

穿破石이 콜라겐유도 생쥐관절염에 미치는 억제효과

조영두, 한효상, 이영종*

경원대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory Effect of *Cudraniae Tricuspidatae Radix* on Collagen-induced Arthritis in Mice

Young-Du Cho, Hyo-Sang Han, Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : The present study was conducted to examine the effect of *Cudraniae Tricuspidatae Radix*(CTR), which is the radix part of *Cudrania tricuspidata* Bureau, on cytokine secretion from the joint cells and spleen cells of mice with arthritis induced by collagen and verify its efficacy against rheumatoid arthritis.

Methods : Three kinds of extract were prepared from CTR through extraction with hot-water and ethanol. The levels of cytokine secreted from the cells were measured, after the mice knee joint cells were cultured with each extract.

Results : The three kinds of extracts from CTR decreased the growth rate and levels of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α from knee joint cells of mice. All of the organic-soluble fraction, such as hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol, and residual water-soluble fraction decreased the levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and IL-10.

Conclusion : These results suggest that CTR had some effects on rheumatitis, with fat and water-solubles in organic solvent considered as the effective element.

Key words : *Cudrania tricuspidata* Bureau, *Cudraniae Tricuspidatae Radix*(CTR), rheumatoid arthritis

서론

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau (뽕나무과 Moraceae)는本草拾遺에 柘木이라는 이름으로 처음 수재되었으며,¹⁾ 大觀本草²⁾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.” 라고 하였는데, 木質部, 白皮 및 根白皮를 모두 약용부위로 사용하여 왔다.

中華本草¹⁾에는 꾸지뽕나무의 뿌리를 穿破石 또는 柘根, 木質部를 柘木이라 하였고, 코르크층을 벗긴 樹皮 혹은 根皮를 柘木白皮라 하였는데, 穿破石은 祛風通絡, 清熱除濕, 解毒消腫의 효능이 있으며, 柘木은 虛損과 婦女崩中血結, 瘡疾을 치료하고, 柘木白皮는 補腎固精, 利濕解毒, 止血, 化瘀의 효능이 있다고 하였다.

꾸지뽕나무는 황해도 이남에서 자라는 落葉小喬木 또는 灌木으로서 가지에 가시가 있으며 小枝에 털이 있으며,³⁾ 同屬 식물로 가지꾸지뽕나무(枸棘, *C. cochinchinensis* Lour. Kudo et Masam)의 뿌리도 穿破石으로 함께 약용되는데, 가지꾸지뽕나무는 常綠灌木으로 중국의 安徽, 浙江, 江西, 福建 등지에 분포하고 있다.¹⁾

꾸지뽕나무의 성분으로는 줄기에서 kaempferol, 7-O- β -D-glucopyranoside, naringenin 7-O- β -D-glucopyranoside 등의 플라보노이드 배당체⁴⁾가 보고되었고, 뿌리껍질에서 cudraxanthenes A-D 및 H-K, cudraflavanone A, cudraflavones A-D, cycloartocarpesin, populin, quercimeritrin 등이 각각 보고되었으며¹⁾, 동속 식물인 가지꾸지뽕나무(*C. cochinchinensis*)의 성분으로는 cudraiflavone A⁵⁾, gerontoxanthone⁶⁾, cudraphenones A-D, cudraxanthenes P-R⁷⁾, dehydrocostus lactone, methyl

*교신저자 : 이영종. 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 본초학교실.
· Tel : 031-750-5415. · E-mail : garak@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2010년 11월 6일 · 수정 : 2010년 12월 7일 · 채택 : 2010년 12월 15일

linoleate, β -sitosterol 등¹⁾이 보고되었다. 한편, 꾸지뽕나무의 생리활성으로는 항산화작용⁸⁾, 혈압강화작용⁹⁾, 항근작용¹⁰⁾과 그밖에 당뇨병¹¹⁾, 동맥경화방지와 항염증작용¹²⁾이 보고되었고, 또한 동속식물인 가지꾸지뽕나무의 생리활성으로는 항지질 과산화작용 효과¹³⁾가 보고되었다.

꾸지뽕나무를 우리 민간에서는 예부터 그 줄기와 뿌리를 신경통 등에 달여 마신 점으로 보아,¹⁴⁾ 퇴행성 관절질환에도 유의한 효과가 있을 것으로 사료되는데, 최¹⁵⁾는 꾸지뽕나무의 목질부인 栝木이 콜라겐으로 유도한 생쥐의 류마티스 관절염에 유효하며, 유효성분은 지용성 성분이라고 보고하였다.

이에 저자는 꾸지뽕나무의 뿌리부위인 穿破石도 류마티스 관절염에 유효할 것으로 사료되어, 최¹⁵⁾의 연구를 바탕으로 穿破石이 관절 질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고자, collagen으로 관절염을 유발한 생쥐에 穿破石 추출액을 투여한 다음 류마티스 관절염과 관련된 여러 cytokine들에 대한 영향을 검사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

동물은 7 주령의 수컷 DBA/1J 생쥐를 중앙실험동물(Slc, Japan)에서 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온 (22±2℃)에서 2 주 일동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용한 穿破石(*Cudrania Tricuspidatae Radix*, 이하 CTR)은 전북 부안군에서 재배하고 있는 꾸지뽕나무(*C. tricuspidata*)의 根部를 2005년 10월 채취하여 적당한 두께로 자른 절편을 건조하여 사용하였으며, 기원의 진위와 품질의 우열을 경원대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해서 n-hexane (Samchun Chemical, Korea), n-butanol (Samchun Chemical, Korea), Ethyl ether (Samchun Chemical, Korea), Ethyl acetate (Samchun Chemical, Korea), Collagenase, EtOH (Sigma, USA), Collagen type II (Chondrex, USA), Fetal bovine serum(FBS) (Hyclone, USA), IL-6 ELISA KIT (R&D, USA), TNF- α ELISA KIT (R&D, USA), IL-1 β ELISA KIT (R&D, USA) 등이 사용 되었다.

(2) 기기

본 실험에 사용된 기기는 Rotary evaporator (Eyela, Japan), Centrifuge (Hanil, Korea), Homogenizer (OMNI, USA), Plate shaker (Lab-Line, USA), ELISA reader (Taran, Canada), Ice maker (Vision science, Korea), Cytological centrifuge (Hanil, Korea), Pulverizer (Rong Tsong, Taiwan) 등이다.

2. 방법

1) 검체의 준비

(1) 전탕 및 알코올추출 분말

穿破石 100 g에 증류수 1 L를 가하고 약탕기(웅진약탕기, 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓여 전탕액을 여과지로 여과한 후 감압증류장치를 이용하여 농축하고, 냉동건조기를 사용하여 분말 22.6 g을 얻었다. 한편, 穿破石 100g에 1 L의 80% EtOH 1L를 가하고 환류냉각장치를 이용하여 70℃에서 3시간 동안 가열하고 여과지로 여과한 후 감압증류장치를 이용하여 농축하고, 냉동건조기를 사용하여 80% 에탄올추출분말 4.7 g을 얻었다.

(2) 전탕 분획 추출

穿破石 전탕에서 얻은 분말을 Fig. 1 과 같은 방법으로 분획하였다. 전탕 분말 20 g에 증류수 400 ml를 가하여 녹이고 극성이 다른 유기용매인 hexane, ethyl ether (EtOEt), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH)을 이용하여 단계적으로 분획하고 농축하여 각 분획별로 6.5%, 29.0% 4.5%, 25.5%의 건조추출물을 얻었으며, 마지막으로 남은 물층은 13.5%이었다. 각 분획생성물들은 감압증류장치를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 냉동건조 하여 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

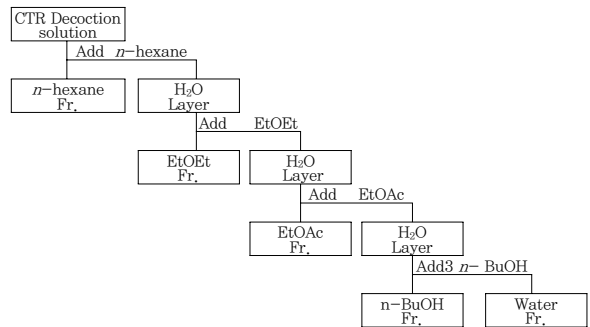


Fig. 1. Fractionation procedure using organic solvents from CTR extract.

2) 콜라겐 유도 관절염 생쥐 모델

콜라겐(Collagen type II, CII)을 0.05 N 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. 준비된 콜라겐용액을 2회 (0일, 21일)에 걸쳐 각각 0.1 ml씩 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.¹⁵⁾

3) 관절세포의 분리 및 배양

관절염이 유도된 생쥐의 관절을 분리하여 1× PBS (phosphate buffer saline)로 3회 세척하고 15 ml tube에 관절을 잘게 분쇄하여 넣었다. Free-DMEM 3 ml를 첨가하고, collagenase를 30 μ l를 첨가한 후, 37℃에서 30분 동안 정치하며 shaking한 다음 상층액을 새로운 15 ml tube에 모았다. 이와 같은 방법을 2~3회 반복 실시한 후에, 상층액을

5분간 1,000 rpm에서 원심분리 하였다. 여기에서 얻은 세포는 1× PBS로 1회 세척한 후, 10% FBS와 antibiotics(penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가한 DMEM에서 배양하였다. 시료를 첨가하고 37℃ CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 원심분리하여 상층액을 얻어 ELISA로 분석하였다.

4) 약물 처리

관절세포의 배양 중에 穿破石의 전탕추출물 또는 전탕액의 분획추출물을 배양액에 첨가하여, 배양액 중 약물의 농도가 1%가 되도록 하였다.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit를 사용하여, CIA 생쥐에서 분리한 관절세포에서 여러 가지 cytokine종류의 양을 측정하였다. 1차 항체가 코팅된 96 well plate에 분리한 혈청을 가하여 반응시킨 후 4 차례 세척하고, 다시 biotin이 표시된 2차 항체를 첨가하여 반응시킨 후 4 차례 세척하였다. 여기에 streptavidin-HRP를 가하여 ELISA reader 로 분석하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 means ± SEM으로 표시하였으며 Student t-test로 분석하여 p<0.05일 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다. 정상군에 대한 대조군의 유의성은 ‘+’ 로, 대조군에 대한 각 처리군의 유의성은 ‘*’ 으로 표시하였다.

결 과

1. 관절세포의 cytokine 생성에 대한 효과

콜라겐유도관절염(Collagen-induced arthritis, CIA)이 유발된 동물의 관절세포에서는 IL-1β, TNF-α 및 IL-6 등 cytokines의 생성이 증가한다고 알려져 있다¹⁵⁾. 따라서 穿破石 추출물이 콜라겐유도관절염을 유도한 생쥐 관절면역세포에서 IL-1β, TNF-α 및 IL-6 생성에 어떤 영향이 있는지를 검사하였다.

콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐로부터 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 穿破石 전탕추출물, 80% 에탄올추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, IL-1β, TNF-α 및 IL-6의 cytokine 생성정도를 검사하였다.

1) IL-1β 생성에 대한 영향

IL-1β 생성에 대한 영향을 분석한 결과 정상세포군(normal)의 흡광치는 0.093인데 비하여, 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐의 관절면역세포의 흡광치는 0.989로써 정상군에 비하여 IL-1β 생성이 현저하게 증가하였다(p<0.01).

관절염이 유발된 관절면역세포를 배양할 때, 각 추출물을 첨가한 경우에는 흡광치가 0.885, 0.775 및 0.775 였다. 대

조군과 비교하였을 때, 전탕추출물 첨가시는 IL-1β 생성량은 현저하게 저하되었고(p<0.01), 에탄올추출물을 첨가한 경우에는 대조군에 비하여 IL-1β 생성량이 유의하게 저하되었다(p<0.05)(Fig. 2).

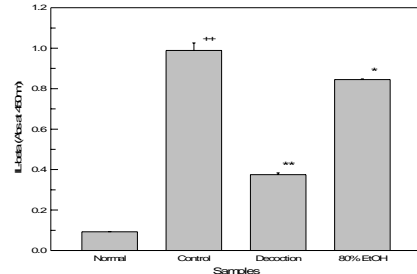


Fig. 2. Effect of CTR extract on IL-1b level in knee joint cells of mice. Normal: The normal cells were cultured without extract, Control: The arthritic cells were cultured without extract, Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction, 80% EtOH Extract : The arthritic cells were cultured with ethanol extract. ++ : p<0.01 compared with normal, ** : p<0.01 compared with control, * : p<0.05 compared with control.

2) TNF-α 생성에 대한 영향

콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐의 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 준비된 穿破石 전탕추출물 및 80% 에탄올추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, TNF-α 생성량을 ELISA로 측정하였다.

대조군의 TNF-α 생성량은 정상군에 비하여 현저하게 증가하였다(p<0.01). 대조군의 흡광치는 1.130, 전탕과 에탄올추출물을 각각 첨가한 경우에는 흡광치가 각각 0.872, 0.706 이었다. 따라서 대조군과 비교하였을 때, 穿破石의 전탕추출물 첨가시 유의하게(p<0.05), 그리고 에탄올추출물을 첨가한 경우에는 TNF-α 생성이 현저하게 감소되었다(p<0.01)(Fig. 3).

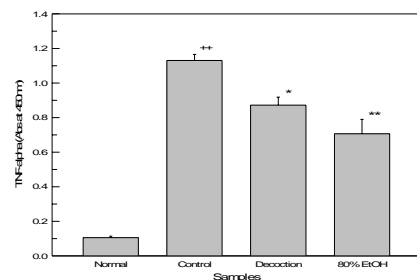


Fig. 3. Level of TNF-α in mice knee joint cell culture with various extracts of CTR. Normal: The normal cells were cultured without extract, Control: The arthritic cells were cultured without extract, Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction, 80% EtOH Extract : The arthritic cells were cultured with ethanol extract. ++ : p<0.01 compared with normal, ** : p<0.01 compared with control, * : p<0.05 compared with control.

3) IL-6 생성에 대한 영향

콜라겐유도관절염이 유발된 생쥐의 관절세포를 분리 및 배양한 다음, 배양액에 준비된 穿破石 전탕추출물 및 80% 에탄올추출물을 1.0%의 농도로 처리하여 배양한 후, IL-6 생성량을 ELISA로 측정하였다.

그 결과, 정상군의 흡광치는 0.203이었고, 대조군의 흡광치는 1.057로 정상군에 비하여 IL-6 생성이 현저하게 증가하였다(p<0.01). 전탕과 에탄올추출물을 각각 첨가한 경우에

는 흡광치가 각각 0.625, 0.193로 대조군과 비교하였을 때, 穿破石 전탕추출물을 첨가한 경우에는 유의하게($p > 0.05$), 그리고 에탄올추출물을 첨가한 경우에는 대조군에 비하여 IL-6 생성이 현저하게 감소되었다($p < 0.01$)(Fig. 4).

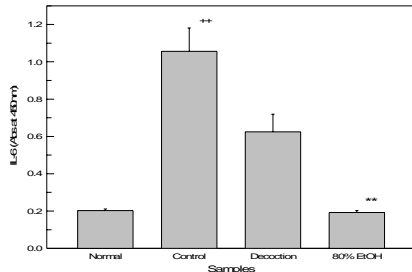


Fig. 4. Level of IL-6 in mice knee joint cell cultured with various extracts of CTR.

Normal: The normal cells were cultured without extract, Control: The arthritic cells were cultured without extract, Decoction : The arthritic cells were cultured with decoction, 80% EtOH Extract : The arthritic cells were cultured with ethanol extract. ++ : $p < 0.01$ compared with normal, ** : $p < 0.01$ compared with control.

2. 관절세포 cytokine 생성에 대한 전탕 유기용매 분획의 영향

穿破石의 hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol 등의 유기용매를 단계적으로 사용하여 준비된 각 분획이 관절세포에서의 cytokine 분비에 미치는 영향을 조사하였다. 준비된 각 분획을 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐의 관절세포를 배양 시 처리하여, cytokine 분비에 대한 각 분획물들의 영향을 조사하였다.

1) IL-1 β 생성에 대한 영향

콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 ELISA 흡광치(Abs at 450)는 0.093인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 0.989로써 정상군에 비하여 IL-1 β 생성이 현저하게 증가하였다($p < 0.01$).

관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 穿破石의 전탕추출물(decoction)첨가시 흡광치는 0.375, 전탕추출물로부터 얻은 hexane 분획 첨가시에는 0.528, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.561, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.549, butanol 분획의 경우에는 0.714, 단계별 용매추출 후 물분획(water) 첨가시에는 0.753 이었다. 따라서 ethyl ether, ethyl acetate 및 butanol 분획 첨가시 대조군에 비하여 IL-1 β 생성량이 현저하게 저하되었고($p < 0.01$), 물 분획의 경우에도 유의하게 저하되었다($p < 0.05$)(Fig. 5).

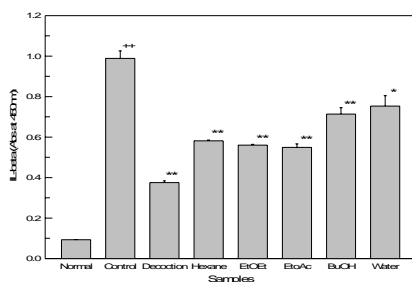


Fig. 5. Level of IL-1 β in mice knee joint cell culture with various fractions prepared from the decoction of CTR. Normal: Normal cells were cultured without sample, Control: Arthritic cells were cultured without sample, Decoction: Arthritic cells were cultured with decoction, Hexane: Arthritic cells were cultured with *n*-hexane Fr., EtOE: Arthritic cells were cultured with ethyl ether Fr., EtOAc: Arthritic cells were cultured with ethyl acetate Fr., BuOH: Arthritic cells were cultured with *n*-butanol Fr, Water : Arthritic cells were cultured with Water Fr. ++ : $p < 0.01$ compared with normal, * : $p < 0.05$ compared with control, ** : $p < 0.01$ compared with control.

2) TNF- α 생성에 대한 영향

콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 ELISA 흡광치(Abs at 450)는 0.105인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.130으로써 정상군에 비하여 TNF- α 의 생성이 현저하게 증가하였다($p < 0.01$). 관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 穿破石의 전탕추출물(decoction)을 첨가한 경우에 흡광치는 0.872였으며, 전탕추출물로부터 준비된 hexane 분획 첨가시에는 0.620, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.675, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.784, butanol 분획의 경우에는 0.746, 단계별 용매추출 후 여분의 수용성 분획 첨가시의 흡광치는 0.761 이었다. 따라서 대조군과 비교하였을 때, 각 분리된 분획이 첨가된 모든 경우 TNF- α 생성량이 현저하게 저하되었다($p < 0.01$)(Fig. 6).

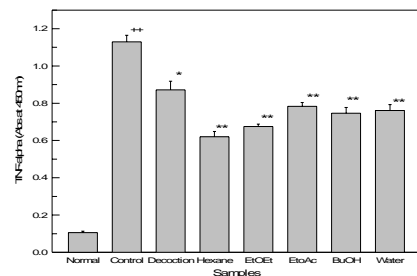


Fig. 6. Level of TNF- α in mice knee joint cell culture with various fractions obtained from the decoction of CTR. Normal: Normal cells were cultured without sample, Control: Arthritic cells were cultured without sample, Decoction: Arthritic cells were cultured with decoction, Hexane: Arthritic cells were cultured with *n*-hexane Fr., EtOE: Arthritic cells were cultured with ethyl ether Fr., EtOAc: Arthritic cells were cultured with ethyl acetate Fr., BuOH: Arthritic cells were cultured with *n*-butanol Fr, Water : Arthritic cells were cultured with Water Fr. ++ : $p < 0.01$ compared with normal, * : $p < 0.05$ compared with control, ** : $p < 0.01$ compared with control.

3) IL-6 생성에 대한 영향

콜라겐으로 관절염을 유도하지 않은 정상세포군(normal)의 ELISA 흡광치(Abs at 450)는 0.203인데 비하여, 대조세포군(control)인 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐 관절세포의 흡광치는 1.057으로써 정상군에 비하여 IL-6 생성이 현저하게 증가하였다($p < 0.01$).

관절염이 유발된 관절세포를 배양할 때, 穿破石의 전탕추출물(decoction)을 첨가한 경우에 흡광치는 0.625, 전탕추출물로부터 준비된 hexane 분획 첨가시에는 0.497, ethyl ether 분획 첨가시에는 0.561, ethyl acetate 분획의 경우에는 0.576, butanol 분획의 경우에는 0.573, 단계별 용매추출 후 여분 분획 첨가시의 흡광치는 0.604 였다.

따라서 대조군과 비교하였을 때, 유기용매로 분리된 분획들 중에서 hexane 및 ethyl ether 분획이 첨가된 경우에 IL-6 생성량이 현저하게 저하되었으며(p<0.01), ethyl acetate, butanol 및 수용성 분획 등이 첨가된 경우에도 IL-6 생성량은 유의하게 저하되었다(p<0.05) (Fig. 7).

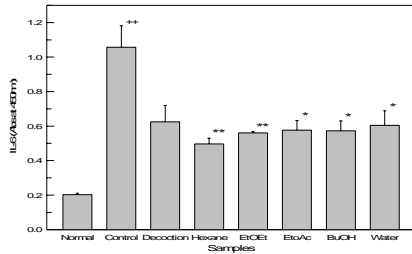


Fig. 7. Level of IL-6 in mice knee joint cell culture with various fractions obtained from the decoction of CTR. Normal: Normal cells were cultured without sample, Control: Arthritic cells were cultured without sample, Decoction: Arthritic cells were cultured with decoction, Hexane: Arthritic cells were cultured with *n*-hexane Fr., EtOEt: Arthritic cells were cultured with ethyl ether Fr., EtOAc: Arthritic cells were cultured with ethyl acetate Fr., BuOH: Arthritic cells were cultured with *n*-butanol Fr, Water : Arthritic cells were cultured with Water Fr. ++ : p<0.01 compared with normal, *: p<0.05 compared with control, **: p<0.01 compared with control.

고찰

꾸지뽕나무 *Cudrania tricuspidata* Bureau (뽕나무과 Moraceae)는 황해도 이남에서 자라는 落葉小喬木 또는 灌木으로서 높이가 8m에 달하며, 가지에 5-35mm 크기인 가시가 있으며 小枝에 털이 있다.^{2,3)} 同屬식물로 가시꾸지뽕나무(枸棘, *C. cochinchinensis* Lour, Kudo et Masam)의 뿌리도 穿破石으로 함께 약용되는데, 가시꾸지뽕나무는 높이가 2-4m인 常綠灌木으로 우리나라에는 자생하고 있지 않지만 중국의 安徽, 浙江, 江西, 福建, 湖北, 湖南, 廣東, 海南, 廣西, 四川, 貴州, 雲南 등지에 분포하고 있다.¹⁾

中華本草¹⁾에 꾸지뽕나무의 뿌리를 穿破石, 木質部를 柘木이라 하고, 코르크층을 벗긴 樹皮 혹은 根皮를 柘木白皮라 하였는데, 穿破石은 祛風通絡, 清熱除濕, 解毒消腫의 효능이 있어서 風濕痺痛, 跌打損傷, 黃疸, 耳下腺炎, 폐결핵, 胃와 十二指腸 潰瘍, 淋濁, 蟲脹, 閉經, 勞傷咳血, 疔瘡癰腫을 다스리며, 柘木은 虛損과 婦女崩中血結, 瘧疾을 다스리고, 柘木白皮는 補腎固精, 利濕解毒, 止血, 化痰의 효능이 있어서 腎虛耳鳴, 腰膝冷痛, 遺精, 帶下, 黃疸, 疔瘡, 嘔血, 咯血, 崩漏, 跌打損傷을 다스린다고 하였다.

柘木이라는 이름은 本草拾遺에 처음 수재되었으며,¹⁾ 大觀本草²⁾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.” 라고 한 바와 같이, 樹皮, 根皮 및 木質部를 두루 약용으로 하였다. 특히 가시가 없는 것이 우수하다고 하였으므로, 가시꾸지뽕나무보다는 꾸지뽕나무를 사용하였음을 알 수 있는데, 中華本草¹⁾에서도, 穿破石의 기원식물은 가시꾸지뽕나무와 꾸지뽕나무를 함께 수재하고 있지만, 柘木의 기원식물은 꾸지뽕나무만을 수재하고 있다.

꾸지뽕나무의 성분에 대한 연구로 박 등⁴⁾은 한국산 꾸지뽕나무의 줄기에서 kaempferide 7-O-beta-D-glucopyranoside와 naringenin 7-O-beta-D-glucopyranoside 등의 플라보노이드 배당체가 보고되었고, Han 등¹⁶⁾은 가지에서 sterol 화합물과 arthocarpetin, norarthocarpetin, 5-O-methyl genistein 등을 분리하였고, Lee 등¹⁷⁾은 세포독성이 있는 dehydroflavonol인 gericudranin A~E를 분리하였으며, 이 등¹⁸⁾은 꾸지뽕나무의 클로로포름추출물로부터 2종의 prenylated flavonoids 항균물질을 분리하였으며, 이밖에 뿌리껍질에서 cudraxanones A-D 및 H-K, cudraflavanone A, cudraflavone A-D, cycloartocarpesin, populnin, qwercimeritrin 등이 각각 보고되었다¹⁾. 한편 동속 식물인 가시꾸지뽕나무(枸棘, *C. cochinchinensis*)로부터 Sun 등⁵⁾은 cudraiso flavone A를, Chang 등⁶⁾은 8 종류의 gerontoxanthone을, 그리고 Hou 등⁷⁾은 4 종류의 cudraphenone과 3 종류의 cudraxanthone(P-R)을 분리한 바 있고, 이밖에 dehydrocostus, methyl linoleate, β -sitosterol 등¹⁾이 보고되었다.

꾸지뽕나무의 생리활성 연구를 보면, 許⁹⁾는 꾸지뽕나무 전탕액의 혈압강화작용을 보고하였고, 차 등^{19,20)}은 꾸지뽕나무의 열매추출물이 항산화작용, 수피추출물이 고지혈증에 영향을 미친다고 하였으며, 전²¹⁾은 꾸지뽕나무 잎의 dihydroquercetin 7-O- β -D-glucopyranoside 성분이 우수한 항산화작용이 있음을 보고하였고, Kim 등¹⁰⁾은 꾸지뽕나무 잎에서 추출한 플라보노이드 성분이 황색포도상구균에 항균작용이 있다고 하였으며, Chen 등¹¹⁾은 당뇨병에 효능이 있고, Park 등¹²⁾은 꾸지뽕나무의 동맥경화방지과 항염증작용이 있다고 보고하였다. Lee 등²²⁾은 꾸지뽕나무에서 추출한 gericudranin이 인간의 tumor cell lines에 대해 세포독성이 있다고 하였고, Seo 등²³⁾은 수피의 ethyl acetate 분획이 IFN- γ 나 LPS에 의해 발현된 RAW 264.7 macrophage에 의해 생성되는 nitric oxide의 생성을 억제하며 human leukemia 세포의 괴사를 일으킬 수 있다고 보고하였다. 또한 동속 식물인 가시꾸지뽕나무의 생리활성 연구로 Chang¹³⁾ 등은 가시꾸지뽕나무에서 분리한 대부분의 xanthone 화합물이 항지질 과산화작용 효과가 있음을 보고하였고, Lin 등²⁴⁾은 가시꾸지뽕나무 뿌리의 butanol 및 ethyl acetate 분획이 항염증 효과와 간보호효과가 있음을 보고하였다.

류마티스 관절염은 관절내 연골과 주위 조직의 염증 반응을 병변으로 하며, 관절 이외에도 여러 장기를 침범하는 전신성 만성 염증성 질환으로 인식되고 있다.²⁵⁾ 류마티스 관절염의 원인은 명확히 밝혀지지 못한 상태로 가설적 원인으로 감염설, 비타민 결핍설, 호르몬 부조화 등이 제기 되고 있으나, 최근에는 자가면역학적 반응으로 설명하고 있으며, 치료 목적은 염증 반응을 최소한으로 줄여 관절의 강직 및 변형을 방지하는데 있으나, 현재까지 근본적인 치료약은 개발되지 못한 실정이다.²⁵⁻²⁸⁾

이에 저자는 꾸지뽕나무가 퇴행성 관절질환에 미치는 효능을 실험적으로 검증하고자, 꾸지뽕나무의 뿌리인 穿破石을 전탕추출, 에탄올추출하고, 이 중 전탕추출물을 여러 유기용매를 사용하여 얻어진 분획을 준비하였으며, 콜라겐유발관절염(CIA) 생쥐에서 적출한 관절세포(synoviocytes와 chondrocytes 포

함)에 준비된 穿破石추출물 및 분획들을 각각 처리하여 류마티스 관절염과 관련된 여러 cytokine 생성에 대한 영향을 조사하였다.

관절염의 병리 발생 기전과 치료제의 개발과 관련된 대부분의 실험적 연구는 adjuvant 유발 관절염 모델, type II collagen 유발 관절염 모델, antigen 유발 관절염 모델 등을 통해서 시행되어 왔다.²⁸⁾

Collagen은 척추동물 체내 단백질의 30% 정도를 차지하며, 주로 피부, 골, 연골, 평활근 및 기저판 등에 존재하고,²⁹⁾ 그 중 제 II형 collagen은 연골조직에 국한되어 주로 연골, 귀, 추간판, 초자체, 각막, 망막 등에 존재한다.³⁰⁾ 실제로 관절염 환자의 혈청과 활액에서 collagen에 대한 항체가 확인되고 질병의 진행과도 관계가 있음이 보고되었으며³¹⁾, 설치류에서의 제 II형 CIA는 임상적, 조직학적, 면역학적으로 사람의 류마티스 관절염과 유사함이 인정되어 이 질환의 병태 연구에 많이 이용되고 있다.^{28),32)}

본 연구에서는 mouse에 제 II형 collagen을 주사하여 콜라겐유도관절염(CIA)을 유발시킨 다음, 관절조직을 적출하여 분리한 세포를 배양하면서 穿破石추출물들을 처리하여 관절염과 연관된 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α cytokines의 분비에 대한 영향을 검사하였다.

Interleukine-1 β (IL-1 β)는 주로 대식세포(macrophages)에서 생산되어 임파구에 작용하여 감염에 대한 숙주의 급성반응과정에서 다양한 작용을 매개함으로써 생체방어에 중요한 역할을 담당하며³³⁾, TNF- α 는 대식세포, Cytotoxic T-cells, Natural killer (NK) cells 등에서 생산되어 류마티스 관절염에서 T세포와 B세포의 기능을 증가시키고, 연골세포에 작용해서 PGE2와 collagenase 생산을 촉진하며³⁴⁾, IL-6은 T-cell 및 대식세포에서 생산되어 IL-1과 TNF- α 의 분비를 촉진한다³⁴⁾. 이와 같이, IL-1 β , IL-6, TNF- α 는 과다하게 분비되어 작용하면 염증을 유발하는 대표적인 cytokine 들로 관절의 활액세포(synovial cell)에서 과잉 생산되어 활액세포의 증식을 촉진하여 염증을 유발한다.^{15),33)}

본 연구에서는 콜라겐을 주사한 생쥐의 관절세포에서 IL-1 β , TNF- α 및 IL-6 등이 정상군에 비하여 현저하게 상승하여 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발되었다고 생각되었다.

콜라겐유도관절염이 유발된 이들 생쥐에 穿破石의 전탕과 에탄올추출물을 투여한 결과, 모두 관절세포의 IL-1 β , IL-6와 TNF- α 등의 염증유발성 cytokines 들을 감소시켰다.

전탕과 에탄올추출물 등이 모두 염증유발성 cytokines의 생성을 감소시킨 점으로 미루어보아 穿破石은 콜라겐유도관절염에 유효하다고 생각되었다.

한편, 전탕추출물은 IL-6 생성에 유의한 영향이 적었음에도 불구하고 에탄올추출물은 IL-6의 생성을 감소시켰다. 이는 전탕추출물에는 cytokines 분비억제에 작용하는 서로 다른 성분이 함유되어 있음을 시사하므로, 穿破石에는 염증유발성 cytokines 들의 생성에 영향을 주는 성분이 최소한 2종류 이상이 있다고 생각된다. 이와 더불어, TNF- α , IL-6의 생성억제에 대한 활성이 에탄올추출물들의 생성에 대한 영향은 현저하게 나타났다. 이러한 결과 또한 穿破石에 함유된 염증완화에 대한 유효성분이 한 물질이 아니라 여러 물질일 수도 있음을 시사하였다.

上記한 바와 같이 穿破石 전탕추출물 투여로 관절세포의

IL-1 β , TNF- α 의 cytokines 생성은 현저하게 감소시켰으며, 유의성은 다소 낮지만 관절세포의 TNF- α 또한 대조군에 비하여 상당히 감소되는 경향성을 보였다. 이와 함께 한의학에서 주된 약재 투여방법이 전탕액인 점을 고려하여, 유효성분을 전탕액으로부터 hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol 등의 유기용매를 순차적으로 사용하여 전탕추출물에 함유되어 있는 성분들을 분획하여 각 분획들이 cytokine 생성에 대한 영향을 조사하였다. 얻어진 각 분획을 농축 및 냉동 건조한 다음, 전탕과 알코올추출물의 경우와 같은 방법으로 콜라겐유도관절염(CIA)이 유발된 생쥐의 관절세포의 cytokines 분비에 대한 영향을 조사하였다.

결과에서 언급한 바와 같이, 관절세포의 cytokines 생성에 대한 각 분획의 영향은 다음과 같았다. hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 물 분획 등 모든 분획은 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 cytokines 생성을 감소시켰으며, hexane 및 ethyl ether 분획에 의한 감소효과는 특히 강하였고, 물 분획에 의한 IL-1 β 및 IL-6 생성감소는 다른 분획들에 비하여 상대적으로 약하였다.

이상의 결과, 穿破石은 관절염 치료제로 개발이 가능하다고 사료된다.

결론

꾸지뽕나무의 根部인 穿破石을 전탕추출, 에탄올추출 하고, 다시 전탕추출물로부터 유기용매를 사용하여 순차적으로 얻은 분획물로, 콜라겐으로 관절염을 유발시킨 생쥐의 관절세포의 cytokine 생성에 대한 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 穿破石의 전탕과 에탄올추출물은 모두 관절세포의 IL-1 β , IL-6 와 TNF- α 는 염증성 cytokines 생성을 감소시켰다.
2. 전탕추출물의 hexane, ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 물 분획은 모두 관절세포의 IL-1 β , TNF- α , IL-6 생성을 감소시켰다.

이와 같은 결과로 보아 穿破石은 콜라겐으로 관절염을 유발시킨 생쥐의 관절세포의 cytokine 생성에 유의한 효과가 있어, 관절염 치료제로 개발이 가능하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. 國家中醫藥管理局 《中華本草》編委會, 中華本草, 上海:上海科學技術出版社, 1999;(2):517-520.
2. 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.

3. 이창복. 대한식물도감. 서울:향문사. 1982:285.
4. 박종철, 양한석, 최재수. 한국산 구지뽕나무의 성분. 약학회지. 1992;(36):40-45.
5. Sun NJ, Chang CJ, Cassady 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):595-598.
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):1310-1315.
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 석사학위논문. 2001:40-43.
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. *Ykugaku Zasshi*. 1995;(115):476-482.
12. 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):5580-5583.
13. Chang CH, Lin CC, Hattory M, Namba T. Effects on anti-lipid peroxidation of *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontogea*. *J. Ethnopharmacol.* 1994;44(2):79-85.
14. 차재영, 조영수. 구지뽕나무 열매 추출물의 항산화 활성. 한국식품영양과학회지. 2001;30(3):547.
15. 최정호. 柘木의 콜라겐 유도 생쥐 관절염에 대한 억제효과. 경원대학교 대학원 박사학위논문. 2007:57-64.
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):1614-1617.
18. 이병원, 강남숙, 박기훈. 구지뽕나무로부터 항균성 prenylated flavonoids의 분리. 한국응용생명화학학회지. 2004;47(2):270-273.
19. Cha JY, Cho YS. Antioxidative Activity of Extracts Fruit of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2001;30(3):547-551.
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):328-334.
21. 전인주. 구지뽕나무 잎의 항산화 성분. 중앙대학교 대학원 석사학위논문. 2003:1-85.
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):213-216.
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):21-28.
24. Lin CC, Lee HY, Chang CH, Yang JJ. The anti-inflammatory and hepatoprotective effects of fractions from *Cudrania cochinchinensis* var. *gerontogea*. *Am J Chin Med.* 1999;27(2):227-239.
25. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울. 최신의학사. 1992:109-31, 155-6.
26. 서울대학교의과대학. 면역학. 서울. 서울대학교출판부. 1997:100, 114, 117, 253, 255, 262, 122-31, 179-80, 266-9.
27. Rene Cailliet, M. D. 무릎을 침해하는 여러 가지 관절염(무릎의 동통과 기능장애). 서울. 대학서림. 1991:125-48.
28. 崔貞植. 鷄血藤의 collagen으로 誘發된 생쥐의 關節炎抑制에 關한 研究. 대전대학교대학원 박사학위논문. 2003:25-32.
29. 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;39:285-290.
30. 김노경. 내과학. 서울:고려의학. 1998:877-8.
31. Cheung HS, Ryan LM, Kozin F, Mccarty DJ. Identification of collagen subtypes in synovial fluid sediments from arthritic patients. *Am. J. Med.* 1980;68:73-9.
32. Trendam d.e. et.al. Autoimmunity to type II collagen. An experimental model of arthritis in rats. *J. EXP. Med.* 1997;146:857-868.
33. 오찬호 역. 신면역학입문. 서울:지구문화사. 1997:63, 118, 120-128, 175-87.
34. 강재성 외. 세포분자면역학 5판. 서울:범문사. 2004:243-253, 261-269, 423.