

오리나무 수피 엑스의 소염 및 진통 활성

정 춘 식*

덕성여자대학교 약학대학

Anti-inflammatory and Analgesic Activity of *Alnus japonica* Cortex Ethanol Extract

Choon Sik Jeong*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract – An extract of *Alnus japonica* (Betulaceae) cortex has been traditionally used for purifying blood, and curing feces containing blood, enteritis, diarrhea, alcoholism and cut wounds. *Alnus japonica* cortex extract significantly inhibited carrageenan-induced paw edema at 1, 2 and 3 hrs after oral administration by 32.8, 24.4, and 46.9%. It also inhibited acetic acid-induced vascular permeability in mice by 15.3 and 28.0% at oral doses of 500 and 1,000 mg/kg, and it significantly reduced the volume of hindpaw of adjuvant-induced arthritis rats at the day 6 and 10 by 22.5 and 18.7% after the sample administration. *Alnus japonica* cortex extract increased threshold on inflamed paw (Randall-Selitto assay) at 3 hr by 137.5% compared to the control group. It also reduced the number of writhing syndrome dose-dependently.

Key words – *Alnus japonica*, anti-inflammation

오리나무(*Alnus japonica*, 赤楊)는 자작나무과(Betulaceae)에 속하며 낙엽교목이다,^{1,2)} 수피는 담자갈색이며, 지엽 및 수피를 赤楊(적양)이라 하여 봄가을에 채취하여 말린 것을 약용으로 쓰는데, 현재 육혈, 혈변, 장염, 설사 및 외상출혈을 치료하며, 외용으로도 사용된다. 주요성분으로는 lupenone, β -amylin, glutenol, taraxerol, betulinic acid 등 다종의 triterpenoid 및 β -sitosterol, heptacosane, 지방족 alcohol, pyrocatechol계 tannin이 함유되어 있다.³⁾

오리나무에 대하여 현재까지 보고된 연구결과는 이동⁴⁾이 천연물로부터 항암물질의 분리를 위해 수행한 MTT assay에서 오리나무 엑스가 P388 및 MKN45 cell에 대하여 작용이 있음을 보고하였다. 조등⁵⁾은 산오리나무(*Alnus hirsuta*)의 세포독성 성분연구를 통하여, ethylacetate 분획에서 1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-5-(beta-D-glucopyranosyloxy)-3-heptanone을 분리 동정하였으며, 유등⁶⁾은 두메오리나무 잎에서 플라보노이드를 분리 동정하였다. 약리활성에 대해서는 정등⁷⁾이 오리나무 수피 분획물의 위염 및 위궤양에 대한 효과를 보고하였다.

이처럼 오리나무에 대하여 연구가 진행, 보고된 부분들은 항암작용 및 그 성분의 분리, 동정에 국한되어 있다. 오리나무 수피에서 새로운 활성의 검색 및 활성성분 분리의 일환으로 오리나무 수피 에탄올 엑스의 관절염에서 급·만성 항염작용, 항위염 및 위궤양 활성화와 간손상에 대한 작용을 시험한 결과, 소염작용이 탁월한 것을 확인한 바 있다.⁸⁾ 본보에서는 오리나무 수피 엑스에서 소염 활성물질 분리를 하기 위한 전 단계로써 엑스가 어떠한 소염 및 진통작용을 갖는지 확인하고자 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

오리나무 수피 에탄올 엑스의 제조 – 시험에 사용한 오리나무 수피는 서울시 소재 경동시장에서 국내산을 구입하였다. 잘 씻어 건조한 오리나무 수피 830 g에 70% 에탄올을 가하여 수욕상에서 5시간, 4회 추출한 후 여과하여 여액을 농축, 건조하여 제조하였으며 수율은 13.9%였다.

시약 및 기기 – 시약은 ethanol, acetic acid (Duksan Chemical Co.), Brewer's yeast, carrageenan (λ -type), Evans blue, ibuprofen (Sigma Chem. Co., USA), Complete Freund's adjuvant (Difco Lab.)을 사용하였으며, 검체는 식

*교신저자(E-mail) : choonsik@center.duksung.ac.kr
(TEL) : 82-2-901-8504, (FAX) : 82-2-901-8386

염수에 용해하여 경구로 투여하였다. 기타시약은 일급시약을 사용하였다. 원심분리기는 Hanil Co.의 UNION 32R을 spectrophotometer는 Bio-Rad의 ELISA reader를 사용하였으며, 부종측정에 사용한 plethysmometer와 Raddall-Selitto assay에 사용한 analgesymeter는 Ugo Basil (Italy)의 제품을 사용하였다.

실험동물 - 삼양동물(주)에서 분양받은 체중 160~220 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 및 20~25 g의 ICR계 생쥐를 22±2°C에서 2주간 이상 사육하여 적응시킨 뒤 실험에 사용하였으며, 동물실 내의 명암은 12시간씩으로 자동조절시켰고, 고형사료(삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

소염작용

Carrageenan유발 흰쥐 족부종 시험 - Winter등의 방법⁹⁾에 따라서 오리나무 수피 에탄올 엑스의 흰쥐의 carrageenan-induced paw edema에 대한 억제작용을 실시하였다. 120~160 g 웅성 흰쥐의 뒷 발바닥에 1% carrageenan 0.1 ml를 피하주사하여 부종을 유발시키고, 검체는 carrageenan 주사 30분 전에 경구투여하였다. Carrageenan 주사 30분, 1시간, 2시간, 3시간에 4회에 걸쳐 부종의 용적을 plethysmometer로 측정한 다음, 주사전의 용적을 기준으로 하여 그 증가율을 다음 식으로 계산하여 부종 억제 정도를 검정하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 경구투여하여 비교하였다.

$$\text{부종증가율(\%)} = \frac{\text{유발 후 뒷발 용적} - \text{유발전의 뒷발 용적}}{\text{유발 전의 뒷발 용적}} \times 100$$

모세혈관 투과성 억제작용 - Whittle등의 방법¹⁰⁾에 준하여, 검체가 단백질 친화성 색소의 모세혈관 투과성에 미치는 영향을 검토했다. 즉, Evans blue 1% 용액 0.1 ml/10 g 씩을 정맥으로 투여하고, 1시간 후 0.7% 초산-생리식염액을 0.1 ml/10 g 씩 생쥐의 복강내에 주사하여 혈관투과성을 증대시켰다. 20분 후 복강액을 채취하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 이물질질을 제거하고 자외부 흡수 스펙트럼(585 nm)에서 혈관투과성의 정도를 검정하였다. 검체는 Evans blue 주사 30분 전에 경구투여하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 경구투여하여 비교하였다.

Adjuvant 유발 관절염 - 흰쥐의 Adjuvant 유발 관절염에 대한 억제효과를 확인하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 즉, 체중 130~160 g 웅성 흰쥐의 10마리를 1군으로 하여 Claude등의 방법¹¹⁾에 따라 실시하였다. 즉, Freund's complete adjuvant (*Mycobacterium tuberculosis*) 0.1 ml/rat를 흰쥐의 오른쪽 뒷 발바닥에 피하주사하고, 18일 이후부터 28일 되는 날까지 검체를 투여하였으며, 약물투여 시작일부터

3일 간격으로 10일간 plethysmometer로 족부종을 측정하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 사용하였다.

진통시험

Randall-Selitto assay - 진통실험은 체중 160~170 g의 웅성 흰쥐 8마리를 한 군으로 하여 Randall 및 Salitto¹²⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 이 방법은 염증부위의 동통에 대한 감수성을 증대시켜 그 증대된 감수성이 진통제에 의해 억제되는 것에 기초한 것이다. 즉, 흰쥐를 하룻밤 절식시킨 뒤, analgesymeter를 이용하여 300 g의 압력에도 반응하지 않는 흰쥐를 먼저 제외시킨 다음, 20% brewer's yeast-생리식염수 현탁액 0.1 ml씩을 흰쥐의 발바닥에 피하주사하여 염증을 유발시키고, 2시간 후에 검체를 투여한 다음, 일정시간 후에 analgesymeter로 동통역치(g)를 측정하였다. 동통역치는 흰쥐의 발바닥에 16 g/sec의 속도로 서서히 압력을 가하여, 흰쥐가 발을 빼려고 하거나 아파서 몸을 뒤틀 때를 동통반응으로 하였다. 진통작용은 대조군 동통역치에 대한 %를 구함으로써 나타내었다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 사용하였다.

초산 유발 writhing syndrome 시험 - 초산유발 writhing syndrome 시험은 Koster 등의 방법¹³⁾에 준하여 실시하였다. 즉, 생쥐에 0.7%의 acetic acid 0.1 ml/10 g을 복강으로 투여한 10분 후부터 10분간 writhing 증상의 발생수를 계수하였다. 검체는 초산 투여 30분 전에 경구로 투여하였다. 대조약물로는 ibuprofen 200 mg/kg을 사용하였다.

결과 및 고찰

잘 씻어 말린 오리나무 수피 830 g을 에탄올로 추출하여 115 g(13.9%)의 엑스를 얻었으며, 이 엑스의 소염 및 진통작용 시험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

급성염증의 I-II 단계 실험모델인 carrageenan 유발 족부종시험은 λ-carrageenan의 대식세포에 대한 선택적 독성작용에 의해 급만성 염증을 일으키는 특성을 이용한 염증 시험이다.¹⁴⁾ 흰쥐에서 carrageenan유발 부종실험을 실시한 결과, 오리나무 수피 엑스 500 및 1,000 mg/kg을 투여한 결과, 1,000 mg/kg을 투여한 군에서 검체 투여 1, 2, 3시간째에 각각 32.8, 24.4 및 46.9%의 유의성 있는 부종억제효과를 나타내었으며, 특히 1시간 및 3시간째에는 대조약물인 ibuprofen 보다 더 높은 부종 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

염증부종에 있어서 모세혈관투과성이 항진되는 것은 혈장성분이 혈관외로 누출하는 것에 의해 일어나는 증상으로 염증의 초기단계인 모세혈관 투과성에 미치는 작용에 의하여 항염증 효과를 검정한다. 따라서 혈관투과성 항진의 염

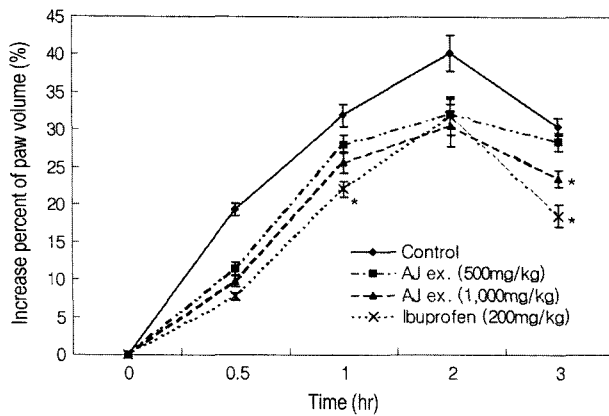


Fig. 1. Effect of *Alnus japonica* Cortex extract on carrageenan-induced paw edema in rats. AJ ex.; *Alnus japonica* Cortex extract, * $P < 0.05$, Significantly different from control group.

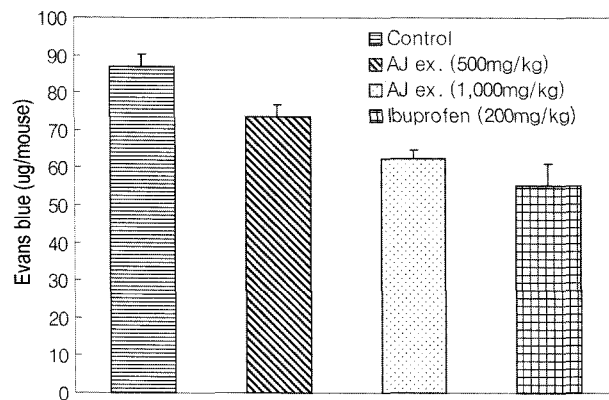


Fig. 2. Effect of *Alnus japonica* cortex extract on vascular permeability in mice. AJ ex.; *Alnus japonica* Cortex extract.

중병태모델의 작성을 위하여 기염제로써 acetic acid를 투여하고, 투과성 항진의 지표로 복강내로 유출하는 Evans blue의 색소량을 지표로 하였다. 대조군의 복강내 Evans blue 양은 86.8 µg/mouse였으나, 오리나무 수피 엑스를 투여한 경우 500 mg/kg 및 1,000 mg/kg 투여 시 15.3 및 28.0%의 용량의존적인 억제작용을 나타내어 소염작용 중 혈관 투과성 억제작용의 영향이 있음을 확인하였다(Fig. 2).

만성염증 유발모델로써 사용한 Freund's complete adjuvant

는 *Mycobacterium tuberculosis* 사균과 paraffin등의 혼합물로 생체내에서 항원·항체반응에 의한 지연형 allergy를 유발함으로써 만성 관절류머티즘 또는 베체드병과 같은 만성 관절염증을 유발시킨다.¹⁵⁾ 또한 실험적 염증 중에서 비교적 만성적 경과를 취하고 그 발현기전에 면역계가 관여하는 것이 인정되고 있는 것이 흰쥐 adjuvant 관절염이다. 관절염을 유발한 흰쥐에 검체 500 및 1,000 mg/kg을 투여한 결과, 1,000 mg/kg 투여시 검체투여 6일과 10일째 되는 날에 22.5 및 18.7%의 억제효과를 보였으며, 대조약물인 ibuprofen 200 mg/kg 보다 강한 작용을 나타내었다(Table I).

진통실험의 대표적인 예라고 할 수 있는 Randall-Selitto 법은 yeast로 일으킨 염증으로 인하여 발생하는 통증에 대한 역치를 측정하는 방법이다. 이 방법은 소염성 진통약에서 마약성 진통약까지 넓게 적용시킬 수 있는데, 마약성 진통약에서는 정상발과 염증발, 양쪽의 역치를 모두 상승시키지만, 말초에 작용점을 가지는 소염성 진통약은 염증발의 동통역치만을 상승시킨다. 본 실험에서의 진통효과는 염증을 일으킨 발에서만 측정하였는데, 그 결과로 검체 대신 식염수만을 투여한 대조군의 경우, 역치는 염증을 일으키기 전 17.6 g에서 30분, 1시간, 2시간 및 3시간 쯤에 각각 6.3, 6.3, 7.1 및 5.5로 나타났다. 오리나무 수피 엑스 투여군의 경우, 500 mg/kg 투여시에는 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으나, 1,000 mg/kg을 투여하였을 때 30분, 1시간 및 2시간째에 대조군에 비교하여 각각 48.9, 22.9 및 50.9%의 역치 증가율을 나타내었으며, 3시간 쯤에는 대조군에 비교하여 137.5%의 역치 증가율을 나타내어 대조약물인 ibuprofen의 효과와 동일한 유의성 있는 효과를 나타내었다(Fig. 3).

검체의 진통효과를 평가하기 위하여 초산처치로 유도되는 복부의 수축반응을 지표로 하는 초산법을 이용하였다. 초산법은 Koster등이 초산을 이용한 writhing syndrome 반응을 abdominal contraction response라 하여 진통약물 검정에 유용한 방법의 하나로, 이 반응의 억제여부를 확인하여 진통효과를 평가하였다. 초산으로 복강 염증 유발 10분 후 10분간 writhing syndrome의 횡수를 측정된 결과, 대조군은 21.9회의 증상을 나타내었으며, 오리나무 수피 엑스의 경우

Table I. Effect of *Alnus japonica* cortex extract on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	n	Increase percent of paw volume (M±S.E.)			
			Day0 ^{a)}	Day+3	Day+6	Day+10
Control	-	13	102.1±6.42	100.3±6.16	120.6±5.37	119.2±5.99
<i>Alnus japonica</i> ex.	500	8	102.0±5.11	94.1±5.08	108.8±5.41	109.6±5.75
	1,000	8	101.7±6.01	84.0±4.92	93.5±6.33*	96.9±6.01*
Ibuprofen	200	8	94.7±5.00	88.0±8.63	106.3±8.73	116.7±9.28

* $P < 0.05$, Significantly different form control group.

^{a)}Samples were administered 18 days after adjuvant injection.

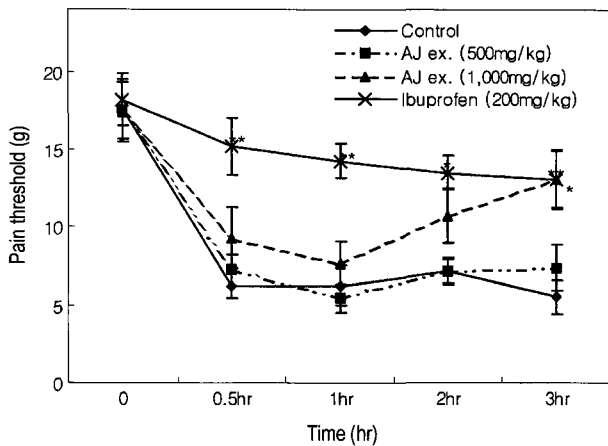


Fig. 3. Effect of *Alnus japonica* cortex extract on Randall-Selitto assay in rats. AJ ex.; *Alnus japonica* Cortex extract, *P<0.01, *P<0.005, Significantly different from control group.

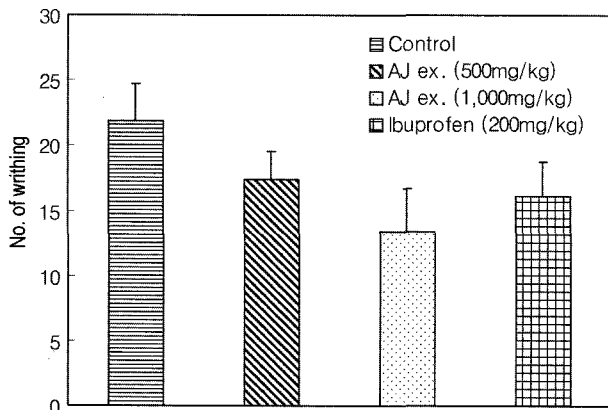


Fig. 4. Effect of *Alnus japonica* EtOH ex. on writhing test in mice. AJ ex.; *Alnus japonica* Cortex extract

500 mg/kg 및 1,000 mg/kg 투여 시에 각각 20.5 및 38.7%의 용량 의존적인 증상억제 효과를 나타내었다.

오리나무 수피 에탄올 엑스의 약리활성 검색 실험에서 오리나무 수피 엑스가 급성 염증인 carrageenan 유발 족부종을 억제하고, 모세혈관 투과성을 감소시킴으로써 급성 염증에 대한 소염작용이 있음을 확인할 수 있었고, 만성 관절염 모델인 adjuvant 유발 관절염에서 부종을 억제함으로써 오리나무 수피 엑스가 급성 및 만성 염증 모델에 대하여 우수한 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 염증으로 인한 통증에 대한 진통효과실험인 Randall-Selitto 시험법과 초산유발 writhing syndrome 실험을 통하여 진통효과도 확인되었다. 이와 같은 효능을 구체적으로 활용하고자, 본 연구 결과는 앞으로 소염 및 진통 작용과 관련된 활성물질 분리, 동정 및 약리활성 기전연구를 실시하기 위하여 기초 연구 자료로 이용할 것이다.

인용문헌

1. 정보섭등(1990) 도해향약(생약)대사전(식물편), 영림사 p. 802.
2. 채영복등(1988) 한국유용식물자원연구총감, 한국화학연구소 p. 125.
3. 강소신의학원편(1978) 중약대사전, 상해과학기술출판사 p. 1088.
4. Lee, Y. S., Lee, I. R., and Song, J. Y. (1992) Cytotoxicity of folkloric medicine in murine and human cancer cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**: 132-136.
5. Cho, E. H., Park, S. K., Oh, G. J., Kim, H. J., Chung, S. G., Gong, J. M., Bae, C. I., and Oh, J. W. (1997) Studies on the cytotoxic constituent of *Alnus hirsuta*. *Yakhak Hoeji* **41**: 559-564.
6. Toh, S. H., Cho, S. M., Jeong, D. W., Ahn, K. W., Lee, M. W., and Kim, J. S. (2000) Flavonoids from the leaves of *Alnus maximowiczii* Call. *Yakhak Hoeji* **44**: 41-46.
7. Chung, C. S., Woo, B. H., Lee, E. B., and Jung, K. H., The effect of *Alnus japonica* cortex extract on gastric lesion and ulcer of rats. *J. Appl. Pharmacol.* **1**: 84-88 (1996).
8. 정춘식(2002) 오리나무 수피 에탄올 엑스의 약리활성 스크리닝. *Duksung Bull. Pharm. Sci.* **13**: 57-61.
9. Winter, C. A., Risley, E. A., and Nuss, G. W. (1962) Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 544-547.
10. Whittle, B. A. (1964) The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**: 246-253.
11. Claude, V. W., Lois, A. L., and Marvin, D. S. (1969) Comparative bioassay of drugs in adjuvant-induced arthritis in rats flufenamic acid, mefenamic acid, and phenylbutazone. *Arthritis and Rheumatism* **12**: 472-482.
12. Randall, L. O. and Salitto, J. J. (1971) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **111**: 4.9-19.
13. Koster, R. Anderson, M., and Debeer, E. J. (1959) Acetic acid for analgesic screening, *Federa. Proc. Pharmacol.* **18**: 412-412.
14. Booney, R. J., Grey, I., Lin, T., Meyenhofer, M. F., Acevedo, W., and Davies, P. (1977) Mononuclear Phagocytes from carrageenan granulomas. *J. Exp. Med.* **148**: 261.
15. Pearson, C. M., Waksman, B. H., and Sharp, J. T. (1961) Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of Mycobacterial adjuvant. *J. Exp. Med.* **133**: 485.

(2003년 8월 27일 접수)