

博士學位論文

난소를 적출한 암컷 쥐에서 CFA로 유발시킨  
관절염에 대한 타조한방약제추출액의 효과



濟州大學校 大學院

獸醫學科

金昇龍

2008年 2月

난소를 적출한 암컷 쥐에서 CFA로  
유발시킨 관절염에 대한  
타조한방약제추출액의 효과

指導教授 李慶甲  
金昇龍

이 論文을 獸醫學 博士學位 論文으로 提出함

2008年 2月

金昇龍의 獸醫學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

委 員 \_\_\_\_\_ (印)

濟州大學校 大學院

2008年 2月

# 목 차

총 론 .....	1
제 1 장. LPS로 자극한 RAW264.7 세포주에서 타조한방약제추출액의 항염증효과 .....	4
서 론 .....	5
재료 및 방법 .....	8
결 과 .....	14
고 찰 .....	25
결 론 .....	27
제 2 장. 난소 적출한 암컷 쥐에서 CFA로 유발시킨 관절염에 대한 타조한방약제추출액의 효과 .....	28
서 론 .....	29
재료 및 방법 .....	31
결 과 .....	35
고 찰 .....	44
결 론 .....	47
총 결 론 .....	48
참고문헌 .....	50

## Abstract

# The Effect of Ostrich Extract with Herbs on the Arthritis Induced by CFA in Ovariectomised Female Rats

Advised by professor Kyoung-kap Lee

Seung-yong Kim

Department of Veterinary Medicine  
Graduate School of Cheju National University  
Jeju 690-756, Korea

This study was performed to find out the effect of ostrich extracts with herbs on the arthritis. First, the ostrich extract composition was analyzed. In vitro, I examined the anti-inflammatory effect of ostrich extract combined with herbs in LPS-stimulated murine RAW264.7 cell by proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) and NO, iNOS concentration. Based on this experiment, I investigated the effect of ostrich extract (OE), herbs extract (HE), ostrich extract with herbs (OEH) on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

The analysis of the composition of the ostrich extract and ostrich extract with herbs showed that they contained 56 % unsaturated fatty acid and 44 % saturated fatty acid, the saturated/unsaturated ratio being 0.78 and that no heavy metals such as lead (Pb), arsenic (As), mercury (Hg), cadmium (Cd) were not detected. Ostrich extract with Herbs significantly inhibited

cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) by LPS-stimulation, especially at 800  $\mu\text{g/ml}$  administration group, compared with ostrich extract and herbs extract. Because of the iNOS inhibition, NO production was significantly low at 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$  group of the ostrich extract with herbs, compared with the other two groups.

Since ostrich extract with herbs was administrated, the clinical signs of the arthritis rats have begun to improve in two weeks and have significantly improved in four weeks, compared with the other two groups. And the number of WBC has significantly decreased in 6 weeks. Cholesterol concentration was increased at ostrich extract group and ostrich extract with herbs group. HDL concentration was significantly high at OEH group in two weeks, while LDL concentration was significantly high at OEH, OE, HE groups in two weeks compared with the control group. In early arthritis, TNF- $\alpha$  was increased, in OE, HE, OEH groups, TNF- $\alpha$  was significantly low compared with the control group. Estrogen concentration was significantly high at OE, HE, OEH groups in two weeks compared with the control group. The estrogen concentration of OEH group was significantly higher than that of the other two group.

In conclusion, ostrich extract with herbs inhibited inflammation-mediated cytokines production and prevented inflammation by arresting NO synthesis. Also, OEH improved the clinical signs of arthritis caused by CFA in ovariectomised female rat and it was confirmed that OEH was therapeutic effect on the arthritis because of anti-inflammation.

**Key words :** Arthritis, Ostrich extract, TNF- $\alpha$ , IL-6, ovariectomised female Rat

## 총 론

류마티스 관절염은 전신적인 염증성 자가면역을 이상으로 하는 대칭성 질병으로 여러 관절의 부종과 동통 및 관절의 기능부전을 나타낸다. 관절내 염증은 synovial lining의 활성화와 증식의 원인이 되며, 염증세포와 cytokines, B-cell의 활성을 증가시키고, 자가 면역항체 생산을 자극한다 (Sturrock, 2006). 또한 관절내 matrix metalloproteinase (MMP) 생산을 증가시키고 결과적으로 관절의 파괴를 일으킨다 (Yoshihara *et al*, 2000; Vandooren *et al*, 2004; Schurigt *et al*, 2005). 류마티스 관절염 발생은 유전, 감염, 환경, 식생활의 차이로 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다 (Van den Berg and Bresnihan, 1999). 세계적으로 1~1.5 % 발생율이 보고되고 있으며 (Khurana and Berney, 2005), 미국은 3.5~5.3 %, 일본은 0.1 %의 발생율이 보고되고 있다 (Wood *et al*, 1967).

류마티스 관절염에서 macrophage는 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 와 nitric oxide (NO), prostaglandins (PGE2)과 같은 염증 매개 물질을 생성하여, 염증성 질병 진행에서 중요한 역할을 한다 (Paul *et al*, 1999; Fujiwara and Kobayashi, 2005). 염증 매개물질의 과다한 생성은 류마티스성 관절염 (Manzi and Wasko, 2000), 동맥경화증 (Libby *et al*, 2002), 천식 (Tak and Firestein, 2001), 폐 섬유증 (Coker and Laurent, 1998)과 같은 많은 질병을 일으킨다.

여성호르몬인 estrogen이 결핍되면 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF (macrophage colony stimulating factor)와 같은 cytokines의 생성이 증가되고, 골세포의 증식과 분화, 골 흡수와 골 소실의 증가를 일으킨다 (Harada and Rodan, 2003; Nanes, 2003). 그리고 IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 골 형성 저해 요인이 되며 동시에 골 흡수의 주요 원인이 된다 (Rahnama *et al*, 2002; Nanes, 2003; Cutolo *et al*, 2004). 특히 폐경기 여성에서 estrogen 결핍은 여러 가지 염증 관련 cytokine의 생성을 유발하여 관절염을 더욱 악화시키고 (Nagamine *et al*, 2001), 골다공증



(Rahnama *et al*, 2002)을 일으킨다.

류마티스 관절염 치료는 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 첫째는 염증 및 통증의 최소화, 둘째는 관절의 파괴를 막아 장기적으로 관절 변형과 기능장애의 최소화, 셋째는 환자에게 부담이 적으면서 효과적인 약물을 환자 개개인에게 적절하게 사용하는 것이다. 일반적으로 관절염의 치료에 공통적으로 쓰이는 약제로는 비스테로이드 소염제 (Non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)이고, DMARD (Disease Modifying Anti-rheumatic Drugs)와 cytokines 억제제 (remicade, infliximab, etanercept, adalimumab 등) 등의 약물들이 쓰이고 있다 (Scallon *et al*, 2002; Rannou *et al*, 2006; Valesini *et al*, 2007). 일반적으로 통증완화, 항염증 및 관절의 기능을 보전하는 방향으로 치료제 개발이 이루어져 왔을 뿐 근본적인 관절염의 치료는 불가능하다. 이러한 치료제들은 장기간에 걸쳐 투여하게 되면, 위장계, 중추신경계, 조혈기관, 신장, 간 등에 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Klippel, 2000). 따라서 이들 약제의 부작용을 최소화하기 위해서 최근 들어서 한방약제에 대한 연구들이 진행되고 있다.

한방약제들 중에서 관절염에 사용되는 약제로는 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*), 황정 (*Polygonatum sibiricum* Delar) 등이 있고, 항염증 작용은 당귀 (*Angelica sinensis*), 진피 (*Fraxinus rhynchopylla*) 등이 이용되며, 진통작용에는 갈근 (*Pueraria lobata*), 계지 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb), 천궁 (*Cnidium officinale* Makino) 등이 쓰인다 (Huang, 1993). 이러한 한방제제들은 염증 반응에 관여하는 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6 등의 생성을 억제한다 (Jung *et al*, 2007).

타조 또한 이러한 한방제들과 더불어 관절에 효과적이라는 민간요법이 있지만 아직 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 그리고 최근 타조의 불포화 지방산과 호르몬이 염증완화에 효과적이라는 보고가 있으며 (Kim *et al*, 2003), 타조한방약제추출액이 항염증 효과와 혈중 중성지방인 트리글리세라이드와 콜레스테롤을 감소시킨다는 연구 (Kim *et al*, 2004)가 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 타조한방약제추출액이 항염증 작용 및 관절염 치료에 효과가 있는지를 알아보기 위해서 RAW 264.7 cell에 LPS를 자극하여 염증 관련 cytokine의 발현 (IL-6와 TNF- $\alpha$ ) 및 NO 발생을 조사하였다. 그리고, 난소를 적출한 암컷 쥐에 CFA (Complete Freund's Adjuvant)로 관절염을 유발시켜서 타조한방약제 추출액을 경구 투여하고 임상증상, WBC, cholesterol, HDL, LDL, TNF- $\alpha$ 와 estradiol 등을 검사하여 관절염에 대한 효과를 알아보았다.

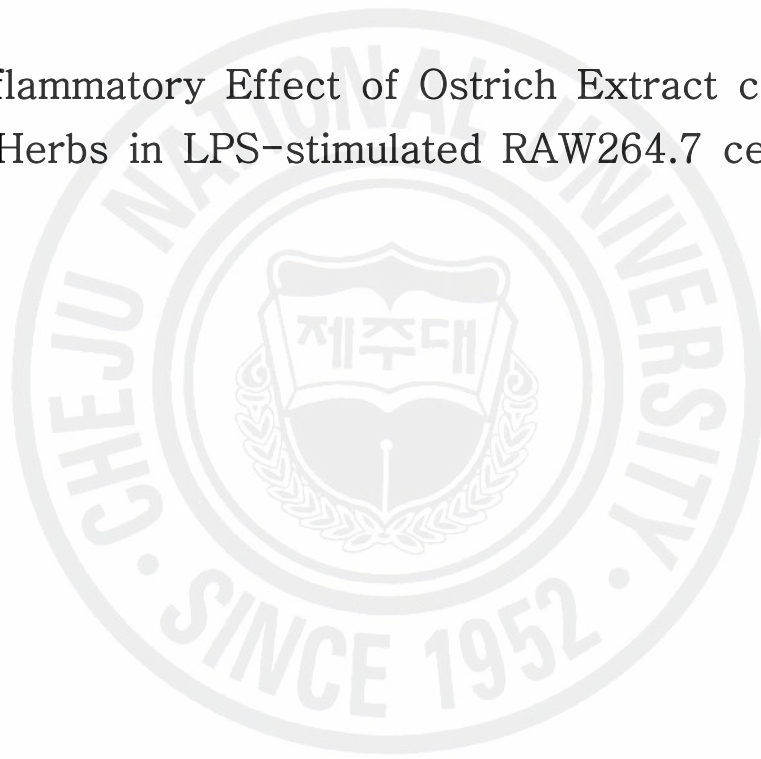




## 제 1 장

### LPS로 자극한 RAW 264.7 세포주에서 타조한방약제추출액의 항염증효과

Anti-inflammatory Effect of Ostrich Extract combined  
with Herbs in LPS-stimulated RAW264.7 cell line



## 서 론

관절은 연골, 윤활세포, 윤활액, 관절강으로 구성되어 있고, 윤활액내 면역조절인 자들에 의해서 정상적인 기능 및 외부 병원체로부터 방어기능을 하고 있다. 병원성 미생물 (바이러스, 세균)에 대한 방어는 체액성 및 세포성 면역 기능에 의해서 이루어지고 있으며, 체액성 면역은 면역관련 세포에서 분비되는 여러 가지 cytokines에 의해서 이루어진다 (Klaus, 1988).

내독소로 알려진 lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성세균의 세포 외막에 존재하며, 탐식세포 (macrophage)로부터 다양한 염증 발생인자로 알려진 tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )와 같은 proinflammatory cytokines를 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Scott and Hancick, 2000; Mangalam *et al*, 2002; An *et al*, 2002; Kim *et al*, 2005). TNF- $\alpha$ 와 같은 여러 가지 기능을 가지는 cytokine은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 염증 병변 과정에서 발현이 증가한다 (Groves *et al*, 1995). 류마티스 관절염에서도 TNF- $\alpha$ 와 IL-6같은 cytokines의 발현은 증가한다 (Ishii *et al*, 2003). LPS 자극에 의해서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 염증성 cytokines들을 생성하며 (Paul *et al*, 1999; An *et al*, 2002; Kim *et al*, 2005), 이들은 다시 주위의 활성화된 세포들을 더욱 활성화하여 nitric oxide(NO) 등을 생성하도록 한다 (Nagy *et al*, 2007). 이 같이 생성된 cytokine들과 NO는 면역 및 염증반응에서 핵심적인 역할을 하게 된다.

체내 염증과정에서는 과량의 NO 및 PGE2 등의 염증인자가 NO synthase (NOS) 및 cyclo-oxygenase (COX)에 의해서 생성된다. 이중 NO는 NOS라는 inducible 또는 constitutive enzymes에 의하여 생성되는 반응성 자유기로서 (Choi *et al*, 1996; Nagy *et al*, 2007) 체내 방어기능, 신호전달기능, 신경독성, 혈관확장 등의 다양한 생리 기능을 가지고 있다 (Nathan, 1992; Kim *et al*, 2005). NOS는

물리 화학적 성상에 따라 3종류의 효소로 나누어지고 (Gaby *et al*, 1997), 세포 속에서 계속적으로 존재하기 때문에 Type I (neuronal NOS)과 Type III (endothelial NOS; eNOS)는 constitutive NOS로 분류되며 (Hartmut *et al*, 1996; Kleinert *et al*, 2004), 상대적으로 일부 세포에서 LPS 및 cytokine, 세균독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현하는 Type II (inducible NOS; iNOS)가 있다 (Stuher *et al*, 1991; Iida *et al*, 1992; Ryu *et al*, 2003). 이들 중에서 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며, 산소 radical은 염증성 조직의 발암현상에 관여하므로 병리적으로도 중요한 역할을 한다 (Ohshima and Bartsch, 1994). 일반적인 NO의 형성은 세균을 죽이거나 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 일으킨다 (Weisz *et al*, 1996).

일반적으로 관절염에서 일차적 그리고 공통적으로 쓰이는 약제가 NSAID이고, DMARD와 cytokine 억제제 등의 약물들이 있다. 비용면에서 고가인 Methotrexate hydroxychloroquine (MTX)은 다른 DMARD와 병용하여 사용하는 약으로 알려져 있다 (Rannou *et al*, 2006). TNF- $\alpha$  억제제는 remicade, infliximab, etanercept, adalimumab 등이 있는데, 이들은 혈액과 조직에서 TNF- $\alpha$ 를 중화시켜서 염증을 억제하는 역할을 한다 (Scallon *et al*, 2002; Valesini *et al*, 2007).

한방약제에는 항염증 작용이 있는 것으로 당귀 (*Angelica sinensis*), 진피 (*Fraxinus rhynchopylla*) 등이 있고 (Yang *et al*, 2007), 진통작용이 있는 것으로 갈근 (*Pueraria lobata*), 계지 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb), 천궁 (*Cnidium officinale* Makino) 등이 이용되고 있으며, 그리고 관절염에는 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*), 황정 (*Polygonatum sibiricum* Delar)등이 이용되고 있다 (Huang, 1993). 이러한 한방제제들은 염증 반응에 관여하는 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Jung *et al*, 2007).

타조 또한 이러한 한방약제들과 더불어 관절에 효과적이라는 민간요법이 있지만

아직 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 최근 타조의 불포화 지방산과 호르몬이 염증 완화에 효과적이라는 보고가 있으며 (Kim *et al*, 2003), 타조한방약제추출액이 항염증 효과와 혈중 중성지방인 트리글리세라이드와 콜레스테롤을 감소시킨다는 보고도 있다 (Kim *et al*, 2004).

본 연구에서는 타조한방약제추출액의 성분을 분석하고, 항염증 효과를 평가하기 위해서 murine macrophage계 RAW 264.7 세포주를 LPS로 자극한 다음 타조한방약제추출액을 적용하여 염증과 관련되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 발현 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발생을 조사하였다.



## 재료 및 방법

### 1. 타조 및 한방약제 시료의 추출

#### 1.1 타조 추출액 제조

타조 (1 년령 수컷)를 도축하여 타조 뼈 10 kg과 고기 2 kg에 물을 첨가하여 30 kg이 되도록 하여 110 °C에서 72시간 가열한 후 상층 지방을 제거 (약 6 kg)하였다. 최종적으로 고기와 뼈를 제외한 추출액 (약 15 ℓ)을 멸균하며 (120°C, 4분) 실험에 사용하였다 (Fig 1).

#### 1.2 한방약제추출액 제조

한방약제는 가시오가피 (*Acantopanax senticosus*), 당귀 (*Angelica sinensis*), 백출 (*Atractylodes ovata* DC), 작약 (*Paeonia lactiflora*), 황정 (*Polygonatum sibiricum* Delar), 복분자 (*Robus crataegifolius* Bunge), 홍화 (*Carthamus tinctorius* L), 속지황 (*Rehmanniae Radix* Preparata), 계지 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb), 육계 (*Cassia Cinnamon*), 곽향 (*Pogostemon cablin* Benth), 갈근 (*Pueraria lobata*), 진피 (*Fraxinus rhynchopylla*), 하수오 (*Persicaria perfoliata* H), 천궁 (*Cnidium officinate* Makino), 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge), 구기자 (*Lycium chinenserubus*), 상지 (*Morus alba* L), 인진 (*Artemisia capillaris*), 복령 (*Poria cocos*), 산사 (*Crataegus pinnatifida* Bunge)는 각각 50 g씩, 맥아 (*Hordeum vulgare*), 두충 (*Eucommia ulmoides*), 생강 (*Zingiber officinale* Rose), 대추 (*Zizyphus jujuba* miller var), 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)는 각각 100 g씩을 넣고 물 5 ℓ를 첨가하여 1 시간동안 가열하였다. 최종 추출액이 5 ℓ가 되었을 때, 멸균과정 (120°C, 4분)을 거쳐 실험에 사용하였다.

### 1.3 타조한방약제추출액 제조

타조추출액 15 l에 26종 약제 (가시오가피, 당귀, 백출, 작약, 황정, 복분자, 홍화, 숙지황, 계지, 육계, 곽향, 갈근, 진피, 하수오, 천궁, 황기, 구기자, 상지, 인진, 복령, 산사를 각각 50g과 맥아, 두충, 생강, 대추, 감초를 각각 100g)를 넣고 약제 추출기에서 약 3시간 가열하여 15 l로 농축하고 멸균하여 보관하였다 (Fig 1).

### 1.4 추출액의 분석 및 동결건조

위 추출과정에서 얻은 타조추출액과 타조한방약제추출액은 (주)과학기술분석센터 (대전광역시 대덕구 석봉동 317-7)에 추출액의 성분 분석을 의뢰하였다. 그리고 타조추출액, 한방약제추출액, 타조한방약제추출액을 동결건조 (각각의 추출액 100 ml을 동결 건조시켜서 타조추출액과 한방약제추출액 각각 6 g과 타조한방약제추출액 10 g의 건조분말)시켜 항염증 효과 및 관절염 실험의 시료로 사용하였다.

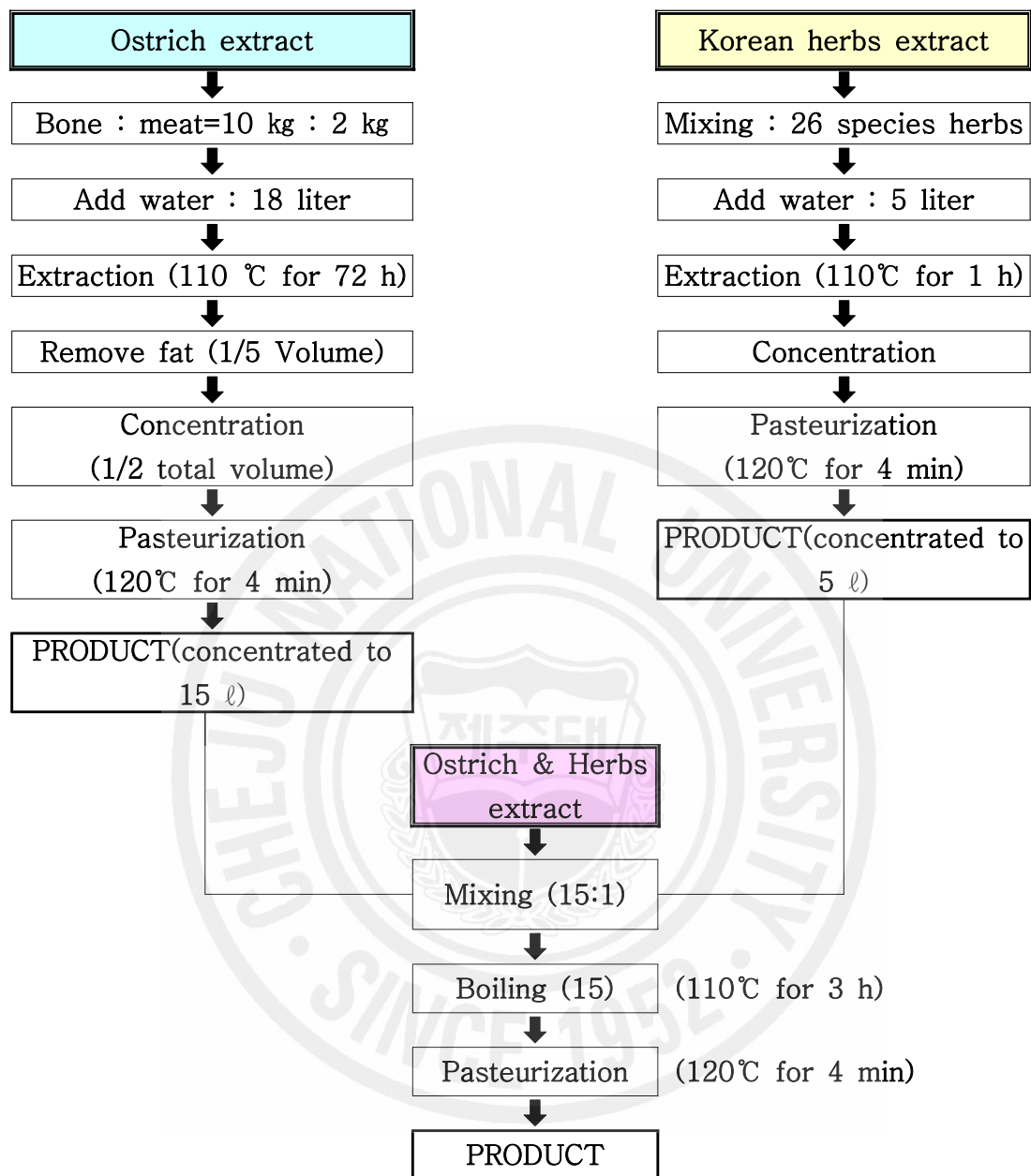


Fig 1. Flow diagram for ostrich extract combined with Korean herbs medicine



## 2. 세포주 배양 및 시약

염증 자극에 대한 항염증 효과를 평가하기 위해서 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주를 Korean Cell Line Bank (KCLB)로부터 분양받아 100 unit/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한번씩 계대 배양하였다. 염증 자극을 위한 lipopolysaccharide (LPS; *E. coli* serotype 0111:B4)는 Sigma (St Louis MO, USA)로 부터 구입하여 실험에 사용하였다.

## 3. Proinflammatory cytokines의 생성 및 정량

RAW 264.7 세포를 DMEM 배지를 이용하여 4.0x10<sup>5</sup> cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 분주하고, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 18시간 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 각 시료의 농도활성을 위해 독성을 나타내지 않는 최대 농도인 800 µg/ml 그리고 1/2인 400 µg/ml, 200 µg/ml과 LPS 최종농도 (1 µg/ml)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 전 배양과 동일 조건하에서 배양하였다. 6시간 후 배양 배지를 원심분리 (12,000 rpm, 3분)하여 상층액을 분리하였다 (An *et al*, 2002). 얻어진 상층액에서 TNF-α 및 IL-6 정량은 murine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D system, Inc, USA)를 이용하여 정량하였다.

## 4. RNA 분리

RAW 264.7 세포 (8.0x10<sup>5</sup> cells/ml)를 18시간 배양하고 10배 농도로 조제된 시험약물과 LPS (최종농도 1µg/ml)를 동시 처리하여 시간별로 배양한 후 total RNA 추출은 TRI-reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRI-reagent를 첨가하여 균질화한 후, chloroform을 첨가하여 원심분리 하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 원심분리 시켜 RNA를 침전시키고, 80% 에탄올로 세척한 후 건조시켜 DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 처리한 증류수에 용

해시켰다. 260 nm의 흡광도에서 측정하여 RNA를 정량하였고,  $A_{260}/A_{280}$ 의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase free한 조건하에서 실시하였다.

## 5. RT-PCR

cDNA 합성을 Improm-II™ cDNA kit (Promega, USA)를 이용하여, 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligo(dT)<sub>18</sub> primer, dNTP (0.5  $\mu$ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2 U)로 70°C에서 5분, 25°C에서 5분, 37°C에서 60분, 그리고 70°C에서 15분 가열하여 반응시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)을 2  $\mu$ l cDNA, 4  $\mu$ M의 각 primer, 10 $\times$  buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250  $\mu$ M dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit Taq polymerase (Promega, WI, USA)를 혼합하여, 멸균 증류수로 최종 25  $\mu$ l로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 55~58°C/45초, 72°C/60초 30회이며, PCR에 의하여 증폭된 산물은 ethidium bromide 함유 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 각 primer (TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS)에 맞는 band 크기를 확인하였다 (Kim *et al*, 2007) (Table 1).

Table 1. The sequences of primers and fragment sizes of the investigated genes in RT-PCR analysis (Kim *et al*, 2007)

Gene	Primer sequences (5'→3')	Fragment size (bp)
TNF- $\alpha$	F 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'	364
	R 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	
IL-6	F 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	308
	R 5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'	
iNOS	F 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'	496
	R 5'-GGCTGTTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'	
$\beta$ -actin	F 5'-GTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3'	603
	R 5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	

## 6. Nitric oxide assay

RAW 264.7 세포에 대하여 DMEM 배지를 이용하여  $1.7 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상층액  $100 \mu\text{l}$ 와 Griess시약 [1 % (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid]  $100 \mu\text{l}$ 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader (Diareader ELX 800G, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Green *et al*, 1982). 표준농도 곡선은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )를 serial dilution하여 얻었다 (1-100  $\mu\text{M}$ ).

## 7. 통계 처리

SAS 프로그램을 이용하여 동일군내 용량에 따른 변화 및 동일 용량에 대한 군간 유의성은 분산분석 (ANOVA)으로 검증하였으며, 1%와 5% 유의수준에서 검증하였다.

## 결 과

### 1. 타조 추출액과 한방약제 추출액의 성분분석

타조추출액과 타조한방약제추출액을 (주)과학기술분석센터에 의뢰하여 분석한 결과, 타조추출액과 타조한방약제추출액에서 탄수화물, 조단백, 조지방이 각각 0.01와 2.53 %, 5.60과 6.78 %, 0.05와 0.02 % 였다. 칼슘, 마그네슘, 철분, 인, 셀레늄 등은 각각 9.60과 14.60 mg/100g, 11.20과 16.24 mg/100g, 1026.4와 2493.2 ppb, 24.50과 38.17 mg/100g 그리고 99.6과 93.0 ppb 였으며, 납 (Pb), 비소 (AS), 수은 (Hg), 카드뮴 (Cd)과 같은 중금속은 검출되지 않았다.

지방분석에서 타조추출액과 타조한방약제추출액의 포화지방산은 각각 43.17과 44.43 %였으며 불포화지방산은 각각 55.27과 55.42 % 였다. 지방 분석에서 불포화지방산에 대한 포화지방산의 비율은 타조추출액이 0.78, 타조한방약제 추출액이 0.80 이었다 (Table 2). 그리고 타조추출액과 타조한방약제 추출액에서 다량 함유되어 있는 지방산들로는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid로써 각각 24.06과 23.81 %, 6.25와 4.30 %, 34.35와 31.11 % 그리고 9.84와 15.64 % 였다 (Table 2).

Table 2. Analysis of ingredient for the ostrich extract and ostrich extract combined with herbs

Ingredients	OE	OEH
Saturated		
Fatty acid (%)		
C 6:0 Caproic acid	ND	5.39
C 8:0 Caprylic acid	1.14	0.68
C10:0 Capric acid	0.19	0.22
C12:0 Lauric acid	0.68	2.12
C13:0 Tridecanoic acid	6.54	4.94
C14:0 Myristic acid	2.30	1.47
C15:0 Pentadecanoic acid	0.53	0.28
C16:0 Palmitic acid	24.06	23.81
C17:0 Magaric acid	0.35	0.26
C18:0 Stearic acid	6.25	4.30
C20:0 Arachidic acid	0.17	0.10
C21:0 Heneicosanoic acid	0.42	0.56
C22:0 Behenic acid	ND	0.12
Unsaturated		
C16:1 Palmitoleic acid	7.15	6.32
C14:1 Myristoleic acid	0.14	0.24
C18:1 Oleic acid	34.35	31.11
C18:2n6 Linoleic acid	9.84	15.64
C18:3n3 Linolenic acid	3.23	1.60
C20:1 Eicosenoic acid	0.71	0.28
C22:1 Eruic acid	0.39	0.18
C22:6n3 DHA	ND	0.23
Total saturated fatty acid	43.17	44.43
Total unsaturated fatty acid	55.27	55.42
Saturated / Unsaturated fatty acid ratio	0.78	0.80
Water (%)	94.34	90.67
Carbohydrate (%)	0.01	2.53
Crude protein (%)	5.60	6.78
Crude fat (%)	0.05	0.02
Ca (mg/100g)	9.60	14.60
Mg (mg/100g)	11.20	16.24
Phosphorus (P)(mg/100g)	24.50	38.17
Iron (Fe) (ppb)	1026.4	2493.2
Selenium (Se) (ppb)	99.6	93.0
Lead (Pb)	ND	ND
Arsenic (As)	ND	ND
Mercury (Hg)	ND	ND
Cadmium (Cd)	ND	ND

OE : ostrich extract, OEH : ostrich extract with herbs

\* ND : not detected

## 2. Pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6)의 변화

RAW 264.7 cell에 LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )로 자극하여 염증 관련 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 pro-inflammatory cytokine 생성을 유도한 결과에서, 실험에 사용한 각각의 추출액을 단독 처리하였을 때에는 어떠한 cytokine 생성에 영향을 보이지 않았으며, 세포 독성도 나타내지 않았다. LPS 자극과 함께 각각의 추출액을 동시에 처리하였을 때, 타조추출액 800  $\mu\text{g/ml}$ , 타조한방약제추출액 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 LPS 단독 처리에 비해 TNF- $\alpha$  생성이 유의성 있게 억제되었으며 ( $P < 0.05$ ), 이중 타조한방약제추출액 400과 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 다른 군에 비해서 유의성 있게 TNF- $\alpha$  생성이 억제되었다 ( $P < 0.01$ ) (Fig 2). IL-6 생성도 TNF- $\alpha$ 와 같이 타조추출액 800  $\mu\text{g/ml}$ , 타조한방약제추출액 200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 LPS 단독 처리에 비해 유의성 하게 억제되었다 ( $P < 0.01$ ) (Fig 3).



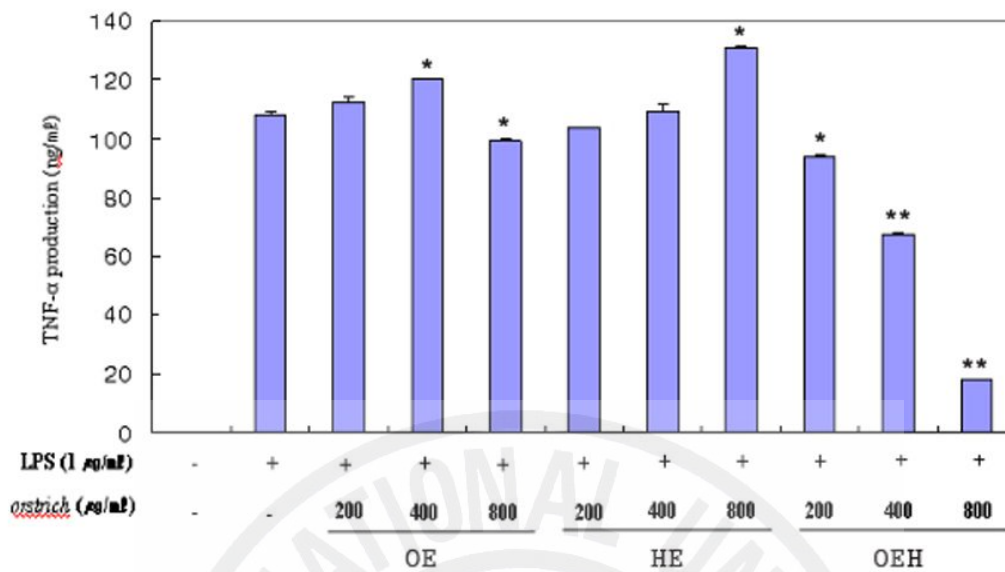


Fig 2. Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the production of TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells ( $4.0 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of sample for 24 hrs. The production of TNF- $\alpha$  was determined by ELISA methods. The data represent the mean  $\pm$  SD of duplicate experiments.

Asterisks indicate significance for change from only LPS stimulation group: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs



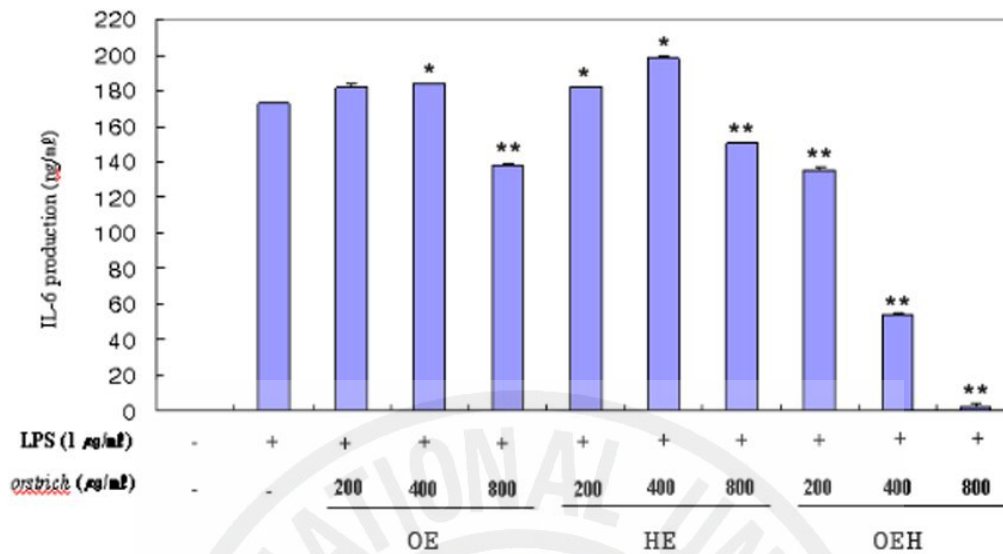


Fig 3. Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the production of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

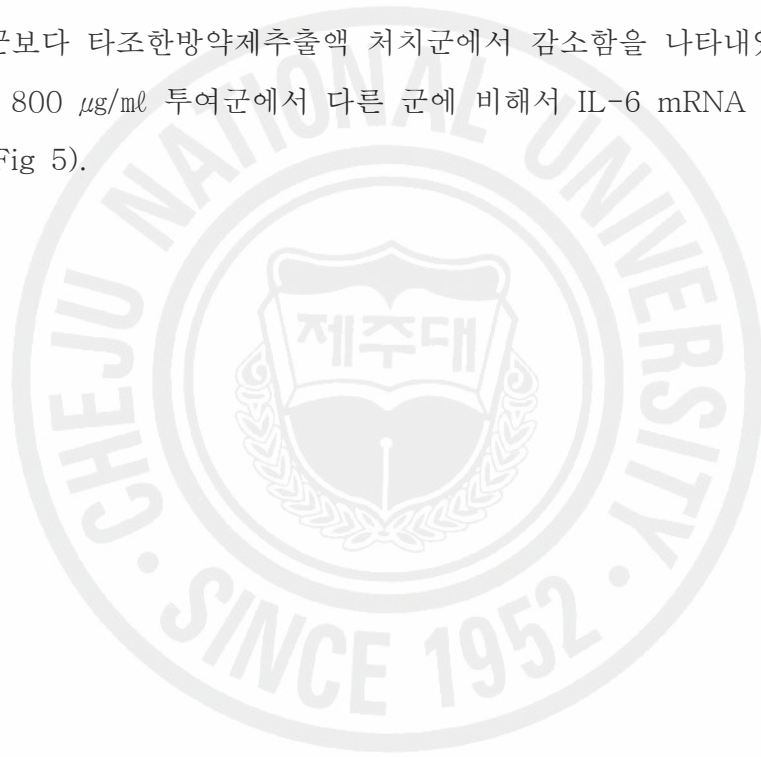
RAW 264.7 cells ( $4.0 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of sample for 24 hrs. The production of IL-6 was determined by ELISA methods. The data represent the mean $\pm$ SD of duplicate experiments.

Asterisks indicate significance for change from only LPS stimulation group: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs

### 3. Pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6) mRNA 발현의 변화

TNF- $\alpha$ , IL-6 cytokines 생성 억제를 mRNA 수준에서 알아보기 위해서 RAW 264.7 cells  $8.0 \times 10^5$  cells/ml에 LPS와 각 시료를 함께 처리하여 각 cytokine mRNA 발현에 대한 억제 효과를 조사한 결과, TNF- $\alpha$  mRNA 발현은 타조추출액과 한방약제추출액 처치군보다 타조한방약제추출액 처치군에서 감소함을 나타내었으며, 타조한방약제추출액 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 다른 군에 비해서 TNF- $\alpha$  mRNA 발현이 강하게 억제되었다 (Fig 4). IL-6 mRNA 발현 또한 타조추출액과 한방약제추출액 처치군보다 타조한방약제추출액 처치군에서 감소함을 나타내었으며, 타조한방약제추출액 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 다른 군에 비해서 IL-6 mRNA 발현이 강하게 억제되었다 (Fig 5).



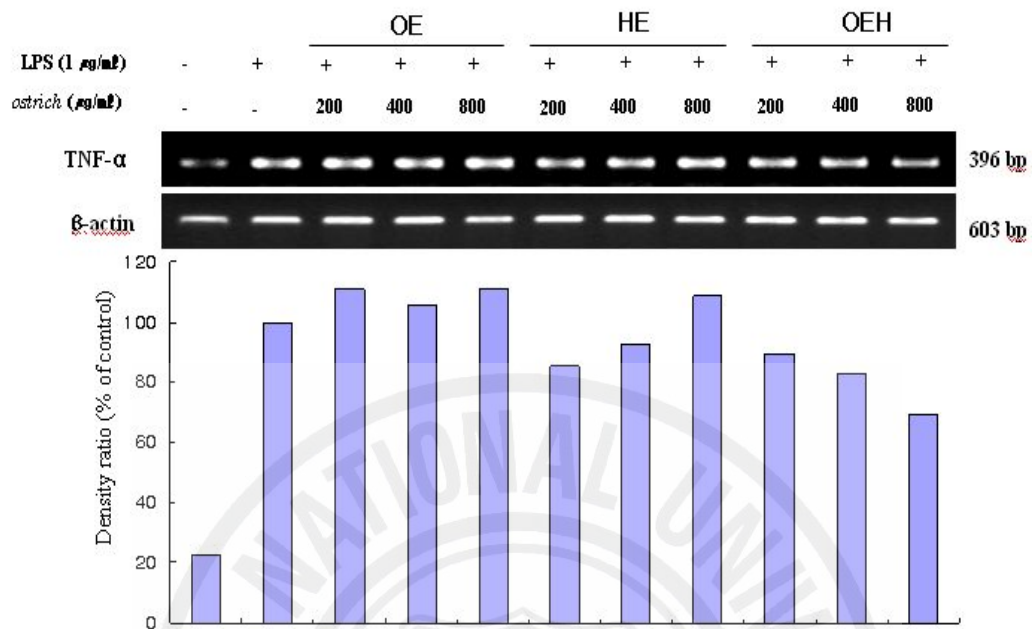


Fig 4. Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the mRNA expression of TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells ( $8.0 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of sample for 18 hrs. The mRNA expression of TNF- $\alpha$  was determined by RT-PCR.

OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs

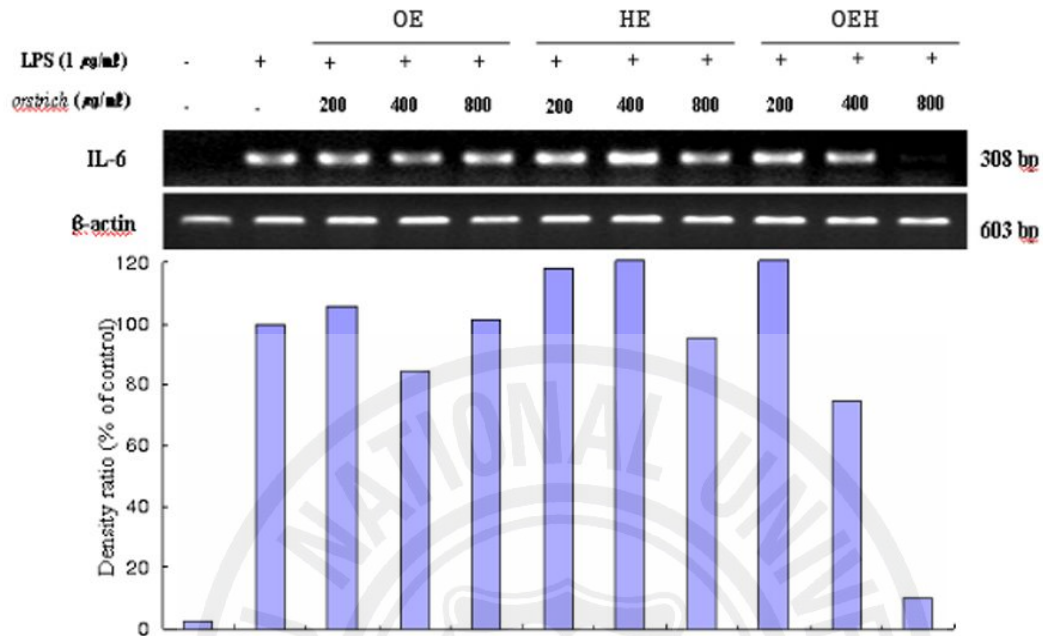
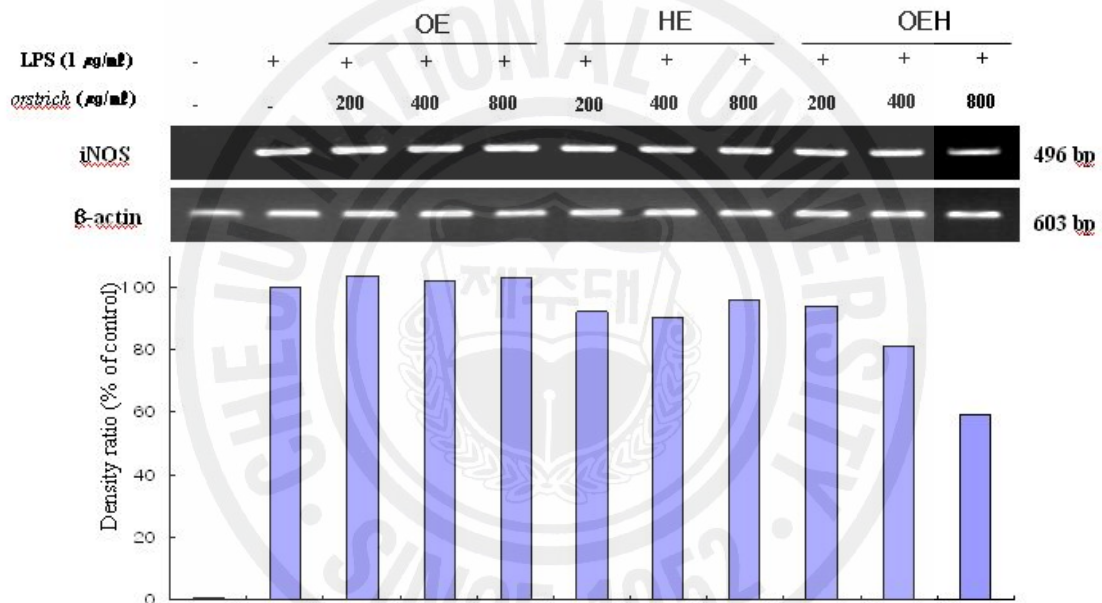


Fig 5. Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the mRNA expression of IL-6 in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $8.0 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of sample for 18 hrs. The mRNA expression of IL-6 was determined by RT-PCR. OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs.

#### 4. iNOS mRNA 발현의 변화

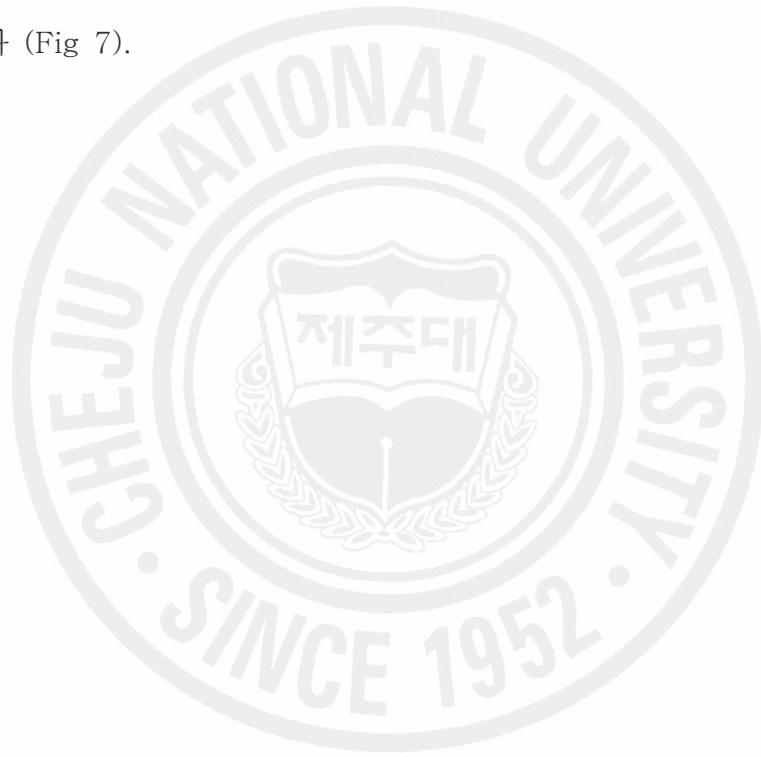
RAW 264.7 cell ( $8.0 \times 10^5$  cells/ml)에 대하여 LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )로 자극하여 iNOS 생성을 유도하여 각 추출액과 농도에 따른 mRNA 발현정도를 RT-PCR로 조사한 결과는 LPS에 의해서 iNOS는 증가하였다. 타조추출액 투여군에 비해 한방약제추출액 투여군이 더 감소되었고, 타조한방약제추출액 투여군 중  $400 \mu\text{g/ml}$ 과  $800 \mu\text{g/ml}$  투여군이 다른 군에 비하여 mRNA 발현이 감소되었다 (Fig 6).



**Fig 6.** Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the mRNA expression of iNOS in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $8.0 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) in the presence of sample for 18 hrs. The mRNA expression of iNOS was determined by RT-PCR. OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs.

## 5. Nitric oxide (NO) 생성의 변화

염증 유발에 중요한 역할을 하는 NO 생성에서는 LPS 단독 투여군에서 생성 농도를 100으로 하였을 때, 타조추출액과 한방약제추출액 투여군에서는 차이를 보이지 않았으나 타조한방약제추출액 200  $\mu\text{g/ml}$  투여군 ( $P<0.05$ ), 400  $\mu\text{g/ml}$  투여군 ( $P<0.05$ ), 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군 ( $P<0.01$ )에서 유의적으로 낮은 발생을 보였다 (Fig 7). Cell viability 역시 타조한방약제추출액 투여군이 대조군과 다른 군에 비해서 10% 정도 (200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 각각 9.5, 11.4, 10.1 %) 높게 나타났다 (Fig 7).



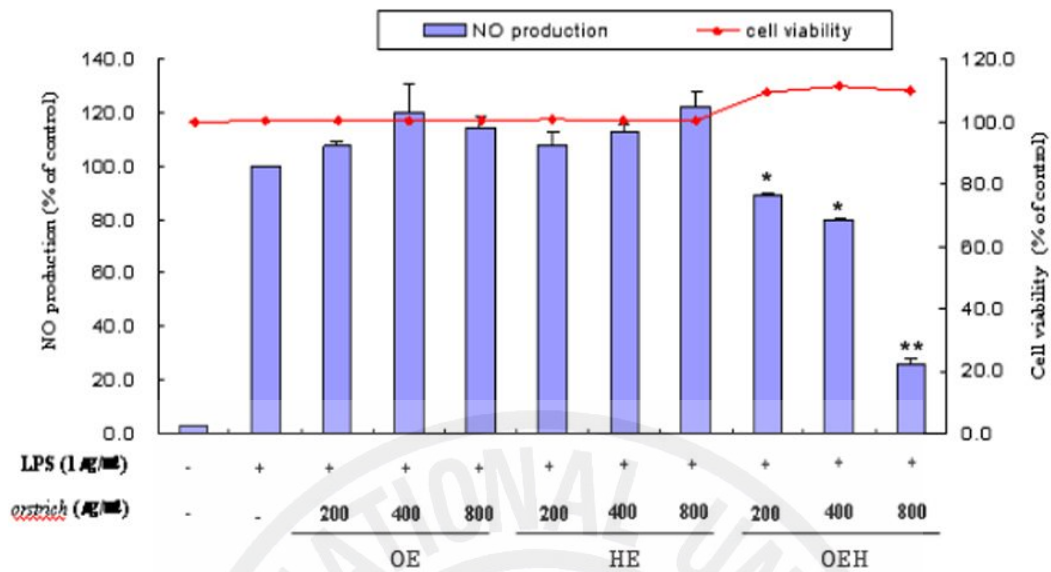


Fig 7. Effects of ostrich (*Struthio camelus*) extracts on the production of nitric oxide in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1.7 \times 10^5$  cell/ml) were stimulated with LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of sample for 24hrs. The cell viability was determined using MTT method. The data represent the mean  $\pm$  SD of duplicate experiments. Asterisks indicate significance for change from only LPS stimulation group: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . OE: ostrich extract, HE: herbs extract, OEH: ostrich extract with herbs



## 고 찰

타조육은 우수한 단백질원으로 단백질 함량은  $22.2 \pm 1.13$  %로 소 ( $20.4 \pm 0.77$  %)나 칠면조 ( $20.1 \pm 0.85$  %)보다 높고, 콜레스테롤은  $33.8 \pm 3.70$  mg/100g로 소 ( $36.6 \pm 4.30$  mg/100g)나 칠면조 ( $50.1 \pm 4.10$  mg/100g)보다 낮으며, 단백질에 대한 지방의 비율이  $0.07 \pm 0.13$  %로 소 ( $0.18 \pm 0.19$  %)와 칠면조 ( $0.22 \pm 0.22$  %)에 비해 훨씬 낮다 (Paleari *et al*, 1998). 타조육의 지방산 조성에서  $50.8 \pm 1.9$  %가 불포화 지방산이고,  $48.0 \pm 1.9$  %가 포화지방산으로 불포화지방산에 대한 포화지방산의 비율이  $0.9 \pm 0.4$  이며, 소 ( $1.0 \pm 0.4$ )와 칠면조 ( $1.1 \pm 0.4$ ) 보다 낮다고 하였다 (Paleari *et al*, 1998). 이러한 불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid; PUFA)은 체내 cholesterol의 함량을 낮추어 주고 항염증 작용을 하는 지방산으로 알려져 있다(Kim *et al*, 2003; Kim *et al*, 2004) 본 실험에서 타조추출액과 타조한방약제 추출액을 성분 분석한 결과에서도 각각 불포화지방산이 55.27과 55.42 %였으며, 포화지방산은 43.17과 44.43 %였다. 또한 불포화지방산에 대한 포화지방산의 비율은 각각 0.78과 0.80 이었다. 타조 및 타조한방약제 추출액에서도 포화지방산에 비해 불포화지방산이 상대적으로 많이 함유되어 있었다.

LPS는 macrophage를 활성화시켜 다양한 염증 매개 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  등)을 생성한다. 이러한 염증 매개 물질은 세포막의 phospholipase A2를 활성화시켜 arachidonic acid를 prostaglandin으로 전환시켜서, NO를 발생 시킨다고 하였다 (Kim *et al*, 2005). 본 실험에서도 macrophage 계열의 RAW 264.7 세포주에 LPS 자극으로 염증 매개 cytokines이 활성화되는 것을 확인하였다. 타조한방약제추출액 투여군에서 다른 두 군에 비해 유의적으로 이들 염증 매개 cytokines이 억제되었고(Kim *et al*, 2003), 800  $\mu$ g/ml 투여군에서는 강하게 억제되었다. 이러한 결과는 타조한방약제추출액의 여러 가지 성분중에 많이 들어있는 n-3와 n-6계열 지방산이 관절염에서 여러 염증관련 cytokines (TNF- $\alpha$ ,

IL-6)과 eicosanoid의 생산을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다는 보고 (Evangeline and Leslie, 2000; Ruxton *et al*, 2004)와 일치하는 결과를 나타내었고, 타조 혹은 한방약제 단독보다는 합제를 투여한 경우 염증매개물질의 억제에 상승효과가 있는 것으로 사료된다.

RAW 264.7 cell에 LPS 및 cytokine, 세균독소 같은 자극을 주면 염증에 관련되는 NO를 만드는 데에 필요한 NO synthase (NOS) 중에서 Type II인 inducible NOS (iNOS) 생성을 증가시킨다 (Ryu *et al*, 2003; Stuehr *et al*, 1991; Iida *et al*, 1992). 본 실험에서 타조추출액과 한방약제추출액 투여군에서는 NO 농도에 차이를 보이지 않았으나, 타조한방약제추출액 200과 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군 ( $P < 0.05$ )과 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군 ( $P < 0.01$ )에서 유의적으로 낮은 NO 농도를 나타낸 것으로 보아, 염증에서 중요한 역할을 하는 NO 합성에 필요한 iNOS 발현을 감소시켜서 항염증 효과를 나타내었고, iNOS 발현의 억제는 결과적으로 염증 유발에 중요한 역할을 하는 NO 생성을 감소시켜서 염증을 완화시킨 것으로 사료된다. 그리고 이러한 결과로 cell viability가 타조한방약제추출액 투여군에서 가장 높게 나타났다.

이상의 결과에서 타조한방약제추출액이 타조추출액 혹은 한방약제추출액보다는 염증 매개에 관련되는 TNF- $\alpha$ , IL-6의 유전자 발현과 단백질 생성을 억제하였으며, 염증에 중요한 NO 합성에 필요한 iNOS 발현을 억제함으로써 NO 생성을 감소시켜서 항염증작용을 나타내는 것으로 사료된다. 타조한방약제추출액이 타조 혹은 한방약제 만의 추출액보다 더 우수한 효과를 보이는 것은 두 추출액간의 상승작용에 의한 것으로 사료된다.

## 결 론

타조한방약제추출액의 성분을 분석하고, 항염증 효과를 평가하기위해서 murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포주에 LPS을 반응시키는 동시에 타조추출액, 한방약제추출액, 타조한방약제추출액을 첨가하여 염증과 관련되는 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현과 NO 생성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

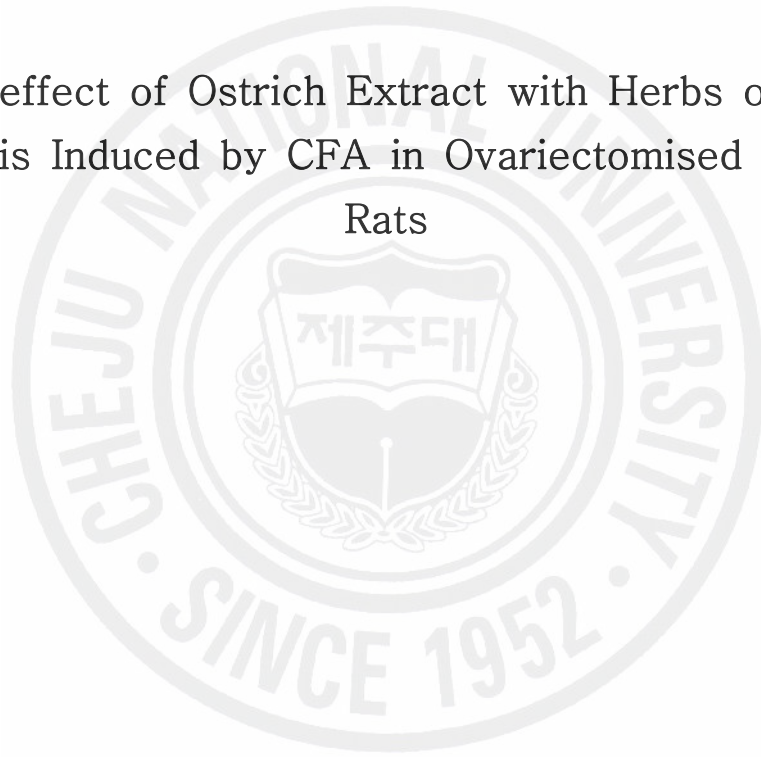
1. 타조추출액과 타조한방약제추출액을 성분 분석한 결과, 각각 불포화지방산이 55.27과 55.42 %였으며, 포화지방산은 43.17과 44.43 % 였다. 불포화지방산에 대한 포화지방산의 비율은 각각 0.78과 0.80 였다. 납 (Pb), 비소 (AS), 수은 (Hg), 카드뮴 (Cd)과 같은 유해한 중금속 성분은 검출되지 않았다.
2. 타조한방약제추출액이 타조추출액과 한방약제추출액 투여군에 비해 유의적으로 염증 매개 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6)과 mRNA 발현을 억제하였으며, 800  $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.01$ ).
3. iNOS 발현 억제에서 타조한방약제추출액 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군이 다른 투여군에 비해 가장 낮았다.
4. NO생성은 타조한방약제추출액 200  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 다른 두 군에 비해 유의성 있게 낮았으며 ( $P < 0.05$ ), cell viability 역시 타조한방약제추출액 투여군이 대조군과 다른 군에 비해서 10% 정도 (200, 400, 800  $\mu\text{g/ml}$  투여군에서 각각 9.5, 11.4, 10.1 %) 높게 나타났다.

이상의 결과로 타조한방약제추출액이 염증 매개에 관련되는 cytokines을 억제하고 NO 합성을 저해함으로써 항염증작용을 나타내었다.

## 제 2 장

난소 적출한 암컷 쥐에서 CFA로 유발시킨  
관절염에 대한 타조한방약제추출액의 효과

The effect of Ostrich Extract with Herbs on the  
Arthritis Induced by CFA in Ovariectomised Female  
Rats



## 서 론

류마티스성 관절염은 전신적 염증성 자가면역성 질병으로 관절부위의 부종과 통증 및 기능부전을 나타낸다. 관절 염증을 윤활 관절면의 활성화 증식을 일으키며 염증세포와 cytokines, B-cell 등의 활성을 일으켜서 자가면역 항체 생산을 자극한다 (Sturrock, 2006). 염증이 있는 관절은 metalloproteinase의 생산을 증가시키고 그 결과 관절파괴를 촉진시킨다 (Yoshihara *et al*, 2000; Vandooren *et al*, 2004; Schurigt *et al*, 2005). 관절염 발생율은 유전, 감염, 환경, 식생활의 차이로 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으며 (Van den Berg and Bresnihan, 1999), 세계적으로 1~1.5% 발생율을 나타내고 (Khurana R and Berney, 2005), 미국은 3.5~5.3%, 일본은 0.1% 발생되는 것으로 보고되어 있다 (Wood *et al*, 1967).

Estrogen이 결핍되면 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , M-CSF (macrophage colony stimulating factor)와 같은 cytokines의 생성 증가, 파골세포의 증식과 분화, 골 흡수와 골 소실의 증가를 일으킨다 (Harada *et al*, 2003). IL-1과 TNF- $\alpha$ 는 골 형성 저해 요인이 되며 동시에 골 흡수의 주요 원인이 된다 (Rahnama *et al*, 2002; Cutolo *et al*, 2002). 특히 폐경기 여성에서 estrogen 결핍은 여러 가지 염증 관련 cytokine의 생성을 유발하여 관절염을 더욱 악화시키고 (Nagamine *et al*, 2001), 동시에 골다공증 (Rahnama *et al*, 2002)을 일으킨다. 또한 활성화된 macrophage는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 NO, PGE2과 같은 다른 염증 매개 물질을 생성하여, 염증성 질병에서 중요한 역할을 한다 (Paul *et al*, 1999; Cutolo *et al*, 2004; Fujiwara and Kobayashi, 2005). 또한 염증 매개물질의 과다한 생성은 류마티스성 관절염 (Manzi and Wasko, 2000), 동맥경화증 (Libby *et al*, 2002), 천식 (Tak and Firestein, 2001) 폐 섬유증 (Coker and Laurent, 1998)과 같은 질병을 일으킨다.

관절염에서 특이 원인이 확인되지 않은 경우에는 일반적인 치료제로 NASID나 면역억제제를 사용하게 되는데, 이들의 약물들은 염증완화 작용이 있고, 비마약성 진통제 또한 항염증 효과를 가지므로 급성 및 만성 염증성 질병의 치료에 사용되고 있다 (Ellis *et al*, 1994). 그러나 이들 약물들은 장기간 사용할 경우 위장관계 출혈, 궤양, 중추신경계 질병 및 신경성 질병 등의 심한 부작용을 나타낸다 (Klippel, 2000; Cho *et al*, 2000). 이러한 부작용을 최소화하기 위해서 최근 민간에서 사용되어온 한방약제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한방 약제들 중에서 항염증 작용에는 당귀 (*Angelica sinensis*), 진피 (*Fraxinus rhynchopylla*) 등이 이용되며, 진통작용에는 갈근 (*Pueraria lobata*), 계지 (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb), 천궁 (*Cnidium officinale* Makino) 등이 이용되고, 관절염에는 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*), 황정 (*Polygonatum sibiricum* Delar) 등이 이용되고 있다 (Huang, 1993). 이러한 한방제제들은 염증 반응에 관여하는 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 생성을 억제시켜서 항염증 작용을 나타낸다고 하였다.

타조에 대한 연구는 아직 미흡하지만 최근 타조의 불포화 지방산과 호르몬이 염증 완화에 효과적이라는 보고가 있었으며 (Kim *et al*, 2003), 타조 한방약제추출액이 항염증 효과와 혈중 중성지방인 트리글리세라이드와 콜레스테롤의 감소시킨다는 보고도 있다 (Kim *et al*, 2004).

이 실험은 암컷 쥐에서 난소를 적출한 후 CFA (Complete Freund's Adjuvant)로 유발시킨 관절염에 대해 타조추출액, 한방약제추출액 그리고 타조한방약제추출액의 효과를 평가하기 위하여 임상증상, 백혈구, 중성지방, 혈중 TNF- $\alpha$  및 estradiol 농도를 측정하였다.



## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

암컷 6~8주령 Sprague Dawley (Charles River Technology, Korea)를 분양받아 실험에 사용하였다. 동물의 사육은 온도  $23\pm 2$  °C, 상대습도  $60\pm 10$  %, 조명시간 12시간 간격으로 소등하여 명암주기를 유지하였다. 기초사육을 거쳐 polycarbonate 사육 상자에 4마리씩 수용하였고, 실험동물용 고형사료 (Rat and mouse 18%, Pmi Nutrition International, USA)와 물을 자유 급여하도록 하였다. 실험전 랫드 평균 체중은  $195\pm 15$  g 이었다.

### 2. 관절염 유발

#### 2.1 난소적출술

난소 적출술을 위해서 마취는 전마취로 atropine (대우약품공업, 한국) 0.1mg/kg 을 근육주사 10분 후 ketamine (케타라, ㈜유한양행, 한국) 60 mg/kg과 xylazine (Rumpun, ㈜바이엘코리아, 한국) 10 mg/kg을 혼합하여 근육 주사하였다 (Carpenter, 2005). 난소 적출술은 배측 정중선을 삭모하고 소독한 후 약 2 cm 피부 및 근층을 절개한 후 자궁각을 hook로 걸어서 외부로 노출한 후 난소를 찾아 4-0 silk (4-0, 원산업, 한국)로 결찰하여 제거하였다. 항생제는 ampicillin (비노탈, ㈜바이엘코리아, 한국) 20 mg/kg을 3일간 근육 주사하였다.

#### 2.2 관절염 유발

난소적출술을 실시한 7일 후 관절염 유발을 위해서 0.1ml의 Complete Freund's Adjuvant (CFA; *Mycobacterium tuberculosis* Sigma, USA)를 오른쪽 후지 발바



닥에 피내 집중하였다 (Newbould, 1963). 이 후에 매일 발바닥과 관절의 상태 및 임상증상을 관찰하였다. CFA 접종 1주일 후 관절염이 확인된 개체를 실험에 사용하였다.

### 3. 실험군 분류 및 추출액 투여

관절염이 유발된 랫트 80 마리를 각 군당 20 마리씩 4개 군으로 나누었다. 타조 추출액 200 mg/BW 100g을 경구 투여한 타조추출액 투여군 (ostrich extract; OE), 한방약제추출액 200 mg/BW 100g을 경구 투여한 한방약제추출액 투여군 (herbs extract; HE), 타조한방약제추출액 200mg/BW 100g을 경구 투여한 타조한방약제추출액 투여군 (ostrich extract with herbs; OEH) 그리고 동량의 물을 투여한 대조군(control; CON)으로 하였다. 각 추출액 투여는 오전 9시와 오후 5시에 1일 2회 존대로 경구 투여하였다.

### 4. 임상증상 평가

각 군의 임상증상 평가는 관절염 유발 랫트에 추출액을 투여한 이후 경미한 발적 이외 다른 임상증상을 보이지 않은 것을 1점, 경미한 발적과 종창, 깔짚 위에 서있으나 약간의 통증 및 파행을 보이는 것을 2점, 심한 발적과 통증 및 깔짚 위에 서있지 못하고 누워있는 것을 3점으로 점수화하였다 (Table 3).

Table 3. The criteria for scoring of clinical sings in arthritis rats

Grade	Clinical signs
1	No signs and mild redness
2	mild swelling, pain and redness, stand on the straw
3	pain and severe redness, can't stand on the straw

## 5. 시료 채취 및 혈액 검사

관절염 유발 후 추출액 투여 전, 투여 후 2주, 4주 그리고 6주에 각 군당 5마리씩 ether 마취하에 개복하고 각각 5두씩 희생하여 후대정맥에서 5 ml 채혈하였다. 혈액은 항응고제 (EDTA-3K)가 함유된 튜브에 1 ml 나머지는 혈청 분리용 vacutainer tube에 분주하였으며, 혈액 응고를 확인한 후 3,000 rpm 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 검사 전까지  $-72^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 백혈구 (WBC)수는 Coulter counter (Vet ABC, France)를 이용하여 측정하였다.

## 6. 혈중 중성지방과 칼슘 측정

혈중 총콜레스테롤 농도는 자동분석기용 T-CHO-Lq 측정용 시약 (쥘아산제약, 한국)으로 하였고, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein)은 자동분석기용 HDL-CHO, LDL-CHO 측정용 시약 (쥘아산제약, 한국)으로 하였으며, 칼슘은 자동분석기용 아산 Ca 시약 (쥘아산제약, 한국)을 이용하여 혈액자동분석장비 (Express 550/Plus wet type, Chiron, USA)로 측정하였다.

## 7. TNF- $\alpha$ 측정

각 군에서 시기별로 채혈한 혈청에서 TNF- $\alpha$  정량은 anti-rat TNF- $\alpha$  가 코팅된 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 정량하였다. TNF- $\alpha$  정량을 위한 표준 직선의 방정식을 산출 ( $y=0.0006x+0.2792$ )하여 각 시기별 TNF- $\alpha$  농도를 계산하였다.

## 8. Estradiol 농도

각 군에서 혈청내 estradiol 정량은 Coat-A-count<sup>®</sup> Estradiol RIA kit (Diagnostic Production Corporation, Los Angeles, USA)를 이용하여 측정하였

다. 시료 처리 및 반응을 끝낸 후 gamma counter로 결합한 estradiol 농도 ( $^{125}\text{I}$  estradiol)를 측정하였다.

## 9. 통계분석

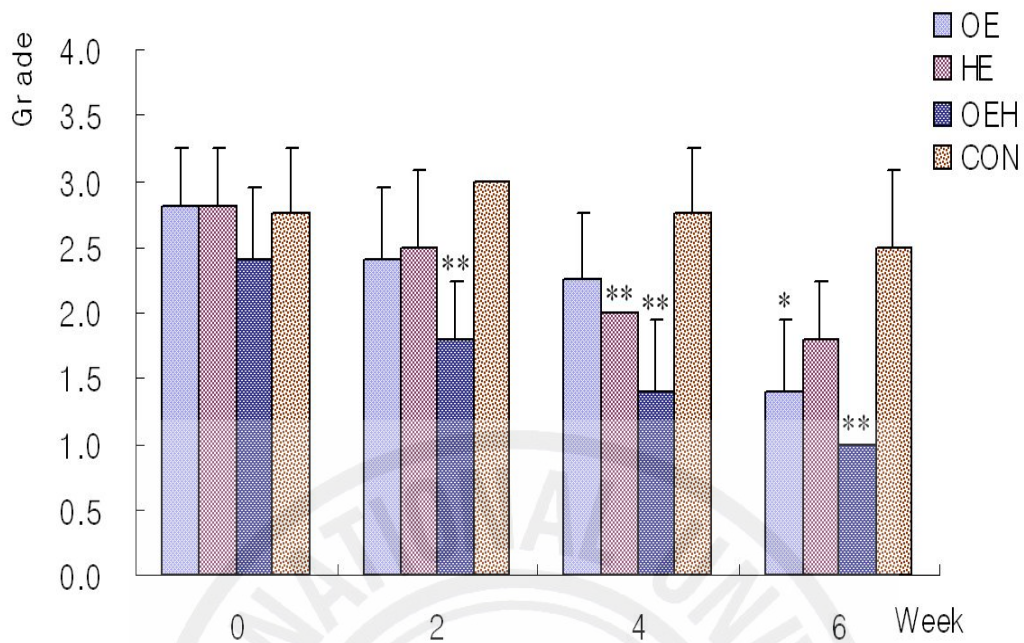
SAS 프로그램을 이용하여 동일군내 용량에 따른 변화 및 동일 용량에 대한 군간 유의성은 분산분석 (ANOVA)으로 검증하였으며, 1%와 5% 유의수준에서 검증하였다.



## 결 과

### 1. 임상증상

관절염을 유발시키기 위해 CFA 0.1 ml을 우측 발바닥에 피내 접종한 결과 1주일 후에 대부분의 랫트는 관절염이 유발되었다. 관절염을 유발시킨 대부분의 랫트는 약물 투여 전에 모두가 심한 발적과 통증을 나타내었고, 깔짚 위에 서있지 못하고 누워있었다 (3점). 각각의 추출액을 투여한 이후 임상증상의 변화를 평가한 결과 대조군에 비해 타조추출액, 한방약제추출액, 그리고 타조한방약제추출액 투여군의 임상증상은 2주 후 부터 개선되기 시작하였다. 타조한방약제추출액 투여군이 4주째에는 대조군에 비해 임상증상이 유의성 있게 개선되었으며 ( $P < 0.01$ ), 6주째도 대조군에 비해서 유의성 있게 동통과 발적이 감소되어 임상증상이 개선되었다 ( $P < 0.01$ ) (Fig 8).



**Fig 8.** Estimation of clinical signs according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \* P<0.05; \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

## 2. 혈액학적 변화

혈액검사에서 염증을 나타내는 백혈구수는 각 추출액 투여 후부터 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고 ( $P<0.05$ ), 6주째는 모든 실험군에서 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다 ( $P<0.01$ ) (Table 4).

Table 4. The changes of white blood cell according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats ( $\times 10^3/\mu\ell$ )

Week	Group			
	OE	HE	OEH	CON
0	7.8±0.71*	6.4±0.20	6.1±0.23	6.3±0.19
2	6.4±0.22*	6.3±0.30*	6.5±0.11*	7.0±0.25
4	6.4±0.24*	6.6±0.23*	6.5±0.12*	7.4±0.30
6	6.2±0.46**	6.1±0.20**	6.4±0.30**	9.0±0.30

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ .

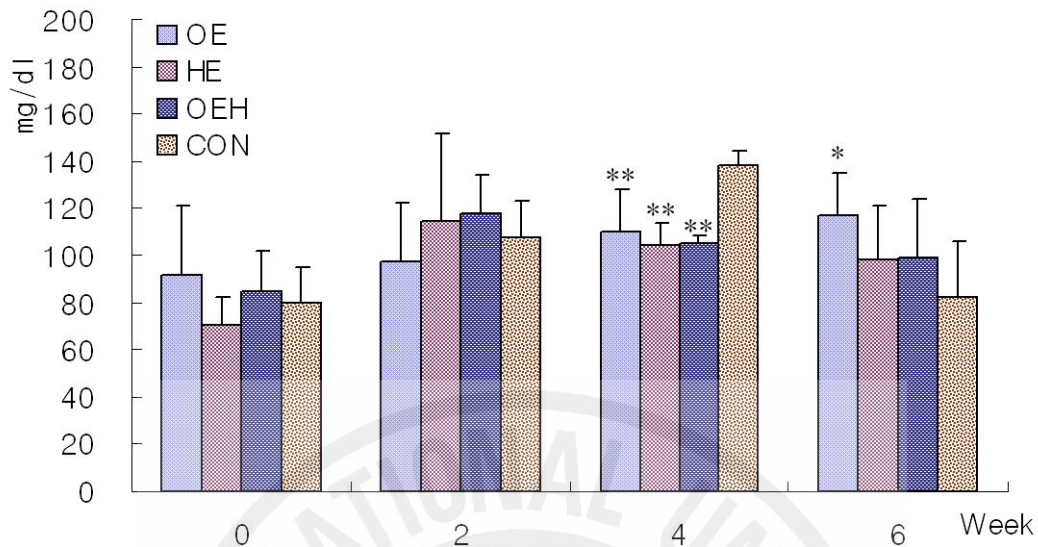
OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

## 3. 혈중 중성지방과 칼슘의 변화

### 3.1 Cholesterol의 변화

각 처치군의 cholesterol 농도는 변화가 심하였고, 4주째에는 대조군  $138\pm 5.9$  mg/dl에 비해 세 군이 모두 유의성 있게 감소하였다 ( $P<0.01$ ). 그리고 6주째에는 대조군에 비해 타조추출액 투여군이  $117\pm 17.2$  mg/dl로 유의적으로 높은 수준을 나타내었다 ( $P<0.05$ ) (Fig 9).





**Fig 9.** The changes of cholesterol concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

### 3.2 HDL의 변화

혈중 HDL 농도는 타조한방약제추출액 투여군이 2주째  $69.6 \pm 11$  mg/dl로 다른 군에 비해 유의성 있게 높았으며 ( $P < 0.05$ ), 4주째에 대조군  $79 \pm 8.3$  mg/dl에 비해 추출액 투여 세 군이 유의성 있게 낮았다 ( $P < 0.01$ ), 6주째 모든 추출액 투여군이 대조군에 비해 높은 수준을 나타내었으나 유의성은 없었다 (Fig 10).



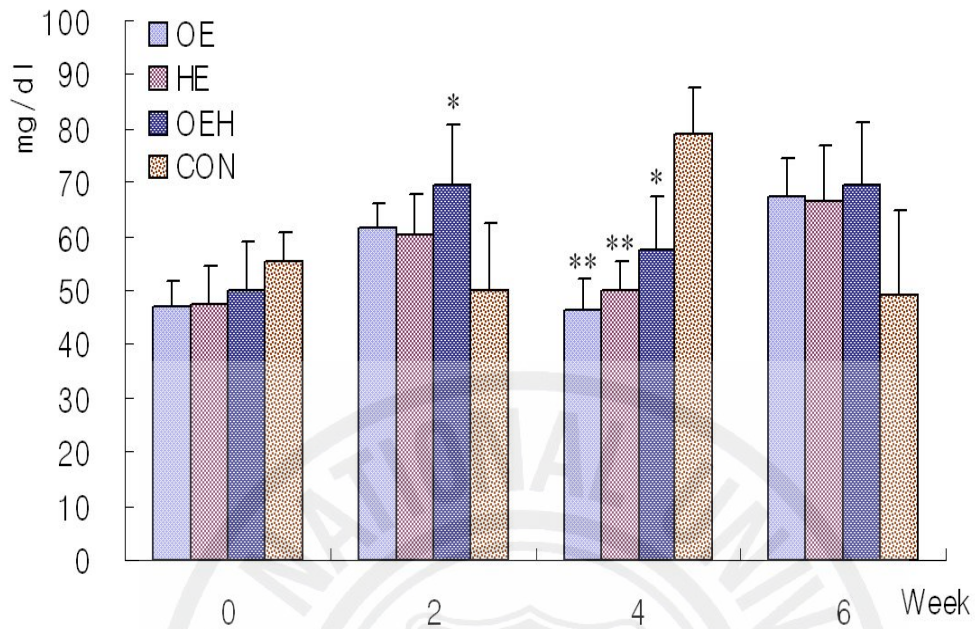


Fig 10. The changes of HDL concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with Herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \* P<0.05; \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

### 3.3 LDL의 변화

혈중 LDL 농도는 2주째 대조군  $21.2 \pm 5.54$  mg/dl에 비해 추출액 투여군 모두에서 유의성 있게 높았고 ( $P < 0.01$ ), 6주째는 타조한방약제추출액 투여군이  $15 \pm 11.3$  mg/dl으로 다른 군에 비해 높은 수준이었으나 유의성은 없었다 (Fig 11).

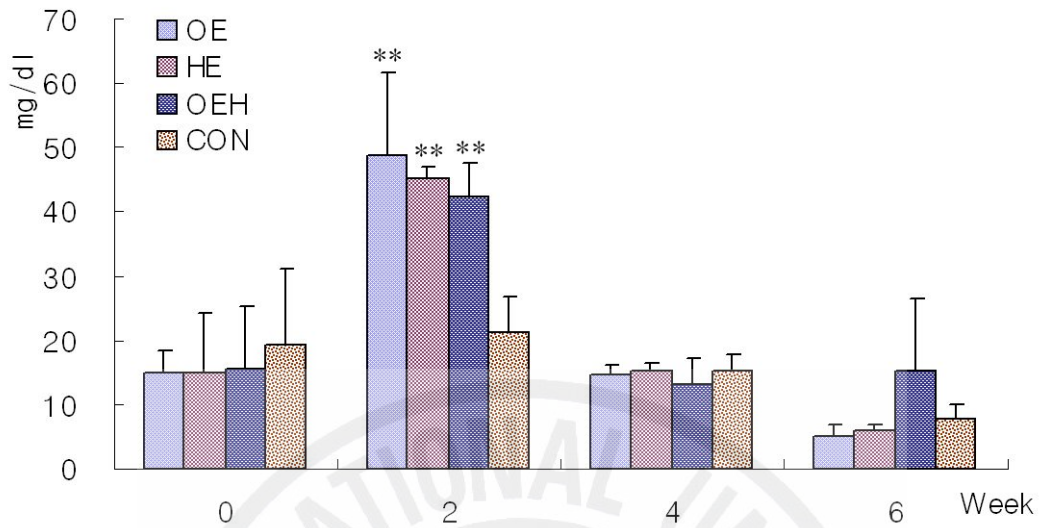


Fig 11. The changes of LDL concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

#### 3.4 칼슘 농도의 변화

혈중 칼슘 농도는 관절염 유발 후 추출액 투여 0주째 대조군에 비해 다른 추출액 투여군이 유의성 있게 높았고 (P<0.01), 4주째 한방약제추출액 투여군이 대조군의 칼슘 농도에 비해 유의성 있게 낮았다 (P<0.01) (Fig 12).

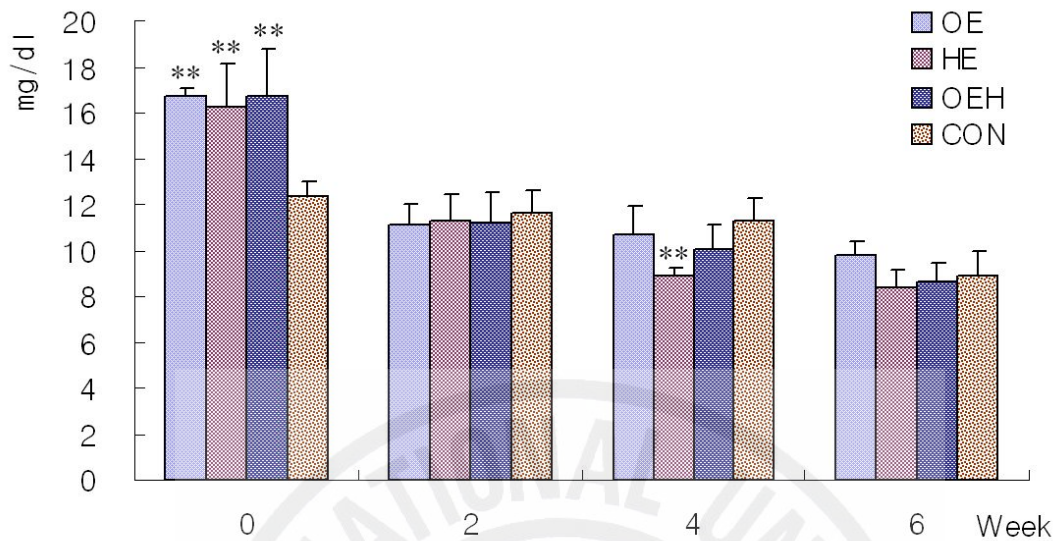


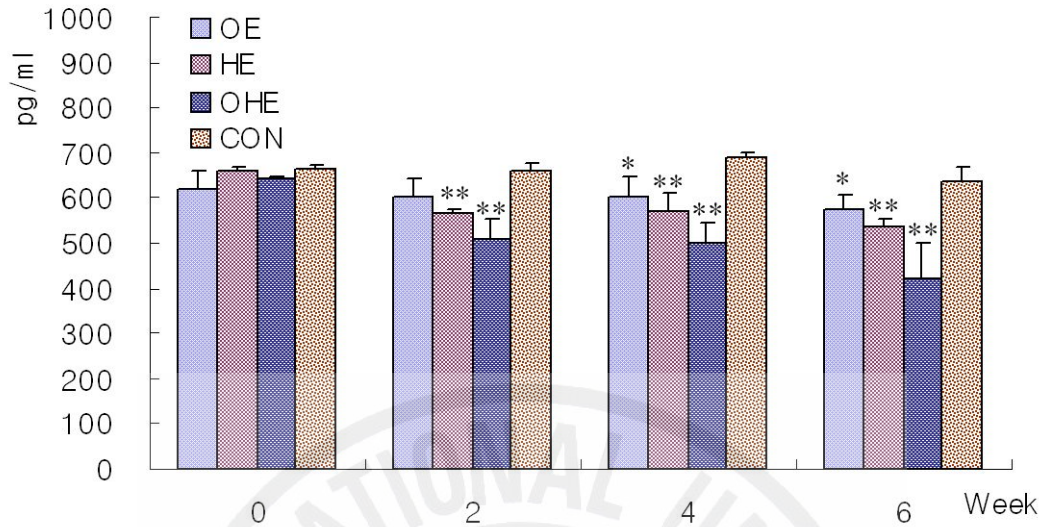
Fig 12. The changes of calcium concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

#### 4. TNF- $\alpha$ 농도의 변화

관절염을 유발시킨 후에 TNF- $\alpha$ 는 증가되었다. 추출액 급여 후에 2주, 4주에 모든 추출액 투여군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수준을 보였으며 (P<0.01), 특히 타조한방약제추출액 투여군은 6주에 다른 두 군에 비해 훨씬 낮은 TNF- $\alpha$  농도를 나타내었다 (Fig 13).



**Fig 13.** The changes of TNF- $\alpha$  concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

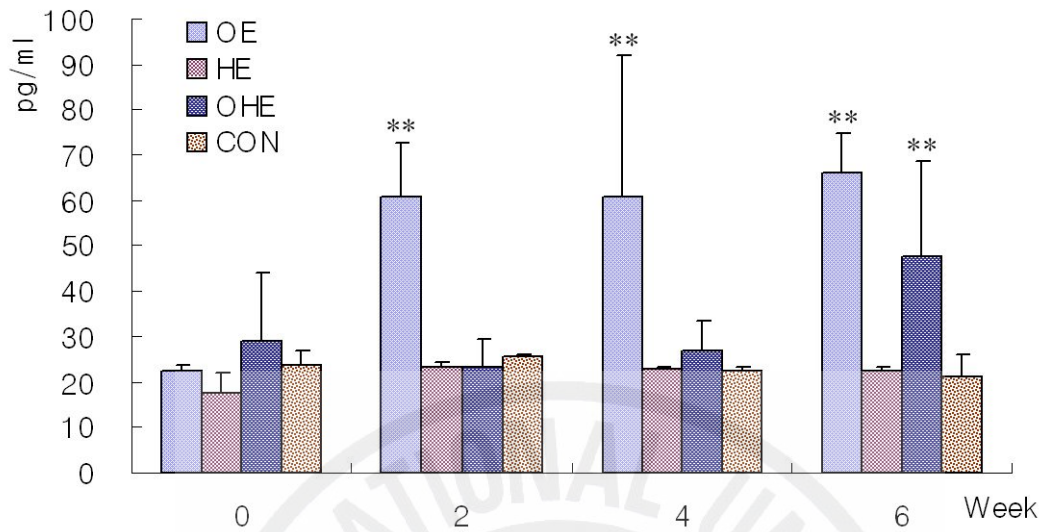
Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \* P<0.05, \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

#### 5. Estradiol 농도의 변화

성호르몬인 estradiol은 타조추출액 투여군에서 2주째부터 대조군에 비해 유의성 있게 높은 수준을 유지하였으며 (P<0.01), 타조한방약제추출액 투여군은 6주째 유의성 있게 높은 수준을 나타내었다 (P<0.01) (Fig 14).





**Fig 14.** The changes of estradiol concentration according to administration of ostrich (*Struthio camelus*) extracts with herbs on the arthritis induced by CFA in ovariectomised female rats.

Asterisks indicate significance for change from control group within same week: \*\* P<0.01.

OE: ostrich extract group, HE: herbs extract group, OEH: ostrich extract with herbs group, CON: control group

## 고 찰

관절염을 유발시키는 약물에는 LPS (lipopolysaccharide), Carraginan, incomplete freund's adjuvant, CFA (complete freund's adjuvant) 등이 있다. 그 중에 CFA로 유발시킨 관절염은 윤활막과 상피세포의 증식과 관절조직 주위에 과립구, 단핵구와 림프구의 침입 그리고 부종 등의 현저한 병리학적 변화를 나타낸다 (Wood *et al*, 1967, Liu *et al*, 2005).

혈중에 에스트로겐이 결핍되면 cytokine이 증가되고, 골에서의 파골세포의 대사가 활발해져서 관절염을 더욱 악화시킨다는 보고가 있다 (Nagamine *et al*, 2001; Harada *et al*, 2003; Cutolo *et al*, 2004). 따라서 본 실험에서 관절염 모델동물을 만드는 방법으로 estrogen생성을 억제시키기위해 쥐에 난소적출술 (Høegh-Andersen *et al*, 2004)을 실시하고, CFA (Complete Freund's Adjuvant)를 발바닥의 피내에 주사하여 (Bendele, 2001) 관절염을 유발시켰다.

타조한방약제 추출액이 실험실 실험에서 염증 관련 매개 cytokine을 억제하여 항염증 효과를 나타내었고, 이 실험에서도 타조, 한방약제 및 타조한방약제 추출액을 투여한 후에 임상증상의 변화를 평가한 결과에서 대조군에 비해 추출액 투여군에서 임상증상이 개선되었다. 그 중에서도 타조한방약제추출액 투여군이 2주째부터 대조군에 비해 차이를 보였으며, 6주째는 대조군에 비하여 유의성 있게 임상증상이 개선되었고 ( $P < 0.01$ ), 다른 추출액 투여군보다도 임상증상이 개선되었다. 이러한 결과는 타조한방약제추출액의 항염증작용으로 관절염의 임상증상을 개선시킨 것으로 사료되고, 본 실험에서 백혈구수가 6주째에 대조군에 비해서 타조추출액, 한방약제추출액, 타조한방약제추출액 투여군에서 유의적으로 감소 ( $P < 0.05$ ) 된 것도 이러한 항염증 작용에 의한 것으로 사료된다.

불포화지방산 (PUFA ; polyunsaturated fatty acid)은 심장병의 발생을 억제하고 류마티스성 관절염 (Ruxton *et al*, 2004)과 궤양성 결장염과 같은 염증성 질병, 아토피성 피부염, 피부건선 (psoriasis), 혈전형성억제, 여러 악성질환의 진행을 막는 유익한 지방산으로 알려져 있다 (Mantzioris *et al*, 2000; Tapiero *et al*, 2002). 그리고 타조육의 PUFA는 체내 triglyceride와 cholesterol의 함량을 낮추어 준다고 하였다 (Kim *et al*, 2004). 또한 염증 진행에서 PUFA (n-3, n-6)는 arachidonic acid로부터 PGE<sub>2</sub>형성을 감소시켜서 항염증 작용을 나타낸다고 하였다 (Kruger and Horrobin, 1997). 타조육에서 중성 지질인 콜레스테롤은 타조 33.8±3.70 mg/100g으로 소 (36.6±4.30 mg/100g)나 칠면조 (50.1±4.10 mg/100g) 보다 낮으며, PUFA에 비해 포화지방산의 함량이 낮았다고 하였다 (Paleari *et al*, 1998). 본 실험에서 혈중 중성지질중 cholesterol 농도는 2주에는 타조한방약제추출액 투여군에서 높았으며, 6주에는 타조추출액 투여군에서 높았다. 혈중 HDL 농도도 타조한방약제추출액 투여군이 2주째부터 다른 군에 비해 유의성 있게 높았고 (P<0.05), 6주째는 대조군이 다른 투여군 보다 낮았다. TNF- $\alpha$ 가 증가함에 따라 HDL과 콜레스테롤은 증가하고 LDL은 감소한다는 연구결과와 유사한 결과를 나타내었다 (Allanore *et al*, 2006). 칼슘 농도는 비타민 D대사, parathyroid 호르몬, 칼슘대사 등이 관여하는데 (Oelzner *et al*, 1998), 타조추출액, 한방약제추출액 그리고 타조한방약제추출액 투여군은 점차 낮아지는 경향을 나타내었다.

관절염에서 염증 매개물질의 생성을 억제함으로써 다양한 염증성 질병을 치료 및 예방할 수 있다고 하였다 (Jung *et al*, 2007). 본 실험에서 대조군의 TNF- $\alpha$ 는 실험기간 동안 높아 있었고 타조추출액, 한방약제추출액, 타조한방약제추출액 투여군은 2주와 4주째 대조군에 비해서 유의성 있게 낮았으며 (P<0.01), 6주째 타조한방약제추출액 투여군이 다른 군에 비하여 낮은 것으로 보아 타조한방약제추출액이 TNF- $\alpha$  생성을 억제하여 항염증 작용을 나타낸 것으로 사료된다.



TNF- $\alpha$ 는 염증에서 중요한 매개체로서, 관절염과 같은 만성염증에서 자가면역이상으로 관여하고 있다. TNF- $\alpha$ 는 골다공증과 인슐린 저항, atherogenesis의 원인이 되고 있으며, 또 TNF- $\alpha$ 는 폐경에 따르는 골소실에서 생리적으로 중심적 역할을 한다고 있다고 하였다(Nanes, 2003). 파골세포에 관여하는 인자로서 parathyroid hormone, vitamin D, TNF- $\alpha$ , interleukin-1 등이 있다. 본 실험에서 타조한방약제추출물 투여군이 TNF- $\alpha$ 가 낮게 검출되는 것은 골소실이 적게 일어났다는 것을 말해주며, 타조한방약제추출물의 투여는 골소실을 방지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

Estrogen 결핍은 CFA로 유발시킨 관절염의 정도를 악화시키는 반면 외인성 estrogen을 투여하면 TNF- $\alpha$ 의 농도를 감소시키고 pro-inflammatory cytokine에 의한 골 소실을 감소시키고 관절염을 개선시킨다고 보고하였다 (Klippel, 2000; Rahnama *et al* 2002). 본 실험에서 타조추출액 투여군에서 2주째부터 대조군에 비해 유의성 있게 높은 수준을 유지하였으며 ( $P < 0.01$ ), 타조한방약제 추출액 투여군은 6주째에 대조군에 비해 유의성 있게 높았다 ( $P < 0.01$ ). 이러한 결과는 다량의 estrogen 물질이 타조추출액에 포함되어 관절염의 개선에 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 이 실험에서 estrogen의 증가와 TNF- $\alpha$  감소는 임상증상과 일치되는 결과를 나타내었다.

이상에서 관절염에 대해서 타조한방약제추출액의 투여로 estrogen 호르몬의 적절한 유지와 염증매개물질의 생성 억제로 인한 항염증 작용과 임상증상이 개선된 것으로 타조한방약제추출액이 관절염 증상 개선에 효과가 있음을 확인하였다.

## 결 론

암컷 랫트에서 난소 적출후 CFA (Complete Freund's Adjuvant)로 유발시킨 관절염에 대해 타조추출액, 한방약제추출액 그리고 타조한방약제추출액의 관절염에 대한 효과를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 임상증상에서 타조한방약제추출액 투여군이 2주째부터 타조추출액과 한방약제추출액 투여군에 비해 임상증상이 유의성 있게 개선되었다 ( $P<0.01$ ). 백혈구수는 6주째에 대조군에 비해서 각 추출액 투여군이 유의적으로 감소되었다 ( $P<0.01$ ).
2. 관절염 초기에 TNF- $\alpha$ 는 높았고, 타조추출액, 한방약제추출액과 타조한방약제추출액 투여군은 2주째 대조군에 비해서 유의성 있게 낮았으며 ( $P<0.01$ ), 6주째 타조한방약제추출액 투여군이 다른 군에 비해서도 낮았다.
3. Estrogen 농도는 타조추출액 투여 2주째부터 대조군에 비해 유의성 있게 높은 수준을 유지하였으며 ( $P<0.01$ ), 6주째 타조한방약제추출액 투여군이 대조군에 비해서 유의성 있게 높았다 ( $P<0.01$ ).

이상의 결과에서 CFA로 유발시킨 관절염에 대한 타조한방약제추출액 투여가 증상완화에 효과적이었다. 이들 효과는 염증매개물질의 생성 억제로 인한 항염증 작용과 estrogen 호르몬의 적절한 유지로 관절염 증상완화에 도움이 된 것으로 사료된다.

## 총 결론

타조 및 한방약제추출액이 관절염에 효과가 있는지를 알아보기 위해서 본 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 타조한방약제추출액의 성분을 분석하였고 실험실적으로 murine macrophage 유래 RAW 264.7 cell에 추출 시료와 LPS 염증 자극으로 염증 매개 cytokines (IL-6와 TNF- $\alpha$ ), NO, iNOS 농도 및 발현을 측정하였다. 이를 바탕으로 암컷 랫트의 난소를 적출하고 CFA로 유발시킨 관절염에 각 타조추출액, 약제추출액, 타조한방약제추출액을 투여하여 관절염 치료효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 타조추출액과 타조한방약제추출액을 성분 분석한 결과, 각각 불포화지방산이 55.27과 55.42 %였으며, 포화지방산은 43.17과 44.43 % 였다. 불포화지방산에 대한 포화지방산의 비율은 각각 0.78과 0.80 였다. 납 (Pb), 비소 (AS), 수은 (Hg), 카드뮴 (Cd)과 같은 유해한 중금속 성분은 검출되지 않았다.
2. 타조한방약제추출액이 타조추출액과 한방약제추출액 투여군에 비해 유의적으로 염증 매개 cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6)과 mRNA 발현을 억제하였으며, 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의성 있게 억제하였다 ( $P < 0.01$ ).
3. iNOS 발현 억제에서 타조한방약제추출액 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군이 다른 투여군에 비해 가장 낮았다.
4. NO생성은 타조한방약제추출액 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군에서 다른 두 군에 비해 유의성 있게 낮았으며, 이로 인한 cell viability가 타조한방약제추출액 투여군에서 10%정도 높게 나타났다.
5. 관절염 랫트의 임상증상은 2주 후 부터 개선되기 시작하였다. 타조한방약제추출

액 투여군이 4주째에는 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보였으며 ( $P<0.01$ ), 6주째도 대조군에 비해서 유의성 있게 임상증상이 개선되었다 ( $P<0.01$ ). 백혈구수는 각 추출액 투여 후부터 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고 ( $P<0.01$ ), 6주째에 각 군 모두 대조군에 비해 유의성 있게 낮았다 ( $P<0.01$ ).

6. 관절염을 유발시킨 후에 TNF- $\alpha$ 는 증가되어 있었다. 모든 추출액 투여군은 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수준을 보였으며 ( $P<0.01$ ), 특히 타조한방약제추출액 투여군은 2, 4, 6주에 다른 두 군에 비해 훨씬 낮은 TNF- $\alpha$  농도를 나타내었다 ( $P<0.01$ ).

7. 성호르몬인 estradiol은 타조추출액 투여 2주째부터 대조군에 비해 유의성 있게 높은 수준을 유지하였으며 ( $P<0.01$ ), 타조한방약제추출액 투여군은 6주째 유의성 있게 높은 수준을 나타내었다 ( $P<0.01$ ).

이상의 결과로 타조한방약제추출액이 염증 매개에 관련되는 cytokines 생성을 억제하고 NO 합성을 저해함으로써 항염증작용을 나타내었다. 또한, CFA로 유발시킨 관절염에 대해서 타조한방약제추출액이 임상증상을 개선시키고 항염증작용을 나타내어서 관절염에 효과적임을 확인하였다.

## 참고문헌

Allanore Y, Kahan A, Sellam J, Ekindjian OG, Borderie D. Effects of repeated infliximab therapy on serum lipid profile in patients with refractory rheumatoid arthritis. Clin Chim Acta 2006, **365**, 143-148.

An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh H, Kwon TO, Song CE, Chung HT. Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 productions and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). Int Immunopharmacol 2002, **2**, 1173-1181.

Bendele AM. Animal models of rheumatoid arthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact 2001, **1**, 377-385.

Carpenter JW. Exotic animal Formulary. Missouri, USA, Elsevier, 2005, p388.

Cho YS, Lee YN, Cho-Chung YS. Biochemical characterization of extracellular cAMP-dependent protein kinase as a tumor marker. Biochem Biophys Res Commun 2000, **278**, 679-684.

Choi BM, Kwak HJ, Jun CD, Rim JS, Park SD, Chung HT. Regulatory Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase by Antisense TGF- $\beta$ 1 Oligodeoxynucleotides During Wound Healing. Kor J Immunol 1996, **18**, 551-558.

Coker RK, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. Eur Respir J 1998, **11**, 1218-1221.

Cutolo M, Villaggio B, Craviotto C, Pizzorni C, Seriola B, Sulli A. Sex hormones and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2002, **1**, 284-289.

Cutolo M, Villaggio B, Seriola B, Montagna P, Capellino S, Straub RH, Sulli A. Synovial fluid estrogens in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004, **3**, 193-198.

Ellis J, MacLeod U, Sammon D, Lindsay E, Erskine JG. Osteonecrosis following treatment for Hodgkin's disease. *Clin Lab Haematol* 1994, **16**, 3-8.

Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005, **4**, 281-286.

Gaby W, Jose P, Dieter K. Mechanism of Suppression of Inducible Nitric-Oxide Synthase(iNOS) Expression in Interferon(INF)- $\gamma$ -stimulated RAW264.7 cells by Dexamethasone. *J Biol Chem* 1997, **272**, 11679-11687.

Groves RW, Allen MH, Ross EL, Barker JN, MacDonald DM. Tumor necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br J Dermatol* 1995, **132**, 345-352.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003, **423**, 349-355.

Hartmut K, Christuan E, Irmgard IB, Ulrich F. In Murine 3T3 Fibroblasts, Different Second Messenger Pathways Resulting in the Induction of NO synthase-II(iNOS) Converge in the Activation of Transcription Factor NF- $\kappa$  B. *J Biol Chem* 1996, **271**, 6039-6044.

Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, Delaissé JM, Christgau S. Ovariectomized rats as a model of



postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004, **6**, R169-180.

Huang KC. The pharmacology of Chinese Herbs. Florida, USA, CRC press, 1993, p247-248.

Iida S, Oshima H, Oguchi S, Hata T, Suzuki H, Kawasaki H, Esumi H. Identification of inducible calmodulin-dependent nitric oxide synthase in the liver of rats. *J Biol Chem* 1992, **267**, 25385-25388.

Ishii R, Horie M, Saito K, Arisawa M, Kitanaka S. Inhibition of Lipopolysaccharide Induced Pro-Inflammatory Cytokine Expression via Suppression of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation by *Mallotus japonicus* Phloroglucinol Derivatives. *Biochem Biophys Acta* 2003, **1620**, 108-118.

Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol* 2007, **114**, 439-445.

Kim AJ, Yuh CS, Lee PJ, Choi MK, Kim SY. Mineral Contents and Anti-inflammatory effect of ostrich extract combined with Korean herb medicine. *Food Sci Biotechnol* 2003, **12**, 617-620.

Kim AJ, Yuh JS, Kim SY, Park SJ, Sung CJ. Anti-inflammatory effect of the ostrich extract combined with Korean herbal Medicine(II). *Food Sci Biotechnol* 2004, **13**, 472-475.

Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- $\kappa$ B



and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 2007, **114**, 307-315.

**Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, Seo EK, Lee KT.** Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 2007, **30**, 2345-2351

**Kim SJ, Jeong HJ, Moon PD, Lee KM, Lee HB, Jung HJ, Jung SK, Rhee HK Yang DC, Hong SH, Kim HM.** Anti-inflammatory activity of gumiganghwaltang through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull* 2005, **28**, 233-237.

**Khurana R, Berney SM.** Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005, **12**, 153-165.

**Klaus B.** Interleukin 1, Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor in infection, inflammation and Immunity. *Immunol Lett* 1988, **19**, 183-192.

**Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 2004, **500**, 255-266.

**Klippel JH.** Biologic therapy for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000, **343**, 1640-1641.

**Kruger MC, Horrobin DF.** Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: a review. *Prog Lipid Res* 1997, **36**, 131-151.

**Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, **105**, 1135-1143.

Liu M, Dong J, Yang Y, Yang X, Xu H. Anti-inflammatory effects of triptolide loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol* 2005, **97**, 219-225.

Lin MW, Tsao LT, Chang LC, Chen YL, Huang LJ, Kuo SC, Tzeng CC, Lee MR, Wang JP. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated NO production by a novel synthetic compound CYL-4d in RAW 264.7 macrophages involving the blockade of MEK4/JNK/AP-1 pathway. *Biochem Pharmacol.* 2007, **73**, 1796-1806.

Mangalam AK, Aggarwal A, Naik S. Gold sodium thiomalate (GSTM) inhibits lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  through ceramide pathway. *Cell Immunol* 2002, **219**, 1-10.

Mantzioris E, Cleland LG, Gibson RA, Neumann MA, Demasi M, James MJ. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2000, **72**, 42-48.

Manzi S, Wasko MC. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000, **59**, 321-325.

Nagamine R, Maeda T, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Iwamoto Y. Menopausal syndrome in female patient with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2001, **11**, 230-233.

Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters* 2007, **111**, 1-5.

Nanes MS. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : molecular and cellular mechanism in skeletal pathology. *Gene* 2003, **321**, 1-15.

**Nathan C.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *EASEB J* 1992, **6**, 3051-3064.

**Newbould BB.** Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Br J Pharmacol Chemother* 1963, **21**, 127-36.

**Oelzner P, Müller A, Deschner F, Hüller M, Abendroth K, Hein G, Stein G.** Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and PTH in rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int* 1998, **62**, 193-198.

**Ohshima H, Bartsch H.** Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factor: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994, **305**, 253-264.

**Paleari MA, Camisasca S, Beretta G, Renon P, Corsico P, Bertolo G, Crivelli G.** Ostrich meat : Physico-chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. *Meat science* 1998, **48**, 205-210.

**Paul A, Cuenda A, Bryant CE, Murray J, Chilvers ER, Cohen P, Gould GW, Plevin R.** Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *Cell Signal* 1999, **11**, 491-497.

**Rahnama M, Tomaszewski T, Swiatkowski W.** Effect of estrogen replacement therapy on serum cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in ovariectomised rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2002, **46**, 273-279.

**Rannou F, François M, Corvol MT, Berenbaum F.** Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2006, **73**, 29-36.

Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res* 2003, **17**, 485-489.

Ruxton CHS, Reed SC, Simpson MJA, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 2004, **17**, 449-459.

Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **301**, 418-426.

Schurigt U, Stopfel N, Hüchel M, Pfirschke C, Wiederanders B, Bräuer R. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005, **7**, R174-188.

Scott MG, Hancick RE. Cationic antimicrobial peptide and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 2000, **20**, 407-431.

Stuher DJ, Cho HJ, Kwon NS. Purification and Characterization of The Cytokine of the Cytokine-Induced Macrophage Nitric Oxide Synthase; an FAD and FMN-containing Flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, **88**, 7773-7777.

Sturrock RD. Update on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *International Congress* 2006, **1295**, 1-8.

Tak PP, Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001, **107**, 7-11.

**Tapiero H, Ba GN, Couvreur P, Tew KD.** Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 2002, **56**, 215-222.

**Valesini G, Iannuccelli C, Marocchi E, Pascoli L, Scalzi V, Di Franco M.** Biological and clinical effects of anti-TNF alpha treatment. *Autoimmun Rev* 2007, **7**, 35-41.

**Van den Berg WB, Bresnihan B.** Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 1999, **13**, 577-597.

**Vandooren B, Kruithof E, Yu DT, Rihl M, Gu J, De Rycke L, Van Den Bosch F, Veys EM, De Keyser F, Baeten D.** Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor alpha blockade in spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2004, **50**, 2942-2953.

**Weisz A, Cicatiello L, Esumi H.** Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 1996, **316**, 209-215.

**Wood JW, Kato H, Johnson KG, Uda Y, Russell WJ, Duff IF.** Rheumatoid arthritis in Hiroshima and Nagasaki, Japan. Prevalence, incidence, and clinical characteristics. *Arthritis Rheum* 1967, **10**, 21-31.

**Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000, **59**, 455-461.

Yang X, Zhao Y, Zhou Y, Lv Y, Mao J, Zhao P. Component and antioxidant properties of polysaccharide fractions isolated from *Angelica sinensis* (OLIV.) DIELS. Biol Pharm Bull. 2007, **30**, 1884-90.

