

최 종
연구보고서

우슬의 항관절염 생리활성 규명과
고부가가치 제품 개발

Development of high value-added products
and anti-arthritis physiological activity of
Achyranthes Radix

연구 기관
동신대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “우슬의 항관절염 생리활성 규명과 고부가가치 제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 24일

주관연구기관명 : 동신대학교

총괄연구책임자 : 김 계 엽

세부연구책임자 : 김 계 엽

협동연구기관명 : 건양대학교

협동연구책임자 : 김 영 일

위탁연구기관명 : 한국식품연구원

위탁연구책임자 : 홍 석 산

참 여 기 업 : 전 남 생 약

농업협동조합

참여기업 대표 : 김 행 중

요 약 문

I. 제 목

우슬의 항관절염 생리활성 규명과 고부가가치 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구사업은 국내에서 생산되는 우슬(*Archyranthes Radix*)을 이용하여 성분의 추출, 분석 등을 통하여 유효 성분의 생체 내 생리활성 메카니즘 규명 및 항관절염 효과에 관한 효능을 연구한다. 또한 우슬의 고부가가치 제품으로서 관절염을 치료할 수 있는 치료용 연고제 및 크림제를 개발하며, 아울러 관절염환자는 물론 예방적 차원에서 응용할 수 있는 기능성 음료(차)를 개발을 목적으로 한다.

우리나라는 예부터 우수한 생약재의 보고(寶庫)로 알려져 왔고, 종류를 셀 수 없을 만큼 많은 생약재가 자생하며, 같은 생약재라도 중국이나 일본 것보다 훨씬 우수한 성분과 약효를 가지고 있다. 그중 우슬에는 여러 기능성 성분들이 다량 함유되어있고, 혈액순환, 골다공증, 관절염, 월경불순, 자궁무력증, 난산 등의 여성 질환에 효과가 좋은 것으로 보고되고 있다. 이러한 생약자원인 우슬의 생산량 증대와 경쟁력을 갖는 하나의 농촌 산업으로 육성하기 위해서는 이로부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다.

관절염은 골관절염이라고도 불리며 퇴행성 골관절염과 자가면역질환의 일종인 류마티스 관절염으로 대별된다. 이들 관절염은 만성질환으로서 기존의 단순 소염·진통제만으로는 그 질환을 효과적으로 조절하기 어려울 뿐 아니라 장기간 복용에 따른 부작용으로 노년층 환자들에게 많은 불편을 초래하고 있는 실정이다. 본 연구는 국내산 우슬을 대상으로 하여 성분분석을 통해 생리활성물질을 규명하고, 우슬의 관절염 효과를 체계적으로 연구한 후, 가공기술을 개발, 기능성 식품 또는 식품의약 소재로 개발하여 농산물시방개방시대에 부응할 수 있는 고부가가치의 대체작물로서의 가능성을 검토하여 농촌경제의 활성화를 이루고자 한다.

1) 기술적 측면

우슬(牛膝)은 비름과(*Amaranthaceae*)의 쇠무릎(*Achyranthes radix*)의 뿌리를 기원으로 하여 한국과 일본, 중국에 분포하며 자라지만, 효능면에서는 우리나라 것이 월등히 우수한 것으로 알려져 있다. 전국 산야에서 생산이 가능하지만 지역에 따라 고랭지나 준고랭지에서는 겨울에 얼어 죽지만 중부이남지역에서는 월동하며 온난 습윤한 남부의 따뜻한 지역에서 재배하는 것이 유리하다. 현재 남부지역에서 일부 재배되어 한약재 등으로 공급하고 있으나 아직은 연구 상태가 미비한 실정이기 때문에 국내산 우슬의 고유한 특성을 살릴 수 있는 제품의 제조기술이 필요하다.

다양한 연령층의 요구에 기여할 수 있는 물질을 추출·가공하여 공급한다면 지역 특산품으로서의 개발 및 많은 수요를 창출 할 것이며, 이에 필요한 우슬이 가지는 기능성 성분을 최대로 추출할 수 있는 전 처리법 확립과 원료 자체의 쓴맛, 색깔 등 식품으로써 부적합한 문제를 해결하여 기호성을 증진시킬 수 있는 가공기술의 개발이 필요하다. 특히, 본 과제에서 개발하려고하는 치료용 연고제는 기존의 화학적 합성에 의해 이루어지며, 구강을 통해 섭취하는 약물과 달리 생약재를 이용한다는 점과 직접 우리가 원하는 부위에 바를 수 있다는 많은 기술적 장점을 내포하고 있다. 산·학과 연계하여 우수한 생약재의 유효 성분에 대한 연구를 체계적이고, 과학적인 연구를 하는 과정에서 생약재의 추출, 분리 및 효능 평가에 대한 새로운 기술 개발은 지역 농업 사회에 이바지 하는 생약재 산업화에 기여 할 수 있을 것이다.

2) 경제·산업적 측면

우슬은 4~5월에 종자 파종하여 10~11월에 수확할 수 있으며, 퇴비를 주는 조건만으로도 수확이 가능하여 재배하기가 쉬우며, 건강에 대한 증대 관심 및 전통적인 약효능이 알려지면서 국내 전체 생산량이 점차적으로 늘어나고 있다. 비름과에 속하는 다년초 식물인 쇠무릎의 뿌리를 말린 약재인 우슬(牛膝)은 현재 가격으로 볼 때 1kg당 약 6,000원으로 계산하면 경지 1평당 24,000원이며, 1,000평이 경작지에서 약 24,000,000원의 소득을 올릴 수 있는 고소득 작물로 볼 수 있다. 예를 들어 우슬 1kg으로 음료를 제조 시에 약 70L를 만들 수 있으며, 100ml 당 10,000원(현재 시가)으로 계산하면 7,000,000원의 소득을 올릴 수 있는 고소득 작물로 볼 수 있다.

아울러 본과제가 선정되어 치료용 연고제로 개발한다면, 우슬의 부가가치는 기타의 기능성 음료의 수배에 이를 것이다.

또한 최근 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 영세 업체를 중심으로 생약재를 이용한 건강음료 및 건강식품이 나타나고 있으나 효능에 대한 과학적이며 체계적인 연구 부족 및 음료식품으로써의 품질이 열악한 실정이다. 이러한 다기능성 음료를 개발함으로써 우슬의 부가가치를 높여 농가소득 증대에 기여하며, 양질의 우슬 재배와 더불어 지역 생약재 산업의 경쟁력을 높이고자 한다. 또한 생약재의 수급 및 가격안정을 확보하여 지속적으로 농가소득 증대를 가져올 수 있다.

우슬의 기능성 활용을 위한 산업은 현재 농가 차원에서도 다양한 재배방법이 실용화되어 우슬의 생산기술이 개발되어가고 있기 때문에 신 기능성 자원으로서의 활용방안이 제시된다면 농가소득증대 및 식·약품 산업으로서 혈액 순환제, 관절염 치료제, 기능성 음료 등으로 개발되어 농가 소득증대의 일익을 담당할 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

생약재는 국민들의 건강을 지키는 의약품이자 농가소득원으로서 오랫동안 우리 생활과 밀접한 관계를 맺어 왔으며, 특히 최근에는 웰빙을 선호하는 국민들의 소비 패턴과 건강 및 전통한약에 관한 관심 증대되고 있다. 또한, 생약성분에 대한 기대가 화학물질보다 높다는 점에서 볼 때 우슬을 원료로 하는 기능성 물질의 공급은 사회적 요구도에 부응한다. 또한, 국내 생약재 유통면에서 품질의 규격화나 표준화가 미흡하고, 수급과 가격이 매우 불안정하며, 수입 한약재가 국산과 뒤섞여 유통되고 있다는 점에서 차별적인 가공기술 개발을 통해 생산자와 소비자를 보호해야 할 필요성이 있다. 관절염의 원인은 여러 가지가 있고 그 증상 또한 다양하다. 그러나 젊어서 일을 많이 하거나 노화로 인한 퇴행성 무릎 관절염과 류마티스성 무릎 관절염의 경우에는 통증이 심하여 일상생활에 불편을 끼치며, 치료해도 별 효과가 없는 질환 중 하나다. 그러므로 퇴행성 관절염과 류마티스성 관절염의 경우에는 무엇보다도 예방이 중요하다.

관절염의 대표적인 치료로는 외과적 치료와 약물 치료가 있는데, 약물치료로 치료약을 복용한 많은 사람들이 일련의 위장장애 등의 부작용이 심각하다. 생약 추출물을 활용하여 치료제 연고를 만든다면 특히 기존의 화학약물들이 가지고 있는 위

장장애 등과 같은 부작용이 거의 없다는 측면과 국민들의 일반적인 화학약품에 의한 부작용과 주사제에 대한 거부감을 줄일 수 있고, 사용하기가 용이하다.

이러한 측면에서 볼 때 전통적인 한약재 중심의 단순한 제품구성과 의약품으로서 가공 및 유통상의 규제로 인해 소비자들의 기호에 부응하는 다양한 생약 제품 개발과 수요 창출이 제한되고 있는 실정에서 생약추출물을 이용한 의약품의 개발이 절실히 요구되고 있으며, 우슬을 기능성 생약자원으로써 고급 문화산업의 기초를 마련 할 수 있다는 점에서도 중요성을 가지고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1차년도

생약 성분(우슬)에 대한 조사를 위해 식물 분류법에 따른 우슬의 형태와 약효, 성분 조사하고, 우슬에 대한 정보를 수집, 분류한다. 우슬의 유효성분에 대해 조사하여 추출, 분획 등의 공정설계와 제품화를 위한 연구를 한다. 우슬 추출용매 선택하고, 우슬 주요성분 추출 및 분석한 후 유효 물질을 찾는다. 우슬을 이용한 연골 세포에 독성 실험 및 대사활성 기능 실험과 관절염 유발 동물 모델을 만들기 위한 예비 실험을 하여 2차년도에 동물임상실험을 시행할 수 있도록 준비한다.

2차년도

전년도 연구를 토대로 우슬의 유효성분 추출물의 항관절염 연고제 실용화 실증 실험을 통해 전년도에 했던 실험 결과들을 토대로 하여 확립된 퇴행성 관절염과 류마티스 질환 Model에 우슬 경구 투여와 제작한 우슬 추출물이 함유된 크림제를 처리하여, 관절 연골 및 활액막 조직의 조직병리학적 병변 변화, 행동학적 평가를 관찰한다.

우슬의 음료 제조하고, 우슬의 기능성 음료를 제품화하기 위하여, 음료 시작품을 제조하여 안전성 및 맛을 향상시킬 수 있는 방법을 규명함과 동시에 좀 더 받아들이기 쉽게 하기 위한 보완제 등을 조사한다. 위의 연구를 토대로 우슬 추출물 음료의 기능성 검증과 더불어 이를 소재로 한 음료(차)를 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 우슬의 항관절염 예방 및 치료제로서의 특성 조사, 물질 분리 및 생리기능성 연구

우슬 (牛膝, *Achyranthes Radix*)은 비름과(*Amaranthaceae*) 종에 속하는 다년생 식물로서 우리나라 각지의 들관이나 길가에 자생되고 있으며, 우리나라를 비롯하여 중국, 베트남 등에 널리 분포하고 있다. 키는 60~150cm 정도 자라고 줄기는 녹자색으로 모난 4각형을 이루며 그 마디 부위는 특별히 굵어 쇠무릎이라고 한다. 우슬은 항관절염(antiarrthritic), 최음효과(aphrodisiac), 항바이러스(antiviral), 지사효과(laxative), 항경련(antispasmodic), 항고혈압(antihypertensive), 항응고 효과(anticoagulant), 이뇨(diuretic), 및 항암효과(antitumor) 등이 알려진 약제이다. 우슬의 함유성분을 밝히는 많은 연구가 이루어져 왔고 특히, rutin, saponin, achyranthine, caffeine acid, oleanolic acid, inokosterone, ecdysterone, rubrosterone 및 phycion 등이 함유된 것으로 보고되고 있다. 최근에 많은 연구를 통해 *in vitro* 실험상에서 우슬의 면역 조절작용 급성 및 아급성 염증에 대한 항염증효과에 대한 효과가 알려져 있다. 우슬의 뿌리에는 oleanolic계 saponin과 steroid계 inokosterone, ecdysterone 등의 성분이 함유되어 있어 예로부터 귀중한 한약재로 사용하기도 하였으며 약리 효과는 진통 작용, 혈압강하작용 등이 있어 고혈압, 류마티스 및 관절통과 같은 울혈의 치료제, 이뇨 및 강장제 등의 치료제 및 민간요법으로 널리 쓰여 지고 있다. 우슬 성분에 있어서 뿌리에는 saponin, 칼슘염 및 점액질, steroid 화합물을 함유하고 있는데, saponin은 물에서 분해하면 oleanolic acid를 형성하고, steroid 화합물은 곤충변태 호르몬으로 ecdysterone, inokosterone, rubrosterone 등을 함유하며, 약리작용에서는 우슬의 곤충변태 호르몬은 강한 단백질 합성촉진 작용이 있으면서 다른 약물과 달리 부작용이 적다고 알려져 있다. Ecdysteroid는 ecdysone($C_{27}H_{44}O_6$: 2 β , 3 β , 14 α , 22 [R], 25-pentahydroxy-7-cholesten-6-one)과 20-hydroxyecdysone($C_{27}H_{44}O_6$: 2 β , 3 β , 14 α , 20 β , 22, 25-hexahydroxy-7-cholesten-6-one)에 관계된 polyhydroxy-ecdysteroids 군을 형성한다.

세포막 내에서 염증을 일으키는 cathepsin B의 과다 분비를 막아주는 작용을 하는 우슬의 20-hydroxyecdysone을 지표물질을 정하여 분리 및, 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 우슬 MeOH 추출물의 EtoAC 분획으로부터 각종 column chromatography를 실시하여 지표 물질인 20-hydroxyecdysone을 206.5 mg 단리하였다. 건조감량은 3.340 %로 규정된 17 %이하에 적합하였고 회분함량은 9.545 %로 규정된 10 %이하에 적합하였으며 산불용성 회분 함량은 1.270 %로 규정된 1.5 %이하에 적합하였다. 우슬의 성분인 20-hydroxyecdysone을 지표물질로 하여 HPLC로 함량을 분석한 결과, 20-hydroxyecdysone의 함량은 2.192 %를 나타내었다. 이상의 결과로 우슬 중 20-hydroxyecdysone의 함량은 2.18 %이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

배양한 관절연골세포에 우슬을 농도별로 처리하여 연골세포의 증식을 관찰한 결과 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 증가하여 25 $\mu\text{g/ml}$ 까지 유의한 세포증식의 효과를 보이다가 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 세포증식이 유의하게 억제되었다. 시간별 처리 시 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 12 시간부터 세포증식에 유의한 증가효과를 보였다. 과산화수소를 이용한 관절연골세포에 미치는 산화적 손상 영향은 9시간 동안 과산화수소를 농도별 처리 시에 10 μM 에서부터 농도 의존적으로 세포증식의 유의한 억제 효과를 보였으며, 시간별로 관찰한 결과 과산화수소 50 μM 로 처리 시 3시간째부터 유의한 세포증식의 억제 효과를 보였다($P < 0.05$). 세포의 산화적 손상 유도 후 유의하게 증가되었던 PGE_2 는 우슬 5, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 유의하게 감소되었다. 본 연구결과 우슬은 지표물질인 20-hydroxyecdysone이 2.18 %이상 함유되었고, 우슬 추출물을 관절연골세포에 처리 시 증식 효과 및 산화적 손상으로 인한 염증성 물질의 증가를 억제하는 효과를 보여, 관절염 치료를 위해 중요한 데이터로 활용 할 수 있을 것이다.

2. 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염에서의 우슬의 효과

퇴행성 골관절염은 관절연골세포와 세포외기질간의 형태적, 생화학적, 분자적, 그리고 생역학적 변화가 분명하고, 임상적으로 관절통, 압통, 움직임의 제한, 뼈 마찰음, 염증 등을 특징으로 한다. 연골 세포의 정상 기능을 이루기 위해 관절 연골의 구조적인 통합이 이루어지는데, 국소적인 MIA 주사는 연골세포 내의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 활동억제로 인하여 해당 작용의 대사 작용 파괴로, 관절 연골의 퇴행화를 유도한다.

관절 통각은 활액막 내 자유 신경 종말로부터 관절염이 있을 때 유발되며, MIA 유발 관절염 모델은 초기에 일시적 활막염을 유발한다. MIA 처치 후 염증 외에 연골하 골과 연골에 물리적 힘을 가함으로써 더욱 관절에 염증과 통증을 발생시키게 된다. 본 연구결과에서 관절염 유발 후 실험 대조군에서 연골 전체적으로 두께와, 세포충실성(cellularity)이 현저히 감소하였고, 퇴행성병변이 관절 모든 부분에서 잘 관찰되었다. 우슬 연고제를 처치한 후 각 실험군들에서 연골세포의 두께가 대조군에 비해 증가하였다. 또한 이러한 조직학적 변화를 Mankin's score로 측정된 결과 실험대조군에 비해 처치한 각 실험군들에서 점수의 유의한 감소 효과를 관찰하였다. 이상의 연구 결과로 보아 MIA로 유도한 퇴행성 관절염 백서에서 우슬 엑스가 함유된 크림과 초음파를 처치 시 실험대조군에 비해 실험군들에서 관절 연골의 침식 정도가 많이 호전됨이 관찰되었다.

우슬이 류마티스 관절염에 미치는 영향을 알아보기 위하여 류마티스 관절염 흰쥐 모델을 대상으로 우슬추출물의 경구투여와 제작한 연고제를 28일 동안 적용한 후 족부의 체적변화, 관절염지수, 관절염의 배측굴곡 및 저측굴곡 통증지수, 기계적 이질통 검사 그리고 조직학적인 검사(H & E, Safranin O-fast green) 및 면역조직화적인 검사(COX-2), 그리고 PGE₂의 농도 변화를 측정하여 염증 및 통증반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 모든 실험결과는 치료적 중재를 실시한 후 측정된 결과를 토대로 하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다. 류마티스 관절염의 유발 전·후의 육안적인 소견을 비교하여 볼 때 유발 후 발적과 부종 및 홍반이 관찰되었으며, H & E를 통한 조직학적인 소견에서도 유발 후에 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤을 확인할 수 있었다. 족부의 체적 변화, 관절염 지수 검사, 관절염

의 배측굴곡과 저측굴곡 통증지수에서 류마티스 관절염 유발 28일째에 관절염 군에 비하여 우슬 경구투여와 연고제 처리 군에서 통계적으로 유의한 감소를 확인할 수 있었다. 특히 병합투여한 군이 다른 군들에 비해 수치상으로 유의한 감소를 확인할 수 있었다. 류마티스 관절염의 기계적 이질통 검사결과, 유발 전에는 각 실험군은 통증역치가 높았으나 유발 후 족부의 민감화로 인하여 낮아졌던 역치가 점차 높아지고 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 유발 28일째에는 병합투여한 군이 다른 군들에 비해 수치상으로 유의한 감소를 확인할 수 있었다. 슬관절 부위의 Safranin O-fast green 염색결과를 관찰하여 조직학적인 지수로 표현한 결과, 관절염만 유도한 군보다 경구 투여와 연고제 처리한 군에서 염증 세포침윤과 활액막의 과증식, 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus) 형성, 연골과괴 지수가 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 또한, 병합처리한 군이 수치상으로 유의한 지수의 감소를 보였다. 이는 지수가 낮아지면 통증역치가 증가됨을 의미한다. 슬관절의 활액막 부위에서 COX-2의 면역조직화학반응 결과, 실험종료 후에 관절염 유도군의 활액막 부위에서는 다발성의 양성 세포의 발현을 관찰할 수 있었으나, 우슬을 처리한 군들의 활액막 부위에서는 국소적으로 감소된 양성 세포의 발현을 관찰할 수 있었다.

이상의 연구 결과에 의하면 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염에 대한 치료적 중재 방법으로 우슬추출물을 이용한 연고제와 경구투여는 염증 및 통증반응의 감소에 긍정적인 영향을 주는 것을 확인할 수 있었고, 더 나아가 행동학적으로 제한되었던 관절의 기능적 회복에까지 영향을 미칠 것으로 사료된다.

3. 활용에 대한 건의

본 연구개발 결과의 활용분야 및 방법, 범위는 의약품의 개념보다는 독성이 없이 관절염을 조절할 수 있는 인체 친화적이고 안정성이 있고, 비록 효능은 합성제제보다는 약하더라도 의약부외품이나 식품으로 치료보조제로서 활용이 가능할 것이다. 또한 우슬 생약재를 다량 확보하기 위해 지역 내 약용작물의 생산기반을 구축으로 한 고부가가치 농업작물로서 활용할 수 있다고 생각된다. 본 연구를 통해 우슬 고유의 생리활성 성분을 분리하는 방법을 확립하였고, 관절염에 대한 기초 자료를 제공하였다. 또한 기능성 성분의 분자량 및 구조를 확인하는 방법을 통하여 다양한 종류의 새로운 기능성 성분의 탐색을 가능케 할 것으로 사료된다.

기존 문헌을 통한 자료 확보와 과학적인 연구를 통하여 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분으로 등록시키기 위한 안전성 및 건강기능성 입증 자료를 확보할 수 있다. 우리나라는 예로부터 생약 및 한약초 재배에 유리하며, 최근 친환경 농업 및 생약 분야에도 관심이 고조되고 있는 실정이다. 국내 농촌지역에서는 약용작물단지 와 산약초단지가 조성되는 등 지역 특성화 분야로 생약생산기반조성이 활발하게 진행되고 있으며 이를 활용하여 우슬의 대량생산을 통한 지역 생약 산업의 발전에 기여할 것이다. 또한 본 연구소와 근접한 지역과 연계사업 등 긴밀한 관계를 유지하며 새로운 생약 농업기반이 구축될 것이다. 우리 농산물인 우슬을 건강기능성 원료·성분으로 등록 수행이 가능할 것으로 보이며, 연구실에서 축적된 know-how를 바탕으로 이를 적극 활용하여, 생약추출물이 함유된 항관절염 치료 연고제 및 기능성 음료 개발이라는 total know-how 축적과 이후 개발될 생약추출물을 이용한 고부가가치 제품화를 위한 자원으로 활용할 것이다.

또한, 우슬 생약재 산업화는 생물자원의 다양성 확보와 이들 자원을 지적재산권으로써 보존한다는 차원에서도 의미가 크며, 이런 사회·문화적인 중요성에 입각하여 수입 한약재에 대응한 품질 경영체제를 구축하고, 우슬을 원료로 하는 기능성 물질의 개발은 사회적 요구도에 부응한다고 볼 수 있다.

개발기술의 특허화 및 산업화를 통하여 시장전망이 밝은 국내 및 세계 기능성 식품 시장으로의 진출 기대된다. 일본의 기능성식품 시장은 7,000억엔 규모이고 미국은 110억불수준으로서 국내에서는 건강보조식품 원료를 연간 1,000억원 이상 수입

하고 있어 본 기술이 실용화되면 연간 500억원의 수입대체 효과를 얻을 수 있다. 기능성생리활성 물질의 대량 생산으로 연간 150억 규모의 농가소득 증대기 기대된다. 한약재를 이용한 한방의료 산업이나 민간처방은 우리의 전통문화이자 생활양식의 한 부분으로 계승·발전시켜야 할 대상이며, 기능성 생물자원으로써 고급 문화산업의 기초가 될 수 있다는 점에서도 중요성을 가지고 있다. 생약재 산업화는 생물자원의 다양성 확보와 이들 자원을 식품 및 제약 산업으로 발달 하여 지역 내 생약재배 활성화에도 일조할 것이다.

우슬 추출물을 가지고 항관절염 효과에 대한 연구가 전무한 실정에서 지역 내 잉여 우슬을 가지고 고부가가치상품을 제품화 한다면 지역 농민들에게도 경제적 수익 증대가 클 것이다. WTO 체제 출범 이후 시장 개방과 농산물 수입에 따른 국내 농가 보호 및 농가 소득 증대 그리고 국산 생약재의 우수함을 입증하여 국제 경쟁력을 갖춘 고소득 작물로서의 경제·산업적 의미가 크다. 건강기능성을 가진 우리 농산물을 건강기능식품 생산에 적극 활용함으로써 수입 건강기능식품에 대한 능동적인 대응 및 국내 건강기능식품 산업을 육성할 수 있을 것으로 보인다.

SUMMARY

I. Title

Development of high value-added products and anti-arthritis physiological activity of *Achyranthes Radix*

II. Goal and Significance of the Study

The purpose of this investigation was to examine osteoarthritis and rheumatoid arthritis effects of *Achyranthes Radix* by cream with *Archyranthes Radix* extract. In addition, Development of high value-added products of *Achyranthes Radix*.

III. Research and Scope

The dried root of *Achyranthes japonica* Leveille et Vaniot (*Amaranthaceae*, AJ) is one of the source plants of *Achyranthes* root. AJ could be activated the blood circulation in human. The active ingredients of AJ were oleanolic acid, saponin and 20-hydroxyecdysone. 20-hydroxyecdysone was a potent inhibition substance of excess secretion of Cathepsin B causing an inflammation. In this study, we tried to isolate and evaluated loss on drying, total ash, acid-insoluble ash of 20-hydroxyecdysone from *Achyranthis Radix*. In order to evaluate quantitative determination of 20-hydroxyecdysone in AJ HPLC method had been used. Separation and quantitative determination of 20-hydroxyecdysone from AJ has been conducted by using HPLC method. 20-hydroxyecdysone in a methanol extract from the raw drug was separated on a reverse phase column using n-hexane : ethanol : methanol(1:3:3) solvent system. Content of 20-hydroxyecdysone in AJ showed average 2.18% in samples collected throughout the regions of Korea.

Osteoarthritis(OA) is a degenerative joint disease characterized by fibrillation

and erosion in cartilage, chondrocyte proliferation and osteophyte formation at the joint margins, and sclerotic of subchondral bone. *Archyranthes Radix* has had extensive therapeutic application, and there has been increasing interest in its biological effects. However, the biochemical and histological effects of *Archyranthes Radix* on chondrocyte have never been systematically investigated. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of *Archyranthes Radix* on role of anti-oxidant and anti-inflammation on oxidative stress induced by H₂O₂ in rat articular chondrocytes. Articular cartilage was harvested from rat articular cartilage and osteoarthritis models was induced from MIA. Cartilage explants and isolated chondrocytes from articular cartilage were treated in various conditions as monolayer culture. After *Archyranthes Radix* treatment, the time-dependent effects of *Archyranthes Radix* was evaluated by measuring cell proliferation and by analysing cell morphology and expression of cartilage apoptotic protein using XTT. *Archyranthes Radix* resulted in a time- and dose-dependent cell proliferation, which was largely attributed to apoptosis. Cell death caused by H₂O₂, was inhibited by *Archyranthes Radix*. Histological findings that are similar to those observed in human osteoarthritis, such as disorganization of chondrocytes, erosion and fibrillation of cartilage surface, and subchondral bone exposure were observed in a MIA-induced osteoarthritis model. Safranin O-fast green staining revealed that marked diffuse reduction of proteoglycans treated with MIA. The Mankin's score were closely correlated to the grade of histological findings.

This study was performed to investigate the effects in inflammatory and pain status on rheumatoid arthritis(RA) induced rats by *achyranthes radix*(AR) extracts ointment according to the application methods with the change of motor-behavioral and immunohistochemistry study through the change of COX-2 in the knee joint and PGE₂ concentration production in serum (pre, 3st, 7st, 14st, 21st, 28stday). The results of this study were as follows:

In result of gross & histological examination, after RA induction were observed

reddening, edema and erythema. And H&E stain were observed the destruction of articular cartilage, bony erosion and the infiltration of inflammatory cells after RA induction. In result of volume change of hind paw edema and arthritis indices test and arthritic dorsal flexion & plantar flexion pain test, group II, III, IV were showed that significantly decrease to arthritis indices compared with group I at 28th day of RA induction. In result of mechanical allodynia test, After RA induction were observed lowering of the mechanical threshold when compared to the pre RA induction. Because of RA induced rats developed mechanical hypersensitivity. Especially, group II, III, IV were showed that significantly increase mechanical threshold compared with group I. In result of safranin o-fast green stain were showed histological indices, group II, III, IV were showed that significantly decrease the scores of cellular infiltration and synovial hyperplasia, pannus formation and cartilage destruction compared with group I at 28th day of RA induction and group IV were the most decreased compared with group II, III at 28th day of RA induction. In result of immunohistochemistic response of COX-2, group II, III, IV were showed that lower response effect compared with group I at 28th day of RA induction. Group I were multicentric response but group II, III, IV were lower local response at synovial tissue. In result of prostaglandin E₂ concentration in serum were investigated at the end of experiment. The PGE₂ concentration of the experimental group I were increased when compared to the pre RA induction. But the PGE₂ concentration of the group II, III, IV were decreased compared to the group I.

IV. Suggestion

In conclusion, Content of 20-hydroxyecdysone in *Archyranthes Radix* showed average 2.18% in samples collected throughout the regions of Korea. In addition, *Archyranthes Radix* in osteoarthritis results are consistent with the hypothesis

that under conditions of oxidative stress, the H₂O₂-induced inhibition of cell proliferation in the rat chondrocyte is mediated through a modulation of *Archyranthes Radix*, promoting further anti-arthritis effect, indicating a potentially important role in cartilage repair and in the treatment of osteoarthritic cartilage. The above results suggest that *Achyranthes radix* extracts ointment effective acts were the most therapeutic intervention in inflammatory, pain control and motor-functional recovery in osteoarthritis and rheumatoid arthritis induced rat.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	29
Section 1. Objectives and significance of the project	29
Section 2. Categories of the project	34
Chapter 2. Literature review and case study	35
Chapter 3. Research contents and results	36
Section 1. Studies on the prevention of antiarthritis, therapeutic character, constituents, purification and physiological function of <i>Achyranthes Radix</i> 36	
1. Investigation on <i>Achyranthis Radix</i>	38
2. Isolation and Quantitative Determination from <i>Achyranthes Radix</i>	38
가. Extract solvent selection of <i>Achyranthes Radix</i>	38
나. Conclusion of extract condition	39
다. Component separation by fraction	39
1) Sequence of fraction	39
2) Hexane layer	40
3) Chloroform layer	41
4) Ethyl acetate layer	41

5) Butanol layer	4
라. Comparison of component content follow <i>Achyranthes Radix</i> region	4
3. Separation of functional substance in <i>Achyranthes Radix</i>	4
가. Material and Method	4
1) Material and Method	4
2) Equipment and sample	4
3) Confirmation test	4
4) Dried content and ash test	4
5) Acid insoluble ash test	4
6) 20-Hydroxyecdysone extract and refine	44
7) Analysis condition of HPLC and measuring	4
8) Manufacture and content of 20-Hydroxyecdysone	74
나. Results and investigation	4
1) Confirmation test and dried content	4
2) Ash test and acid insoluble ash test	4
3) 20-Hydroxyecdysone extract and refine	84
4) Measure of 20-Hydroxyecdysone	94
5) Content of 20-Hydroxyecdysone	94
4. Manufacture of extract tea	5
5. Chondrocyte toxicity and metabolic activity test	5
가. Material and Method	5
1) Reagent and material	5
2) Chondrocyte isolation and culture	5
3) Chondrocyte oxidative injury	5
4) Change of chondrocyte proliferation	5
나. Results and Investigation	5

1) Dose-dependent effects of <i>Archyranthes Radix</i> in chondrocyte proliferation	57
2) Time-dependent effects of <i>Archyranthes Radix</i> in chondrocyte proliferation	57
3) Dose-dependent effects of H ₂ O ₂ in rat chondrocyte	95
4) Time-dependent effects of H ₂ O ₂ in rat chondrocyte	95
5) Effect of prostaglandin E ₂ concentration	6
Section 2. Effect of <i>Archyranthes Radix</i> in osteoarthritis and rheumatoid arthritis	62
1. Effect of <i>Archyranthes Radix</i> in osteoarthritis	6
가. Introduction	6
나. Material and Method	63
1) experimental animal	6
2) Osteoarthritis model	6
3) Experimental scheme	6
4) <i>Archyranthes radix</i> cream preparation	5
5) Histological test	6
(1) Hematoxylin & Eosin (H & E) stain	7
(2) Safranin O-fast green stain	7
(3) Histological evaluation	7
다. Results and Investigation	9
1) Histopathological evaluation in osteoarthritis	9
2) Histopathologic findings	7
3) Histopathological evaluation	7
2. Effect of <i>Archyranthes Radix</i> in rheumatoid arthritis	8

가. Introduction	78
나. Material and Method	81
1) Experimental animal	81
2) Rheumatoid arthritis model	82
3) Preparation <i>Archyranthes Radix</i> extract containing	82
4) Assessments for behavioral observation	82
(1) Volume change of hind paw edema	83
(2) Clinical assessment of arthritis indices	83
(3) Scoring of arthritic dorsal flexion & plantar flexion pain test	83
(4) Measurement of mechanical allodynia	84
5) Histological assessment	85
(1) Paraffin embedding sample	85
(2) Histopathological survey in knee joint	86
(3) Histopathological survey in knee joint	86
6) Immunohistochemical stain(COX-2 protein)	88
7) Measure of prostaglandin E ₂ concentration	88
다. Results	88
1) Gross and histopathological changes in RA	88
2) Assessments for behavioral observation	88
(1) Volume change of hind paw edema	88
(2) Clinical assessment of arthritic index	90
(3) Scoring of arthritic dorsal flexion pain test	91
(4) Scoring of arthritic plantar flexion pain test	93
(5) Change of mechanical allodynia	94
3) Histochemical evaluation	95
(1) Histochemical reaction through safranin O-fast green stain in knee joint	94
(2) Evaluation of histological index through safranin O-fast green stain in	94

knee joint	96
(3) Change of Cox-2 immunoreactive cell in knee joint	79
4) Change of concentration in prostaglandin E ₂	8
5) Concentration of inflammatory cytokine concentration	9
6) Radiological view	101
라. Investigation	103
Section 3. <i>Archyranthes Radix</i> include transdermal delivery system	107
1. Transdermal delivery system	107
2. Oral preparation	113
Chapter 4. The achivement degree of research goals and the degree of contribution to the related field	115
1. The achivement degree of research goals	15
2. The degree of contribution to the related field	16
Chapter 5. Plan for using research results	117
1. Application	117
2. Industrialized programs	118
Chapter 6. Collection of foreign technique information	120
Chapter 7. Reference	122

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	29
제 1절	연구개발의 목적과 필요성	29
제 2절	연구개발의 범위	34
제 2 장	국내외 기술개발 현황	35
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	36
제 1절	우슬의 항관절염 예방 및 치료제로서의 특성 조사, 물질 분리 및 생리기능성 연구	36
1.	생약 성분(우슬)에 대한 특성 조사	38
2.	우슬의 성분 추출 및 분석	38
가.	우슬의 추출용매 선정	38
나.	추출조건 확정	38
다.	분획에 의한 성분 분리	39
1)	분획의 순서	39
2)	Hexane층	40
3)	Chloroform층	41
4)	Ethyl acetate층	41

5) Butanol층	4
라. 우슬의 부위에 따른 성분함량 비교	42
3. 우슬의 기능성 물질 분리	43
가. 재료 및 방법	43
1) 시약 및 재료	43
2) 기기와 검체	43
3) 확인시험	43
4) 검조감량과 회분시험	43
5) 산불용성 회분시험	44
6) 20-Hydroxyecdysone 추출 및 정제	44
7) HPLC의 분석조건 및 검량선 작성	45
8) 검액의 조제 및 20-Hydroxyecdysone의 함량	74
나. 결과 및 고찰	48
1) 확인시험 및 건조함량	48
2) 회분시험 및 산불용성 회분시험	48
3) 20-Hydroxyecdysone 추출 및 정제	84
4) 20-Hydroxyecdysone의 검량선	84
5) 20-Hydroxyecdysone의 함량	94
4. 추출차의 제조	51
5. 우슬의 연골 세포 독성 실험 및 대사활성 기능 실험	54
가. 재료 및 방법	54
1) 시약 및 재료	54
2) 연골세포 분리 및 배양	55
3) 관절연골세포의 자가고사 유도	56
4) XTT를 이용한 연골세포의 증식 변화	56
나. 결과 및 고찰	57

1) 우슬 농도에 따른 증식률	57
2) 우슬 처리 후 배양시간에 따른 증식률	57
3) 과산화수소수 농도에 따른 세포 증식률	59
4) 과산화수소수 처리 후 배양시간에 따른 세포 증식률	59
5) 우슬이 prostaglandin E ₂ 에 미치는 영향	61
제 2절 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염에 우슬의 효과	62
1. 퇴행성관절염에서 우슬이 미치는 영향	62
가. 서설	62
나. 재료 및 방법	63
1) 실험동물	63
2) 퇴행성 골관절염 모델	64
3) 실험구성도	64
4) 우슬 크림 제조	64
5) 조직학적 검사	66
(1) Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색	66
(2) Safranin O-fast green 염색	66
(3) 조직학적 평가	67
다. 결과 및 고찰	69
1) 퇴행성 골관절염 유발 시 병리조직학적 평가	69
2) 치료 종료 후 병리조직학적 소견	71
3) 치료 종료 후 병리조직학적 평가	73
2. 류마티스 관절염에서 우슬이 미치는 영향	78
가. 서설	78
나. 재료 및 방법	81
1) 실험동물	81

2) 류마티스 관절염 모델	82
3) 우슬추출물 경피투과제의 제조 및 연고도포방법	82
4) 행동학적인 관찰 평가	82
(1) 족 부종의 체적변화	83
(2) 관절염 지수의 임상적 평가	83
(3) 관절염의 배측굴곡과 저측굴곡 통증 지수	83
(4) 기계적 이질통 측정	84
5) 조직학적 검사	85
(1) 조직 표본제작	85
(2) 류마티스 관절염 유발 전·후 슬관절의 병리조직학적인 관찰	85
(3) 실험 종료 후 슬관절의 병리조직학적인 관찰	85
6) COX-2 단백질에 대한 면역조직화학 염색	8
7) 혈청에서의 Prostaglandin E ₂ 농도 측정	86
다. 결과	88
1) 류마티스 관절염의 육안 및 조직학적 유발 소견	88
2) 행동학적인 관찰 평가	88
(1) 족 부종의 체적변화	88
(2) 관절염 지수의 임상적 평가	90
(3) 관절염의 배측굴곡 통증 지수	91
(4) 관절염의 저측굴곡 통증 지수	93
(5) 기계적 이질통의 변화	94
3) 조직화학적 평가	95
(1) 슬관절의 Safranin O-fast green 염색을 통한 조직화학적 반응	95
(2) 슬관절의 Safranin O-fast green 염색을 통한 조직학적인 지수 평가	96
(3) 슬관절의 COX-2 단백질의 발현 면역조직화학적 반응	97
4) 혈청에서의 Prostaglandin E ₂ 의 농도변화	98
5) 혈청에서의 염증성 사이토카인의 농도 변화	99
6) 방사선학적 소견	101

라. 고찰	103
제 3절 우슬 함유 경피 흡수 제제 제조	107
1. 경피흡수제	107
2. 경구투여제	113
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	115
1. 연구개발 목표의 달성도	115
2. 관련 분야에의 기여도	116
제 5장 연구개발결과의 활용계획	117
1. 활용방안	117
2. 산업화 추진방안	119
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보	120
제 7장 참고문헌	122

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적과 필요성

국내에서 생산되는 우슬을 이용하여 성분의 추출, 분석 등을 통하여 유효 성분의 생체 내 생리활성 메카니즘 규명 및 항관절염 효과에 관한 효능을 연구한다. 또한 우슬의 고부가가치 제품으로서 관절염을 치료할 수 있는 치료용 연고제를 개발하며, 아울러 관절염환자는 물론 예방적 차원에서 음용할 수 있는 기능성음료(차)를 개발을 목적으로 한다.

본 연구는 국내산 우슬을 대상으로 하여 성분분석을 통해 생리활성물질을 규명하고, 우슬의 관절염 효과를 체계적으로 연구한 후, 가공기술을 개발, 기능성 식품 또는 식품의약 소재로 개발하여 농산물시방개방시대에 부응할 수 있는 고부가가치의 대체작물로서의 가능성을 검토하여 농촌경제의 활성화를 이루고자 한다.

1) 기술적 측면

우슬(牛膝)은 비름과(Amaranthaceae)의 쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 뿌리를 기원으로 하여 한국과 일본, 중국에 분포하며 자라지만, 효능면에서는 우리나라 것이 월등히 우수한 것으로 알려져 있다. 다년생 초본식물로 약리 및 생리활성에 관한 구전이 많았던 작물이다. 50~100cm 여러해살이 식물로 뿌리는 황토색이며 인삼과 비슷하게 향긋한 냄새가 난다. 줄기는 대형이고 단면은 정방형으로 원줄기는 높이 1m까지도 자라며 가지는 대생한다. 마디가 굽어져 소의 무릎처럼 볼록하게 보이므로 쇠무릎이라 한다.

전국 산야에서 생산이 가능하지만 지역에 따라 고랭지나 준고랭지에서는 겨울에 얼어 죽지만 중부이남지역에서는 월동하며 온난 습윤한 남부의 따뜻한 지역에서 재배하는 것이 유리하다. 현재 남부지역에서 일부 재배되어 한약재 등으로 공급하고 있으나 아직은 연구 상태가 미비한 실정이기 때문에 국내산 우슬의 고유한 특성을 살릴 수 있는 제품의 제조기술이 필요하다. 우슬은 oleanolic계(系) saponin, steroid 계(系) inokosterone 등의 성분을 주축으로 여러 기능성 화합물을 함유하고 있으며,

민간약으로 관절염, 월경불순, 산후복통, 근육통, 신경통에 사용되고 있다. 이러한 천연 화합물은 처리 조건에 따라 그 구조가 쉽게 변형되거나 분해되어 효능이 달라지는 경우가 있어 일정 성분을 활용하기 위해서는 균일화된 처리 공정의 확립이 중요하며 이들 성분을 정확히 동정하기 위한 기술이 필요하다. 더욱이 현대화되는 사회분위기에 따라 다양한 맛과 기능을 가진 건강 보조물질의 출현이 요구되는 시점이다. 다양한 연령층의 요구에 기여할 수 있는 물질을 추출·가공하여 공급한다면 지역 특산품으로서의 개발 및 많은 수요를 창출 할 것이며, 이에 필요한 우슬이 가지는 기능성 성분을 최대한으로 추출할 수 있는 전 처리법 확립과 원료 자체의 쓴맛, 색깔 등 식품으로써 부적합한 문제를 해결하여 기호성을 증진시킬 수 있는 가공기술의 개발이 필요하다. 특히, 본 과제에서 개발하려고하는 치료용 연고제는 기존의 화학적 합성에 의해 이루어지며, 구강을 통해 섭취하는 약물과 달리 생약재를 이용한다는 점과 직접 우리가 원하는 부위에 바를 수 있다는 많은 기술적 장점을 내포하고 있다. 산·학과 연계하여 우수한 생약재의 유효 성분에 대한 연구를 체계적이고, 과학적인 연구를 하는 과정에서 생약재의 추출, 분리 및 효능 평가에 대한 새로운 기술 개발은 특히나 이와 연관된 방법적 기술을 확보하여 지역 농업 사회에 이바지 하는 생약재 산업화에 기여 할 수 있을 것이다.

2) 경제·산업적 측면

세계무역기구(WTO) 쌀 협상 타결, 자유무역협정(FTA) 체결 확대, 농촌 인구 고령화 등 농촌의 여건이 빠르게 악화 되면서 현시대에 부응하는 농촌의 경쟁력이 있는 경제작물의 개발·공급이 필요하다. "한방의료보험제도"의 실시에 따라 한약재의 소비는 급증하고 있으나 국내 농촌의 한약재 생산은 경작규모가 영세하며 또한 인건비의 상승 그리고, 생산기반 구축이 어려운 산간·구릉지에서 재배되고 있기 때문에 기계화를 통한 생산비 절감이 어렵다. 때문에 경작 비용이 저렴하면서 척박한 토양에서도 잘 자랄 수 있는 다년생 초본인 우슬과 같은 우수 생약 작물을 재배할 수 있는 환경을 만든다면 농촌의 한약재 생산의 경쟁력 증대에 좋은 영향을 줄 것이다.

우슬은 4~5월에 종자 파종하여 10~11월에 수확할 수 있으며, 퇴비를 주는 조건

만으로도 수확이 가능하여 재배하기가 쉬우며, 건강에 대한 증대 관심 및 전통적인 약효능이 알려지면서 국내 전체 생산량이 점차적으로 늘어나고 있다. 비름과에 속하는 다년초 식물인 쇠무릎의 뿌리를 말린 약재인 우슬(牛膝)은 혈액이 잘 돌게 하고 어혈을 없애는 성질이 있어 쇠무릎의 뿌리를 말린 한약재는 월경불순, 난산, 산후복통, 산후자궁무력증, 타박상, 부스럼 등에 쓰이고 있으며, 이뇨작용·자궁수축작용·식균작용·항알레르기 작용 등이 있는 것으로 밝혀졌고, 특히 태음인 체질에게 좋은 한약재이다. 현재 가격으로 볼 때 1kg당 약 6,000원으로 계산하면 경지 1평당 24,000원이며, 1,000평이 경작지에서 약 24,000,000원의 소득을 올릴 수 있는 고소득 작물로 볼 수 있다. 예를 들어 우슬 1kg으로 음료를 제조 시에 약 70L를 만들 수 있으며, 100ml 당 10,000원(현재 시가)으로 계산하면 7,000,000원의 소득을 올릴 수 있는 고소득 작물로 볼 수 있다. 또한 최근 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 영세 업체를 중심으로 생약재를 이용한 건강음료 및 건강식품이 나타나고 있으나 효능에 대한 과학적이며 체계적인 연구 부족 및 음료식품으로써의 품질이 열악한 실정이다. 이러한 다기능성 음료를 개발함으로써 우슬의 부가가치를 높여 농가소득 증대에 기여하며, 양질의 우슬 재배와 더불어 지역 생약재 산업의 경쟁력을 높이고자 한다. 또한 생약재의 수급 및 가격안정을 확보하여 지속적으로 농가소득 증대를 가져올 수 있다.

또한 우슬의 기능성 활용을 위한 산업은 현재 농가 차원에서도 다양한 재배방법이 실용화되어 우슬의 생산기술이 개발되어가고 있기 때문에 신 기능성 자원으로서의 활용방안이 제시된다면 농가소득증대 및 식·약품 산업으로서 혈액 순환제, 관절염 치료제, 기능성 음료 등으로 개발되어 농가 소득증대의 일익을 담당할 수 있다. 현재 국내 노령 인구층에서 가장 많은 만성 질환으로 관절염을 꼽을 수 있으며, 이로 인해 신체적 활동에 제약을 받게 되는 인구는 심장병이나 암, 또는 당뇨병에 의한 경우보다 훨씬 많아 육체적 불구를 야기하는 가장 큰 원인이 되고 있다. 보건복지부 발표에 따르면, 국내 급성질환으로는 감기, 만성질환으로는 1위가 관절염으로 인구 1,000명당 63.9명으로 95년에 인구 1,000명당 34명이던 것이 3년 후인 98년에 61명으로 2배에 가깝게 증가했고 3년 후인 2001년에는 64명으로 증가추세가 크게 둔화되었으며 지금까지 이어지고 높은 비율로 유지되고 있으며, 이로 인한 경제적 손실은 무려 5조원에 이른다. 1996년 세계보건기구와 국제은행이 '전 세계의 질

병으로 인한 손실 보고서(The Global Burden of Disease)'라는 제목의 연구 결과에서 2020년까지 50세 이상의 인구수는 두 배가 될 것으로 예상했으며, 이런 추세와 함께 인구의 노령화에 따라 근골격계 질환 인구도 급속히 증가할 것으로 예상했다. 전 세계적으로 근골격계 질환으로 인해 사망하거나 불구가 되는 사람도 많아질 것으로 보이며 따라서 이 분야에 대한 연구 증대, 질병 교육 확대, 접근 가능한 치료제 등의 개발이 필요하다고 하였다.

3) 사회·문화적 측면

생약재는 국민들의 건강을 지키는 의약품이자 농가소득원으로서 오랫동안 우리 생활과 밀접한 관계를 맺어 왔으며, 특히 최근에는 웰빙을 선호하는 국민들의 소비 패턴과 건강 및 전통한약에 관한 관심 증대되고 있다. 또한, 생약성분에 대한 기대가 화학물질보다 높다는 점에서 볼 때 우슬을 원료로 하는 기능성 물질의 공급은 사회적 요구도에 부응한다. 또한, 국내 생약재 유통면에서 품질의 규격화나 표준화가 미흡하고, 수급과 가격이 매우 불안정하며, 수입 한약재가 국산과 뒤섞여 유통되고 있다는 점에서 차별적인 가공기술 개발을 통해 생산자와 소비자를 보호해야 할 필요성이 있다. 관절염의 원인은 여러 가지가 있고 그 증상 또한 다양하다. 그러나 젊어서 일을 많이 하거나 노화로 인한 퇴행성 무릎 관절염과 류마티스성 무릎 관절염의 경우에는 통증이 심하여 일상생활에 불편을 끼치며, 치료해도 별 효과가 없는 질환 중 하나다. 그러므로 퇴행성 관절염과 류마티스성 관절염의 경우에는 무엇보다도 예방이 중요하다.

관절염의 대표적인 치료로는 외과적 치료와 약물 치료가 있는데, 약물치료로는 지금까지 통증이 있는 근골격계 질환에 대표되는 치료제인 항염증제(NSAID 등)의 약물을 사용하나 NSAID를 복용한 많은 사람들이 일련의 위장장애 등의 부작용이 심각하다. 생약 추출물을 활용하여 치료제 연고를 만든다면 특히 기존의 화학약물(NSAIDs)들이 가지고 있는 위장장애 등과 같은 부작용이 거의 없다는 측면과 국민들의 일반적인 화학약품에 의한 부작용과 주사제에 대한 거부감을 줄일 수 있고, 사용하기가 용이하다. 우슬(牛膝)은 혈액이 잘 돌게 하고 어혈을 없애는 성질이 있어 관절염, 신경통, 월경불순, 난산, 산후복통, 산후자궁무력증, 타박상 등에 쓰이고

있으며, 이노작용·자궁수축작용·식균작용·항알레르기 작용 등이 있는 것으로 민간요법으로 이용되고 있다. 이러한 측면에서 볼 때 전통적인 한약재 중심의 단순한 제품구성과 의약품으로서 가공 및 유통상의 규제로 인해 소비자들의 기호에 부응하는 다양한 생약 제품 개발과 수요 창출이 제한되고 있는 실정에서 생약추출물을 이용한 의약품의 개발이 절실히 요구되고 있다. 우슬을 이용한 한방의료 산업이나 민간 처방은 우리의 전통문화이자 생활양식의 한 부분으로 계승·발전시켜야 하며, 기능성 생약자원으로써 고급 문화산업의 기초가 될 수 있다는 점에서도 중요성을 가지고 있다.

제 2절 연구개발의 범위

1차년도

생약 성분(우슬)에 대한 조사를 위해 식물 분류법에 따른 우슬의 형태와 약효, 성분 조사하고, 우슬의 정보를 수집, 분류한다. 우슬의 유효성분이 관절염에 미치는 영향과 성분 추출, 분획 등의 공정설계와 제품화를 위한 연구를 한다. 우슬 추출용매 선택하고, 우슬 주요성분 추출 및 분석한 후 유효 물질을 찾는다. 우슬을 이용한 세포 독성 실험 및 대사활성 기능 실험과 관절염 유발 동물 모델을 만들기 위한 예비 실험을 하여 2차년도에 동물임상실험을 시행할 수 있도록 한다.

2차년도

우슬의 기능성 음료 제조하고, 우슬의 기능성 음료 제품화하기 위하여, 음료 시제품을 제조하여 안전성 및 맛을 향상시킬 수 있는 방법을 규명함과 동시에 좀 더 받아들이기 쉽게 하기 위한 보완제 등을 조사한다.

위의 연구를 토대로 우슬 추출물 음료(차)의 기능성 검증과 더불어 이를 소재로 한 음료 개발한다. 또한 우슬의 유효성분 추출물의 항관절염 연고제 실용화 실증 실험을 통해 전년도에 했던 예비 실험 결과들을 토대로 하여 확립된 관절염 질환 Model 질환에 우슬 유효성분을 경구 투여한 후 치사시켜, 관절 연골 및 활액막 조직의 조직병리학적 병변 변화를 관찰한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

중국이나 일본에서는 전통적인 동양의학적 지식을 바탕으로 오래전부터 생약 추출물로부터 의약품을 발견하고자 노력하였으나 연구 과정에 있어 일본 경우 의약품 전 단계인 건강보조식품으로 시장을 점유하고 있고, 중국 경우 아직까지 가시적 연구 성과는 얻지 못한 상태이다. 국내 경우 한의학적 경험과 지식을 바탕으로 생약 성분을 추출하여 디자인하여 상품화 한다면, 국내 뿐 아니라 세계 시장에서 좋은 성과를 거둘 것이다.

우슬에 대한 약효는 관절염을 비롯하여 다방면으로 있다고는 알려져 있지만 이에 따른 구체적인 생체 기능성 물질 성분 규명 및 실용화에 대한 연구는 아직 많이 되어 있으며, 일부에서 약리 활성물질과 관련된 연구가 활발하게 진행되고 있는데 이 중 우슬이 포함되어 있다. 일본에서는 우슬의 oleanolic계 saponin, steroid계 inokosterone, ecdysone β -sitosterol 등의 성분이 항종양 활성을 보였다고 일부 보고되고 있다.

국내 경우 건강기능성을 지닌 생약재가 한방(韓方)이나 민간요법에서 많이 활용되고 있으나, 건강 기능성 원료로 하기에는 안전성과 기능성을 입증할 과학적이고 체계적인 연구가 매우 단편적이거나 아직은 미흡한 실정이다. 현재 국내에서 시판되는 대부분의 건강식품들은 국내 농산물보다 주로 외국에서 개발된 천연물들을 사용하여 제조되고 있어 그 수입액이 연간 1,600억 원에 달한다. 최근에 와서 생약재를 이용한 건강식품 및 치료제 개발에 관심이 모아지고 있으며, 국내 생약재의 건강식품 소재화의 경우는 도라지의 약리 작용을 이용한 건강식품 연구, 농산물 및 생약재의 혈당강화 효능 및 이를 활용한 혈당 조절용 식품개발 연구 등 일부 연구가 진행되어 왔으며 음료의 경우 인삼, 석류, 대추, 오미자 등의 식미가 양호한 생약재를 원료로 한 음료가 소비되고 있으나 생약재의 약리적 효과를 기대하는 기능성 음료로 보기에선 무리가 따른다. 또한, 일반적으로 반고형 제제는 국소 적용을 목적으로 하는 외용제나 최근 좌제, 연고제, 젤제를 이용하여 전신 작용을 목적으로 하는 경피 제제 개발이 많이 이뤄지고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 우슬의 항관절염 예방 및 치료제로서의 특성 조사, 물질 분리 및 생리기능성 연구

1. 생약 성분(우슬)에 대한 특성 조사

최근 경제 성장에 따른 식생활의 변화로 각종 만성퇴행성 질환의 발병과 사망률이 증가하는 추세이다. 또한 흡연, 과음 및 스트레스와 같은 간접적 인자들의 억제 또는 예방 및 치료를 위한 건강 기능성 식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이런 활발한 연구는 생약의 추출과 상품화에 대해서도 관심이 많아지고 있다. 예로부터 한약제로 많이 쓰이는 우슬의 유효성분에 대하여 분석하고자 본 연구를 실시한다.

쇠무릎(*Achyranthes Radix*)은 비름과(*Amaranthaceae*)에 속하는 식물로 소의 무릎처럼 생겼다고 하여 우슬(牛膝)이라 한다.



또한 쇠물팍, 접골초, 고장근(苦杖根)의 여러 이름도 있다. 다년생으로 산야 또는 비교적 습기가 있는 수음지(樹陰地)에서도 잘 자라며 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본 등에도 분포하고 있다.

우슬의 생김새는 40~100 cm 정도 곧게 자란다. 원줄기는 네모나 있고 털이 있고 뿌리는 가늘고 길며 잎은 대생하고 타원형 또는 도란형이다. 화기(花期)는 8~9월이고 녹색의 꽃이 잎자루와 줄기 사이에서 꽃대가 나와 개화하는 수상화서(穗狀花序)이며 과기는 9~10월이고 뿌리는 가을 또는 그 이듬해 봄에 채취하여 흙을 털어내고 햇빛에 말려 약용한다. 줄기와 잎도 약용하는데 이를 우슬 경엽(牛膝莖葉)이라 한다. 우슬은 그 포제 방법에 따라 크게 두 가지 효능으로 나누어지는데 생용으로 사용하면 어혈과 종기 등을 없애는 효능이 있으며, 삶게 되면 간과 신을 보호하고 뼈와 근육을 튼튼하게 하는 효능이 있다. 예로부터 한약제로 쓰이며 민간요법으로 널리 알려져 온 우슬의 약리작용으로는 진통, 진경, 이뇨, 혈압강하, 섬유소 용해 등의 효과가 있다. 혈액의 순환을 원활하게 하고 어혈을 제거하는 작용을 가지고 있어 월경을 조절하는 효과가 있으며, 또한 관절의 움직임을 부드럽게 하고 근골을 강하게 하여 관절이 저리고 아픈 증상, 허리와 무릎이 시리고 아픈 증상, 근골이 힘이 없는 증상 등에 효과가 있어 관절통과 같은 울혈의 치료제, 이뇨제, 고혈압, 통경제, 자궁수축작용, 식균작용의 목적으로 사용하였으며 또한 수성엑스는 감작물모트 폐절편에 의한 실험에서 항 알레르기작용에 대한 보고가 있다.

우슬의 뿌리에는 식물 호르몬의 일종인 olenolic계 및 glycoside계 saponin과 caffeic acid, polysaccharides, K-oxalate, γ -aminobutyric acid, betain hydrate 및 해충 방제에 이용될 수 있는 곤충의 탈피를 촉진하는 호르몬인 nokosterone, ecdysterone 등이 보고되었다. 그 외에도 inokosterone, β -sitosterol, succinic acid, stigmasterol 등의 성분이 함유되어 있다. 우슬의 성분과 관련한 연구로는 saponin과 polysaccharide 및 20-hydroxyecdysone, inokosterone 등의 phytoecdysteroid에 대해 보고된 바 있다.

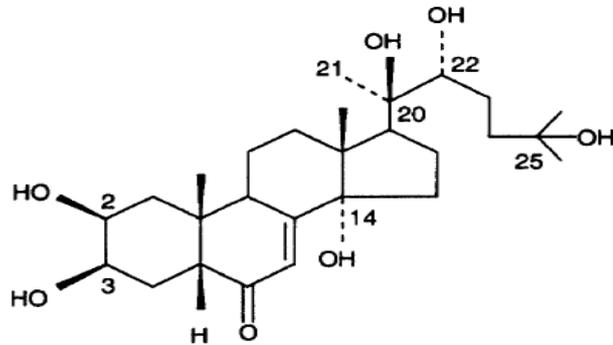


Figure 1-1. Chemical structure of 20-hydroxyecdysone

우슬 중 20-hydroxyecdysone은 우슬의 생합성으로 만들어 지는 주요성분으로서 세포막 내에서 염증을 일으키는 cathepsin B의 과다 분비를 막아주는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험은 지표물질로 정하여 상용되는 우슬의 20-hydroxyecdysone의 분리 및 함량, 건조감량, 회분 및 산불용성회분을 정량하여 품질관리 기준을 설정하고자 한다.

2. 우슬의 성분 추출 및 분석

가. 우슬의 추출용매 선정

물, 메탄올, 물-메탄올 혼액(4:1), Ethylacetate를 추출 용매로 선정하였다. 이중 Chloroform, Hexane 층에서는 Ecdysone이 존재하지 않았다. Methanol이나 물-메탄올 혼액(4:1) 혼액으로 추출 후 증발 농축하고 Ethylacetate로 분리 정제한 후 Buthanol을 용매로 silica plate에 TLC 전개시켜 확인 가능 하였다.

Table 1-1. 용매에 따른 우슬의 주성분 추출

용매	Saponin	Ecdysone	20-hydroxyecdysone
물	0	0	0
메탄올	0	0	0
80% 메탄올	0	0	0
Chloroform	0	-	-
Hexane	-	-	-
Buthanol	0	0	0
Ethylacetate	0	0	0

나. 추출조건 확정

가온추출과 저온추출의 성분 함량을 비교한 결과 큰 차이가 없었다. 메탄올이나 80% 메탄올을 이용하여 실온에서 48시간 추출하는 방법이 효과적인 것으로 생각되어진다.

Table 1-2. 우슬의 추출조건에 따른 성분함량(80% 메탄올-우슬 400g)

추출조건	함량(ug)		
	Saponin	Ecdysone	20-hydroxyecdysone
저온추출	5.4	0.02	0.03
가온추출	5.5	0.02	0.03

다. 분획에 의한 성분 분리

1) 분획의 순서

Hexane층 → Chloroform층 → Ethyl acetate층 → Butanol층

2) Hexane층

2차 분획 후 농축되어 얻어진 우슬의 양은 0.23g. Hexane층 우슬성분을 같은 TLC 판에 점적 한 후 전개 용매(C:M=5:1)을 사용하여 전개- Ecdysone은 없었다.

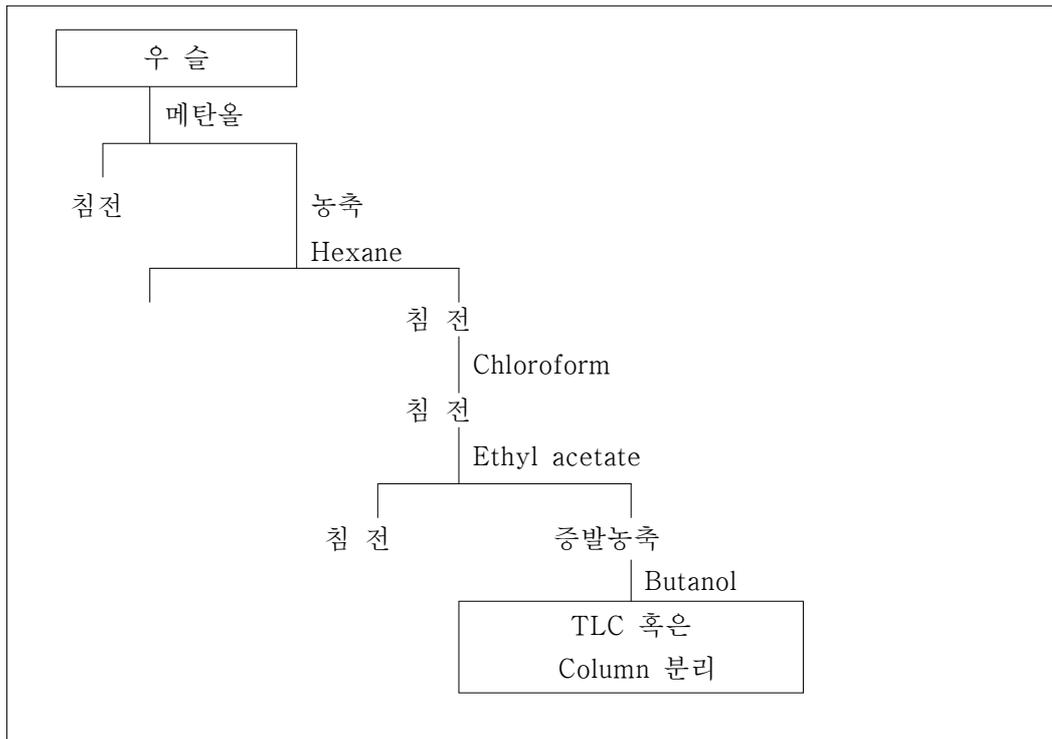


Figure 1-2. 우슬 주성분의 용매 분리과정

Table 1-3. 우슬 주성분의 TLC에 의한 분리도(RF value)

용매	Ecdysone	20-hydroxyecdysone	Inokosterone
RF value	0.61	0.72	0.43

3) Chloroform층 - 3차

분획 후 농축되어 얻어진 우슬의 양은 1.69g이며, Chloroform층 우슬성분을 같은 TLC 판에 점적 한 후 전개 용매(C:M=5:1)하였으나 Ecdysone은 없었다.

4) Ethyl acetate층 - 7차

분획 후 농축되어 얻어진 우슬의 양은 2.32g. Ethyl acetate층 우슬 성분을 같은 TLC 판에 점적 한 후 전개 용매(C:M=5:1)- Ecdysone이 존재 확인하였다.

전개 용매를 Eonly, Conly, C:M, C:E, E:M, H:C:E, C:M:W, E:M:W, H:E:W 등 검색한 결과 C:M=5:1에서 나온 spot보다 Rf값이 작게 하기 위하여 저극성의 용매를 높여 C:M=7:1이 가장 적합하다고 생각되었다.

5) Butanol층 - 2차

우슬 Butanol층을 같은 TLC 판에 점적을 한 후 전개 용매(C:M=5:1)- Ecdysone이 존재 확인하였다. Column 분리의 이동상 용매는 Chloroform : Methanol = 7 : 1로 하였고, 칼럼분리는 Ethyl acetate층에서 얻은 우슬 성분으로 하였으며, injection하기에 용이하도록 시료를 이동상 용매(C:M=7:1) 설정하여Methanol에 가용하였다. Dry loading과정에서는 시료가 잘 녹는 용매 설정(메탄올)하고, 시료를 농축 시킨 후, silica gel을 넣어 silica gel이 시료를 흡착하였다. silica gel에 흡착된 시료를 농축 시킨 후, dry sylinge에 충전하였다.

Table 1-4. 우슬 주성분의 silica column 분리 시간

용매	Ecdysone	20-hydroxyecdysone	Inokosterone
Time(min)	55-72	46-51	86-115

라. 우슬의 부위에 따른 성분함량 비교

뿌리와 줄기에서 모두 ecdysone이 검출되었다. 특히 뿌리와 줄기 부분에 대한 성분비교에서 뿌리부위의 함량이 높게 나타났다. 주로 당이 많이 검출되었으나 지표 성분으로 설정하기 곤란하였으며, saponine 성분의 검출되었고, 항염작용이 있는 ecdysone과 20-hydroxyecdysone을 지표 물질로 선정하였다.

Table 1-5. 우슬의 부위별 주요성분의 함량

부 위	함량(ug)		
	Saponin	Ecdysone	20-hydroxyecdysone
뿌 리	5.4	0.02	0.03
줄 기	4.6	0.01	0.02

Saponin류와 당류가 상대적으로 다량 검출되었다. 우슬의 주성분으로 알려진 Ecdysteroid로 주로 항염작용을 하는 것으로 ecdysone과 20-hydroxyecdysone을 평가하였으며, 20-hydroxyecdysone을 고농도로 함유한 제품의 개발 가능성 확인하였다.

3. 우슬의 기능성 물질 분리

가. 재료 및 방법

1) 시약 및 재료

본 연구에 사용된 20-hydroxyecdysone 표준품은 Sigma(USA)사 제품을 사용하였다. Methanol(MeOH), n-hexane, chloroform(CHCl_3), ethyl acetate(EtoAC), n-butanol(n-BuOH), methylene chloride(MC)을 사용하였다. Column은 silica gel(70~230 mesh, ϕ 4.5×28cm, Fuji chem, Ltd), TLC plate silica gel 60F₂₅₄(Merck HPTLC, Art.5642) 등을 사용하였다.

2) 기기와 검체

본 연구에서 사용한 기기는 cutting mill(Medical Today Planning Co., Seoul. Korea), Rotary vacuum evaporator R-200(Buchi, Swiss), fraction collector(EYELA Co., DC-1000), Muffle furnace(Daihan Labtech Co., LEF-205P)를 사용하였다. 또한 HPLC(SCL-10ATVP System, SPD-10Avp Detector, Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 국내에서 시판되고 있는 2007년산 우슬을 구입하여 분쇄기로 분쇄한 후 다음과 같이 이화학적 실험을 실시하였다.

3) 확인시험

검체 2.0 g에 MeOH 10 ml를 넣어 1 시간 초음파 처리한 여액을 검액으로 하였다. 따로 20-hydroxyecdysone 표준품 1 mg을 MeOH 1 ml에 녹여 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 5 μ l씩을 TLC용 실리카겔을 써서 만든 층판에 점적한 후 CHCl_3 : MeOH : H_2O (8:2:0.5)의 하층을 전개용매로 하여 전개시킨 다음 UV 254 nm의 1 amp와 10 % H_2SO_4 으로 발색시켜 표준액에서 얻은 반점과 생상 및 R_f 값을 비교 측정하였다.

4) 건조감량과 회분시험

검체 2.0 g을 미리 질량을 단 칭량병에 넣어 그 질량을 정밀하게 달아 105 °C에서 6 시간 건조 실시 후 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 측정하였다. 다시 이것을 105 °C에서 건조하여 1 시간마다 질량을 정밀하게 달아 함량

이 될 때의 감량을 건조감량(%)으로 산출하였다. 미리 사기제 도가니를 500~550 °C에서 1 시간 강열하고 방치하여 식힌 다음 질량을 정밀하게 측정하였다. 분석용 검체 2.0 g을 도가니에 넣어 그 질량을 정밀하게 칭량 후 천천히 가열하고 온도를 올려 500~550 °C에서 4 시간 동안 강열하여 탄화물이 남지 않을 때까지 회화하여 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 달았다. 다시 잔류물을 항량이 될 때까지 회화하고 방치하여 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 달아 회분량(%)을 산출하였다.

5) 산불용성 회분시험

회분에 묶은 염산 25 ml를 5 분간 약한 열로 끓여 불용물을 정량용 여과지로 여과하여 잔류물을 열탕으로 잘 씻어 여과지와 함께 건조한 다음 회분항과 같은 방법으로 3 시간 가열하여 데시케이터(실리카겔)에서 식힌 다음 그 질량을 정밀하게 달아 산불용성 회분량(%)을 산출하였다.

6) 20-Hydroxyecdysone 추출 및 정제

그림 2와 같이 시료 1,008 g을 MeOH로 50 °C에서 5번 냉침 추출하여 감압 농축시킨 다음 MeOH 엑스(226 g)을 분획하여 5개의 분획을 얻을 수 있었다. 각각 분획별로 사용한 용매와 얻어진 추출량은 다음과 같은데 Fr. I은 H₂O, Fr. II은 n-Hexane(0.23 g), Fr. III은 CHCl₃(1.69 g), Fr. IV은 EtoAC(2.32 g), Fr. V은 n-BuOH(14.31 g)이다. 여기에서 얻은 5개 분획을 TLC을 한 결과 Fr. IV(EtoAC)에서 20-hydroxyecdysone이 존재하여 분리가 되어 수차례 TLC를 실시하여 1개로 얻을 수 있었다. TLC상 조건의 경우, 전개용매는 CHCl₃ : EtOH : MeOH = 5:2:1로 하여 plate는 silica gel 60F₂₅₄(Merck HPTLC, Art.5642)를 사용하였고 발색시약은 10 % H₂SO₄를 가한 후 가열하면서 발색시켰다. Fr. IV(EtoAC) 분획을 취하여 10 ml MeOH로 녹인 다음 drying package column(φ 4.5x40 cm)에 cotton을 깔고 미세한 Silica gel을 충전시키고 상층부분에 저어주면서 탈기 후 MeOH에 녹인 Fr. IV를 cap이 부착된 압력 pump로 옮겨 fraction collector에 연결하여 chromatography하여 2 ml씩 5 분정도로 45개 분획을 각각 순차적으로 받아 모았다(이동상; CHCl₃ : MeOH = 7:1). 또한, 45개 분획을 전개용매 MC : MeOH : H₂O = 6 : 2 : 0.2의 비율로 하여 MeOH에 희석한 20-hydroxyecdysone sample과 표준품을 TLC에 10 % H₂SO₄으로 가열하면서 분무 발

색시킨 후 표준품과 유사 물질이 존재하여 분리 되어 있다는 것을 확인하여 분획(302.7 mg)을 모았다.

Ecdysteroid 유사물질은 MeOH에 녹인 다음 Recycling Preparative HPLC(이동상; MC : MeOH : H₂O = 7 : 1 : 0.1)로 분리된 2개 ecdysteroid 유사 물질별로 분취하여 Fr.2 분획을 MC : MeOH : H₂O = 7 : 1 : 0.1을 전개용매로 하여 TLC에 10 % H₂SO₄으로 가열하면서 분무 발색시킨 다음에 표준품과 유사물질이 존재하여 분리되는 것을 확인하여 진공 농축 후 20-hydroxyecdysone(206.5 mg)을 모았다.

7) HPLC의 분석조건 및 검량선 작성

본 실험에 사용한 HPLC는 SCL-10ATVP System, SPD-10AVP Detector, Shimadzu, Japan로서 분석조건은 다음과 같다. Column : ZorBax sil(4.6×250 mm, 5 μm), Mobile phase : n-Hexane : EtOH : MeOH = 1 : 3 : 3, Flow rate : 1.0 ml/min, Detector : UV 254 nm. 표준액은 20-hydroxyecdysone 표준품 1 mg을 1 ml의 MeOH에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 300, 250, 160, 120, 100, 80 μg/ml로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 표준용액 25 μl를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하였다.

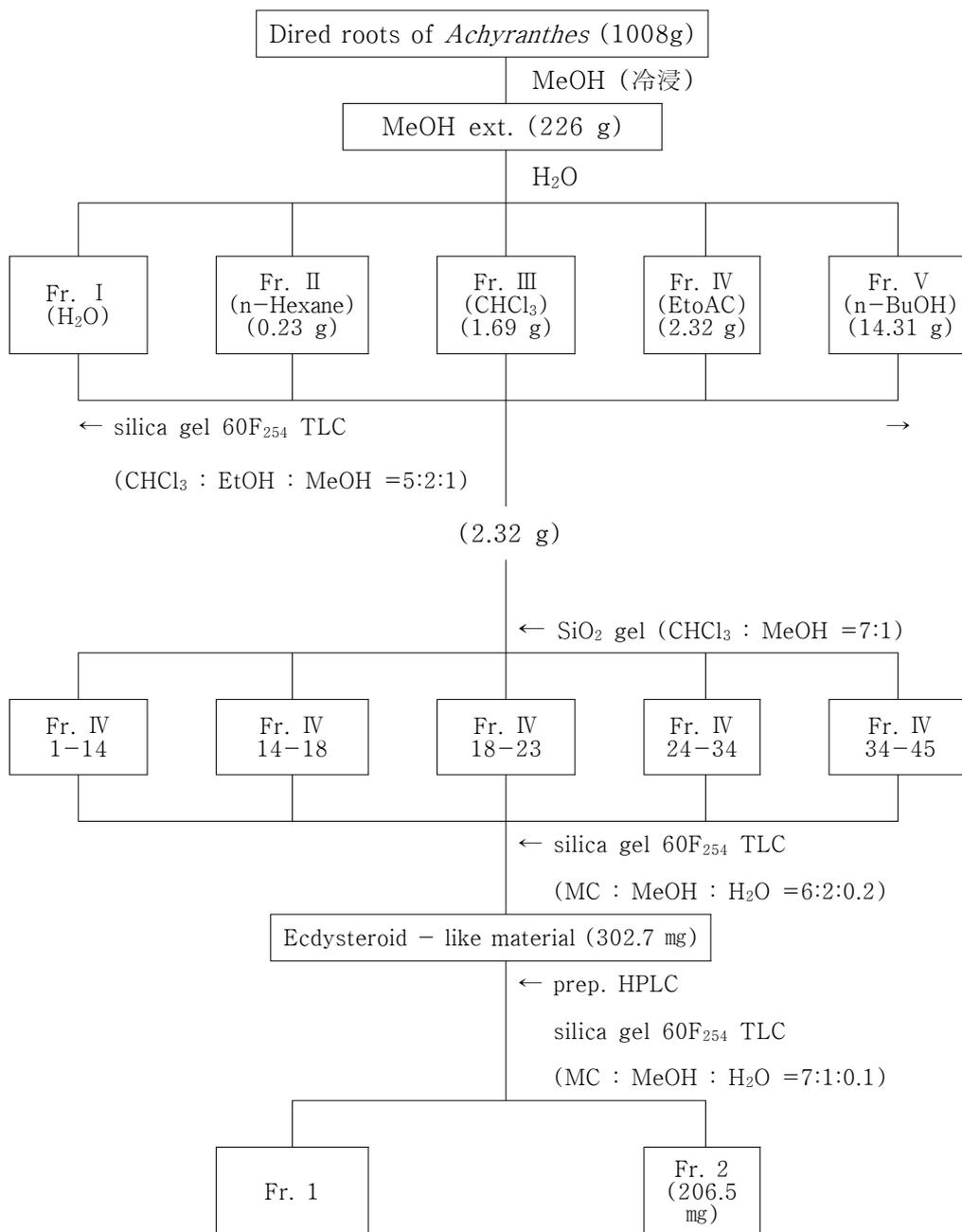


Figure 1-3. Extraction and isolation of 20-hydroxyecdysone from *Achyranthes Radix*

8) 검액의 조제 및 20-Hydroxyecdysone의 함량

우슬 50 mg을 취하고, MeOH 5 ml을 가하여 sonicator로 1 시간 동안 추출 후 추출액 3 ml을 취하여 0.45 μ m membrane filter로 여과한 여액을 검액으로 사용하였다. 전항에서 조제한 각 검액을 25 μ l씩 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram의 면적 평균값을 구하여 회귀직선 방정식으로부터 각각의 20-hydroxyecdysone의 함량을 구하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 확인시험 및 건조함량

20-Hydroxyecdysone을 대조물질로 하여 TLC법으로 확인 시험한 결과 표준품과 동일한 반점을 나타내었으며 동일한 Rf값을 나타내었다. 건조감량시험에서는 평균 및 표준편차는 3.340 ± 0.279 % (n=3)로 시료에 따라 3.110 %~3.650 %로 차이를 보였으며 시료 모두 대한약전 8개정에 규정하고 있는 17.0 %이하로 적합 판정하였다.

2) 회분시험 및 산불용성 회분시험

회분함량시험에서는 평균 및 표준편차는 9.545 ± 0.378 % (n=3)로 시료에 따라 9.130 %~9.870 %로 차이를 보였으며, 시료 모두 대한약전 8개정에 규정하고 있는 10.0 %이하로 적합 판정하였다. 산불용성 회분시험에서는 평균 및 표준편차는 1.270 ± 0.285 % (n=3)로 시료에 따라 1.020 %~1.580 %로 차이를 보였으며 시료 모두 대한약전 8개정에 규정하고 있는 1.5 %이하로 적합 판정하였다.

3) 20-Hydroxyecdysone 추출 및 정제

우슬 1008 g을 MeOH로 냉침 추출하여 감압 농축한 후 얻은 추출물을 증류수에 현탁시킨 다음 n-hexane, CHCl₃, EtoAC 및 n-buOH로 용매분획 하였다. EtoAC 분획물을 drying package column 및 silica gel을 사용한 column chromatography를 반복 실시하여 단일 반점을 얻었으나 HPLC에 의해 혼합물이 확인되어 recycling preparative HPLC(MC : MeOH : H₂O =7:1:0.1)를 실시한 후 순수한 20-hydroxyecdysone을 206.5 mg 단리하였다.

4) 20-Hydroxyecdysone의 검량선

20-Hydroxyecdysone의 표준 검량선을 작성하고 정량에 이용할 목적으로 stock solution을 만들고 이를 희석하여 표준용액을 제조 후 각 표준용액의 chromatogram으로부터 얻은 peak 면적과 농도와의 관계로부터 검량선을 작성한 결과 80~300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도범위에서 그 직선성이 유효하며 이때의 회귀직선 방정식은 $y=16303x-35.68$ 이며 상관계수는 0.9999로써 1.0에 근접하였다.

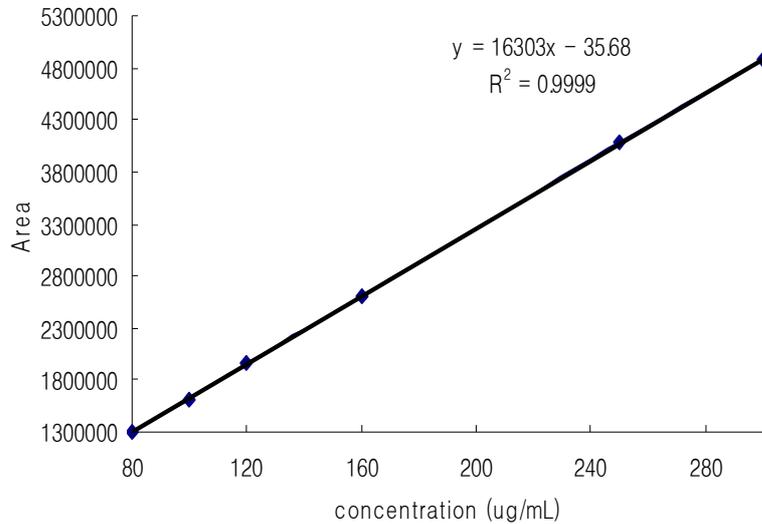


Figure 1-4. Calibration curve of 20-hydroxyecdysone.

5) 20-Hydroxyecdysone의 함량

우슬의 지표물질인 20-hydroxyecdysone의 함량을 측정하기 위하여 HPLC을 이용하여 정량하였다. Column은 ZorBax sil을 사용하였다. n-hexane : EtOH : MeOH(1:3:3)을 이동상으로 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하였으며 검출파장은 254 nm에서 고정하여 실시하였다. 이때 20-hydroxyecdysone의 retention time이 약 2.7 분에서 나타나며 다른 물질의 peak와 양호하게 분리되므로 적합한 분석조건이라고 사료된다. 이상과 같은 조건에서 HPLC를 실시하여 20-hydroxy ecdysone 함량을 시험하여 건조중량(g)중의 함량을 구하여 %를 산출하였다. 상기 회귀직선방정식으로부터 그 함량을 구한 결과 2.186~2.199 %를 나타내었으며 그 평균값 및 표준편차는 2.192 ± 0.006 %이었다. 따라서 우슬 중 20-hydroxyecdysone의 함량은 2.18 %이상으로 규정하는 것이 타당하다고 사료된다.

Table 1-6. The contents of 20-hydroxyecdysone, loss on drying, total ash and acid-insoluble ash from *Achyranthes Radix*.

AJ	Loss on Drying (%)	Total Ash (%)	Acid-insoluble Ash (%)	Content (%)
1	3.650	9.635	1.580	2.191
2	3.110	9.870	1.020	2.186
3	3.260	9.130	1.210	2.199
Mean± S.D.	3.340±0.279	9.545±0.378	1.270±0.285	2.192±0.006

4. 추출차의 제조

우슬 추출차를 제조하기 위해 건조한 우슬의 줄기, 뿌리, 잎 등을 약 5mm정도 크기로 절단하여 주재료로 하였다. 첨가재료로는 국내산 오가피(15%), 두충(10%), 목과(10%), 속단(10%), 대계(10%), 감초(5%) 국내에서 생산되지 않는 감초는 중국산을 적정량씩 평량하여 무명으로 만든 추출용자루에 혼합한 후 압력반응기를 활용하여 반응온도 95~98℃, 반응시간 6시간, 반응압력 약 1.5기압 등의 조건으로 1차 및 2차 추출하여 제조하였다.

일반적으로 한약재료는 평균 4시간 정도 약한 불에 다려 약액이 초기의 1/2정도로 줄어든다. 이 약액에 재탕분을 혼합하여 복용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 우슬음료 제조공정에서도 초탕용 1차 반응조와 재탕용 2차반응조 및 혼합 포장조 등 3개의 반응조로 구성하여 우슬 차를 생산할 수 있는 파이로트 설비를 하였다. 이 설비는 쉽게 사용하기 위하여 스테인레스스틸로 제작하였으며 에너지는 전기를 사용하도록 하였고 각 추출기에는 온도조정 센서를 부착하여 자동온도조절기능을 갖도록 하였다.

1차 추출조는 스테인레스 스틸로 만들어야 하며 상부에는 밀폐가 가능한 캡슐을 달아 재료를 쉽게 넣거나 꺼낼 수 있도록 한다. 하부에는 전기 또는 가스 버너를 설치하였다. 추출조에는 thermo couple을 달아 추출조의 온도를 일정하게 유지할 수 있도록 한다. 추출조내의 물은 상부쪽 파이프라인을 통해 넣고 하부쪽에서 드레인 하여 혼합포장조로 유동시킬 수 있도록 한다. 추출용 지하암반수(또는 천연약수)는 미리 수처리과정을 거쳐 스테인레스 탱크에 저장하면서 필요할 때 사용할 수 있도록 한다. 소형 크레인을 활용하여 추출조에 추출용 원료를 넣거나 꺼낼 수 있도록 한다. 추출온도는 98℃로 하여 밀폐된 공간에서 가열하기 때문에 증기압이 발생하여 고압상태가 유지되어 용출속도를 빠르게 한다.

2차 추출조는 1차 추출조와 같은 조건과 기능을 갖도록 하며 1차 추출조에서 꺼낸 원료를 새로운 지하암반수에 재추출하여 혼합포장조에서 1차 추출액과 혼합하도록 한다.

혼합포장조는 상기와 같이 제조한 우슬과 첨가재료 1차 및 2차 추출액을 동시에 혼합포장조로 이동시켜 혼합한 다음 온도가 떨어지지 않도록 하면서 CPP/PET재질

로 된 파우치백으로 포장하였다. 파우치 팩은 CPP/PET재질과 CPP/Al-foil/PET재질 등이 있으나 CPP/Al-foil/PET재질은 불에 타지 않을 뿐만 아니라 전자레인지 등에 넣어 가열할 수 없는 단점이 있다. CPP/PET재질의 파우치 팩을 사용하는 것이 경제적이다. 그러나 판매측면에서 볼 때는 좀더 보기 좋은 포장재를 선호하고 있어 CPP/Al-foil/PET재질을 불가피하게 사용할 경우도 있을 것으로 보여진다.

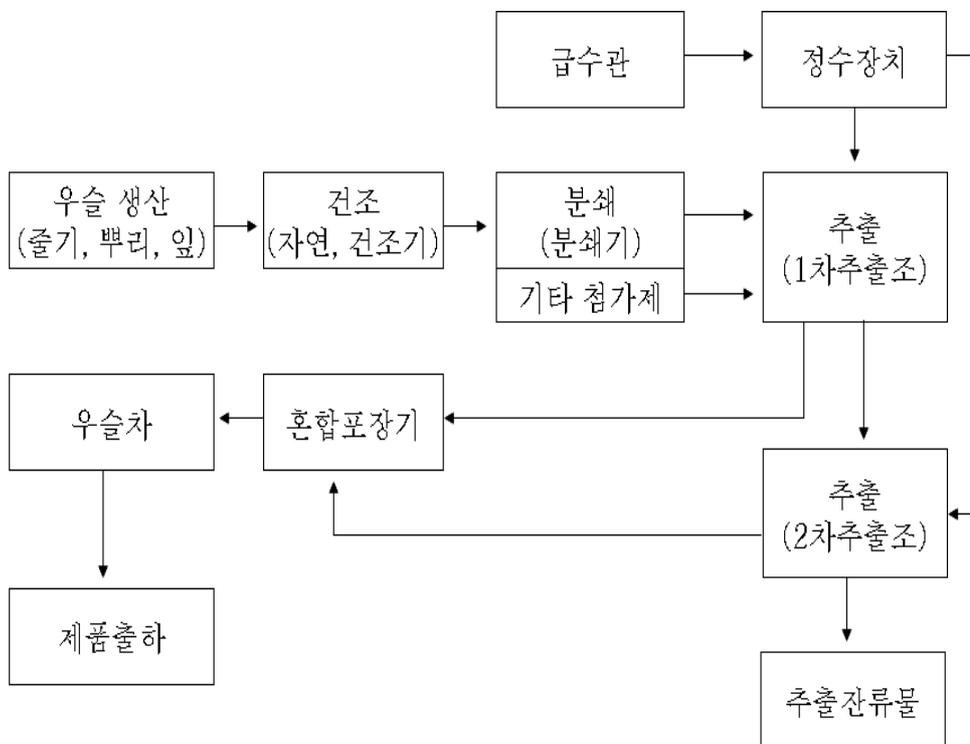


Figure 1-5. The manufactory progress of *Archyranthes Radix* extract tea

따라서 우슬의 생산에서 제품의 출하까지의 전공정을 그림과 같이 설계할 수 있으며 정수장치에서 물을 생산하는 경우와 천연 약수를 구매하여 사용할 수 있다. 또한 우슬은 농산물이기 때문에 생산시기의 기후에 따라 건조, 분쇄 등의 조건이 달라질 수 있으며 처리해야할 체적이 큰 경우는 소형 건조기와 같은 장치로 건조하기에는 한계가 있다.

5. 우슬의 연골 세포 독성 실험 및 대사활성 기능 실험

가. 재료 및 방법

1) 시약 및 재료

본 실험에서 사용할 우슬은 동결 건조하여 분말로 얻었으며, 우슬 1 kg을 80% 메탄올(메탄올:물=4:1) 5 L에 넣고 환류 냉각기를 장치한 후 95℃ 수욕조에 서 12시간 동안 온탕 하였다. 이 추출액을 약 50℃ 정도로 냉각시키고 여러 겹의 거즈로 여과하여 상등액을 취하였다. 이와 같은 추출 및 여과 조작을 3회 반복하여 상등액을 합하고 회전증발장치를 이용하여 감압 하에서 메탄올을 완전히 증발시켜 농축하였다. 이를 소량의 증류수에 용해하였다. 최종적으로 얻은 우슬 추출물 용액을 -80℃에서 얼린 후 동결 건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다.



Figure 1-6. Dried powder of *Archyranthes Radix* root.

2) 연골세포 분리 및 배양

연골 채취를 위한 실험동물로는 무게 약 300 g 정도의 Sprague-Dawley rat를 사용하였으며 각 실험을 위한 세포들은 백서를 경추탈골한 후 슬관절 부위를 베타딘과 70% 알코올로 소독하고 피부절개 후 관절 연골을 채취하였다. 채취한 연골 조직은 4°C phosphate buffer saline(Calcium & Magnesium free, pH 7.4) 용액에 보관하였다. 연골은 크기가 2~3 mm로 잘게 잘라 mincing하여 37°C에서 30분 동안 10 ml, 0.1% EDTA-CMFT(calcium magnesium free tyrode) 용액에 2회 넣어 0.15% trypsin(GIBCO, 840-7072IL, NY)에 1시간, 2 mg/ml collagenase I (Sigma, C0130, USA)에 3시간 동안 흔들면서 세포 부유액을 얻었다. 이 부유액은 120 μ m pore size의 나일론 여과지로 여과한 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리 하여 원심 분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(GIBCO, 450-1200EA, NY)으로 3회 세척한 후 연골세포를 얻었다. 얻어진 세포는 10% FCS(fetal calf serum, GIBCO, 26140-038, NY)와 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium: GIBCO 213000-025, NY)에 항생제(penicillin 100 U, strepto- mycin 50 μ g/ml)를 첨가하여 35 mm 배양 접시에 각 well 당 5×10^4 cells/cm² 밀도로 분주하였으며, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 배지를 교환해주었고, 약 10~14일 간 배양한 후 배양접시가 완전히 차면 모든 세포는 1회 계대 배양 후 사용하였다.

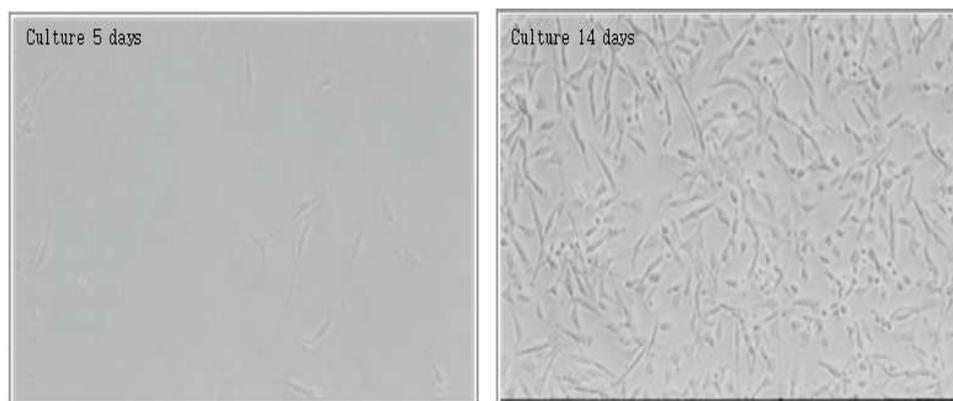


Figure 1-7. Primary cultured rat chondrocyte

3) 관절연골세포의 자가고사 유도

관절 연골세포의 자가고사를 위해 과산화수소수(H_2O_2)를 이용하여, 다양한 농도와 시간별로 처리하여 나온 결과 값 중 가장 적합한 농도와 시간을 표준으로 하여 세포의 자가고사를 유도하였다.

4) XTT를 이용한 연골세포의 증식 변화

XTT(sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)는 미토콘드리아의 respirator chain에 속하는 succinate-tetrazolium reductase에 의해서 formazan 염색으로 대사되므로 살아있는 세포에 의해서만 분해되어 방사성 동위원소를 사용하지 않고도 세포 증식과 생존율을 확인할 수 있으며, 대사산물이 수용성이므로 MTT assay와 같은 용해과정을 필요로 하지 않는 장점을 가지고 있다. XTT를 이용한 비색법으로 관절연골세포의 증식에 미치는 영향을 보기 위하여 실시하였다. XTT 시약은 phenol red가 들어있지 않은 RPMI 1640 배지에 XTT를 1 mg/ml로 용해시킨 XTT 용액(ab7963, abcam, cambridge, UK) 5 ml과 PBS 1.25 mM로 용해시킨 N-methyl dibenzo-pyrazine methyl sulfate (PMS) 용액 0.1 ml을 전자 공유 시약으로 사용 직전에 혼합하여 제조하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후 96 well culture plate와 35 mm 배양 접시에 각 well 마다 우슬을 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, 배양이 끝난 후 XTT를 1 mg/ml로 용해시키고 PBS에 1.25 mM로 용해시킨 PMS 용액에 100 μ l를 사용 직전에 혼합하여 각 well 당 첨가하고 배양기에서 5시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 ELISA reader(Bio-Rad, Hercules, Calif)로 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 우슬 농도에 따른 증식률

일정기간 동안 배양한 연골세포에서 우슬을 농도별(0~200 $\mu\text{g/ml}$)로 24시간 처리하여 연골세포 증식률을 관찰하였다. 우슬을 처리하지 않았을 때 $97.61 \pm 10.23\%$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $96.37 \pm 8.67\%$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $118.52 \pm 11.86\%$ ($P < 0.01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $129.21 \pm 17.47\%$ ($P < 0.001$), 25 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $114.96 \pm 11.25\%$ ($P < 0.01$), 50 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $83.36 \pm 11.21\%$ ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $75.64 \pm 8.35\%$ ($P < 0.01$), 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 $62.85 \pm 9.33\%$ ($P < 0.001$)의 세포 증식률을 나타내었다.

2) 우슬 처리 후 배양시간에 따른 증식률

일정기간 동안 배양한 연골세포에서 우슬을 시간별(0~72시간)로 처리하여 연골세포 증식률을 관찰하였다. 우슬을 처리하지 않았을 때 $94.36 \pm 11.24\%$, 1시간 처리 시 $93.61 \pm 10.89\%$, 6시간 처리 시 $91.33 \pm 13.21\%$ ($P < 0.05$), 9시간 처리 시 $99.74 \pm 15.98\%$ ($P < 0.01$), 12시간 처리 시 $105.40 \pm 10.24\%$ ($P < 0.05$), 24시간 처리 시 $124.21 \pm 11.21\%$ ($P < 0.05$), 48시간 처리 시 $132.51 \pm 12.54\%$ ($P < 0.01$), 72시간 처리 시 $135.1 \pm 13.55\%$ ($P < 0.001$)의 시간 의존적 세포 증식률을 나타내었다.

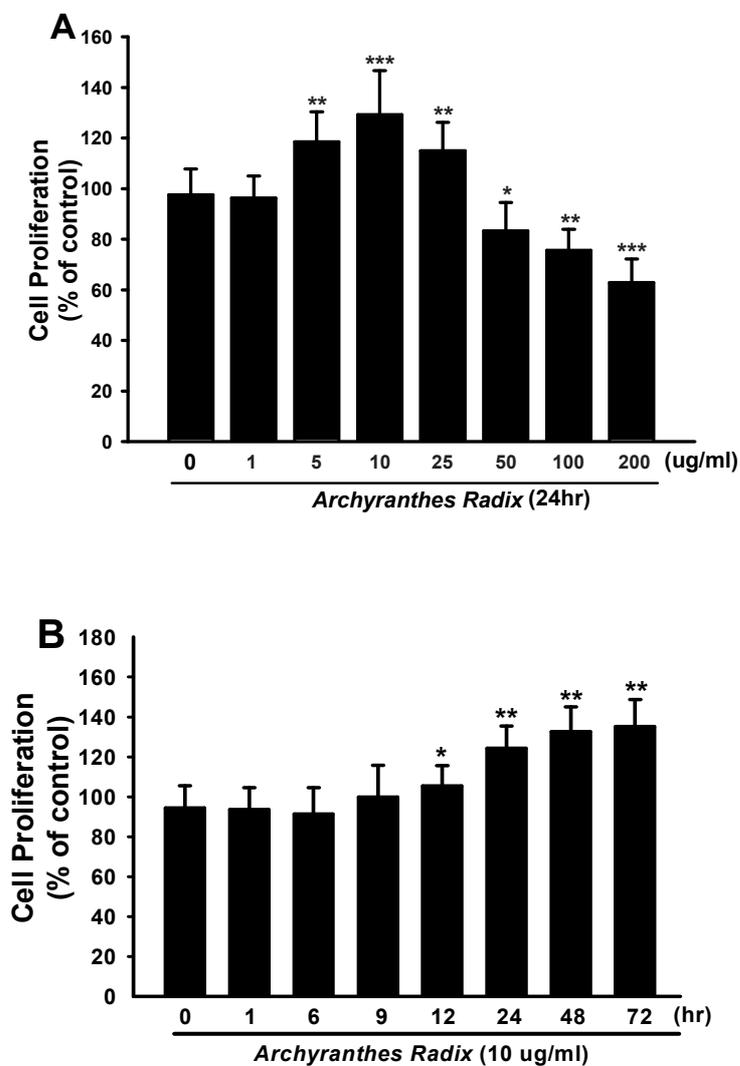


Figure 1-8. Dose- and time-dependent effects of *Archyranthes Radix* in chondrocyte proliferation.

Values are means±S.E. of three independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. AR non-treatment. The autoradiographs are representative of two independent experiments.

3) 과산화수소수 농도에 따른 세포 증식률

일정기간 동안 배양한 연골세포에서 과산화수소수 처리 농도별(0~300 μM) 연골세포 증식률을 관찰하였다. 과산화수소수 0 μM 처리에서 세포생존율은 $100.00 \pm 8.67\%$, 5 μM 에서 $94.61 \pm 9.64\%$, 10 μM 에서 $88.24 \pm 10.21\%$ ($P < 0.05$), 25 μM 에서 $79.64 \pm 9.64\%$ ($P < 0.01$), 50 μM 에서 $74.51 \pm 8.99\%$ ($P < 0.01$), 100 μM 에서 $52.34 \pm 6.54\%$ ($P < 0.001$), 200 μM 에서 $45.31 \pm 6.32\%$ ($P < 0.001$), 300 μM 에서 $22.45 \pm 5.64\%$ ($P < 0.001$)로 나타났으며, 농도 의존적으로 세포의 증식이 감소됨을 관찰하였다.

4) 과산화수소수 처리 후 배양시간에 따른 세포 증식률

일정시간 동안 배양한 연골 세포에서 과산화수소수 처리 후 배양 시간별(0~48 hr)로 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 과산화수소수를 처리하지 않은 세포생존율은 대조군(0시간)이 $100.00 \pm 8.67\%$ 인데 비해 5분 처리 시 $100.00 \pm 9.86\%$, 1시간은 $98.64 \pm 11.54\%$, 3시간은 $91.33 \pm 10.29\%$ ($P < 0.05$), 6시간 $87.33 \pm 9.67\%$ ($P < 0.05$), 9시간은 $75.34 \pm 10.24\%$ ($P < 0.01$), 12시간은 $65.97 \pm 9.35\%$ ($P < 0.001$), 24시간 $45.64 \pm 11.25\%$ ($P < 0.001$), 48시간은 $39.58 \pm 10.24\%$ ($P < 0.001$)로 시간 의존적으로 유의하게 세포 증식이 억제되는 것으로 나타났다.

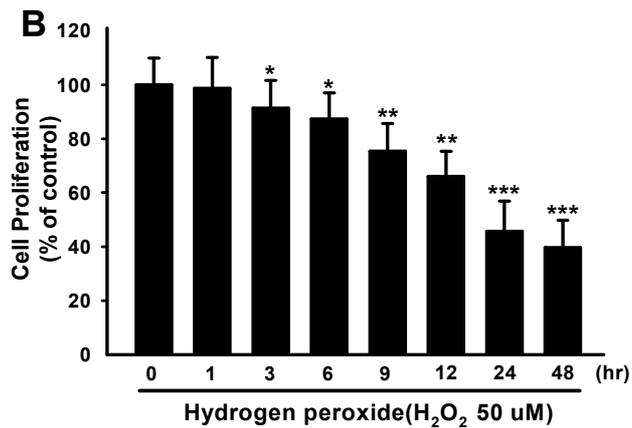
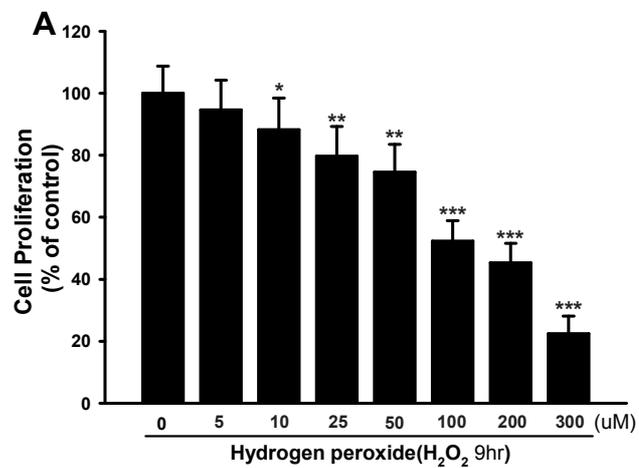


Figure 1-9. Dose- and time-dependent effects of H₂O₂ in rat chondrocyte. Values are means ± S.E. of three independent experiments. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. control. The autoradiographs are representative of two independent experiments.

5) 우슬이 prostaglandin E₂에 미치는 영향

우슬이 염증에 관여하는 PGE₂에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 ELISA를 이용하여 PGE₂ 농도 변화를 관찰하였다. PGE₂ 농도 변화는 과산화수소수를 처리하지 않았을 때 0.30 ± 0.04 ng/ml였고 처리 시에 0.83 ± 0.03 ng/ml로 유의하게 증가되었다($P < 0.05$). 우슬을 농도별로 처리 시에 5 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.28 ± 0.02 ng/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.26 ± 0.05 ng/ml, 25 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.34 ± 0.06 ng/ml로 우슬 만 처리 시에는 PGE₂의 농도 변화에 큰 영향을 미치지 않았다. 세포고사 유도 후 우슬 처리 결과는 다음과 같다. 우슬 5 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.80 ± 0.03 ng/ml, 우슬 10 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.64 ± 0.01 ng/ml, 우슬 25 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 0.7 ± 0.04 ng/ml로 유의한 PGE₂의 농도의 감소를 보였다($P < 0.05$).

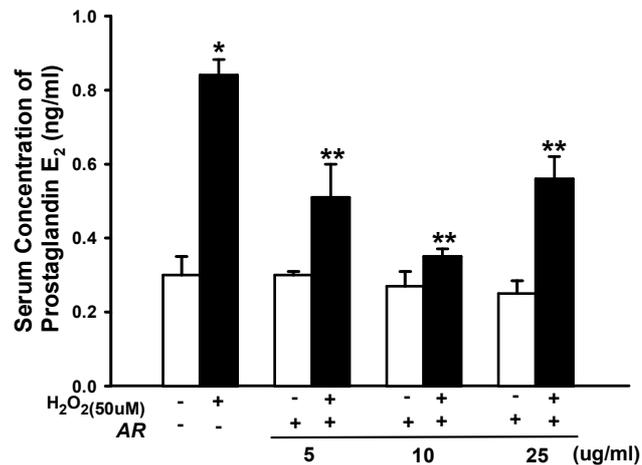


Figure 1-10. The change of prostaglandin E₂ concentration in AR treatment after chondrocyte apoptotic cell death.

Values are means \pm S.E. of three independent experiments. * $P < 0.05$, vs. non-treated, ** $P < 0.05$, vs. H₂O₂ alone treated.

제 2절 우슬의 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염에 우슬의 효과

1. 퇴행성 관절염에서 우슬이 미치는 영향

가. 서설

실험적 퇴행성 골관절염은 외과적 수술방법, 세포외 기질의 변성, collagenase 등의 효소이용, vitamin A와 iodoacetate 등을 이용한 연골세포의 대사 방해 등 여러 방법에 의해 유도되어 진다. 연골 세포의 정상 기능을 이루기 위해 관절 연골의 구조적인 통합이 이루어지는데, 국소적인 MIA 주사는 연골세포 내의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 활동억제로 인하여 해당 작용의 대사 작용 파괴로, 관절 연골의 퇴행화를 유도한다. 이러한 모델에서 관절 퇴행화의 조직학적 변화는 사람의 골관절염의 상태와 매우 유사하다고 하였다. 따라서 이러한 유사성 때문에 퇴행성 골관절염의 병태생리학적인 실험과 약물 연구에 많이 사용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 monosodium iodoacetate(MIA)로 퇴행성 관절염을 유발하여 사람과 유사한 퇴행성 관절염 모델을 유도 후, 우슬 추출물을 함유한 크림제가 관절조직 내에 어떠한 영향을 미치는지 조직학적 관찰을 통하여 관찰하고자 하였다. 특히 본 연구에서는 관절염 치료에 적용하는 우슬 크림제가 실제 어떠한 효과를 발휘하는지 세포조직 수준에서의 연구가 매우 미진한 실정이기에, 우슬 크림제의 치료효과에 대해 정확한 근거를 제시하는데 큰 목적이 있다.

나. 재료 및 방법

1) 실험동물

본 연구에서는 체중이 약 250 ± 50 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐(8주령, 웅성, 대한 실험동물)를 관절염 유발 확인을 위해 치료 전에 20마리를 사용하였고, 군당 8마리씩 40마리를 사용하여 총 60마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였다. 물과 사료는 자유롭게 급여하였다. 우슬 크림제를 처리하기 전에 퇴행성 관절염을 유발하는 기간 동안 주사 전, MIA 주사 후 3일, 7일, 14일에 각각 5마리씩 부검하여 관절염 유발을 확인하였다. 실험동물은 정상군은 정상 대조군(n=8), 실험대조군은 퇴행성 골관절염 유발군(n=8), 실험군 I은 우슬 크림제 100mg 처치군(n=8), 실험군 II는 우슬 크림제 500mg 처치군(n=8) 그리고 실험군 III는 우슬 크림제 1,000mg 처치군(n=8)으로 나누었다(Table 2-1).

Table 2-1. Classification of experimental groups

Groups	Composition of experimental
Normal (n=8)	Normal
Control (n=8)	MIA induced osteoarthritis
Group I (n=8)	OA and <i>Archyranthes Radix(AR)</i> extract cream 100mg
Group II (n=8)	OA and <i>Archyranthes Radix(AR)</i> extract cream 500mg
Group III (n=8)	OA and <i>Archyranthes Radix(AR)</i> extract cream 1,000mg

2) 퇴행성 골관절염 모델

사람과 유사한 퇴행성 골관절염 유발 모델을 제작하기 위해 MIA(monosodium iodoacetate)로 관절염을 유발하였다. 실험 동물실에서 적응된 흰쥐를 마취 챔버(Royal medical, 한국)에 넣고, 70% N₂O와 28.5% O₂ 가스에 2.0% 엔플루란(enflurane)을 혼합시킨 마취가스로 흡입전신마취 후 수술대에 고정시키고, monosodium iodoacetate(I2512, Sigma, Poole, UK)를 오른쪽 슬관절의 슬개골 인대를 통해 관절 내 주사(intraarticular injection)를 하였다. MIA는 0.9% sterile saline에 마리당 3mg의 농도가 되게 용해하여 한 관절 당 50 µl씩 26 gauge를 사용하여 주사하였다. 정상군은 동일한 위치에 0.9% sterile saline 50 µl씩 주사하였다. MIA 주사 후 5일 정도까지 실질성 염증이 관찰되어졌으며, 일반적인 건강상태를 관찰하였으나 특별한 소견은 관찰되지 않았다. 관절염 유발에 관한 병리학적 평가는 퇴행성 골관절염 유발 전, 유발 3, 7, 14일째에 각각 5마리씩 부검하여 퇴행성 골관절염 유발 정도를 조직학적으로 확인하였다.

3) 실험구성도

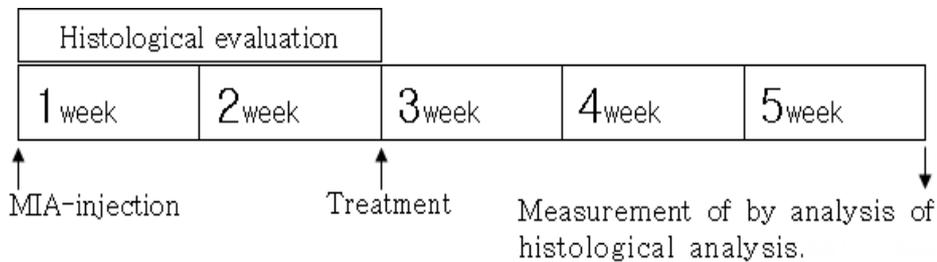


Figure 2-1. Diagram of osteoarthritis *in vivo* experimental.

4) 우슬 크림 제조

우슬을 이용한 경피투과제의 제조 시 용매에 우슬의 양을 일정하게 취하여 각각 용해시켰다.

Vaseline	60
Stearyl alcohol	200
PG	120
Caster oil	100
Tween 80	10
Methyl paraben	1
Propyl paraben	1
Mineral oil	100
우슬 엑스 5%	100.0
Ethanol	750
정제수	850

위의 물질을 각각 70℃에서 가온하면서 교반 후 용융 상태에서 교반하면서 혼합하였으며 서서히 식혀 크림제를 제조하였다. 이와 같이 얻은 경피투과제는 밀봉하여 사용할 때까지 보관하였다. 각 실험군에 연고도포 방법은 우슬 엑스가 5% 함유된 크림을 관절염 유발 15일째부터 21일 동안 슬관절 부위에 고르게 펴서 도포하였다.



Figure 2-2. Cream of *Archyranthes Radix* extract

5) 조직학적 검사

슬관절의 관절염의 파괴와 회복정도를 확인하기 위해 병리학적 평가를 실시하였다. 관절염 유발 전, 유발 3일째, 유발 7일째, 유발 14일째에 각각 5마리씩 부검하여 슬관절을 채취하였으며, 치료 종료 후 군별로 채취하였다. 채취한 슬관절은 10% 포르말린(formalin)에 24시간 고정하였고, 그 후 파라핀 포매 전 10% formic acid로 72시간 동안 탈회하였다. 조직은 일반적인 탈수, 투명 및 침투 과정을 자동 조직 처리장치(4640B, Sakura, Japan) 기기를 사용하여 14시간 동안 처리하였다. 파라핀 블록의 제작과 냉각은 자동 포매 장치(Tissue-*Tex*, Japan)를 사용하였으며, 제작된 파라핀 블록은 회전식 미세 박절기(Rotary Microtome 2040, Japan)를 사용하여 쥐의 우측관절 내측면에서 250 μm 간격을 두고 두께 7 μm 로 박절하여, 부유 온수조와 신전기 과정을 거쳐 슬라이드에 부착시켰다.

슬관절 절편은 관절 조직 및 주변 조직의 염증성 침윤(infiltration) 정도를 평가하기 위해 슬라이드에 부착시켜 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 실시하였고, 연골의 퇴행성 정도를 측정하기 위하여 safranin-O fast green 염색을 실시하였다.

(1) Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색

박절한 조직 절편은 탈파라핀 과정을 거쳐 Hematoxylin(HHS32, Sigma, St Louis, USA) & Eosin(HT110232, Sigma, St Louis, USA)으로 염색 한 다음 과염색된 부분은 흐르는 수돗물에 5~10분 정도 수세한 다음 핵이 청명한 색이 되도록 세포질 대조 염색으로 염색한 다음 15초간 과도한 Eosin 용액을 흐르는 물로 세척하고 탈수 및 투명과정을 거쳐 봉입하였다.

(2) Safranin O-fast green 염색

각 조건에 따라 초음파와 우슬이 처리된 연골조직의 세포외기질 변화를 관찰하기 위하여 연골조직에 특이적인 기질인 당단백의 sulfur 기에 반응하는 원리를 이용한 Safranin O-fast green 염색법을 실시하였다. 이 염색은 탈파라핀과 합수 처리 과정을 거친 후 Weigert's iron hematoxylin(HT110232, Sigma, St Louis, USA) 용액에 10 분간 반응시킨 후 10 분간 흐르는 물에 수세하고, 0.02% fast green (FCF) 용액(F7258, Sigma, St Louis, USA)에 5 분간 염색하였다. 1% acetic acid 요액에 10~15 초간 반응시킨 후 0.1% safranin O(S2255, Sigma, St Louis) 용액에 5 분간 염색하였다. Safranin O-fast green으로 염색된 슬라이드는 5~10분 정도 충분히 세척하여 핵이 청명한 색이 되도록 하고, 탈수 및 투명과정을 거친 후 봉입하였다. 그 후 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)을 사용하여 각각의 조직절편의 염증세포의 침윤정도, 연골과 뼈의 파괴 유무, 세포 파괴 유무를 관찰하였으며, 현미경에 장착된 디지털 CCD (Charge-coupled device) 카메라(Foculus, IEEE 1394, Germany)로 각 군의 조직들을 촬영하였다.

(3) 조직학적 평가

퇴행성 골관절염 부분의 정도를 평가하기 위하여 Mankin's score를 측정하였다. Mankin's score는 2명의 독립된 관찰자에게 단계에 대해 설명한 후 등급을 매기게 하였다. 이 점수는 조직 구조(structure), 세포형(cellularity), safranin o-fast green 염색, 연골세포층의 비대 두께(thickness of hypertrophic chondrocyte layer), 골 재형성과 골파괴(bone remodelling and osteolysis) 등으로 구분화하여 점수화하였으며 표 2와 같다. 전체 점수의 합계는 총 15점으로 하였다.

Table 2–2. Scale of osteoarthritis lesion (Mankin's score)

Grade	State		
Structure			
0	Normal		
1	Pannus and surface irregularities		
2	Clefts to transitional zone		
3	Cleft to radial zone		
4	Cleft to calcified zone		
5	Complete disorganization		
Stain			
0	Normal		
1	Slight reduction		
2	Moderate reduction		
3	Severe reduction		
Cellularity			
0	Normal		
1	Diffuse hypercellularity		
2	Cloning		
3	Hypocellularity		
Thickness of hypertrophic chondrocyte layer grade			
0	Normal		
1	Moderate decrease		
2	Total decrease		
Bone remodelling and bone osteolysis were grade & Respectively			
0	No	1	Yes

다. 결과 및 고찰

1) 퇴행성 골관절염 유발 시 병리조직학적 평가

MIA 주사 전, 주사 후 3, 7, 14 일째 실질성 초기 염증 반응을 보기 위하여 백서의 우측 슬관절을 H & E와 safranin O-fast green 염색을 통해 조직학적 변화를 관찰하였다. 주사 전 H & E와 safranin O-fast green은 정상 관절 상태이며, 3일째에 연골의 침습 정도를 확인한 결과 본 실험에서 슬관절의 연골 부분에서 염증성 소견이 확인되었다. 이 염증은 활액막의 팽창에 의하여 단백질 부종액, 대식세포 침윤, 호중구, 형질세포와 림프구 등에 의해 활성화 되어진다. MIA 주사 14일째에서 연골의 심부를 통하여 세포외 기질의 소실을 확인하였으며, 연골층이 많이 소실됨을 확인하였다.

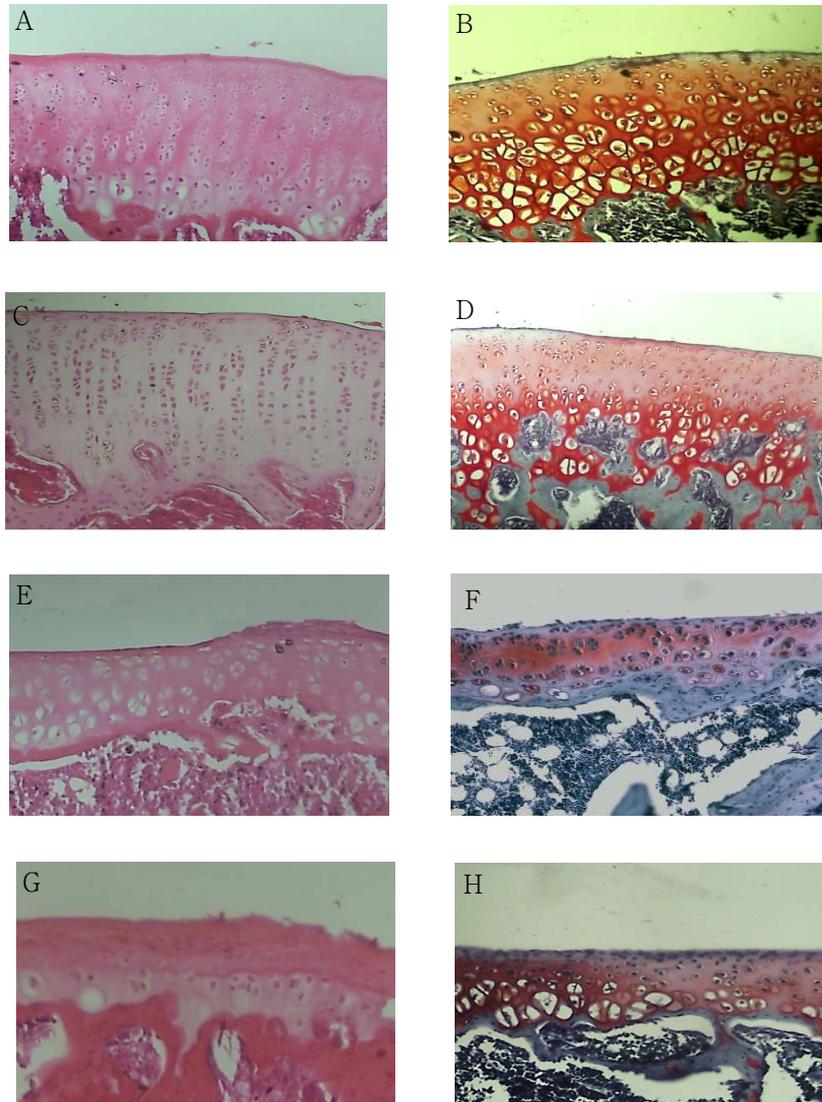


Figure 2-3. Histological change of articular cartilage and synovial membrane pre- and post-monosodium iodoacetate (MIA) injection (H & E, safranin O-fast green, $\times 200$).

(A) & (B) control group, (C) & (D) After 3 days of MIA-induced osteoarthritis, (E) & (F) After 7 days of MIA-induced osteoarthritis, (G) & (H) After 14 days of MIA-induced osteoarthritis.

2) 치료 종료 후 병리조직학적 소견

퇴행성 골관절염 유발 후 우슬 크림제를 처치 한 후 21일째 연골의 변화를 보기 위하여 백서의 우측 슬관절을 H & E와 safranin O-fast green 염색으로 관찰하였다. 실험 종료 후 28일째 safranin O-fast green에 의해 연골의 침습 정도를 확인한 결과 실험대조군에서 슬관절의 연골 부분에 미약한 염증성 소견이 발견되었다 (Fig. 2-4A). 이 염증은 활액막의 팽창에 의한 것으로 보여 진다. 실험군 I (Fig. 2-4B), II (Fig. 2-4C), III (Fig. 2-4D)에서는 경증의 활막염이 관절 부분에서 관찰되었으며, 약간의 proteoglycan의 소실과 세포질이 관절의 일부 구획에서 관찰되었으나, 연골층이 대조군에 비해 많이 호전됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 2-4).

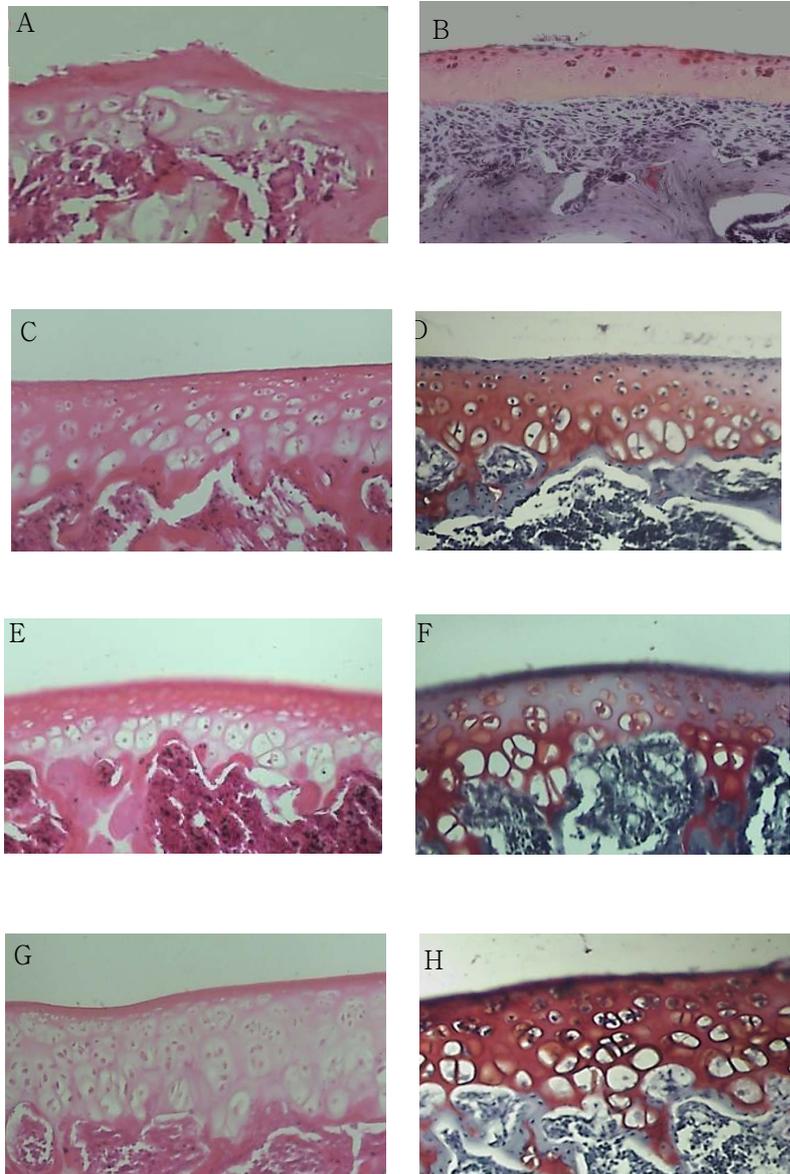


Figure 2-4. Histological change of cartilage undergoing a treatment during osteoarthritis rats (21 days, H & E, safranin O-fast green, $\times 200$).

(A) & (B) MIA induced osteoarthritis group, (C) & (D) Experimental group I. (E) & (F) Experimental group II. (G) & (H) Experimental group III.

3) 치료 종료 후 병리조직학적 평가

우슬 크림제 처치 후 21일에 백서의 우측 슬관절을 H & E와 safranin-O fast green 염색으로 관찰하고, 이를 토대로 Mankin's score로 측정된 결과 그림 2-5와 같다. 21 일째에 실험대조군은 7.2 ± 0.54 점, 실험군 I 은 5.8 ± 0.52 점, 실험군 II는 5.1 ± 0.73 점, 실험군 III은 4.8 ± 0.76 점으로 실험군들에서 대조군에 비해 유의하게 점수가 감소하여, 치료 이후에 손상되었던 관절연골이 조직의 구조, 세포의 형태, 주위 세포의 기질의 염색성 등의 현미경적 소견이 어느 정도 정상 연골 조직으로 수복되어가고 있는 과정을 관찰하였다($P < 0.05$)(Fig. 2-5).

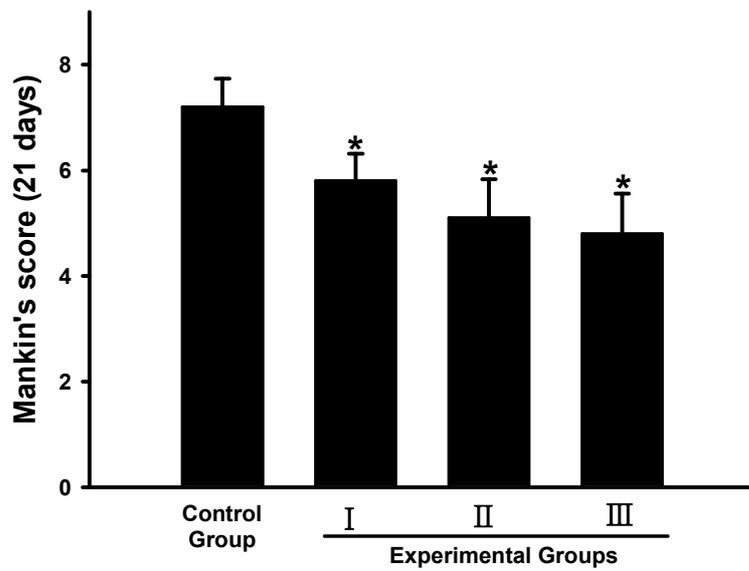


Figure 2-5. Influence of a calibrated effort on histological lesions (according to Mankin's score) in post-monosodium iodoacetate (MIA) injection. Values are showed mean±S.E. Statistically significant as compared with control group, *P<0.05.

또한 우슬 투여군의 경우에는 생약자체의 독성 유무 혹은 정도를 알아보기 위하여 간, 신장에 대해서 병리조직학적 검사를 아울러 실시하였다. 정상군에 비하여 실험군 I에서는 간(Fig. 2-6)과 신장(Fig. 2-7)의 염증성 소견이 관찰되는데 반하여, 관절염 유발 후 우슬을 투여한 처치 약물의 독성과 관련된 어떠한 병리조직학적 변화도 관찰할 수 없었다.

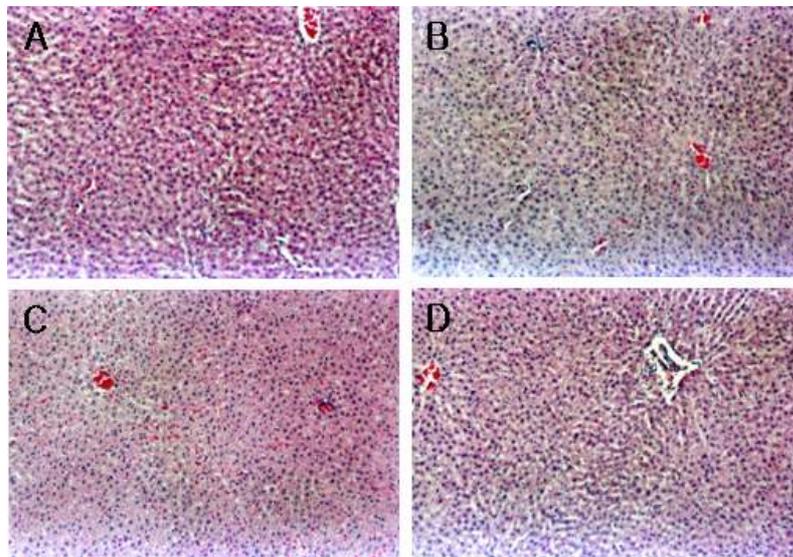


Figure 2-6. Effect of *Achyranthes Radix* on the histopathological change of liver tissue in type II collagen induced arthritis models (H & E stain $\times 100$, A: Control group, B: Group I, C: Group II, D: Group III).

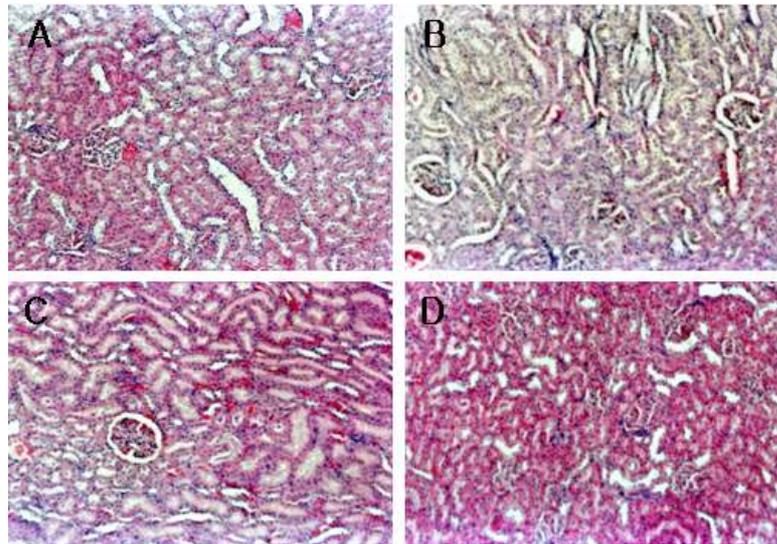


Figure 2-7. Effect of *Achyranthes Radix* on the histopathological change of kidney tissue in type II collagen induced arthritis models (H & E stain $\times 100$, A: Control group, B: Group I, C: Group II, D: Group III).

퇴행성 골관절염은 관절연골세포와 세포외기질간의 형태적, 생화학적, 분자적, 그리고 생역학적 변화가 분명하고, 임상적으로 관절통, 압통, 움직임의 제한, 뼈 마찰음, 염증 등을 특징으로 한다. 관절염에 많이 사용되는 우슬은 주요 성분으로 saponin, betaines, achyranthine, amino acid, inokosterone, glactose, β -ecdysone, flavonoids와 미량원소인 티타늄 등이 함유되어 있다고 보고되었다. 이와 같이 우슬의 성분 등의 연구가 일부 보고된바가 있으며, 실제 임상에서 퇴행성 골관절염 환자에게 민간요법으로 우슬을 많이 이용하고 있으나, 치료 효과는 많이 밝혀져 있지 않다.

실험적 퇴행성 골관절염은 외과적 수술방법, collagenase 등의 효소이용, vitamin A 등을 이용한 연골세포의 대사 방해 등 여러 방법에 의해 유도되어 진다. 연골 세포의 정상 기능을 이루기 위해 관절 연골의 구조적인 통합이 이루어지는데, 국소적인 MIA 주사는 연골세포 내의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 활동억제로 인하여 해당 작용의 대사 작용 파괴로, 관절 연골의 퇴행화를 유도

한다.

관절 내 MIA 주사는 초기 염증반응을 보이며, 단백 부종액, 섬유소, 대식세포, 중성구, 형질세포 대식구 등을 보인다고 하였다. 더욱이 MIA로 유도한 관절염 동물 모델에서 초기 염증반응은 후기 상태에서 1차 구심성 섬유의 말초 수용기 감각을 유도하여 특성화된 반응을 보이며, 이는 C 섬유와 관련하여 척수로 들어가는 입력을 더 증가시키고, 활막의 손상과 연골하 골의 노출로 사람과 같은 관절통이 발생되게 된다. 따라서 이러한 유사성 때문에 퇴행성 골관절염의 병태생리학적인 실험과 약물 연구에 많이 사용하고 있다. 관절통각은 활액막 내 자유 신경 종말로부터 관절염이 있을 때 유발되며, MIA 유발 관절염 모델은 초기에 일시적 활막염을 유발한다. 국소 부위에 substance P, bradykinin, prostaglandins와 같은 물질의 유리를 유도하며, 관절염에서 대식세포의 역할에 대해 확인된바가 있다. MIA 처치 후 염증 외에 연골하 골과 연골에 물리적 힘을 가함으로써 더욱 관절에 염증과 통증을 발생시키게 된다. 본 연구결과에서 관절염 유발 후 실험 대조군에서 연골 전체적으로 두께와, 세포충실성(cellularity)이 현저히 감소하였고, 퇴행성병변이 관절 모든 부분에서 잘 관찰되어 퇴행성 골관절염이 유발되었음을 조직학적 검사 및 평가를 통해 확인할 수 있었다. 처치 종료 후 각 실험군들에서 연골세포의 두께가 대조군에 비해 현저히 증가하였다. 또한 이러한 조직학적 변화를 Mankin's score로 측정된 결과 실험대조군에 비해 처치한 각 실험군들에서 점수의 유의한 감소 효과를 관찰하였다.

이상의 연구 결과로 보아 MIA로 유도한 퇴행성 관절염 백서에서 우슬 엑스가 함유된 크림제를 처치 시 실험대조군에 비해 실험군들에서 관절 연골의 침식 정도가 많이 호전됨이 관찰되었다. 따라서 우슬 크림을 처치하였을 때 연골세포의 퇴행화를 많이 억제하는 것으로 보여지며, 정확한 기전을 밝히는데 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 류마티스 관절염에서 우슬이 미치는 영향

가. 서설

관절부위의 질환에 대한 연구는 수십 년 전부터 실험동물을 이용하여 집중적으로 연구되어 왔으며, 그 중 다발성 관절염(Poly arthritis) 모델은 약 50년 전부터 어쥬번트(Adjuvant)를 실험적으로 유도하여 연구되어 왔다. 이러한 관절염 모델은 활막의 비후와 염증세포의 침윤을 특징적으로 반복 진행하게 되어 관절의 연골과 골을 파괴시켜 변형을 유도하는 자가면역질환(Autoimmune disease)으로써, 인간의 질환과 유사한 병리학적 특징을 나타내는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)이라고도 불린다. 이러한 류마티스 관절염은 초기에는 외부의 감염물질에 대하여 보호하려는 면역반응을 통해 T세포가 활성화되어 염증반응이 시작되는 것으로 보이며 말기로 진행되면 T세포의 영향력은 감소하고 활막세포의 비정상적인 증식과 활성화로 인해 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화를 야기시키고, 이로 인해 관절의 염증과 파괴가 지속적으로 나타나게 된다.

그러나 정확한 원인과 병태생리는 밝혀져 있지 않지만 류마티스 관절염 환자의 약 75%에서 면역글로불린 IgG의 Fc portion에 결합하는 자가항체가 검출되며, 관절내 type II collagen, collagenase, prostaglandin E₂(PGE₂), stromelysin, plasminogen activator 등이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 이러한 분비 물질의 증가는 비정상적인 과민면역반응에 의해서 발생되고 조직 내에서는 prostaglandin, histamine, bradykinin, serotonin, substance P, TNF- α , IL-1 β , IL-1, IL-6, IL-8, chemokine, growth factor 등 많은 종류의 화학매개물질(chemical mediators)이 염증세포와 손상조직, 신경 말단 등에서 유리되어 조직의 해부학적, 생리학적 변화를 유발한다.

이러한 염증반응을 통하여 발적, 열감, 부종, 통증과 기능소실이 나타나며 일반적으로 좌상 혹은 관통상과 같은 외상에 의해 발생하는 질환과는 다른 신체의 제한이 뒤따른다. 이로 인하여 발생하는 통증은 조직의 손상으로부터 보호하기 위한 신체기작이고 다양한 자극에 의해 몇 가지 형태로 유도된다. 통증 섬유는 지속적 자극에 의한 통증과 같은 느린 통증에서 더 높은 흥분이 나타나며, 유수 신경 섬유나 무수 신경 섬유의 활동이 증가하게 되면 이들 신경 섬유들이 함유하고 있는

Peptide들이 말초 조직으로 분비되어, 이로 인해 염증이 일어날 수 있으며, 염증으로 인한 통증이 발생될 경우에는 신경계 내부의 변형을 초래하여 지속적인 통증을 일으키는 것으로 생각되고 있다. 그러므로 관절염의 치료를 위해서는 염증에 대한 치료와 더불어 동반되는 통증을 조절하는 것이 매우 중요하다.

한편 염증성 사이토카인 억제 물질인 IL-10, Transforming growth factor-beta(TGF- β), IL-1 receptor antagonist(IL-1RA), Soluble Tumor necrosis factor- α receptor(TNFR)의 발현 증가도 보고되고 있으나 염증성 사이토카인의 작용을 중화시키기에는 충분하지 않은 것으로 생각된다. 따라서 염증성 사이토카인을 포함한 염증 물질과 항염증 물질의 불균형에 의해 류마티스 관절염이 지속되고 악화되어 염증과 통증을 야기하는 것으로 추측된다.

현재 류마티스 관절염의 약물치료방법은 크게 세 가지로 분류할 수 있다. 첫째로는 DMARDs(Disease modifying anti-rheumatic drugs)가 있고, 두 번째로는 steroid가 있으며, 세 번째로는 NSAID(Non-steroidal anti-inflammatory drugs)방법이 있다. DMARDs는 현재 질환의 초기에 사용되어 관절의 파괴를 예방하는데 효과가 있으나 골수억제, 간기능 손상 등 나아가 발암의 가능성을 아직 배제하지 못하고 있는 실정이다. 그리고 steroid 제제 약물은 단기간 사용에는 효과적이거나 장기간 사용하면 체중증가, 여드름, 신장피질괴사, 골다공증, 감염, 근력감소, 골괴사증, 의인성 쿠싱 증후군, 고혈압, 당뇨병, 위궤양을 유발하여 장기간 사용이 어렵다. 반면 NSAID는 세계에서 가장 널리 사용되고 있는 약물이며, Cyclooxygenase(COX)를 억제하여 Prostaglandin(PG) 합성을 억제함으로써 항염 및 진통작용을 나타내는 긍정적인 효과가 있는 것으로 알려져 왔다.

대개 COX는 Arachidonic acid를 PG로 전환시키며 I형과 II형의 두 가지 효소로 구성되어 있다. COX-1은 그 효소가 어느 조직에서나 발현하기 때문에 부작용도 위장관이나 신장에서 다양하게 나타나는 반면, 이 효소의 아형인 COX-2는 여러 종류의 자극에 의해 나타나는 유도 효소로서 염증이 있는 조직에서만 발현되어, 염증과 통증에 중요한 역할을 하는 PG의 생성을 조절하여 통증의 중추전달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 염증에 의해 발생된 통증에 NSAID를 척수의 척수강에 주사하거나 복강 내나 피하로 자극제를 주사하여 유도한 통증을 의미 있게 감소시킨다는 결과가 보고된 이후 항염제로 많이 사용되고 있다. 그러나 여전히 증상 조

절에 필요시 되고 있지만, 가장 큰 문제는 위장관 출혈, 항응고 작용, 수분저류 등 부작용이 심하게 나타난다는 점이다. 그래서 COX-1 억제에 따른 부작용을 최소화 하고, 원하는 진통 효과 및 항염증 효과를 얻기 위한 시도로써 선택적 COX-2 억제제에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

본 연구에서 사용할 쇠무릎(*Achyranthes japonica* LEVEILLENet VANIOT)의 뿌리로 불리는 우슬(*Achyranthes Radix*)은 Oleanolic acid, Saponin, Metamorphosis hormone, β -sitosterol, stigmasterol, Rubrosterone, Inokosterone, Phytoecdysteroid, Ecdysteroid 등의 여러 가지 성분이 분리되어 보고되었다. 또한 진통과 소염작용, 면역기능 조절작용, 혈압강하작용, 항노화작용, 이뇨작용, 항알레르기 효과 등이 알려져 있어, 고혈압, 류마티스 관절염과 같은 울혈의 치료, 이뇨 및 강장제 등의 치료 및 민간요법으로 널리 사용되어 왔다. 현재 우슬을 이용한 관절의 통증이나 염증성 질환에 관련된 여러 연구가 진행되고 있으나, 구체적인 성분과 활성의 연구와 관련지어 보고된 경우는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 류마티스 관절염 환자를 대상으로 천연물질인 우슬추출물을 함유 크림제를 적용하여 항염증의 효능을 평가하고 이에 더불어 통증의 감소에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험동물

본 연구는 생후 7주된 250 ± 25 g 무게의 Sprague-Dawley계 흰쥐(웅성, 대한실험동물)를 각 군당 27마리씩 할당하여 108마리를 사용하였다. 항온·항습이 되는 사육실의 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 명암은 12시간 주기로 하였고, 물과 고형사료는 자유롭게 공급하였다.

류마티스 관절염을 유발한 후 육안으로 관절의 발적, 부종 및 염증을 형성하는 개체를 선별하여 실험에 착수하였으며, 각 실험군 구성은 다음과 같다. 실험군 I은 류마티스 관절염을 유발한 후 아무런 처치도 하지 않은 군($n=27$), 실험군 II는 류마티스 관절염을 유발한 후 우슬추출물의 연고도포(100mg) 군($n=27$), 실험군 III은 류마티스 관절염을 유발한 후 우슬추출물의 연고도포(500mg) 군($n=27$), 실험군 IV는 류마티스 관절염을 유발한 후 우슬추출물의 연고도포 군(1,000mg)($n=27$)으로 나누었다. 또한 류마티스 관절염을 유발하기 전($n=8$)을 제외한, 유발 3일째, 유발 7일째, 유발 14일째, 유발 21일째, 유발 28일째에 각 군당 5마리씩 할당하여 운동행동 반응평가와 면역조직화학적 검사 및 ELISA를 이용한 검사를 실시하였다(Table 2-3).

Table 2-3. The Number of rats used in each experimental groups

Groups	Training Period(days)					
	Pre	3 rd	7 th	14 th	21 th	28 th
I: RA Induced($n=27$)		n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
II: RA Induced + AR Ointment 100 mg($n=27$)		n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
III: RA Induced + AR Ointment 500 mg($n=27$)	n=8	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
IV: RA Induced + AR Ointment 1,000 mg($n=27$)		n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Total($n=108$)	n=8	n=20	n=20	n=20	n=20	n=20

2) 류마티스 관절염 모델

Chicken type II collagen(Sigma, St, Louis, MO, USA)을 0.1 M 아세트산에 4 mg/ml의 농도로 4℃에서 12시간 정도 저어준 다음 동량의 Freund's incomplete Adjuvant(Sigma, St, Louis, MO, USA)와 혼합하여 유탕시켰다. 그 후 흰쥐의 족척 부위에 유탕액을 200 μ g의 용량으로 총 2회 주입하였다. 일차접종은 우측 족척의 중족골 부위에 주입하고, 이차접종은 일차주사 후 7일 후에 꼬리기시부의 1~3번째 부위에 동량의 유탕액을 주입하여 유발하게 된다. 마지막 접종일로부터 14일째에 육안으로 관절주위부의 발적이나 부종 등의 임상적 관절염 증후를 관찰 및 평가하여 개체를 선별한 후 다음날부터 실험을 하였다.

3) 우슬추출물 경피투과제의 제조 및 연고도포방법

앞서 퇴행성 관절염과 동일한 방법으로 제조하여, 사용하였으며, 이와 같이 얻은 경피투과제는 밀봉하여 사용할 때까지 냉장실(2~3℃)에 보관하였다. 각 실험군에 연고도포 방법은 우슬추출물을 이용한 크림제를 유발 14일째부터 28일 동안 슬관절에 고르게 펴서 도포하였다.

4) 행동학적인 관찰 평가

관절염의 임상적인 평가를 위해 류마티스 관절염을 유발하기 전 3일간 행동학적인 평가를 통해 실험전의 값을 산출하였다. 행동학적인 평가에는 족 부종의 체적변화(volume change of hind paw edema), 관절염지수의 임상평가(clinical assessment of arthritis indices), 관절염의 배측굴곡과 저측굴곡 통증 지수(scoring of arthritic dorsal flexion & plantar flexion pain test), 기계적 이질통(measurement of mechanical allodynia)에 대한 역치 검사를 포함하였다. 흰쥐에 한 가지 행동학적인 평가 후 30분 후에 다른 행동학적인 평가를 실시하였으며, 이러한 행동학적인 관찰 평가 방법은 크림제 도포 전에 매일 오후 13:00~17:00 사이에 유발 3일, 7일, 14일, 21일, 28일째에 각각 측정하였다. 행동학적인 관찰의 정량적 분석을 위해 실험군과 대조군을 인지하고 있지 않은 두 명의 관찰자가 수행하여 관찰자에 의한 오차를 최소화하였다.

(1) 족 부종의 체적변화

Water-displacement 방법에 의하여 유발 전 용적(volume)을 대조용적(control volume)으로 하여, 매일 같은 시각에 측정된 용적과의 차이를 비교하였다. 또한 족 부종의 체적측정은 유발 전, 유발 후 3, 7, 14, 21, 28일째에 각각 3회 반복 측정하여 평균을 내어 체적(ml)을 산출하였다.

(2) 관절염 지수의 임상적 평가

Hughes 등(1994)의 연구방법을 수정한 것으로 관절염의 중증도를 정량적으로 평가하고자 흰쥐의 각 지절에서 관절 주위부의 염증이나 발적 및 부종과 같은 임상적 관절염의 증상을 육안으로 관찰한 후 흰쥐의 후족부를 0점에서 4점으로 점수를 배점하였고, 다시 사지의 점수를 합산하여 각각의 개체에 최대 16점으로 채점하여 관절염 지수를 구하였다(Table 2-4).

(3) 관절염의 배측굴곡과 저측굴곡 통증 지수

흰쥐의 족관절을 저측방향으로 5초 간격으로 5번씩 부드럽게 굴곡시킨다. 이와 같은 방법을 적용할 때 족관절에 가하는 힘은 혈액순환의 차단을 관찰하기 위해 엄지발가락의 색깔 변화를 관찰하면서 적용하였다. 각각의 개체에 대하여 총 발회피 점수는 0~5점 사이에서 얻을 수 있으며, 정상측과 비교하여 빠르지 않은 발회피 반응을 보이면 0점, 정상측과 비교하여 활발한 발회피 반응을 보일 경우를 1점으로 주었다. 이와 같은 점수방법을 배측굴곡의 발회피 반응에도 적용하여 점수를 내었다.

Table 2-4. Clinical assessment of arthritis indices

Grade	Clinical symptom
0	Paws with no swelling and focal redness
1	Paws with swelling of finger joints
2	Paws with mild swelling of ankle or wrist joint
3	Paws with severe inflammation of the entire paws
4	Paws with deformity or ankylosis

(4) 기계적 이질통 측정(Measurement of mechanical allodynia)

외부자극에 대한 통각 회피 역치검사는 Shimizu 등(2005)의 연구방법을 수정 보완하였으며, von Frey filament라고 불리는 Touch-Test™ Sensory Evaluator Instructions(North Coast Medical Inc., CA 95037, USA)을 up-down 방법을 사용하여 자극하였다. 검사를 위해 흰쥐의 발바닥에 매우 쉽게 접근할 수 있도록 만들어진 금속철망(10×10 cm)의 위에 사각형 모양의 투명한 플라스틱을 올려놓고 흰쥐를 실험 상자에 넣고 15분 이상 적응시켰다. 그 후 흰쥐의 움직임이 없고 조용해지면 von Frey filament를 사용하여 낮은 강도에서 높은 강도로, 3~4번째 발바닥의 밑에서부터 수직으로 올려 5~6초간 유지할 때 흰쥐가 신속한 회피반응을 보이거나, hairs를 뺄 때 즉시 움찔하거나 발바닥을 핥으면 양성자극으로 간주하였다. 이와 같은 방법으로 반응에 대한 역치 값을 찾은 후 각 개체에 6회의 자극에 대해 반응을 얻을 때까지 계속하였다. 이때, von Frey filament의 구부리는 힘은 1.0, 1.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0 및 26.0 g을 사용하였는데, 자극시 구부리는 힘이 체중의 10%를 초과할 경우 능동적인 “foot withdrawal”이 아니라 수동적인 “foot lift”가 되는 결과를 초래하기 때문에 26.0 g을 최대로 구부리는 힘으로 하였다.

5) 조직학적 검사(Histological assessment)

(1) 조직 표본제작

류마티스 관절염 유발 전, 유발 후 3, 7, 14, 21일째에 전신 마취제인 럼폰(Rompun, 바이엘코리아)을 복강주사(0.6 mg/kg)하여 마취한 후, 10% 중성 포르말린 용액(neutral buffered formalin: NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 슬관절을 Bouin액에 침지하여 24 시간 이상 고정하였으며, 10% 질산(Nitric acid) 용액에서 2일에 한번씩 질산액을 교환하면서, 총 7일 동안 탈회(decalsification)를 실시하였다. 그 후 탈회된 슬관절 조직을 세척한 후 10% 중성포르말린용액에서 48시간 동안 후고정을 실시한 후 파라핀을 포매한 다음 미세절단기(Sakura 2040, Japan)를 이용하여 5 μ m 두께로 박절하였다.

(2) 류마티스 관절염 유발 전·후 슬관절의 병리조직학적인 관찰

박절한 슬관절 절편은 염증침윤정도를 관찰하기 위해 젤라틴으로 코팅 처리된 슬라이드에 부착시켜 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 시행하였다. 염색 후 통상의 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하였다. 각각의 조직절편은 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)에 디지털 CCD 카메라(FOculus, IEEE 1394, Germany)를 장착하여 각 군의 조직들을 촬영하였다.

(3) 실험 종료 후 슬관절의 병리조직학적인 관찰

Safranin O-fast green 염색은 탈 파라핀 과정을 거친 후 Weigert's iron hematoxylin 용액에 10 분간 반응시킨 후 10 분간 흐르는 물에 세척하고, fast green (FCF) solution에 5 분간 염색하였다. 1% acetic acid solution에 10 초간 반응시킨 후 0.1% safranin O solution에 5 분간 염색하였다. Safranin O-fast green 으로 염색된 슬라이드는 5~10분 정도 충분히 세척하여 핵이 청명한 색이 되도록 하고, 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하였다. 그 후 광학현미경 (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)에 디지털 CCD 카메라(FOculus, IEEE 1394, Germany)를 장착하여 각 군의 조직들을 촬영하였다. 이를 Beehler 등(2003)와 McCarney-Francis 등(2003) 및 Thompson 등(1993)의 방법을 응용하여 세포침윤, 활액막의 과다증식, 판누스 형성, 연골의 파괴정도를 조직학적 지수(Histological index)

로 구분하여 0(normal), 1(mild changes), 2(moderate changes), 3(severe changes)으로 점수화하여 평가 하였다.

6) COX-2 단백질에 대한 면역조직화학 염색

Inflammatory cytokine인 COX-2의 윤희관절막내 발현량의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학 염색 방법을 이용하였다. 우선 박절된 슬관절 조직절편을 0.01 M PBS로 여러 번 세척한 후 남아있는 고정액 성분을 제거하기 위하여 37°C의 온도에서 1% normal blocking serum으로 1시간 처리하였다. 면역화학염색을 위한 전처리 과정으로 0.3%의 과산화수소수(hydrogen peroxide) 용액에 30분간 처리하여 조직내의 내재된 peroxide 활성을 차단하였다. 다시 0.01 M PBS로 3회 세척한 후 각각의 조직절편을 anti COX-2(N-20, cat# sc-1746, 1:500, Santa Cruz, CA)로 4°C에서 24시간 처리한 후 0.01 M PBS로 수세하고, anti-biotinylated universal secondary(cat# PK-8800, Vectastain, USA)로 1시간 반응시켰다. 다시 0.01 M PBS로 10분씩 3회 수세한 후 Strepta-vidin/peroxidase로 60분간 반응시켰으며, 0.01 M PBS로 수세과정을 거쳐 1분간 DAB(3,3-Diaminobenzidine, 60382248, ZYMED Lab, Germany)로 발색을 실시하였다. 0.01 M PBS로 10분씩 3회, 증류수로 10분씩 3회 수세한 후 Hematoxylin(MHS-32, Sigma, USA)으로 대조염색한 후 탈수 및 투명화 과정을 거쳐 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co. Japan)으로 관찰한 후 현미경에 장착된 디지털 CCD 카메라(FOculus, IEEE 1394, Germany)로 각 군의 조직들을 촬영하였다. COX-2의 발현 정도는 면역조직화학법으로 처리한 조직절편을 광학현미경($\times 200$) 하에서 다음과 같이 반정량적 척도(semiquantitative scale)로 구분하여 negative(-), mild(+), moderate(++), severe(+++)로 평가하였다.

7) 혈청에서의 Prostaglandin E₂의 농도 측정

혈청에서 PGE₂의 측정은 PGE₂ assay kit(R & D System Inc., Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정방법은 류마티스 관절염 유발 전, 유발 후 28일째에 각 군으로부터 심장 채혈하여 혈청을 분리하였다. 먼저 Calibrator Diluent RD5-39를 비특이적 결합(nonspecific binding, NSB)을 한 well에 150 μ l 첨가하고, Calibrator Diluent(RD5-3950)를 100 μ l 첨가하여 zero standard(B₀) well을 만들었

다. 다음으로 microplate well에 sample과 100 μ l의 standard 용액을 첨가하였다. 또한 blank와 NSB well을 제외한 나머지 sample well에 50 μ l의 PGE₂ primary antibody solution을 첨가하고, blank를 제외한 나머지 well에 50 μ l의 Conjugate를 첨가하였다. 마지막으로 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 wash buffer(200 μ l)로 4번 깨끗이 수세한 후 암실에서 substrate solution을 각각의 well에 200 μ l 첨가하여 30분간 반응시켰다. 마지막으로 50 μ l의 stop solution을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 microplate reader(Model 680, BIO-RAD Inc., Japan)의 기기로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 결과

1) 류마티스 관절염의 육안 및 조직학적 유발 소견

흰쥐의 족부에서 관찰되는 발적과 홍반 및 부종을 동반하는 관절염의 육안적 소견은 Fig. 2-8과 같았다. Chicken type II collagen으로 관절염을 유발시킨 후 14일째에 정상개체와 실험군 I을 Hematoxylin & Eosin(H & E) 염색을 통하여 조직학적으로 관찰하여 본 결과 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤 등 기타 염증의 소견을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다.



Figure 2-8. Erythematous swelling of the hind paw of a rat 2 weeks after the secondary immunization with Chicken type II collagen(Right) and normal hind paw(Left)

2) 행동학적인 관찰 평가

(1) 족 부종의 체적변화

류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 족 부종의 체적변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($p > .05$), 실험적 중재 이후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다($p < .01$). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에는 실험군 I 과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으며($p < .05$), 실험군 II, III, IV 사이에는 수치상의 차이는 있으나 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p > .05$). 실험군별 측정시기에 따른 변화를

일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, I 군은 유발 14일째(p<.05), 유발 21일째, 28일째(p<.001)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났고, II 군은 유발 14일째(p<.05), 21일째(p<.01), 28일째(p<.001)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다. 또한, III 군은 유발 21일째(p<.01), 28일째(p<.001)에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, IV 군에서는 유발 21일째(p<.05), 28일째(p<.01)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다.

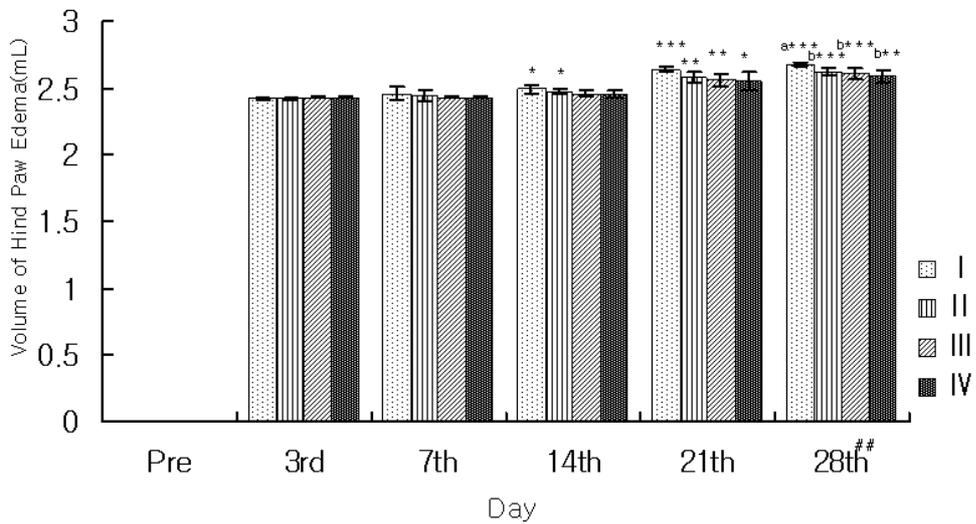


Figure 2-9. Volume change of hind paw edema in rheumatoid arthritis rat. Values are showed mean±SD, Tested by One-way ANOVA(##: p<.01). Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p<.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(*: p<.05, **: p<.01, ***: p<.001).

(2) 관절염 지수의 임상적 평가

류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 관절염 지수의 임상적인 평가의 변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 ($p > .05$), 실험적 중재 이후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다($p < .01$). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에는 실험군 I 과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으나($p < .05$), 실험군 II, III, IV 사이에는 통계학적으로는 유의한 차이는 보이지 않았지만 수치상의 차이는 있었다 ($p > .05$)(Fig. 2-10). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, I 군은 유발 14일째($p < .01$), 유발 7일째, 21일째, 28일째($p < .001$)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났고, II 군은 유발 21일째($p < .01$), 7일째, 14일째, 28일째에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다($p < .001$). 또한, III 군은 유발 7일째, 28일째($p < .01$), 14일째, 21일째($p < .001$)에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, IV 군에서는 유발 7일째, 14일째, 21일째, 28일째($p < .001$)에서 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다.

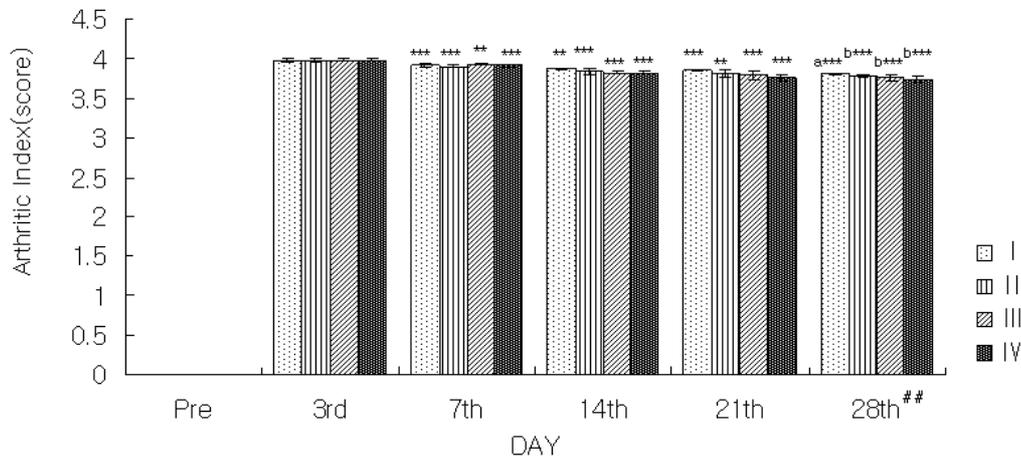


Figure 2-10. Change of arthritic index in rheumatoid arthritis rat.

Values are showed mean±SD, Tested by One-way ANOVA(##: p<.01).

Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p<.05). Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(**: p<.01, ***: p<.001).

(3) 관절염의 배측굴곡 통증 지수

류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 관절염 배측굴곡 통증 지수의 변화를 일요인 분산분석(One-way ANOVA)으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(p>.05), 실험적 중재 이후 28일째 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다(p<.01). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에 실험군 I 과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으며(p<.05), 실험군 II, III, IV 사이에는 수치상의 차이는 있으나 유의한 차이는 보이지 않았다(p>.05). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, I 군은 시기별로 호전된 차이가 유의하지 않았

으나($p>.05$), II군은 유발 28일째($p<.01$)에서 호전된 차이가 유의하게 나타났다. 또한, III군은 유발 7일째에는 호전된 차이가 유의하지 않았으나($p>.05$), 유발 14일째, 21일째($p<.01$), 유발 28일째($p<.001$)에서 각각 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, IV군에서는 유발 7일째, 14일째에는 호전된 차이가 유의하지 않았으나($p>.05$), 유발 21일째($p<.05$)와 유발 28일째($p<.01$)에서는 호전된 차이가 각각 유의하게 나타났다.

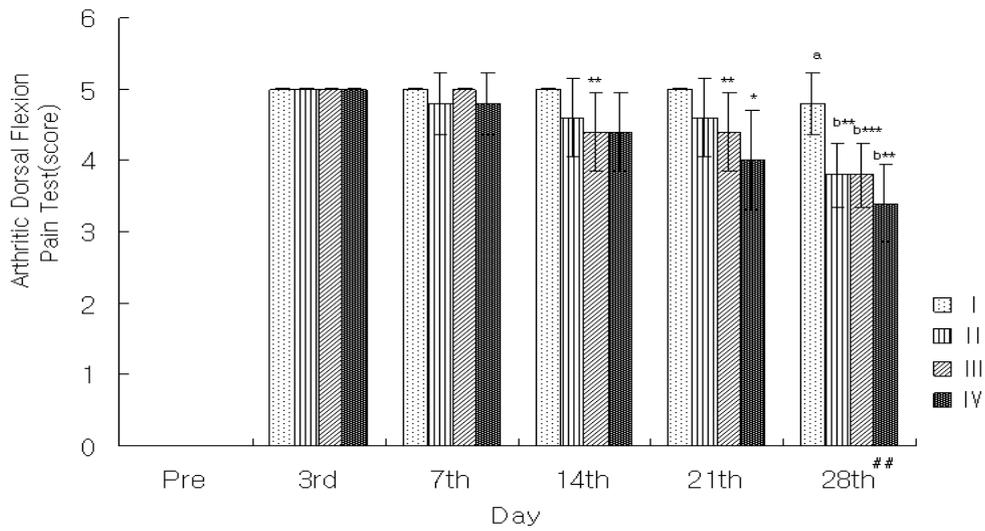


Figure 2-11. Change of scoring of arthritic dorsal flexion pain test in rheumatoid arthritis rat.

Values are showed mean±SD, Tested by One-way ANOVA(##: $p<.01$).

Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test($p<.05$).

Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(*: $p<.05$, **: $p<.01$, ***: $p<.001$).

(4) 관절염의 저측굴곡 통증 지수

류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 관절염 저측굴곡 통증 지수의 변화를 일요인 분산분석으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나($p>.05$), 실험적 중재 이후 28일째에는 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다($p<.01$). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에 실험군 I 과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으며($p<.05$), 실험군 II, III, IV 사이에는 수치상의 차이는 있으나 유의한 차이는 보이지 않았다($p>.05$). 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, I 군, II군에서는 유발 28일째($p<.01$)에 호전된 차이가 유의하게 나타났다. 또한, III군에서는 유발 21일째($p<.01$)와 유발 28일째($p<.001$)에 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, IV군에서는 유발 21일째와 유발 28일째에 호전된 차이가 유의하게 나타났다($p<.001$).

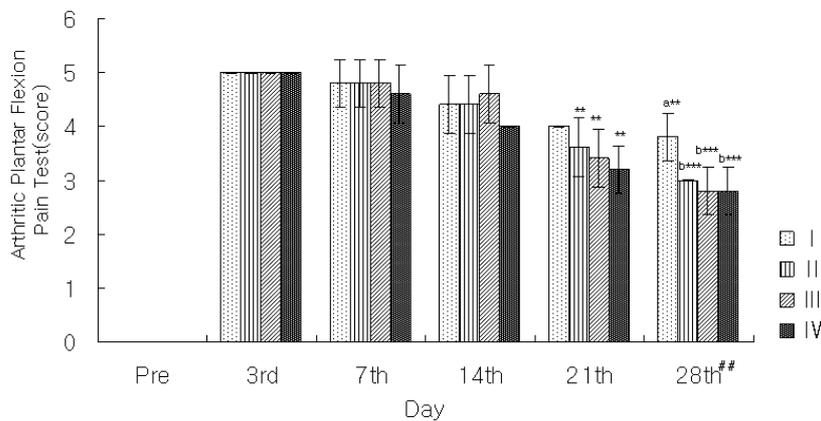


Figure 2-12. Change of scoring of arthritic plantar flexion pain test in rheumatoid arthritis rat.

Values are showed mean±SD, Tested by One-way ANOVA(^{##}: $p<.01$).

Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test($p<.05$).

Significantly different as compared with 3rd days by paired t-test(^{**}: $p<.01$, ^{***}:

p<.001).

(5) 기계적 이질통의 변화

각 군의 류마티스 관절염 2차 유발 후, 각 실험군의 시기별 관절염의 기계적 이질통의 변화를 일요인 분산분석(One-way ANOVA)으로 유의성검정을 실시한 결과, 실험적 중재 이후 3일째, 7일째, 14일째, 21일째에는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(p>.05), 실험적 중재 이후 28일째에는 실험군들 간에 유의한 차이를 보였다(p<.01). Duncan의 다중범위검정으로 사후검정을 실시한 결과, 28일째에 실험군 I 과 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보였으나(p<.05), 실험군 II, III, IV 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다(p>.05). 또한 실험군별 측정시기에 따른 변화를 일표본 대응 T검정(paired t-test)으로 실시한 후 류마티스 관절염 유발 3일째와 비교하여 보면, I 군은 각 시기별로 호전된 차이가 유의하지 않았으나(p>.05), II 군은 유발 28일째(p<.01)에 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, III군에서는 유발 21일째(p<.05)와 유발 28일째(p<.01)에 호전된 차이가 유의하게 나타났으며, IV군에서는 유발 21일째(p<.05)와 유발 28일째(p<.01)에 호전된 차이가 유의하게 나타났다.

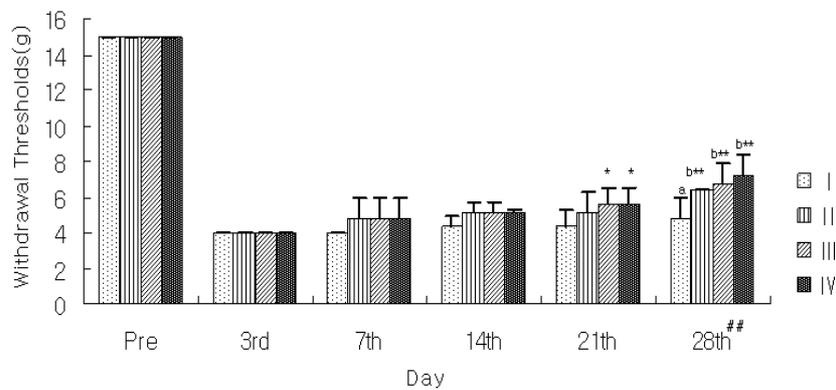


Figure 2-13. Change of mechanical allodynia in rheumatoid arthritis rat.

Values are showed mean±SD, Tested by One-way ANOVA(##: p<.01).

Values with different alphabet within the column are significantly different by Duncan's multiple range test(p<.05). Significantly different as compared with 3rd days by

paired t-test(*: $p < .05$, **: $p < .01$).

3) 조직화학적 평가

(1) 슬관절의 Safranin O-fast green 염색을 통한 조직화학적 반응

류마티스 관절염 유발 28일 후, 각 실험군에서 Safranin O-fast green 염색을 통하여 슬관절의 조직화학적 소견을 관찰한 결과 실험전에서는 대퇴(femur)와 슬개골(patella)의 관절연골, 연골하 골조직, 활액막, 관절강 및 관절낭 등에서 정상적인 조직소견을 볼 수 있었다(Fig. 2-14A). 류마티스 관절염 실험종료 후, 실험군 I은 슬관절의 활액막의 과다증식으로 인하여 염증 세포침윤과 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus)를 형성하고 있었다. 이로 인하여 관절연골(Articular cartilage), 연골하 골조직(subchondral bony tissue)이 심하게 파괴되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 2-14B). 반면, 실험군 II, III, IV에서는 만성 염증성 세포침윤과 활액막의 과다증식은 거의 보이지 않았으며, 섬유성 판누스의 형성, 관절연골의 파괴는 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 특히 골간단(metaphysis)부위에서는 골외막의 증식성 변화와 신생골조직의 증식이 관찰되었다(Fig. 2-14C-E).

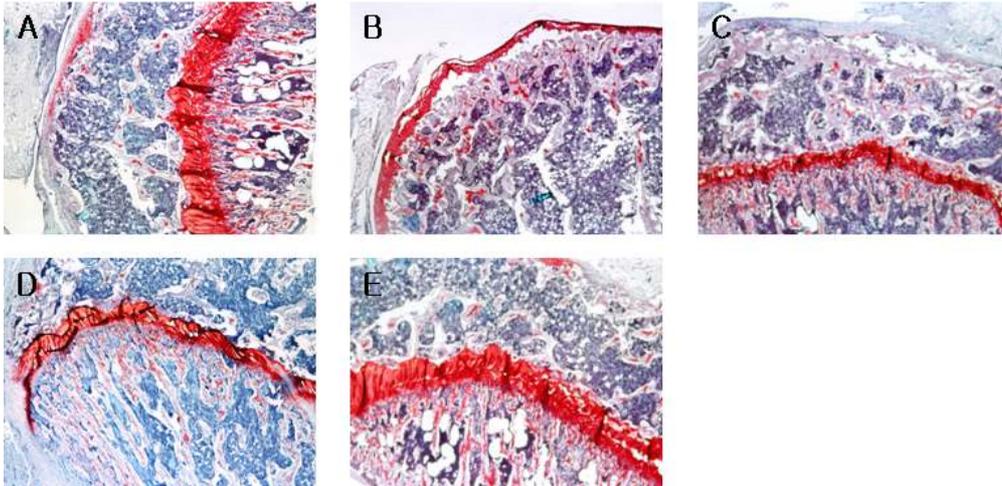


Figure 2-14. Histological change of cartilage undergoing a treatment during RA rats (21 days, H & E, safranin O-fast green, $\times 200$).

(2) 슬관절의 Safranin O-fast green 염색을 통한 조직학적인 지수 평가

류마티스 관절염 유발 28일 후, 각 실험군에서 슬관절부위에 Safranin O-fast green 염색을 실시하여 세포침윤, 활액막 과다증식, 판누스 형성, 연골의 파괴정도를 측정하였으며, 실험군간 변화를 일포본 대응 T검정(paired t-test)을 통해 비교한 결과는 다음과 같다. 류마티스 관절염 실험종료 후 실험군 I 과 비교하여 본 결과 세포침윤정도는 실험군 II, III, IV에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며 ($p<.05$), 활액막 과다증식 정도는 실험군 II, III, IV에서 호전된 차이가 유의하게 나타났고($p<.05$), 판누스 형성정도는 실험군 II, III, IV에서 호전된 차이가 유의하게 나타났으며($p<.01$), 또한 연골의 파괴정도는 실험군 II, III, IV에서 호전된 차이가 유의하게 나타났다($p<.01$). Safranin-O염색을 실시하여 proteoglycan의 소실 정도를 관찰한 결과 정상군은 관절연골표면이 골고루 염색된 반면 실험군 I 인 류마티스유도군은 염색성이 많이 떨어짐을 확인할 수 있었고, 우슬 처치시는 많이 호전됨이 관찰되었다.

Table 2-5. Change of histological score by safranin O-fast green stain in rheumatoid arthritis rat. (score)

Groups	Day of examination				
	Pre	Cellular infiltration	Synovial hyperplasia	Pannus formation	Cartilage destruction
I	0	2.80±0.44	2.60±0.54	2.80±0.44	2.60±0.54
II	0	2.00±0.01*	1.60±0.54*	1.60±0.54**	1.40±0.54**
III	0	1.80±0.44*	1.60±0.54*	1.60±0.54**	1.20±0.44**
IV	0	1.80±0.44*	1.40±0.54*	1.20±0.44**	1.20±0.44**

Values are showed mean±SD.

Significantly different as compared with experimental group I by paired t-test(*: $p < .05$, **: $p < .01$).

(3) 슬관절의 COX-2 단백질의 발현 면역조직화학적 반응

류마티스 관절염 유발 28일 후 슬관절 조직에서 발현되는 COX-2에 대한 면역조직화학적 반응을 검사하였다. 면역조직화학적 방법으로 표본을 염색한 결과, COX-2의 면역반응은 진한 갈색 과립상으로 관찰되었으며, 주로 윤활관절막의 주변 영역에서 면역 양성 반응을 보인 세포 수의 증가를 확인할 수 있었다. 류마티스 관절염 유발 28일 후 슬관절 조직에서 발현되는 COX-2를 반정량적으로 평가한 결과 실험군 I은 (+++), 실험군 II는 (++) , 실험군 III은 (++) , 실험군 IV는 (++)로 관찰되었으며 (Table 2-6), 유발 후 아무런 치료도 하지 않은 실험군 I에 비해 치료적 중재를 실시한 실험군 II, III, IV에서 COX-2 발현이 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다.

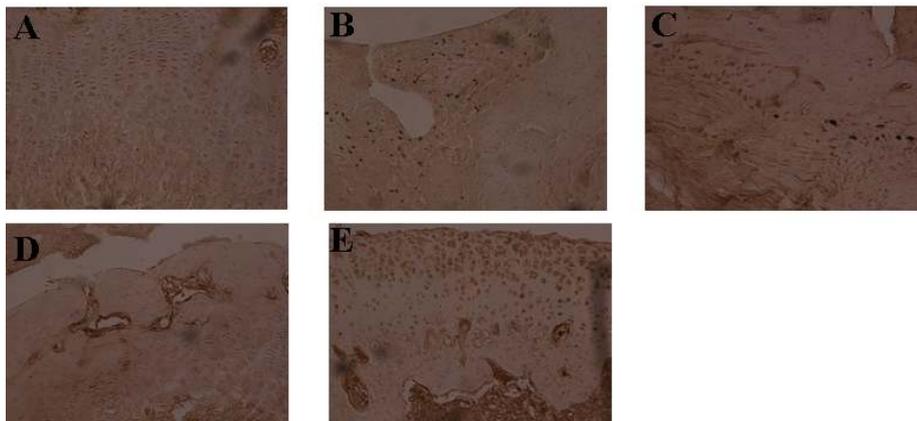


Figure 2-15. Effect of *Achyranthes Radix* ointment and swimming exercise on the immunostaining of COX-2 in representative synovial tissue sections from rats with rheumatoid arthritis (Hematoxylin counterstained; original magnification, $\times 250$).

Table 2-6. Change of Cox-2 immunoreactive cell in knee joint

Group	Cox-2 immunoreactive cell
I	+++
II	++
III	++
IV	++

-: Negative, +: Mild expressed, ++: Moderate expressed, +++: Severe expressed

4) 혈청에서의 Prostaglandin E₂(PGE₂)의 농도 변화

류마티스 관절염 유발 28일 후, 각 실험군들에 대해 ELISA를 이용하여 혈청에서의 PGE₂의 농도를 분석 하였다. 실험군 I의 농도는 유발 전(정상)과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가함을 볼 수 있었다(p<.001). 반면에 아무런 처치도 하지 않은 실험군 I의 농도와 비교하여 볼 때 각각 우슬 연고를 처치한 실험군 II, III, IV의 농도는 통계적으로 유의하게 감소함을 볼 수 있었다(p<.01).

Table 2-7. Change of concentration on prostaglandin E₂ production in serum (ng/ml)

	Prostaglandin E ₂ concentration	p-value
Pre	0.54±0.07	-
I	4.34±0.05 ^{***}	0.000
II	3.71±0.17 ^{**}	0.003
III	3.65±0.17 ^{**}	0.002
IV	3.37±0.16 ^{**}	0.001

Values are showed mean±SD.

Significantly different as compared with pre and experimental group I by paired

t-test(†††: $p < .001$). Significantly different as compared with experimental group I and group II, III, IV by paired t-test(**: $p < .01$).

5) 혈청에서의 염증성 사이토카인의 농도 변화

류마티스 관절염 Model에 대한 우슬의 *in vivo* 상에서 혈청을 분리하여, 전염증성 사이토카인인 interleukin-1과 tumor necrosis factor- α 를 측정하여 보았다. 이들 사이토카인은 윤희관절막에 비정상적인 면역 반응이 일어나는 질병인 류마티스 관절염에서 나타나게 된다. 본 실험에서 혈청 interleukin-1과 tumor necrosis factor- α 의 농도를 분석하여 본 결과 류마티스 관절염 유발한 실험군 I에서는 IL-1(Fig. 2-16A)과 TNF- α (Fig. 2-16B)의 농도가 높은 반면 우슬 투여시 감소하였고, 특히 500 mg/kg에서 유의한 감소를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2-16). 또한 류마티스 관절염시 마커로 쓰이는 C- 반응단백의 검사 결과에서도 류마티스 유도군에서는 증가한 반면 우슬 처치 시 유의한 감소를 보였으며($P < 0.05$)(Fig. 2-17A), 백혈구 수에 있어서도 우슬처치군에서 많이 호전됨을 보였다(Fig. 2-17B). 생약의 간독성을 확인하기 위하여 혈청 AST(Fig. 2-18A)와 ALT(Fig. 2-18B) 소견을 확인한 결과 우슬이 간독성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

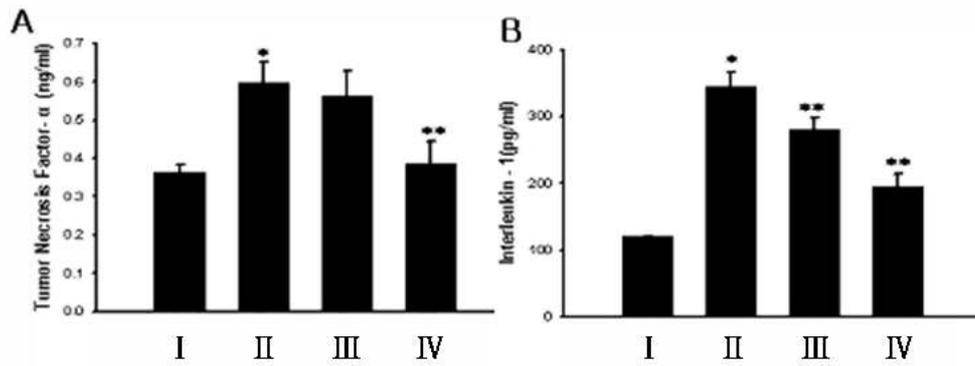


Figure 2-16. Effect of *Achyranthes Radix* on the TNF- α (A) and IL-1(B) in type II collagen induced arthritis models .

Significantly different as compared with experimental group I by paired t-test(*: $p < .05$, **: $p < .01$).

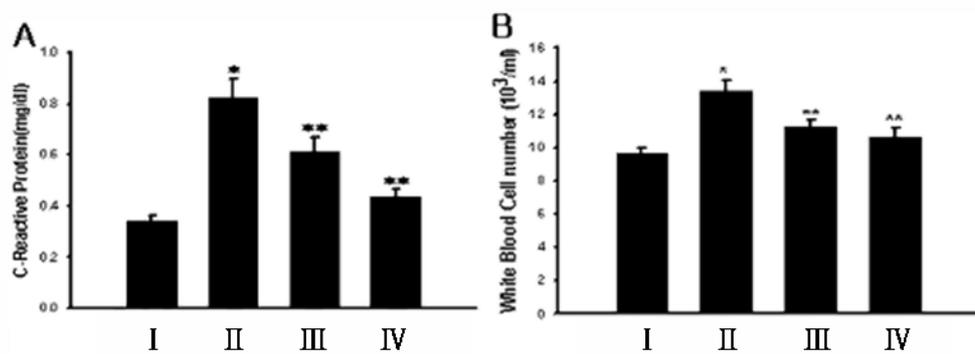


Figure 2-17. Effect of *Achyranthes Radix* on the CRP(A) and WBC(B) in type II collagen induced arthritis models .

Significantly different as compared with experimental group I by paired t-test(*: $p < .05$, **: $p < .01$).

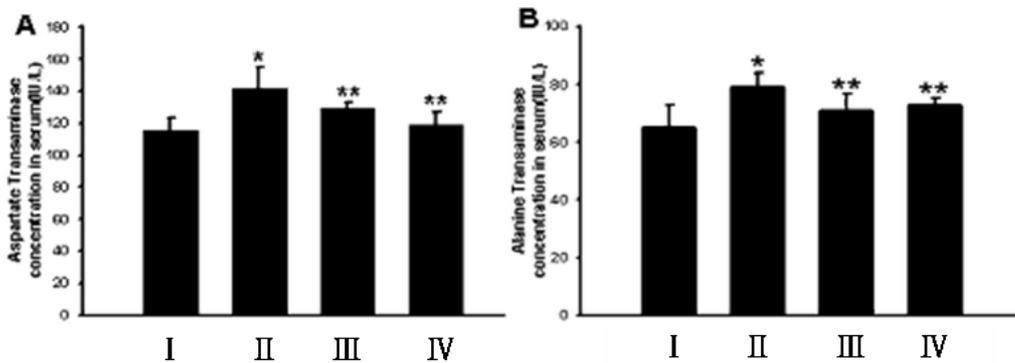


Figure 2-18. Effect of *Achyranthes Radix* on the AST(A) & ALT(B) in type II collagen induced arthritis models .

Significantly different as compared with experimental group I by paired t-test(*: $p < .05$, **: $p < .01$).

6) 방사선학적 소견

류마티스 관절염 Model에 대한 우슬의 *in vivo* 병리조직학적 검사를 한 결과, 육안검사에서 약간의 개선이 관찰되었으며, 방사선 검사에서는 방사선상에서 또렷하게 관찰될 정도의 현저한 골변화는 염증 상태에 장기간 노출되어야 하기 때문에 증상 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2-19). 그러나 가장 중요한 소견인 병리조직학적 검사에서 H&E 염색을 실시하여 관절면을 관찰한 결과 정상군은 활액막의 증식이나 염증세포 소견이 관찰되지 않았으며, 실험군 I에서는 전반적으로 synovial lining cell이 중등도로 hyperplasia되어 있었으며, 혈관 반응과 함께 단핵구의 침윤이 관찰되었고, 국소적으로 심한 연골 소실을 확인할 수 있었다. 또한 대체적으로 chondrocyte가 많이 감소되어 있었고 불규칙한 배열을 띄고 있었다. 우슬 실험군 II(100 mg)는 확대 관찰 하여 본 결과 일부 활액막에서 만성 염증성 세포의 침윤이 관찰되었다. 실험군 III(500 mg)에서도 대조군에 비해 연골의 회복이 관찰되었고, 염증 세포의 침윤이 완화됨을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보아 우슬 크림제 처치군은 류마티스 관절염 치료에 있어 병리조

직학적으로 유의적인 효과를 보이는 것으로 나타났으며, 100 mg 보다도 500 mg, 1,000에서 좋은 효과를 나타내었다.

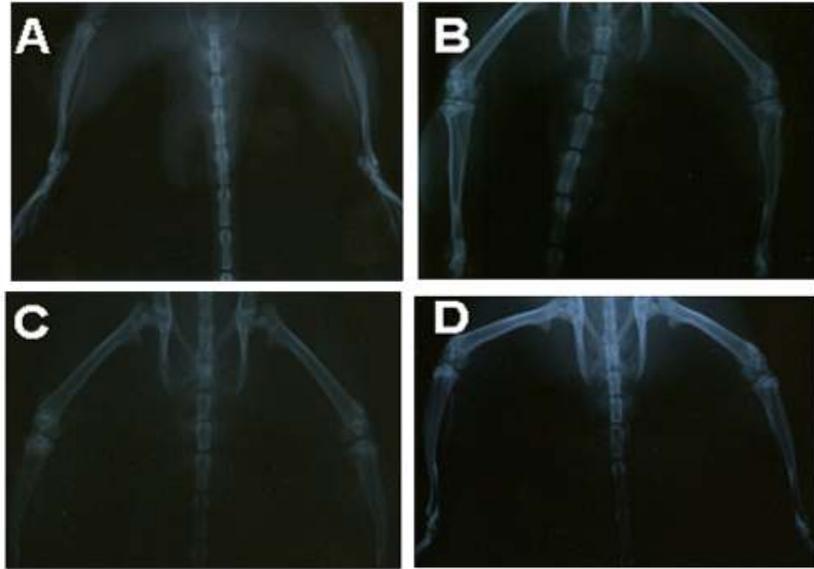


Figure 2-19. Effect of *Achyranthes Radix* on the radiological change in type II collagen induced arthritis models (A: Normal group, B: Group I, C: Group II, D: Group III).

라. 고 찰

의학과 과학기술의 발달로 인하여 인구의 고령화가 진행되고 있으며 이로 인해 여러 가지 난치성 질환이 문제점으로 대두되고 있는데, 그중 하나가 류마티스 관절염이다. 이 질환은 만성적인 염증질환으로 초기에는 관절부위 중 활막(synovial membrane)에 부종 및 동통을 초래하며 점차적으로 관절변형과 관절강직이 유발되는 질환이며, 여기서 활막은 관절액을 분비하고 관절에서 생기는 노폐물을 흡수하여 처분하는 얇은 막으로써, 보통 만성이라고 하는 것은 활막의 염증이 6주 이상 지속됨을 의미한다. 본 연구에서도 관절의 부종과 염증이 유지되는 것으로 보아 만성적인 류마티스 관절염이 지속되었음을 관찰할 수 있었다.

대부분의 류마티스 관절염 환자들은 약 30~40%의 유전적인 소인과 60~70%의 환경적인 요인들이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있으며, 지금까지 알려진 발병기전은 크게 항원-특이적 기전(Antigen-specific)과 항원-비특이적(non-antigen-specific)기전으로 나뉜다. 항원-특이적 기전은 T세포 항원이 바이러스나 세균에 의한 것으로 추측하고 있으며 특히 특이적인 주 조직 적합항원(Class II major histocompatibility complex, MHC)과 림프구 활성화에 관여하는 부수분자들이 발현되어 침윤된 T세포를 활성화시켜 자가항원과 교차반응을 하여 대식세포를 자극하여 관절염을 유도하게 되는 기전이다. 또한 항원-비특이적 기전에서 관절염의 발생은 감염이나 조직손상 및 예방접종 등과 같은 비특이적 자극이 대식세포를 활성화시키고, 활성화된 대식세포로부터 Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin 등의 사이토카인에 의해 수지상세포(Dendritic cell)의 분화가 유도되고, 수지상세포가 자가 항원을 자동반응 T세포(Autoreactive T cell)에 전달함으로써 T세포가 자극되어 관절염이 유도되는 기전이다.

본 연구에서 사용한 우슬(*Achyranthes Radix*)의 성분 중 Ecdysteroid는 곤충의 변태호르몬으로서 ecdysone(2 β , 3 β , 14 α , 22 [R] , 25-pentahydroxy-7-cholesten-6-one)과 20-hydroxyecdysone(2 β , 3 β , 14 α , 20 β , 22, 25-hexahydroxy-7-cholesten-6-one)과 관련된 polyhydroxyecdysteroids군을 형성하며 곤충의 성장 과정에서 짧은 기간에 생산과정이 시작되고 조절되기에 관련학자들에게 ecdysteroids의 동정과 정량에 대한 관심을 가져왔다. 비록 ecdysteroids가 곤충에서 분리되었지만 식물에 훨씬 많이 존재한다고 알려져 있어 몇 가지의 식물들은 ecdysteroids원으로 주목되고 있으며,

그 외에도 우슬의 여러 성분들은 항염증, 진통, 진경, 이뇨, 항알레르기 효과 외에 혈류개선 효과, 항산화작용으로 인한 항노화 효과가 있다고 알려지고 있다.

본 연구에서는 류마티스 관절염 모델 흰쥐를 대상으로 우슬추출물을 이용한 연고제를 실험적 중재방법으로 실시한 후 네 가지의 행동학적인 검사와 항염증과 진통효과에 중요한 역할매개체인 COX-2와 PGE₂의 발현양상을 관찰 및 평가하여 임상적 효용성을 위한 기초 자료로 제공하고자 실시하였다.

먼저 네 가지의 행동학적인 검사방법의 결과는 다음과 같다. 첫째로, 족 부종의 체적검사와 관절염 지수에서는 28일째에서 통계적으로 유의한 감소를 보였으며 ($p < .01$), 실험군 I 과 비교하여 볼 때 시간이 지남에 따라 실험군 II, III에서 통계적으로 유의한 족부의 염증반응 감소를 확인할 수 있었으며 ($p < .05$), 실험군 IV에서는 수치상으로 실험군 II, III보다 더 긍정적인 결과를 보이고 있다. 특히 이러한 염증반응 감소의 결과와 함께 관절염의 배측굴곡 및 저측굴곡 검사, 기계적 이질통 검사를 통하여 통증의 변화도 측정하였다. 배측굴곡 및 저측굴곡 통증지수 검사 결과에서는 28일째에 통계적으로 유의한 감소를 확인할 수 있었으며 ($p < .01$), 특히 실험군 IV에서는 수치상으로 실험군 II, III에 비하여 통증의 결과가 같거나 감소하는 경향을 보였다. 기계적 이질통 검사 결과에서는 유발 전에는 모든 실험군에서 hair의 높은 역치 값을 확인할 수 있었으나, 유발 후에는 모든 실험군에서 hair의 역치 값이 급격히 낮아짐을 볼 수 있었다. 이러한 이유는 족부의 염증과 통증이 심해짐에 따라 족부의 민감화를 초래하기 때문이라고 생각되어진다. 또한, 치료적 중재를 실시한 후 시간이 지날수록 족부의 역치 값이 증가하는 것으로 보아 염증과 통증반응이 감소되고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 28일째에는 hair의 역치 값이 통계적으로 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다 ($p < .01$). 결과적으로 우슬추출물을 이용한 크림제의 치료적 중재방법은 류마티스 관절염 흰쥐에서 염증과 통증반응의 감소에 효과적이었으며, 시간이 지날수록 더 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

한편 흰쥐의 슬관절 부위의 H & E 염색 결과, 관절연골의 파괴와 골침식 및 염증세포의 침윤 등 기타 염증의 소견이 관찰되었으며. 이는 류마티스 관절염이 유발되었다고 할 수 있다. 또한 실험종료 후 Safranin O-fast green 염색 결과, 실험 전에는 대퇴와 슬개골의 관절연골, 연골하 골조직, 활액막, 관절강 및 관절낭 등의 정상적인 조직소견을 볼 수 있었으나, 실험종료 후, 실험군 I 은 슬관절 부위의 활액막의

과다증식으로 인하여 염증 세포침윤과 과도한 섬유성 판누스(fibrous pannus)를 형성하고 있었으며, 이로 인하여 관절연골(articular cartilage), 연골하 골조직(subchondral bony tissue)이 심하게 파괴되었음을 관찰할 수 있었다. 반면, 실험군 II, III, IV에서는 만성 염증성 세포침윤과 활액막의 과다증식은 거의 보이지 않았으며, 섬유성 판누스의 형성, 관절연골의 파괴는 현저하게 감소함을 관찰할 수 있었다. 특히 골간단(metaphysis)부위에서는 골외막의 증식성 변화와 신생골조직의 증식도 관찰할 수 있었다. 이처럼 우슬 추출물이 염증과 통증반응의 감소에 지대한 영향을 주었고, 결과적으로는 행동학적인 기능수준의 향상을 가져올 것으로 사료된다.

우슬추출물은 COX-2의 억제를 유도하는 중재방법으로서, 주요 작용기전은 arachidonic acid 대사에서 cyclooxygenase(COX)를 억제하면 prostaglandin(PG)의 합성을 억제하게 되어 항염증효과를 나타낸다. COX-2는 LPS, tumor promoters, oncogenes, mitogens, hormones, cytokine과 성장인자와 같은 여러 종류의 자극에 반응하여 유도되며, 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관 이완과 혈관 신생성에도 관여한다. 그리고 PGE₂는 구심성 신경말단 수용체에서 bradykinin과 histamine 등과 반응하여 통증과 감각과민을 일으키고 부종, 강한 발열 및 혈관확장 등의 염증 반응을 일으키는 류마티스 관절염의 염증 반응에 가장 중요한 PG 중 하나이다. 신체에서 PGE₂는 신혈관 확장, 위산 분비억제, 평활근 이완 또는 수축, 혈관 투과성 증가, 통증 감수성 증가, 비만세포 매개물질 유리억제, 세포독성 억제, 대식세포에서 여러 염증 반응을 조절하는 역할을 하게 된다.

따라서 본 연구에서도 염증과 통증감소에 중요한 매개체인 COX-2와 PGE₂의 발현량을 관찰하였다. 실험종료 후 슬관절 조직의 COX-2의 면역조직화학적 염색결과, 실험군 I의 활막 부위에서 다발성의 양성 세포의 발현을 관찰할 수 있었으나, 치료적 중재를 실시한 실험군 II, III, IV의 활막 부위에서는 국소적으로 억제된 양성반응 세포의 발현이 관찰되었다. 이러한 결과는 류마티스 관절염의 슬관절 조직에서의 COX-2의 발현이 억제된다는 선행연구 결과와 일치하였다. 다음으로 혈청에

서의 PGE₂ 농도를 측정 한 검사 결과, 실험군 I의 농도는 유발 전(정상)과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하는 것($p < .001$)을 볼 수 있는 반면, 실험군 I의 농도와 비교하여 볼 때 치료적 중재를 실시한 실험군 II, III, IV의 농도는 통계학적으로 유의하게 감소함($p < .01$)을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 arachidonic acid 대사에서 COX를 억제하면 PG의 합성을 억제하게 되어 항염증 효과를 나타낸다.

이상의 연구 결과에 의하면 우슬 추출물은 류마티스 관절염 흰쥐에서 만성적 염증 및 통증반응을 악화시키는 COX-2, PGE₂ 발현을 효과적으로 억제시켰다. 이를 토대로 행동학적인 기능 수준의 향상을 기대할 수 있으며, 류마티스 관절염의 임상 활용에 타당성을 제공할 것으로 사료된다. 본 연구에서 얻어진 결과들은 실험동물을 대상으로 실시하였고, 여러 기전 중 염증과 통증과 관련된 세포의 신호 전달 체계의 변화를 관찰한 것이다. 따라서 부작용이 없는 더욱 다양한 성분을 이용한 치료제를 고려한 객관적인 임상적 연구가 다각적으로 이루어지면 류마티스 관절염의 새로운 치료적 중재 방향도 제시할 수 있으리라 사료된다.

제 3절 우슬 함유 경피 흡수 제제 제조

1. 경피흡수제

가. Hydrogel 제조방법

1) HPMC: 2.0, 정제수: 적량

2) Transcutol: 12.0, 우슬 엑스: 5.0

3) Methyl paraben: 0.5, Propyl paraben: 0.5

위의 1), 2), 3)을 각각 70℃에서 가온하면서 교반한 후 1)과 3)을 섞고 이를 다시 2)와 혼합하여 교반하여 제조하였다. 필요할 경우 Homogenizer를 이용하였다.



Figure 3-1. 우슬 엑스를 함유한 hydrogel

나. Cream 의 제조

1) 크림 제조 첨가물

Vaseline	60
Stearyl alcohol	200
PG	120
Caster oil	100
Tween 80	10
Methyl paraben	1
Propyl paraben	1
Mineral oil	100

2) 크림 제조 시 우슬 첨가량

우슬 엑스 5%	100.0
Ethanol	750
정제수	850

1)과 2)를 각각 70℃에서 가온하면서 교반 후 용융 상태에서 교반하면서 혼합하였으며 서서히 식혀 크림제를 제조 하였다.



Figure 3-2. Cream of *Archyranthes Radix* extract

다. Patch제의 제조

1) Patch제의 함유물

천연고무	30.0
Polyisobuthylene	30.0
우슬 엑스	5.0
Vaseline	20.0
resin	5.0
PEG	5.0
산화아연	2.0
BHT	1.0

우슬 함유 patch는 용융전포법을 사용하여 제조하였는데 박리지지체를 펴고 용융시킨 주성분과 기제 및 우슬 엑스를 녹인 액을 그 위로 전포하고 박리제를 부착시키는 방식으로 제조한다.

라. In vitro 피부 투과량 측정 실험

제제의 20-hydroecdysone의 피부 투과율을 관찰하기 위하여 먼저, Hairless mouse의 등 부위를 절개한 후 피하지방 및 모세혈관을 조심스럽게 제거한 후 사용하였다. 시험액은 0.1% NaCl을 사용하여 온도를 $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 를 유지하였고 셀 내의 교반속도는 600rpm으로 고정하였다. Franz modified diffusion cell에 피부를 장착한 뒤 겔을 피부에 도포하여 피부투과도를 측정하였다. 각 시간마다 0.2ml씩 채취하고 시험액을 동량 보충하였다. 측정 결과 주성분인 20-hydroecdysone을 피부투과를 실험한 결과 겔제에서 가장 높은 투과도를 나타내었으며, 크림제는 겔제에 비하여 약간 낮은 투과도를, 그리고 패치제의 경우는 가장 낮은 투과도를 나타내었다(Fig. 3-3).

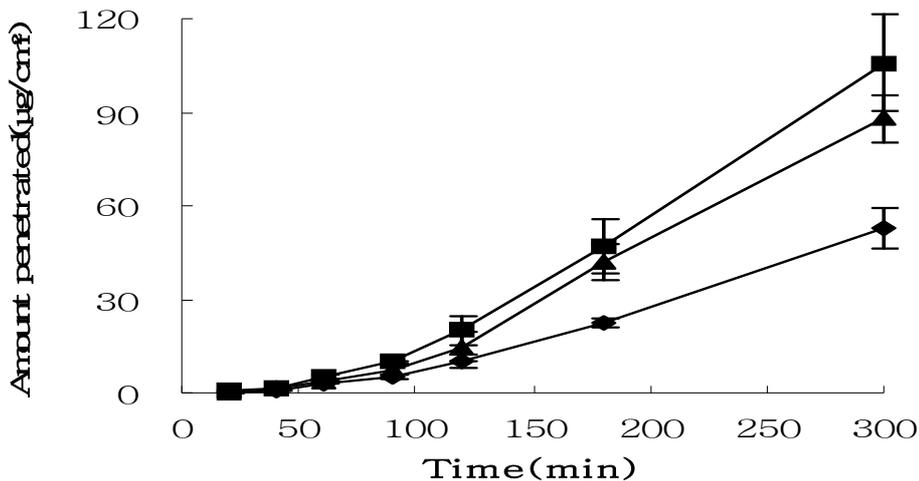


Figure 3-3. 시간에 따른 우슬 함유 제제의 피부투과도

마. 점도 및 유수분배 계수 측정 실험

겔의 외관은 투명한 상태로서 1400 mPa·s의 점도를 갖고 있으며, pH는 6.5를 유지하였다. 예비실험에서 약물 용해를 위하여 첨가된 Transcutol의 비율이 높을수록 겔의 투명도가 떨어짐에 따라 12 %로 고정하였고, 제조된 겔과 크림을 50 °C에서 6개월간 보관하였으나 뚜렷한 제제의 변화는 나타나지 않았다. 크림제의 점도는 2200 mPa·s의 점도를 갖고 있으며, pH는 6.9였으며 역시 6개월간 저장 조건에서 제제의 외관상 변형은 관찰되지 않았다.

Table 3-1. 제조된 제제의 점도 및 pH

Preparations	Hydrogel
점도(mPa·s)	1400 ± 250
PH	6.5 ± 0.3
Cream	2200 ± 380



Figure 3-4. 우슬 함유 patch제

바. 흡수촉진제제의 영향 평가

흡수촉진제로 다양한 종류를 시험하였다. 그 결과 Transcutol에서 가장 높은 투과도를 나타내었으므로 이를 기준으로 처방을 설정하였다. Table 3-2에 10시간 후 우슬 엑스의 투과량을 나타내었다.

Table 3-2. In vitro 상에서 10간 후 우슬 엑스의 투과량

Inhancer	투과량(ug/cm ²)
Transcutol	213 ± 34
Labrafil	189 ± 28
PEG 1500	185 ± 31
Propyleneglycol	172 ± 29

사. 점착력 시험

제조된 패취제의 인장강도를 측정하였다. 측정방법은 대한약전 규정에 따랐으며 정각박리 실험을 실시하였다. 제조된 패취의 점착력은 60.0gf/FS로 우수하게 나타나 제제로서 충분한 부착력을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

2. 경구투여제

가. 정제의 제조

우슬엑스를 함유한 정제를 제조하였다. 우슬의 함량은 5%로 하였으며 습식과립 방법으로 제조하였다. 처방은 다음과 같다. 주성분을 함유한 엑스를 정제수 적당량에 녹이고 부현제를 혼합하여 과립을 제조한 후 이를 건조하여 정립하고 활택제를 넣어 타정하였다. 타정은 약 350g으로 하였으며 여러 가지 실험을 통하여 정제를 평가하였다.

우슬엑스	5.0
Lactose	40.0
Starch	15.0
S. paste	10.0
Sodiumbicarbonate	3.0
Ascorbic acid	5.0
Talc	2.0
정제수	적량



Figure 3-5. 우슬 엑스를 함유한 정제제

나. 중량편차 실험

타정된 정제의 중량을 측정하여 분포를 평가하였다. 정제의 중량은 $353 \pm 15\text{g}$ 으로 제조규정에 적합하였다.

다. 마손도 측정

제조된 정제의 마손도는 5%로 규정인 8% 미만의 규정에 적합하였다.

라. 붕해시험

제조된 정제의 붕해시간은 19 ± 3 분으로 30분 이하라는 규정에 적합하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발 목표의 달성도

본 연구를 수행한 결과 국내 농가의 고소득 대체작물로서, 생약자원(우슬: *Achyranthes Radix*)을 이용하여, 생체 기능성 물질을 탐색 및 추출, 연골세포의 산화적 스트레스에 의한 우슬의 항산화 효과, 임상 동물 모델인 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염에서의 항관절염과 항염증 효과 및 연고 제조와 기능성 음료 제조를 성공적으로 수행하였다.

60세도 별로 노령으로 생각되지 않는 고령화 사회에서 노인들에게 심각한 활동 제한을 가져오게 하는 퇴행성 관절염은 외국에서는 이미 많은 관심을 모으고 있고 국내에서도 활발한 연구가 진행되고 있다. 관절염으로 고생하는 노인인구를 부양하기 위하여, 사회, 경제적으로도 많은 비용이 소모될 것이 예상된다.

본 연구과제를 통해 1차년도에 우슬에 대한 성분 특성 조사 및 추출용매를 선택하여 주요 성분 추출을 하였고, 연골세포 배양법을 확립하여 세포배양한 후에 우슬을 처리하여 세포 증식에 미치는 영향과 산화적 손상을 유발시킨 후 우슬을 처리시 염증유발물의 감소를 확인할 수 있었다.

2차년도에는 1차년도 연구개발을 토대로 우슬의 기능성 음료를 제조하여 우슬 추출물이 함유된 기능성 음료의 제품화를 달성하였다. 우슬 추출물이 함유된 연고제를 제조하여, 퇴행성 관절염과 류마티스 관절염 모델에서 염증성 물질, 관절염으로 인한 부종률, 행동반응평가, 혈액학적 검사, 조직병리학적 방법을 이용한 우슬 추출물이 함유된 크림제의 관절염에 대한 효능을 평가하였다. 이와 같은 연구 결과는 관절염의 치료 및 예방에 생약재인 우슬을 이용할 수 있는 가능성을 부여하며, 의미하는 바가 아주 클 것으로 사료된다.

제 2절 관련 분야에의 기여도

본 연구를 성공적으로 수행한 결과 생약재 산업화는 생물자원의 다양성 확보와 이들 자원을 기능성 식품 및 제약 산업으로 발달시켜 농촌의 생약재배 활성화에도 일조할 것이다. 또한 우슬 생약추출물이 함유된 항관절염 치료 연고제 개발 및 천연물로부터 추출한 기능성 음료 개발이라는 total know-how 축적을 통해 이후 개발될 생약추출물을 이용한 고부가가치 제품화를 위한 농업활성화 기반 자원으로 활용 가능성 제시하였다.

우슬 추출물을 가지고 항관절염 효과에 대한 연구가 전무한 실정에서 지역 내 잉여 우슬을 가지고 고부가가치상품으로 제품화한다면 지역 생약 재배 농민들에게도 경제적 수익증대가 예상되며, 판매활성화로 약용식물 재배자(생약 조합원 및 농가), 유통 등 연관 분야 파급효과가 클 것으로 보여지며, 우리 농산물을 건강기능성 원료·성분으로 등록 수행이 가능하다.

우리 농산물의 건강기능성에 대한 과학적인 연구를 통하여 국산 원료를 사용한 건강기능식품에 대한 소비 확대와 부가가치 제고가 가능하다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

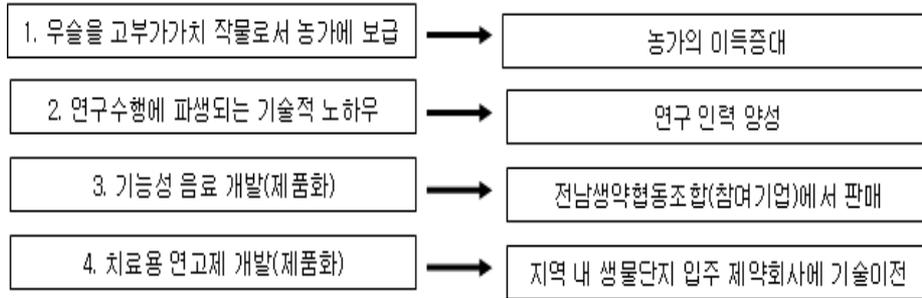
제 1절 활용방안

우슬은 한국에서 생산된 것이 효능이 우수한 것으로 알려져 있으며, 세계적으로도 관절염 치료에 대한 화학약품보다 생약성분에 대한 수요가 증가하고 있는 추세이다. 특히 생약성분이 함유된 기능성 물질은 건강한 생활을 즐기려는 사람들에게 더 많은 관심의 대상이 되고 있다. 특히 현대인에게 발생하기 쉬운 여러 가지 퇴행성 질환에 대한 치료 및 예방 대책으로 우슬과 같은 기능성 물질의 응용은 더욱 증가할 것으로 보여진다. 또한 본 연구개발 결과 제조된 우슬 연고제의 활용분야 및 방법, 범위는 의약품의 개념보다는 독성이 없이 관절염을 조절할 수 있는 인체 친화적이고 안정성이 있는 것으로 보며, 비록 효능은 합성제재 보다는 약하더라도 의약부외품이나 식품으로 치료보조제로서 활용할 계획이다.

또한 생약재를 다량 확보하기 위해 지역 내 약용작물의 생산기반을 구축으로 한 고부가가치 농업작물로서 활용할 수 있다고 확신한다.

본 연구를 통해 우리 고유 농산물인 우슬의 생리활성 성분을 분리하는 방법을 확립하고, 대량 생산을 위한 기초 자료를 제공하였다. 또한 기능성 성분의 분자량 및 구조를 확인하는 방법을 통하여 다양한 종류의 새로운 기능성 성분의 탐색을 가능케 할 것이다. 또한 물리화학적 처리에 의한 다양한 기능성 성분의 추출 및 분석은 새로운 분야의 학문적 기초 자료를 제공하였다. 따라서 우슬은 항산화 및 항염증제로서 활용 될 수 있기에 여러 용도의 식품이나 의약품으로서의 응용연구가 가능할 것으로 기대된다.

추출 및 분획, 제형 등의 공정을 개선하고, 새로운 기능성 물질을 제조할 수 있기 위해서는 이들 관련 제품의 표준화 및 규격화로 인한 유통망이 확보 또는 개선을 통해 지역 내 생약자원 산업의 발전을 위한 기초를 마련한다.



제 2절 산업화 추진방안

우슬의 기능성 활용을 위한 산업은 현재 농가 차원에서도 다양한 재배방법이 실용화되어 우슬의 생산기술이 개발되어가고 있기 때문에 신 기능성 자원으로서의 활용방안이 제시된다면 농가소득증대 및 식·약품 산업으로서 혈액 순환제, 관절염 치료제, 기능성 음료 등으로 개발되어 농가 소득증대의 일익을 담당할 수 있다.

현재 본 협동기관에서는 여러 외용기제 중 생약 추출물의 경피(transdermal) 흡수성을 높이기 한 연구가 진행되고 있으며, 따라서 본 연구에서 우슬에서 추출 및 분획한 항관절염 효능을 지닌 성분을 연고화하여 제조한 후 농도에 따른 점도, 안정성, 마우스를 이용한 피부투과 실험 및 피부 내 약물을 측정하여 외용제로 개발할 수 있다. 다기능성 음료를 개발함으로써 우슬의 부가가치를 높여 농가소득 증대에 기여하며, 양질의 우슬 재배와 더불어 지역 생약재 산업의 경쟁력을 높이고자 한다. 또한 생약재의 수급 및 가격안정을 확보하여 지속적으로 농가소득 증대를 가져올 수 있다. 현재까지 기술개발로 인한 국내 전문 학술지에 발표하였으며, 논문 발표를 통해 우슬의 성분 조성 함량, 기능성 물질 생산, 생리활성효능 입증자료를 확보함과 동시에 향후 본격적인 우슬 관련 제품생산 및 산업화를 시도할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 건강하고 쾌적한 삶(웰빙)을 유지하기 위해 직접적인 먹거리 분야에서부터 간접적으로 질병 예방과 건강 유지를 위한 기능성 식음료까지 우리 주위에 다양한 수요를 증가시키고 있다. 또한 기능성 식음료에서부터 천연물을 이용한 생약제를 개발하기 위한 많은 연구들이 시행되고 있다. 이러한 관점에서 볼때 자연에서 생산되는 우리 농산물로부터의 천연물질 추출 또는 활용의 가능성은 매우 크다. 더욱이 현재 국내에서 생산되는 우슬과 같은 약용식물은 중국산과 비교가 불가능 할 만큼 질적인 면에서 우수하다고 생각되며, 한약재료의 재배와 그 성분 활용 기술의 개발이 무엇보다 중요하다고 생각된다.

현재 국내에서 브랜드화된 대표적 농업 생산품은 인삼류 외에 거의 없다고 볼수 있으며, 국내 기후와 토양 조건으로 볼때 약용작물을 재배하는데 매우 적합한 조건을 갖추었다. 따라서 우슬과 같은 약용작물에 대한 연구를 수행하여 세계적인 고부가가치 상품을 개발해야할 필요성이 있다.

현재 미국, 중국, 일본 등에서의 전체 관절염 환자 중 40% 이상이 식이요법을 포함한 대체 의학에 의존하고 있다. 최근에 미국 식품 의약 및 안전국이 셀레브렉스 같은 항염증제의 위험성을 소비자에게 경고한 후에는 대체 의학 치료로 눈길을 돌리는 환자의 수가 증가하고 있는 실정이다. 최근 미국 국립 보건국 연구진은 동 연구 성과를 Arthritis & Rheumatism에 발표한 논문에서 제로 아스피린이 개발되기 전에 버드나무 껍질이 관절염 증상 완화 치료에 사용된 것처럼, 심황 열대성 작물의 뿌리에 함유된 물질을 이용하면 관절 염증 및 관절 손상 치료에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 보인다고 주장하였다. 실험 쥐를 통한 실험을 통하여 생강과의 꽃을 피우는 식물인 심황이 관절염 증상 완화에 도움이 된다는 연구 결과를 제시하였다. 심황 추출물이 급성 및 만성 관절염을 예방하며 관절염으로 인한 관절 손상도 예방할 수 있을 것으로 기대하고 있는데, 음식을 통하여 심황을 섭취하면 현재 특정한 단백질의 작용에 초점을 맞춘 관절염 치료제와 동일한 치료 효과를 볼 수 있

을 것으로 해석하고 있다.

일본에서는 약리 활성물질과 관련된 연구가 진행되고 있는데 우슬이 강한 알레르기 및 항종양 활성을 보였다고 하였으며, 1996년에 특히 HT-116 및 B16-F10에 대해 강한 세포독성 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 우슬은 진통작용, 혈압강화작용, 고혈압, 관절염 및 관절통과 같은 울혈의 치료제, 이뇨 및 강장제 등의 치료 및 민간요법으로 사용되고 있다. 우슬은 본 연구를 통해 나온 관절염 효과 외에 혈류개선 효과와 항산화작용으로 인한 항노화 효과가 있다고 알려져 있다.

따라서 우슬과 같은 자연에서 생산 및 재배가 가능한 생약성분을 사용하는 건강을 위한 기능성 물질의 필요성이 강조된다는 현 시점에서 볼때 우슬에서 기능성 성분을 추출하여 만든 제품의 공급은 국제적 차원에서도 사회적 요구에 부응한다고 볼 수 있다.

제 7 장 참고문헌

1. 김동수, 송창호, 이수근. (1998). Acanthopanax추출물이 마우스에서 collagen induced arthritis 유발에 미치는 영향. 대한 소아과학회, 41(2); 247-254.
2. 도원석, 김경호, 김갑성. (2001). 유백피, 계지, 우슬, 봉독 및 우황, 옹담, 사향복 잡제 약침이 mouse의 LPS 유발 관절염의 혈액학적 변화에 미치는 영향. 대한침구학회지, 18(1); 157-169.
3. 박일성, 노성만, 송은규, 박창수, 양동현, 김용욱. (1994). Collagenase로 유발한 백서 슬관절의 퇴행성 병변에 관한 형태학적 연구. 대한관절염학회. 대한관절염학회지, 6; 3-15.
4. 손건호, 황지현, 이승호, 박정일, 강신정, 장승엽, 이경순. (1999). 우슬로부터 20-Hydroxyecdysone의 분리 및 함량분석. 생약학회지, 30(3); 335-339.
5. 유호상. (2000). 관절염에 관한 한의학 석.박논문 73편에 대한 분석. 대전대학교 석사학위논문.
6. 육창수. (1989). 원색 한국 약용 식물도감. 서울; 아카데미서적, 175.
7. 윤형란. (2000). 류마티스 관절염 치료 시 비스테로이드성 소염제 단독, 위장관 부작용 예방 약제 병용 투여 및 COX-2 특이 억제제 사용의 비용-효과 분석. 한양대학교 박사학위논문.
8. 이승덕, 김갑성. (1999). 우슬 및 봉독약침이 생쥐의 LPS유발관절염의 세포성면역반응에 미치는 영향. 침구학회지, 16(3); 287-315.
9. 이승택, 채영암. (1996). 약용작물재배. 서울: 향문사. 159-1625.
10. 이유선. (2007). 류마티스 관절염 동물 모델에서 curcumin의 예방 및 치료 효과. 충남대학교 대학원 박사학위 청구논문.
11. 이윤숙. (2003). 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 NSAIDs의 말초 진통 효과와 Cyclooxygenase-1과 Cyclooxygenase-2의 발현. 고려대학교 박사학위논문.
12. 이한섭. (2001). 키토산 연고의 수용성 비타민 B₂(Ribokalvin)의 경피투과. Bull Nat Sci, Yong-In Univ, 6(1); 1-7.
13. 한갑이. (2006). 파극천에서 분리한 Monotropein의 FCA로 유도된 관절염 흰쥐의 산화적 스트레스에 미치는 저해효과. 경성대학교 석사 학위 논문.

14. 황중순. (2005). 유근피약침액이 Mouse 관절의 염증과 인지질 활성화에 미치는 영향. 동국대학교 석사 학위 논문.
15. ACR AD. (1996). Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(5); 713-722.
16. Akhtar MS, Iqbal J. (1991). Evaluation of the hypoglycemic effects of *Achyranthes aspera* in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol*, 31(1); 49-57.
17. Arend WP. (2001). Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 45(1); 101-106.
18. Bae SC, Corzillius M, Kuntz KM, Liang MH. (2003). Cost-effectiveness of low dose corticosteroids versus non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 specific inhibitors in the long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 42; 46-53.
19. Beehler BC, Hei YJ, Chen S, Lupisella JA, Ostrowski J, Starrett JE, Tortolani D, Tramosch KM, Reczek PR. (2003). Inhibition of disease progression by a novel retinoid antagonist in animal models of arthritis. *J Rheumatol*, 30(2); 355-363.
20. Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Struebe M. (1996). Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett*, 30; 165-169.
21. Boissier MC, Bessis N. (2004). Therapeutic gene transfer for rheumatoid arthritis. *Reumatismo*, 56(1); 51-61.
22. Bonney RC. (2001). Treating autoimmune diseases: The market potential for new therapeutic options. *PJPBJB Publication*, 1-244.
23. Brahn E, Tang C, Banquerigo ML. (1994). Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. *Arthritis Rheum*, 37; 839-845.
24. Burckhardt CS. (1985). The impact of arthritis on quality of life. *Nursing Research*, 34(1); 11-16.
25. Caccese RG, Zimmermann JL, Carlson RP. (1992). Bacterial

- lipopolysaccharide potentiates type II collagen-induced arthritis in mice. *Mediat Inflamm*, 1;273.
26. Campion M. (1998). Hydrotherapy principles and practice. In *Rheumatic Diseases*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 3-13.
27. Cannon GW. (1999). Cyclooxygenase-2 selective inhibitors. *Drugs Today(Barc)*, 35(7); 487-496.
28. Cashman JN. (1996). The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*, 52 (Suppl 5); 13-23.
29. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53; 55-63.
30. Chen Q, Wei W. (2003). Effects mechanisms of glucosides of *chaenomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in rats. *Int Immunopharmacol*, 3(4); 593-608.
31. Colpaert FC. (1987). Evidence that adjuvant arthritis in the rat is associated with chronic pain. *Pain*, 28; 201-222.
32. Couture R, Cuello AC. (1984). Studies on the trigeminal antidromic vasodilation and plasma extravasation in the rat. *J Physiol*, 346; 273-285.
33. Cremer MA, Hernandez AD, Townes AS, Stuart JM, Kang AH. (1983). Collagen-induced arthritis in rats: antigen-specific suppression of arthritis and immunity by intravenously injected native type II collagen. *J Immunol*, 131; 2995-3000.
34. Cryer B, Feldman M. (1998). Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104; 413-421.
35. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Muià C, Crisafulli C, Dugo L, Collin M, Britti D. (2006). Glycogen synthase kinase-3beta inhibition attenuates the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Clin Immunol*, 120(1); 57-67.

36. Cuzzocrea S, Ayroldi E, Di Paola R, Agostini M, Mazzon E, Bruscoli S, Genovese T, Ronchetti S, Caputi AP, Riccardi C. (2005). Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. *FASEB J*, 19(10); 1253–1265.
37. Davis B, Harisson A. (1988). *Hydrotherapy in practice*. 1st edn. Churchill Livingstone.
38. Dray A, Urban L, Dickenson A. (1994). Pharmacology of pain. *Trends in Pharmacol Sci*, 15; 190–197.
39. Driver S, O'connor J, Lox C, Rees K. (2004). Evaluation of an aquatics programme on fitness parameters of individuals with a brain injury. *Brain Inj*, 18(9); 847–859.
40. Drower EJ, Stapelfeld A, Mueller RA, Hammond DL. (1987). The antinociceptive effects of prostaglandin antagonists in the rat. *Eur J Pharmacol*, 133(3); 249–256.
41. Euchenhofer C, Maihöfner C, Brune K, Tegeder I, Geisslinger G. (1998). Differential effect of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS 398 and diclofenac on formalin-induced nociception in the rat. *Neurosci Lett*, 248(1); 25–28.
42. Feldman M, McMahon AT. (2000). Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastro-intestinal toxicity. *Ann Intern Med*, 132(2); 134–143.
43. Ferrell WR, Russell NJW. (1986). Extravasation in knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anesthetized cat. *J Physiol*, 379; 407–416.
44. Firestein GS. (1996). Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis Passive responders or transformed aggressors. *Arthritis Rheum*, 39(11); 1781–1790.
45. Firestein GS, Zvaifler NJ. (2002). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanism from beginning to end.

- Arthritis Rheum, 46(2); 298–308.
46. Fosslien E. (1998). Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci*, 28; 67–81.
 47. Fox DA. (1997). The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum*, 40(4); 598–609.
 48. Frolich JC. (1995). Prostaglandin endoperoxide synthetase isoenzymes: the clinical relevance of selective inhibition. *Ann Rheum Dis*, 54; 942–943.
 49. Gabriel H, Rothe G, Korpys M, Schmitz G, Kindermann W. (1997). Enhanced expression of HLA-DR, Fc gamma receptor 1 (CD64) and leukocyte common antigen (CD4+5) indicate activation of monocytes in regenerative training periods of endurance athletes. *International Journal of Sport Medicine*, 18(2); 136–141.
 50. Goldring SR. (2002). Pathogenesis of bone erosion in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 14; 406–410.
 51. Groszmann RJ. (1993). Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 17(2): S38–40.
 52. Han DR, Lee MW. (1991). Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (I) oleanolic acid bisdesmoside from the root. *Yakhak Heoji*, 35; 457–460.
 53. Han SB, Lee CW, Yoon YD, Lee JH, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Lee K, Park SK, Kim HM. (2005). Prevention of arthritic inflammation using an oriental herbal combination BDX-1 isolated from *Achyranthes bidentata* and *Atractylodes japonica*. *Arch Pharm Res*, 28(8); 902–908.
 54. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK, Mukhtar H. (1999). Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 4524–4529.
 55. Hawkey CJ. (2001). COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 15; 801–820.
 56. Hughes C, Wolos JA, Giannini EH, Hirsch R. (1994). Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol*, 153; 3319–3325.

57. Hürlimann D, Enseleit F, Ruschitzka F. (2004). Rheumatoid arthritis, inflammation, and atherosclerosis. *Herz*, 29(8); 760–768.
58. Ida Y, Satoh Y, Katoh M, Katsumata M, Nagasao M, Yamaguchi K, Kamei H, Shoji J. (1994). Achyranthosides A and B, novel cytotoxic saponins from *Achyranthes fauriei* root. *Tetrahedron Lett*, 35; 6887–6890.
- Johnson JA, Repp EC. (1984). Nonpharmacologic pain management in arthritis. *Nurs Clin North Am*, 19(4); 583–591.
59. Joosten LA, Lubberts E, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ. (1997). Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, 40; 249–260.
60. Kapoor M, Kojima F, Yang L, Crofford LJ. (2007). Sequential induction of pro- and anti-inflammatory prostaglandins and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma during normal wound healing: a time course study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 76(2); 103–112.
61. Kim JS. (2000). The current status of Koreans coronary heart disease In *Diagnosis and treatment in hyperlipidemia association of hyperlipidemic therapy*. Haneuyhak, Seoul, p; 64–74.
62. Kim KS, Seung NS, Kim MW, Pyo BS, Hwang B. (1997). Micropropagation of *Achyranthes japonica* Through Axillary Buds Culture. *Korean J Plant Tissue Culture*, 24; 357–360.
63. Korotkova M, Westman M, Gheorghe KR, Klint E, Trollmo C, Ulfgren AK, Klareskog L, Jakobsson PJ. (2005). Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum*, 52(11); 3439–3447.
64. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2005). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, PA(7th edition): Elsevier Inc.
65. Kutuk O, Basaga H. (2003). Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med*, 9(12); 549–557.

66. Lee SJ, Son KH, Jang HU, Kang SS, Park BU, Kwak YJ, Han CK, Kim HP. (1994). Development of plant anti-inflammatory agents: Comparison of anti-inflammatory and analgesic activities of extracts from *Lonicera japonica*. *Kor J Pharmacogn*, 25(4); 363–367.
67. Liu HX, Tian JB, Luo F, Jiang YH, Deng ZG, Xiong L, Liu C, Wang JS, Han JS. (2007). Repeated 100 Hz TENS for the Treatment of Chronic Inflammatory Hyperalgesia and Suppression of Spinal Release of Substance P in Monoarthritic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 4(1); 65–75.
68. Lu T, Mao C, Zhang L, Xu W. (1997). The research on analgesic and anti-inflammatory action of different processed products of *Achyranthes bidentata*. *Zhong Yao Cai*, 20(10); 507–509.
69. Ma A, Guo H. (1998). Study of old-age-resistant function of *Radix Achyranthes Bidentatae*. *Zhong Yao Cai*, 21(7); 360–362.
70. Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S, Goto T. (2003). Calcineurin inhibitors exert rapid reduction of inflammatory pain in rat adjuvant-induced arthritis. *Br J Pharmacol*, 139(5); 927–934.
71. Malmberg AB, Yaksh TL. (1992). Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 263(1); 136–146.
72. Marcus BH, King TK, Clark MM, Pinto BM, Bock BC. (1996). Theories and techniques for promoting activity behaviours. *Sports Med*, 22; 321–331.
73. Matsuura M, Imayoshi T, Okumoto T. (2000). Effect of FTY720, a novel immunosuppressant, on adjuvant and collagen-induced arthritis in rats. *Int J Imm*, 22; 323–331.
74. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R. (2000). Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med*, 21; 21–24.
75. Maxis K, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Duval N, Lajeunesse D. (2006). The shunt from the cyclooxygenase to lipoxygenase pathway in

- human osteoarthritic subchondral osteoblasts is linked with a variable expression of the 5-lipoxygenase-activating protein. *Arthritis Res Ther*, 8(6); R181.
76. McCartney-Francis NL, Chan J, Wahl SM. (2003). Inflammatory joint disease: clinical, histological, and molecular parameters of acute and chronic inflammation and tissue destruction. *Methods Mol Biol*, 225; 147-159.
77. McNeal RP. (1990). Aquatic therapy for patient with rheumatic disease. *Rheumatic Disease Clinical North American*, 18(4); 915-929.
78. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. (1994). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90; 11693-11697.
79. Morgan ED, Poole CF. (1976). The formation of trimethylsilyl ethers of ecdysones. A reappraisal. *J Chromatogr*, 116(2); 333-341.
80. Morgan K, Clague RB, Reynolds I, and Davis M. (1993). Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *British J Rheumatol*, 32; 333-335.
81. Nembo B, Duie P, Garcia M, Breton P, Gayral P, Porcheron P, Goudey-Perriere F. (1993). Levels of ecdysteroid-like material in adults of *Nippostrongylus brasiliensis* during the intestinal phase. *J Helminthol*, 67(4); 305-315.
82. Nieman DC, Berk LS, Simpson-Westerberg M, Arabatzis K, Youngberg S, Tan SA, Lee JW, Eby WC. (1989). Effects of long-endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners. *International Journal of Sport Medicine*, 10; 317-323.
83. Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Warren BJ, Davis JM, Fagoaga OR, Nehlsen-Cannarella SL. (1997). Vitamin C supplementation does not alter the immune response to 2.5 hours of running. *International Journal of Sport Nutrition*, 7(3); 173-184.
84. Ochi T, Yamane-Sugiyama A, Ohkubo Y, Sakane K, Tanaka H. (2001). The anti-inflammatory effect of FR188582, a highly selective inhibitor of cyclooxygenase-2, with an ulcerogenic sparing effect in rats. *Jpn J Pharmacol*,

85(2); 175–182.

85. Ogawa S, Nishimoto N, Okamoto N, Takemoto T. (1971). Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (VIII). The inset–moulting substances in *Achyranthes* genus. *Yakugaku Zasshi*, 91; 916–920.

86. Olszanecki R, Gebska A, Korbut R. (2006). Production of prostacyclin and prostaglandin E2 in resting and IL–1beta–stimulated A549, HUVEC and hybrid EA.HY 926 cells. *J Physiol Pharmacol*, 57(4); 649–660.

87. Pearson C. (1993). Experimental joint disease; Observations on adjuvant–induced arthritis. *J Chronic Dis*, 16; 863–874.

88. Raynor MW, Kithinji JP, Barker IK, Bartle KD, Wilson ID. (1988). Supercritical fluid chromatography of ecdysteroids. *J Chrom*, 436; 497–502.

89. Rothketter HJ, Pabst R, Bailey M. (1999). Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno immunopath*, 72; 157–165.

90. Schmelzer KR, Inceoglu B, Kubala L, Kim IH, Jinks SL, Eiserich JP, Hammock BD. (2006). Enhancement of antinociception by coadministration of nonsteroidal anti–inflammatory drugs and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(37); 13646–13651.

91. Schrey MP, Patel KV. (1995). Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators. *Br J Cancer*, 72; 1412.

92. Shavit Y, Terman GW, Martin FC, Lewis JW, Liebeskind JC. (1985). Stress, opioid peptides, the immune system, and cancer. *Journal of immunology*, 135; 834S–837S.

93. Shimizu I, Iida T, Guan Y, Zhao C, Raja SN, Jarvis MF, Cockayne DA, Caterina MJ. (2005). Enhanced thermal avoidance in mice lacking the ATP receptor P2X3. *Pain*, 116(1–2); 96–108.

94. Son KH, Hwang JH, Lee SH, Park JH. (1999). Isolation and quantitative determination of 20–hydroxyecdysone from *Achyranthis radix*. *Kor J Pharmacogn*,

30: 355–339.

95. Spangler RS. (1996). Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy. *Semin Arthritis Rheum*, 26(1); 435–446.

96. Stoerk HC, Bielinski LC, Budzilovich T. (1954). Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants. *Am J Pathol*, 30; 616.

97. Summary Report of the Cause of Death Statistics. (2002). Korean National Statistical Office.

98. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res*, 480–481; 243–268.

99. Sweeney SE, Firestein GS. (2004). Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(3); 372–378.

100. Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N, Hirayama H, Taniguchi S. (1968). Studies on the constituents of *Achyranthis radix* VII. The insert-moulting substances in *Achyranthes* and *Cyathula* genera "supplement". *Yakugaku Zasshi*, 88; 1293–1297.

101. Takemoto T, Ogawa S, Nishimoto N, Yen KY, Abe K. (1967). The isolation of ecdysterone from the radix of *Achyranthes obtusifolia* lam. *Yakugaku Zasshi*, 87(12); 1521–1523.

102. Thomas R, Lipsky PE. (1996). Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 39(2); 183–190.

103. Thompson SJ, Thompson HS, Harper N, Day MJ, Coad AJ, Elson CJ, Staines NA. (1993). Prevention of pristane-induced arthritis by the oral administration of type II collagen. *Immunology*, 79(1); 152–157.

104. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5);

705–716.

105. Turull A, Queralt J. (2001). Changes in prostaglandin E2 (PGE2) levels in paw exudate, stomach and kidney of arthritic rats: effects of flosulide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 66(1); 27–37.
106. Turull A, Queralt J. (2000). Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors reduce anti-Mycobacterium antibodies in adjuvant arthritic rats. *Immunopharmacology*, 46(1); 71–77.
107. Van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*, 4(2); 87–93.
108. Van Lent Holthuysen AEM, van den Bersselaar LAM, van Rooijen N, Joosten LAB, van de Loo FJ, van de Putte LBA, van den Berg WB. (1996). Phagocytic lining cells determine local expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 39; 1545–1555.
109. Vane JR. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. *Nature*, 231; 232–235.
110. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. (2002). Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res*, 35(11); 1389–1394.
111. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. (1995). Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63; 289–302.
112. Wells WE. (1993). A review of the chronic pain syndromes : etiology, transmission and treatment. *Crna*, 4; 187–198.
113. Wilder RP, Brennan DK. (1993). Physiological response to deep water running in athletes. *Sports Medicine*, 16; 374–380.
114. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1963). Anti-inflammatory and antipyretic activities of indomethacin, 1-(p-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid. *J Pharmacol Exp Ther*, 141; 369–376.

115. Xie F, Li X, Sun K, Chu Y, Cao H, Chen N, Wang W, Liu M, Liu W, Mao D. (2001). An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage. *J Tradit Chin Med*, 21(3); 225–231.
116. Yang JH, Kim DK, Yun MY, Kim TY, Shin SC. (2006). Transdermal delivery system of triamcinolone acetonide from a gel using phonophoresis. *Arch Pharm Res*, 29(5); 412–417.
117. Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM, Min W. (2002). Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*, 5(5Pt1); 547–554.
118. You JH, Lee KK, Chan TY, Lau WH, Han FK. (2002). Arthritis treatment in Hong Kong cost analysis of celecoxib versus conventional NSAIDS, with or without gastroprotective agents. *Aliment Pharmacol Ther*, 16(12); 2089–2096.
119. Yu S, Zhang Y. (1995). Effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides (ABP) on antitumor activity and immune function of S180-bearing mice. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 17(4); 275–278.
120. Zimmer Z, Hickey T, Searle MS. (1995). Activity participation and well-being among older people with arthritis. *Gerontologist*, 35(4); 463–471.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.