

원 저

퇴행性關節炎 치료제 개발을 위한 수종의 한약재 활성 검색 및 기전연구

허정은¹⁾, 조은미¹⁾, 양하루¹⁾, 김대성¹⁾, 백용현, 이재동, 최도영, 박동석

경희대학교 부속한방병원 침구학교실
경희대학교 골관절질환 한방연구센터¹⁾

The Study on the Effectiveness and Mechanism of Several Herbal Medicines for Development of Osteoarthritis Treatment.

Jeong-Eun Huh¹⁾, Eun-Mi Cho¹⁾, Ha-Ru Yang¹⁾, Dae-Sung Kim¹⁾,
Yong-Hyeon Baek, Jae-Dong Lee, Do-Young Choi, Dong-Suk Park

Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical Hospital, Kyung-Hee University
Oriental Medicine Research Center for Bone & Joint Disease¹⁾

Objectives : Articular cartilage is a potential target for drugs designed to inhibit the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) to stop or slow the destruction of the proteoglycan and collagen in the cartilage extracellular matrix. The purpose of this study was to investigate the effects of KHBJs for cartilage-protective effect in human and rabbit articular cartilage explants.

Methods : The cartilage-protective effects of KHBJ were evaluated by using glycosaminoglycan degradation assay, collagen degradation assay, colorimetric analysis of MMPs activity, and histological analysis in rabbit and human cartilage explants culture.

Results : KHBJs significantly inhibited GAG and collagen release of rabbit and human cartilage explant in a concentration-dependent manner. Also, KHBJs inhibited MMP-3 and MMP-13 activities from IL-1 α -treated cartilage explants cultures. Histological analysis indicated that KHBJ004 reduced the degradation of the cartilage matrix compared with that of IL-1 α -treated cartilage explants. KHBJ004 had no harmful effect on chondrocytes viability or cartilage morphology in cartilage explants.

Conclusions : These results indicate that KHBJs inhibits the degradation of proteoglycan and collagen through the downregulation of MMP-3 and MMP-13 activities without affecting the viability or morphology of IL-1 α -stimulated rabbit and human articular cartilage explants.

Key Words: Cartilage, proteoglycan, collagen, matrix metalloproteinase, KHBJs

· 접수 : 2006년 2월 8일 · 논문심사 : 2006년 2월 18일
· 채택 : 2006년 2월 22일
· 교신저자 : 박동석, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 부속한방병원 침구학교실.
(Tel : 02-958-9206 E-mail: dspark@yahoo.co.kr)

· 본 논문은 보건복지부 특정센터연구의 지원에 의하여 연구되었음(사업명: 한방치료기술 연구개발사업, 고유번호: B030008).

緒 論

퇴행성관절염(osteoarthritis, OA)은 말초 및 축골격의 주로 체중이 부하되는 관절에 영향을 주어 통증 유발, 활동의 제약, 체형변형 등이 유발되는 가장 일

반적인 관절질환이다¹³⁾.

OA는 가장 빈발하는 관절염 질환으로 전 인구의 12~15%가 환자군으로 분류되며, 대부분 55세 전후로 발명하여 전진적으로 악화되는 질환이다. 임상적 증상으로는 무릎, 허리 및 수지의 침범된 관절형상과 관절주위의 심한 동통이 수반된다. 또한, 조직강직, 켈링현상 및 압통, 골팽대, 염발음 및 운동범위의 장애가 동반될 수 있는 질환이며, 이 질환의 원인은 확실히 알려져 있지 않으나, 관절연골과 연골 아래뼈에 영향을 주는 생체 역학적 스트레스와 연골 및 활막에서 발생하는 생화학적 변화가 병태생리에 중요한 것으로 판단된다¹⁴⁾.

OA 진행의 임상단계에서 다양한 정도의 염증이 나타나게 되며, Prostaglandin E₂, IL-1 β , TNF- α 같은 inflammatory cytokine들이 extracellular matrix를 분해하는 metalloproteinases에 의해 축대되는, cartilage의 catabolic process의 시작과 진행의 과정에서의 역할에 대해 연구되고 있다. 초기의 OA 환자에게서 C-reactive protein수치가 상승되어 있으며 이것이 질환의 예후를 반영한다. Eicosanoids, leukotrienes들 중 일부가 synovial membrane 뿐 아니라 관절주변 조직과 subchondral bone에도 영향을 미치게 되며, 관절연골과 synovial membrane의 변화는 subchondral bone 자체의 변성과 함께 OA의 결과이면서 질환의 시작과 진행의 과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 보고되고 있다^{3,5,6)}.

OA에서 加齡에 의한 퇴행성 변화가 질환의 발병과 진행과정의 중요한 위험인자임에는 틀림없지만, OA의 진행에는 염증으로 대표되는 기계적, 생화학적 과정이 개재된다. 관절연골의 조성과 물리적 특성을 변화시키는 이러한 과정의 결과로 수분, collagen, proteoglycan으로 구성된 관절연골이 붕괴되며 여기에는 chondrocyte 기능의 저하 뿐 아니라 non-cellular matrix composition의 변화도 포함된다^{13,5,6)}. OA는 感受性 있는 個體에 局所의 因子가 作用하여 發病한다. 全身의 感受性은 연령, 성별, 인종 및 유전적 인자와 함께 hormonal status, bone density, nutritional factor 및 기타 全身的 疾患을 包括한다. 局

所的 因子는 關節과 그 주변부의 外因性이거나 內在的인 인자로 대별되며, 外因性 因子는 物理的 活動이나 손상 등이며, 내재적 인자는 alignment, strength, laxity, proprioception 등으로 최근 집중 조망되고 있는 부분이다^{5,9)}.

OA은 난치성 질환으로서 현재 임상에서 사용되고 있는 항염증제 위주의 약물로는 완치가 어렵고, 또한 소화장애, 위장관 장애 및 신장기능 감소 등과 같은 전신적인 부작용을 유발하여 환자의 연령이 증가할수록 부작용 발생의 빈도가 높아져 노년층에 많은 골관절질환의 치료시 장기간에 걸친 전신투여는 많은 문제점을 내포하고 있다. 따라서 인구의 노령화에 비례하여 증가하는 OA에는 항염증작용 등의 대증요법적 접근보다는 좀더 적극적인 증상의 호전 및 예방을 위한 항염, 연골의 보호 및 재생효과를 목표로 한 신약의 개발이 그 어느 때보다 절실하며, 현재 사용되고 있는 약물의 단점을 보완하기 위하여 천연물을 이용한 개발이 시도되고 있다¹⁰⁾. 전통적으로 한방에서 OA 치료제로 쓰여왔던 약제는 항염, 진통, 연골의 분화와 증식, 재생의 촉진효과를 나타낸 것으로 보고된바 있다¹¹⁻¹³⁾. 특히 녹용은 연골의 분화와 증식, 재생촉진 및 항염의 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. 해외에서도 최근에는 항염증작용의 약물개발에서 한걸음 더 나아가 관절연골보호, 연골분해방지 및 재생촉진에 관심을 두고 관절조직 분해효소 저해제, 자유라디칼 소거제(SOD등 활성 산소류 제거효소), 관절조직구성성분(Chondroitin, Glucosamine etc.)의 장기 복용에 의한 보호 요법 (conservation therapy) 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁸⁾.

연골의 주요구성성분은 프로테오글리칸인 aggrecan과 type II의 collagen이며 aggrecanase 및 matrix metallo proteinase (MMP)에 의해 분해된다^{15,19,20-23)}. 연골분해에 있어 MMP 효소는 프로테오글리칸과 콜라겐 성분과 더불어 골관절염 진행을 변화시킬만한 가능성있는 약리학적 치료의 표적이 되고 있다²⁴⁻²⁶⁾. 따라서 본 연구에서는 관절 연골조직의 구성성분인 프로테오글라이칸, collgen 분해억제능

을 측정하였고, 이의 분해효소인 matrix metalloproteinase (MMP)의 활성을 저하시키는 것을 목표로 수십종의 한약재의 활성을 검색하였고, 실험결과 개발가능성이 있는 수종의 한약물을 선별하였기에 결과를 발표하고자 한다.

材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 단미재는 36종이며, 약재들은 경희대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입하였고, 감정한 다음 정선하여 사용하였다.

2) 연골조직

사람의 관절연골은 인관관절 수술을 받는 환자의 정상femoral chondyle연골 부위를 이용하였고(경희의료원 수술실), 토끼는 1.5kg의 5주령된 토끼(Samtako Biokorea Co., 대한민국)의 관절에서 채취하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 DMEM 배지, 우태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 항생제 및 trypsin등의 세포배양 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(48 well plate)는 Falcon 사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

배양액의 글리코스아미노글리칸(GAG) 와

collagen의 정량을 위해 Blycan (biodye science, UK)에서 구입하였고, MMP (Matrix metalloproteinase) ELISA kit, recombinant human IL-1 α 는 R&D system사에서 구입하였다. 흡광도 측정을 위한 ELISA reader는 Molcular Device사에서 구입하였다.

2. 방법

1) 약재선정

본 실험에서 사용한 약재는 민간요법, 중국, 일본 및 국내의 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌 등을 통해 기존의 상용 처방과 단미재를 탐색·분석·평가하여 약 200여종의 유효한 단미재를 일차로 선정 후, 가장 가능성 있다고 판별되는 약재를 최종적으로 36종 선정하여 사용하였다.

2) 추출 및 분획

경희대학교 한의과대학 부속 한방병원에 의뢰하여 구입하여 감정한 다음 정선하여 사용하였다. 각각의 한약재를 1cm 이하로 분쇄한 후, 시료 200g을 3L 플라스크에 넣은 후 50% 에탄올 1,500ml을 가하여 3시간 동안 환류 추출하고 여과하였다. 잔사는 다시 50% 에탄올로 추출하고 이 조작을 2회 반복하여 모은 여액을 감압농축기르 감압농축한 후, 이를 동결 건조하여 약재 에탄올 추출물을 얻어 본 실험에 필요로 하는 농도로 희석하여 사용하였다. 분획은 알코올 추출액을 유기용매인 butanol과 residue층인 물층으로 분획하여 동결건조하였다.

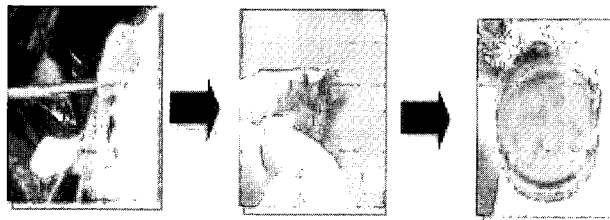


Fig. 1. Isolation of cartilage from rabbit knee joint for cartilage explant culture.

3)연골조직배양

상세히 설명하면, 멸균상태에서 사람 및 토끼의 관절 표면을 드러낸 후, 작은 조각으로 만들어 배지(열처리로 비활성화된 5% FBS와 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 DMEM 배지)에 담가 놓았다(Fig. 1). 조직을 배지로 수차례 씻어 낸 다음 5% CO₂, 37℃ 배양기에서 1일간 배양하였다. 배양된 관절을 기본 배지(열처리로 비활성화된 1% FBS, 10 mM HEPES 및 페니실린-스트렙토마이신 100 unit/ml이 함유된 DMEM)로 교체 하였고, 30mg의 관절 조직을 48-웰 플레이트에 옮겨 놓은 후, 시험물질을 처리하였다. 인터루킨-1α 5 ng/mL을 1시간동안 배양하여, 관절의 손상 및 염증을 유발시키고, 수종의 약재를 농도별로 처리하여 3일간 더 배양하였다. 상등액을 수거한 후, 약재가 함유된 신선한 배지를 넣어준 후 18일간 더 배양하였다. 3, 7, 14, 21일이 되는 때에 상등액을 수집하였으며, 이를 -20℃에 보관

하였다.

4) 글리코사미노글리칸(GAG) 분해정도 측정

배지 중 GAG 수치는 시험물질에 의해 3일간 배양하여 상층액을 모은 후, 1,9-디메틸메틸렌블루와 반응한다. 음이온성(polyanionic)물질의 양에 의해 측정하였으며, 표준물질로는 황산콘드로이틴(chondroitin sulfate)을 사용하였고, 540 nm에서 분광학적 GAG량을 측정하였고, 인터루킨 1α로 유도된 GAG 분해량을 기준으로 억제율을 계산하여 나타내었다.

5) collagen 분해정도 측정

시험물질에 의한 collagen 분해 억제 실험을 위해 시험물질을 3일 간격으로 배지를 교환하여 약 21일간 배양 후 상층액을 모은다. 상층액은 6M HCl로 분해시킨 뒤 6M NaOH로 in vacuo 중화시킨다. 반응 후 상층액은 chloramine-T reagent와 추가 반응시키며 DAB reagent와 4분간 반응 시킨 후 60℃ 35분간 끓이

Table. 1 Effects of KHBJs on GAG Release by rhIL-1α induced Rabbit Articular Cartilage.

| Name | Inhibition (%) (n=12, mean) | Name | Inhibition (%) (n=12, mean) |
|-----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|
| control | 46.4±0.16 | KHBJ 018 | 68.4±0.13 |
| IL-1α | 100±0.19 | KHBJ 019 | 1.6±0.15 |
| SKI306X I | 58.5±0.14 | KHBJ 020 | 30.2±0.1 |
| KHBJ 001 | 21.3±0.18 | KHBJ 021 | 1.1±0.19 |
| KHBJ 002 | 1.5±0.20 | KHBJ 022 | 0.2±0.14 |
| KHBJ 003 | 0.5±0.23 | KHBJ 023 | 5.5±0.08 |
| KHBJ 004 | 56.9±0.17 | KHBJ 024 | 53.6±0.09 |
| KHBJ005 | 13.1±0.04 | KHBJ 025 | 0.3±0.06 |
| KHBJ 006 | 0.7±0.03 | KHBJ 026 | 30.1±0.18 |
| KHBJ 007 | 2.2±0.12 | KHBJ 027 | 11.5±0.09 |
| KHBJ 008 | 11.5±0.08 | KHBJ 028 | 50.8±0.11 |
| KHBJ 009 | 0.5±0.09 | KHBJ 029 | 48.6±0.06 |
| KHBJ 010 | 1.1±0.27 | KHBJ 030 | 37.5±0.15 |
| KHBJ 011 | 9.8±0.03 | KHBJ 031 | 32.9±0.14 |
| KHBJ 012 | 0.7±0.06 | KHBJ 032 | 50.9±0.2 |
| KHBJ 013 | 17.5±0.16 | KHBJ 033 | 12.1±0.30 |
| KHBJ 014 | 30.3±0.15 | KHBJ 050 | 67.2±0.12 |
| KHBJ 015 | 1.7±0.23 | KHBJ 051 | 8.2±0.13 |
| KHBJ 016 | 28.4±0.14 | KHBJ 052 | 45.9±0.20 |
| KHBJ 017 | 10.4±0.16 | | |

Table. 2 Effects of KHBJs and KHBJs-fractions on GAG Release by rhIL-1 α induced Human Articular Cartilage.

| Name | | Inhibition (%), n=12 | | |
|----------|------|----------------------|-----------|-----------|
| | | 20 ug/ml | 200 ug/ml | 400 ug/ml |
| control | 49.5 | | | |
| IL-1 | 100 | | | |
| SK-II | | | 49.7 | 53.0 |
| KHBJ004T | | 6.2 | 24.8 | 46.0 |
| KHBJ004B | | 0.5 | 54.7 | 65.8 |
| KHBJ004R | | 6.2 | 5.9 | 8.9 |
| KHBJ018T | | 3.6 | 28.2 | 58.9 |
| KHBJ018B | | 11.4 | 29.9 | 52.8 |
| KHBJ018R | | 5.9 | 9.9 | 10.6 |
| KHBJ024T | | 5.9 | 56.8 | 61.1 |
| KHBJ024B | | 1.7 | 64.2 | 65.6 |
| KHBJ024R | | 7.8 | 55.6 | 65.2 |
| KHBJ032T | | 16.8 | 36.9 | 48.2 |
| KHBJ032B | | 19.9 | 41.6 | 48.9 |
| KHBJ032R | | 21.9 | 30.2 | 31.7 |
| KHBJ050T | | 30.9 | 46.4 | 54.9 |
| KHBJ050B | | 10.9 | 25.1 | 42.4 |
| KHBJ050R | | 27.6 | 29.9 | 32.9 |
| KHBJ028T | | 9.9 | 3.3 | 39.5 |
| KHBJ028B | | 2.6 | 24.8 | 56.6 |
| KHBJ028R | | 9.7 | 10.1 | 10.8 |
| KHBJ029T | | 18.1 | 35.3 | 42.0 |
| KHBJ029B | | 35.3 | 55.9 | 60.7 |
| KHBJ029R | | 16.1 | 17.3 | 25.4 |
| KHBJ030T | | 14.2 | 10.5 | 11.5 |
| KHBJ030B | | 14.7 | 46.6 | 66.8 |
| KHBJ030R | | 12.3 | 15.6 | 17.9 |
| KHBJ031T | | 9.5 | 13.7 | 14.2 |
| KHBJ031B | | 9.5 | 11.9 | 11.2 |
| KHBJ031R | | 8.7 | 18.9 | 24.8 |
| KHBJ052T | | 18.3 | 25.6 | 27.1 |
| KHBJ052B | | 20.1 | 31.2 | 30.1 |
| KHBJ052R | | 9.8 | 9.7 | 10.0 |

고 5분간 cooling 후 560nm 파장에서 측정하였다.

6) Matrix metalloproteinases (MMPs) 효소 활성 측정 시험물질에 의한 MMPs의 활성 억제 시험을 위해 MMPs와 p-aminophenylmercuric acetate (APMA)를 0.1M Tris-HCl, pH 7.5 buffer 하에서 37℃에서 3 시간 동안 반응시켜 MMPs를 활성화시킨다. 활성화된 MMPs와 시험물질을 37℃에서 30분간반응시

키고 (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitro-phenyl]-L-2,3-diaminopro-pionyl)-Ala-Arg-NH₂(M1895, Bachera, U.S.A) 를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. MMP-13에 specific한 활성억제 측정을 위해 MMP-13에 의해 specific하게 반응하는 peptide인 (3-[2,4-dinitro-phenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Pro-Tyr-Ala-Tyr-

Trp-met- Arg-OH를 활성화된 MMP-3와 반응시킴. 각 MMPs의 활성 억제측정을 위해 각 MMPs에 대해 specific한 peptide를 사용하며 반응의 조건은 동일하게 설정하고 colotimetric spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

7) 조직병리학적 평가.

연골을 10% formalin 고정액에 고정 후 70% alcohol, 80% alcohol, 90% alcohol, 95% alcohol, 100% alcohol의 탈수과정 및 xylene을 거친 후 파라핀을 조직내에 침투시킨 후 블록을 제조하였다. 세포의 형태를 관찰하기 위하여 H&E 염색하였고, proteoglycan의 함성정도를 확인하기 위하여 특수염색으로 Safranin O 염색, collagen 함성정도를 확인하기 위하여 Masson-trichrome 염색을 실시 후 현미경으로 관찰하였다.

結果

1. Proteoglycan 분해 억제능

시험물질의 토끼 및 사람의 관절 연골조직에서 보호효과를 측정하기 위해 프로테오글리칸을 구성하는 GAG의 분해정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다.

토끼의 연골조직으로 연골배양을 실시 후 단미제

약제 36종에 대하여 proteoglycan 분해 억제능을 정량하여 토끼 연골조직에 유효한 활성을 보이는 단미제를 10종(KHBJ 004, 018, 024, 028, 029 030, 031, 032, 050, 052)을 선정하였다(Table1).

선정된 유효단미제 (T)를 butanol층 (B)과 residual(R)로 분획하여 사람의 연골조직을 분리 후, rhIL-1 α 과 함께 10종의 단미제 및 그의 분획 20종을 20, 200, 400ug/ml의 농도별로 처리하여 배양하였다. 72시간 반응 후 proteoglycan 분해 억제능을 정량한 결과 활성이 우수한 13종을 선정하였다 (KHBJ 004T, 004B, 018T, 018B, 024T, 024B, 028B, 029B, 030B, 032T, 032B, 050T, 050B). 특히, total층에 비해 butanol 분획층에서 유효하게 활성이 증가한 분획은 4종(004B, 028B, 029B, 030B)이었고, 토끼의 연골조직에서는 proteoglycan 분해억제 효과가 있었으나 사람의 연골조직에서 효과가 없는 단미제 2종(031, 052)을 확인하였다 (Table. 2).

2. Collagen 분해 억제능

시험물질의 관절 연골세포 보호효과를 측정하기 위해 관절의 구성성분인 콜라겐의 분해정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다.

사람으로부터 연골조직을 분리 후, rhIL-1 α 과 함께 10종의 단미제 및 그의 분획 20종에 대하여 20, 200,

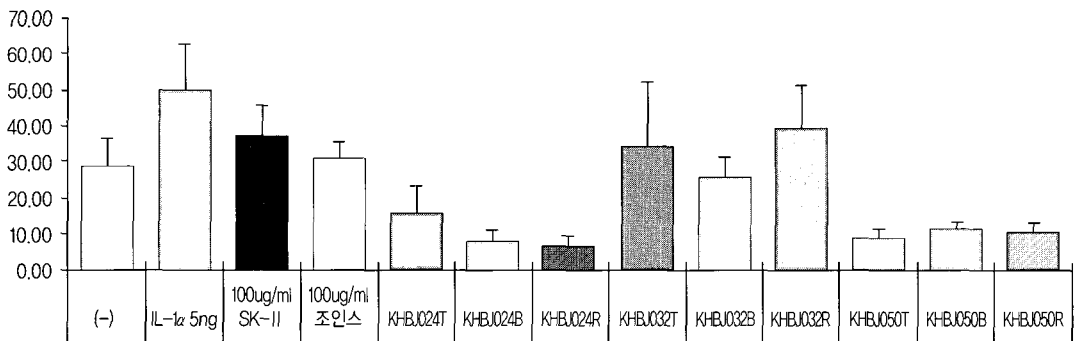


Fig. 2. Effects of KHBJs on collagen degradation by rhIL-1 α induced human articular cartilage.

Table 3. Effects of KHBJs and KHBJs-fractions on MMP-3 and -13 Degradation by rhIL-1 α induced Human Articular Cartilage.

| | MMP-3 (pg/ml) | MMP-13 (ng/ml) | | MMP-3 (pg/ml) | MMP-13 (ng/ml) |
|---------------|------------------|-------------------|---------------|------------------|-------------------|
| control | 21.08 | 2393 | control | 9.64 | 1165 |
| IL-1 α | 38.54 | 12058 | IL-1 α | 17.61 | 2279 |
| SK-II | 31.36 | 6000 | SK-II | 14.63 | 501 |
| SKI 306X | 31.13 | 5896 | SKI 306X | 12.07 | 618 |
| KHBJ 004T | 14.84 | 183 | KHBJ 028T | 11.43 | 342 |
| KHBJ 004B | 14.78 | 282 | KHBJ 028B | 11.30 | 352 |
| KHBJ 004R | 27.47 | 11842 | KHBJ 028R | 12.81 | 607 |
| KHBJ 018T | 0.15 | 1138 | KHBJ 029T | 10.48 | 465 |
| KHBJ 018B | 0.66 | 448 | KHBJ 029B | 7.18 | 654 |
| KHBJ 018R | 19.39 | 6488 | KHBJ 029R | 12.38 | 1165 |
| KHBJ 024T | 22.91 | 3265 | KHBJ 030T | 10.67 | 1280 |
| KHBJ 024B | 30.33 | 10702 | KHBJ 030B | 7.83 | 286 |
| KHBJ 024R | 23.85 | 2842 | KHBJ 030R | 10.37 | 586 |
| KHBJ 032T | 31.13 | 2445 | KHBJ 031T | 13.66 | 985 |
| KHBJ 032B | 30.05 | 1105 | KHBJ 031B | 13.32 | 797 |
| KHBJ 032R | 30.43 | 11425 | KHBJ 031R | 14.05 | 1624 |
| KHBJ 050T | 4.89 | 1360 | KHBJ 052T | 15.66 | 2900 |
| KHBJ 050B | 3.12 | 1227 | KHBJ 052B | 10.45 | 541 |
| KHBJ 050R | 24.97 | 12147 | KHBJ 052R | 17.71 | 1656 |

400 ug/ml의 농도별로 처리 후, 21일간 배양하여 collagen 분해 억제능을 정량한 결과, 7종 (KHBJ 024, 024B, 024R, 032B, 050, 050B, 050R)을 선정하였고, total층에 비해 분획층에서 유효하게 활성이 증가한 분획은 3종(024B, 024R, 032B)으로 확인되며 가장 우수한 collagen 분해억제능을 보인 6종(KHBJ 024T, 024B, 024R, 050T, 050B, 050R)을 선정하였다 (Fig. 3).

3. MMP-3, -13 효소 활성 억제에 대한 작용

사람으로부터 연골조직을 분리 후, rhIL-1 α 과 함께 단미재 10종 및 그의 분획 20종을 20, 200, 400 ug/ml의 농도별로 처리하여 배양후 배양액에서 MMP-3, -13 효소활성 억제능을 정량하였다. MMP-3 효소활성 억제능 실험결과, 양성대조군에 비해 우수한 약제 12종 (KHBJ004T, 004B, 018T, 018B, 028T, 028B, 029T, 029B, 030T, 030B, 050T, 050B)을 선정하

였다. MMP-13 효소활성 억제능 실험결과, 양성대조군에 비해 우수한 약제 13종 (KHBJ 004T, 004B, 018T, 018B, 024T, 024R, 023T, 028B, 029T, 030B, 032B, 050T, 050B)을 선정하였다 (Table. 3).

4. 형태 보존정도 측정

염색된 조직표본은 시료에 대한 사전 정보가 전혀 없는 병리학자가 염색된 슬라이드를 판독하였으며, 200배율의 렌즈로 측정 후 사진촬영 하였다(Fig 3).

프로테오글라이칸을 염색(Safranin-O)과, 콜라겐 염색(Masson-trichrome)한 결과, 사람 연골조직에서는 무처리 군에 비하여 인터루킨-1 α 로 유도된 연골 조직은 프로테로글리칸 및 콜라겐의 손실이 유도되어 염색후 발색정도가 흐렸고, 연골세포수가 줄어들었다. 그러나 유효활성이 검증되었던 단미재 및 분획에서는 발색정도가 진하게 염색되었다. 특히

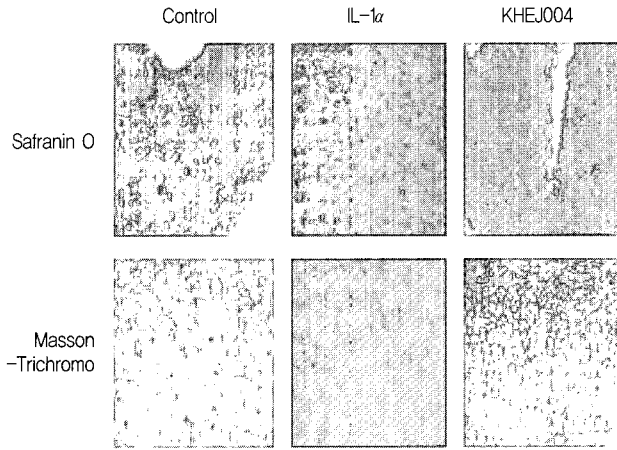


Fig. 3. Histological characteristics of human articular cartilage. control; normal cartilage from vehicle treated in human cartilage explant culture, IL-1 α ; 5 ng/ml IL-1 α treated cartilage, KHEJ004; 200 ug/ml KHEJ004 treated cartilage.

KHEJ004는 인터루킨-1 α 로 유도된 연골조직의 손실을 회복시켜 진하게 염색됨을 확인하였다 (Fig. 3). 또한, KHEJ004는 인터루킨-1 α 로 유도된 연골조직의 cartilage layer, eroin 정도와 chondrocyte 숫자등이 다시 회복함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

考 察

경희대학교 골관절질환 한방연구센터에서 퇴행성관절염 치료제 개발을 위하여 연구를 진행한 결과, 개발 가능성을 확인하였기에 한약물 단독 또는 분획물에 대한 연구 과정 및 결과를 기술하였다. 이 결과를 바탕으로 한약처방을 구성하고, 조성물의 비율 및 새로운 한약재의 첨가에 기인한 효능을 세포실험 및 동물실험 연구가 마무리되고 있으며, 임상실험을 단계별로 수행하여 최종적으로는 퇴행성관절염에 대한 효능과 그 기전을 밝히고, 우수한 한약물 또는 신물질의 개발을 목표로 하고 있다.

퇴행성관절염치료제 개발을 위해 민간요법, 중국, 일본 및 국내외 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌 등을 통해 기존의 상용 처방과 단미제를 탐색·분석·평가하여 약 200여종의 유

효한 단미제를 일차로 선정한 후 연골보호 중심으로 최종 36종을 선별하여 연구를 진행하였다.

연구결과, 연골보호의 경우, 토끼의 연골조직에서 proteoglycan의 분해억제능에 가장 우수한 활성을 보였던 단미제는 12종이었으나, 사람 연골조직에서 2종의 단미제에 대해서는 효능이 관찰되지 않았으며, proteoglycan의 분해억제능이 양성대조군인 SKII에 비하여 효능이 가장 우수한 활성을 보였던 단미제는 total층에서 2종(024, 050)이며, butanol 분획에 의해 활성이 증가된 단미제는 4종(004B, 024B, 029B, 030B)이었고, 그 증가율은 약 20-30%로 유의한 증가율을 보였다(Table 1, 2). 일반적으로 한약물의 활성증가를 위해 분획, 재분획 및 유효단일물질 분리 등이 시도되고 있으나, 본 실험에 사용한 한약물의 경우, 프로테오글라이칸 분해억제는 total층의 활성이 butanol분획층과 비슷한 활성을 보여 퇴행성관절염 치료제 개발을 위한 처방은 한방개념이 도입된 복합처방 및 분획으로 활성을 증진시킬 수 있는 다양한 처방을 조합하여 연구할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 collagen 분해억제능 실험결과, 가장 우수한 활성을 보였던 단미제가 프로테오글라이칸 분해억

제능에 효과가 가장 좋았던 단미재 2종 (024, 050)과 일치하였고, 분획에 의해서도 효능이유의하게 증가 되는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이 연구결과로 2종의 단미재가 프로테오글라이칸 및 콜라겐 분해를 모두 억제시키는 것을 확인하여 앞으로의 처방구성에 균약으로 사용될수 있음을 제시하였다.

현재 관절염치료제의 주요 목표로 알려진바와 같이 본 연구팀에서도 MMPs의 작용기전에 대하여도 실험하였다. 연구결과, 프로테오글라이칸 및 콜라겐 분해억제에 효과를 보인 단미재 및 분획층의 약재들이 연골보호 효과가 MMP-3 및 MMP-13의 유의한 활성억제를 통해 연골보호효과가 있는 것으로 사료된다. 이에 본 연구팀에서 선정된 단미재 및 분획들이 MMPs 활성을 억제 시킴으로써 항염활성을 갖음을 시사하였고, 이를 통해 손상된 연골조직의 보호 및 회복 효과가 있는 것으로 사료된다.

앞으로 선정된 단미재들을 균약으로하는 복합처방 및 혼합시료 조성물을 구성하고 효능을 분리 추출하여 퇴행성 관절염 한방신약의 후보로 선정하고, 동물실험 모델을 이용한 한약제의 치료 효과 기전 규명, 임상시험 프로토콜 작성 및 생체 내 작용기전 연구하여 한방신약을 개발하고자 한다.

본 한방골관절연구센터에서의 기초 및 임상연구 결과들은 퇴행성관절염 치료제 개발 뿐 아니라 한약제제에 대한 객관화, 정량화, 표준화, 현대화 작업을 통해 한의학의 과학화, 한약제제의 실용화·제품화로 부가가치 창출 및 인류 보건 향상에 기여할 수 있을것으로 사료된다.

結 論

민간요법, 중국, 일본 및 국내외 한의학 고전 처방, 각종 임상 논문 및 보고서 등 관련 문헌 등을 통해 기존의 상용 처방과 단미재를 탐색·분석·평가하여 약 200여종의 유효한 단미재를 일차로 선정 후, 가장 가능성 있다고 판별되는 약재를 최종적으로 36종 선정하여 프로테오글라이칸, 콜라겐 분해억제 및 MMPs(MMP-3, -13) 활성억제를 통해 연골보호 효과

를 확인한 수종의 단미재 및 분획을 선정하였다. 이 결과로 효능이 검증된 퇴행성관절염 치료제 개발을 위한 처방의 기초자료를 제시하는데 그 의의가 있다고 사료된다.

參考文獻

1. Woessner J.F., Jr, Howell D.S. (Eds) "Joint cartilage degradation", New York: Marcel Dekker 1993.
2. Haq I, Murphy E, Dacre J. Osteoarthritis. Postgrad Med J. 2003;79(933):377-383.
3. Allen JB, Christopher BV, David M. The role of bone in osteoarthritis. Age and Ageing. 2001; 30:374-378.
4. Chikanza I, Ferenandes L. Novel strategies for the treatment of osteoarthritis. Expert Opinion on Investigational Drugs. 2000;9(7):1499-1510.
5. Sinkov V, Cymet T. Osteoarthritis: understanding the pathophysiology, genetics, and treatments. J Natl Med Assoc. 2003 Jun;95(6):475-482.
6. Leena S. Local factors in osteoarthritis. Cur Opinion in Rheumatol. 2001;13:441-446.
7. Ernst E. The role of complementary and alternative medicine. BMJ. 2000 Nov;321:1133-1135.
8. Muir H. M., Hardingham T. E. "Copeman's Textbook of the Rheumatic Diseases" Scott, J. T., ed Churchill Livingstone, Edinburgh. 1986:177-198.
9. Robert Y, Yuan L. Traditional chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. Pharmacology & Therapeutics. 2000;86:191-8.
10. Jung YB, Roh KJ, Jung JA, Jung K, Yoo H, Cho YB, Kwak WJ, Kim DK, Kim KH, Han CK. Effect of SKI 306X, a new herbal anti-arthritis agent, in patients with osteoarthritis of the knee: a

- double-blind placebo controlled study. *Am J Chin Med.* 2001;29(3-4):485-91
11. Mills SY, Jacoby RK, Chacksfield M, Willoughby M. Effect of a proprietary herbal medicine on the relief of chronic arthritic pain: double blind study. *Br J Rheumatol.* 1996;35:874-78.
 12. Long L., Soeken K., Erst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatol.* 2001;40:779-93.
 13. Altman RD, Aven A, Homburg CE. Capsaicin cream 0.025% as monotherapy for osteoarthritis: A double-blind study. *Semin Arthritis Rheum.* 1994;23(Suppl.):25-33.
 14. Kim K.S., Choi Y.H., Kim K.H., Lee, Y.C., Kim, C.H., Moon S.H., Kang, S.G., Park, Y.G. Protective and anti-arthritic effects of deer antler aqua-acupuncture(DDA), inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on phosphate ions-mediated chondrocyte apoptosis and rat collagen-induced arthritis. 2004;4(7):963-73.
 15. Murphy G, Knuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metallo proteinase in arthritic disease. 2002;4:s39-49.
 16. Bädger, A.M., Cook, M.N., Swift, B.A., Newman-Tarr, T.M., Gowen, M., Lark, M., Inhibition of interleukin-1-induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, hymenialdisine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1999;290:587-93.
 17. Choi, J.H., Choi, J.H., Kim, D.Y., Yoon, J.H., Youn, H.Y., Yi, J.B., Rhee, H.I., Ryu, K.H., Jung, K., Han, C.K., Kwak, W.J., Cho, Y.B., Effects of SKI306X, a new herbal agent, on proteoglycan degradation in cartilage explant culture and collagenase-induced rabbit osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2002;10:471-78.
 18. Clay, K., Seed, M.P., Clements-Jewery, S. Studies on interleukin-1b induced glycosaminoglycan release from rat femoral head cartilage in-vitro. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 1989;41:503-04
 19. Dodge, G.R., Jimenez, S.A. Glucosamin sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2003;11:424-32.
 20. Nieduszynski, I. A., Huckerby, T. H., Brown, G. M., Tai, G.-H., Morris, H. G., Eady, S. There are two major types of skeletal keratan sulphates. *Biochemical Journal.* 1990;271:243-245.
 21. Okada, Y., Shinmei, M., Tanaka, O., Naka, K., Kimura, A., Nakanishi, I., Bayliss, M., Iwata, K., Nagase, H. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Laboratory Investigation .* 1992;66:1069-73.
 22. Saito, S., Katoh, M., Mashmoto, M., Mashmoto, S., Mashmoto, J. Collagen degradation induced by the combination of IL-1alpha and plasminogen in rabbit articular cartilage explant culture. *Journal of Biochemistry (Tokyo).* 1992;122:49-54.
 23. Saito, S., Katoh, M., Masumoto, M., Matsumoto, S. Masuho, Y. Involvement of MMP-1 and MMP-3 in collagen degradation induced by IL-1 in rabbit cartilage explant culture. *Life Sciences.* 1998;62:PL359-365.
 24. Singleton, W.D., Ellis, A.J., Rowan, A.D., Cawston, T.E. Retinoic acid combines with interleukin-1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: Matrix Metalloproteinase-1 and 13 are involved in cartilage breakdown. *Journal of Cellular*

- Biochemistry. 2000;79:519-531.
25. Westacott, C.I., Sharif, M. Cytokines in osteoarthritis: Mediators on markers of joint destruction. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1996;25:254-272.
26. Woessner, J.F., Jr Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB Journal*. 1991;5:2145-54.
27. NIH conference. Osteoarthritis: New insights. Part I: the disease and its risk factors. *Annals of Internal Med*. 2000;133:635-46.