

원저

계지의 항염 효과에 관한 연구

박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강진모, 최일환, 김수영, 심범상, 이재현, 임사비나
경희대학교 동서의학연구소 경희비전2000 통증및신경의학연구팀

The Anti-inflammatory Effect of *Cinnamomi Ramulus*

Hi-Joon Park, Ji-Suk Lee, Jae-Dong Lee, Nam-Jae Kim, Ji-Hee Pyo, Jun-Mo Kang, Il-Hwan Choe,
Su-Young Kim, Bum-Sang Shim, Je-Hyun Lee, Sabina Lim

Research Group of Pain and Neuroscience in Vision2000 Project, East-West Medical Research
Institute, Kyung Hee University

Objectives : *Cinnamomi Ramulus* (CR), the young twig of *Cinnamomum loureirii nees*, has been used for treating symptoms related to pain, rheumatic arthritis and inflammation in Korean herb medicine. This study was carried out to investigate the anti-inflammatory effect of CR *in vivo* and *in vitro*.

Methods : Extracts of CR were prepared and the chemical components of the extracts were examined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The extracts were administrated to the rat paw edema model induced by carrageenan to evaluate the anti-inflammatory effect of CR. The expressions of nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase (COX)-2 were also quantified in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophages to survey the effect of CR *in vitro*. The main components were cinnamaldehyde and coumarin.

Results : We examined the anti-inflammatory activity of the 80% ethanol extract of *Cinnamomi Ramulus* *in vivo* by using carrageenan-induced rat paw edema model. Maximum inhibition of 54.91% was noted at the dose of 1000mg/kg after 2 hours of drug administration in carrageenan-induced rat paw edema and this showed a potent anti-inflammatory effect.

Conclusions : The results showed that *Cinnamomi Ramulus* suppressed dose-dependently LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages and also decreased iNOS protein expression. *Cinnamomi Ramulus* also showed a significant inhibitory effect in LPS-induced PGE2 production and COX-2 expression.

Key Words : *Cinnamomi Ramulus*, anti-inflammatory effect, carrageenan, rat paw edema, nitric oxide, cyclooxygenase-2

서론

· 접수 : 2005년 3월 22일 · 논문심사 : 2005년 4월 13일
· 채택 : 2005년 5월 3일
· 교신저자 : 임사비나, 서울시 동대문구 회기1동 경희대학교
동서의학연구소 경희비전2000 통증및신경의학
연구팀
(Tel. 02-961-0324, Fax. 02-961-7831,
E-mail: lims@khu.ac.kr)

* 이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단과 경희대학교의 지원에 의하여 연구되었음.(KRF-2003-005-E00002)

계지 (*Cinnamomi Ramulus*)는 性味が辛甘溫하고發汗解肌, 溫經通脈, 通陽化氣, 平喘降逆하는 효능을 가지고 있어, 風寒感冒, 脘腹冷痛, 血寒經閉, 關節痹痛, 痰飲, 水腫, 心悸, 奔豚 등의 치료에 응용되고 있다^{1,2)}. 특히 계지는 肌表의 風寒을 발산시켜 風寒表證, 風寒頭痛, 肢體疼痛 등의 表證을 없애고, 四

肢에 도달하여 경맥을 따뜻하게 함으로써 寒邪를 제거하여 경락을 잘 통행시키고 관절을 부드럽게 하는 작용이 강하여, 寒濕性的 風濕痺痛 치료에 다용되고 있는 약재이다³⁾.

계지는 녹나무과 (Lauraceae)의 상록교목인 육계 및 동속 근연식물의 어린 가지를 건조한 것으로^{4,5)}, cinnamaldehyde, coumarin, β -sitosterol, protocatechuic acid 등의 화학성분을 함유하며,⁶⁾ 진정, 진통, 해열, 소염, 항균, 항바이러스, 항암, 건위, 강심, 이뇨, 지해 작용의 약리 작용을 가진 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 계지에 대한 연구로는, 박 등⁶⁾이 항산화 작용을, 박 등⁷⁾이 항염증 활성 검색의 지표로 쓰이는 hyaluronidase 및 trypsin 효소에 대한 활성 저해 작용을, 최 등⁸⁾과 안 등⁹⁾이 lipopolysaccharide (LPS) 유발 관절염에서 계지약침 자극이 면역조직화학적 변화에 미치는 영향을 보고하였는데, 이러한 연구 결과를 통해 계지의 염증성 질환 치료제 개발 가능성을 확인할 수 있다.

염증(inflammation)은 상처를 줄 수 있는 자극에 대한 생체의 방어 반응으로, 염증반응에서는 미소혈관의 확장, 혈액성분의 조직간극으로의 유출, 백혈구의 염증 부위로의 유주 및 조직의 변성과 섬유화 등이 연쇄적으로 일어나게 된다. 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 동통, 기능 장애의 5가지 증상이 나타나며, cytokines, prostaglandin E₂ (PGE₂), lysosomal enzyme, free radicals 등 다양한 매개물질이 관여하고 있다¹⁰⁾. 즉 염증반응을 일으킬 수 있는 세포에 외부 자극이 가해지면, interleukin-1 β (IL-1 β)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 전-염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)의 발현이 유도되고, 유도된 전-염증성 사이토카인이 호중구를 활성화하여 염증 부위로 이동시키고, inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenases (COX)-2를 코딩하는 유전자의 발현을 자극함으로써 염증반응에 관여하는 nitric oxide (NO), PGE₂의 반응성 물질을 생성하게 하여 염증반응이 일어나게 되는데, 이 중, NO는 혈관 확장 및 조직 손상에 주로 관여하고, PGE₂는 통증과

발열의 전달에 주로 관여하는 중요한 염증매개물질로 알려져 있다.

이와 같은 염증매개물질이 과량 생산되면, 과도한 면역반응을 야기하여 각종 염증성 질환을 유발시키고 악화시키게 된다. 특히 만성염증에서는 NOS, COX와 같은 효소 및 signaling proteins의 상승 조절 작용을 일으켜, NO와 prostaglandins (PG)를 과량 생성하게 되고, 이는 다발성 경화증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 대장암과 같은 질환의 병인이 된다. 따라서, NO와 PGE₂의 생성을 억제하고, 그 원인인 iNOS, COX-2의 발현을 억제할 수 있는 물질을 발견한다면, 류마티스 관절염과 같은 각종 면역질환을 포함한 염증성질환 치료에 중요한 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 經脈을 溫通시키는 작용이 있어 寒濕痺를 치료하는 중요한 약재로 쓰이고 있으며, 기존의 실험적인 연구에서 발한, 해열, 소염, 진통 등의 약리작용을 가진 것으로 규명된 계지의 유효성분을 에탄올로 추출한 검액을 이용하여 계지의 항염 효과 및 기전을 밝히고자 하였다. 염증의 주요 증상 중 하나인 부종을 측정하기 위해 카라기난 으로 유도한 급성염증 모델을 이용하였고, 계지 추출물이 NO, PGE₂, iNOS, COX-2 등 염증 매개물질의 생성 및 발현 억제에 미치는 영향을 조사하기 위해 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 계지 추출물의 항염 효과를 검토한 후 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 계지 추출액의 제작

본 실험에서 사용한 계지(Cinnamomi Ramulus)는 경희대학교 한약학과에 의뢰하여 베트남산 *Cinnamomum loureirii* NEES의 어린 가지¹¹⁾를 서울특별시 동대문구 제기동 소재의 경동 시장에서 구입하여 감정한 다음 정선하여 사용하였다. 구입시의 성상은 15cm 길이의 건조된 상태였으며, 1cm 이하로 계지를 분쇄한 후, 시료 200g 을 3 l 플라스크에 넣은 후 80% 에탄올 1,500ml 을 가하여 3시간 동안

환류추출하고 여과하였다. 잔사를 다시 80% 에탄올로 추출하고 이 조작을 2회 반복하여 모은 여액을 감압농축기로 감압농축한 후, 이를 동결 건조하여 계지 에탄올 추출물 7.0g (수율 3.5%)을 얻어 본 실험에 필요로 하는 농도로 희석하여 사용하였다.

2. GC-MS를 이용한 성분 분석

계지의 80% 에탄올 추출물을 ethyl acetate에 녹여 10mg/ml의 농도로 조제하여 membrane filter (pore size : 0.45µm) 로 여과한 후, 2µl를 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 로 분석하였다. GC 분석은 DB-5column (10m, 0.18mm, 0.18µm)을 사용하였고, 컬럼의 온도는 40℃에서 300℃까지 10℃/min의 승온속도로 승온하였으며, 주입구 온도는 280℃이었으며, 운반기체는 helium (He) 을 사용하였다. 분리된 성분의 동정은 GC-MS (GC; Agilent 6890N / MS; LECO Pegasus III)를 사용하였고, 검출 질량은 30~550amu 이었고, 이온화 에너지는 1800eV이었다.

3. 카라기난 유도 급성염증 모델에서의 소염 작용

1) 실험동물

체중 180~200g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐 (Samtako's Sam : TacN (SD) BR, Korea) 를 이용하였으며, 사료는 삼양유지사료(주) 고휘사료를 사용하였고, 물은 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 실험실 온도는 22±2℃를 유지하였고 습도는 50~60%를 유지하였다. 실험동물에 관한 윤리규정은 경희대학교 한의과대학 실험동물 윤리지침을 따랐다.

2) 족부 부종 유발

기염제를 투여하기 30분 전에 각 군당 6마리의 흰쥐에게 계지 추출물을 생리식염수에 0, 200, 500, 1000mg/kg 의 농도가 투여되도록 녹인 후 흰쥐의 체중 100g당 1ml씩 경구 투여하였다. 족부 부종 유발을 위한 기염제로 카라기난 Type IV (λ-carrageenan, Sigma, USA)을 멸균된 0.9% 생리식염수에 1% 농도로 희석하여 사용하였으며, 50µl/rat 씩 우측 후

지 발바닥 부위에 피하 주사하여 족부 부종을 유발시켰다. 족부종의 측정은 매시간 (1, 2, 3, 4, 5시간) 마다 부종측정기 (Plethysmometer : Ugo Basil Co., Italy)를 이용하여 측정하였다. 족부종의 정도는 아래의 수식에 따라 부종증가와 및 부종억제율을 구하여 실험군과 대조군을 비교하였다.

부종증가율 (%) =

$$[(\text{기염물질 투여 전의 족부종} - \text{기염물질 투여 후의 족부종}) / \text{기염물질 투여 전의 족부종}] \times 100$$

부종억제율 (%) =

$$[(\text{대조군의 일정시간 후의 평균부종을} - \text{약물투여군의 일정시간 후의 평균부종을}) / \text{대조군의 일정시간 후의 평균부종을}] \times 100$$

4. LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 항염 작용

1) 세포 배양

Macrophage cell line인 RAW 264.7 세포는 서울대학교 암연구소 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 대식세포를 10% Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GibcoBRL, USA) 배지를 이용하여 CO₂ incubator 37℃, 5% CO₂-95% O₂ 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 세포는 96 well plate에 분주하여 배양하였다.

2) NO 생성량 측정

(1) LPS 처리 및 검액 처리

세포가 부착되어 있는 각 well에 1µg/ml의 lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype O111:B4, Sigma, USA)를 함유한 10% FBS-DMEM 200µl씩을 넣었다. 이 때, 대조군에는 LPS가 없는 배지를 넣고, 실험군에는 LPS가 포함된 배지를 넣은 후 즉시 검액인 계지 에탄올 추출물을 농도별로 각각 20, 50, 100µg/ml로 처리하고 검액을 처리하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. CO₂ incubator 37℃, 5% CO₂-95% O₂ 조건하에서 16시간 배양한 후 그 상층액을 회수하여 정량하였다.

(2) Griess 반응에 의한 배양액 중의 NO 생성량 측정
회수한 상층액을 96 well plate에 각 well 당 배양

액 100 μ l씩 분주한 후 Griess 시약 100 μ l씩을 첨가하여 10분간 가볍게 흔들어 준 후, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁰⁾. Sodium nitric dioxide (NaNO₂)를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 검액을 처리한 배양액 중의 NO 생성량을 구하였다.

3) PGE₂ 생성량 측정

(1) Aspirin 전처리 및 세포 부착

RAW 264.7 세포를 10% FBS-DMEM에 현탁하여 10x10⁵ cells/ml로 하였다. 이 현탁액에 aspirin을 첨가해 세포에 잔존하는 최종 농도가 500 μ M이 되도록 하여 세포에 잔존하는 COX 효소의 활성을 비가역적으로 억제한 다음, 세포 현탁액을 96well 세포 배양판의 각 well에 200 μ l씩 첨가하고, CO₂ incubator 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95% O₂ 조건하에서 2시간 동안 배양하여 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 PBS (phosphate buffer solution)로 2회 세척한 후 표면에 남아있는 세포를 실험에 사용하였다.

(2) LPS 처리 및 검액 처리

세포가 부착되어 있는 각 well에 1 μ g/ml의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM 200 μ l씩을 넣었다. 검액인 계지 에탄올 추출물을 농도별로 각각 10, 50, 100, 150 μ g/ml로 처리하여 CO₂ incubator 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-95% O₂ 조건하에서 16시간 배양한 후 그 상층액을 회수하여 유리된 PGE₂ 양을 효소 면역 분석법으로 정량하였다.

(3) 효소 면역 분석법을 이용한 PGE₂ 생성량 측정

항-PGE₂ 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholinesterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양하였다. 그 후, 각 well에 남아있는 용액을 씻어낸 후, 0.05% Tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 200 μ l를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂를 표준품으로 검량선을 작성하여 검액을 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군

에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 검액의 억제율 (% inhibition)을 구하였다.

4) Western blotting

세포를 LPS로 처리한 후 300 μ l의 trisol extraction buffer를 첨가하여 단백질을 분리하였다. 분석하고자 하는 단백질 샘플을 Protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량한 뒤, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행하고, 전기영동이 끝난 gel을 nitrocellulose membrane로 transfer시켜, 분리된 단백질이 그대로 membrane으로 이동하게 한 후, anti-rabbit COX-2 antibody (Santa Cruz Biotech., CA, USA)을 1:1000으로 희석하였다. 1시간 반응 후, TBST (Tris-base solution, Triton X-100)로 15분간 3회 세척한 뒤, 1차 항체를 detection할 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 1시간 반응 후, TBST로 15분간 3회 세척한 뒤 ECL (enhanced chemiluminescence) kit (Amersham Biosciences, Inc.)에 반응시키고 membrane은 X-ray film에 노출시켰다.

6. 통계

모든 측정값은 평균값 \pm 표준오차 (Mean \pm standard error)로 나타내었으며, oneway - ANOVA로 통계 검정한 뒤 Newman-Keuls 방법을 사용하여 사후 분석하였다. 유의수준 $p < 0.05$ 이하인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. GC-MS 분석 결과

계지 에탄올 추출물의 GC chromatogram에서 Retention Time이 각각 445.152초와 563.152초인 주요한 2개의 peak를 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 각각의 주요 peak의 mass data를 Mass Library에서 검색한 바에 의하면, 445.152초에서 나온 peak는 3-phenyl-2-Propenal (cinnamaldehyde; C₉H₈O)로 동정되었고, 563.452초에 나온 peak는 2H-1-Benzopyran-2-one(coumarin)으로 동정되었다(Fig. 2, Fig. 3).

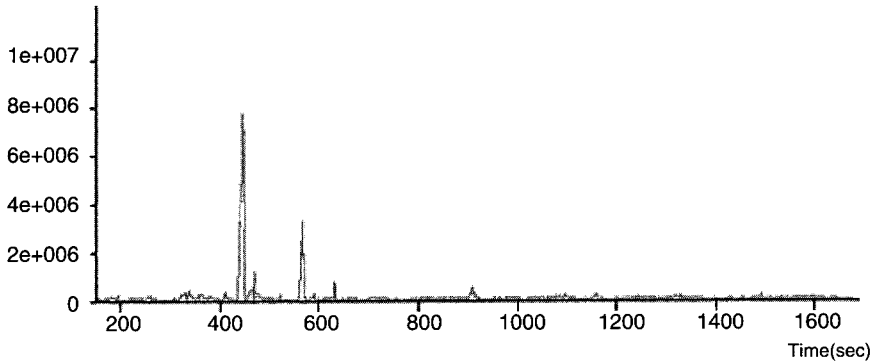


Fig. 1. GC chromatogram of 80% ethanol extract of Cinnamomi Ramulus.

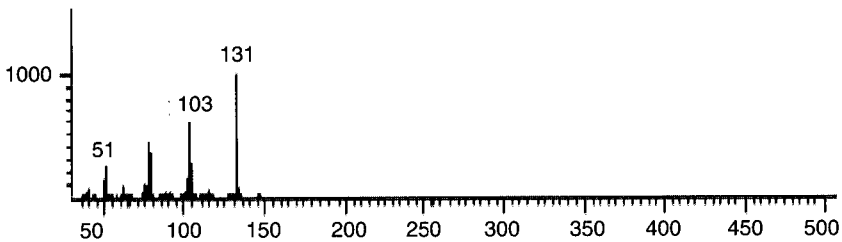


Fig. 2. Mass spectrum of Cinnamaldehyde from Cinnamomi Ramulus at 445.152 sec.

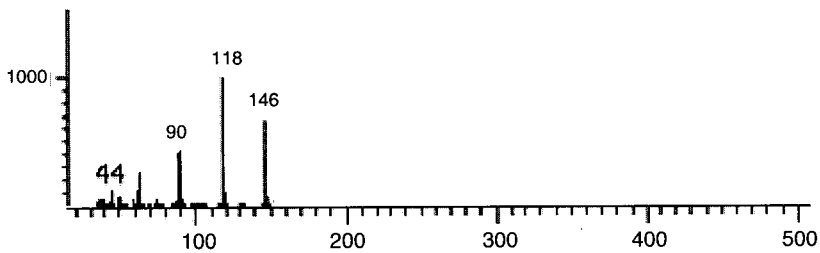


Fig. 3. Mass spectrum of Coumarin from Cinnamomi Ramulus at 563.452 sec.

2. 카라기난 유도 급성염증 모델에서의 소염 효과
계지 추출물의 급성염증 모델에서의 항염 효과를 평가한 결과를 Table I 과 Fig. 4에 제시하였다. 카라기난을 주사한 발의 부종율은 주사 후 2시간 이내에 상승하기 시작하여, 주사 후 4시간에 최대를 나타내었고, 계지 추출물을 경구 투여한 실험군은 계지

추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 200, 500, 1000 mg/kg의 농도에서 각각 유의한 부종 증가 억제 효과가 있었으나 농도 의존적이지는 않았다.

Table I 에 나타낸 바와 같이 계지 추출물은 카라기난 유도 급성염증 모델에서 계지 추출물 투여 후 2시간에 모든 투여용량군에서 높은 부종억제율을 나

Table 1. Anti-inflammatory Effects of *Cinnamomi Ramulus* extract on Carrageenan-induced Rat Paw Edema.

Groups	Dose(mg/kg p.o.)	Time course of swelling percentage(%)				
		1	2	3	4	5hr
Control	-	12.93± 4.50	86.82± 9.40	99.34± 7.35	116.76± 8.07	107.43± 7.38
Sample	200	11.87± 4.00 (8.20)	50.84± 8.45* (41.44)	68.31± 4.29** (31.24)	80.21± 5.51** (31.30)	78.19± 6.19** (27.22)
Sample	500	16.41± 3.80 (<50)	40.63± 7.78** (53.20)	69.98± 9.76* (29.56)	77.73± 9.27** (33.43)	78.64± 7.60* (26.90)
Sample	1,000	9.81± 6.03 (24.13)	39.15± 14.16** (54.91)	60.11± 9.21** (39.49)	76.31± 4.89*** (34.64)	70.81± 4.67** (34.09)

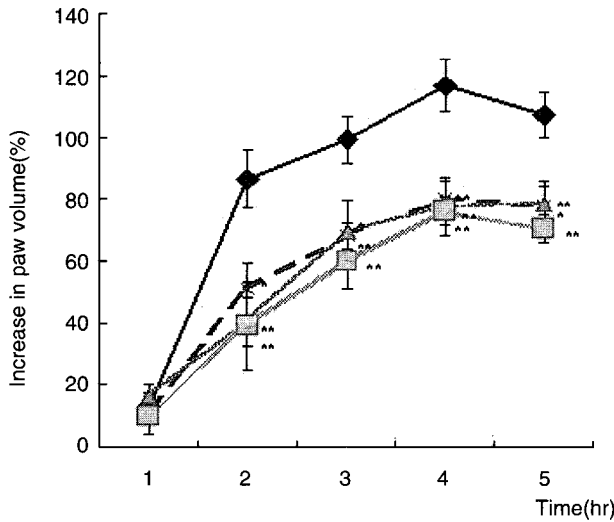


Fig. 4. Anti-inflammatory effects of *Cinnamomi Ramulus* extract at 200(×), 500(▲), and 1000(■) mg/kg on paw edema induced by carrageenan. ◆, edema induced by carrageenan alone (control group). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ versus control group.

타내었으며, 1000 mg/kg의 농도에서 54.91%의 가장 높은 부종억제율을 나타내었다.

3. LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 항염 작용 NO 생성억제 효과는 LPS만 처리한 대조군에 비하여 80% 계지 에탄올 추출물을 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 군에서 NO 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 5, $p < 0.001$).

PGE₂ 생성 억제 효과는 80% 계지 에탄올 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 군에서는 PGE₂ 생성 억제 효과가 나타나지 않았지만, 계지 추출물을 50, 100, 150

$\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 군에서는 PGE₂ 생성이 농도 의존적으로 감소하였다.

iNOS와 COX-2의 발현 억제 효과는 RAW 264.7 세포의 LPS 처리에 의한 iNOS와 COX-2의 발현에 대하여 계지 추출물은 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켰다 (Fig. 7, Fig. 8).

고 찰

계지의 주요 성분을 확인하기 위한 GC-MS 분석 결과, cinnamaldehyde와 Coumarin이 동정되었다.

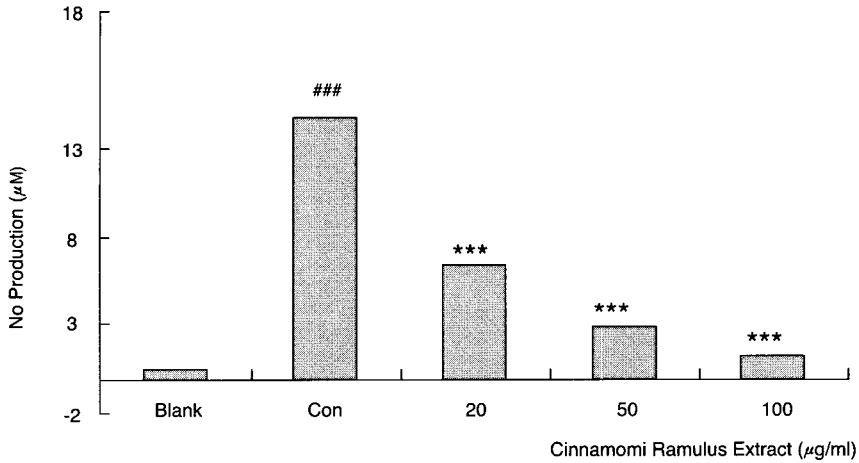


Fig. 5. Effects of Cinnamomi Ramulus extract on NO production in LPS-induced RAW 264.7 cells. ###, $p < 0.001$ versus blank group; ***, $p < 0.001$ versus control group.

기존의 연구에 의하면, 계지의 화학 성분¹²⁾은 육계와 비슷하며, 휘발성의 정유를 0.2~0.9% 함유하고 있는데, 정유 중에는 cinnamaldehyde, coumarin, β -sitosterol, protocatechuic acid 등이 주로 함유되어

있고^{2,13)}, 정유 중 70~80%를 차지하는 cinnamaldehyde는 진정, 항경련, 진통, 해열, 항균, 항암, 건위 작용을 나타내고⁹⁾, coumarin은 항응고, 혈관확장, 항균, 항염증 작용을 나타내는 것으로 알려져 있

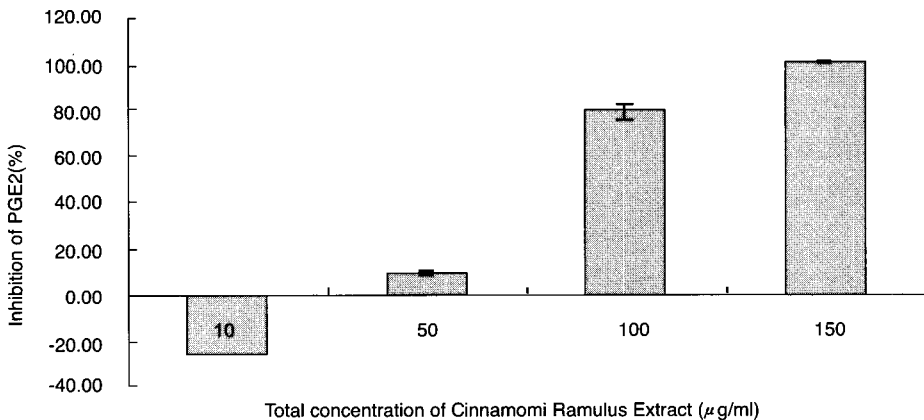


Fig. 6. Effects of Cinnamomi Ramulus extract on inhibition of PGE2 in LPS-induced RAW 264.7 cells.

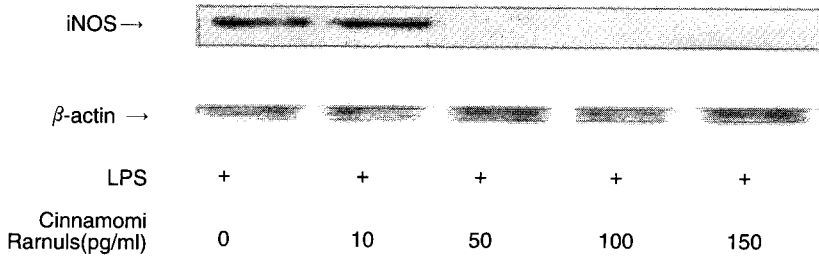


Fig. 7. Western blotting analysis of iNOS expression in LPS-induced RAW 264.7 cells in the presence or absence of Cinnamomi Ramulus extract.

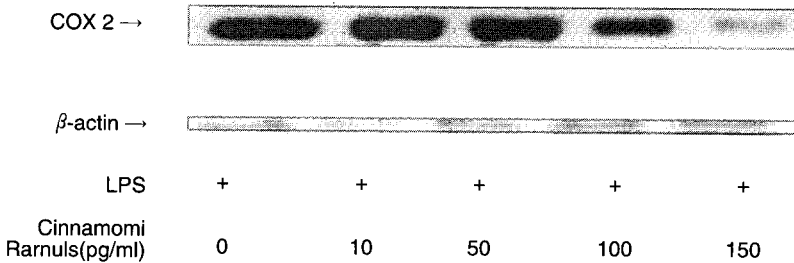


Fig. 8. Western blotting analysis of COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 cells in the presence or absence of Cinnamomi Ramulus extract.

어¹⁴⁾, 계지의 염증성 질환 치료제 개발 가능성이 높다고 할 수 있다.

염증 (Inflammation)은 여러 가지 형태의 감염이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 방어기전의 발현으로¹⁵⁾, 생체는 염증을 통하여 병원성 물질을 제거하고 손상된 조직의 재생을 통해 정상적인 구조와 기능을 되찾게 된다. 그러나 염증반응에 이상이 생기면 정상 조직까지 파괴하는데, 이러한 질병을 염증성 질환이라 하며 대표적인 사례로 관절염을 들 수 있다.

관절염은 관절에 염증성 병변이 생겨서 동통, 경직, 종창, 발적, 발열, 운동장애 등의 증상이 나타나

는 염증 질환으로, 한의학적으로는 歷節風^{16,17)}, 鶴膝風¹⁶⁾, 白虎歷節風¹⁸⁾, 痛風¹⁹⁾, 痺症²⁰⁾에 해당한다고 할 수 있다. 이들은 모두 痺症의 범주에 포함되는데, 痺症의 병인병리에 대해 『素問』〈痺論〉²⁰⁾에서는 風寒濕의 三氣가 합하여 痺症을 일으킨다고 하여 痺症에 대해 최초로 언급하였으며, 歷節風에 대해 최초로 기재한 『金匱要略』²¹⁾에서는 땀이 날 때 물에 들어가거나, 술을 마시고 땀이 날 때 바람을 쐬어 발생한다고 하였는데, 이것은 관절염의 병인 중 外因에 대한 기술로 볼 수 있다. 『景岳全書』¹⁷⁾에서는 眞陰과 精血이 소모되어 부족해진 이후에 風寒濕의 三氣가 침입하여 발생한다고 하였고, 『東垣十種醫書』²²⁾에서는

血熱이 왕성해진 이후 冷水나 濕地에 노출되거나 風寒冷의 사기에 접촉한 이후에 발생한다고 하였고, 『備急千金要方』²³⁾에서는 높은 지위에 있는 사람들은 뼈대가 약하고 살집이 좋은데, 이런 사람이 피로하여 땀을 흘린 이후 갑자기 움직일 때 바람을 쐬게 되면 발생한다고 함으로써, 병인으로 風寒濕의 외인뿐만 아니라 氣血不足과 같은 내인도 중요하게 고려하였다.

이러한 원인에 의하여 관절동통, 운동장애, 강직, 발열, 발적 등의 국소증상과 眩暈欲吐, 短氣, 自汗出 등의 전신증상이 나타나게 되는데²⁴⁾, 치료할 때는 외인과 내인을 함께 고려하여 風寒濕의 사기 중 風邪가 주로 심할 때는 祛風을 위주로 하고, 寒邪가 주로 심할 때는 散寒을 위주로 하고, 濕邪가 주로 심할 때는 利濕을 위주로 치료하는 동시에, 기혈이 부족한 경우에는 補氣, 補血하여 개체가 항상성을 유지하도록 해야 한다²⁵⁾. 즉, 기혈이 부족한 사람이 外邪의 침범을 받았을 때, 경맥의 소통이 방해를 받아 비증이 유발된다고 보므로, 치료할 때는 의사를 제거하는 동시에 부족한 기혈을 보해 주는 것을 원칙으로 삼고 있다. 또한 관절염의 주요 증상인 통증에 대해 한의학에서는 寒邪에 의해 기혈 순행이 장애를 받아 통증이 나타난다고 보기 때문에, 寒濕性의 風寒濕痺痛에 辛溫한 性味の 계지, 강활, 방풍 그리고 辛熱한 性味の 부자 등의 약물을 많이 응용하고 있으며, 대표적인 처방으로는 桂枝附子湯, 桂枝加朮附湯, 桂枝芍藥知母湯 등 風寒濕痺의 關節痛을 치료하는 처방과 黃芪桂枝五物湯처럼 營衛不足에 의한 血痺를 치료하는 처방 등이 있다²⁶⁾.

계지의 관절염 치료와 관련한 연구로는, 계지의 cinnamaldehyde 성분에 대한 연구²⁷⁾, 계지작약지모탕²⁸⁾, 백호가계지탕²⁹⁾, 계지보령환³⁰⁾ 등 처방에 관한 연구, 계지약침⁸⁹⁾에 대한 연구가 있다. 그러나 약물 요법으로 계지를 단미제로 썼을 경우 계지의 항염 효과와 그 기전에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없어, 본 연구에서는 계지 에탄올 추출물을 검액으로 사용하여 카라기난 유도 급성염증 모델 실험을 통해 급성염증에 대한 계지의 소염 효과를 알아보

고, LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 항염 효과를 알아보았다.

카라기난 유도 급성염증 모델은 카라기난의 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 염증을 일으키는 특성을 이용한 시험으로³¹⁾, 카라기난은 해조류에서 추출한 LPS의 일종으로 부종을 유발하는데, 1시간까지의 초기 부종기에는 histamine, 5-HT, kinin, PAF 등의 물질이 관여하고, 1시간 이후 6시간까지 후기 부종기에는 PG, superoxide anion, NO 등이 관여하는 것으로 알려져 있다³²⁾. 본 실험 결과, 계지 추출물을 경구 투여한 실험군에서는 계지 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 유의성 있는 부종 억제 효과를 나타내었으므로, 계지 추출물이 급성염증에 대하여 소염 효과가 있는 것으로 사료된다.

계지의 급성염증에 대한 소염 효과에 착안하여 LPS로 유도된 macrophage cell line인 RAW 264.7 세포를 선정하여 계지 추출물을 처리한 후, 염증반응에 있어서 주요한 염증 매개물질인 NO, PGE2, iNOS, COX-2의 생성에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 본 연구에서 이용한 RAW 264.7 세포는 대식세포주로서 사이토카인의 자극만으로도 스스로 NO를 생성하는 특성을 가지고 있어 일반적으로 세포독성을 갖는 물질의 독성 검정을 위해 유용하게 사용되고 있다³³⁾. 실험에서 RAW 264.7 세포의 활성화는 LPS를 이용하였는데, LPS는 동물에 여러 종류의 실험적 자가 면역질환을 유발하는 물질로, 대식세포를 자극하여 IL-1의 분비를 유발하여 T림프구 응답을 촉진시키고³⁴⁾, 염증매개물질인 TNF- α 의 분비를 유발시키고, PGE2의 생성을 증가시켜 일과성의 급성염증을 유발하는 것으로 알려져 있다.

염증 반응을 조절할 수 있는 인자 중의 하나로 알려진 NO는 두 개의 원자로 이루어진 매우 불안정한 free radical로 주위 환경의 다른 free radical이나 중금속과 쉽게 반응하며, 혈관확장, 신경전달체제, 항균물질, 면역조절 등의 생체 내 작용에 관여하는 물질로^{35,36)}, 생체에서 혈관 내피세포와 대식세포 및 신경원세포에서 생성되는데 아미노산인 L-arginine으로부터 NO를 형성하는 합성효소 (nitric oxidase,

NOS)는 크게 두 가지로 분류된다. 세포 내에 항상 존재하며 소량의 NO를 생성하는 constitutive NOS (cNOS)와 염증 등의 자극에 의해 활성화된 대식세포 등에서 유도되는 inducible NOS (iNOS)가 있는데, cNOS에 의해 생성된 NO는 신경전달물질로 작용을 하고 내피세포에서는 혈관확장 작용을 하는 반면, iNOS에 의해 과량으로 생성된 NO는 조직을 손상시키는 염증매개물질로 작용한다³⁷⁾. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며, 대식세포가 interferon- γ (IFN- γ) 또는 lipopolysaccharide (LPS)의 자극을 받게 되면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 과량의 NO를 생성하게 되고, 과량으로 생성된 NO는 염증매개물질로 작용하여 TNF- α , IL-1 및 IL-6 등 pro-inflammatory cytokine 뿐만 아니라 COX-2와 같은 염증매개물질을 과량 생산하여 과도한 면역 반응을 야기함으로써 각종 인체 질환을 악화시킨다³⁸⁾.

일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만, 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다³⁹⁾.

본 실험에서 NO 생성은 LPS만 처리한 대조군에 비하여 계지 추출물을 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 그리고, 계지 추출물 처리에 의한 NO의 생성 억제가 iNOS의 억제에 기인한 것인지 확인하기 위하여 Western blotting으로 분석한 결과 LPS에 의해 증가된 iNOS의 발현이 계지 추출물 처리에 의해 감소하며 계지 추출물의 농도가 증가할수록 iNOS의 발현이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

염증 반응에서 통증과 발열을 주로 전달하는 중요한 매개물질인 PG는, 세포막에 존재하는 인지질에서 유래된 불포화지방산의 대사산물이며, phospholipase A2, COX 및 hydroperoxidase가 관여하는 일련의 산화반응에 의해 생성되는데, PGE₂는 최근 연구에 의하면, 염증, 세포사멸, 혈관신생 및 관절질환에서 특징적으로 나타나는 구조적 변화 등

에 관여한다고 한다⁴⁰⁾. COX는 arachidonic acid를 PG으로 전환시키는 효소로서, COX-1과 COX-2로 분류된다. 생리·병리적인 조건에서 늘 일정하게 대부분의 세포에서 발현되며, 항상성을 조절하기 위한 PG 합성에 관여하는 COX-1과 달리, 특정 세포에서 염증성 자극에 의해 유도되는 COX-2는 PG 형성에 관여하며, COX-2에 의해 형성되는 PG는 통증, 염증과 발열을 전달할 뿐만 아니라 종양 형성을 도와준다.

본 실험에서 PGE₂ 생성은 LPS만 처리한 대조군에 비하여 계지 추출물을 50, 100, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군에서 PGE₂ 생성이 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

그리고 계지 추출물 처리에 의한 PGE₂의 생성 억제에 COX-2의 억제에 기인한 것인지 확인하기 위하여 Western blotting으로 분석한 결과 LPS에 의해 증가된 COX-2의 발현이 계지 추출물 처리에 의해 감소하며 계지 추출물의 농도가 증가할수록 COX-2의 발현이 현저하게 감소하는 것으로 나타났다.

본 실험 결과, 계지 추출물은 카라기난 급성 관절염 모델에서 급성염증에 대한 소염 효과를 나타내었고, LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 NO와 PGE₂ 생성을 억제하고, iNOS 및 COX-2의 발현을 저해시켰다.

이상의 결과는 계지 추출물이 LPS 유도성 염증 모델에서 NO, PGE₂, iNOS, COX-2와 관련이 있음을 제시하는 것이며, 유의한 항염 효과가 있음을 보여주는 것으로, 이러한 계지의 항염 효과는 류마티스 관절염을 비롯한 염증성 질환에 계지를 응용할 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료된다.

결론

한의학적으로 發汗解肌, 溫經通脈 등의 효능이 있는 계지의 항염 효과를 검토하기 위한 카라기난 유도 급성염증 모델과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서의 항염 작용 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GC-MS 분석을 통해 본 실험에서 사용한 계지 에탄올 추출물의 주성분이 cinnamaldehyde와 coumarin으로 동정되었다.
2. 카라기난 유도 급성염증 모델에서의 소염 효과 측정에서 계지 추출물을 경구 투여한 군은 계지 추출물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 유의한 부종 억제 효과를 나타내었다.
3. NO 생성율은 LPS만 처리한 대조군에 비하여 계지 추출물 처리군에서 NO 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다.
4. PGE₂ 생성율은 계지 추출물 처리군에서 유의성 있는 PGE₂ 생성 저해활성을 나타내었다.
5. iNOS 및 COX-2의 발현이 계지 추출물 처리에 의해 현저하게 감소됨이 인정되었다.

이상의 결과는 계지가 iNOS 및 COX-2의 활성을 감소시키고 NO와 PGE₂의 생성을 억제하는 항염 효과가 있음을 보여주는 것으로, 이러한 계지의 항염 효과는 계지를 활용한 새로운 항염증약물 개발 가능성을 제시하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 著者 未詳. 神農本草經. 台北:文光圖書有限公司. 1982:91.
2. 章永紅 編著. 抗癌中藥大全. 南京:江蘇科學技術出版社. 2000:341.
3. 신민교. 원색임상본초학. 서울:영림출판사. 1988:518-9.
4. 서부일, 최호영. 임상 한방본초학. 서울:영림사. 2004:126-9.
5. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2001:66-7.
6. 朴哈俊, 朴涌基. 계피나무의 部位別 抗酸化作用에 關한 研究(I). 대한본초학회지. 2000; 15(2):45-55.
7. 박종은, 최혁재, 정석희, 김남재, 김동현. 빈 용 한약재의 진통 소염활성. 생약학회지. 2001; 32(4):257-68.
8. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 mouse의 LPS誘發 關節炎 중 細胞性免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001; 18(1):100-112.
9. 안형준, 도원석, 장준혁, 김갑성. 桂枝藥鍼刺戟이 白鼠의 LPS誘發 關節炎 中* 免疫組織化學的 變化에 미치는 影響. 한의정보학회지. 1998;4(1):35-48.
10. Storck M, Schilling M, Burkhardt K, Prestel R, Abendroth D, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. Transpl Int. 1994;7(Suppl1):647-9.
11. Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. J Assoc Off Anal Chem. 1982;65(3):690-5.
12. Shen Q, Chen F, Luo J. Comparison studies on chemical constituents of essential oil from Ramulus Cinnamomi and Cortex Cinnamomi by GC-MS. Zhong Yao Cai. 2002; 25 (4):257-8.
13. 季宇彬 主編. 抗癌中藥藥理與應用. 黑龍江科學技術出版社. 1999:980-2.
14. Shin KH, Chi HJ. Biological Activity of Natural Coumarins. Kor. J. Pharmacog. 1979;10(1):1-8.
15. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Pathologic basis of disease. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 1994:51-92.
16. 허준. 국역증보 동의보감. 서울:남산당. 1995:413, 529-36.
17. 張介賓. 景岳全書. 北京:人民衛生出版社. 1991:248-55.
18. 김정제. 진료요감. 서울:동양의학연구소. 1991:459.
19. 唐宗海. 血證論. 서울:일증사. 1992:168.
20. 著者 未詳. 今釋 黃帝內經素問. 서울:성보사. 1994:376-82.

21. 張仲景. 金匱要略方論. 臺北:東方書店. 1950:30-9.
22. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울:대성문화사. 1983:480-1.
23. 孫思邈. 備急千金要方. 北京:人民衛生出版社. 1988:171.
24. 楊思樹. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. 1991:502-11.
25. 黃道淵. 醫宗損益. 서울:의약사. 1976:356-8.
26. 神戸中醫學研究會 編著. 中國臨床のための中藥學. 東京:醫齒藥出判株式會社. 1997:38-40.
27. 김지형, 박선동. 계지탕의 문헌적 고찰. 대한본초학회지. 1996;11(2):115-34.
28. 신병희, 이종수, 신현대. 계지작약지모탕이 제 II 형 Collagen유발 관절염의 항체에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1994;4(1):121-33.
29. 유경주, 신현대, 정석희, 이종수, 김성수. 백호탕과 백호가계지탕이 류마티드 관절염 및 Human Monocyte의 IL-8에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1995;5(1):79-92.
30. 하동주, 정경진, 이기남. 계지복령환이 실험동물의 진통력六峯항경련력結 및 정상체온에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16(1):339-50.
31. Bonney RJ, Gery I, Lin TY, Meyenhofer MF, Acevedo W, Davies P. Mononuclear phagocytes from carrageenan-Induce granulomas. Isolation, cultivation, and characterization. J Exp Med. 1978;148 (1):261-75.
32. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. Brit. J. Pharmacol. 1996 ; 118 :829-38.
33. 염정호. 니켈 및 코발트의 세포독성 기전에서 NO의 역할. 대한 산업의학회지. 2001;13(3):274-7.
34. Matsukawa A, Ohkawara S, Maeda T, Takagi K, Yoshinaga M. Production of IL-1 and IL-1 receptor antagonist and the pathological significance in lipopolysaccharide-induced arthritis. Clin Exp Immunol. 1993;93(2):206-11.
35. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43:109-42.
36. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med. 1998;25(4-5):434-56.
37. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis. 1999;20(10):1945-52.
38. Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. Life Sci. 1997;61(21):2073-81.
39. Sin GM, Park YM, Kim IT, Hong SP, Lee GT, Hong JP. In vitro Antiinflammatory Activity of Amygdalin in Murine Macrophage Raw 264.7 Cells. Kor. J. Pharmacogn. 2003;34(3):223-7.
40. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Semin Arthritis Rheum. 2003;33(3):155-67.