

만성 저온 스트레스 동물모델에서의 黃連의 항염증 효능 연구

최진규^{1#}, 허유진^{2,3}, 이원일³, 김윤경⁴, 이태희^{5*}, 오명숙^{3*}

1 : 경희대학교 약학대학 약학과, 2 : 경희대학교 일반대학원 경락의과학과
3 : 경희대학교 일반대학원 나노의약생명과학과, 4 : 원광대학교 약학대학 한약학과
5 : 가천대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-inflammatory effects of *Coptidis Rhizoma* in chronic cold stress-exposed mice

Jin Gyu Choi^{1#}, Eugene Huh^{2,3}, Wonil Lee³, Yun-Kyung Kim⁴, Tae-Hee Lee^{5*}, Myung Sook Oh^{3*}

1 : Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Kyung Hee University
2 : Department of Medical Science of Meridian, Graduate School, Kyung Hee University
3 : Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate school, Kyung Hee University
4 : Department of Herbal Medicine, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University
5 : Department of Formulae Pharmacology, School of Oriental Medicine, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate whether the extract of *Coptidis Rhizoma* inhibits inflammation in chronic cold stress (CCS)-exposed mice or not.

Methods : *Coptidis Rhizoma* extract (CRE) was made by reflux with distilled water. Male ICR mice (7 weeks old) were divided randomly into 5 groups: (1) control, (2) CCS, (3) CCS+CRE 100 mg/kg, (4) CCS+CRE 300 mg/kg, (5) CCS+CRE 1,000 mg/kg groups. Mice were orally administered once a day for 14 days starting from 1 day before CCS. Group (2)-(5) were exposed to CCS conditions that maintained at 4°C for 2 h once a day for 14 days. The levels of serum cortisol and hypothalamic prostaglandin E1 (PGE1) and PGE2 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay kit. The expression levels of several pro-inflammatory factors like heat shock protein 70 (HSP70), c-fos, and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) were measured by western blot analysis in mouse hypothalamus.

Results : Oral administration of CRE 1,000 mg/kg significantly suppressed the increase of serum cortisol levels in mice exposed to CCS. CCS-exposed mice had significantly increased the expression of HSP70, c-fos, and NF-κB in hypothalamus, while CRE treatment significantly attenuated the elevation of these pro-inflammatory factors. The ratio of PGE2/PGE1 was also higher in CCS-exposed mice than control group. CRE treatment significantly reduced the increase of PGE2/PGE1 ratio induced by CCS.

Conclusion : These findings suggest that *Coptidis Rhizoma* may work as a potential agent to modulate inflammatory responses under the condition of cold adaptation formed by CCS.

Key words : *Coptidis Rhizoma*, chronic cold stress, inflammation

*Corresponding author : Tae-Hee Lee, Department of Formulae Pharmacology, School of Oriental Medicine, Gachon University, 1342 Seongnamdae-ro, Sujeong-gu, Seongnam 13120, Republic of Korea.

· Tel : +82-31-750-5418 · E-mail : ophm5418@gachon.ac.kr

Myung Sook Oh, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-9436 · E-mail : msok@khu.ac.kr

#First author : Jin Gyu Choi, Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-961-2252 · E-mail : choijg2002@khu.ac.kr

· Received : 08 August 2018 · Revised : 21 September 2018 · Accepted : 25 November 2018

I. 서론

외부 환경의 변화로 인한 cold stress는 뇌 시상하부(hypothalamus) 부위의 cold sensing 수용체의 활성화를 유도하여 혈관 수축 및 체내 대사활동을 증가시킨다¹⁾. 만성적인 cold stress (chronic cold stress; CCS)는 체온 유지를 위해 열을 발생시키고 대사활동을 촉진시키지만, 이러한 상태가 계속되면 체내 전반적인 염증 및 자율신경계의 문제를 야기하여 각종 질병을 유도하기도 한다^{1,2)}. CCS는 혈액 내 cortisol 및 뇌 시상하부 내 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)와 같은 pro-inflammatory factors의 발현 증가를 유도하여 뇌 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA)을 활성화시킴으로써 결과적으로 체온 감소, 고혈압, 불안 증상을 유발한다고 알려져 있으며³⁻⁶⁾, CCS가 랫드의 혈액 및 뇌 시상하부와 피질 내 pro-inflammatory cytokines의 급속한 증가와 학습 및 인지능력 감퇴를 유도하며, 이는 CCS로 인한 HPA 조절 능력의 이상과 밀접한 상관성이 있음을 밝힌 바 있다⁷⁾. 또한 Kim 및 Makino 등^{1,8)}은 CCS 유도 HPA 매개 염증 및 산화 스트레스에 대한 한약의 억제 효능을 실험적으로 증명하여 한약의 CCS 유도 염증 조절 가능성을 제시하였다.

韓醫學에서 다양한 病因의 분류 중 六淫은 외부 환경적 요인으로서 외부로부터 침입한 邪氣를 분류한 것이다. 이는 風, 寒, 暑, 濕, 燥, 火로 이루어져 있으며, 그 중 寒邪는 陰邪로서 인체에 침범하여 氣의 收斂을 유도한다고 알려져 있다⁹⁾. 寒邪는 다른 邪氣와 비교하여 인체의 外部에서 內部로 병의 진행 방향이 비교적 일정하며 진행 단계에 따라 나타나는 증상이 명확하다. 寒邪 침입 초기 단계에서는 體表에서 병증이 나타난다고 알려져 있다. <靈樞·歲露論>에서는 外寒 등의 寒邪가 인체 내로 침입하면 皮膚가 緊急하게 되고 腠理가 닫힌다고 서술되어 있는데¹⁰⁾, 이는 寒邪가 인체에 침입 시 衛氣의 방어작용을 유도하여 氣를 수렴시켜 발생함을 의미하는 것으로 邪氣가 體表에 머물고 있음을 알 수 있다. 寒邪의 침입과 함께 발생하는 증상으로 痛症과 全身 熱感 등이 수반되는데, <傷寒論·太陽病>에 “太陽病或已發熱, 或未發熱, 必惡寒體痛, 嘔逆, 脈陰陽俱緊者, 名曰傷寒”과 같은 구절에서도 확인할 수 있다¹¹⁾. 이는 인체의 국소적 또는 전신적 염증 반응과 유사한 증상으로 寒邪로부터 염증 반응이 유도될 수 있음을 암시하고 있다.

황련(黃連)은 미나리아재비과에 속하는 다년생 본초인 황련(*Coptis japonica* Makino), 중국황련(*C. chinensis* Franch.), 삼각엽황련(*C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao), 운련(*C. teeta* Wallich)의 뿌리를 제거한 뿌리줄기를 치칭하며 알칼로이드 계열의 berberine, coptisine 등이 주성분으로 함유되어 있다¹²⁾. 본초학적으로 황련은 주로 淸熱燥濕, 瀉火解毒의 효능을 가지며, 다양한 모델에서 황련 추출물과 함유성분의 항염증 효능이 입증된 바 있다. 황련 추출물의 항염증 효능에 대한 약리 연구는 lipopolysaccharide (LPS) 유도 내독소혈증 및 pro-inflammatory gene 발현 억제 효능¹³⁻¹⁵⁾, 피부각질 형성세포에서의 tumor necrosis factor- α 유도 NF- κ B 발현 억제 효능¹⁶⁾에 관한 보고가 있었으며, berberine의 궤양

성 대장염 억제 효능^{17,18)}, ovalbumin 유도 염증에 의한 과민성반응 억제 효능¹⁹⁾, NF- κ B 발현 억제를 통한 LPS 유도 자궁내막염 개선 효능²⁰⁾, 담배연기로 유도된 급성 폐렴 개선 효능²¹⁾, coptisine의 NF- κ B 발현 억제를 통한 동맥경화 개선 효능²²⁾, 연골세포에서의 interleukin-1 β 유도 염증 매개 인자 발현 억제 효능²³⁾ 등이 보고되었다. 이러한 선행연구를 통해 다양한 염증 반응 조절 효능이 입증되었으나, 저온 스트레스에 지속적으로 노출되어 나타나는 염증에 대한 황련의 억제 효능 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 황련이 만성 저온 스트레스 유도 동물모델에서의 염증 관련 인자 조절 효능을 평가하고자 하였다. 따라서, 황련 추출물을 이용하여 CCS에 노출된 마우스의 혈액 내 cortisol 농도 및 뇌 시상하부 내 pro-inflammatory 단백질 발현 변화를 enzyme-linked immunosorbent (ELISA) 또는 western blot 분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 준비

본 실험에 사용된 황련(*C. chinensis* Franch.)은 중국 사천에서 재배된 것을 옴니허브(Omni Herb Inc., South Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 추출분말은 이전에 보고된 연구의 방법을 참고하여 제조하였다²⁴⁾. 건조된 약재 200g을 분쇄기를 이용하여 분말화한 후 10배의 2차 증류수를 가하여 환류 추출기에서 2시간 동안 가열 추출하였고 이를 2회 반복하여 합하였다. 감압 여과 후, 여과액을 동결건조하여 powder 형태의 시료(Coptidis Rhizoma extract; CRE)를 22.84g을 얻었다. 동결건조 후의 수율(yield, %)은 11.42%였으며 시료는 -20 $^{\circ}$ C에서 보관 후 매 실험마다 용매에 녹여 사용하였다.

2) 시약

30% acryl amide, tetramethylethylenediamine, tween-20, ECL reagent, protein assay kit는 Bio-RAD (Hercules, USA)에서 구입하였고 rabbit anti-c-fos 1차 항체, cortisol ELISA kit, prostaglandin E1 (PGE1) 및 prostaglandin E2 (PGE2) ELISA kit는 Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)에서 구입하였다. Goat anti-heat shock protein 70 (HSP70), rabbit anti-NF- κ B, mouse anti- β -actin 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)에서 구입하였다. Protein extraction buffer는 Intron biotechnology (Seongnam, South Korea)에서 구입하였고, phosphate buffered saline (PBS), tris-buffered saline (TBS), diethyl ether는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다. Non-fat skim milk는 BD Biosciences (Bedford, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 사육

실험동물은 ICR mice 수컷(7주령, 30-32g) 25마리를 오리엔트 바이오(Seongnam, South Korea)에서 구입하여 사육하였다. 동물은 5마리/cage (40cm × 25cm × 18cm) 단위로 수용하여 사육하였으며, 사육환경은 온도 22~24℃, 습도 50~70%가 되도록 유지하였고, 12시간 명암주기(07:00 점등, 19:00 소등)로 조절되는 환경에서 사육하였다. 실험기간 동안 사료는 실험동물용 고품사료를 공급하였고, 음수는 증류수를 사용하여 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 동물실험에 관련된 모든 과정은 실험동물 사육 및 사용에 관한 가이드라인(NIH publication 8th edition, revised 2011)과 경희대학교 실험동물 사용 및 관리 가이드라인 원칙에 준하여 수행되었다(동물실험계획서 승인번호: KHP-2014-05-3).

2) 투여 및 chronic cold stress 유도

7일간 적응 후, 실험동물을 각 군당 5마리씩 총 5군으로 나누어 투여하였다. 제1군(control) 및 제2군(chronic cold stress; CCS)은 생리식염수(saline)를 체중 kg당 5 ml로 CCS 유도 1시간 전부터 시작하여 1일 1회 14일간 경구투여하였다. 제3군(CCS+CRE 100 mg/kg), 제4군(CCS+CRE 300 mg/kg), 제5군(CCS+CRE 1,000 mg/kg)은 각각 CRE 100, 300, 1,000 mg/kg 농도로 체중 kg당 5 ml 용량에 해당하는 양을 CCS 유도 1시간 전부터 시작하여 1일 1회 14일간 경구투여하였다. CCS 유도는 이전에 보고된 연구의 방법을 참고하여 제2군~제5군의 실험동물을 대상으로 수행하였다²⁵. 각군의 실험동물이 있는 cage를 4℃, 습도 50~70%로 유지되는 Misco control system chamber (Samsung Co. Ltd., Seoul, South Korea)에서 2시간 동안 1일 1회 넣은 후, 이를 14일간 반복하여 CCS를 유도하였다.

3) 혈청 내 cortisol 농도 측정

Cortisol ELISA assay는 kit manual 및 이전에 보고된 연구의 방법에 따라 수행되었다²⁶. 각 실험동물의 혈액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 serum sample에 diethyl ether를 혼합한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Diethyl ether 혼합물을 nitrogen 건조 후 570nm excitation / 590nm emission 조건으로 설정된 microplate reader (VERSA max, Molecular Device, Sunnyvale, USA)에서 protease 활성을 측정하였다. 측정값은 control군의 값에 대한 %로 환산하여 표시하였다.

4) 뇌 시상하부 조직 분리 및 western blot 분석

뇌 시상하부(hypothalamus)에서의 CCS 유도 HSP70, c-fos, NF-κB 발현에 대한 CRE의 억제 효능을 확인하기 위해, western blotting을 수행하였다. 마지막 CCS 유도 직후 실험동물을 avertin 10 μl/g 용량으로 복강투여하여 마취 후, 복대동맥에서 혈액을 채취하고 경추 탈골하여 희생시켰다. 이후 뇌조직을 적출하여 시상하부 부위를 분리하였다. 이물질

제거를 위해 PBS에 1회 세척 후 사용 전까지 -80℃에 보관하였다. 동결된 뇌 시상하부 조직에 protein assay 용액을 넣은 후 균질화하여 12000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 실험에 이용하였다. 단백질 정량 후 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에 전기영동 후, gel을 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, USA)에 전사하였다. 비특이적 반응의 제거를 위해 membrane을 tween-20을 포함한 TBST에 희석한 5% non-fat skim milk에 1시간 동안 반응 후 HSP70, c-fos, NF-κB (1:1000), β-actin (1:3000) 1차 항체를 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날 membrane에 2차 항체 (HRP-conjugated, 1:2000)를 1시간 동안 반응시켰다. Membrane을 ECL detection kit를 이용하여 반응시킨 후 LAS-4000 mini system (Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 band image를 얻었다. Band intensity는 Image J (Bethesda, USA)를 이용하여 정량하였으며 β-actin의 band intensity에 대비하여 측정하였다. 측정값은 control군의 값에 대한 %로 환산하여 표시하였다. 각 반응 간에 TBST를 이용하여 15분간 3회 세척하였으며, 단백질 정량은 Bradford 방법을 이용하였다²⁷.

5) 뇌 시상하부 내 PGE1, PGE2 농도 측정

PGE1 및 PGE2 ELISA assay는 kit manual 및 이전에 보고된 연구의 방법에 따라 수행되었다²⁶. 각 실험동물의 뇌 시상하부 조직 lysate와 reaction buffer를 혼합하여 상온에서 45분 동안 반응시킨 후, microplate reader (570nm)에서 protease 활성을 측정하였다. PGE1 및 PGE2 농도값을 이용하여 PGE2/1 ratio를 구한 후, control군 값 대비 %로 환산하여 표시하였다.

6) 통계 처리

모든 측정값은 mean ± standard error of the mean (SEM)으로 표시하였다. 통계처리는 Graphpad Prism 5.0 software (San Diego, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의성 평가는 독립 표본 t-검정(unpaired Student's t-test)을 사용하여 p값이 0.05 미만일 때 유의하다고 판단하였다.

III. 결 과

1) CRE의 만성 저온 스트레스에 의한 혈청 내 cortisol 농도 증가 억제 효능

CRE가 CCS에 의한 serum 내 cortisol 농도 증가에 미치는 영향을 확인하기 위하여 cortisol ELISA assay를 수행하였다. CCS에 노출된 생쥐에서의 serum 내 cortisol 농도는 control군에 비해 약 3.5배 정도 증가함으로써 통계적으로 유의하였으나, CRE 1,000 mg/kg 투여에 의해 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

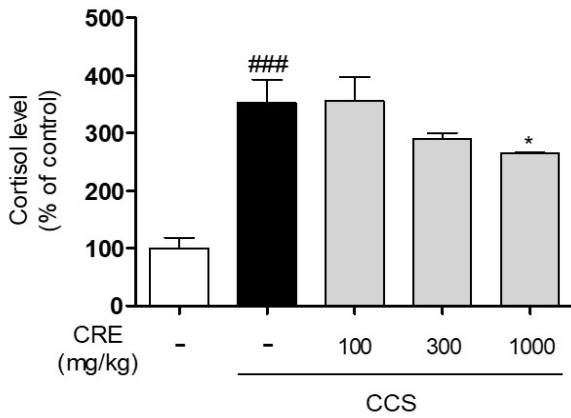


Fig 1. Effects of CRE on cortisol level in mouse serum after CCS.

Mice were exposed to CCS conditions that maintained at 4°C for 2 h once a day for 14 days. The ELISA assay was conducted to measure the level of cortisol in mouse serum. The measured levels were expressed as percent of the control value. Values were expressed as mean ± SEM (n=5 per group). Statistical evaluations were analyzed by Student's t-test. ###*p*<0.001 vs. control group; **p*<0.05 vs. CCS only treated group.

2) CRE의 만성 저온 스트레스에 의한 뇌 시상하부 내 염증 관련 단백질 발현 증가 억제 효능

CCS에 따른 염증 관련 전사 단백질인 HSP70, c-fos, NF-κB의 뇌 시상하부 내 변화에 대한 CRE의 영향을 확인하기 위하여, western blot 분석을 수행하였다. CCS 유도에 따른 mouse hypothalamus 내 HSP70 발현은 control군에 비해 약 1.7배 정도 증가함으로써 통계적으로 유의하였으나, CRE 1,000 mg/kg 투여에 의해 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2A). 또한 CCS 유도 뇌 시상하부 내 c-fos 및 NF-κB 발현은 control군에 비해 각각 약 1.5, 1.3배 정도 증가함으로써 통계적으로 유의하였으며, c-fos 발현은 CRE 1,000 mg/kg, NF-κB 발현은 CRE 300 및 1,000 mg/kg 투여에 의해 각각 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2B, C).

3) CRE의 만성 저온 스트레스에 의한 뇌 시상하부 내 PGE2/1 ratio 증가 억제 효능

Stress에 의해 증가하는 염증 관련 단백질인 PGE1 및 PGE2 농도에 CRE가 미치는 영향을 확인하기 위하여 CCS에

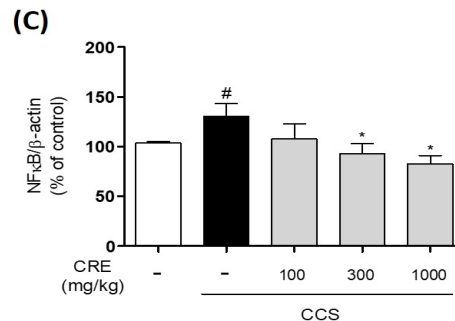
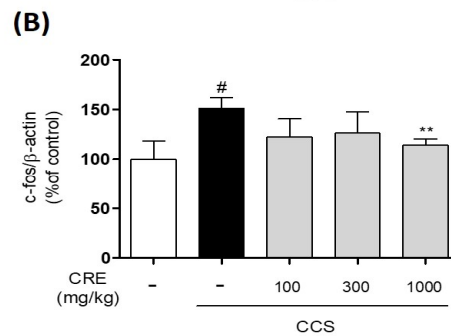
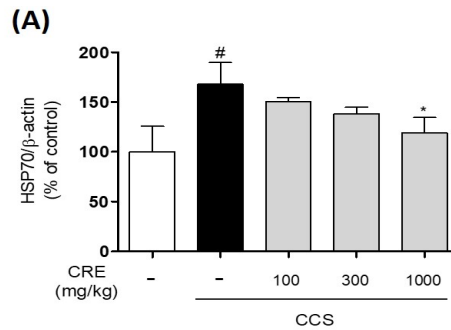
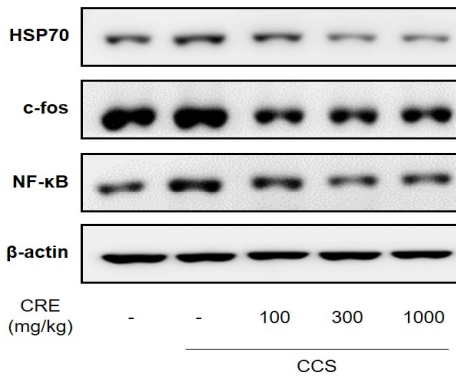


Fig 2. Effects of CRE on the expressions of HSP70, c-fos, and NF-κB in mouse hypothalamus after CCS. Mice were exposed to CCS conditions that maintained at 4°C for 2 h once a day for 14 days. Western blotting analysis was conducted to measure the expression levels of each hypothalamic protein in mice. Quantification of densitometric analyses were performed by measuring the expression ratio of (A) HSP70/β-actin, (B) c-fos/β-actin and (C) NF-κB/β-actin in the lysates of hypothalamus. Values were expressed as mean ± SEM (n=5 per group). Statistical evaluations were analyzed by Student's t-test. #*p*<0.05 vs. control group; **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs. CCS only treated group.

노출된 생쥐의 뇌 시상하부 내 PGE1 및 PGE2 농도 측정을 위한 ELISA assay를 수행하였다. CCS에 의한 뇌 시상하부 내 PGE2/1 비율은 control군에 비해 약 1.4배 정도 증가함으로써 통계적으로 유의하였으나, CRE의 모든 용량 투여군(100, 300, 1,000 mg/kg)에서 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

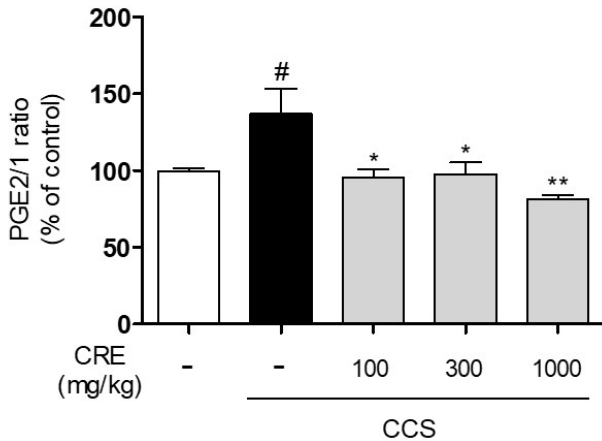


Fig 3. Effects of CRE on the ratio of PGE2/PGE1 levels in mouse hypothalamus after CCS. Mice were exposed to CCS conditions that maintained at 4°C for 2 h once a day for 14 days. The ELISA assay was conducted to measure the ratio of PGE2/PGE1 levels in the mouse hypothalamus. The measured levels were expressed as percent of the control value. Values were expressed as mean ± SEM (n=5 per group). Statistical evaluations were analyzed by Student's t-test. #p < 0.05 vs. control group; *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. CCS only treated group.

IV. 고 찰

본 연구에서는 지속적인 저온 스트레스에 노출되어 나타나는 염증 반응에 대한 황련의 억제 효능을 알아보고자 하였다.

외부 온도변화에 수반되는 cold stress는 glucocorticoid 분비를 유도하여 포도당 분해를 통한 혈당 상승을 통해 체내 항상성을 유지한다²⁸⁾. Cortisol은 부신피질에서 분비되는 주요 glucocorticoid 호르몬으로서 HPA에 의해 조절되며 외부 스트레스에 대한 체내 항상성 조절에 기여하나, 지속적인 스트레스에 노출되면 cortisol이 과다 분비되어 glucocorticoid 수용체 손상에 따른 염증 반응이 나타난다²⁹⁾. 이는 cortisol이 glucocorticoid 수용체/heat shock 단백질 복합체에 결합 후 HSP70, c-fos, NF-κB 등의 pro-inflammatory 전사 인자들의 활성화 및 분비를 유도하는 등 스트레스로 인한 세포 내 신호전달체계에서 중요한 역할을 담당하고 있는 것과 관련성이 높다^{30,31)}. 또한 Zhao 등³²⁾은 1일 1회 20일간 지속적인 cold stress가 주어진 상태에서 HSP70, NF-κB 등의 염증 관련 인자의 발현 증가 및 glutathione 등의 항산화 효소 분비량 감소 등이 나타나 조직 손상을 일으킨다는 것을 보고하였다. 본 연구에서 CCS에 노출된 마우스의 혈청 내 cortisol 농도가 control군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였으며, CRE 1,000 mg/kg 투여 후 감소되는 것을 확인하였다. 또한 CRE 300 또는 1,000 mg/kg 투여가 CCS로 유도된 HSP70,

c-fos, NF-κB 단백질의 뇌 시상하부 내 과발현을 통계적으로 유의하게 억제하여 항염증 효능을 나타내는 것을 확인하였다.

PGE1은 갈색 지방 매개 열 생산 및 혈관 수축의 촉진 등을 유도하여 체내 열 손실 방지와 열 생산 증가에 관여한다^{33),34)}. 세포막 인지질의 arachidonic acid로부터 합성되는 PGE2는 cortisol에 의해 조절되며 다양한 염증 및 면역반응의 매개체로서, 특히 c-fos 활성화를 유도한다³⁵⁻³⁸⁾. 본 연구에서 지속적인 CCS 노출에 따라 뇌 시상하부 내 PGE2/PGE1의 농도 비가 정상군에 비해 급격히 증가하였으며, 이러한 상태는 CRE 1,000 mg/kg 투여 후 통계적으로 유의하게 개선되는 것을 확인하였다.

본 연구에서 확인한 CCS에 대한 CRE의 효능은 berberine을 포함한 함유 알칼로이드 계열 성분들의 항염증 효능에 기인하는 것으로 예상된다¹³⁾. 대표적으로 berberine은 갈색 지방 매개 열 생산과 체내 대사를 촉진시켜 cold stress 노출 후 나타나는 체온 조절 이상과 염증 반응을 개선하고³⁹⁾, 동맥류에서의 대식세포 침윤에 따른 pro-inflammatory 사이토카인의 분비를 억제하며⁴⁰⁾, coptisine의 경우 NF-κB/mitogen-activated protein kinase 신호전달체계 억제^{41),42)}, LPS/toll-like 수용체-4 매개 pro-inflammatory 전사 인자 과발현 억제 효능⁴³⁾ 등이 보고되었다. 또한 黃連解毒湯⁴⁴⁾, 三黃瀉心湯⁴⁵⁾ 등 황련 함유 처방들의 항염증 효능에 관한 선행 연구결과에서도 황련의 우수한 항염증 효능을 예상할 수 있다. 또한 Jiang 등⁴⁶⁾에 따르면 acute cold stress(6시간동안 4°C 조건에서 1회 노출)에 의한 rectal temperature 온도 저하 억제, TRPM8(말초신경 내 cold signal sensor 단백질)의 발현 증가 유도를 통한 berberine의 체내 온도 조절 효능을 보고한 바 있으며, 이를 바탕으로 저온 스트레스 동물모델에서의 황련의 효능을 예상할 수 있다.

한의학적 관점에서 外寒은 六氣 중 하나에 해당하며 外부의 寒邪에 의해 야기된 것을 말한다. 寒邪는 陰邪에 해당하므로 인체의 陽氣를 손상시켜 陰陽의 균형을 무너뜨리고 이는 체내 항상성에 영향을 미친다. 이와 관련한 연구에서 cold stress에 노출된 생쥐의 혈중 호르몬을 측정된 결과, corticosterone 및 epinephrine의 증가를 확인하였다⁴⁷⁾. 또한 cold stress로 인한 뇌 내 염증 사이토카인 변화를 확인한 연구에서는 NF-κB 신호전달체계 인자의 활성화를 확인하였다²⁵⁾. 따라서 cold stress 노출 시 염증 사이토카인 및 glucocorticoid 호르몬 등의 과다분비로 인해 체내 항상성의 불균형 상태가 발생하게 되며 본 연구 모델에서의 양상과 일치함을 확인할 수 있다. 이러한 관점에서 황련의 우수한 清熱작용과 항염증 효능은 만성 저온 스트레스로 유도된 HPA 매개 cortisol 증가와 이로 인한 염증 전사 인자들의 과발현을 억제하는 데 주요한 역할을 하였음을 알 수 있다.

이상의 연구에서 황련은 cold stress 유도 동물모델에서 혈중 cortisol 농도 증가 및 뇌 시상하부에서의 HSP70, c-fos, NF-κB, PGE 등의 염증 관련 단백질의 과발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하여 지속적인 外寒(만성 저온 스트레스) 유도 체내 염증에 대한 황련의 조절 효능을 과학적으로 규명하였음을 밝히는 바이다.

V. 결 론

본 연구에서는 황련 추출물(CRE)의 만성 저온 스트레스 유도 염증 억제 효능 연구를 수행하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CRE는 chronic cold stress로 유도한 생쥐 혈청에서 cortisol 농도의 증가를 억제하는 효능을 나타내었다.
2. CRE는 chronic cold stress로 유도한 생쥐 뇌 시상하부에서 염증 전사 단백질인 HSP70, c-fos, NF- κ B의 발현 증가를 억제하는 효능을 나타내었다.
3. CRE는 chronic cold stress로 인해 증가한 생쥐 뇌 시상하부에서 PGE2/PGE1 ratio를 유의하게 억제하는 효능을 나타내었다.

황련이 chronic cold stress에 의한 cortisol 및 pro-inflammatory 인자들의 혈액 또는 뇌 시상하부 내 급격한 증가를 억제할 수 있음을 확인하였다. 이상의 결과는 만성 저온 스트레스 노출 후 寒邪가 체내 침입하여 나타나는 inflammatory condition에 대한 황련의 조절 효능을 과학적으로 규명하였으며, 저온 스트레스의 지속적인 노출에 따른 인체 내 염증에 대한 황련의 임상 효능을 기대할 수 있다는 점에서 시사하는 바가 크다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 한의이론과학화사업(K14301)과 미래창조과학부 및 한국연구재단의 기초과학연구센터(NRF-2017R1A5A2014768) 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Makino T, Kato K, Mizukami H. Processed aconite root prevents cold-stress-induced hypothermia and immuno-suppression in mice. *Biol Pharm Bull.* 2009 ; 32 : 1741-8.
2. Wang X, Che H, Zhang W, Wang J, Ke T, Cao R, Meng S, Li D, Weiming O, Chen J, Luo W. Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs. *Int J Biol Sci.* 2015 ; 11 : 1171-80.
3. Ukropec J, Anunciado RP, Ravussin Y, Hulver MW, Kozak LP. UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold-acclimated Ucp1-/- mice. *J Biol Chem.* 2006 ; 281 : 31894-908.
4. Westfall TC, Yang CL, Chen X, Naes L, Vickery L, Macarthur H, Han S. A novel mechanism prevents the development of hypertension during chronic cold stress. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2005 ; 25 : 171-7.
5. Nishikawa H, Hata T, Itoh E, Funakami Y. A role for corticotropin-releasing factor in repeated cold stress-induced anxiety-like behavior during forced swimming and elevated plus-maze tests in mice. *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27 : 352-6.
6. Ma S, Morilak DA. Chronic intermittent cold stress sensitises the hypothalamic-pituitary-adrenal response to a novel acute stress by enhancing noradrenergic influence in the rat paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol.* 2005 ; 17 : 761-9.
7. Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology.* 2011 ; 36 : 1164-74.
8. Kim HG, Lee JS, Han JM, Lee JS, Choi MK, Son SW, Kim YK, Son CG. Myelophil attenuates brain oxidative damage by modulating the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in a chronic cold-stress mouse model. *J Ethnopharmacol.* 2013 ; 148 : 505-14.
9. Jeon BH. A Bibliographic Study on the Pathological Concept of Han(Cold : 寒) - Concentration Upon the Nai Kyung -. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 1988 ; 3 : 107-22.
10. Zhang J, Lei Jing. Ren Min Wei Sheng Chu Ban She. 1965.
11. Zhang Z. Shang-Han Lun. Hanmi medical publishing co. 2011.
12. Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. Medicinal Herbology. 8th rev. ed. Seoul : YounglimSa, 2012 : 220-4.
13. Choi YY, Kim MH, Cho IH, Kim JH, Hong J, Lee TH, Yang WM. Inhibitory effect of Coptis chinensis on inflammation in LPS-induced endotoxemia. *J Ethnopharmacol.* 2013 ; 149 : 506-12.
14. Bose S, Jeon S, Eom T, Song MY, Kim H. Evaluation of the in vitro and in vivo protective effects of unfermented and fermented Rhizoma coptidis formulations against lipopolysaccharide insult. *Food Chem.* 2012 ; 135 : 452-9.
15. Kim JM, Jung HA, Choi JS, Lee NG. Identification of anti-inflammatory target genes of Rhizoma coptidis extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophage-like cells. *J Ethnopharmacol.* 2010 ; 130 : 354-62.
16. Enk R, Ehehalt R, Graham JE, Bierhaus A, Remppis A, Greten HJ. Differential effect of Rhizoma coptidis and its main alkaloid compound berberine on TNF-alpha induced NFkappaB translocation in human keratinocytes. *J Ethnopharmacol.* 2007 ;

- 109 : 170-5.
17. Cui H, Cai Y, Wang L, Jia B, Li J, Zhao S, Chu X, Lin J, Zhang X, Bian Y, Zhuang P. Berberine Regulates Treg/Th17 Balance to Treat Ulcerative Colitis Through Modulating the Gut Microbiota in the Colon. *Front Pharmacol*. 2018 ; 9 : 571.
 18. Lee IA, Hyun YJ, Kim DH. Berberine ameliorates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation, enterobacterial growth and NF- κ B activation. *Eur J Pharmacol*. 2010 ; 648 : 162-70.
 19. Wang Z, Chen Z, Chen T, Yi T, Zheng Z, Fan H, Chen Z. Berberine Attenuates Inflammation Associated with Delayed-Type Hypersensitivity via Suppressing Th1 Response and Inhibiting Apoptosis. *Inflammation*. 2017 ; 40 : 221-31.
 20. Fu K, Lv X, Li W, Wang Y, Li H, Tian W, Cao R. Berberine hydrochloride attenuates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by suppressing activation of NF- κ B signal pathway. *Int Immunopharmacol*. 2015 ; 24 : 128-32.
 21. Lin K, Liu S, Shen Y, Li Q. Berberine attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation. *Inflammation*. 2013 ; 36 : 1079-86.
 22. Feng M, Kong SZ, Wang ZX, He K, Zou ZY, Hu YR, Ma H, Li XG, Ye XL. The protective effect of coptisine on experimental atherosclerosis ApoE^{-/-} mice is mediated by MAPK/NF- κ B-dependent pathway. *Biomed Pharmacother*. 2017 ; 93 : 721-9.
 23. Zhou K, Hu L, Liao W, Yin D, Rui F. Coptisine Prevented IL- β -Induced Expression of Inflammatory Mediators in Chondrocytes. *Inflammation*. 2016 ; 39 : 1558-65.
 24. Moon M, Huh E, Lee W, Song EJ, Hwang DS, Lee TH, Oh MS. Coptidis Rhizoma Prevents Heat Stress-Induced Brain Damage and Cognitive Impairment in Mice. *Nutrients*. 2017 ; 9(10) : pii: E1057.
 25. Kim W, Lee W, Choi JG, Ju IG, Kim YK, Lee TH, Oh MS. Inhibitory effects of Aconiti Lateralis Radix Preparata on chronic intermittent cold-induced inflammation in the mouse hypothalamus. *J Ethnopharmacol*. 2018 ; 215 : 27-33.
 26. Lee W, Moon M, Kim HG, Lee TH, Oh MS. Heat stress-induced memory impairment is associated with neuroinflammation in mice. *J Neuroinflammation*. 2015 ; 12 : 102.
 27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 ; 72 : 248-54.
 28. Pääkkönen T, Leppäluoto J. Cold exposure and hormonal secretion: a review. *Int J Circumpolar Health*. 2002 ; 61 : 265-76.
 29. Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 ; 1261 : 55-63.
 30. O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM-INT J MED*. 2000 ; 93 : 323-33.
 31. Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab*. 2013 ; 24 : 109-19.
 32. Zhao FQ, Zhang ZW, Wang C, Zhang B, Yao HD, Li S, Xu SW. The role of heat shock proteins in inflammatory injury induced by cold stress in chicken hearts. *Cell Stress Chaperones*. 2013 ; 18 : 773-83.
 33. Simpson CW, Ruwe WD, Myers RD. Prostaglandins and hypothalamic neurotransmitter receptors involved in hyperthermia: a critical evaluation. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994 ; 18 : 1-20.
 34. Fyda DM, Cooper KE, Veale WL. Contribution of brown adipose tissue to central PGE1-evoked hyperthermia in rats. *Am J Physiol*. 1991 ; 260 : 59-66.
 35. Neulen J, Zahradnik HP, Flecken U, Breckwoldt M. The effect of cortisol on the synthesis of prostaglandins (PGF2 alpha, PGE2) by human endometrial fibroblasts in vitro with and without addition of estradiol-17 beta or progesterone. *Prostaglandins*. 1989 ; 37 : 587-95.
 36. Narumiya S. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2007 ; 83 : 296-319.
 37. Chen Y, Hughes-Fulford M. Prostaglandin E2 and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of c-fos in human prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2000 ; 82 : 2000-6.
 38. Yen JH, Kocieda VP, Jing H, Ganea D. Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation. *J Biol Chem*. 2011 ; 286 : 38913-23.
 39. Zhang Z, Zhang H, Li B, Meng X, Wang J, Zhang Y, Yao S, Ma Q, Jin L, Yang J, Wang W, Ning G. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. *Nat Commun*. 2014 ; 5 : 5493.
 40. Quan K, Li S, Wang D, Shi Y, Yang Z, Song J, Tian Y, Liu Y, Fan Z, Zhu W. Berberine Attenuates

- Macrophages Infiltration in Intracranial Aneurysms Potentially Through FAK/Grp78/UPR Axis. *Front Pharmacol.* 2018 ; 9 :565.
41. Chen HB, Luo CD, Liang JL, Zhang ZB, Lin GS, Wu JZ, Li CL, Tan LH, Yang XB, Su ZR, Xie JH, Zeng HF. Anti-inflammatory activity of coptisine free base in mice through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Eur J Pharmacol.* 2017 ; 811 : 222-31.
 42. Wu J, Zhang H, Hu B, Yang L, Wang P, Wang F, Meng X. Coptisine from *Coptis chinensis* inhibits production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264,7 murine macrophage cells. *Eur J Pharmacol.* 2016 ; 780 : 106-14.
 43. Zou ZY, Hu YR, Ma H, Wang YZ, He K, Xia S, Wu H, Xue DF, Li XG, Ye XL. Coptisine attenuates obesity-related inflammation through LPS/TLR-4-mediated signaling pathway in Syrian golden hamsters. *Fitoterapia.* 2015 ; 105 : 139-46.
 44. Shin NR, Ko JW, Park SH, Cho YK, Oh SR, Ahn KS, Ryu JM, Kim JC, Seo CS, Shin IS. Protective effect of HwangRyunHaeDok-Tang water extract against chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide in a mouse model. *J Ethnopharmacol.* 2017 ; 200 : 60-5.
 45. Zhang Q, Ma YM, Wang ZT, Wang CH. Differences in pharmacokinetics and anti-inflammatory effects between decoction and maceration of Sanhuang Xiexin Tang in rats and mice. *Planta Med.* 2013 ; 79 : 1666-73.
 46. Jiang JF, Wang YG, Hu J, Lei F, Kheir MM, Wang XP, Chai YS, Yuan ZY, Lu X, Xing DM, Du F, Du LJ. Novel effect of berberine on thermoregulation in mice model induced by hot and cold environmental stimulation. *PLoS One.* 2013 ; 8 : e54234.
 47. Han SY, Kang HJ, Choi ES, Lee KN, Lee TH, Kime YK. Comparative study of hwangnyeonhaedok-tang and geongangbuja-tang on the plasma hormones level in mice exposed to cold stress. *Herb Formula Sci.* 2013 ; 21(2) : 144-57.