

고량강의 항염증 작용에 대한 연구

박희준[#], 이제현, 김수영, 심범상, 구헌중,
강전모, 최일환, 이재동, 김남재, 이지숙, 임사비나^{*}

경희대학교 동서의학연구소 경희비전 2000 통증 및 신경의학연구팀

Anti-inflammatory Effect of *Alpiniae officinari* Rhizoma Extract

Hi Joon Park[#], Je Hyun Lee, Su Young Kim, Bum Sang Shim, Heon Jong Ku,
Jun Mo Kang, Il Hwan Choe, Jae Dong Lee, Nam Jae Kim, Ji Suk Lee, Sabina Lim^{*}

Research Group of Pain and Neuroscience in Vision 2000 Project,
East-West Medical Research Institute. Kyung Hee University

ABSTRACT

Objective : The use of herbal therapy is becoming an increasingly attractive approach for the treatment of various inflammatory disorders.

The *Alpiniae officinari* Rhizoma is popular in Aisa as a traditional herbal medicine. *Alpiniae officinari* Rhizoma is a species of the ginger family(Zingiberacease).

Method : This study was performed to investigate the anti-inflammatory effect of *Alpiniae officinari* Rhizoma extract by the methods of "carrageenan induced paw edema" and "Lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in mouse macrophage RAW 264.7 cells".

Result : We suggest that *Alpiniae officinari* Rhizoma extract decreased paw volume induced by plantar injection of carrageenan.

Also *Alpiniae officinari* Rhizoma extract inhibited nitric oxide, prostaglandin E₂ production and induced nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 protein expression in Mouse macrophage RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide.

Conclusion : This study shows that *Alpinia officinari* Rhizoma extract seems to have anti-inflammatory effect by inhibition of nitric oxide, prostaglandin E₂ production and nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 protein expression.

Key Words : *Alpiniae officinari* Rhizoma, carrageenan, inflammation, lipopolysaccharide, nitric oxide, prostaglandin E₂

*교신저자 : 임사비나. 서울시 동대문구 회기1동 경희대학교 동서의학연구소 경희비전2000 통증 및 신경의학 연구팀. E-mail : lims@khu.ac.kr Tel : 02-961-0324 Fax : 02-961-7831

#제1저자 : 박희준. 서울시 동대문구 회기1동 경희대학교 동서의학연구소 경희비전2000 통증 및 신경의학 연구팀. E-mail : acufind@khu.ac.kr Tel : 02-961-9435 Fax : 02-961-7831

· 접수 : 2005년 4월 11일 · 수정 : 2005년 6월 14일 · 채택 : 2005년 6월 20일

서론

고량강(*Alpinia officinarum* Hance)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 여러해살이풀로서, 名醫別錄¹⁾에 '大溫, 主治暴冷, 胃中逆逆, 癩亂腹痛'으로 처음 기재된 이래, 한의학에서는 溫胃, 祛風, 散寒, 行氣, 止痛하는 효능으로 脾胃中寒, 脘腹冷痛, 嘔吐와 泄瀉, 食滯 등을 치료하는데 주로 사용되어 왔다²⁾. 하지만 동의보감에 기록되어 있는 고량강이 포함된 처방들 중에서 開笑散, 哭來笑去散은 齒痛에, 訶子散, 桂靈散, 愈痛散, 鷄舌香散 등은 心痛에, 拈痛散은 痛風 치료에, 雲母膏는 癰疽 치료에 사용되었는데³⁾, 이러한 질환들은 염증과 관련되어 있다.

고량강에 대한 연구를 살펴보면 Shin 등⁴⁾은 pancreatic lipase 저해 작용을, Li 등⁵⁾은 지방산 합성 억제 작용을, Kim 등⁶⁾은 고량강의 항산화 효과에 대한 연구를 보고하였다. 뿐만 아니라 고량강 추출물의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도된 세포독성과 DNA손상에 대한 방어효과⁷⁾, 고량강의 cyclooxygenase-2(COX-2) 저해작용⁸⁾과 prostaglandin 생합성 저해 효과⁹⁻¹⁰⁾와 같은 염증반응에 관련된 고량강의 작용에 관한 연구들도 발표되었다.

염증(inflammation)은 조직의 변질, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지를 병을 유발하는 복잡한 병변으로, 여러 가지 형태의 감염(infection)이나 생체 내 대사산물 중의 자극성 물질에 대한 생체 내 방어기전의 발현이라 할 수 있다¹¹⁾. 일반적으로 염증은 상처, 화상, 화학물질, 세균감염 뿐 아니라 암과 Alzheimer¹²⁾에 이르기까지 많은 질병에 연루되어 있으므로 평생 한·두 가지 염증질환을 앓아보지 않은 사람이 없을 정도로 우리 건강과 밀접한 관련을 가지고 있다. 특히, 최근에는 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 염증질환과 골관절염, 류마티스(rheumatoid) 관절염 등과 같은 만성 염증질환이 증가하는 추세이다¹³⁾. 기존의 항염증제는 크게 스테로이드성과 비스테로이드성 항염증제로 구분된다. 비스테로이드성 항염증제는 주로 cyclooxygenase(COX)를 억제하여 염증반응에 관여하는 prostaglandin(PG)의 생성을 억제함으로써 항염증 작용을 나타낸다¹⁴⁾. 하지만 상부위장관에 대한 병변이나 신장 독성과 같은 여러 가지 부작용을 수반하는 경우가 많아 효력이 강하면서도 비교적 부작용이 적은 항염증제의 개발이 꾸준히 요구되고 있는 실정이다. 최근에는 이러한 요구에 맞는 항염증제를 개발하기 위해 천연물로부터 항염 효과가 있는 성분

을 분리하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 우리나라의 경우 오래전부터 임상 경험이 풍부하고 안전성 측면에서 탁월한 평가를 받고 있는 한약재를 이용한 새로운 항염증제의 개발가능성이 충분하다고 사료된다.

이에 본 연구에서는 항염증 효과가 있을 것으로 예상되는 한약재 중 고량강을 실험한 결과 Rats의 carrageenan 유도 급성염증 모델에서 유의한 소염 효과를 나타내었고, 염증 과정에서 고량강이 염증 유발 인자에 미치는 영향을 연구하기 위해 실시한 마우스 대식세포를 이용한 염증 억제 실험에서도 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 고량강(*Alpiniae officinari* Rhizoma)은 중국에서 수입한 것으로 서울특별시 동대문구 제기동 소재의 경동시장에서 굵고 크며 방향과 매운 맛이 강한 것으로 구입하였다.

2. 검액의 제조

고량강을 분쇄기로 분쇄한 후, 고량강 시료 200g을 3ℓ 플라스크에 넣은 후 80% 에탄올 1500ml를 가하여 3시간 동안 환류 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상층액을 모은 후, 거름종이로 여과하고 감압농축기로 감압 농축한 후 동결 건조하여 고량강 에탄올 추출물 40.7g(20.35%)을 수득하였다.

3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)를 이용한 성분 분석

고량강의 80% 에탄올 추출물을 ethyl acetate에 녹여 10 mg/ml의 농도로 조제하여 membrane filter(pore size : 0.45um)로 여과하고 sample 주입량은 2 μℓ를 주입(injection)하여 GC-MS 분석하였다. GC의 분석조건은 DB-5 column(10 m, 0.18 mm, 0.18 μm)을 사용하였고, 컬럼의 온도는 40℃에서 300℃까지 10℃/min의 승온 속도로 승온하였으며, 주

입구 온도는 280℃이었으며, 운반기체는 He (Helium)을 사용하였다. 분리된 성분의 동정에는 GC-MS(GC; Agilent 6890N / MS; LECO Pegasus III)를 사용하였고, 검출 질량은 30-550 amu(atomic mass unit)이었고, 이온화 에너지는 1800 eV(electron-volt)이었다.

4. Carrageenan 유도 급성염증 모델에서의 소염 작용

1) 동물

본 실험에서 사용한 동물은 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(SD Rats, male, (주) 샘타코 바이오 코리아, 한국)를 이용하였으며, 실험실의 온도는 22℃±2℃로 유지하였다. 사료는 삼양 유지사료(주) 고행사료를 사용하였고, 물과 사료는 충분히 공급하면서 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 실험군 분류

Carrageenan을 투여하기 30분전에 동결 건조된 고량강 추출물을 각각 200, 500, 1000 mg/kg이 되도록 농도를 조절한 후, 1 ml씩 경구 투여하여 실험군으로 하였으며, 고량강 추출물을 투여하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 그리고 prednisolone 500 mg/kg을 투여한 군을 양성 대조군으로 하였고, 각 군은 6마리씩으로 하였다.

3) Carrageenan 유도 족부종 측정

Type IV carrageenan(λ - carrageenan, Sigma Aldrich Co., USA)를 생리식염수에 녹여 1%가 되도록 제조하여 염증 유발을 위한 기염제로 사용하였다. 생리식염수로 희석한 1%의 carrageenan 50 μ l를 흰쥐의 후지족척에 피하 주사하여 염증을 유발시킨 후, 주사 후 1, 2, 3, 4 및 5시간에 부종의 변화를 부종측정기(Plethysmometer, Ugo Basil Co., Italy)를 이용하여 측정하였으며, 부종은 각 동물에서 carrageenan을 주사 후 증가한 후지족척의 부피(ml)를 측정하여 주사 전과 비교한 값으로 나타내었다.

5. Mouse macrophage RAW 264.7 cells를 이용한 항염 작용

1) 세포배양

Mouse macrophage(대식세포주인) RAW 264.7 세포는 서울대학교 암 연구소 한국 세포 주 은행에서 분양받아 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS)를 포함한 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

계대 배양은 2~3일에 한번씩 시행하였다. 96 well plate에 세포(cells)를 seeding하여 24시간 전 배양하고, lipopolysaccharide(LPS)와 한약제를 처리하여 48시간 후 살아있는 세포수를 측정하여 세포의 증식 저해 활성 및 세포 독성을 알아보았다.

2) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

(1) LPS 처치 및 검색 시료의 처리

세포가 부착되어 있는 각 well에 1 μ g/ml의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM 200 μ l씩을 넣었다. 이때, 대조군에는 LPS가 없는 배지를 넣고, LPS가 포함된 배지로 교환한 후 곧 바로 고량강 추출물 각 20, 50, 100 μ g/ml를 처리하여, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 16시간 배양한 후 그 상층액을 회수하여 정량하였다.

(2) Griess 반응에 의한 배양액 중의 NO 생성량 측정

회수한 상층액을 96 well plate에 각 well 당 배양액 100 μ l씩 넣고 Griess 시약 [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid] 100 μ l씩을 넣어 10분간 가볍게 흔들여 준 후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. sodium nitric dioxide(NaNO₂)를 표준품으로 하여 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 NO 생성량을 구하였다.

3) Prostaglandin E₂(PGE₂) 생성량 측정

(1) Aspirin 전처리 및 세포 부착

대식세포주인 RAW 264.7 세포를 10% FBS-DMEM에 현탁하여 10×10^5 cells/ml로 하였다. 이 현탁액에 aspirin을 첨가해 세포에 잔존하는 최종농도가 500 μ M이 되도록 첨가해 세포에 잔존하는 COX 효소의 활성을 비가역적으로 억제시켰고, 그런 다음 세포 현탁액을 96 well 세포 배양판의 각 well에 200 μ l씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하여 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후, 표면에 남아 있는 세포를 실험에 사용하였다.

(2) LPS 처치 및 검색 시료의 처리

세포가 부착되어 있는 각 well에 1 μ g/ml의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM 200 μ l씩을 넣었다. 이때, 대조군에는 LPS가 없는 배지를 넣었고, LPS가 포함된 배지로 교환한 후 곧 바로 고량강 추출물 각 10, 50, 100, 150 μ g/ml를 처리하여, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 16시간 배양한 후 그 상층액을 회수하여 유리된 PG양을 효소면역분석법을 이용하여 정량하였다.

(3) 효소면역분석법을 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 말끔히 털어낸 후, 0.05% tween 20-phosphate buffer solution으로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 200 μ l를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂를 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 % inhibition을 구하였다.

4) Western blotting

세포를 LPS로 처리한 후 300 μ l의 trizol extraction buffer를 첨가하여 단백질을 분리하였다. 단백질은 Bradford 방법을 이용하여 정량한 뒤, 12% sodium dodecyl sulfate(SDS)-polyacrylamide gel을 이용하여 단백질을 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 nitrocellulose membrane (BioRad Laboratories, Hercules, California)에 transfer한 후 1시간 동안 2% bovine serum, Albumine(BSA), 5% skim milk에서 blocking 한 뒤, Anti-rabbit COX-2 IgG (Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 1:1000으로 희석하고, 1시간 반응 후 4°C에서 24시간 동안 더 반응시킨 뒤 tris-base solution, tripton X-100(TBS-T)로 3회 세정한 뒤, goat anti-rabbit IgG를 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence(ECL) solution을 이용하여 확인하였다. 발현된 단백질은 β -actin을 사용하여 같은 양이 loading 되었는지를 확인하였다.

6. 통계

모든 data는 평균 \pm 표준오차(Mean \pm standard error)로 나타내었으며, ANOVA로 통계검정한 뒤 Newman-Keuls 방법을 사용하여 사후 분석하였다.

결 과

1. Gas-Chromatograph/Mass Spectrum 분석 결과

고량강에 대한 GC 분석에서 5개의 peak를 관찰할 수 있었으며, Mass로 확인 동정한 결과 benzenepropanal, benzalacetone 등의 성분을 확인할 수 있었다(Fig. 1,2,3).

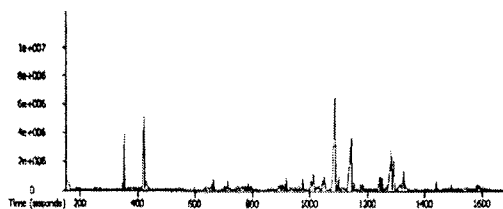


Fig. 1. Gas chromatogram of *Alpiniae officinari* Rhizoma

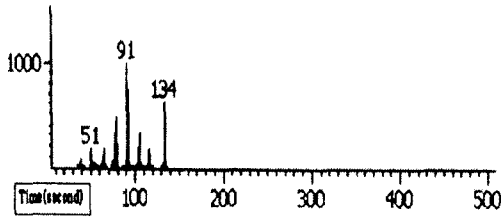


Fig. 2. Mass spectrum of Benzenepropanal from *Alpiniae officinari Rhizoma*(Rt : 353.265sec)

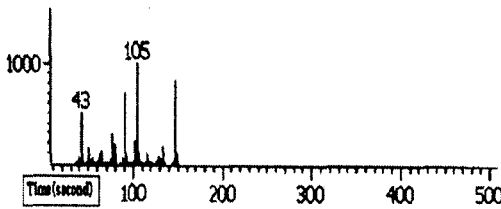


Fig. 3. Mass spectrum of Benzalacetone from *Alpiniae officinari Rhizoma*(Rt : 421.465sec)

2. Carrageenan 유도 급성염증 모델에서의 소염 효과

Carrageenan을 주사한 발의 부종은 주사 후 1시간이 지나면서 급격히 증가하기 시작하였으며, 주사 후 3시간에 최대에 도달하였다. 5시간까지 부종은 계속 지속되었으며, 고량강 추출물 200, 500, 1000 mg/kg을 투여 하였을 때 유의성 있게 부종이 감소되었다(Table I, Fig. 4).

Table I. Anti-inflammatory effect of *Alpiniae officinari Rhizoma* and prednisolone on rat paw edema induced by 1% carrageenan injection.

Group	Dose (mg/kg, p.o.)	Time (hr)				
		1	2	3	4	5
Control	-	0.30±0.30	1.32±0.11	1.94±0.15	1.83±0.12	1.78±0.16
<i>Alpiniae officinari Rhizoma</i>	200	0.14±0.06*	0.80±0.16*	1.05±0.16***	1.17±0.06***	1.20±0.07**
	500	0.12±0.03***	0.53±0.13***	0.92±0.21***	1.20±0.16**	1.12±0.09**
	1000	0.13±0.04**	0.55±0.10***	0.89±0.11***	1.00±0.59***	1.24±0.07**
Prednisolone	500	0.17±0.04*	0.49±0.11***	0.44±0.12***	0.57±0.15***	0.58±0.20***

Each data represents mean ± standard error (n=6)

Significant differences from the carrageenan-induced paw edema are indicated by *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

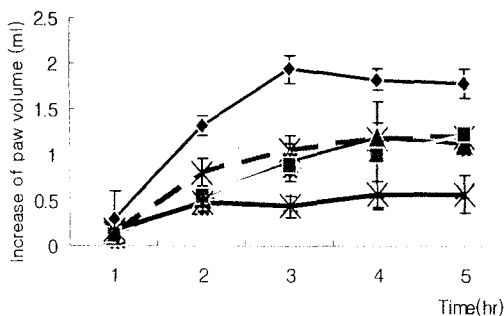


Fig. 4. Time-course of increase in paw volume induced by plantar injection of carrageenan(◆) and effect of *Alpiniae officinari Rhizoma* 1000mg/kg(■), 500mg/kg(▲) and 200mg/kg(×) and effect of prednisolone 500mg/kg(*) administered per orally 30 min before carrageenan injection. Significant differences from the carrageenan-induced paw edema are indicated by *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

3. Mouse macrophage RAW 264.7 cells를 이용한 항염 효과

1) NO 생성 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하면 NO의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 고량강 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여하였을 때 유의성 있게 NO 생성이 저해되었다(Fig. 5).

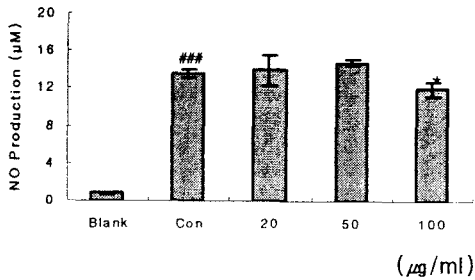


Fig. 5. Effect of *Alpiniae officinari* Rhizoma on nitric oxide(NO) production by lipopolysaccharide (LPS)-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells.

###, Statistically significant value compared with control group($p < 0.001$).

*, Statistically significant value compared with control group($p < 0.05$)

2) PGE₂ 생성 억제 효과

LPS로 활성화된 대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 PGE₂의 생합성이 증가하게 되는데, 고량강 추출물 10, 50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의성 있는 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 6).

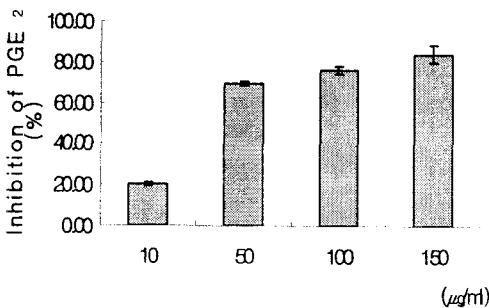


Fig. 6. Effect of *Alpiniae officinari* Rhizoma on prostaglandin E₂(PGE₂) production by lipopolysaccharide(LPS)-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells

3) inducible nitric oxide synthase (iNOS) 발현 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 LPS 처리를 한 경우 iNOS의 발현이 증가한 것을 관찰하였고, 고량강 추출물 50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하면 LPS로 증가된 iNOS의 발현이 감소되었다(Fig. 7).

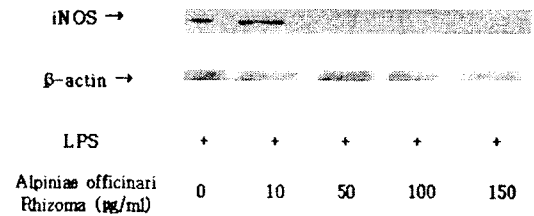


Fig. 7. Modulation by *Alpiniae officinari* Rhizoma of lipopolysaccharide(LPS)-induced inducible nitric oxide synthase(iNOS) expression in mouse macrophage RAW 264.7 cells

4) COX-2 발현 억제 효과

대식세포주인 RAW 264.7 세포에서 LPS 처리를 한 경우 COX-2의 발현이 증가한 것을 관찰하였고, 고량강 추출물을 처리하면 LPS로 증가된 COX-2의 발현이 감소되었다(Fig. 8).

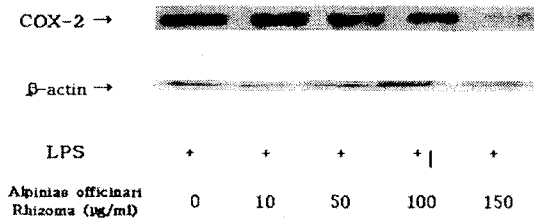


Fig. 8. Modulation by *Alpiniae officinari* Rhizoma of lipopolysaccharide(LPS)-induced cyclooxygenase-2(COX-2) expression in mouse macrophage RAW 264.7 cells

고찰

염증(inflammation)은 인체에 발생하는 가장 흔한 질환 중의 하나로 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 회복 재 생성하려는 기전이다¹¹⁾. 염증을 일으키는 원인 중에서는 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandin(PG), hydroxy-eicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 결과적으로 숙주(host)에 해를 끼칠 수 있다¹³⁾. 염증의 발현 기전에는 다양한 화학적 매개체가 관여하고 있으며, 그 병의 원인도 매우 복잡한 것으로 알려져 있다. 체내 염증과정에서는 과량의 nitric oxide(NO) 및 prostaglandin E₂(PGE₂) 등의 염증인자가 유도형 nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 형성된다¹⁸⁻¹⁹⁾.

한의학에서는 염증에 대한 병리적 기전으로 靈樞·癰疽篇²⁰⁾에서는 차갑고 사이한 기운이 經絡 가운데 침입하면 혈액이 凝滯되고 통하지 않게 되어 癰腫을 일으키고, 차갑고 사이한 기운이 변화하면 열이 나고 열이 勝하면 肌肉이 傷하고 膿이 생긴다고 하였다. 또한 인체에서 가장 흔한 대표적인 염증 질환의 하나인 관절염은 한의학적으로 보면 痺症, 歷節風, 痛風, 鶴膝風 등의 범주에 속하는 것으로 볼 수 있다. 痺症은 인체의 氣血이 허약하고 영위가 불화할 때, 風寒濕의 邪氣가 인체의 肌表 經絡을 침입하면 氣血의 운행이 원활하지 못하여 肢體, 筋肉, 關節 등의 疼痛, 麻木, 重着, 屈伸不利 그리고 關節腫脹 등의 증상을 일으키는 병증이다²¹⁻²²⁾. 內經²³⁾에서는 風寒濕의 三氣가 습하여 痺症을 일으키는데 風氣가 勝한 것을 行痺, 寒氣가 勝한 것을 痛痺, 濕氣가 勝한 것을 著痺라 하였다. 그 원인으로 金匱要略²⁴⁾에서는 稟賦不足으로 嗜慾이 無節하여 氣血肝腎이 虧損하였을 때 風寒濕 三氣가 침입하여 병이 생긴다고 보았으며, 朱²⁵⁾는 血虛 風濕 風熱 痰飲 瘀血로 보았고, 巢²⁶⁾는 風濕을 주원인으로 보았고, 巢²⁷⁾은 濕熱과 風濕, 寒濕을 구분하였고, 李²⁸⁾는 內因인 七情에 傷하거나 外因인 六氣에 傷하여 氣血運行에 균형을 잃음으로써 발병한다고 하였고, 李²⁹⁾은 形이 怯瘦한 者는 주로 血虛有火의 內因으로 因하고, 形

이 肥勇한 者는 風濕生痰의 外因이 많다고 하였다.

痺의 症狀은 肢體의 關節동통, 운동장애가 있으며, 短氣, 自汗出하고 全身에 일정한 부위가 없이 동통을 일으키기도 하는데²⁰⁾, 風痺는 風의 善行數變하는 성질로 인하여 통증이 上下左右로 流走하여 일정치 않은 것이 특징이며 惡寒, 發熱 등의 증상을 발하는 것으로 腕, 踝, 肘, 膝 등의 大關節에서 많이 나타난다. 一名 行痺 또는 歷節風이라고도 한다. 濕痺는 濕의 貳滯固着하는 성질로 인하여 동통부위가 고정되어서 이동하지 않으므로 一名 著痺(或 着痺)라고도 하고, 肢體에 重滯感 麻木 浮腫 等症이 있다. 寒痺는 寒邪의 성질이 激烈하여 氣血을 凝固시키고 전신 혹은 국소에 격렬한 疼痛이 있어서 一名 痛痺라고도 하며, 통증이 마치 찌르는 듯 하고, 熱을 받으면 통증이 경감되고 寒氣를 받으면 그 증상이 심해진다.

痺症의 治法으로는 風邪가 심할 때는 祛風을 爲主로 하고, 佐로 散寒利濕, 補血시키며, 寒邪가 심할 때는 散寒을 주로 하고, 濕邪가 심할 때는 利濕을 爲主로 하고 佐로 祛風散寒, 通氣 活血시킨다³⁰⁾.

고량강은 생강과에 속하는 여러해살이풀로서 높이가 30 ~ 80 cm이다. 뿌리줄기는 원기둥 모양이고 옆으로 길게 자라고 적갈색 또는 자홍색이며 마디가 있고 마디에서 뿌리가 내린다. 따뜻하고 습윤한 기후를 좋아하고, 廣東의 海南 및 雷州半島·廣西·雲南·臺灣 등지에 주로 분포되어 있다. 늦여름으로부터 초가를 사이에 채취하되 4 ~ 6년 묵은 뿌리줄기를 파내어 줄기·잎·수염뿌리 및 비늘을 제거하고 사용하며, 향기가 있고 맛이 맵고, 성질이 아주 따뜻하다³¹⁾. 고량강은 비위의 찬기운을 잘 소산시키고 濫中止痛의 효능이 있어 胃脘冷痛을 치료하고, 溫胃散寒의 작용이 양호하여 胃寒氣逆으로 인한 嘔吐清水에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 동의 보감에 기록되어 있는 고량강이 포함된 처방을 살펴보면 加減木香散, 訶朮散, 桂香散, 固腸丸, 大斷下丸, 順氣木香散, 神效越桃散 등의 처방은 泄瀉, 脹滿, 腹痛 등의 소화기 질환에 사용되었고, 草果飲, 小清脾湯, 常山飲, 老瘡飲, 驅癩湯, 驅邪湯 등은 疥癩에 사용되었고, 開笑散, 哭來笑去散은 齒痛에 사용되었다. 그리고 訶子散, 桂靈散, 愈痛散, 鷄舌香散 등은 心痛에 사용되었으며, 拈痛散은 痛風 치료에, 雲母膏는 癰疽 치료에 사용되었다³⁾.

고량강의 뿌리줄기에는 정유 0.5% ~ 1.5%를 함유하고 있는데, 그 주요성분은 1,8- cineole, methylcinnamate, eugenol, pinene, cadinene 등이

다. 또한, flavonoid인 galangin, kaempferide, kaempferol, quercetin, isoramnetin 등과 신미성분의 일종인 galangol을 함유한다³¹⁾. 이 성분들 중에서 galangin은 COX 억제활성, 항산화, lipoxigenase 및 prostaglandin synthase 억제활성, 항 virus 활성, 유전자독성 억제활성 등이 있음이 보고되었고, kaempferide도 COX-2억제활성이 있음이 보고되었다³¹⁾.

고량강에 대한 GC 분석에서 5개의 peak를 관찰할 수 있었으며, Mass로 확인 동정한 결과 benzenepropanal, benzalacetone 등의 성분을 확인할 수 있었다.

Carrageenan은 marine alga *Chondrus crispus*(Irish sea moss)로부터 추출한 sulfated polygalactose로서 최소한 5종 이상의 polysaccharide 혼합물이다. Kappa와 lambda의 2 fraction으로 구성되며, 이 2 fraction 중에서 염증유발에 유효한 성분은 lambda fraction으로 밝혀졌다³²⁾. Carrageenan에 의한 염증 시 histamine, kinins, serotonin, prostaglandin E 등이 유리되며, carrageenan 주사 시 초기에는 histamine 및 serotonin 등의 유리에 의한 hyperemia를 일으키며, 이어 bradykinin의 유리에 의한 지속적인 부종을 수반하는 염증반응이 일어나는 것으로 생각된다³³⁾. 본 실험에서 carrageenan에 의한 족부종은 주사 후 1시간이 지나면서 급격히 상승하기 시작하여 3시간에 최고조에 달했으며, 5시간까지 부종은 계속 지속되었다. 고량강 추출물을 200, 500, 1000 mg/kg씩 투여 하였을 때 유의성 있게 부종을 감소시키는 효과가 있었다. 이것은 고량강 추출물이 급성 염증기에 관여하여 있으며, 염증유발인자들을 억제하는 효능이 있음을 의미하는 결과라고 판단된다³⁴⁾.

본 실험에서는 염증세포에서의 항염 효과를 측정하기 위해 대식세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유발하였고, 염증반응과정에서 고량강이 염증 유발 인자인 PGE₂, NO, COX-2, iNOS에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

Gram-negative bacteria의 세포외막에 존재하는 LPS는 내독소로 잘 알려져 있으며, 박테리아가 죽으면서 세포외막에서 방출되어 gram-negative sepsis와 septic shock을 일으킨다¹³⁾. 마우스 대식세포에 LPS를 처리하면 iNOS의 발현이 유도되어 NO의 생성도 증가하게 된다³⁵⁾. NO의 과다한 생성은 염증 반응의 악화, 암화, 순환계 질환과 밀접한 연관이 있는 것으로 여겨지고 있다. NO는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 무기 저분자 라디칼

로서 신경 전달기능, 혈액응고 및 혈압의 조절 및 종양세포나 세포 내 기생 생물에 대한 숙주 면역계의 방어기능 등에 관여하고 있다¹³⁾. NO를 생성하는 효소는 물리화학적 성상에 따라 type I, II 및 III의 3종류의 동종 효소로 나뉘어진다. Type I (neuronal NOS, nNOS)과 type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS(constitutive NOS)로 분류되며, 상대적으로 일부 세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS(inducible NOS, iNOS)로 나뉘어진다. 이러한 NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 형성한다. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 절대적으로 많으며 이는 병리적으로 중요한 작용을 한다²⁰⁾. 염증반응 등에 의해 생성되는 NO는 LPS, TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β (interleukin-1 β) 또는 IFN- γ (interferon- γ)에 의해 자극 받은 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포, 심근세포에서 생성되는 iNOS에 의해 유도된다. iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다³⁶⁾. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 LPS에 노출시키게 되면 뚜렷하게 NO가 축적되는데 고량강 추출물 20, 50 μ g/ml에서는 NO 생성 억제효과가 뚜렷하지 않았지만 100 μ g/ml에서는 NO의 생성이 유의성 있게 억제되는 결과를 볼 수 있었다. NO 생성저해기전을 조사하기 위해 Western Blot으로 분석한 결과 LPS에 의한 iNOS의 발현은 고량강 추출물 100, 150 μ g/ml에서 감소되었다. 이 결과는 Prem N. Yadav 등의 실험 보고³⁷⁾와도 유사했다. 이러한 결과로부터 고량강은 대식세포에서 LPS가 유도하는 염증반응 중 iNOS의 발현을 저해하여 NO 생성을 억제함으로써 항염 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

다수의 항염증제의 작용기전은 PG 합성을 억제하는 것인데 이것은 COX의 생성 및 활성 저해에 의한 것이다. COX는 PG 생합성 과정에서 첫 단계인 아라키돈산(arachidonic acid)을 불안정 중간물질인 endoperoxide(PGG₂와 PGH₂)로 변환시키는 효소

이며 endoperoxide synthase, 또는 fatty acid cyclooxygenase로 부른다. 현재 COX는 constitutive enzyme인 COX-1과 induced enzyme인 COX-2의 두 가지 이성체효소(isozyme)가 알려져 있다³⁸⁾. COX-1은 정상 상태에서 발현하여 위장관보호, 신장기능조절과 같은 신체의 항상성 유지에 관여하는 PG합성에 작용하는 것이고, COX-2는 일반 정상조직에서는 그 발현 정도가 매우 낮으나 염증성 인자나 세포 성장인자, 발암원, 종양촉진인자 등의 작용에 의하여 빠르고 일시적으로 발현되는 효소로 알려져 있어 염증 및 암세포 성장에 주요한 역할을 담당하고 있을 것으로 여겨지고 있다³⁹⁾. 따라서 상부위장관에 대한 병변⁴⁰⁾이나 신장독성과 같은 비스테로이드성 항염제와 관련된 부작용은 주로 COX-1의 억제에 의해 발생되며 항염 효과는 COX-2의 억제에 기인하리라 생각된다.

대식세포주인 RAW 264.7 cells에 LPS를 처리하면 COX-2의 발현에 의해 PG 생합성이 증가하게 되는데, 고량강 추출물 10, 50, 100, 150 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 유의성 있는 PGE₂ 생성 억제 효과를 나타내었다. 그리고 LPS로 증가된 COX-2의 발현도 농도 의존적으로 감소되었다. 이러한 결과는 대식세포에서 LPS가 유도하는 염증반응 중 COX-2의 발현을 저해하여 PGE₂ 생성을 억제함으로써 항염 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 이러한 결과는 강⁸⁾, 노 등⁹⁾의 연구결과와 같았다.

본 실험 결과를 종합하면 고량강은 염증작용 기전에서 iNOS와 COX-2의 발현을 저해하고 이로 인해 NO와 PGE₂ 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타내는 것을 규명할 수 있었다. 하지만 NO 생성 억제 작용보다 PGE₂ 생성 억제 작용이 더 유의성 있게 나타난 결과로 미루어 볼 때 고량강의 항염 효과는 염증억제 작용기전 중에서 COX-2의 발현 억제와 이로 인한 PGE₂ 생성 억제에 보다 더 관련되어 있을 것으로 사료된다.

결 론

고량강의 항염증 작용을 확인하기 위해 GC/MS를 통해 성분을 확인하고, Carrageenan 유도 급성염증 모델에서의 소염 작용에 대한 실험과, 마우스 대식세포를 이용한 항염 작용 실험에서 획득한 결론은 고량강에 대한 GC 분석에서 5개의 peak를 관찰할 수 있었으며, MS로 확인 분석한 결과 benzenepropanal, benzalacetone 등의 성분을 확인

할 수 있었다.

Carrageenan 유도 급성염증 모델에서 고량강 추출물을 투여 하였을 때 유의성 있게 부종이 감소되었다.

고량강 추출물은 대식세포주인 RAW 264.7 cells에 LPS 처리를 하여 증가된 NO, PGE₂의 생성과 iNOS, COX-2의 발현을 유의성 있게 억제시켰다.

참고문헌

1. 陶弘景. 名醫別錄輯校本. 북경:인민위생출판사. 1986:152.
2. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2004:388-389.
3. 허준. 동의보감. 서울:남산당. 1992:310,314,337, 339,343,535,952.
4. Shin JE, Han MJ, DH Kim DH. 3-Methylethergalangin isolated from *Alpinia officinarum* inhibits pancreatic lipase. *Biol Pharm. Bull.* 2003;26(6):854-857.
5. Li BH, Tian WX. Presence of fatty acid synthase inhibitors in the rhizome of *Alpinia officinarum* hance. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2003 Aug;18(4):349-356.
6. Kim JH, Lee SE, Hwang HJ, Ha JS, Jeong HS. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Science.* 2003; 73:167-179.
7. Lee SC, Shin KS, Heo MY. Protection of ROS-induced cytotoxicity and DNA damage by the extract of *Alpinia officinarum*. *J. Fd Hyg. Safety.* 2002;17(2):106-116.
8. 강삼식, 김주선, 손건호, 김현표, 장현욱. Isolation of COX-2 inhibitors from *Alpinia officinarum*. *생약학회지.* 2000;31(1):57-62.
9. 노민수, 하준용, 이창훈, 이우영, 이수환, 이정준. Inhibitory activities of natural products on lipopolysaccharide induced prostaglandin production in mouse macrophages. *약학회지.* 1998;42(6):558-566.
10. Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, Hanaoka F, Sankawa U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem Pharm Bull.* 1992; 40(2):387-391.

11. 유태무, 이숙영, 정수연, 송상애, 류항목, 이은방, 양지선. Studies on the antiinflammatory effects of natural products. *용약물학회지*. 1998;6: 269-275.
12. Ehab E. Tuppo, Hugo R. Arias. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 37:289-305.
13. 현은아, 이해자, 윤원종, 박수영, 강희경, 김세재, 유은숙. RAW 264.7 Cell에서 세이지에 의한 염증성 Cytokine 및 iNOS 억제 효과. *약학회지*. 2004;48(2):159-164.
14. Goldman L, Claude Bennett J. *CECIL TEXTBOOK of MEDICINE*. Pennsylvania : W. B. Saunders Company. 2000:114-118.
15. 문태철, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 장현욱. 천연물로부터 사이클로옥시게나제-2 저해제 검색. *약학회지*. 1998;42(2):214-219.
16. Park SY, Lee HJ, Hyun EA, Moon JY, Yang HC, Lee NH, Kim SJ, Kang HK, Yoo ES. Inhibitory Effect of *Eurya emarginata* on the production of pro-inflammatory cytokines in Murine Macrophage RAW 264.7. *Yakhak Hoeji*. 2003;47(5):311-318.
17. Kim YK, Kang HJ, Lee KT, Choi JG, Chung SH. Anti-inflammation activity of *Actinidia polygama*. *Arch Pharm Res*. 2003;26(12): 1061-1066.
18. Han M, Wen JK, Zheng B, Zhang DQ. Acetylbritannilaton suppresses NO and PGE₂ synthesis in RAW 264.7 macrophages through the inhibition of iNOS and COX-2 gene expression. *Life Science*. 2004;75:675-684.
19. 신경민, 박영미, 김인태, 홍선표, 홍정표, 이경태. Amygdalin의 Murine Macrophage RAW 264.7 세포에서 in vitro 항염효과. *생약학회지*. 2003;34(3):223-227.
20. 洪元植 編. *경교황제내경(영추)*. 서울:동양의학연구원출판부. 1985:345-350.
21. 남상경, 예경옥. 비증의 분류 및 증상에 대한 문헌적 고찰. *The Journal of East-West Medicines*. 17(3):36.
22. 구본홍, 이경섭, 배형섭, 김영석, 이원철. *동의십계내과학*. 서울:서원당. 1993:248-253.
23. 김달호, 이종형 共編譯, 주해황제내경소문. 서울:의성당. 2001:885-887.
24. 張仲景. *金匱要略*. 서울:아울로스출판사. 1994: 131-132.
25. 朱震亨. *丹溪心法附餘*. 서울:대성문화사. 1993: 180.
26. 巢元方. *巢氏諸病源候論*. 서울:대성문화사. 1992: 11-16.
27. 葉天士. *葉天士臨證指南醫案*. 서울:정담. 1998: 599-603.
28. 李東垣. *東垣十種醫書*. 서울:대성문화사. 1983: 480-481.
29. 李梴. *醫學入門*. 서울:남산당. 1988:193-194.
30. 강윤호. *동의임상내과*. 서울:서원당. 1990:195-203.
31. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 공역. *중약대사전*. 서울:정담. 1999:244-249.
32. Chough YS, Kim ND, Kim SA. Aspirin과 Prednisolone 병용투여시의 항염증 및 해열작용에 관한 연구. *약학회지*. 1978;22(3):128-137.
33. Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004;369:294-299.
34. 고성권, 신차균, 이학성, 한성태, 양병옥, 임병옥, 정성현. Carrageenan 유발 족부종에 미치는 종대황 스틸벤 유도체의 효과. *생약학회지*. 2004; 35(2):171-174.
35. Gadek-Michalska A, Bugajski J. Role of prostaglandins and nitric oxide in the lipopolysaccharide-induced ACTH and corticosterone response. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004;55(3):663-675.
36. 노태철, 최희철, 이승용, 김영호, 노문철, 김영국, 이현선. 호장근의 쿠마린에 의한 RAW 264.7 세포주의 nitric oxide 생성 저해활성. *생약학회지*. 2001;32(3):181-188.
37. Yadav PN, Liu Z, Rafi MM. A diarylheptanoid from Lesser Galangal (*Alpinia officinarum*) inhibits proinflammatory mediators via inhibition of mitogen-activated protein kinase, p44/42, and transcription factor nuclear -kB. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;305:925-931.

38. Shanmugam N, Gaw Gonzalo IT, Natarajan R. Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes*. 2004;53(3):795-802.
39. Kwon SK. SAR of COX-2 inhibitors. *The Journal of Applied Pharmacology*. 2001;9:69-78.
40. 이상우, 김희양, 박수현, 함기백, 배종면, 정현채, 김진호. The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs in upper gastrointestinal bleeding. *대한소화기학회지*. 2004;44:13-18.