

## 柘木의 콜라겐유도 생쥐 관절염에 대한 억제효과

최정호, 한효상, 이영종\*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

### The Inhibitory Effect of Cudrania Lignum on the Collagen-induced Arthritis in Mice

Jeong-Ho Choi, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee\*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

#### ABSTRACTS

**Objectives** : The present study purposed to examine the effect of Cudrania Lignum, which is the wooden part of *Cudrania tricuspidata* Bureau (Moraceae), on cytokine secretion from the joint cells of mice with arthritis induced by collagen and verify its efficacy against rheumatoid arthritis.

**Methods** : We prepared the hot-water extract, ethanol extract and methanol extract of Cudrania Lignum, and tested their effects on cytokine secretion from the joint cells of mice with arthritis induced by collagen.

**Results** : 1. Cudrania Lignum reduced the secretion of inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , INF- $\alpha$  and IL-6 from joint cells.  
2. The effect for reducing the secretion of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 was strong in order of methanol extract, ethanol extract and hot water extract.  
3. Considering the effect on cytokine secretion, the effective element is soluble in organic solvent, and is not volatile.  
4. The ethanol extract and methanol extract of Cudrania Lignum lowered the survival rate of cells significantly, but still the survival rate was over 92%, suggesting the low toxicity of the extracts.

**Conclusions** : Cudrania Lignum is considered effective for rheumatoid arthritis, and the effective element is considered soluble in organic solvent.

**Key words** : *Cudrania tricuspidata* Bureau, Cudrania Lignum, rheumatoid arthritis

#### 서 론

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau (뽕나무과 Moraceae)는 황해도 이남에서 자라는 落葉小喬木 또는 灌木으로서 가지에 가시가 있으며 小枝에 털이 있다<sup>1)</sup>. 꾸지뽕나무는 《本草拾遺》에 “柘木”이라는 이름으로 처음 수재되었으며<sup>2)</sup>, 《大觀本草》<sup>3)</sup>에 “柘木 味甘, 溫, 無毒. 主補虛損. 取白皮及東行根白皮, 煮汁釀酒, 主風虛耳聾, 勞損虛羸瘦, 腰腎冷, 夢與人交接泄精者. 取汁服之, 無刺者良. 木主婦人崩中血結, 及主瘡疾, 兼堪染黃”이라고 한 바와

같이 樹皮와 根皮 및 木質部를 두루 약용으로 하였음을 알 수 있다.

꾸지뽕나무의 목재를 柘木, 뿌리를 穿破石이라 하고, 코르크층을 벗긴 樹皮 혹은 根皮를 柘木白皮, 열매를 柘樹果實, 가지와 잎은 柘樹莖葉이라 하는데, 木質部인 柘木은 虛損과 婦女崩中血結, 瘡疾을 다스리고, 뿌리인 穿破石은 祛風通絡, 清熱除濕, 解毒消腫의 효능이 있으며, 柘木白皮는 補腎固精, 利濕解毒, 止血, 化瘀의 효능이 있고, 柘樹果實은 清熱涼血, 舒筋活血, 柘樹莖葉은 清熱解毒, 舒筋活絡의 효능이 있다고 하였다<sup>2)</sup>.

\* 교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr  
· 접수 : 2009년 8월 25일 · 수정 : 2009년 9월 22일 · 채택 : 2009년 9월 23일

꾸지뽕나무의 성분으로 kaempferide 7-O-β-D-glucopyranoside, naringenin 7-O-β-D-glucopyranoside 등의 플라보노이드<sup>4)</sup>가 있으며, 동속 근연식물인 가시꾸지뽕나무(枸棘, *C. cochinchinensis* Lour. Kudo et Masam)의 성분으로는 cudraisoiflavone-A<sup>5)</sup>, gerontoxanthone<sup>6)</sup>, cudraphenone, cudraxanthone(P~R)<sup>7)</sup> 등이 있다. 한편 꾸지뽕나무의 생리활성으로는 polyphenolic compound의 항산화작용<sup>8)</sup>, 꾸지뽕나무 전탕액의 혈압강화작용<sup>9)</sup>, 플라보노이드 성분의 항균작용<sup>10)</sup>과 그밖에 당뇨병<sup>11,12)</sup>, 동맥경화방지와 항염증작용<sup>13)</sup>이 보고되었다.

최근 노령 인구의 증가와 함께 노화로 인한 퇴행성 질환과 동맥경화증, 고혈압, 당뇨 등의 만성 성인병이 증가함에 따라 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 꾸지뽕나무를 우리 민간에서는 예부터 그 줄기와 뿌리를 신경통과 간암 등에 달여 마신 점으로 보아<sup>14)</sup>, 퇴행성 관절질환에도 유의한 효과가 있을 것으로 사료되나 아직 이에 대한 실험적 연구는 보고되지 않고 있다.

이에 저자는 꾸지뽕나무의 木質部인 柘木이 관절 질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고자, collagen으로 관절염을 유발한 생쥐에 이의 추출액을 투여하여 류마티스 관절염과 관련된 여러 cytokine들의 변화를 관찰한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 6~7주령의 웅성 DBA/1J 생쥐를 Slc (Japan)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온(22±2°C)에서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 약재

실험에 사용한 柘木(*Cudrania Tricuspidatae* Lignum, 이하 CL로 표기)은 2005년 10월 전북 부안군에서 채제한 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata* Bureau)의 木質部를 채취하여 사용하였다.

#### 3) 시약 및 기기

##### (1) 시약

Reagents	Company	Nation
DMEM medium		
D-phosphate buffer saline(D-PBS)		
Chloroform, RPMI-1640 medium	Sigma	USA
Collagenase, EtOH, MeOH		
Collagen type II		
Complete Freund's adjuvant (CFA)	Chondrex	USA
Fetal bovine serum(FBS)	Hyclone	USA
methyl3H (Thymidine)	Amersham	USA
IL-6 ELISA KIT,		
TNF-α ELISA KIT IL-1β ELISA KIT	R&D	USA

##### (2) 기기

Machinery	Company	Nation
Rotary evaporator	Eyela	Japan
Centrifuge	Hanil	
Homogenizer	OMNi	USA
Plate shaker	Lab-Line	
ELISA reader	Taran	Canada
Ice maker	Vision science	
Cytological centrifuge	Hanil	Korea
Pulverizer	Rong tsong	Taiwan

## 2. 방법

### 1) 검체의 준비

#### (1) 전탕 및 알코올 추출

전탕은 柘木을 조말한 100 g에 1 L의 증류수를 가하고 약탕기(웅진약탕기, 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓인 다음 여과지로 여과한 후 감압증류장치를 이용하여 농축하여 건조분말 25.0 g을 얻었다. 알코올추출액은 柘木을 조말한 100 g에 1L의 80% EtOH 또는 80% MeOH을 가하고 환류냉각장치를 이용하여 70°C에서 3시간 동안 추출한 다음 여과지로 여과한 후 감압 증류하여 농축하고, 냉동건조기를 사용하여 에탄올 추출분말 2.0 g, 메탄올 추출분말 4.7 g을 얻었다.

#### (2) 전탕액 분획 추출

柘木 전탕액의 분말을 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하였다. 전탕 분말 20 g에 증류수 400 ml를 가하여 극성이 다른 여러 용매인 *n*-hexane, ethyl ether (EtOEt), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)을 이용하여 단계적으로 분획하였으며, 각 분획별로 16.5%, 7.0%, 3.0%, 25.0%의 건조추출물을 얻었으며, 마지막으로 남은 물층은 25.5%이었다. 극성에 의해 얻어진 분획 생성물들은 감압증류장치를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 냉동 건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

### 2) 세포 독성 측정

6주령 웅성 DBA/1J 생쥐의 비장 조직과 림프절을 곱게 갈아서 RPMI1640 media를 첨가하여 세척한 후 RBC lysis buffer를 첨가 하고 4°C에서 약 5분간 incubation하였다. RPMI 1640 media에 10%의 FBS와 항생제를 처리한 complete media를 이용하였으며, 세척하여 얻은 면역세포를 실험에 사용하였다. 분획별로 얻은 약물을 1%로 희석하여 분리한 면역세포에 첨가한 후 72시간 동안 36°C에서 배양하였다. 세포증식을 활성화시키기 위하여 anti-CD3/CD28을 처리하였다. 배양된 세포를 harvest하기 12~18시간 전에 1μCi의 [3H]-thymidine을 처리하였다. 세포를 beta-counter에 사용하는 safe cuvette에 500 μl씩 분주한 다음 cocktail solution을 2 ml첨가 한 후, thymidine의 uptake를 beta-counter로 확인하였다.

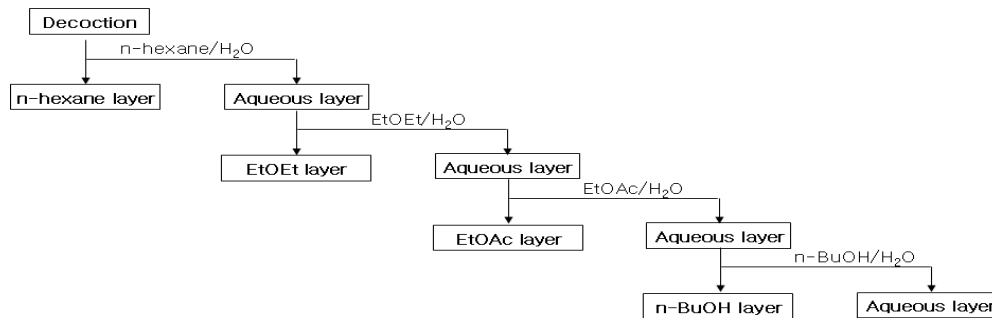


Fig. 1. Procedure for fractionation using several solvents from the decoction prepared from Cudrania Lignum

3) Collagen 유도 관절염 생쥐 모델

Collagen type II (CII)를 0.05N acetic acid로 녹여 2 mg/ml의 농도로 만들고, 같은 양의 Freund's complete adjuvant (FCA)를 혼합하여 2 ml로 만들어, CII의 농도가 1 mg/ml이 되도록 하였다. 이후 2차례(0일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1 ml의 CII를 실험동물의 꼬리 기저부에 접종하여 콜라겐유도관절염(Collagen-induced arthritis, CIA) 모델을 만들었다. 실험이 완료되는 12주 후에 관절염이 유도된 동물들의 관절 및 비장을 적출하여 세포를 분리하여 실험에 사용하였다<sup>15)</sup>.

4) 관절세포의 분리 및 배양

관절염이 유도된 CIA mouse의 관절을 분리하여 4°C에 보관했던 PBS로 3회 세척하고 15 ml tube에 관절을 잘게 분쇄하여 넣었다. Free-DMEM 3 ml를 첨가하고, collagenase를 30 µl을 첨가한 후에, 37°C에서 30분 동안 incubation하며 shaking한 다음 supernatant를 새로운 15 ml tube에 모았다. 이와 같은 방법을 2~3회 반복 실시한 후에, supernatant를 5분간 1,000 rpm에서 centrifuge하였다. 여기에서 얻은 세포는 PBS로 한 차례 washing한 후, DMEM에 10% FBS와 antibiotics (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가한 media에 배양하였다. 이때 관절세포의 활성을 돕기 위하여 anti-mouse IL-1β, anti-mouse IL-6 또는 anti-mouse TNF-α 항체를 처리하고 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 원심 분리하여 상층액만을 분리하여 ELISA로 분석하였다.

5) 통계처리

통계는 Student t-test로 하였으며, p<0.05일 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다. 정상군에 대한 대조군의 유의성은 '+' 로, 대조군에 대한 각 처리군의 유의성은 '\*'으로 표시하였다.

성 적

1. 수율

柘木(CL)을 전탕하여 얻은 분말을 동일 양으로 분획하

였을 때, 각각의 유기 용매에서 얻은 분획 수율을 계산하였다. 柘木 전탕액의 점성으로 인하여 -80°C에서 결빙한 후에 분말을 수득하였다. Aqueous 분획에서 가장 높은 수율을, EtOAc 분획에서 가장 낮은 수율을 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Yield of Various Fraction Extracts from Cudrania Lignum

	n-hexane	EtOEt	EtOAc	n-BuOH	Residue
Yield(%)	16.5	7	3	25	25.5

n-hexane : n-hexane fraction extract of Cudrania Tricuspidatae Lignum decoction.  
 EtOEt : Ethyl ether fraction extract of Cudrania Lignum decoction.  
 EtOAc : Ethyle acetate fraction extract of Cudrania Lignum decoction.  
 n-BuOH : n-Btanol fraction extract of Cudrania Lignum decoction.  
 Residue : Residue fraction extract of Cudrania Lignum decoction.

2. 세포 독성

각 추출액의 면역세포에 대한 독성을 검사하기 위하여, 비장조직 및 림프절로부터 준비한 정상세포를 사용하여 柘木의 전탕, 에탄올 추출물 및 메탄올추출물의 세포의 증식에 영향을 검사하였다. 생쥐의 비장조직과 림프절에서 얻은 세포를 배양하는 동안 전탕, 에탄올 추출물 및 메탄올추출물로부터 준비된 분말을 1.0%의 농도로 첨가

Table 2. Cell Proliferation in Mice Cell Culture with Various Extracts (1%) of Cudrania Lignum

Unit	Counts/min (CPM; M±SE)	Cell viabilities (%; M±SE)
Control	645,311±4,847	100.0±0.8
Decoction	609,260±15,893	94.4±2.5
EtOH-extract	593,553±8,637	92.0±1.3**
MeOH-extract	597,165±3,429	92.6±0.5**

The cell number was determined using β-counter.  
 Control : The cells were cultured without extract.  
 Decoction : The cells were cultured with decoction(hot-water extract).  
 EtOH-Extract : The cells were cultured with ethanol-extract.  
 MeOH-Extract : The cells were cultured with methanol-extract.  
 \*\* : p<0.01 compared with control.

하여 배양한 다음, 살아있는 세포 수를 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 생존세포 수와 비교하였을 때, 배양 후 세포 수는 전탕 첨가시는 94.4%, 에탄올추출물 첨가시는 92.0%, 그리고 메탄올추출물 첨가시에는 92.6%의 생존율을 보였다. 대조군과 비교하여 전탕 첨가시는 유의한 차이가 없었으나, 에탄올추출물 및 메탄올추출물 첨가시에는 유의하게 생존율이 저하되었다( $p<0.01$ )(Table 2).

### 3. 관절세포의 cytokine 생성에 대한 영향

콜라겐유도관절염(Collagen-induced arthritis, CIA)이 유발된 동물의 관절세포에서는 interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tissue necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 및 interleukine-6 (IL-6) 등 cytokines의 생성이 증가한다고 알려져 있는 점을 고려하여, 柘木추출물이 콜라겐유도관절염을 유도한 생쥐 관절세포에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6 등의 cytokines 생성에 대한 영향이 있는지를 검사하였다. 콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐의 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 준비된 전탕, 80% 에탄올추출물 및 80% 메탄올추출물 등 柘木추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6의 cytokine 생성정도를 상호 비교하여 검사하였다.

#### 1) Interleukine-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 생성에 대한 영향

IL-1 $\beta$  생성에 대한 영향을 ELISA로 분석한 결과는 다음과 같았다. 콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 흡광치(Abs at 450)는 0.098인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.003으로서 정상군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성이 현저하게 증가하였다( $p<0.01$ ). 관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 柘木의 전탕(decoction), 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 각각 첨가한 경우에는 흡광치가 0.885, 0.775 및 0.775였다. 대조군과 비교하였을 때, 전탕 첨가시는 IL-1 $\beta$  생성량에서 유의한 차이가 없

Table 3. The Effect of Cudrania Lignum on the Level of IL-1 $\beta$  in the Knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice

Samples	IL-1 $\beta$ (A450, M $\pm$ SE, n=3)
Normal	0.098 $\pm$ 0.006
Control	1.003 $\pm$ 0.040 <sup>++</sup>
Decoction	0.885 $\pm$ 0.048
Ethanol-extract	0.775 $\pm$ 0.032*
Methanol-extract	0.775 $\pm$ 0.049*

Normal : The normal cells were cultured without extract.

Control : The arthritic cells were cultured without extract.

Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction.

Ethanol-Extract : The arthritic cells were cultured with ethanol-extract.

Methanol-Extract : The arthritic cells were cultured with methanol-extract.

++ :  $p<0.01$  compared with normal.

\* :  $p<0.05$  compared with control.

없었으나, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 첨가한 경우에는 대조군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성량이 유의하게 저하되었다( $p<0.05$ )(Table 3).

#### 2) Tissue necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 생성에 대한 영향

콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐의 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 준비된 전탕, 80% 에탄올추출물 및 80% 메탄올추출물 등 柘木추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, TNF- $\alpha$  생성량을 ELISA로 분석하였다. 대조군의 TNF- $\alpha$  생성량은 정상군에 비하여 현저하게 증가하였다( $p<0.01$ ). 대조군의 흡광치는 1.130, 전탕, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 각각 첨가한 경우에는 흡광치가 0.945, 0.768 및 0.679였다. 대조군과 비교하였을 때, 柘木의 전탕, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 각각 첨가한 경우 모두 TNF- $\alpha$  생성이 현저하게 감소되었다( $p<0.01$ )(Table 4).

Table 4. The Effects of Cudrania Lignum on the Levels of TNF- $\alpha$  in the Knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice

Samples	TNF- $\alpha$ (A450, M $\pm$ SE, n=3)
Normal	0.105 $\pm$ 0.008
Control	1.130 $\pm$ 0.035 <sup>++</sup>
Decoction	0.945 $\pm$ 0.013 <sup>**</sup>
Ethanol-extract	0.768 $\pm$ 0.029 <sup>**</sup>
Methanol-extract	0.679 $\pm$ 0.040 <sup>**</sup>

Normal : The normal cells were cultured without extract.

Control : The arthritic cells were cultured without extract.

Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction.

Ethanol-extract : The arthritic cells were cultured with ethanol-extract.

Methanol-extract : The arthritic cells were cultured with methanol-extract.

++ :  $p<0.01$  compared with normal.

\*\* :  $p<0.01$  compared with control.

#### 3) Interleukine-6 (IL-6) 생성에 대한 영향

콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐의 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 준비된 전탕, 80% 에탄올추출물 및 80% 메탄올추출물 등 柘木추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, Interleukine-6 (IL-6) 생성량을 ELISA로 분석하였다. 정상군의 흡광치는 0.203이었고, 대조군의 흡광치는 0.997로 정상군에 비하여 IL-6 생성이 현저하게 증가하였다( $p<0.01$ ). 전탕, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 각각 첨가한 경우에는 흡광치가 0.299, 0.301 및 0.155였다. 대조군과 비교하였을 때, 柘木의 전탕, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 각각 첨가한 경우 모두 IL-6 생성이 현저하게 감소되었으며( $p<0.01$ ), 감소된 정도는 메탄올추출물, 에탄올추출물 그리고 전탕의 순서로 강하였다(Table 5).

**Table 5. The Effects of Cudrania Lignum on the Levels of IL-6 in the Knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice**

Samples	IL-6 (A450, M±SE, n=3)
Normal	0.203±0.008
Control	0.997±0.067 <sup>++</sup>
Decoction	0.299±0.030 <sup>**</sup>
Ethanol-extract	0.301±0.074 <sup>**</sup>
Methanol-extract	0.155±0.015 <sup>**</sup>

Normal : The normal cells were cultured without extract.  
 Control : The arthritic cells were cultured without extract.  
 Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction.  
 Ethanol-Extract : The arthritic cells were cultured with ethanol-extract.  
 Methanol-Extract : The arthritic cells were cultured with methanol-extract.  
<sup>++</sup> :  $p < 0.01$  compared with normal.  
<sup>\*\*</sup> :  $p < 0.01$  compared with control.

#### 4. 전탕 유기용매 분획의 cytokine 생성에 대한 영향

한의학에서는 주된 약재 투여 방법이 전탕액인 점을 고려하여, 전탕액으로부터 *n*-hexane, ethyl ether, ethyl acetate, *n*-butanol 등의 유기용매를 사용하여 단계적으로 분획하여 각 분획의 cytokine 분비에 대한 영향을 검사하였다. 준비된 각 분획을 농축 및 냉동 건조한 다음, 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐의 관절세포 또는 비장세포의 배양에 미치는 영향을 조사하였다.

##### 1) 관절세포의 Interleukine-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) 생성에 대한 영향

IL-1 $\beta$  생성에 대한 영향을 ELISA로 분석한 결과는 다음과 같았다. 콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상

**Table 6. The Effect of Cudrania Lignum on the Level of IL-1 $\beta$  in the Knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice**

Samples	IL-1 $\beta$ (A450, M±SE, n=3)
Normal	0.098±0.006
Control	1.003±0.040 <sup>++</sup>
Decoction	0.885±0.048
Hexane-fraction	0.884±0.015
EtOEt-fraction	0.847±0.004 <sup>*</sup>
EtOAc-fraction	0.842±0.039 <sup>*</sup>
BuOH-fraction	1.015±0.057 <sup>*</sup>
Residue	1.062±0.032

Normal : Normal cells were cultured without sample.  
 Control : Arthritic cells were cultured without sample.  
 Decoction : Arthritic cells were cultured with decoction.  
 Hexane-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-hexane-fraction.  
 EtOEt-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl ether-fraction.  
 EtOAc-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl acetate-fraction.  
 BuOH-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-butanol-fraction.  
 Residue : Arthritic cells were cultured with residue-fraction.  
<sup>++</sup> :  $p < 0.01$  compared with normal.  
<sup>\*</sup> :  $p < 0.05$  compared with control.

세포군(normal)의 흡광치(Abs at 450)는 0.098인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.003으로서 정상군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성이 현저하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 柘木の 전탕(decoction)첨가시 흡광치는 0.885, 전탕으로부터 준비된 *n*-hexane 분획 첨가시에는 0.884, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.847, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.842, *n*-butanol 분획의 경우에는 1.015, 단계별 용매추출 후 여분 분획 첨가시에는 1.062였다. Ethyl ether, ethyl acetate 및 *n*-butanol 분획 첨가시에는 대조군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성량이 유의하게 저하되었다( $p < 0.05$ )(Table 6).

##### 2) 관절세포의 tissue necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 생성에 대한 영향

관절세포의 TNF- $\alpha$  생성에 대한 영향을 ELISA로 분석한 결과는 다음과 같다. 콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 흡광치(Abs at 450)는 0.105인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.130으로서 정상군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성이 현저하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 柘木の 전탕(decoction)첨가시 흡광치는 0.945, 전탕으로부터 준비된 *n*-hexane 분획 첨가시에는 0.839, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.907, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.795, *n*-butanol 분획의 경우에는 0.803, 단계별 용매추출 후 여분 분획 첨가시의 흡광치는 0.822였다. 대조군과 비교하였을 때, 유기용매로 분리된 분획이 첨가된 모든 경우 TNF- $\alpha$  생성량이 현저하게 저하되었다( $p < 0.05$ ). 용매추출

**Table 7. The Effect of Cudrania Lignum on the Level of TNF- $\alpha$  in the knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice**

Samples	TNF- $\alpha$ (A450, M±SE, n=3)
Normal	0.105±0.008
Control	1.130±0.035 <sup>++</sup>
Decoction	0.945±0.013 <sup>**</sup>
Hexane-fraction	0.839±0.021 <sup>**</sup>
EtOEt-fraction	0.907±0.027 <sup>**</sup>
EtOAc-fraction	0.795±0.022 <sup>**</sup>
BuOH-fraction	0.803±0.024 <sup>**</sup>
Residue	0.822±0.014 <sup>**</sup>

Normal : Normal cells were cultured without sample.  
 Control : Arthritic cells were cultured without sample.  
 Decoction : Arthritic cells were cultured with decoction.  
 Hexane-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-hexane-fraction.  
 EtOEt-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl ether-fraction.  
 EtOAc-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl acetate-fraction.  
 BuOH-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-butanol-fraction.  
 Residue : Arthritic cells were cultured with residue-fraction.  
<sup>++</sup> :  $p < 0.01$  compared with normal.  
<sup>\*\*</sup> :  $p < 0.01$  compared with control.

분획들이 단계적으로 준비된 점을 고려하여 볼 때, *n*-hexane 분획 첨가시 TNF- $\alpha$  생성량이 현저하게 저하되었으며, 그 이후 분획들에 의한 TNF- $\alpha$  생성량은 큰 변이가 없었다(Table 7).

### 3) 관절세포의 Interleukine-6 (IL-6) 생성에 대한 영향

관절세포의 IL-6 생성에 대한 영향을 ELISA로 분석한 결과는 다음과 같았다. 콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 흡광치(Abs at 450)는 0.203인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.057로서 정상군에 비하여 IL-1 $\beta$  생성이 현저하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 柘木의 전탕(decoction)첨가시 흡광치는 0.807, 전탕으로부터 준비된 *n*-hexane 분획 첨가시에는 0.692, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.651, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.695, *n*-butanol 분획의 경우에는 0.7 t, 단계별 용매추출 후 여분 분획 첨가시의 흡광치는 0.844였다. 대조군과 비교하였을 때, 유기용매로 분리된 분획들 중에서 *n*-hexane 및 ethyl ether 분획이 첨가된 경우에 IL-6 생성량이 유의하게 저하되었으며( $p < 0.05$ ), 그 이후 분획들에 의한 IL-6 생성량은 유의한 변화가 없었다(Table 8).

Table 8. The Effect of Cudrania Lignum on the Level of IL-6 in the Knee Joint Cells of Collagen-induced Arthritis Mice

Samples	IL-6 (A450, M $\pm$ SE, n=3)
Normal	0.203 $\pm$ 0.008
Control	1.057 $\pm$ 0.124 <sup>++</sup>
Decoction	0.807 $\pm$ 0.022*
Hexane-fraction	0.692 $\pm$ 0.034*
EtOEt-fraction	0.651 $\pm$ 0.037*
EtOAc-fraction	0.695 $\pm$ 0.051
BuOH-fraction	0.739 $\pm$ 0.036
Residue	0.849 $\pm$ 0.068

Normal : Normal cells were cultured without sample.

Control : Arthritic cells were cultured without sample.

Decoction : Arthritic cells were cultured with decoction.

Hexane-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-hexane-fraction.

EtOEt-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl ether-fraction.

EtOAc-fraction : Arthritic cells were cultured with ethyl acetate-fraction.

BuOH-fraction : Arthritic cells were cultured with *n*-butanol-fraction.

Residue : Arthritic cells were cultured with residue-fraction.

++ :  $p < 0.01$  compared with normal.

\* :  $p < 0.05$  compared with control.

## 고찰

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau(뽕나무과 Moraceae)는 《本草拾遺》에 柘木이라는 이름으로 처음

수재되었으며<sup>2)</sup>, 《大觀本草》<sup>3)</sup>에 “柘木 味甘, 溫, 無毒. 主補虛損. 取白皮及東行根白皮, 煮汁釀酒, 主風虛耳聾, 勞損虛羸瘦, 腰腎冷, 夢與人交接泄精者. 取汁服之, 無刺者良. 木主婦人崩中血結, 及主瘧疾, 兼堪染黃”이라고 한 바와 같이, 樹皮, 根皮 및 木質部를 두루 약용으로 하였으며, 가시가 없는 것이 우수하다고 하였다.

꾸지뽕나무의 성분에 대한 연구로 박 등<sup>4)</sup>은 꾸지뽕나무의 줄기에서는 kaempferide 7-O-beta-D-glucopyranoside와 naringenin 7-O-beta-D-glucopyranoside 등의 플라보노이드를 추출하였으며, Han 등<sup>16)</sup>은 가지에서 sterol화합물과 arthocarpetin, norarthocarpetin, 5-O-methyl genistein 등을 분리하였고, Lee 등<sup>17,18)</sup>은 세포독성이 있는 dehydroflavonol인 gericudranin A~E를 분리한 바 있다. 한편 동속 근연 식물인 가시꾸지뽕나무(枸棘) *C. cochinchinensis* (Lour.) Kudo et Masam.으로부터 Sun 등<sup>5)</sup>은 cudraiso-flavone-A를, Chang 등<sup>6)</sup>은 8개의 gerontoxanthone을 그리고 Hou 등<sup>7)</sup>은 4개의 cudraphenone과 3개의 cudraxanthone(P~R)을 분리한 바 있다.

꾸지뽕나무의 생리활성 연구를 보면 Cha 등<sup>8)</sup>은 polyphenolic compound의 항산화작용, 許<sup>9)</sup>는 꾸지뽕나무 전탕액의 혈압강화작용이 있다 하였고, 차 등<sup>19,20)</sup>은 열매 추출물은 항산화 작용, 수피추출물은 고지혈증에 영향을 미친다고 하였으며, Kim<sup>10)</sup>등은 꾸지뽕나무 잎에서 추출한 플라보노이드 성분이 황색포도상구균에 항균작용이 있다고 하였다. Chen 등<sup>11)</sup>은 당뇨병, Park 등<sup>13)</sup>은 동맥경화방지와 항염증작용, Cha 등<sup>21)</sup>은 꾸지뽕나무 잎의 수용성 추출물이 지질 농도를 저하시키는 작용이 있다고 보고하였다. Lee 등<sup>22)</sup>은 gericudranin이 인간의 tumor cell lines에 대해 세포독성이 있다고 하였고, Park 등<sup>12)</sup>은 근피가 당뇨에 효과가 있음을 보고하였으며, Seo 등<sup>23,24)</sup>은 수피의 ethylacetate 분획이 IFN- $\gamma$ 나 LPS에 의해 발현된 RAW 264.7 macrophage에 의해 생성되는 nitric oxide의 생성을 억제하며 human leukemia 세포의 괴사를 일으킨다고 보고하였다.

이에 저자는 꾸지뽕나무가 퇴행성 관절질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고자, 꾸지뽕나무의 木質部인 柘木을 전탕추출, 에탄올추출 및 메탄올추출하고, CIA 동물에서 적출한 관절 세포에 柘木추출물들을 각각 처리하여 류마티스 관절염과 관련된 여러 cytokine들의 변화를 관찰하였다.

Collagen은 척추동물 체내 단백질의 30% 정도를 차지하는데, 주로 피부, 골, 연골, 평활근 및 기저판 등에 존재하며<sup>25)</sup>, 그 중 제II형 collagen은 연골조직에 국한되어 주로 연골, 귀, 추간판, 초자체, 각막, 망막 등에 존재한다.<sup>26)</sup> 제II형 collagen을 쥐에게 피내주사하면 관절염이 유발됨을 1977년 Trendem 등이 처음 보고한 이래, 설치류에서의 제II형 CIA는 임상적·조직학적·면역학적으로 사람의 류마티스 관절염과 유사함이 인정되어 이 질환의 병태연구에 많이 이용되고 있다.<sup>27)</sup>

본 연구에서는 mouse에 제II형 collagen을 주사하여

콜라겐유도관절염(CIA, collagen-induced arthritis)을 유발시킨 다음, 관절조직을 적출하여 세포를 분리하여 배양하면서 柘木의 추출물들을 처리하여 면역세포에 대한 영향을 검사하고자 하였다. 이를 위하여 콜라겐유도관절염이 유발된 관절세포를 분리한 다음 배양하면서 柘木추출물을 처리하여 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등 cytokines의 분비에 대한 영향을 검사하였다.

Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )는 임파구에 작용하여 감염에 대한 숙주의 급성기 반응의 다양한 작용을 매개함으로써 생체방어에 중요한 역할을 담당하며<sup>28)</sup>, tissue necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 류마티스 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, 연골세포에 작용해서 PGE2와 collagenase 생산을 촉진하고<sup>29)</sup>, IL-6은 IL-1과 TNF- $\alpha$ 에 의해 분비를 촉진한다. 이와 같이, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 는 대표적인 염증유발 cytokines으로 관절의 활액세포(synovial cell)에서 과잉 생산되어 활액세포의 증식을 촉진한다<sup>28)</sup>.

본 연구에서는 콜라겐유도관절염(CIA, collagen-induced arthritis)이 유도된 생쥐의 관절세포를 분리하여 柘木의 전탕, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 처리하여 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성에 대한 영향을 검사하였다. 그 결과, 전탕은 IL-1 $\beta$  생성에는 유의한 영향이 없었으나, TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성은 감소하였고, 에탄올추출물과 메탄올추출물은 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 모두 감소시켰으며, 그 감소된 정도는 메탄올추출물, 에탄올추출물 그리고 전탕의 순서로 강하였다. 이와 같은 결과는 柘木에는 관절세포의 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하는 성분이 있으며, 그 성분은 물보다는 알코올, 특히 메탄올에 보다 잘 용해되는 물질임을 시사하였다.

한편 TNF- $\alpha$ , IL-6의 생성억제에 대한 활성이 에탄올추출물보다 메탄올추출물이 훨씬 더 강하였다. 이러한 결과는 柘木에 함유된 염증완화에 대한 유효성분이 한 물질이 아니라 여러 물질일 수도 있음을 시사하였다.

또 한의학에서 주된 약재 투여방법이 전탕액인 점을 고려하여, 전탕액으로부터 *n*-hexane, ethyl ether, ethyl acetate, *n*-butanol 등의 유기용매를 순차적으로 사용하여 전탕에 함유되어 있는 성분들을 분리하여 각 분획의 cytokine 생성에 대한 영향을 검사하였다. 각 분획을 농축 및 냉동 건조한 다음, 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐의 관절세포를 배양할 때 첨가하여 그 영향을 검사하였다. 결과에서 언급한 바와 같이, 전탕으로부터 첫 번째 유기용매로 분리된 *n*-hexane 분획은 관절세포의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  및 IL-6 등 cytokines의 생성을 감소시켰다. 그러나 *n*-hexane분획으로부터 ethyl ether, ethyl acetate, *n*-butanol 등의 유기용매를 사용하여 순차적으로 성분을 분리한 모든 분획에서 cytokines의 생성에 대한 영향이 *n*-hexane 분획보다 더 강하지는 않았으며, 오히려 그 영향이 약해지는 경우도 있었다.

세포 독성 실험에서 에탄올추출물과 메탄올추출물이 유의하게 세포생존율을 저하시켰으나, 그 생존율은 92%

이상으로 나타나 독성이 매우 미약한 것으로 판단되므로, 柘木을 과량으로만 사용하지 않는다면 큰 문제는 되지 않는다고 사료된다.

## 결론

柘木의 전탕추출물, 에탄올추출물 및 메탄올추출물을 콜라겐으로 관절염을 유발시킨 생쥐의 관절 세포에 처리하여 cytokine 분비에 대한 영향을 검사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 柘木은 관절세포의 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 등 염증성 cytokines 생성을 감소시켰다.
2. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 생성감소효과는 메탄올추출물, 에탄올추출물, 전탕추출물의 순서로 강하였다.
3. Cytokines 생성에 대한 영향을 고려할 때, 유효성분은 유기용매에 용해성이며, 휘발성 물질이 아니다.
4. 柘木의 에탄올추출물과 메탄올추출물이 유의하게 세포생존율을 저하시켰으나 그 생존율이 92% 이상으로 독성은 미약하였다.

이와 같은 결과는 柘木이 류마티스 관절염에 유효하며, 유효성분은 유기용매에 용해성이라고 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 경원대학교 연구비 지원을 받았으며 이에 감사드린다.

## 참고문헌

1. 이창복. 대한식물도감. 서울 : 향문사. 1982 : 285.
2. 國家中醫藥管理局 中華本草編委會. 中華本草. 卷2. 上海 : 上海科學技術出版社. 1999 : 518-20.
3. 唐慎微 著. 尙志鈞 點校. 大觀經史證類備急本草. 合肥 : 安徽科學技術出版社. 2003 : 532.
4. 박종철, 양한석, 최재수. 한국산 꾸지뽕나무의 성분. 약학회지. 1992 ; 36(1) : 40-5.
5. Sun NJ, Chang CJ, Cassidy JM. A Cytotoxic isoflavone from *Cudrania cochinchinensis*. Phytochemistry. 1996 ; 27(3) : 951, 952.
6. Chang CH, Lin CC, Hattory M, Namba T. Fourprenylated xanthenes from *Cudrania cochinchinensis*. Phytochemistry. 1989 ; 28(2) : 595-8.
7. Hou A, Fukai T, Shimazaki M, Sakagami H, Sun H, Nomura T. Benzophenones and xanthenes with isoprenoid groups from *Cudrania cochinchinensis*. J. Natural Products. 2001 ; 64(1) : 65-70.

8. Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1999 ; (28) : 1310-5.
9. 許泰永, 柘木 煎湯液이 酸化窒素 依存型 高血壓 白鼠의 血壓에 미치는 影響. 원광대학교 대학원 석사 학위논문. 2005.
10. Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1993 ; (22) : 68-72.
11. Chen F, Nakashima N, Kimura I, Kimura M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium mori*) and cortex *mori radiceis* in streptozotocin-induced diabetic mice. Yakugaku Zasshi. 1995 ; (115) : 476-82.
12. Park WY, Ro JS, Lee KS. Hypoglycemic effect of *Cudrania tricuspidata* root bark. Kor J Pharmacogn. 2001 ; 32(3) : 248-52.
13. Park KH, Park YD, Han JM, Im KR, Lee BW, Jeong IY, Jeong TS, Lee WS. Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. Bioorg Med Chem Lett. 2006 ; 16(21) : 5580-3.
14. 차재영, 조영수. 꾸지뽕나무 열매 추출물의 항산화 활성. 한국식품영양과학회지. 2001 ; 30(3) : 547.
15. Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Canas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2005 ; 7(5) : R1034-45.
16. Han SY, Park JH, Park HJ and Choi JS. Chemical Study on the Stem of *Cudrania tricuspidata*. Arch. Pharm Res. 1989 ; 12(1) : 39-41.
17. Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim WM, Yoo ID. Two benzylated dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. J Natural Product. 1995 ; 58(10) : 1614-7.
18. Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim WM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. Phytochemistry. 1996 ; 41(1) : 231-6.
19. Cha JY, Cho YS. Antioxidative Activity of Extracts Fruit of *Cudrania tricuspidata*. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2001 ; 30(3) : 547-51.
20. Cha JY, Kim DJ, Cho YS. Effect of stem Bark Extract from *Cudrania tricuspidata* on the Concentrations of Lipid and Lipid Peroxidation in Rats Fed a Cholesterol Diet. Korean Journal of Life Science. 2001 ; 11(4) : 328-34.
21. Cha JY, Kim HJ, Jun BS, Cho YS. Effect of water extract of leaves from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentration of serum and liver in rats. Agric. Chen Biotechnol. 2000 ; (43) : 303-8.
22. Lee IK, Kim CJ, Song KS, Kim WM, Koshino H, Uramoto M, Yoo ID. Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from *Cudrania tricuspidata*. Phytochemistry. 1996 ; 41(1) : 213-6.
23. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 Macrophages stimulated with interferin-gamma and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol. 2000 ; 35(1) : 21-8.
24. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Chung HT, Jang KK, Kwon TO. Ethyl acetate extract of the stem bark of *Cudrania tricuspidata* induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Am J Chin Med. 2001 ; 29(2) : 313-20.
25. Morgan K et al. Native type II collagen induced arthritis in the rat. Incidence and humoral response to collagen. Annals of the Rheumatic Disease. 1980 ; 39 : 285-90.
26. 김노경. 내과학. 서울 : 고려의학. 1998 : 877, 878.
27. Trendam DE et al. Autoimmunity to type II collagen. An experimental model of arthritis in rats. J EXP Med. 1997 ; 146 : 857-68.
28. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울 : 지구문화사. 1997 : 63, 118, 120-8, 175-87.
29. 강제성 외. 세포분자면역학 5판. 서울 : 범문사. 2004 : 243-53, 261-9, 423.