

排膿散이 프로테이나아제 活性受容體-2에 의한 흰쥐 발바닥 浮腫에 미치는 抗炎효과

임종필* · 최 훈

우석대학교 한약학과

Anti-inflammatory Effect of Baenong-san in Proteinase-activated Receptor-2-mediated Paw Edema

Jong Pil Lim*, Xun Cui

Department of Oriental Pharmacy, Woosuk University

The Baenong-san has long been used for treatment of inflammatory in Korea. In this study, the anti-inflammatory effects of Baenong-san water extract (BWX) were investigated in proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-mediated rat paw edema. Paw edema was induced by injection of trypsin or *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂ (*tc*-NH₂) into hindpaw of rats. BWX (10, 50, 100 and 200mg/kg) was orally administered 1 h before induction of inflammation. At doses of 50, 100 and 200 mg/kg, BWX showed significant inhibition of both change in paw volume and vascular permeability. BWX(100mg/kg) significantly also inhibited PAR2 agonist-induced myeloperoxidase (MPO) activity in paw tissue. This study demonstrated that BWX has an anti-inflammatory action for PAR2-mediated paw edema.

Key words : Baenong-san(排膿散), Anti-inflammatory, Trypsin, *tc*-NH₂, Paw edema

서 론

排膿散은 金匱要略¹⁾의 처방으로 氣行血暢, 膿液可消, 正氣自復함으로써 膿과 熱을 치료하는데 사용해왔다. 현재 排膿散은 단독으로 사용되기보다는 排膿湯과 合方하여 排膿散及湯으로 더 널리 사용되고 있다. 排膿散에 대한 연구는 별로 이루어진바 없으나 排膿散及湯의 抗菌效果에 대한 연구에서 균에 대한 억제효과가 있음이 보고된바 있다²⁾.

최근 proteinase 수용체인 PAR1, PAR3 및 PAR4가 thrombin에 의하여 활성화될 수 있다는 보고가 있다^{3,4)}. 그리고 PAR2 및 PAR4는 trypsin에 의하여 활성화될 수 있으며 mast cell tryptase 도 PAR2를 활성화시킨다고 하였다^{5,6)}. 또한 Trypsin, mast cell tryptase 또는 합성 peptide (SLIGRL-NH₂)는 PAR2를 활성화시켜서 광범위한 염증을 일으킨다고 하였다⁷⁾. PAR2가 염증과정에 중요한 역할을 하는데 이는 혈관 투과성의

증가, neutrophil의 침윤 및 proinflammatory cytokines의 분비에 의한 것이라고 하였다^{8,9)}. 그러므로 이 경우 PAR2 활성의 억제는 PAR2에 의한 염증치료에 중요한 의미가 있는 것이다.

본 연구에서 trypsin이나 *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂ (*tc*-NH₂)에 의하여 생성된 흰쥐의 발 부종에 대하여 배농산물엑스(BWX)의 항염증효과를 확인하여 보고한다¹⁰⁾.

재료 및 방법

1. 시약 및 동물

Trypsin은 Sigma(St. Louis, MO), *trans*-cinnamoyl-LIGRLO-NH₂ (*tc*-NH₂; M.W. 812.59)는 Santa Cruz Biotech. Inc. (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

동물은 Sprague-Dawley 숫컷 흰쥐를 대한바이오링크에서 구입하여 체중 200±20 g인 것을 실험실 환경에서 충분한 사료와 물을 공급하면서 적응시킨 뒤 실험하였다.

2. 검약의 조제

본 실험에 사용한 약제는 시중에서 구입하여 정선한 것을

* 교신저자 : 임종필, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한약학과

· E-mail : limjp@woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1571

· 접수 : 2003/10/27 · 수정 : 2003/12/19 · 채택 : 2004/01/12

Table 1과 같이 金匱要略¹⁾의 처방에 준하여 50첩 분량을 세절하여 물로 3시간씩 3회 가열 추출한 여액을 감압 농축한 후 냉동 건조하여 배농산엑스 171g (수득율 19%)을 얻어 본 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Baenong-san

韓藥	生藥名	用量(g)
枳實	Ponciri Fructus	10.0
芍藥	Paeoniae Radix	6.0
桔梗	Platycodi Radix	2.0
總量		18.0

3. Trypsin 및 tc-NH₂에 의한 부종 및 혈관투과성 억제

쥐는 물을 자유롭게 마시도록 하고 18시간 절식시킨 후 BWX (10, 50, 100 및 200mg/kg) 및 생리식염수를 경구투여 하였다. 1시간 후 ketamine HCl (30 mg/kg)과 xylazine (6 mg/kg)을 근육주사하여 마취한 후 trypsin (500 pmol) 또는 tc-NH₂ (500 µg)을 쥐의 뒷다리 발바닥에 주사하였다. Trypsin 및 tc-NH₂는 생리식염수에 녹여 100 µl씩 주사하였다. 부종의 크기는 쥐의 발바닥 주사직전과 1시간 후에 plethysmometer (Ugo Basile, Italy)를 이용하여 측정하였으며 전후 차이로 계산하였다.

Trypsin 및 tc-NH₂주사에 의한 혈관투과성은 Katayama 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. BWX(10, 50, 100 및 200mg/kg) 및 생리식염수를 경구투여하고 trypsin이나 tc-NH₂를 100 µl씩 쥐 발바닥에 주사한 직후 2.5 mg/kg Evans blue를 생리식염수에 녹여 정맥주사 1시간 후 쥐를 죽여서 발바닥을 도려내어 무게를 측정하고 잘게 썰어 마개 있는 시험관에 넣어 1N KOH용액 1ml를 붓고 37°C에서 하루 밤을 침출시킨 후 0.6N H₃PO₄와 acetone (5:13) 혼액을 9 ml 가하고 수초동안 시험관을 세게 흔들어 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상정액을 spectrophotometer로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 Evans blue표준곡선으로 농도를 구하여 µg/g으로 표시하였다.

부종 억제 및 혈관투과성 억제율은 다음 식으로 계산하였다. 이때 A는 BWX투여 직전의 수치이며 B는 BWX투여 1시간 후의 수치이다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (A-B)/A \times 100$$

4. Myeloperoxidase 정량

상기와 같은 방법으로 생리식염수나 BWX를 경구투여한 1시간 후 trypsin 및 tc-NH₂를 쥐 발바닥에 주사하고, 6시간 후 쥐 발바닥 무게를 측정하고 myeloperoxidase (MPO) 활성도를 Bradley 등¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 조직을 잘게 썰어서 0.5% hexa-decyltrimethyl-ammonium bromide (HTAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 포함하는 KH₂PO₄ / K₂HPO₄ buffer (pH 6.0) 중에 0°C에서 45초 동안 전동 homogenizer로 혼화한 후 4°C에서 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. Myeloperoxidase 활성도를 측정하기 위하여 96-well microtiter plate에 상정액 50 µl, 50 µl의 phosphate buffer 함유한 0.5 % HTAB (pH 6.0), 50 µl의 o-dianisidine (Sigma) (0.68 mg/ml in distilled water)을 첨가

하고 반응을 촉진하기 위하여 새로 조제한 0.003 % hydrogen peroxide를 가하였다. 그리고 450 nm에서 흡광도차를 이용하여 계산하였다. Myeloperoxidase 활성도 억제율은 다음 식으로 계산하였다. A는 BWX투여 직전의 수치이며 B는 BWX투여 1시간 후의 수치이다.

$$\text{Inhibition(\%)} = (A-B)/ A \times 100$$

5. 통계처리

실험성적의 통계처리는 student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.01이하로 하였다

결 과

1. 부종억제율

PAR2 작용약물인 trypsin이나 tc-NH₂로 유발된 쥐의 뒷발바닥 부종은 PAR2 작용약물을 주사한 경우 생리식염수 단독처리시 보다 유의성 있게 증대하였다 (Table 2).

Table 2. Effects of BWX on trypsin or tc-NH₂-induced paw edema in the rats*

Agnist*	Treatment	Dose (mg/kg p.o.)	Change of paw edema (ml) [§]	%inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	0.48±0.04	-
		10	0.42±0.12	12.5
		50	0.27±0.02*	43.8*
		100	0.16±0.03*	66.7*
tc-NH ₂ (500 µg)	Saline	-	0.40±0.11	-
		10	0.36±0.05	10.0
		50	0.28±0.01	30.0*
		100	0.17±0.03*	57.5*
tc-NH ₂ (500 µg)	BWX	200	0.16±0.06*	60.0*

*Oral administration of saline or BWX was performed 1 h prior to subplantar injection of trypsin or tc-NH₂. Trypsin or tc-NH₂ was dissolved in saline and injected in a volume of 100 µl. §The size of edema was assessed by measuring the volume of the hindpaw immediately before and 1 h after the agonist injection. Data show the mean±SE from six rats. *p<0.01 compared to the saline group.

Trypsin으로 유발된 부종에서 BWX 50 mg/kg 투여 시 43.8%, 100 mg/kg에서 66.7%, 200 mg/kg에서 68.8%의 유의성 있는 억제율을 보였다. tc-NH₂로 유발된 부종에서는 BWX 50 mg/kg에서 30.0%, 100 mg/kg에서 57.5%, 200 mg/kg에서 60.0%의 억제율을 나타냈다. Trypsin이나 tc-NH₂으로 유발된 부종에서 BWX 100 mg/kg과 200 mg/kg에서 거의 비슷한 억제율을 나타냈으나 10 mg/kg에서는 유의성이 보이지 않았다.

2. 혈관투과성 억제율

500 pmol의 trypsin이나 500µg의 tc-NH₂주사 1시간 후 뚜렛이 Evans blue의 투과성이 높아졌다. 그러나 BWX (50, 100 및 200 mg/kg)는 유의성 있게 발바닥 조직의 Evans blue 투과성을 억제하였다(Table 3). BWX 100 mg/kg에서 혈관투과율은 trypsin의 경우 62.6%, tc-NH₂의 경우 53.0%의 억제율을 보였다. 100 mg/kg과 200 mg/kg에서 trypsin 및 tc-NH₂의 경우 혈관투과 억제율은 비슷했다.

Table 3. Effects of BWX on trypsin or *tc*-NH₂-induced vascular permeability in the paw of rats[†]

Agnist [*]	Treatment	Dose (mg/kg <i>p.o.</i>)	Amount of drug (μ g/g paw) [‡]	%inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	91.30±6.71	-
		10	75.32±5.40	17.5
	BWX	50	53.55±3.19*	41.3*
		100	34.14±4.29*	62.6*
		200	33.54±5.01*	63.3*
<i>tc</i> -NH ₂ (500 μ g)	Saline	-	70.27±4.52	-
		10	60.11±1.99	14.5
	BWX	50	47.21±3.85	32.8*
		100	33.01±4.19*	53.0*
		200	32.65±2.47*	53.5*

[†]Oral administration of saline or BWX was performed 1 h prior to subplantar injection of trypsin or *tc*-NH₂. [‡]Trypsin or *tc*-NH₂ was dissolved in saline and injected in a volume of 100 μ l. ^{*}Rats received an intravenous injection of 25 mg/kg Evans blue in saline immediately before the agonist injection. Data show the mean±SE from six rats. ^{††}p<0.01 compared to the saline group.

3. Myeloperoxidase 활성도

BWX (100 mg/kg)는 유의성 있는 MPO활성 억제효과를 나타냈는데 trypsin의 경우는 63.3 %, *tc*-NH₂의 경우는 55.6%의 억제효과를 보였다 (Table 4).

Table 4. Effects of BWX on trypsin or *tc*-NH₂-induced MPO activity in the paw of rats[†]

Agnist [*]	Treatment	Dose (mg/kg <i>p.o.</i>)	MPO activity (unit/g paw) [‡]	%inhibition
Trypsin (500 pmol)	Saline	-	5.61±0.25	-
	BWX	100	2.06±0.21*	63.3*
<i>tc</i> -NH ₂ (500 μ g)	Saline	-	4.41±0.18	-
	BWX	100	1.96±0.11*	55.6*

[†]Oral administration of saline or BWX was performed 1 h prior to subplantar injection of trypsin or *tc*-NH₂. [‡]Trypsin or *tc*-NH₂ was dissolved in saline and injected in a volume of 100 μ l. ^{*}Six hours after agonist injection paw was weighed and assessed for the myeloperoxidase(MPO) activity. Data show the mean±SE from six rats. ^{††}p<0.01 compared to the saline group.

고찰

본 연구에서 trypsin이나 *tc*-NH₂로 유발된 쥐 발바닥 浮腫, 血管透過性, myeloperoxidase 活性度에서 BWX 50, 100 및 200 mg/kg 投與時 有意性있는 減少率을 보였다. BWX 1,000 mg/kg 이상의 고용량에서는 trypsin 이나 *tc*-NH₂로 유발된 부종에서 100 mg/kg의 경우보다 더 낮은 효과를 보여 (data 게재하지 않음) 고용도의 BWX는 큰 도움이 되지 않는 것으로 보인다. Trypsin 이나 *tc*-NH₂와 같은 PAR2 작동약의 주사는 쥐 발바닥에서 혈관투과성이 증가하여 부종으로 나타난다고 한다^{13,14}). 따라서 이러한 염증반응 모델은 항염증반응을 평가하는데 적합하다고 생각된다. PAR2는 neutrophil과 eosinophil에서 뿐 아니라 mast cell에서도 나타난다고 한다^{15,16}). Kawabata 등¹³)은 조직침투 (Evans blue extravasation)에서 신속한(15 min) mast cell 의존도의 증가는 PAR2 활성peptide인 SLIGRL-NH₂의 투여에 기인한 것이라고 하였다. 반대로 Vergnolle 등¹⁴)은 *tc*-NH₂에 의한 염증반응은 주로 mast cell degranulation에 독립적이라고 말하였다. 이러한 반응들은 PAR2가 endothelial cell 뿐 아니라 neutrophil 과 eosinophil과 같은 mast cell 이외의 조직 함유물에서 나타나는데

이는 쥐의 발에서 trypsin이나 *tc*-NH₂에 대한 하나의 중요한 표적이 되며 이것이 조직의 투과성과 부종 증가의 원인이 된다고 하였다¹⁷). Vergnolle 등¹⁸)은 *tc*-NH₂로 유발된 발바닥 부종은 prostaglandin이나 nitric oxide와는 관계가 없다고 하였다.

이상의 결과로 보면 약물 각개 구성성분의 활성에 대해 좀 더 연구가 있어야 하지만 排膿散의 構成藥物인 苦寒한 枳實로 散痞, 瀉痰消積하며, 桔梗으로 開宣肺氣, 祛痰排膿하며, 枳實과 桔梗으로 一昇一降하여 氣滯可開, 壅結可散하며 芍藥으로 養血活血하여 浮腫을 치료하는 韓方的 原理¹⁹)와 상기 이론이 서로 상관이 있다고 사료된다.

결론

排膿散 물엑스는 proteinase 활성수용체-2에 의한 흰쥐 뒷발바닥 浮腫모델에서 trypsin이나 *tc*-NH₂로 誘發된 발바닥 浮腫, 血管透過性, myeloperoxidase 活性度에서 50, 100 및 200 mg/kg 經口投與한 경우 有意性 있는 抑制率을 보여 抗炎症 效果가 뚜렷함을 나타냈다.

감사의 글

이 논문은 우석대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 張仲景, 金匱要略, p243, 學苑出版社, 北京, 1995.
- 王智重, 排膿散和排膿湯의 抗菌作用, 黑龍江中醫藥, 1, 46-47, 1981.
- Kahn, ML. Zheng, YW. Huang, W. Bigornia, V. Zeng, D. Moff, S. Farese, RV Jr. Tam, C. Coughlin, SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. Nature, 394(6694), 690-694, 1998.
- Coughlin, S.R. How the protease thrombin talks to cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(20):11023-11027, 1999.
- Corvera, CU. Dery, O. McConalogue, K. Bohm, SK. Khitin, LM. Caughey, GH. Payan, DG. Bunnett, NW. Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor-2. J Clin Invest, 100(6):1383- 1393, 1997.
- Kong, W. Mcconalogue, K. Khitin, LM. Hollenberg, MD. Payan, DG. Bohm, SK. Bunnett, NW. Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor-2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 8884-8889, 1997.
- Molino, M. Barnathan, ES. Numerof, R. Clark, J. Dreyer, M. Cumashi, A. Hoxie, JA. Schechter, N. Woolkalis, M. Brass, LF. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. J. Biol. Chem. 272, 4043-4039, 1997.
- Emilsson, K. Wahlestedt, C. Sun, MK. Nystedt, S. Owman,

- C. Sundelin, J. Vascular effects of proteinase-activated receptor 2 agonist peptide. *J. Vasc. Res.* 34, 267-272, 1997.
9. Hou, L. Kapas, S. Cruchley, AT. Macey, MG. Harriott, P. Cinni, C. Stone, SR. Howells, GL. Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology*, 94, 356-362, 1998.
10. Saifeddine, M. Roy, SS. Al-Ani, B. Triggle, CR. Hollenberg, MD. Endothelium-dependent contractile actions of proteinase-activated receptor-2 activating peptides and human umbilical vein: release of a contracting factor via a novel receptor. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1445-1454, 1998.
11. Katayama, S. Shionoya, H. Ohtake, S. A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 22(2):89-101, 1978.
12. Bradley, PP. Priebe, DA. Christensen, RD. Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78(3):206-209, 1982.
13. Kawabata, A. Kureda, R. Imnami, T. Kataka, K. Taneda, M. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br. J. Pharmacol.* 125, 419-422, 1998.
14. Vergnolle, N. Macnaughton, WK. Al-Ani, B. Saifeddine, M. Wallace, JL. Hollenberg, MD. Proteinase-activated receptor-2-activating peptides: identification of a receptor that regulates intestinal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7766-7771, 1998.
16. Howells, GL. Macey, M. Chinni, C. Hou, L. Fox, MT. Harriott, P. Stone, S. Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J. Cell Sci.* 110:881-887, 1997.
17. Nystedt, S. Ramakrishnan, B. Sundelin, J. The proteinase-activated receptor-2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:14910-14915, 1996.
18. Vergnolle, N. Hollenberg, MD. Sharkey, KA. Wallace, JL. Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR-2) -activating peptides in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1083-1090, 1999.
19. 中國中醫研究院編, 正統金匱要略, p344, 醫學研究社, 서울, 1987.