골의 국소적인 퇴행성 변화, 연골하골(subchondral bone)의 비대, 주변 골연골부의 과잉 골형성, 관절의 변형을 특징으로 하며 염증변화는 소수에서 나타나고, 임상적으로는 반복적인 동통, 관절강직감 및 점진적인 운동장애 등을 초래하는 질환으로서 특히 슬관절에 많이 침범하는 질환이다. 골관절염의 근치적 치료방법은 아직 없으며, 병적상태에 따라 약물요법, 관절에 대한 국소요법 및 물리치료, 수술적 요법이 적용된다(1). 약물에 사용되는 약제로는 phenylbutazone, 비스테로이드성 소염진통제(NSAID), 스테로이드제 등이 있고, 최근 강력한 진통 및 항염작용을 가진 약품들이 개발되어 사용되고 있으나, 질병의 경과가 만성으로 장기간의 투여가 불가피하고 또 대부분의 약제에서 소화성 궤양 등 위장관 장애가 있어 그 사용에 제한을 받아왔다(2,3).

골관절염을 유발하는 연골 파손 과정에서, 일부 염증이

유발될 수 있으며, 이로써 염증 관련 효소의 방출을 야기하여 연골 손상을 가속시킨다. 골관절염이 진행되면, 염증 반응과 함께 활액량이 늘어나는 것을 확인할 수 있는데 이는 연골이 파괴되어 활액내로 프로테오글리칸이 방출되기 때문이며, 따라서 활액내의 프로테오글리칸 농도를 감소시키는 것은 골관절염의 개선에 중요한 마커가 된다. 또한, 관절 내 염증 반응과 함께 통증이 증가하게 되는데 이러한 통증은 활액내에서 이와 관련된 중요한 인자인 프로스타글란딘 E₂의 농도가 증가하기 때문이며, 따라서 활액내의 프로스타글란딘 E₂의 농도를 감소시키는 것이 또한 골관절염의 개선에 중요하다(4).

일반적으로 염증 부위에서는 과다한 양의 NO가 발생하여 세포 조직의 괴사를 촉진시킨다고 알려져 있으며 이러한 NO를 발생시키는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 활성을 억제하거나 단백질 발현을 억제하는 것은 많은 염증성 질병에서 치료의 중요한 관건이 되고 있다(5-7). iNOS는 외부자극에 반응하여 생체를 방어하려는 목적으로 단시간에 과량의 NO를 생성하지만, 관절염과 같은 질환에서는 과잉 분비된 NO가 괴사, 통증 등의 2차적인 부작용을 일으키

[†]Corresponding author. E-mail: blue@kmsi.co.kr
Phone: 82-32-255-2500. Fax: 82-32-851-2508

게 된다. 따라서, iNOS의 과잉발현 억제는 골관절염 치료에 중요한 것으로 알려져 있다(8-11).

사이클로옥시게나제 2(COX-2)는 통증 유발물질인 프로스타글란딘의 합성을 유도하는 효소로서, NO를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진되기 때문에 COX-2의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 것은 또한 골관절염 치료에 중요한 마커가 된다(1,12,13). 최근에는 다른 활성 산소분자와의 상호작용을 함으로써 염증의 매개체로서 역할을 하고 있음이 밝혀졌다(14).

갈근(葛根, 칩뿌리; *Puerariae Radix*)은 대한약전에 의하면 칩(*Pueraria lobata* Ohwi)의 주피를 제거한 뿌리로서, 오래전부터 식용으로 칩차, 칩죽, 미숫가루 등에 사용되었고, 약용으로 감기, 머리 아픈데, 땀이 잘나지 않고 가슴이 답답하고 해갈하는데, 당뇨병, 설사, 이질 등에 약으로 쓰이며, 갈화(葛化)는 열을 내리고 가래를 잘 나오게 하며 술독을 푸는 데 쓰여 왔다(15). 그리하여 한방에서 갈근은 기육을 풀어주는 작용을 하므로 감기몸살이나 발진성 질환, 항강통에 사용되고 있으며, 고혈압과 관상동맥경화증, 협심증, 노인성 당뇨, 숙취제거 등에 이용되었다(16). 갈근과 관련한 약리작용으로는 항산화작용, 항염작용, 혈압강화작용, 항알코올 중독(antidipsotropic), 간보호 작용, 숙취억제 작용, 항천식 작용 등이 알려져 있다(17-23). 또한 갈근은 뇌혈관과 관상동맥을 확장시킬 수 있어 뇌하수체 후엽호르몬에 의해 발생하는 급성 심근허혈을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.

갈근은 puerarin, apigenin, isoflavonoid, genistein, kakonein 등의 성분을 함유하고 있으며(24) 주로 isoflavonoid와 관련한 성분의 연구가 많이 보고되고 있다. 또한, Moon 등은 다양한 천연물로부터 BMMC(bone marrow derived mast cells)의 사이클로옥시게나제-2에 대한 활성을 측정한 결과 각갈근(*Puerariae Radix*) methanol 추출물이 77%를 저해함을 보고하였다(25). 특히, apigenin과 daidzein은 소염에 효능이 있음이 밝혀졌고(26-30), 최근에 daidzein에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 이처럼 항염효능이 있는 물질을 포함하고 있음에도 불구하고 갈근에 관련된 대부분의 연구는 항산화 및 간보호 작용에 집중되어 있다. 또한, 이런 갈근의 isoflavonoid는 에탄올이나 메탄올에 대한 용해성이 높고 열수추출보다는 에탄올 추출물에서 높은 함량이 추출됨이 보고되었다(31). 따라서 본 연구에서는 갈근을 70% 에탄올에서 추출한 후 단계별 용매 분획물을 얻은 후 그 중 생리활성이 우수한 ethyl acetate 분획층을 사용하여 마우스 대식세포, 토끼 연골조직세포 및 동물에서 염증, 재생 및 통증 실험을 통해 골관절염 치료 후보물질로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

갈근의 추출 및 분획

본 연구에 사용한 갈근은 국내산으로써 경기도에 소재한

대영제약에서 구입하였다. 갈근 200 g을 환저플라스크(round bottom flask)에 5배(w/v)의 70% 에탄올을 가하여 60°C에서 2시간 2회 추출, 감압농축 하여 얻은 70% 에탄올 추출물을 hexane, ethyl acetate(EA), butanol(BuOH) 및 증류수(H₂O) 순으로 분획하여 각 분획물을 동결건조한 결과 다음과 같은 분말을 얻었다(Fig. 1). 각각의 분획물에 대해 iNOS assay 및 PGE₂ assay를 실시하여 그 중 생리활성이 우수한 EA분획물을 실험에 이용하였다.

세포배양

마우스 대식세포주(RAW 264.7): 마우스 유래의 대식세포주인 RAW 264.7을 한국세포주 은행에서 구입하여 사용하였으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, 26140-079, Gibco Co.), 페니실린(100 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 µg/mL)을 포함한 DMEM 배지를 포함한 24 well plate에 2×10⁶ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 습윤조건하에서 배양하였다. RAW 264.7 세포에서 산화질소를 유도하기 위하여 대장균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS)를 100 ng/mL의 농도로 투여하고 대조군에는 용매인 DMSO만을 처리하고 실험군에서는 갈근 EA분획물(0.8, 4.0 및 20.0 µg/mL) 처리 후, 16시간 동안 배양하였다.

토끼 연골조직 세포: 2~3 주령의 토끼 관절로부터 연골조직을 분리하여 primary culture하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)을 첨가하였으며, 1×10⁶개의 세포를 60 mm dish에 접종하고, 5~6일 동안 37°C, 5% CO₂ 습윤조건하에서 배양하였다. 관절세포(passage 0)가 80% 정도 자랐을 때, 배지는 serum free DMEM으로 바꾸고, 대조군을 제외한 모든 dish에 cytokine mixture(CM IL-1β 1 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL, IFN-α 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 갈근 EA분획물(0.8, 4.0 및 20.0 µg/mL) 처리 후, 16시간 동안 배양하였다.

Nitrite assay

갈근 EA분획물에 대한 NO 생성 억제 효과를 마우스 대식세포와 토끼 연골조직세포를 이용하여 확인하였다. 염증을 일으키는 cytokine들에 의해 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂⁻)의 형태로서 Griess

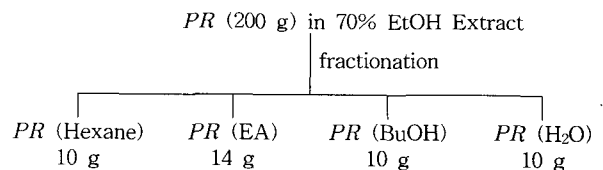


Fig. 1. The solvent fractionation scheme from 70% ethanol extract of *Puerariae Radix* (EPR).

시약[0.1% N-(1-naphtyl)ethylenediamine 2HCl, 1% sulfanilamide in 5% conc. H_3PO_4 in H_2O]을 이용하여 측정하였다. 즉, 각각의 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess시약 100 μ L를 혼합하여 96-multiwell plates에서 10분 동안 반응시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DMB assay

토끼 연골 조직의 구성 성분인 프로테오글리칸의 분해를 유발시켜 배양액 내의 프로테오글리칸의 분해 산물인 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.

PGE₂의 정량

염증성 cytokine들로 유발된 COX-2에 기인한 PGE₂의 농도변화를 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 μ 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 μ L를 가하고 실온에서 30분간 발색시키고, 1 M H_2SO_4 100 μ 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.

Gelatin zymography

세포수집 후, 원심분리를 하여 세포 조각(cell debris)은 제거하고 상등액만 취하였다. 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, pH 7.0, 0.15 M NaCl, 0.01 M $CaCl_2$, 1 M $ZnCl_2$, 0.02% NaN_3)에 담근 후, 37°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 0.25% Com-massie Brilliant Blue R250(Sigma-aldrich, USA)으로 1시간 동안 염색한 후 탈색(25% ethanol, 8% acetic acid)하였다.

진통 효과 테스트

체중 20~22 g의 ICR계 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 와이딩(writhing: 등을 쭉 펴거나 뒷다리를 몸 뒤로 완전히 뺀 채 지는 현상)을 보이는 횟수를 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 mean \pm SD으로 표시하였으며, 음성대조군(LPS 또는 CM)과 갈근 EA분획물 및 양성대조군(apigenin)과 갈근 EA 추출물 사이의 유의성은 paired Student's *t*-test를 적용하여 각각 * p <0.05, ** p <0.001 및 * p <0.001인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

일산화질소 생성 억제 효과

염증성 cytokine들에 의해 활성화된 마우스 대식세포(RAW 264.7)와 토끼 연골조직세포 배양액에서 NO생성 저해활성을 측정함으로써, 갈근(*Puerariae Radix*)의 ethyl acetate(EA) 분획물의 항염증 효과를 확인하였다. 갈근의 EA분획물은 0.8, 4.0, 20.0 μ g/mL로 처리하였고 음성대조군(LPS 또는 CM)에 비해 마우스 대식세포에서는 0.8 및 4.0 μ g/mL 처리군에서는 차이를 보이지 않았으나, 20.0 μ g/mL 처리군에서는 42.3%로 유의성 있는(p <0.001) NO 생성 저해 효과를 나타냈다(Fig. 2). 또한, 토끼 연골조직세포에서는 각각 5.5%, 16.2%, 39.5%로 유의성 있는(p <0.001) NO 생성 저해효과를 보였다(Fig. 3). Apigenin의 IC₅₀은 마우스 대식세포에서는 7.87 \pm 0.16 M(2.12 \pm 0.02 μ g/mL)로 나타났으며, 갈근 EA분획물은 23.61 \pm 0.35 μ g/mL을 나타냈다. 토끼의 연골조직세포에서 apigenin의 IC₅₀은 9.86 \pm 0.09 M(2.66 \pm 0.02 μ g/mL)로 나타났으며, 갈근 EA분획물은 294.23 \pm 0.72 μ g/mL을 나타냈다.

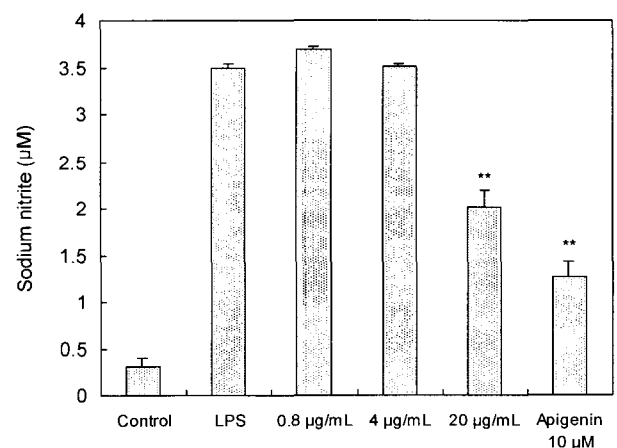


Fig. 2. Inhibition of NO production in RAW 264.7 cell by EPR.

The cells were stimulated with cytokine (LPS; 100 ng/mL of lipopolysaccharide) and EPR was added at doses ranging from 0.8 to 20.0 μ g/mL. The cells were incubated for an additional 16 h. Data are mean \pm SD of duplicate per treatment. ** p <0.001: significantly different from the negative control (LPS).

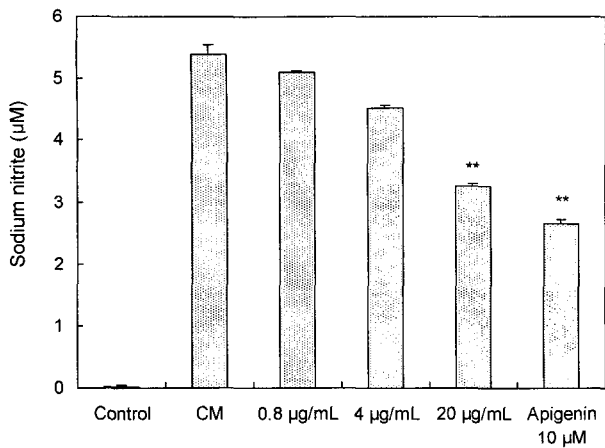


Fig. 3. Inhibition of NO production in rabbit articular chondrocytes by EPR.

The cells were stimulated with cytokine mixture (CM; 1 ng/mL IL-1 β , 10 ng/mL TNF- α , 1 ng/mL IFN- γ , 1 μ g/mL LPS) and EPR was added at doses ranging from 0.8 to 20.0 μ g/mL. The cells were incubated for an additional 20 h. Data are mean \pm SD of duplicate per treatment. **p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

Proteoglycan 분해 억제 효과

관절조직의 주요 성분 중 하나인 proteoglycan의 갈근 EA 분획물에 의한 분해 억제 정도를 측정하였으며 Fig. 4에 나타내었다. 음성대조군(CM)의 경우는 proteoglycan의 분해 산물인 GAG 함량이 31.84 \pm 0.52 μ g/mg으로서 대조군(control, 15.18 \pm 0.16 μ g/mg)에 비해 유의성 있는 증가를 보여 염증성 cytokines에 의한 proteoglycan의 분해를 확인하였다(p<0.001). 갈근 EA분획물을 처리한 시험군에서는 농도의존적인 proteoglycan 분해 억제하였음을 확인하였고, 20.0 μ g/mL(17.63 \pm 0.17 μ g/mg) 농도에서는 대조군과 비슷한 수

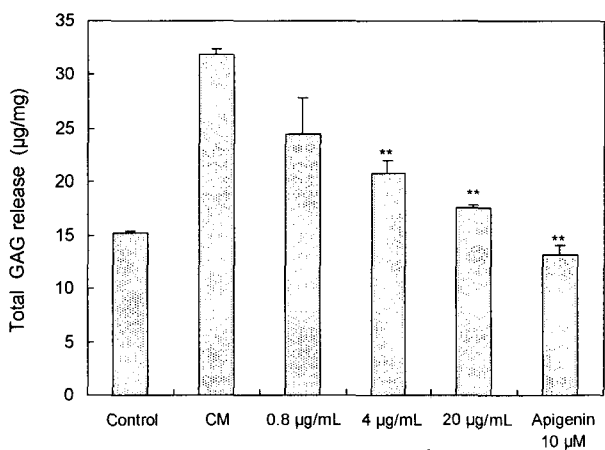


Fig. 4. Dose dependent inhibition of cytokines-stimulated proteoglycan release from rabbit articular chondrocytes by EPR.

Apigenin was added as the positive control. Proteoglycan release was measured 20 h after the addition incubation of EPR. Data are mean \pm SD of duplicate per treatment. **p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

준으로 proteoglycan의 분해를 유의성 있게 저해함을 확인하였다(p<0.001).

PGE₂ 생성 억제에 미치는 영향

통증유발물질인 프로스타글란딘을 합성하는 효소인 cyclooxygenase 2(COX-2)의 갈근 EA분획물에 의한 활성억제를 확인하기 위해 COX-2를 나타내는 지표인 PGE₂의 농도 변화를 마우스 대식세포 및 토끼 연골조직 세포에서 확인하였다. 마우스 대식세포에서는 염증성 cytokine을 처리하지 않은 대조군(control, 17.44 \pm 0.19 pg/mL)에 비하여 처리한 음성대조군(LPS, 532.85 \pm 17.18 pg/mL)에서 약 30배 이상 증가되어 유의성 있는 통증 유발의 증가를 확인하였다. 반면에 음성대조군에 비교해 갈근 EA분획물을 처리한 군에서 농도의존적인 감소를 확인하였다(Fig. 5). 특히, 20.0 μ g/mL(193.50 \pm 10.18 pg/mL) 농도에서는 음성대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며(p<0.001), 양성대조군(apigenin, 302.70 \pm 11.88 pg/mL)에 비해서도 유의성 있는 우수한 통증 억제 효과가 있음을 확인하였다(p<0.001). 토끼 연골조직 세포에서도 염증성 cytokine을 처리하지 않은 대조군(control, 19.65 \pm 1.24 pg/mL)에 비하여 처리한 음성대조군(CM, 267.72 \pm 9.98 pg/mL)에서 약 14배 이상 증가를 보여 통증 유발을 확인하였고 이와 비교해 갈근 EA분획물을 처리한 군에서 농도의존적인 감소를 확인하였다(Fig. 6). 20.0 μ g/mL(26.44 \pm 0.42 pg/mL) 농도에서는 음성대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였으며(p<0.001), 양성대조군(apigenin, 24.46 \pm 1.16 pg/mL)과 같은 수준을 보여 통증 억제에 효과가 있음을 확인하였다.

Gelatin zymography

연골세포는 sulfated proteoglycan(aggrecan)과 type II

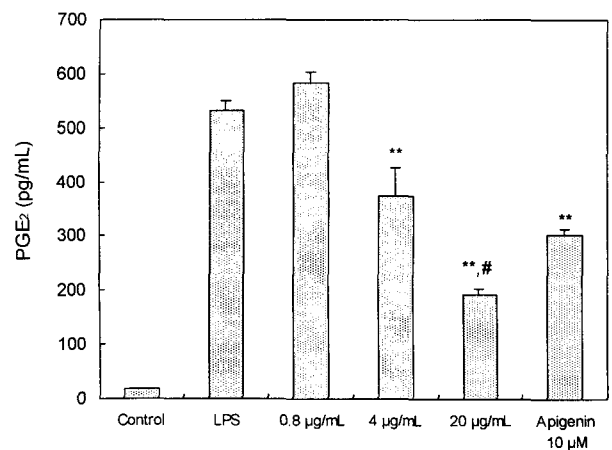


Fig. 5. Effect of EPR on PGE₂ production in RAW 264.7 cell. The cells were stimulated with cytokine in the presence or absence of inhibitor of PGE₂. PGE₂ production was measured 16 h after the addition incubation of EPR. Data are mean \pm SD of duplicate per treatment. **p<0.001: significantly different from the negative control (LPS), #p<0.001: significantly different from the positive control (apigenin).

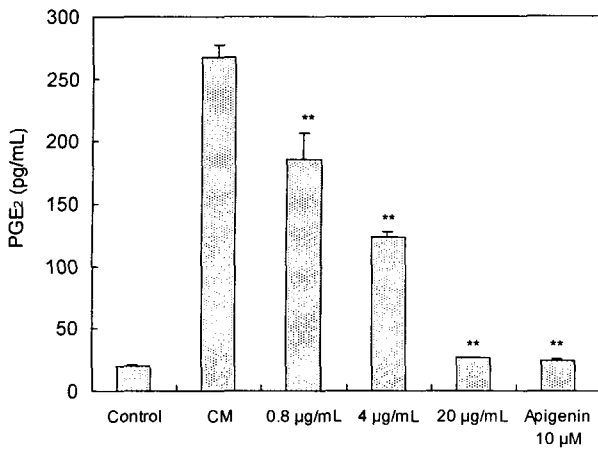


Fig. 6. Effect of EPR on PGE₂ production in rabbit articular chondrocytes.

The cells were stimulated with cytokines in the presence or absence of inhibitor of PGE₂. PGE₂ production was measured 20 h after the addition incubation of EPR. Data are mean ± SD of duplicate per treatment. **p<0.001: significantly different from the negative control (CM).

collagen 등의 연골 특이적 ECM(extracellular matrix) 단백질을 정상적으로 합성한다. 그러나 질환상태의 연골조직에서는 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13의 발현 및 활성이 증가하며 이러한 현상은 염증성 cytokine에 의해 유발된다. 본 실험에서는 갈근 EA분획물의 관절조직 분해효소 활성 억제효과를 확인하기 위하여 MMP-9의 활성실험을 하였다. Fig. 7에서와 같이 염증성 cytokine에 의해 증가된 MMP-9의 활성이 갈근 EA분획물에 의해 농도의존적으로 억제되었으며 20.0 µg/mL에서는 대조군 수준까지 감소되는 것을 확인하였다.

초산 유발 마우스에서의 진통효과 테스트

초산 유발 마우스에서의 진통 효과에 미치는 결과는 다음과 같다. 대조군에서는 10분 동안에 20.3±1.5회의 writhing syndrom을 일으켰으며, 갈근의 EA분획물 200 mg/kg 투여군에서는 18.3±1.5회(10.0% 저해)로 감소를 보였고, 400 mg/kg 투여군에서는 15.0±1.0회(26.3% 저해)로 유의성 있는 억제효과를 나타내어 진통효과가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 8, p<0.05).

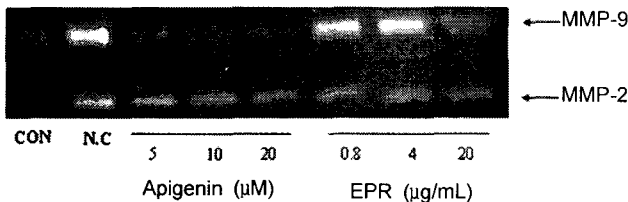


Fig. 7. Effect of EPR on enzyme expression of MMP-2 and MMP-9.

After treatment with cytokines and EPR, the culture media were used in gelatin-based electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue. The experiment was repeat in twice independently.

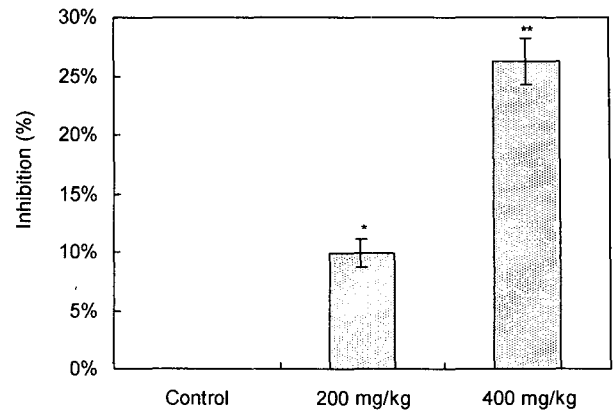


Fig. 8. Effect of EPR on the writhing syndrome in mice. Each value represents the mean ± SD. Drugs were orally administered 1 hr before the injection 0.6% acetic acid (0.1 mL/10 g). *p<0.05, **p<0.001: significantly different from the control group.

고 찰

모든 호기성 생물체는 산소를 이용한 에너지 대사 과정에서 항상 발생하는 활성 산소의 상해에 대하여 자기 방어기구를 구비하고 있지만, 조직의 방어능을 초월한 활성산소의 생성은 여러 질환의 원인이 되고 있다. 활성산소는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항 산소(³O₂)가 산화, 환원 과정에서 환원되어 생성되는 일중항 산소인 슈퍼옥사이드 음이온 (superoxide anion, ¹O₂⁻)과 과산화수소(H₂O₂), 하이드록시 라디칼(·OH)과 같은 자유라디칼로서, 이들은 단백질, DNA, 효소 및 T 세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 각종 질병을 유발시킨다. 이런 활성 산소의 상해에 대하여 인간을 비롯한 모든 호기성 생물체는 자기 방어기구를 구비하고 있지만, 조직의 방어능을 초월한 활성산소의 생성은 관절염 등 여러 질환의 원인이 되고 있다.

현재 국내의 경우 골관절염(osteoarthritis)으로 고통 받고 있는 환자는 전체 인구의 약 20% 정도로 알려져 있으며 스테로이드계 호르몬 및 소염제를 복용하는 방법이 사용되고 있으나, 호르몬의 경구투여는 일시적으로 효과가 있을 수 있지만 심각한 부작용 때문에 사용시 지속적인 주의 관찰과 함께 경구 투여가 아닌 관절 내 주사를 원칙으로 하고 있고 비스테로이드성 소염제의 경우는 위장관 등에 부작용으로 장기간 복용할 수 없는 문제점을 안고 있다. 최근 글루코사민 및 콘드로이친과 같은 보조제가 사용되고 있으나, 소염 및 통증의 경감이 전혀 없고 장기간 투여가 필요하며 퇴화가 이미 진행된 노인들에게서 장내 흡수 및 연골재생을 기대하기는 어려움이 많다. 다만 위장관 장애 등의 부작용이 없어 소염 진통제와 함께 사용되고 있다. 이런 면에서 독성이 없는 천연물에서 소염, 진통 및 연골분해 억제 효능을 지닌 물질을 얻게 된다면 그 가치는 상당할 것이다.

본 연구에서 사용한 갈근(*Puerariae Radix*)에 대한 항산

화 효능의 보고는 말할 수 없이 많으며 apigenin 및 daidzein 과 같은 소염에 효능이 있는 물질을 포함하고 있다(26-30). 또한 염증이 있는 부위에서만 작용하는 효소인 COX-2의 활성을 억제하는 보고도 있다(25). 따라서 본 연구에서는 갈근(*Puerariae Radix*)을 높은 함량의 유효물질을 얻기 위해 70% 에탄올로 추출한 후 용매 분획물 중 에틸 아세테이트 분획물(EPR)에 대한 마우스 대식세포, 토끼 연골조직세포 및 동물에서 골관절염 항염증 작용, 염증유발관련 효소 억제 작용, 관절조직 분해효소 억제작용 및 소염 진통작용 등의 치료작용을 확인하여 골관절염 치료 후보제로서의 가능성을 확인하였다.

골관절염을 유발하는 연골 파손 과정에서, 일부 염증이 유발될 수 있으며, 이로써 염증 관련 효소의 방출을 야기하여 연골 손상을 가속시킨다. 골관절염이 진행되면, 염증 반응과 함께 연골이 파괴되어 활액내로 프로테오글리칸이 방출되며, 프로스타글란딘 E₂의 농도가 증가하여 통증을 유발하게 된다. 또한, 염증 부위에서는 과다한 양의 NO가 발생하여 세포 조직의 괴사를 촉진시킨다. 이러한 NO는 iNOS에 의해 발생되는데, iNOS는 외부자극에 반응하여 생체를 방어하려는 목적으로 단시간에 과량의 NO를 생성하지만, 관절염과 같은 질환에서는 과잉 분비된 NO가 괴사, 통증 등의 2차적인 부작용을 일으키게 된다(11). COX-2는 통증 유발물질인 프로스타글란딘을 합성하는 효소이며, 이는 NO를 비롯한 기타 자극에 의해 합성이 촉진된다(13). 즉, 활액내의 프로테오글리칸 및 프로스타글란딘 E₂의 농도를 감소시키고 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하거나 활성을 억제하는 것, 관절조직 분해효소인 MMP의 활성을 억제하는 것은 골관절염 치료에 중요한 마커가 된다(8,9,32,33).

마우스 대식세포 및 토끼 연골조직세포를 염증성 cytokine에 의해 iNOS 발현을 유도한 후, NO 생성저해를 측정할 결과, 갈근 EA분획물(EPR)이 활성을 저해하는 것을 확인함으로써 효과적으로 염증을 저해하는 것으로 사료된다(Fig. 1, Fig. 2). 또한, 갈근 EA분획물의 NO 생성저해 효과에 대한 IC₅₀값은 마우스 대식세포 및 토끼 연골조직세포에서 각각 23.61 ± 0.35 µg/mL, 294.23 ± 0.72 µg/mL을 나타내 소염 효능을 보였다. DMB assay를 통해서 관절조직의 중요성분 중 하나인 프로테오글리칸의 시료에 의한 분해 억제 정도를 측정해본 결과, 갈근 EA분획물은 프로테오글리칸의 분해를 농도의존적으로 저해할 뿐만 아니라 정상세포인 대조군과 비슷한 수준까지 나타냄을 확인하였다(Fig. 3). 이는 연골세포를 자극하고 프로테오글리칸을 생성시켜 연골을 재생시키거나 연골의 파괴를 막는 것을 의미한다. 또한, 관절연골 조직의 파괴에 관여하는 MMP-2, 9에 대하여 zelatin zymography 방법을 통해 갈근 EA분획물에 의한 변화를 측정할 결과 특히 MMP-9이 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이는 연골조직에서 MMP 합성 및 활성화에 의해 파괴된 항상성을 갈근 EA분획물이 그 항상성을 유지

시키고 균형을 이루게 하여 연골 특이적 ECM 단백질을 정상적으로 합성함을 의미한다.

이런 골관절염 항염증 및 관절조직 분해효소 억제 작용뿐만 아니라, 진통에서도 우수한 효능이 있음을 확인하였다. 갈근 EA분획물이 세포수준에서 통증유발을 증가시킨 음성 대조군(CM)에 비교해 통증유발 물질인 PGE₂를 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 4, Fig. 5). 또한, 마우스를 이용한 초산 통증유발 실험에서도 갈근 EA분획물에서 대조군(control)에 비하여 농도의존적인 진통 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 7).

이상과 같은 결과로 보아 갈근의 70% ethanol 추출물 중 ethyl acetate 분획물(EPR)은 기존에 잘 알려진 항산화 작용뿐만 아니라, 소염 및 진통 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 특히, 갈근은 식품 원재료로서 전래적인 식생활이나 통념상 널리 이용되어져 왔으며, 지금까지 특별한 부작용이 보고된 적이 없어 단일 합성 의약품의 복용으로 발생하는 안전성 문제를 지니지 않을 것으로 사료된다. 실험동물에 이용한 골재생 효능 검색 등 좀더 세밀한 약리 기전 연구가 수행된다면 천연물신약 개발의 경비 및 시간을 단축시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

갈근(*Puerariae Radix*)의 70% ethanol 추출물 중 ethyl acetate 분획물(EPR)은 염증성 cytokine을 처리한 마우스 대식세포 및 토끼 연골조직세포에서 염증을 발현과 관련된 NO 생성 저해효과를 보였고, 관절조직의 주요 성분 중 하나인 proteoglycan의 분해 억제효과와 관절조직 분해효소인 MMP-9의 활성이 억제되었다. 또한, 통증유발물질인 프로스타글란딘의 유의성 있는 감소를 보여 통증억제 효과가 있음을 확인하였을 뿐만 아니라 초산 유발 진통 효과테스트인 동물 모델에서도 효과적으로 통증을 억제함을 확인하였다. 즉, 갈근의 70% ethanol 추출물 중 ethyl acetate 분획물(EPR)은 독성의 문제뿐만 아니라, 소염, 진통 효과 및 연골 조직세포의 분해를 억제하는 다양한 효과를 나타내는 장점을 지니고 있어 관절염 치료제의 훌륭한 후보약재가 될 것으로 기대된다.

문 헌

1. 박용범. 2002. 골관절염의 내과적 치료. 대한내과학회지 63: S436-S443.
2. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. 1994. *Harrison's principles of internal medicine*. 13th ed. McGraw-Hill Inc, New York. p 1543.
3. Flower RJ. 1999. New directions in cyclooxygenase research and their implications for NSAID-gastripathy. *Ital J Gastroenterol* 28(4): 23-27.
4. Nam KW, Je KG, Lee JG, Han HJ, Kang SK, Mar WC.

2003. Inhibition of COX-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) production by water-soluble sub-fractionated parts from bee (*Apis mellifera*) venom. *Arch Pharm Res* 26: 383-388.
5. Badger AM, Cook MN, Swift BA, Newmantraa TM, Gowen M, Lark M. 1999. Inhibition of interleukin-1 induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, hymentialdisine. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 587-593.
 6. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, Russel RGG. 1984. Stimulation by human IL-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblast in vitro. *Biochem Biophys Acta* 797: 186-193.
 7. Westacott CI, Sharif M. 1996. Cytokines in osteoarthritis: Mediators or markers of joint destruction. *Semin Arthritis Rheum* 25: 254-272.
 8. Lee SH, Seo GS, Sohn DH. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by butein in RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 125-132.
 9. Park BJ, Cho MG, Kim KG, Lee SK, Lee CS, An GH, Mar WC. 1999. Effect of natural product on the inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAQ 264.7 cell culture system. *Natural Product Sciences* 5(3): 113-120.
 10. Kim HT, Ahn JS, Jeong IH. 1996. Subacute toxicity of SKI306X, an anti-inflammatory herbal extract, in rats. *J Applied Pharmacol* 1: 19-31.
 11. Sandy JD, Brwon HLG, Lowther DA. 1978. Degradation of proteoglycan in articular cartilage. *Biochem Biophys Acta* 543: 539-544.
 12. Moon YH, Go JJ, Park JY. 1999. The anti-inflammatory and analgesic activities of Gumiganghwaltang. *Kor J Pharmacogn* 30: 18-24.
 13. Ha HK, Lee JH, Kim CS. 2000. Extracts of *Rheum undulatum* L. inhibits COX-2 activities in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 cells. *J Applied Pharmacol* 8: 73-77.
 14. Kim JY, Park SW. 2004. Effect of geraniol on the proliferation of L1210 cells and ICR mouse macrophages, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activities. *Yakhak Hoeji* 48: 309-316.
 15. Lee SJ. 1980. *Bonchokangmok*. Komunsa, Seoul. Vol 18, p 537.
 16. Hur J. 1984. *Donguibokam*. Mansandong, Seoul. Vol 3, p 726.
 17. Zeng GY, Cheng YS, Fan LL, Zhou YP, Zhang LY. 1982. Pharmacologic studies on *Radix puerariae*: effects of puerariae flavones on coronary circulation, cardiac hemodynamics and myocardial metabolism in dogs. *Chinese Med J* 95: 145-150.
 18. Huh LH, Kim HC, Lee SJ. 1987. Studies on anti-inflammatory activity and its mechanism of daidzein. *J Pharmaceut Soc Kor* 31: 164-163.
 19. Oh MJ, Lee KS, Son HY, Kim SY. 1990. Antioxidative components of Pueraria root. *J Kor Soc Food Sci Tech* 22: 793-795.
 20. Lee CH, Han SH, Min SG. 1995. The effects of Puerariae radix actechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J Korean Soc Food Nurt* 24: 713-719.
 21. Lee JS, Kim ES, Kim SW. 1999. Effects of extract of *Pueraria radix* on lipid peroxidation in ethanol-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nurt* 28: 901-906.
 22. Lin RC, Guthrie S, Xie CY, Mai K, Lee DY, Lumeng L, Li TK. 1996. Isoflavone compounds extracted from *Pueraria lobata* suppress alcohol preference in a pharmacogenetic rat model of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 659-663.
 23. Park KH, Koh DS, Lim YH. 2001. Anti-asthmatic compound with leukotriene D4 antagonism isolated from Puerariae radix. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 38-39.
 24. 심상용. 1983. 약이 되는 자연식. 창조사, 서울. p 142.
 25. Moon TC, Chung KC, Son KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW. 1998. Screening of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors from natural products. *Yakhak Hoeji* 42: 214-219.
 26. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-355.
 27. Liang Y, Huang Y, Tsai S, Lin-Shiau S, Chen C, Lin J. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20: 1645-1652.
 28. Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 58: 759-765.
 29. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T. 2002. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Letters* 176: 17-23.
 30. Husain SR, Cillard J, Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489-2491.
 31. Lee OH. 2004. Effects of supplementation of *Puerariae radix* ethanol extract on the antioxidative defense system in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 872-880.
 32. Elliott S, Cawston T. 2002. The clinical potential of matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic disorders. *Drug Aging* 18: 87-99.
 33. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada J. 1992. Increased concentrations of nitric synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 51: 1219-1222.

(2005년 10월 17일 접수; 2005년 12월 30일 채택)