경락경혈학회지 Vol.27, No.2, pp.13~24, 2010
Korean Journal of Acupuncture

지각 약침액의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구

김성진 · 박상균

상지대학교 한의과대학 경락경혈학교실

Antioxidative and Anti-inflammatory Effects of *Aurantii Fructus Immaturus* Pharmacopuncture

Sung-Jin Kim, Sang-Kyun Park

Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Sangji University

Abstract

Objectives : Ulcerative colitis is a chronic relapsing inflammatory disease in the gastrointestinal tract. We investigated whether *Aurantii fructus immaturus* (AFI) pharmacopuncture has antioxidative and anti-inflammatory effects.

Methods : *in vitro* experiments, 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, superoxide dismutase (SOD) activity, prevention on H_2O_2-induced cell death in RAW264.7 cell line, DNA fragmentation, and cyclooxygenase-2 mRNA expression induced by lipopolysaccharide (LPS), were analyzed to investigate antioxidative and anti-inflammatory effect of AFI pharmacopuncture. *in vivo* experiment, a murine model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis was used to examine the effect of AFI pharmacopuncture on CV12 at different doses of 5 ㎕, 0.5 ㎕, 0.05 ㎕ for 10 days. Body weight, colon length and macroscopic features were investigated.

Results : AFI pharmacopuncture showed DPPH free radical scavenging and SOD active effects in a dose-dependent manner. AFI pharmacopuncture showed a protective effect against H_2O_2 -induced cell injury and also attenuated LPS-induced COX-2 mRNA expression. In a DSS- induced colitis murine model, however, AFI pharmacopuncture at CV12 had no anti-inflammatory effects.

Conclusions : The present results suggest that AFI pharmacopuncture extract may have anti- inflammatory and antioxidative effects *in vivo* test, but further research on the underlying mechanism is required.

Key words : *Aurantii fructus immaturus*, Antioxidative, Anti-inflammation, Dextran sulfate sodium, Inflammatory bowel disease

Ⅰ. 서 론

염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론씨병(Crohn's disease)으로 분류되는데[1], 궤양성 대장염은 호전과 악화가 반복되는 혈성 설사, 대변절박증, 그리고 복통을 주된 증상으로 하는 원인 불명의 만성 염증성 장질환[2]으로 서구에 흔한 질병이나 최근 우리나라에서도 그 발병율과 유병율이 빠르게 증가하고 있다[3]. 염증성 장질환의 원인은 명확하지 않으나 유전적 요인, 감염적 요인, 면역학적 요인, 심리적 요인 등이 관여하는 것으로 알려

· 교신저자 : 김성진, 강원도 원주시 우산동 660번지
상지대학교 한의과대학 경락경혈학교실,
Tel. 010-6418-6656, E-mail: feelthegood@naver.com
· 투고 : 2010/03/18 심사 : 2010/04/30 채택 : 2010/06/09

져 있다[4]. 이에 대한 치료는 5-aminosalicylic acid 제제, 스테로이드, 면역조절약물 제제가 있으나[5], 부작용이 적으며 장기적으로 효능이 입증되는 이상적인 새로운 치료법의 개발이 대두되고 있으며[6], 여러 가지 염증질환에 대체의학 치료방법의 관심도 증가하고 있다[7].

산화적 스트레스는 염증성 장질환의 잠재적 원인이 되기도 하는데, 염증성 장질환 환자에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 증가하고, 항산화능은 감소하는 결과를 보인다[8]. 생체의 산화 과정 중에 생성된 활성산소들은 퇴행성질환, 암, 동맥 경화와 같은 만성질환과 관계하는 것으로 알려져 있으며[9], 활성산소종은 단백질, 지질, DNA와 같은 거대분자를 빠른 속도로 붕괴시킴으로써 결국 세포를 사멸시켜 염증반응에 관여한다[10].

枳殼(*Aurantii fructus immaturus*, 이하 AFI)은 운향과에 속한 酸橙(*Citrus aurantum* L.)의 미성숙한 과실을 건조한 것으로 肺, 脾, 大腸에 귀경하며, 破氣, 行痰, 消積의 효능으로 胸膈痰滯, 胸痞, 脇脹, 噫氣, 嘔逆, 下痢後重, 脫肛, 子宮脫垂 등에 사용된다[11].

본 연구에서는 枳殼의 임상적 활용에 비추어 소염, 항산화 기전이 관여할 것으로 가설을 세우고 이를 검증하기 위하여 枳殼을 약침액으로 조제하여 그 항산화 및 항염증 효과를 여러 in vitro 실험을 통해 수행하고, *in vivo* 실험에서 dextran sulfate sodium (DSS)으로 유도된 궤양성 대장염 모델에 枳殼 약침액을 인체의 胃募穴인 中脘(CV12) 상응부위에 농도별로 주입한 후 체중 및 대장 길이의 변화를 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 약침액 제조

본 실험에 사용한 枳殼은 시중에서 구입하였으며, 건조된 枳殼 100 g을 증류수 1000 ㎖로 3시간 전탕한 후 감압농축기로 100 ㎖로 감압농축 하였다. 그 후 실온까지 냉각하여 100 ㎖의 75% ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 방치하고 난 후 생성된 침전물을 여과하였다. 여액을 다시 감압농축기에서 농축하여 100 ㎖로 만든 후 100 ㎖의 85% ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 동안 방치하고 난 후 생성된 침전물을 여과하였다. 여액을 다시 감압 농축하여 100 ㎖로 만든 후 100 ㎖의 95% ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 동안 방치하고 난 후 생성된 침전물을 여과하였다. 여액을 감압농축한 후 0.1 N NaOH와 HCl로 pH 7.2-7.4로 조절한 후 0.2 ㎛의 membrane filter로 여과한 후 실험에 사용하였다. 시료의 농도는 약침액 원액을 100%로 하여 실험항목에 따라 생리식염수로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 세포주

본 실험에 사용한 세포주는 RAW264.7 세포로 한림대학교 지역기술혁신센터에서 분양받아 사용하였다. 분양받은 즉시, 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA), penicillin

(100 units/㎖, Sigma, USA), streptomycin (100 ㎍/㎖, Sigma, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA)배지로 5% CO_2 , 37℃ 조건에서 배양하였다.

3) 시약 및 재료

실험에 사용한 시약인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Griess-reagent(modified), lipopolysaccharide(LPS), radioimmunoprecipiation assay (RIPA) buffer, bicinchoninic acid(BCA), bovine serum albumin (BSA)은 Sigma(USA)에서 구입하였다. Cyclooxygenase-2(COX-2)는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였고, ELISA reader(PerkinElmer, USA)를 사용하여 실험하였다.

2. 실험방법

1) DPPH를 이용한 항산화능 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 枳殼 약침액의 라디칼 소거능을 Blois 법[12]에 의하여 분석하였다. 여러 농도의 枳殼 약침액 200 ㎕에 1.5×10^{-4} M 농도로 메탄올에 용해시킨 DPPH 용액 800 ㎕를 첨가 혼합하여 30분간 실온에서 방치하였다. 그 후 520 nm에서 UV-VIS Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Blank는 DPPH 대신 ethanol을 사용하였고, control은 枳殼 약침액 대신 증류수를 사용하였으며, DPPH에 의한 항산화능(%)은 다음과 같다.

항산화능(%)=

$$\left(1-\frac{sample\,흡광도-blank\,흡광도}{Control\,흡광도}\right)\times 100$$

2) SOD를 이용한 항산화능 측정

Superoxide dismutase(SOD)의 효소활성은 Fluka社에서 판매하는 kit(제품명: 19160 SOD determination kit)를 사용하였다. Xanthine oxidase(XOD)에 의해 생성된 superoxide radical들은 반응액에 포함된 NBT와 반응하여 보라색의 NBT-diformazan을 형성하는데, SOD의 활성이 높을 경우 XOD에 의해 형성된 Oxygen radical이 SOD에 의해 제거됨으로서 상대적으로 formazan의 형성이 감소하게 된다. 이와 같이 형성된 formazan을 450 nm에서 흡광도를 측정하여 SOD의 활성을 검증하였다.

먼저 96-well plate의 각 well에 측정할 枳殼 약침액을 20 ㎕씩 넣고, 음성대조군에는 같은 양의 증류수를 넣었다. 그런 후에 각 well에 200 ㎕의 WST 염색시약을 첨가한다. 이 때 대조군에는 희석용 buffer를 사용하였다. 그 다음 과정은 각 well에 미리 정해놓은 농도의 SOD 효소(enzyme working solution)를 처리하고 37℃에서 20분 동안 방치하였다. 그런 후에 흡광도 450 nm에서 그 염색시약의 정도를 정량적으로 측정하였다. SOD 활성 정도는 제조사의 시험방법에 따라 계산하였다.

3) H_2O_2에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호효과

RAW264.7 세포를 각 배양접시에 3×10^5 cells/㎖가 되도록 분주한 후에 0.1 ㎎/㎖로 조정된 枳殼 약침액을 5% (v/v)의 농도로 처리하였다. 약 3시간 정도 배양 한 다음, 1 mM의 농도로 H_2O_2를 처리하였다. 실험은 아무것도 처리하지 않은 음성대조(normal)과 枳殼 약침액을 처리하지 않고 H_2O_2만을 처리한 양성대조군(control)을 枳殼 약침액군과 같이 수행하였다. H_2O_2의 처리 6시간, 12시간 경과한 시점에 각 실험군의 세포를 취해 trypan blue 시약을 이용하여 hematocytometer로 측정하였다. 측정하기 위해 취한 전체 세포수 중에서 파란색으로 염색된 사멸된 세포수를 측정하여 백분율로 나타내었다.

4) DNA fragmentation

RAW264.7 세포를 5×10^5 cells/㎖로 조정하여 60 mm dish에 옮긴 후 1 mM의 H_2O_2를 처리하고, 枳殼 약침액을 처리하였다. 그 후 6시간, 18시간 후 세포를 수거하여 DNA fragmentation 실험을 수행하였다. RAW264.7 세포를 얼음으로 차게 한 phosphate buffer saline(PBS)으로 한 번 세척한 후 세포 침전물을 700 ㎕의 lysis buffer(20 mM Tris-HCl, pH8.0, 10 mM EDTA, 0.5% Triton X-100)로 현탁시키고, 0℃에서 45분간 유지 시키면서 가끔씩 침전된 세포를 현탁시켜 세포의 파쇄를 용이하게 하였다. 파쇄된 세포를 4℃에서 13,000 ×g로 20분간 원심 분리하여 세포질 부분을 회수하였다. 이 세포질 용액을 phenol/chloroform으로 두 번 extraction하여 단백질을 제거하고 세포질 내로 유출된 DNA와 RNA를 sodium acetate/isopropanol로 침전시켰다. 침전된 핵산을 40 ㎕의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)로 용해시키고, 200 ㎍/㎖의 농도가 되게 DNase-free RNase를 넣고 37℃에서 1시간 방치하였다. RNA가 제거된 DNA 용액을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA를 ethidium bromide로 염색한 후 자외선으로 DNA 절편을 확인하고, 사진을 찍어 가시화하였다.

5) COX-2 발현억제 효과

RAW264.7 세포를 각 배양접시에 3×10^5 cells/㎖가 되도록 분주한 후에, 농도별(100, 50, 25, 12.5, 6.25 %)로 희석한 각 枳殼 약침액을 처리하였다. 3시간 정도 처리한 후에 염증 유발물질인 lipopolysaccharide(LPS)를 0.5 ㎍/㎖의 농도로 처리하였다. 그리고 15시간 처리한 후에 각 세포를 취해 western blot을 실시하였다. Western blot은 각 실험군의 단백질 농도를 10 ㎍/㎖로 동일화 한 후, 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 전개 된 gel을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 단백질이 binding된 nitrocellulose membrane를 5% skim milk에서 6시간 blocking한 후, COX-2의 항체(1차 항체)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 후에 TBS buffer (pH 7.5)를 이용하여 3회 세척 하였다. 그리고 난 후, horse-radish peroxidase (HRP)가 붙어 있는 2차 항체를 1시간 처리하고 PBS로 5회 세척하였다. 모든 과정이 끝나면 HRP 효소에 ECL solution을 첨가한 후, LAS3000을 이용하여 데이터를 분석하였다.

6) DSS 유발 대장염 실험

(1) 실험동물

동물은 4-5주령, 20-25 g의 수컷 BALB/c 마우스를 사용하였다. 적응기간 및 실험기간 동안 멸균된 사료와 증류수를 자유롭게 급식시키면서, 온도 21±2℃, 습도 55±3%에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2) 대장염 유발 및 약침 처리

동물은 한 군 당 5마리씩 체중이 유사하도록 배치하였으며 아무 처리하지 않은 정상대조군, 궤양성 대장염을 유발하고 생리식염수를 中脘(CV12)에 시술한 대조군과 대장염 유발과 함께 100% 枳殼 약침액을 농도별로 0.05, 0.5, 5 ㎕씩 中脘(CV12)에 시술한 군까지 총 다섯 군으로 분류하였다. 대장염의 유발은 5%의 dextran sulfate sodium (DSS, 분자량 36-44 kDa)용액을 5일간 투여하여 DSS 유발 대장염을 유발하였다. 枳殼 약침액은 DSS 투여와 함께 시작하여 투여가 끝나고도 매일 0.05, 0.5, 5 ㎕씩 WHO 표준혈위에 근거하여 인체의 中脘(CV12)부위에[13] 상응하는 부위에 10일간 시술하였다. 열흘째 되는 날까지 매일 체중을 측정하였고, 실험 마지막 날인 10일에 대장을 적출하여 그 길이를 측정하였다.

3. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 Graphpad Prism 5 (Graphpad software, USA)를 이용하였고, 모든 자료는 평균±표준편차로 표시하였고, student's *t*-test, one-way *ANOVA*를 실시하였으며, $p<0.05$인 경우를 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. DPPH를 이용한 항산화효과

DPPH를 이용하여 항산화효과를 50%, 25%, 12.5%, 6.25%의 枳殼 액침액으로 실험한 결과, 50%에서는 枳殼 약침액 자체의 색에 의한 간섭으로 항산화효과가 작게 나온 반면, 25% 이하에서는 농도의존적인 항산화효과가 나타났다(Fig. 1).

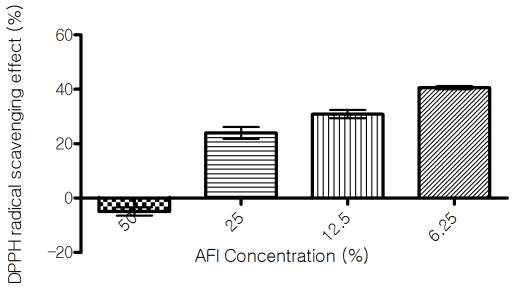

Fig. 1. Effect of AFI pharmacopuncture on 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) free radical scavenging activity.
AFI, *Aurantii fructus immaturus.*

2. SOD를 이용한 항산화효과

SOD를 이용하여 항산화효과를 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%의 枳殼 액침액으로 실험한 결과, 100% 농도에서는 106.7±3.8%의 억제효과를 보였으며, 50% 농도에서는 40.5±0.2%, 25% 농도에서는 25.5±3.2%, 12.5%의 농도에서는 69.5±0.6%, 6.25% 농도에서는 10.1±0.4%의 억제효과를 나타냈다(Fig. 2).

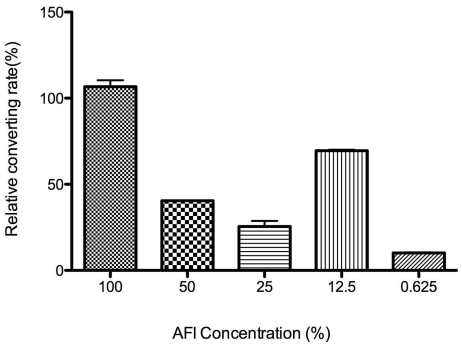

Fig. 2. Effect of AFI pharmacopuncture on SOD free radical scavenging activity.
Relative converting rate(%) : absorbance of NBT-diformazan at 450 nm
AFI, *Aurantii fructus immaturus* ; SOD, superoxide dismutase

3. H_2O_2에 의한 산화적스트레스에 대한 보호효과

H_2O_2로 산화적스트레스를 유도하고, 枳殼 약침액이 이를 방어하는지 확인하는 실험을 수행한 결과 6시간 경과 후에는 H_2O_2만을 처리한 군에 비하여 낮은 보호효과를 보였으나, 12시간 경과 뒤에는 10% 이상의 보호효과가 관찰되었다(Fig. 3).

4. DNA 절편 보호효과

RAW264.7 세포에 H_2O_2를 처리한 후 6시간, 18시간 경과 뒤 DNA 절편변화를 관찰하였다. 6시간보다 18시간 처리 시에 DNA 절편이 줄어드는 결과가 나타났다(Fig. 4).

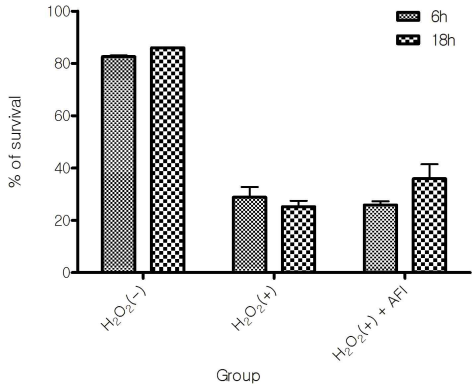

Fig. 3. Protective effect of AFI pharmacopuncture on H_2O_2-induced cell injury in RAW264.7 cell line.
AFI, *Aurantii fructus immaturus*.

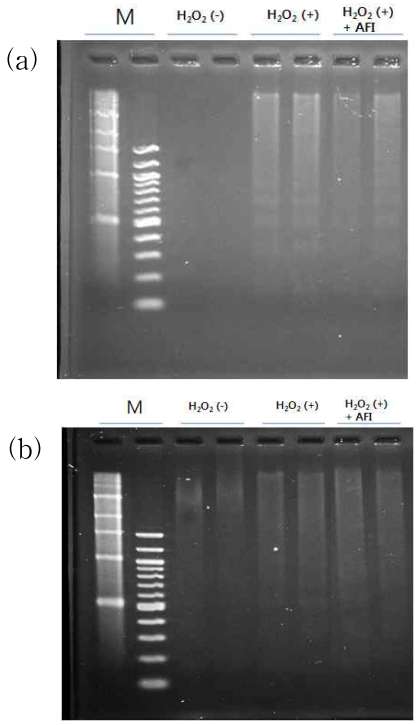

Fig. 4. Effect of AFI pharmacopuncture on DNA Fragmentaion.
(a) at 6 h after H_2O_2 treatment; (b) at 18 h treatment ; AFI, *Aurantii fructus immaturus*.

5. COX-2 발현억제 효과

RAW264.7 세포를 LPS로 처리하고 염증성 단백질인 COX-2의 발현 유무를 Western blot으로 확인하였다. 농도가 증가함에 따라 COX-2의 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 5).

Fig. 5. Effect of AFI pharmacopuncture on LPS-induced COX-2 expression.
AFI, *Aurantii fructus immaturus* ; NC, normal control ; PC, positive control.

6. DSS 유발 대장염 실험

DSS로 대장염을 유발시킨 뒤 100%의 枳殼 약침액을 5 ㎕, 0.5 ㎕, 0.05 ㎕씩 생쥐의 中脘(CV12)에 하루 1회씩 열흘간 주입하면서 매일 체중변화를 측정한 결과 실험 10일째 정상대조군의 체중이 22.43±1.24 g이었으며, DSS만 처리한 대조군은 18.43±1.73 g이었고, 100% 枳殼 약침액 0.05 ㎕를 처리한 군은 19.02±1.86 g이었고, 0.5 ㎕의 경우 18.54±1.04 g이었고, 5 ㎕를 처리한 군은 18.12±1.94 g이었다(Fig. 6). 실험 완료 후 대장의 길이를 측정하고 현미경으로 관찰한 결과 DSS만 처리한 대조군과 비교할 때 枳殼 약침은 유의한 차이가 없었다(Figs. 7, 8).

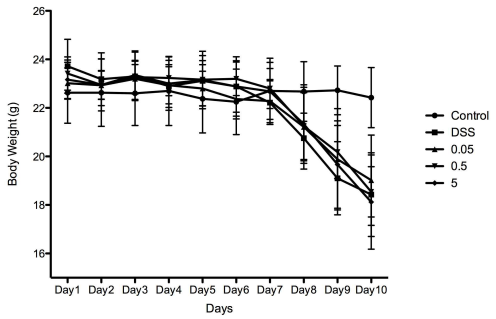

Fig. 6. Effect of AFI pharmacopuncture at CV12 on body weight changes in mice with DSS-induced colitis.
AFI, *Aurantii fructus immaturus* ; DSS, dextran sodium sulfate.

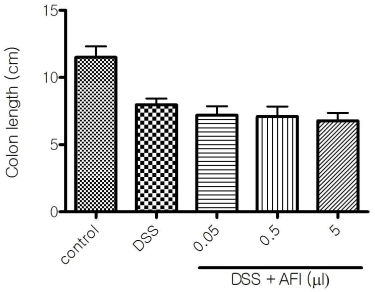

Fig. 7. Effect of AFI pharmacopuncture at CV12 on colon length in mice with DSS-induced colitis (at day 10).
100% AFI was injected on CV12 at different doses of 0.05, 0.5, and 5 ㎕ for 10 days. AFI, *Aurantii fructus immaturus* ; control, normal control ; DSS, dextran sodium sulfate.

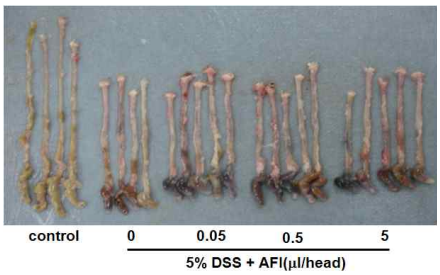

Fig. 8. Effect of AFI pharmacopuncture at CV12 on macroscopic appearance of colon in mice with DSS-induced colitis(at day 10).
100 % AFI was injected on CV12 at different doses of 0.05, 0.5, and 5 ㎕ for 10 days. AFI, *Aurantii fructus immaturus* ; control, normal control ; DSS, dextran sodium sulfate.

Ⅳ. 고 찰

염증성 장질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론씨병(Crohn's disease)으로 구분된다[14]. 그 중 궤양성 대장염은 연속적으로 직장에서 근위부로 침범하는 점막 또는 점막하층의 염증을 특징으로 하는 원인 불명의 만성 염증성 장질환으로, 호전과 악화가 반복하는 혈성 설사와 대변절박증 및 복통 등이 주요 증상이며[15], 병변 부위에 따라 직장염, 좌측대장염, 광범위대장염으로 구분된다[16]. 염증성 장질환의 원인은 확실하지 않지만[17] 환경적, 유전적, 생물학적, 면역학적, 심리적 요인이 작용할 것으로 생각된다[18].

『東醫寶鑑』의《湯液篇》에 따르면, 枳殼은 성질이 차고, 맛은 쓰며 시고 독이 없으며, 가슴 속에 몰려 있는 痰을 헤치고 大小腸을 잘 통하게 하며 脹滿을 삭히고 關格으로 몰리고 막힌 것을 열어 주는 작용이 있고, 아울러 痰을 삭이고 물을 몰아내며 癥癖과 몰려 있는 邪氣를 헤치고 風으로 가렵고 마비된 것, 腸風, 痔疾을 낫게 한다고 하였다[19]. 李時珍의 경우 裏急後重, 腸風下血에 사용하는 약물로 기재하고 있다[20].

따라서 枳殼의 문헌적 효능과 임상적 활용으로 보아 소화기계염증 질환에 활용하는 기전에 소염, 항산화 작용이 관여하는지 규명하기 위하여 본 연구에서는 *in vitro*와 *in vivo* 실험으로 구분하여 다양한 가능성을 살펴보았다.

산화반응 중 발생한 활성산소는 세포막을 형성하는 주성분인 지질의 과산화 현상을 불러와 조직손상을 유발하고 기관과 세포의 쇠퇴와 염증을 초래한다[10,21].

본 실험에서는 枳殼 약침액의 활성산소 소거능을 DPPH를 이용하여 조사한 결과, 50%에서는 枳殼 약침액 자체의 색에 의한 간섭으로 소거능이 작게 나온 반면, 25 % 이하에서는 농도의존적인 항산화능이 나타나 항산화 작용이 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

또한, SOD의 활성을 이용하여 항산화 작용을 조사하였는데 이는 xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide radical을 SOD가 산소와 H_2O_2로 전환하는 정량값으로 나타내며, 이 때 효소활성은 수용성 formazan 염색약을 이용하여 흡광도의 증감으로 표현하게 된다. 이 실험에서는 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%의 5가지 농도의 枳殼 약침액을 이용하였는데 10%에서 100% 범위의 대체적으로 농도의존적인 억제능을 보여 DPPH를 이용한 실험의 결과와 일관된 경향을 나타내었다(Fig. 2).

과산화수소와 같은 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species)은 산화적 스트레스를 유발하고[22], 반응성산소종의 농도와 표적세포의 종류에 따라 돌연변이, 염색체 절단, 세포독성, 암발생, 지질과산화, 단백질교차결합, 세포파괴와 같은 다양한 생물학적 손상의 원인이 되며[23,24], 부분적으로 항산화제에 의해 억제된다[25].

H_2O_2로 유도한 산화적 스트레스 보호효과에서는 6시간 경과 후에는 枳殼 약침액의 세포사멸 보호 효과가 대조군에 비해 미미하였으나 12시간이 경과한 시점에서는 10% 이상의 보호효과가 있었으며(Fig. 3), RAW264.7

대식세포에 H_2O_2로 손상을 주고 DNA 분절 변화를 관찰한 실험에서도 6시간보다 18시간 처리 시에 DNA 분절이 줄어드는 결과가 나타나 H_2O_2로 유도한 산화적 스트레스에 의한 세포보호효과에서와 비슷한 시점에 결과를 나타내었다(Fig. 4.). 또한 LPS는 병원균의 내독소이며, 그람 음성 세균의 세포막 구성 물질로서 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며[16], 여러 종류의 염증 세포 및 조직 세포들의 cytokine 생산을 촉진한다는 것이 밝혀져 염증 반응을 연구하는 실험 모델에 많이 응용되는데[26,27], 본 실험에서는 RAW264.7 대식세포에 LPS를 처리하여 pro-inflammatory cytokine인 COX-2의 발현 유무를 Western blot으로 확인하고자 하였다. 그 결과 枳殼 약침액의 농도가 증가함에 따라 COX-2의 발현이 감소됨을 확인하여 枳殼 약침액의 소염 작용의 일부는 COX-2의 발현을 억제하는 기전을 통해 이루어지는 것으로 생각해 볼 수 있다(Fig. 5). 그러나 문헌을 조사해 본 결과 枳殼의 소염작용이나 항산화 작용에 관한 사전 연구들이 없으므로 본 연구를 토대로 향후 더 많은 기전연구가 필요함을 알 수 있었다.

염증성 장질환을 유발시키는 여러 가지 방법 중에서[28,29,30,31] DSS를 이용하는 것은 상대적으로 적은 스트레스를 주고, 사람과 유사한 대장염을 유발시킬 수 있다는 장점이 있다. 본 실험의 경우는 DSS로 궤양성 대장염을 유발시킨 동물 모델에서 100 %의 枳殼 약침액을 5 ㎕, 0.5 ㎕, 0.05 ㎕씩 생쥐의 中脘(CV12)에 하루 1회씩 열흘간 주입하여 실험하였다. 본 연구에서 사용한 中脘(CV12)은 任脈에 속하는 경혈로 윗배부위, 앞정중선(anterior median line) 상에서 배꼽 위 4寸 부위에 취혈하며 胃經의 募穴이며 八會穴 중 腑會로 健脾和胃化痰하므로 胃脘痛, 嘔吐, 呑酸, 腹脹, 腸鳴, 泄瀉, 便秘, 痢疾 등을 치료한다[13]. 그러므로 본 실험에서 궤양성 대장염 동물모델에서 이 경혈을 이용하여 枳殼 약침을 시술하여 소염효과의 여부를 확인하고자 한 것이다. 그 결과 DSS 처리군에 비하여 0.05 ㎕에서 약 3%의 체중 감소 억제가 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 6). 또한 약침 처리 열흘째 되는 날 대장의 길이를 관찰한 결과 DSS만 처리한 대조군과 비교하여 枳殼 약침처리군에서 대장의 길이와 형태에서 유의한 차이가 없었다(Figs. 7, 8). 그 이유를 분석하자면 부위에 DSS로 유발된 궤양성 대장염 모델에서는 실제로 枳殼 약침이 효과가 없을 수 있고, 선택한 혈위에 효과가 없었을 수도 있다. 手陽明大腸經의 募穴인 天樞(ST25)나 기타 관련된 혈위를 이용한 추가적 실험이 요구된다. 한편 실험에 사용한 枳殼 약침액의 농도나 주입량이 효과를 나타내는 데에 부족했을 가능성도 배제할 수 없겠다.

결론적으로, 枳殼 약침액은 항산화 및 세포보호 작용이 있으며 COX-2의 발현 억제를 통해 항염증 효과가 있을 가능성을 발견하였으나 DSS로 유발된 궤양성 대장염 동물 모델에서 소염 효과는 미미한 것으로 나타나 추후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

枳殼 약침액의 항산화 및 항염증에 관한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 枳殼 약침액은 항산화능을 보였다.
2. 枳殼 약침액은 H_2O_2로 유도된 산화적스트레스에 대한 세포보호 효과를 나타내었다.
3. DSS로 유도된 대장염 동물모델에서 中脘(CV12)에 농도별 枳殼 약침을 열흘간 시술한 결과 대조군에 비해 항염증 효과는 유의하지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 枳殼 약침액은 일부의 세포보호 및 항염증 효과가 나타났으나 추후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 고영은, 김미경, 조한영, 이인영, 이선영. Dextran sodium sulfate로 대장염을 유도한 흰쥐에서 캐피어 원말의 장보호 효과. 한국영양학회지. 2008 ; 41(5) : 391-401.
2. 최창환, 정성애, 이보인, 이강문, 김주성, 한동수, 대장장연구학회 IBD연구회. 궤양성 대장염 진단 가이드라인. 대한소화기학회지. 2009 ; 53 : 145-60.
3. 양동훈, 양석균. 한국인에서 궤양성 대장염은 증가하는가?. 대한내과학회지. 2009 ; 76(6) : 637-42.
4. Kurt JI, Eugene B, Jean DW, Joseph BM, Anthony SF, Dennis LK. Harrison's Principles of Internal Medicien 13 edition. Mcgraw-hill, inc. 1994 : 1404.
5. 진윤태, 김주형. 궤양성 대장염의 최신치료. 대한내과학회지. 2009 ; 76(6) : 654-60.
6. Silvio D, Erika A, Alberto M, Renzo C. Biological agents for Ulcerative Colitis : Hypes and Hopes. Medicinal Research Reviews. 2008 ; 28(2) : 201-18.
7. Shin EK, Kwon HS, Kim YH, Shin HK, Kim JK. Vhrysin, a natural flavone, improves murine inflammatory bowel disease. Biochemical and Biophusical Research Communications. 2009 ; 318 : 502-7.
8. Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B et al. Alteration in salivary antioxidantsm nitric oxide, and transformaing growth factor-bate 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. Ann N Y Acd Sci. 2006 ; 1091 : 110-22.
9. 백설, 최재혁, 고성훈, 이용재, 차동석, 박은영, 강양규, 전훈. 감솜향의 in vitro 항산화 및 항염증 효과. 동의생리병리학회지. 2009 ; 23(4) : 853-9.
10. 나선택. Lonicerae folium의 항산화효과 탐색 및 RAW264.7 세포에서 항산화기전을 통한 산화적 스트레스 · 염증반응 억제효과 연구. 동국대학교 대학원. 2009.
11. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 대성문화사. 1991 ; 351-2.
12. Blois MS. Antioxidant determination by the use a stable free radicals. Nature. 1958 ; 26 : 1191-204.
13. 전국한의과대학, 한의학전문대학원 경락

경혈학 교재편찬위원회. 대학경락경혈학 각론(하). 의방출판사. 2009 : 1172.
14. Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease:progress and current concepts of etiopathgenesis. J. Dig. Dis. 2007 ; 8 : 171-8.
15. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2007 ; 133 : 1670-89.
16. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease : controversies, consensus and implications. Gut. 2006 ; 55 : 749-53.
17. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease : Etiology and pathogenesis. Gastroenterology. 1998 ; 115 : 182-205.
18. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease : dogma and heresies. Digest Liver Dis. 2002 ; 34 : 306-11.
19. 許浚. 東醫寶鑑 제 5 권. 여강출판사. 1994 : 2813.
20. 李時珍. 本草綱目. 文光圖書有限公司. 1992 : 1188-90.
21. Sjodin B, Westing HY, Apple FS. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med. 1987 ; 10 : 236-54.
22. Berelt BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem. 1997 ; 272 : 20313-6.
23. Dhar A, Young MR, Colburn NH. The role of AP-1, NF-kappa B and ROS/NOS in skin carcinogenesis : the JB6 model is predictive. Mol Cell Biochem. 2004 ; 234-235 : 185-93.
24. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromise telemere integrity and accelerates the onset of senscense in human endothelial cells. J Cell Sci. 2004 ; 117 : 2417-26.
25. 신성애, 김도순, 김미정, 김성호, 조성기, 변명우, 이성태. 과산화수소수의 산화적 스트레스로 유도된 Apoptosis에 대한 생약복합조성물(HemoHIM)의 방호효과 평가. J korean Soc Food Sci Nutr. 2006 ; 35(9) : 1127-32.
26. Lindermann RA, Economou JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. J Periodontol. 1988 ; 59 : 728-30.
27. Lindermann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes: Activated by peridontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J Dent Res. 1988 ; 67 : 1131-5.
28. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 1990 ; 98 : 694-702.

29. Macpherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rat. Digestion. 1978 ; 17 : 135-50.
30. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hepaten -induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology. 1989 ; 96 : 795-803.
31. Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M. Hyperexpression of inducible co-stimulator on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium colitis. Gastroenterology. 2004 ; 19(2) : 174-81.