

金銀花의 抗류마티즘 效能에 대한 研究

김희수¹, 기호필², 이준서², 윤용갑^{2,3}

¹진솔한의원, ²원광대학교 한의과대학 방제학교실, ³한국전통의학연구소

ABSTRACT

Effects of *FLOS LONICERAE* Water Extract On Anti-Rheumatoid Arthritis

Hee-Soo Kim¹, Ho-Pil Ki², Joon-Suh Lee², Yong-Gab Yun²

¹Jin-Sol Oriental Clinic, ²Dept. of Oriental Medicine Prescription, Wonkwang University

³Reserch Center of Traditional Korean Medicine

Rheumatoid arthritis is characterized by the focal loss of cartilage due to an up-regulation of inflammatory pathways, which produce inflammatory mediators, such as interleukin-1beta(IL-1 β), IL-6, tumour necrosis factor alpha(TNF- α), prostaglandin, and nitric oxide(NO). We investigated the anti-arthritic effects of water extract from *FLOS LONICERAE*(FLWE) *in vitro* and *in vivo*. Extract inhibited the production of inflammatory mediators(NO, IL-1 β , TNF- α , and prostaglandin E₂) and the expression of inducible NO synthase(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner. FLWE also inhibited TNF- α , IL-1 β , IL-6, and PGE₂ production as well as COX activity in collagen-induced mouse arthritis. Moreover, FLWE significantly suppressed collagen-induced mouse arthritis. These results suggest that *FLOS LONICERAE* may be useful for therapy against inflammatory immune diseases

-
- 교신저자 : 윤용갑
 - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 063-850-6834 Fax : 063-856-5056 E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr
 - 접수 : 2010/ 11/ 25 수정 : 2010/ 12/ 03 채택 : 2010/ 12/ 06

and rheumatoid arthritis, probably by suppressing the production of inflammatory mediators.

Key word : Anti-Rheumatoid, FLOS LONICERAE

1. 서 론

金銀花는 忍冬科(인동과: Caprifoliaceae)에 속하는 多年生 半常綠 蔓性灌木인 인동덩굴의 花蕾를 말하며, 忍冬花, 銀花, 蘇花, 二花, 雙花, 禹花 등의 異名을 갖고 있다¹⁾. 金銀花의 性味는 甘, 寒, 無毒하고 清熱解毒, 涼血止痢, 散風熱의 효능이 있어 腫기, 痲毒, 疔瘡, 疔瘡, 疔瘡, 疔瘡 등에 활용되고 있으며, 특히 약리적으로는 유행성 감기의 병독, 이질균, 장티프스균, 파라티프스균, 大腸菌, 百日咳菌, 디프테리아균, 結核菌, 포도구균, 용혈성 연쇄구균, 폐염 쌍구균 등에 비교적 강력한 억제 작용이 보고되고 있다²⁻⁵⁾.

또한 金銀花는 알콜 또는 물을 용매로 추출하여 많이 사용되고 있는 약물중 하나며⁶⁾, 최근에는 위와같은 효과를 입증하기 위한 金銀花 抽出物에 대한 연구가 매우 활발히 전개되고 있다. Ohta 등¹⁶⁾은 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)로 유도된 白鼠에 金銀花 메탄올 추출물을 투여한 결과, 손상된 간조직세포를 복구하는 효과를 보고 하였고, Tae 등¹⁷⁾은 trypsin과 tc-NH₂로 유도된 발부종(paw edema)을 완화시키는 抗炎症작용을 보고한 바가 있으며, Lee 등¹⁵⁾은 lipopoly-saccharide (LPS)로 유도한 白鼠의 肝 염증유도에 可溶性 金銀花 추출물을 투여한 결과 nuclear factor-kappaB (NF-κB)를 억제함으로써 抗炎症작용을 나타내는 기전과 강력한 항산화(anti-oxidant) 작용을 보고 하였으며, 최근 Jang 등²⁰⁾은 설치류 RAW 264.7 대

식세포를 대상으로 金銀花의 항염증작용을 보고한 바 있다.

이러한 藥理作用을 나타내는 金銀花의 주요 성분을 검출하기 위한 연구도 활발히 진행되고 있는데, 金銀花는 triterpenoid saponins, iridoid glycosides, flavones 및 phenolic 등 주요 물질들이 함유되어 있어 항염증작용이 있음을 보고하고 있다^{18,19)}.

한편 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)이 형성되는 주요한 원인으로 nitric oxide(NO), 다양한 pro-inflammatory cytokine, interleukin-1(IL-1), IL-6 그리고 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 등과 같은 cytokines의 증가로 인한 iNOS의 발현 증가와 강력한 염증반응이 그 원인으로 알려져 있다. 또한 in vivo에서도 이러한 물질들이 Human osteoarthritic 과 rheumatoid joints 내에 국부적으로 생산되어 축적된다는 보고가 있다²¹⁻²⁵⁾.

Nitric oxide(NO)는 생체 내에서 NO synthase (NOS) 라는 효소의 촉매 작용을 통해 L-arginine 으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유 라디칼이다. NO는 생리적인 현상인 혈압조절과 신경전달 매개체로 작용하며, 면역반응에 중추적인 역할을 하고 있으며 뼈를 형성하는 chondrocyte와 synoviocyte 같은 세포에서도 발현이 되고 있다. 하지만 최근에는 關節에서 과량의 NO 생성이 염증반응을 일으키고, 조직의 파괴 및 면역 체계의 이상이 나타난다고 보고 되고 있다²⁶⁾. 따라서 이들 매개체의 생성을 효과적으로 억제하면 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis) 등과 같은 염증 질환을 치료 할 수 있다

는 관점에서 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis) 치료제를 천연 자원에서 개발하고 있다. 최근 천연 생리 활성물질이 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis) 치료에 효과가 있음이 알려져 있으나, 어떠한 기전에 의하여 이러한 효과를 나타내는지는 분명하게 알려져 있는 것은 없고, 고 효능의 치료제가 아직까지 확인된 것이 없으며, 지금까지 collagen 유도 關節炎 모델동물에서 金銀花의 효능에 대한 보고가 없는 점을 착안하여 본 실험을 시도하였다.

金銀花에 관한 실험 연구로는 수용성 金銀花 추출물의 anti-rheumatoid arthritis 효과를 규명하기 위하여 설치류 RAW 264.7 대식세포와 동물 실험에서 염증매개물질인 NO, prostaglandin E₂(PGE₂), pro-inflammatory cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α)의 생성과 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였으며, Collagen induced arthritis(CIA) 모델동물에서 金銀花 추출물에 의한 rheumatoid arthritis의 개선효과를 조사하여 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 약

Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 및 prostaglandin E₂(PGE₂) and cyclooxygenase-2(COX-2) assay kit은 R&D Systems사(Minneapolis, USA)로부터 구입하였으며, Anti-iNOS, anti-COX-1 및 anti-COX-2 antibody는 Santa cruz biotechnology Inc.(California, USA)로부터 구입하였다. Bovine type II collagen(CII), lipopolysacchride(LPS) 및 Complete Freund's adjuvant(CFA)는 Sigma사(USA)로부터 구입했으며, 기타 사용된 모든 시약은 분석 등급으로 Sigma사(USA)와 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구

입하여 사용하였다.

2) 실험동물

6주령의 DBA1J 마우스 40 마리를 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)로부터 확보하고, 2주간 스트레스를 해소한 후 8주령을 대상으로 실험에 사용하였다. 마우스의 실제환경은 무균 및 항온·항습이 유지되는 동물 사육장(엠제이티디, 서울)에서 사육하였으며, 무균물과 사료를 충분히 공급하면서 실험하였다.

2. 방 법

1) 약물의 추출 및 제조

실험에 사용한 약제는 원광대학교 부속 익산한방병원에서 구입하였으며, 형태학적인 동정을 통하여 확인하고 사용하였다. 증거표본은 원광대학교 한의과대학 방제학교실에 보관 중에 있다. 잘 건조된 金銀花(*Flos Lolicerae*) 200 g과 증류수 1,200 ml을 대응약탕기(DWP-1800T)에 넣고 100°C에서 3시간 동안 煎湯하였다. 그 후 수용성 추출물은 동결 건조하여 8.625 g을 얻어 실험에 사용하였다.

2) RAW 264.7 세포주의 배양

金銀花 추출물이 염증반응 매개물질의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 설치류의 대식세포 RAW 264.7을 사용하였다. 설치류의 대식세포 RAW 264.7 세포는 American Tissue Culture Collection(ATCC TIB TIB-71, Rockville, MD)에서 구입하여, DMEM 배지로 1×10^6 세포/ml의 농도를 유지하였고, 여기에 10%의 열에 비활성화된 우태아 혈청, 페니실린 G(100 U/ml), 스트렙토마이신(100 μ g/ml) 및 L-글루타민(2 mM)를 보충하여, 5% CO₂와 95%의 공기를 포함하는 가습 조건하에서 37°C 온도를 유지하여 배양하였다. 충분히 성장한 세포들은 각각의 추출물을 여러 가지 농도(100-1000 μ g/ml)로 2시간 전 처리하고 1 μ g/ml의 LPS로 자극하여 염증 매개물질의 생성능력을 측정하였다.

3) RAW 264.7의 cytokine, COX 및 PGE₂ 측정

LPS로 RAW 264.7(1×10^6 cells/ml) 세포를 자극하기 전 金銀花 추출물을 여러 농도(10-500 $\mu\text{g/ml}$)로 2시간동안 전 처리하였다. Pro-inflammatory cytokine, COX-1, COX-2, PGE₂ 등 염증매개물질의 생성에 미치는 약물의 효과를 검증하기 위해서 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)로 자극한 후 이들 염증매개물질을 세포 상층액에서 측정하였다. TNF- α 의 측정은 6시간, IL-1 β 와 IL-6의 측정은 12시간, COX-1과 COX-2의 활성 측정은 18시간, PGE₂은 18시간에 측정하였다. pro-inflammatory cytokine, COX-2 및 PGE₂ assay kit(R&D System Inc., Minneapolis, USA)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다.

4) MTT 분석

RAW 264.7 대식세포의 생존율은 여러 농도의 추출물처리 또는 추출물과 LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 동시에 처리하여 24시간 배양 후 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정하였다.

요약하면, 지수성장을 하는 세포들은 DMEM 배지에서 1×10^6 cells/ml의 밀도로 현탁하였고, 여러 가지 농도로 약물을 처리하였다. 4시간 동안 배양한 후 1 mg/ml의 농도로 배양하기 위하여 MTT용액을 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하였다.

MTT-formazan 생성물은 동일한 용량의 용해완충액(50% n, n-dimethyl formamide)을 포함하는 20% SDS 용액, pH4.7)을 첨가하여 용해하였다.

Formazan의 양은 570 nm에 흡수되는 양을 측정함으로써 결정하였다.

5) 아질산 농도의 측정

NO의 기질인 L-아지닌은 L-시트룰린과 일산화질소로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. 그리스 시약(Griss reagent: 0.5%의 설과닐아미드, 2.5%의 인산 및 0.5%의 나프틸에틸렌아민)은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 일산화질소의 농도와 일치하기 때문에 아조염의 농도

로부터 아질산염의 농도를 측정하여 540 nm에서 그 최대 흡수정도를 측정하여 구할 수 있다. 즉, 100 μl 의 그리스 시약을 상기 대조군과 실험군의 샘플 1 내지 6의 각각에 100 μl 씩을 첨가하고, 그 혼합물을 37°C에서 10분간 배양하였다. 그 샘플의 빛의 흡수는 스펙트로포토메타(MD, USA)로 540 nm에서 측정하였다. 아질산염의 농도 정도는 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

6) Western blot

추출물과 LPS로 처리된 세포를 용해한 후 단백질을 블레드포드 방법에 따라 정량하고 50 μg 을 10% SDS-PAGE로 분리한 다음 transfer solution (20% methanol, 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH8.3)을 이용하여 nitro cellulose membrane에 분리된 단백질을 전사 시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 TBS로 4°C에서 2시간 이상 충분히 흔들면서 방치하였다. 그 후 TBS로 3회 세척하고 anti-iNOS antibody (1: 1,000), anti-COX-2 antibody (1: 1,000) 또는 anti-COX-1 antibody (1: 1,000)을 주입하여 3시간 동안 실온에서 반응시킨 후 충분히 세척하였으며, horse radish peroxidase가 부착된 anti-goat IgG (1: 2,000)을 주입하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. Membrane은 TBS로 충분히 세척하고 통상적인 ECL방법으로 발색시켰다.

7) CIA(Collagen induced arthritis) 모델동물

Bovine type II collagen(CII)을 10 mM acetic acid에 주입하고, 용해하여 2 mg/ml의 농축시약을 만들었다. CII 용액을 동량의 CFA와 혼합하여 CII/CFA를 조제하였다. 1차 면역은 DBA1J 마우스 꼬리에 CII/CIA 혼합액을 마우스 마리 당 100 μl (100 μg /마리)씩 피하에 26 G needle을 이용하여 주사하였다. 2차 면역은 1차 주사 후 20일이 경과된 마우스에 CII/CIA 혼합액(CII : 200 μg /마리)을 이용하여 꼬리의 피하에 주사하였다. 관절염을 가속화시키기 위하여 1차 면역 후 28일에 마리당 20 μg 의 LPS를 복강에 주사하였다.

8) 약물의 투여

金銀花 추출물을 마우스 체중 kg당 100-500 mg 을 1차 면역과 동시에 경구 투여하였다. 약물의 투여 시간은 다른 변이를 제거하기 위하여 오전 10시로 정하였고, 1일당 1회씩 48일간 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 경구 투여하였으며, 각 실험군 당 마우스는 8마리를 대상으로 하였다.

9) Arthritis index 평가

CIA 모델동물에서 paw에 나타나는 부종과 종창정도를 관찰하여 關節炎의 발생빈도와 위중도(severity)를 paw에서 측정하고, 평균값을 산출하였다. Arthritis index는 다음과 같은 증상에 점수를 부여하여 산정하였다. 최종적으로 실험이 종료된 마우스는 digital camera로 촬영하였다.

0 점 : 부종이나 종창이 없고 정상

1 점 : mid foot 혹은 ankle joint에 국한된 경한 부종과 발적

2 점 : 발목관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적

3 점 : 발목관절에서 metatarsal bone에 걸친 중등도의 부종과 발적

4 점 : 발목에서 digit 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

10) Arthritis incidence 평가

CIA 모델동물에서 약물을 처리한 group과 처리하지 않은 group간의 paw에 arthritis가 발생되는 마우스의 숫자를 계산하여 백분율로 표시하였다.

11) 모델동물의 cytokine, COX 및 PGE₂ 측정

CIA 모델동물에서 金銀花 추출물이 pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6), COX-1, COX-2 및 PGE₂의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 關節炎 유도가 최대로 나타나는 시기인 1차 면역 후 36일에 심장으로부터 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈청에서 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등 assay kit(R&D System Inc., Minneopolis, USA)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. COX-1, COX-2 및 PGE₂ 등의 정량은 paw 조직을 적출하고 조직

세포를 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 세포용액 buffer를 주입하여 세포용액을 제조한 다음 단백질의 양을 정량하였다. 그 후 COX-2 및 PGE₂ assay kit(R&D System Inc., Minneopolis, USA)을 이용하여 ELISA법으로 정량하였다. 즉, Cytokine들과 PGE₂, COX-2의 정량은 R&D System에서 제공된 방법에 준하여 측정하였다.

12) 통계 분석

통계 분석은 Student's t-test를 이용하였으며, 결과는 평균값 \pm 표준편차로 표현하였다. 유의성의 한계는 p<0.05로 정하였다.

III. 실험 결과

1. 金銀花 추출물이 대식세포의 생존율에 미치는 영향

LPS가 처리된 RAW 264.7 대식세포에서 金銀花 추출물의 농도에 따른 세포 생존율을 MTT assay법에 준하여 조사한 결과 Fig. 1과 같다. 먼저 RAW 264.7 대식세포에 金銀花 추출물을 10-500 μ g/ml 농도를 처리한 결과 모든 농도에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않았다(95-100%). 이러한 결과를 바탕으로 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS 처리군의 생존율은 약 80%로 감소하였으나, 金銀花 추출물을 10-500 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가하였다. 특히 100 μ g/ml의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 증가되었다(Fig. 2).

2. 金銀花 추출물이 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향

金銀花 추출물이 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포(1×10^6 cells/ml)를 접종하고 5시간 후에 각각의 약물을 10-500 μ g/ml의 농도로 2시간 동안 전 처

리한 다음 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 22.2 μM 의 NO를 생성시킨 반면, 金銀花 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 NO의 생성이 크게 억제되었다 (Fig. 3). 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 金銀花 추출물은 NO 생성을 억제시키지 못했지만, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도부터 NO 생성 억제효과가 나타났으며, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 NO 생성 억제효과가 현저하게 나타났다.

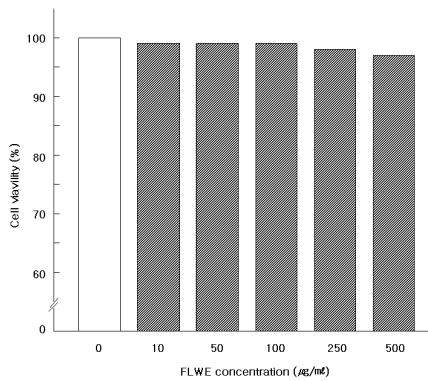


Fig. 1. Cell viability in *FLOS LONICERAE* (FLWE)-treated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 macrophages(1×10^6 /well plate) were incubated for 24 h in the presence or absence of extract at indicated doses. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments.

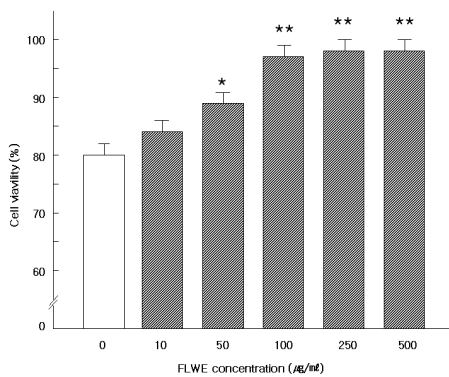


Fig. 2. Cell viability in *FLOS LONICERAE* (FLWE)-treated RAW 264.7 cells.

Cells(1×10^6 /well plate) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h and then incubated with or without 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means of three independent experiments. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ compared with the control group(LPS alone).

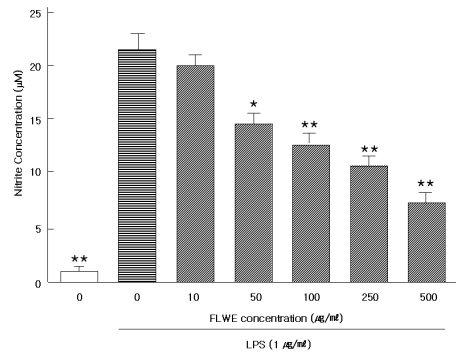


Fig. 3. Inhibitory effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on NO production by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

RAW 264.7 cells(1×10^6 /well plate) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 24 h. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data are means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone.

3. 金銀花 추출물이 대식세포의 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine로부터 생성된다. LPS로 대식세포를 자극하면 iNOS가 과량 발현되면서 많은 양의 NO를 생성하게 된다. 따라서 상기에서 실험한 약물에 의한 NO 생성 억제와 iNOS와의 관계를 알아보기 위하여 金銀花 추출물이 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하였다. 그 결과 NO 생성 억제와 같이 iNOS 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 4).

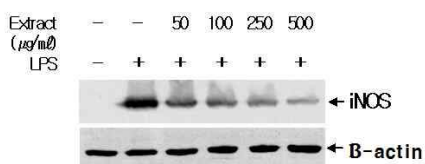


Fig. 4. Inhibitory effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the expression of iNOS in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 g/ml LPS for 18 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

4. 金銀花 추출물이 대식세포의 PGE₂ 생성에 미치는 영향

金銀花 추출물이 LPS로 유도된 PGE₂ 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 대식세포(1×10^6 cells/ml)를 접종하고 5시간 후에 추출물을 10-500 µg/ml의 농도로 2시간 동안 전 처리한 다음 LPS(1 µg/ml)를 처리하여 18시간 배양하였다. 그 결과 아무런 약물이 처리되지 않고 LPS로 자극한 대조군은 1170 ng/ml의 PGE₂를 생성시킨 반면, 金銀花 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 현저하게 억제되었다(Fig. 5). 저농도(50 µg/ml)에서는 PGE₂ 생성을 크게 억제시키지 못했지만, 100 µg/ml 농도에서는 PGE₂ 생성 억제효과가 증가하였으며, 500 µg/ml의 농도에서는 현저히 억제하였다.

5. 金銀花 추출물이 대식세포의 COX-2 발현에 미치는 영향

Cyclooxygenase(COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 염증반응을 가속화시킨다고 알려졌다. 따라서 본 연구에서도 PGE₂ 생성에 직접적으로 영향을 미치는 COX-2의 발현을 immunoblot

방법으로 조사하였다. 그 결과 PGE₂ 생성 억제와 같이 COX-2 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 6).

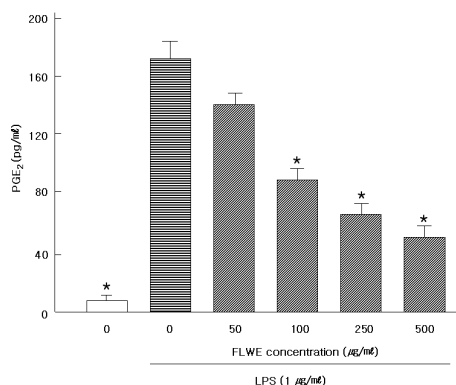


Fig. 5. Inhibitory effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the production of PGE₂ in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 g/ml LPS for 18 h. PGE₂ production assay was carried out as described in Materials and methods. *p<0.01 compared with the LPS alone.

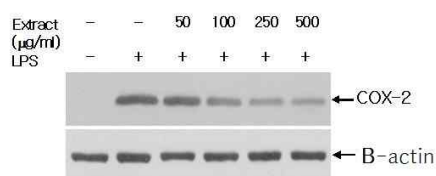


Fig. 6. Inhibitory effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the expression of COX-2 in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/ml$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without 1 g/ml LPS for 18 h. Western blot analysis was carried out as described in Materials and methods.

6. 金銀花 추출물이 대식세포의 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

rheumatoid arthritis 질환의 유발 원인 중에 하

나가 관절내의 대식세포 활성화에 의한 다양한 염증 매개 인자인 cytokine의 발현과 생성에 기인하고 있다. 따라서 金銀花 추출물이 활성화된 대식세포에서 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제효과를 조사하기 위하여 RAW264.7 cells(1×10^6 cells/)를 LPS($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)와 실험 약제를 동시에 처리하고, TNF- α 의 경우 6시간, IL-1 β 와 IL-6는 12시간이 경과한 후 생성된 pro-inflammatory cytokine의 양을 kit를 이용하여 측정하였다.

LPS로 활성화한 대식세포는 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6를 다량 생성하였고, 金銀花 추출물을 첨가하였을 때 이들 cytokine의 생성은 억제되었다. 즉, 金銀花 추출물은 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성을 억제하였으며(Fig. 7), IL-1 β (Fig 8)와 IL-6(Fig.9)의 생성능 역시 金銀花 추출물의 농도에 의존적으로 현저히 억제되었다. 따라서 金銀花 추출물은 pro-inflammatory cytokine의 생성억제효과를 뚜렷하게 나타내었다.

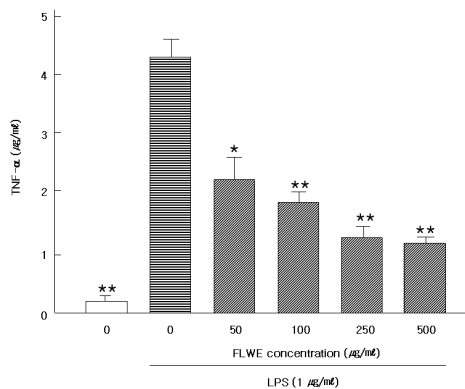


Fig. 7. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the productions of TNF- α in RAW264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/\text{ml}$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without $1 \text{ g}/\text{ml}$ LPS for 6 h. The productions of TNF- α was determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone.

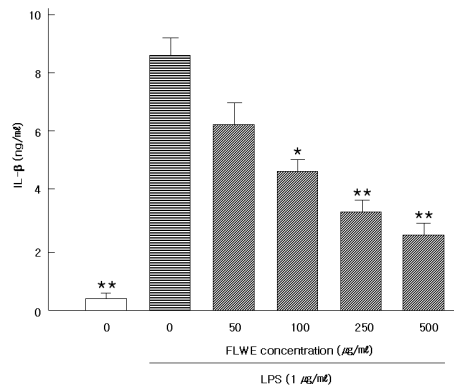


Fig. 8. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the productions of IL-1 β in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/\text{ml}$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without $1 \text{ g}/\text{ml}$ LPS for 12 h. The productions of IL-1 β was determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone.

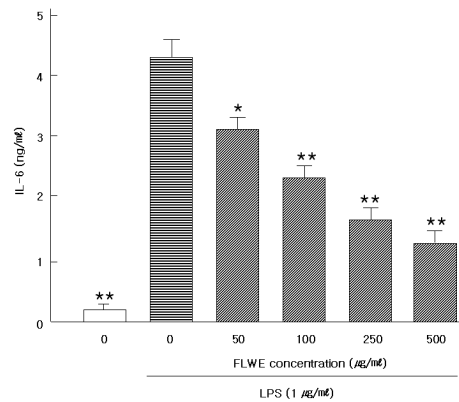


Fig. 9. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on the productions of IL-6 in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS.

Cells($1 \times 10^6/\text{ml}$) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 h, and then incubated with or without $1 \text{ g}/\text{ml}$ LPS for 12 h. The productions of IL-6 was determined as described in Materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from three independent experiments. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ compared with the LPS alone.

7. 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서 arthritis incidence에 미치는 영향

Collagen induced arthritis(CIA) 모델동물에서 金銀花 추출물이 arthritis incidence와 arthritis index에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 10과 같이 金銀花 추출물(500 mg/kg)에 의해 arthritis incidence가 현저하게 감소되었고, Fig. 11과 같이 arthritis index도 뚜렷히 감소되었다. 이러한 결과는 RAW 264.7 대식세포에서 조사한 염증매개물질(NO, PGE₂, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6) 억제 현상과 일치되는 결과를 보였다. 따라서 金銀花는 CIA 모델 동물에서 arthritis incidence와 arthritis index를 현저하게 억제시키는 효과가 있었다.

8. 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서 paw morphology에 미치는 영향

CIA 모델동물에서 金銀花추출물이 paw morphology에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 arthritis incidence 및 index에서 보여준 바와 같이 金銀花 추출물은 paw morphology의 개선효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 12).

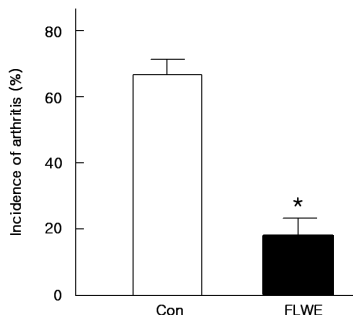


Fig. 10. Effects of *FLOS LONICERAE*(FLWE) on arthritis incidence in collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated FLWE(500 mg/kg, body weight). Arthritis incidence was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean from n=5 mice.

*p<0.01 compared with the control group.

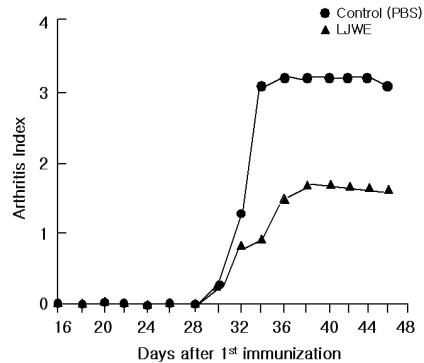


Fig. 11. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on arthritis incidence in collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated FLWE(500 mg/kg, body weight). Arthritis index was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean from n=5 mice.



Fig. 12. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on paw edema in collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated FLWE(500mg/kg, body weight) for 45 days. Morphological changes of paw demonstrated as described in materials and methods.

9. 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향

CIA 모델동물에서 金銀花 추출물이 pro-inflammatory cytokine(TNF- α , IL-1 β , IL-6)들의 변화에 미치는 영향을 알아보았다. 먼저, 1차 면역 후 36일에 대조군과 약물이 투여된 모델동물의 혈청을 분리한 후 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 ELISA법으로 측정하여 정량하였다. TNF- α 는 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군에서 혈청(1.2 ± 0.25 pg/ml, Fig. 13A) 보다는 ankle joint tissue(1.4 ± 0.20 pg/ml, Fig. 13B)에서 매우 많은 양이 생성되었다. 그러나 金銀花 추출물이 투여된 실험군에서는 혈청과 ankle joint tissue에서 각각 0.65 ± 0.15 pg/ml과 0.69 ± 0.08 pg/ml으로 현저히 억제되는 현상을 보였다. IL-1 β 는 대조군에서 혈청(1.1 ± 0.20 pg/ml, Fig. 14A) 보다는 ankle joint tissue(1.2 ± 0.20 pg/ml, Fig. 14B)에서 매우 많은 양이 생성되었다. 그러나 金銀花 추출물이 투여된 실험군에서는 혈청과 ankle joint tissue에서 각각 0.64 ± 0.14 pg/ml과 0.69 ± 0.15 pg/ml으로 현저히 억제되는 현상을 보였고, IL-6의 경우는 대조군에서 혈청(1.1 ± 0.15 pg/ml, Fig. 15A) 보다는 ankle joint tissue(1.4 ± 0.15 pg/ml, Fig. 15B)에서 매우 많은 양이 생성되었다. 그러나 金銀花 추출물이 투여된 실험군에서는 혈청과 ankle joint tissue에서 각각 0.62 ± 0.19 pg/ml과 0.69 ± 0.22 pg/ml으로 현저히 억제되는 현상을 보였다. 이러한 결과는 金銀花는 CIA 모델동물에서 pro-inflammatory cytokine 생산량을 억제하는데 매우 뛰어난 효과가 있음을 알 수 있었다.

10. 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서 PGE₂ 생성 및 COX 활성에 미치는 영향

CIA 모델동물에서 金銀花 추출물이 PGE₂ 생산 및 COX 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저, 1차 면역 후 36일에 대조군과 약물이 투여된 모델동물의 혈청을 분리한 후 PGE₂ 생산 및 COX 활성을 ELISA법으로 측정하여 정량하였다. PGE₂는 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군에서 혈청(3.8 ± 0.75 pg/ml, Fig. 16A)과 ankle joint tissue(3.9 ± 0.50 pg/ml, Fig. 16B)에서 매우 많은 양이 생성되었다.

그러나 金銀花 추출물이 투여된 실험군에서는 혈청과 ankle joint tissue에서 각각 0.98 ± 0.16 pg/ml과 1.1 ± 0.15 pg/ml로 현저히 억제되는 현상을 보였다. COX의 활성은 대조군을 100%로 정했을 때 金銀花가 투여된 실험군에서는 30%로 나타나 약 70%정도 억제시키는 효과가 있었다(Fig. 17).

이러한 결과는 pro-inflammatory cytokine 억제와 일치되는 결과를 보였다. 따라서 金銀花는 강력한 PGE₂와 COX를 억제시키는 효과가 있었다.

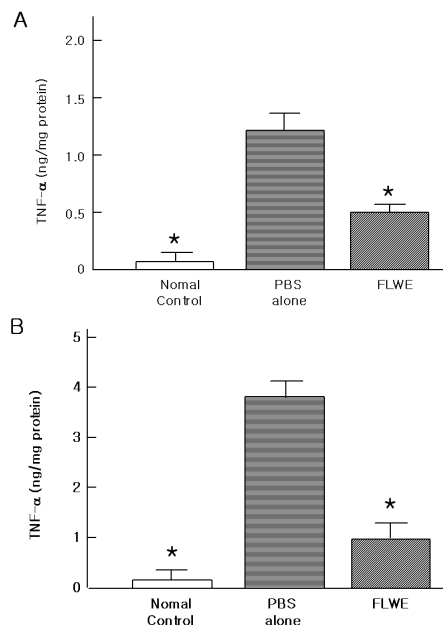


Fig. 13. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on TNF- α production in serum (A) and ankle joint tissue (B) of collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated FLWE(500 mg/kg, body weight) for 36 days.

TNF- α production was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from n=3 mice. *p<0.01 compared with the PBS alone.

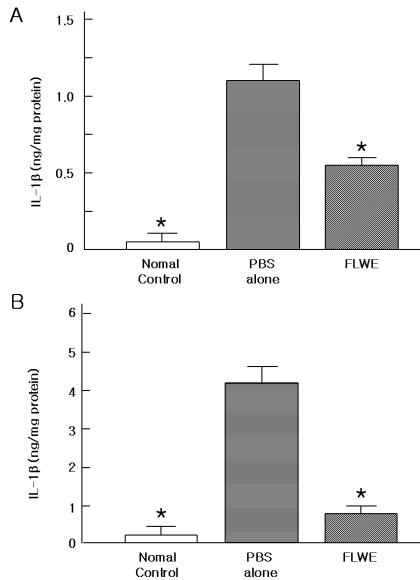


Fig. 14. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on IL-1 β production in serum (A) and ankle joint tissue (B) of collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated (500 mg/kg, body weight) for 36 days. IL-1 β production was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from n=3 mice. *p<0.01 compared with the PBS alone.

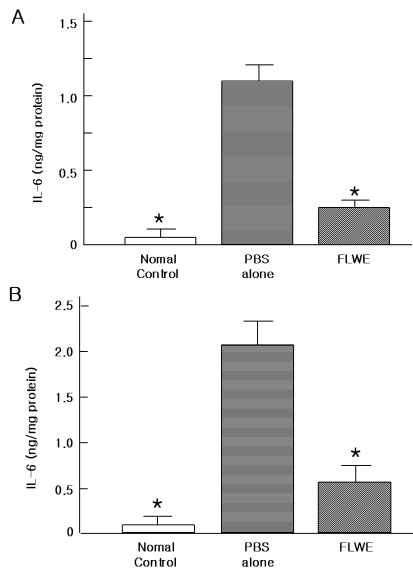


Fig 15. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on IL-6 production in serum (A) and ankle joint tissue (B) of collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated (500 mg/kg, body weight) for 36 days.

IL-6 production was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from n=3 mice.

*p<0.01 compared with the PBS alone.

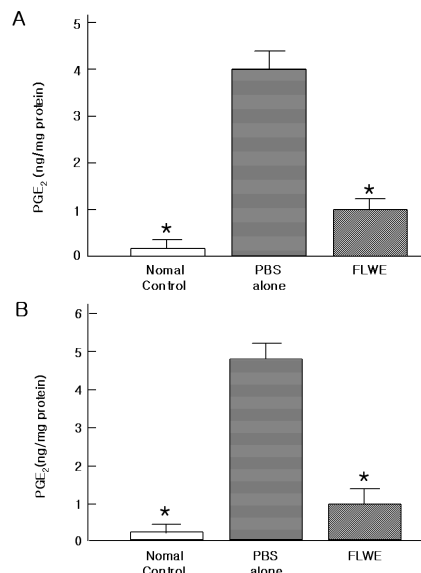


Fig 16. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on PGE₂ production in serum (A) and ankle joint tissue (B) of collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated (500 mg/kg, body weight) for 36 days. PGE₂ production was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from n=3 mice. *p<0.01 compared with the PBS alone.

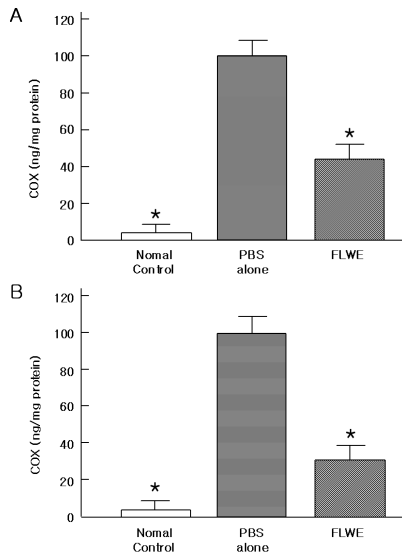


Fig 17. Effects of *FLOS LONICERAE* (FLWE) on COX production in serum (A) and ankle joint tissue (B) of collagen-induced arthritis DBA1J mice.

Mice were administrated(500 mg/kg, body weight) for 36 days.

COX production was determined as described in materials and methods. Each column represents the mean \pm S.D. from n=3 mice. *p<0.01 compared with the PBS alone.

IV. 고 찰

고령인구의 증가에 따라 여러 가지 난치성 질환이 문제점으로 대두되고 있는데 그중 인구가 해결해야 할 대표적인 질병 중에 하나가 關節炎이다. 關節炎은 전 세계 성인인구의 약 10%정도 발병하는 대표적인 만성, 난치성 성인 질환으로 骨關節炎(osteoarthritis)과 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)으로 대별될 수 있다. 骨關節炎이란 關節을 보호하고 있는 軟骨의 손상 혹은 退行性變化로 인하여 關節을 이루는 뼈와 靭帶 등에 손상이 일어나고, 염증과 痛證이 생기는 질환으로 退行性 關節炎으로 불리기도 한다. 骨關節炎는 주로 하나 혹은 둘 정도의 關節에 국한되며 체중이 실리는

關節인 무릎, 股關節, 발 및 脊椎關節 등에 잘 발생한다.

한편 全身性 證狀을 동반하는 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)은 關節의 滑膜에 발생하는 慢性 炎症으로 유발되는 自家免疫 疾患의 일종이다. 여러 關節에, 주로 손 關節에, 대칭적으로 염증을 일으켜 수년 혹은 수십 년에 걸쳐 關節이 서서히 파괴되며, 때로는 關節뿐만 아니라 폐, 심장, 눈, 血管, 神經 등의 여러 장기를 침범하기도 한다. 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)은 男女老少를 막론하고 누구나 걸릴 수 있다. 그러나 주로 30대에 발병하여 身體機能에 장애를 일으켜 ‘삶의 질’을 떨어뜨리고, 작업능력의 저하로 인하여 막대한 경제적 손실을 초래하게 된다. WHO에서는 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)질환으로 인해 증가하고 있는 건강관리상의 부담에 초점을 맞춰 새 천년의 첫 10년을 “骨과 關節의 10년”으로 지정하고 있어 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)의 새로운 치료법과 함께 이 질환의 정복을 위한 新藥의 개발이 절실히 요구되고 있다²⁷⁾.

류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)의 원인은 호중구(neutrophils), 대식세포(macrophages), 섬유아세포(fibroblasts) 등에서 분비된 cytokines 이나 성장인자에 의해 활막섬유세포(synoviocytes), 免疫細胞, 조골세포(osteoblasts) 및 chondrocytes가 활성화되고 이들 세포의 활성화는 활막액의 이상 증식 및 연골의 파괴를 통해 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)을 유발시킨다. 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)의 초기에는 활막세포의 증식과 미세혈관의 손상, 모세혈관정맥 주위의 T-세포의 침윤, T-세포에서 분비되는 cytokine에 의해 활막액의 증식과 염증반응 등이 일어나게 된다²⁸⁻³³⁾. 關節炎의 유발에 관여하는 免疫活成 조절 및 염증매개 인자인 cytokines에는 IL-1, IL-2, IL-6 와 TNF- α 등이 있다. 이러한 cytokine들은 다양한 세포들을 활성화시키며, 유해산소 그리고 NO등의 생성을 증가시켜 연골조직을 지속적으로 파괴하여

關節炎의 진행을 촉진시키는 것으로 알려져 있다^{28,29)}.

류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)의 치료제는 1970년대부터 개발되기 시작하여 유기 합성적인 방법으로 혹은 천연 생리 활성물질을 이용하여 다양한 방법으로 널리 알려지고 있다. 그러나 이러한 유기 합성으로 만들어진 약제들 중의 하나인 non-steroidal anti-inflammatory agents(NSAID)등이 널리 사용되고 있지만, 이러한 약제의 가장 큰 문제는 胃臟管 出血, 항응고작용(bleeding disorder), 수분저류 등 부작용이 심하게 따른다는 것이다. 또한 steroid 제제는 단기간 사용에는 효과적이거나 장기간 사용 시 체중증가, 반월형 안면, 뼈 및 피부의 얇아짐, 여드름, 녹내장, 고혈압, 당뇨병, 감염 및 위궤양등을 유발하기 때문에 장기간 사용이 어려운 실정이다²⁷⁾.

최근, 선진국에서는 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis)의 치료효과는 크고 부작용이 최소화된 약제 개발을 위하여 다양한 노력을 경주하고는 있으나 현재까지 뚜렷한 약물을 개발하지 못하고 있다.

한의학적으로 金銀花가 배합된 방제를 살펴보면, 金銀花散, 金銀白芷散, 二活散, 千金消毒散, 內消沃雪湯, 東垣托裏散, 內托千金散, 仙傳化毒湯, 托裏消毒散, 消毒飲, 蓮翹敗毒散, 天花散, 清熱消毒飲, 托裏消毒飲, 三黃敗毒散등이 있으며¹³⁾, 주로 癰癤 등의 병증에 활용하고 있고, 癰疽, 疔疽, 天疱瘡, 癰疽, 便癰, 乳癰 및 넓은 의미의 化膿性 炎症 병변에 해당되는 것으로 보고 있다⁷⁾.

한편 金銀花는 解熱 消炎 抗콜레스테롤 免役增強 등의 藥理效果가 보고된 바 있고^{38~42,14)}, 氣管支 炎症(respiratory tract infection), 당뇨병(diabetes), 간조직세포 복구에 金銀花를 사용하였고, 金銀花에 함유된 주요물질(triterpenoid saponins, iridoid glycosides, flavones 및 phenice등)이 消炎 炎症작용을 일으키고 있고, 그 기전으로는 nuclear factor- κ B(NF- κ B)를 억제하는 것과 연관성이 있음

을 증명하고 있다¹⁵⁻¹⁹⁾. 최근에는 설치류 RAW 264.7 대식세포를 대상으로 金銀花의 抗炎작용을 보고한 바가 있다²⁰⁾. 따라서 본 연구는 천연물을 이용한 류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis) 치료제 개발에 대한 일환으로 金銀花를 이용하여 *in vitro* 와 *in vivo* 실험을 시행하였다.

먼저 金銀花 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하면 RAW 264.7 대식세포에 金銀花 추출물을 10-500 μ g/ml 농도를 처리한 결과 모든 농도에서 세포의 생존율에 영향을 주지 않았으며, 어떠한 약물이 처리되지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 나타냈을 때 LPS 처리군의 생존율은 약 80%로 감소하였으나, 金銀花 추출물을 10-500 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 농도에 의존적으로 세포생존율이 증가하였다. 특히 100 μ g/ml의 농도에서는 대조군과 비슷하게 세포 생존율이 향상되었다(Fig. 2). 이는 金銀花 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 독성에는 무관하며 오히려 세포에 생존율을 증가시키는 작용이 있음을 시사하고 있다.

金銀花 추출물이 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 알아보면 LPS로 자극한 대조군은 22.2 μ M의 NO를 생성시킨 반면, 金銀花 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 NO의 생성이 현저하게 억제되었다(Fig. 3). 50 μ g/ml의 농도부터 NO 생성 억제효과가 나타났으며, 500 μ g/ml의 농도에서는 NO 생성 억제효과가 현저하게 나타났다. 이는 金銀花 추출물이 NO 생성을 억제함으로써 염증반응을 억제할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

NO 생성 억제와 iNOS와의 관계를 알아보기 위하여 金銀花 추출물이 iNOS 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하여 보면, NO 생성도 억제와 같이 iNOS 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 이는 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제함으로써 NO생성을 억제하고 있음을 알 수 있다.

金銀花 추출물이 PGE₂ 생성에 미치는 영향을

살펴보면 LPS로 자극한 대조군은 1170 ng/ml의 PGE₂를 생성시킨 반면, 金銀花 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 PGE₂의 생성을 현저하게 억제하였다(Fig. 5). 100 µg/ml 농도에서는 PGE₂ 생성 억제효과가 증가하였으며, 500 µg/ml의 농도에서는 현저히 억제하였다. 이는 金銀花散 추출물이 RAW 264.7 대식세포에서 강력한 염증성 매개물질인 PGE₂ 생성을 억제함으로써 염증반응을 억제할 수 있음을 보여주고 있다.

金銀花 추출물이 COX-2 발현에 미치는 영향을 살펴보면 PGE₂ 생성 억제와 같이 COX-2 단백질 발현이 약물의 농도에 의존적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있는데(Fig. 6), 이는 PGE₂ 생성억제가 COX-2 단백질 발현에 의한 것임을 보여주고 있다.

류마티스 關節炎(rheumatoid arthritis) 질환의 유발 원인 중에 하나가 關節내의 대식세포 활성화에 의한 다양한 염증매개 인자인 cytokine의 발현과 생성에 기인한다고 알려져있다. 따라서 金銀花 추출물이 활성화된 대식세포에서 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제효과를 조사한결과 LPS로 활성화된 대식세포는 TNF-α, IL-1β 그리고 IL-6를 다량 생성하였고, 金銀花 추출물은 농도 의존적으로 TNF-α의 생성을 억제하였으며(Fig. 7), IL-1β(Fig 8)와 IL-6(Fig.9)의 생성능 역시 金銀花 추출물의 농도에 의존적으로 현저히 억제하였다. 따라서 金銀花 추출물은 pro-inflammatory cytokine의 생성을 억제하는데 뛰어난 효과가 있었으며, 이러한 결과는 金銀花 추출물이 염증매개 인자인 cytokine의 생성을 억제하므로써 關節炎의 유발이나 진행을 억제할 수 있음을 시사하고 있다.

Collagen induced arthritis(CIA) 모델동물에서 金銀花 추출물이 arthritis incidence에 미치는 영향을 살펴보면, Fig. 10에서와 같이 金銀花 추출물(500mg/kg)에 의해 arthritis incidence가 현저하게 감소되었고, Fig.11에서와 같이 arthritis index도 현저하게 감소되었다. 이러한 결과는 金銀花 추출

물이 RAW 264.7 대식세포에서 조사한 염증매개물질(NO, PGE₂, COX-2, TNF-α, IL-1β, IL-6) 억제 작용과 일치하여 CIA 모델동물에서도 arthritis incidence와 arthritis index가 현저하게 억제되었다. 이는 RAW 264.7 대식세포 실험과 *in vivo*의 CIA모델에서 염증반응 억제에 관한 동일한 경향성을 보여주고 있어 항염증 치료제 개발의 가능성을 보여주고 있다.

金銀花 추출물이 paw morphology에 미치는 영향을 살펴본 결과 arthritis incidence 및 index에서 보여준 바와 같이 金銀花 추출물은 paw morphology의 개선효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 12). 이는 실험동물 모델에서 염증반응 개선효과를 직접 관찰할 수 있음을 보여주고 있다.

CIA 모델동물에서 金銀花 추출물이 pro-inflammatory cytokine 생성에 미치는 영향을 혈청 및 ankle joint tissue에서 살펴보면 TNF-α, IL-1β 및 IL-6등의 pro-inflammatory cytokine 생성이 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군에 비하여 현저히 억제되는 현상을 보였다(Fig. 13A), (Fig. 13B), (Fig. 14A), (Fig. 14B), (Fig. 15A), (Fig. 15B). 이는 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서도 염증성 매개물질인 TNF-α, IL-1β 및 IL-6를 효과적으로 억제하고 있어 관절부위의 염증억제제 개발에대한 유의한 자료가 될 것으로 보여진다.

CIA 모델동물에서 金銀花 추출물이 PGE₂ 생성 및 COX 활성화에 미치는 영향을 살펴보면 Fig.16A, Fig.16B, Fig.17에서와 같이 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군에 비하여 PGE₂의 생성과 COX의 활성화가 혈청 및 ankle joint tissue에서 강력하게 억제되는 효과를 관찰할 수 있는데, 이러한 결과는 pro-inflammatory cytokine 억제작용과 일치하며, 金銀花 추출물이 CIA 모델동물에서도 매우 효과적인 抗炎症 작용이 있음을 보여주고 있다.

이상의 결과를 종합하면, 金銀花 추출물이 RAW 264.7 대식세포에서와 CIA모델동물에서 염증성 매개물질을 현저히 억제하고 있으며, NO, PGE₂ 생

성 억제는 iNOS와, COX-2 단백질 발현 억제에 기인하고 있음을 알 수 있었다.

특히 CIA모델동물 혈청과 ankle joint tissue 에서도 여러 가지 pro-inflammatory cytokine이 억제됨과 동시에 arthritis incidence 및 index, paw morphology 개선 효과가 관찰되고 있는 바 金銀花 추출물이 류머티스 관절염 치료제나, 항 소염제로 개발 가능성을 보여주고 있어 이에 대한 좀더 깊은 기전 연구 및 기존 치료제와의 비교실험이 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

金銀花의 anti-rheumatoid arthritis효과를 세포 배양 조건과 collagen-induced arthritis (CIA)모델 동물 실험을 통하여 관찰 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 金銀花 추출물은 세포 배양 조건에서 RAW 264.7 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하여 NO, PGE₂ 및 pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6)의 생성을 효과적으로 억제 하였다.
2. 金銀花 추출물은 CIA 모델동물에서 PGE₂, COX 및 pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6)의 생성을 효과적으로 억제하였다.
3. 金銀花 추출물은 CIA 모델동물에서 arthritis incidence, index 및 paw edema를 효과적으로 감소시켰다.

이러한 결과는 金銀花가 炎症性 면역질환 뿐만 아니라 關節炎을 예방하거나 치료할 목적으로 응용할 수 있음을 시사하고 있다.

참고문헌

1. 辛民教. 臨床本草學, 서울:永林社. 1991:321.
2. 康秉秀 外. 臨床配合本草學, 서울:永林社, 1994: 230.
3. 김창민, 신민교. 完譯 中藥大辭典, 서울:도서출판 정담. 1997:582-7.
4. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1998:1791-9.
5. 田大準. 實用中藥辭典. 北京:人民衛生出版社. 2002: 1181-7.
6. 김형균. 漢藥의 藥理. 서울:고려의학. 335-6.
7. 문한주. 透膿散의 마우스 刺傷 炎症에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1999.
8. 김호철. 金銀花의 規格化에 관한 研究. 慶熙大學校 大學院. 1993.
9. 新文豐出版公司. 新編中藥大辭典. 臺北:新文豐出版公司. 中華民國71年:1136-9.
10. 高玉敏, 王名洲, 王建平 外; 中草藥, 銀花化學成分研究所, 北京. 1995:26(11):568-9.
11. 鄭虎占等主編. 中藥現代研究與應用. 北京:學苑出版社. 1998:2931-63.
12. 황현서. 金銀花藥鍼이 卵巢摘出 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 1999.
13. 許 俊. 國譯增補東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1995:508, 537, 538, 540, 541, 545, 548, 550, 551, 552, 553, 554, 560, 562, 667.
14. 지형준. 대한약전외한역(생약) 규격집주해. 한국메디칼인텍스사. 1998:134-5.
15. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from Lonicera japonica flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. Int J Mol Med. 2001;7:79-83.
16. Ohta S, Sato N, Tu SH, Shinoda M. Yakugaku

- Zasshi; Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. *Yakugaku Zasshi*. 1993;113:870-80.
17. Tae J, Han SW, Yoo JY, Kim JA, Kang OH, Baek OS, Lim JP, Kim DK, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Anti-inflammatory effect of *Lonicera japonica* in proteinase-activated receptor 2-mediated paw edema. *Clin Chim Acta*. 2003;330:165-71.
 18. Machida K, Sasaki H, Iijima T, Kikuchi M. Studies on the constituents of *Lonicera* species. XVII. New iridoid glycosides of the stems and leaves of *Lonicera japonica* THUNB. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 2002;50:1041-4.
 19. Peng LY, Mei SX, Jiang B, Zhou H, Sun HD. Constituents from *Lonicera japonica*. *Fitoterapia*. 2000;71:713-5.
 20. Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Lee JC, Kook YB, Yun YG. Aqueous extract from *Lonicera japonica* flower Inhibits LPS-induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *J Ethnopharm*. 2003, in press.
 21. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:747-55.
 22. Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS; fluence of pro-inflammatory(IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:681-7.
 23. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62:630-4.
 24. Wahl SM, McCartney-Francis N, Chan J, Dionne R, Ta L, Orenstein JM. Nitric oxide in experimental joint inflammation. Benefit or detriment? *Cells Tissues Organs*. 2003;174:26-33.
 25. Ding CH, Li Q, Xiong ZY, Zhou AW, Jones G, Xu SY. Oral administration of type II collagen suppresses pro-inflammatory mediator production by synoviocytes in rats with adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:416-23.
 26. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2001;3:335-341.
 27. Bonney RC. Treating autoimmune diseases: The market potential for new therapeutic options. *PJBPJB Publication*, 2001:1-244.
 28. Veihelmann A, Hofbauer A, Krombach F, Dorger M, Maier M, Refior HJ, Messmer K. Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology*, 2002; 41:509-17.
 29. Hai le X, Kogure T, Niizawa A, Fujinaga H, Sakakibara I, Shimada Y, Watanabe H, Terasawa K. Suppressive effect of hochu-ekki-to on collagen induced arthritis in DBA1J mice. *J Rheumatol.*, 2002;29:1601-8.
 30. Tokura Y, Sakurai M, Yagi H, Furukawa F, Takigawa M. Systemic administration of hochu-ekki-to(bu-zhong-yi-qi-tang), a Japanese-Chinese herbal medicine, maintains interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol*. 1998;25:131-3.
 31. Needleman P., and Isakson P.C. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol*. 1997; 24 Suppl 49:6-8.
 32. Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C.

- Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cell Immunol.* 1996;173:269-75.
33. Shinada M, Azuma M, Kawai H, Sasaki K, Yoshida I, Yoshida T, Suzutani T, Sakuma T. Enhancement of interferon-gamma production in glycyrrhizin-treated human peripheral lymphocytes in response to concanavalin A and to surface antigen of hepatitis B virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986 Feb;181(2):205-10.