

원저

## 육계약침액이 LPS로 유도된 대식세포의 염증반응에 미치는 영향

김형석 · 노정두

세명대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

## Effects of *Cinnamomi Cortex* Pharmacopuncture on LPS-induced Inflammatory Response in Macrophage

Kim Hyeong-seok and Roh Jeong-du

Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine,  
Semyung University

**Objectives** : In recent years, many studies have been widely researching anti-inflammation effect of various medicinal plants. *Cinnamomi Cortex* was not enough in researching of the anti-inflammation. Moreover, there is no comparative study about extraction methods. Therefore, we investigated the inhibitory effects of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction on Nitric oxide(NO), Prostaglandin E2(PGE2) production, Cyclooxygenase( COX)-2, inducible NOS(iNOS) expression and extracellular signal regulate kinase(ERK)1/2 phosphorylation in lipopolysaccharide(LPS) induced RAW 264.7 macrophage cell.

**Methods** : *Cinnamomi Cortex* was extracted by EtOH and Hot water. RAW 264.7 macrophage cell viability was measured by MTT assay. Effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture on NO and PGE2 production in LPS induced macrophages was accessed by Griess assay and enzyme-linked immunospecific assay(ELISA), respectively. Inhibition effect on COX-2, iNOS expression and ERK1/2 phosphorylation was examined by Immunoblotting assay.

**Results** : 1. Cytotoxic effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by Hot water extraction in RAW 264.7 macrophages was not appeared, except 3125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . And cytotoxic effect was not appeared in EtOH extraction method.

2. *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction inhibited NO production in LPS induced macrophages significantly.

· 접수 : 2012. 1. 16. · 수정 : 2012. 1. 26. · 채택 : 2012. 1. 26.

· 교신저자 : 노정두, 충청북도 제천시 세명로 65(신월동) 세명대학교 부속제천한방병원 침구과

Tel. 043-649-1816 E-mail : wsrohmi@hanmail.net

3. *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction inhibited PGE2 production in LPS induced macrophages significantly.

4. *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction inhibited COX-2, iNOS expression in LPS induced macrophages. Especially, it has been confirmed that COX-2, iNOS expression were effectively inhibited in Hot water extraction.

5. *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction inhibited ERK1/2 phosphorylation in LPS induced macrophages. Especially, it has been confirmed that ERK1/2 phosphorylation was effectively inhibited in Hot water extraction.

**Conclusions** : According to the results, *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture suppresses NO, PGE2 production, COX-2, iNOS expression and ERK1/2 phosphorylation in LPS induced macrophages. It has a potential for treating various inflammatory diseases, and Hot water extraction method could be used more extensively than EtOH extraction method.

**Key words** : anti-inflammatory, *Cinnamomi Cortex*, COX-2, ERK1/2, iNOS, Korean medicine, NO, PGE2, pharmacopuncture

## I. 서론

염증은 물리적 손상, 자외선, 미생물 침입, 그리고 면역반응 등 다양한 자극에 의해 유발되며, 주된 증상은 통증, 발열, 발적, 종창 그리고 기능상실이다<sup>1,2</sup>. 염증반응은 염증유발이 가능한 세포에 외부 자극이 가해지면서 시작되는데, interleukin(이하 IL)-1 $\beta$ 와 tumor necrosis factor- $\alpha$ (이하 TNF- $\alpha$ ) 등의 전-염증성 사이토카인의 발현이 유도되어 이것이 호중구를 활성화시키고 염증 부위로 이동하도록 하여, inducible NOS(이하 iNOS), cyclooxygenase(이하 COX)-2를 코딩하는 유전자의 발현을 자극한다. 이런 과정을 통해 산화질소(Nitric oxide, 이하 NO), Prostaglandin E2(이하 PGE2)와 같은 물질이 생성됨으로써 염증반응이 일어나게 된다. 생체는 이와 같은 염증반응을 통하여 병원성 물질을 제거하지만, 염증반응에 이상이 생기면 정상적인 조직까지 파괴하는 등 염증성 질환을 야기한다<sup>3</sup>.

오늘날 염증 질환의 치료는 이와 같은 주요 염증 매개체들의 합성이나 작용을 방해하는 것과 관련되어 있다<sup>4</sup>. 따라서 다양한 염증물질을 효과적으로 감소시킬 수 있는 항염증제 및 치료보조제 개발에 대한

연구가 많이 이루어지고 있으며, 최근에는 한약재로부터 유래되는 생리활성물질이나 단일화합물이 주목받고 있다<sup>5</sup>.

한의학에서는 염증질환에 주로 淸熱法을 사용하였으며, 淸熱解毒藥과 淸熱涼血藥 등이 응용되었다<sup>6</sup>. 따라서 기존에는 항염증효과연구에 주로 淸熱藥 위주의 추출물연구가 진행되었으나, 최근에는 補益藥·溫裏藥·解表藥 등의 다양한 약재로 연구가 진행되고 있다<sup>7-13</sup>.

육계(*Cinnamomi Cortex*)는 녹나무과에 속한 상록 교목인 肉桂(*Cinnamomum cassia* PRESL)의 樹皮로,性は 熱하고, 味는 辛甘하다<sup>14</sup>. 溫裏藥 중의 하나로 분류되는 육계에 대해서는 항염증효과와 관련한 기존의 연구가 부족했고, 메탄올 추출 방식의 항염증효과에 대한 보고<sup>15</sup>는 있으나 추출 방식에 따른 비교 연구는 없었다.

이에 저자는 알코올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 RAW 264.7 대식세포에 각각 적용하여, 세포생존율 및 NO, PGE2의 생성, COX-2, iNOS 발현 그리고 extracellular signal regulate kinase(이하 ERK)1/2 인산화에 대한 억제 효과 등을 비교 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 약침액의 제조

실험에 사용한 肉桂(*Cinnamomi Cortex*)는 세명대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 본 실험에서는 열수 추출과 에탄올 추출의 2가지 방법으로 육계약침액을 추출하였다. 열수 추출 방식은 시료의 300g을 중량하고 3차 증류수 2 L와 혼합하여 100°C로 4시간 동안 추출 하였으며, 여과지로 여과한 추출액을 rotary evaporator를 이용하여 100ml까지 농축하고 -80°C로 동결하였다. 농축한 동결액을 freezing dryer system(Labconco, USA)을 이용하여 7일간 동결건조 하였다. 에탄올 추출 방식은 시료의 300g을 중량하고 70% 에탄올 2L와 혼합하여 70°C로 4시간 추출하였고, 그 후의 농축 및 동결건조 과정은 열수 추출 방식과 동일하게 시행하였다. 추출물은 4°C에서 냉장보관 하였고, 실험에 사용할 약침액은 추출물을 증류수에 용해시켜 준비하였다.

### 2. 세포 배양

RAW 264.7 mouse macrophage cell line은 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였다. RAW 264.7 cell은 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제(100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin ; GIBCO)가 적용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경으로 배양하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay 방법을 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 96-well plate에 1 × 10<sup>5</sup>cells/well로 분주한 다음, 16시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 세포를 안정화시켰다. 배양된 세포들은 에탄올 추출 방식과 열수 추출방식의 육계약침액을 1, 5, 25, 125, 625 및 3125 µg/ml의 각기 다른 농도로 16시간 동안 처리한 후, 이어서 MTT formazan substrate에 2시간 동안 배양시켰다. 상층액은 제거하고 100ml의 DMSO를 추가하여, 570nm에서 SPECTRA190(Molecular Devices)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4. 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 측정

세포를 well 당 1 × 10<sup>5</sup>이 되도록 96well plate에 깔고 16시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 세포를 안정화시켰다. 안정화시킨 세포에 lipopolysaccharide(이하 LPS)와 에탄올 추출 방식 및 열수 추출 방식의 육계약침액을 1, 5, 25, 125, 625, 그리고 3,125µg/ml의 농도로 처리하여 16시간동안 배양하였다. 배양상층액 100µl와 Griess 시약 100µl를 섞어 흡광도 540nm에서 측정하였다. Griess 시약은 0.1% naphthylethyleneiamine dihydrochloride 50µl와 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>에 녹인 1% sulfanilamide 50µl를 섞어 조제하였다. NO 측정량은 세포배양배지(cell culture medium)에서의 NO 발생의 indicator로써 사용되었으며, Griess reaction을 이용하여 측정하였다.

### 5. Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 측정

PGE<sub>2</sub>의 분비량을 측정하기 위하여 competitive enzyme immunoassay법을 시행하였다. 세포를 well 당 1 × 10<sup>5</sup>이 되도록 96well plate에 깔고 16시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 세포를 안정화시켰다. 안정화시킨 세포에 LPS와 에탄올 추출 방식 및 열수 추출 방식의 육계약침액을 50, 100, 150, 그리고 200µg/ml의 농도로 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 세포를 용해하기 위하여 각 well에 buffer A를 20µl씩 넣고 잘 흔든 뒤 실온에서 10분간 방치한 후, 세포가 용해된 50µl를 goat anti-mouse가 coating된 측정용 plate에 옮겼다. 항체와 conjugate 용액을 각각 50µl씩 넣고 실온에서 1시간 방치한 후, wash buffer로 4번 세척하고 발색 용액 150µl/well을 넣고 실온에서 정확히 30분간 반응시킨 뒤 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. COX-2, iNOS 발현 및 ERK1/2 인산화의 측정

RAW 264.7 대식세포는 6-well culture plate에 하룻밤동안 분주한 후에, LPS와 에탄올 추출 방식 및 열수 추출 방식의 육계약침액을 50, 100, 150, 그리고 200µg/ml의 농도로 처리하고, 다시 L-glutamine이 없는 DMEM에서 24시간 더 배양하였다. 단백분해효소 억제제가 포함된 RIPA buffer를 homogenizing하여, 세척해놓은 세포를 용해시켰다. 이렇게 준비된 총 세

포 용해물에서, SDS-PAGE를 이용하여 25 $\mu$ g의 용해성 단백질을 분리하였고 PVDF membrane으로 이동시켰다. 비특이적 항체 결합(5% BSA in TBS-T)을 차단한 후, membrane은 COX-2, iNOS, ERK1/2 또는 인산화 된 ERK1/2에 대한 항체(1:1,000 dilution; Cell Signaling Technology)가 있는 조건에서 배양하였다. TBS-T로 여러 번 세척한 후, mouse나 rabbit의 IgG(1:20,000 dilution)에 대한 horseradish peroxidase와 결합된 2차항체로 실온에서 1시간동안 membrane을 탐색하였다. 이어서 TBS-T로 세 번의 세척을 거치고, Odyssey Imager(LI-COR; Lincoln, Nebraska, USA)를 사용하여 immune-reactive band를 시각화하였다.

### 7. 통계처리

실험결과는 SPSS Window program(Ver. 10.0)을 이용하였으며, 통계학적 비교를 위해 student's *t*-test를 시행하였고, 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다. 그래프 작성은 Microsoft Office Excel 2007을 이용하였다.

## III. 결 과

### 1. 세포 생존율 평가

RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 각각 1, 5, 25, 125, 625, 그리고 3,125 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 측정하였다.

그 결과, 에탄올 추출 방식에서는 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았고 5, 25, 125 및 625 $\mu$ g/ml의 농도에서는 세포증식이 확인되었다(Fig. 1). 열수 추출 방식에서는 3,125 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포독성이 확인되었고, 나머지 농도들에서는 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig. 2).

### 2. NO 생성에 미치는 영향

LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 각각 1, 5, 25, 125, 625, 그리고 3,125 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 측정하였다.

### EtOH

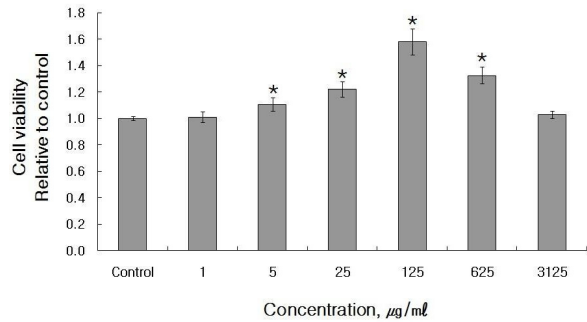


Fig. 1. The effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH extraction on cell viability of RAW 264.7 macrophage cells

Control : 0  $\mu$ g/ml *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture treated group.

Concentration : *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture treated group

(1, 5, 25, 125, 625 & 3,125  $\mu$ g/ml).

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

### Hot water

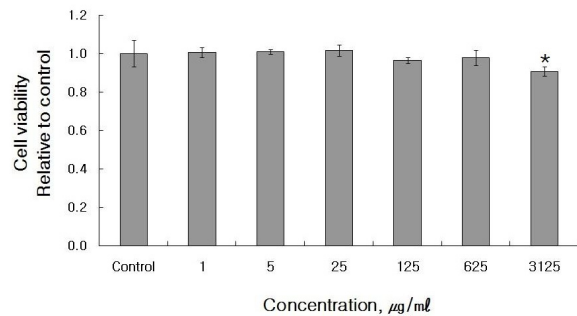


Fig. 2. The effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by Hot water extraction on cell viability of RAW 264.7 macrophage cells

Control : 0  $\mu$ g/ml *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture treated group.

Concentration : *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture treated group.

(1, 5, 25, 125, 625 & 3,125  $\mu$ g/ml).

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

그 결과 에탄올 추출 방식에서는 25, 125, 625 및 3,125 $\mu$ g/ml의 농도에서 NO 발생량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3). 열수 추출 방식에서도 역시 25, 125, 625 및 3,125 $\mu$ g/ml의 농도에서 NO 발생량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

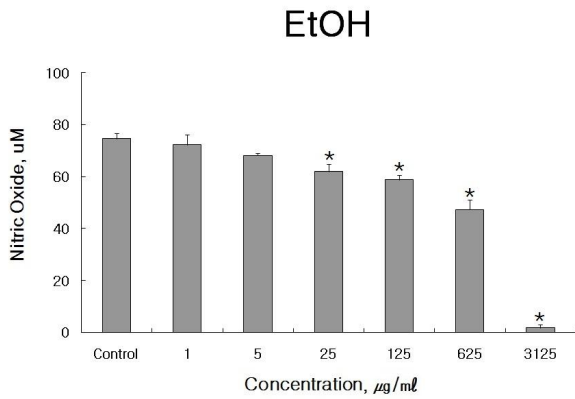


Fig. 3. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH extraction on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells

Control : LPS 1 µg/ml treated group.

Concentration : LPS 1 µg/ml + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture(1, 5, 25, 125, 625 & 3,125 µg/ml) treated group.

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

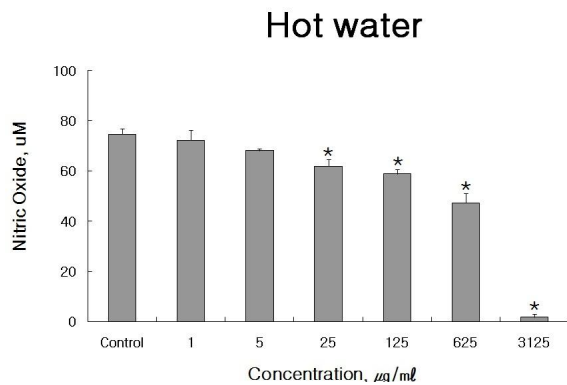


Fig. 4. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by Hot water extraction on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells

Control : LPS 1 µg/ml treated group

Concentration : LPS 1 µg/ml + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture(1, 5, 25, 125, 625 & 3,125 µg/ml) treated group

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$

### 3. PGE2 생성에 미치는 영향

LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 각각 50, 100, 150, 그리고 200µg/ml의 농도로 처리하여 측정하였다.

그 결과 에탄올 추출 방식에서는 모든 농도에서 유

의성 있는 PGE2 생성 감소가 나타났다(Fig. 5). 열수 추출 방식에서는 100, 150 및 200µg/ml 농도에서 유의성 있는 PGE2 생성 감소가 나타났다(Fig. 6).

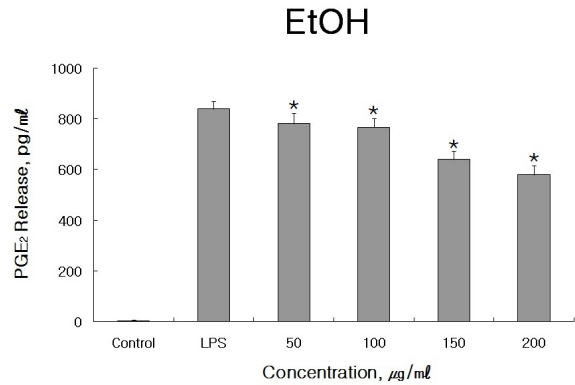


Fig. 5. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH extraction on PGE2 production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells.

PGE2 : Prostaglandin E2.

Control : LPS 0 µg/ml treated group.

LPS : LPS 1 µg/ml treated group.

Concentration : LPS 1 µg/ml + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture(50, 100, 150 & 200 µg/ml) treated group

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

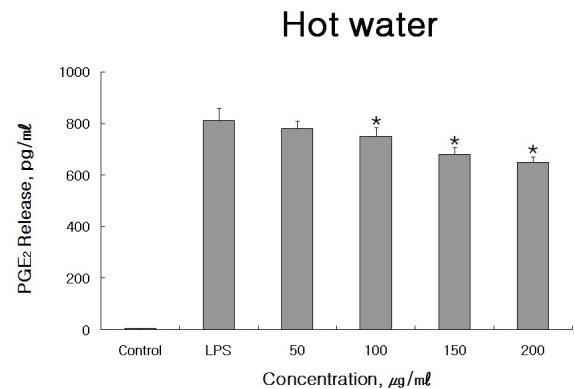


Fig. 6. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by Hot water extraction on PGE2 production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells

PGE2 : Prostaglandin E2.

Control : LPS 0 µg/ml treated group.

LPS : LPS 1 µg/ml treated group.

Concentration : LPS 1 µg/ml + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture(50, 100, 150 & 200 µg/ml) treated group.

\* : statistically significant difference from the control group, as determined by student's *t*-test as  $p < 0.05$ .

#### 4. COX-2 및 iNOS 발현에 미치는 영향

LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 각각 50, 100, 150, 그리고 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 관찰하였다.

그 결과 COX-2의 발현은 두 가지 추출 방식 모두에서 농도의존적으로 감소되었으며, 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제됨을 확인하였다. 한편 iNOS의 발현은 에탄올 추출 방식의 경우 유의한 효과가 없었으나, 열수 추출 방식에서는 농도의존적으로 감소되었다(Fig. 7).

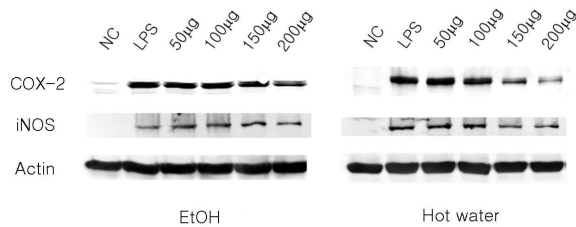


Fig. 7. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction on COX-2 and iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells

NC : Normal Control.  
 LPS : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 50 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 100 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 150 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 200 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.

#### 5. ERK1/2 인산화에 미치는 영향

LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 각각 50, 100, 150, 그리고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 관찰하였다.

ERK1/2의 인산화는 두 가지 추출 방식 모두에서 농도의존적으로 감소되었으며, 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제됨을 확인하였다(Fig. 8).

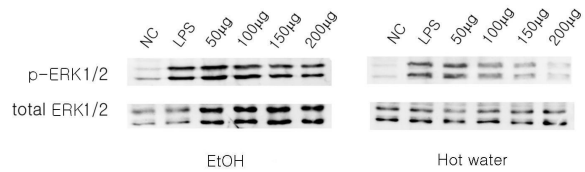


Fig. 8. Inhibitory effect of *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture by EtOH and Hot water extraction on ERK1/2 phosphorylation in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells

NC : Normal Control.  
 LPS : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 50 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 100 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 150 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.  
 200 $\mu\text{g}$  : LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + *Cinnamomi Cortex* pharmacopuncture 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  treated group.

### IV. 고찰

염증은 복잡한 네트워크에서 다양한 요소들의 작용이 연관된 일련의 과정이다<sup>16)</sup>. 그람음성세균의 세포 외막 성분인 LPS는, 대식세포에서 각종 전염증성 분자들을 분비하도록 세포를 자극하며, 이들 분자들은 면역세포를 활성화시켜 NO, PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6, IL-10과 같은 염증매개물질들이 생성되게 한다<sup>17,18)</sup>. 이렇게 생성된 염증매개물질들이 제어되지 않고 과잉 상태가 지속되면, 주변 정상조직의 손상 및 다양한 종류의 염증질환으로 발전할 수 있다<sup>19)</sup>.

NO는 free radical로서 심혈관계·신경계 및 면역계의 전달물질이며, 세포 내 항상성의 유지, 신경전달물질의 운반, 항암 작용 등 다양한 역할을 한다<sup>20)</sup>. 그러나 다량으로 생성된 NO는 조직을 손상시키는 염증매개물질로 작용하며, NO합성효소인 iNOS의 과잉 발현은 만성 관절염, 심근염, 사구체염, 인슐린 의존성 당뇨병, 과민성 대장염 등을 초래할 수 있다<sup>21)</sup>. 따라서 최근에는 다양한 염증질환의 치료방법으로서, 효과적인 NO생성 억제제 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>11)</sup>.

PGE2는 COX-2의 작용으로 합성되며, 대식세포에 의해 활성화되는 염증 매개물질로서, 염증을 촉진하여 발적, 부종, 뻣뻣함, 통증을 일으킨다<sup>22,23)</sup>. COX-1은 대부분의 정상 조직에서 관리역할을 하는데 비해, COX-2는 매개물질에 의해 유도되어 통증, 염증, 발열

작용 등에 관여한다<sup>24)</sup>. 따라서 COX-2를 선택적으로 억제하는 약물들은 염증반응은 줄이면서 COX-1 억제에 의한 부작용을 예방할 수 있다는 측면에서 많은 연구가 진행되고 있다<sup>25)</sup>.

ERK1/2는 mitogen-activated protein kinase(이하 MAPKs)의 대표적인 일원으로서, MAPKs는 그 밖에 c-Jun NH2-terminal kinase(이하 JNK), p38 MAPK(이하 p38) 등으로 구성된다. MAPK pathways는 세포가 외부의 환경 변화에 따른 자극들을 인지하고 그 정보들을 세포 내부로 전달하여 유전자 발현을 조절하는 과정에 관여하는 대표적인 신호 전달계로서, 이 경로의 중심은 단백질-세린/트레오닌 인산화 효소이며, 전사인자의 활성도는 단백질 인산화 과정을 통하여 조절된다<sup>26,27)</sup>. 이들의 신호전달과정은 염증반응을 유도하는 염증매개물질들의 합성을 유도한다는 점에서 염증관련 질병의 발병기전에 중요한 역할을 하는데, ERK1/2, JNK, p38과 같은 MAPKs는 LPS 유도로 인한 iNOS와 COX-2 유전자 발현에 있어, 관련 전사 요소 활성화를 통한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>28,29)</sup>.

근래 서양의학에서는 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)를 급·만성 염증 질환에 널리 쓰고 있으나, 장기간 사용은 주된 부작용인 위장질환을 유발하기 때문에 최근에는 한약재를 포함한 다양한 식물로부터 낮은 독성과 높은 항염증작용이 있는 새로운 생물학적 요소를 찾기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>30)</sup>.

실험에 사용한 약재인 육계는, 녹나무과에 속한 상록교목인 肉桂(*Cinnamomum cassia* PRESL)의 樹皮로서, 性은 熱하고, 味는 辛甘하다<sup>14)</sup>. 육계에 대한 연구로는 최<sup>31)</sup>의 고콜레스테롤 혈증에 미치는 영향, 정<sup>32)</sup>의 혈당강화에 미치는 영향, 고<sup>33)</sup>의 신생혈관 형성 촉진 작용, 백<sup>34)</sup>의 기형암종세포주에 미치는 항암효과, 이<sup>35)</sup>의 대장암 세포주의 성장 및 COX-2 기전에 미치는 영향 등이 보고되어 있다. 같은 기원식물의 어린 가지를 사용하는 계지의 항염증효과에 관해서는 기존의 여러 연구들<sup>336-40)</sup>을 통하여 밝혀진 바 있으나, 육계에 대한 항염증효과 연구는 미흡했다. 또한 육계약침액의 추출 방식에 따른 효과의 비교연구는 기존에 없었기에, 저자는 열수 추출법과 에탄올 추출법을 모두 시행하여 육계의 항염증효과를 비교 연구하고자 실험을 진행하였다.

먼저 육계약침액의 RAW 264.7 대식세포에 대한 세포생존율을 평가하기 위하여 에탄올 추출 방식과

열수 추출 방식의 육계약침액을 처리한 결과, 에탄올 추출 방식에서는 세포독성이 발견되지 않았으며 5, 25, 125 그리고 625 $\mu$ g/ml의 농도에서 세포가 증식하는 모습을 보였다. 열수 추출 방식에서는 3,125 $\mu$ g/ml의 농도일 때 세포독성이 확인되었다.

육계약침액이 LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 NO생성 억제에 미치는 영향을 평가한 결과, 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식 모두에서 25, 125, 625, 그리고 3,125 $\mu$ g/ml의 농도일 때 NO 발생이 유의성 있게 감소하였다. 이는 에탄올 추출 방식의 육계약침액은 세포증식효과와는 별개의 유의적인 NO 생성 억제 효능이 존재함을 의미한다. 열수 추출 방식의 경우에도 비슷한 NO 억제 효과를 보이나, 세포생존율을 고려할 때 에탄올 추출 방식이 좀 더 안정적으로 이용 가능할 것으로 사료된다.

육계약침액이 PGE2 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 처리하여 관찰한 결과, 에탄올 추출 방식에서는 모든 농도에서 PGE2 발생이 감소하였고, 열수 추출 방식에서는 100, 150, 그리고 200 $\mu$ g/ml 농도에서 PGE2 발생이 감소하였다. 이는 PGE2 억제에 있어서는 육계 에탄올 추출 방식의 적용이 열수 추출 방식보다 조금 더 효과적임을 보여주고 있다.

육계약침액의 COX-2와 iNOS에 대한 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 적용하여 관찰한 결과 COX-2의 발현은 농도의존적으로 감소되었고, 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제되었다. iNOS의 발현은 에탄올 추출 방식에서는 유의한 효과가 없었지만, 열수 추출 방식에서는 농도의존적으로 감소되었다.

한편 육계약침액의 ERK1/2 인산화에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식의 육계약침액을 LPS 유도된 RAW 264.7 대식세포에 적용한 결과, ERK1/2 인산화는 농도의존적으로 감소되었으며 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제되었다. 이는 열수 추출한 육계약침액의 경우, ERK1/2 인산화 억제 효과가 COX-2, iNOS의 발현 감소에 영향을 미쳤을 가능성을 시사한다.

본 실험 결과를 종합적으로 분석해보면, 육계약침액은 에탄올 추출 방식과 열수 추출 방식 모두에서 항염증효과가 있다고 볼 수 있다. 다만 NO, PGE2의 생성 억제 효과에 있어서는 두 추출 방식이 거의 비

숫하거나 에탄올 추출 방식의 적용이 조금 유리했고, COX-2, iNOS 발현과 ERK1/2 인산화 억제에 있어서는 열수 추출 방식이 에탄올 추출 방식보다 뛰어난 효과를 나타내었다.

본 실험에서는 육계약침액의 에탄올 추출 방식보다 열수 추출 방식에서 좀 더 폭넓은 항염증효과가 나타났으나, 향후 여러 염증상황에 적절한 추출 방식 및 농도 선택에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포의 염증반응에, 추출 방식에 따른 육계약침액이 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성은 에탄올 추출 방식의 경우 실험한 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며, 열수 추출 방식의 경우 3,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 제외하고는 독성이 나타나지 않았다.
2. NO 생성은 열수 추출 방식과 에탄올 추출 방식 모두 25, 125, 625 및 3,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게 감소하였다.
3. PGE2 생성은 에탄올 추출 방식의 경우 실험한 모든 농도에서, 열수 추출 방식의 경우 100, 150 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의성 있게 감소하였다.
4. COX-2 발현은 두 가지 추출 방식 모두에서 농도의존적으로 감소하였고, 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제되었다.
5. iNOS 발현은 에탄올 추출 방식일 때 유의한 감소가 없었으나, 열수 추출 방식에서는 농도의존적으로 감소하였다.
6. ERK1/2 인산화는 두 가지 추출 방식 모두에서 농도의존적으로 감소하였고, 특히 열수 추출 방식에서 효과적으로 억제되었다.

## VI. 참고문헌

1. Muthiah Maridass. Anti-inflammatory Activity of the Methanolic Extract of Cinnamomum

sulphuratum Barks. Ethnobotanical Leaflets. 2008 ; 12 : 494-8.

2. 이만형. 면역학. 서울 : 신일북스. 2008 : 50.
3. 박희준, 이지숙, 이재동, 김남재, 표지희, 강전모, 최일환, 김수영, 심범상, 이재현, 임사비나. 계지의 항염 효과에 관한 연구. 대한한의학회지 2005 ; 26(2) : 140-51.
4. Tung YT, Chua MT, Wang SY, Chang ST. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (cinnamomum osmophloeum) twigs. Bioresour Technol. 2008 ; 99 : 3908-13.
5. 민지영, 박용기. 續斷의 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증반응에 대한 효과. 대한본초학회지. 2009 ; 24(4) : 189-95.
6. 곡정강, 정승기, 정희재, 김진주. 連翹의 LPS로 유도된 Raw 264.7 Cell에서의 抗炎症 효과. 대한한방내과학회지. 2010 ; 31(2) : 242-53.
7. Lee JH, Ko WS, Kim YH, Kang HS, Kim HD, Choi BT. Anti-inflammatory effect of the aqueous extract from lonicera japonica flower is related to inhibition of NF-kappaB activation through reducing I-kappaBalpha degradation in rat liver. Int J Mol Med. 2001 ; 7 : 79-83.
8. 이동연, 이재령, 김영우, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 金銀花 및 金銀花全草가 Raw 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005 ; 19(2) : 481-9.
9. 정광진. 金銀花가 喘息유발 cytokine 분비와 호산구 chemotaxis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2005 ; 26(1) : 129-42.
10. 주예진, 정혜미, 서운교. 三七花의 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide와 전염증성 사이토카인의 생성 억제효과. 대한한의학회지. 2009 ; 30(1) : 150-62.
11. 정효원, 박용기. 황련의 쥐 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 TNF- $\alpha$ 의 생성억제효과. 대한본초학회지. 2006 ; 21(2) : 165-73.
12. 최영광, 박성호, 서일복, 김호현, 김정선, 김이화. 黃芩藥液이 LPS로 誘導된 RAW 264.7 大食細胞에서의 抗炎症效果. 대한약침학회지. 2003 ; 6(3) : 5-14.
13. 최유진, 노정두. 당귀약침액이 대식세포에서 산화



- 질소(NO) 및 프로스타글란딘(Prostaglandin) 생성에 미치는 영향. 대한약침학회지. 2011 ; 14(3) : 81-90.
14. 전국한외과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울. 영림사. 2005 : 380-1.
  15. Kubo M, Ma S, Wu J, Matsuda H. Anti-inflammatory activities of 70% methanolic extract from cinnamomi cortex. Biol Pharm Bull. 1996 ; 19 : 1041-5.
  16. Joshi K, Awte S, Bhatnagar P, Walunj S, Gupta R, Joshi S, Sabharwal S, Bani S, Padalkar AS. Cinnamomum zeylanicum extract inhibits proinflammatory cytokine TNF $\mu$ : in vitro and in vivo studies. Research In Pharmaceutical Biotechnology. 2010 ; 2(2) : 14-21.
  17. 박성준, 송호준. LPS로 활성화된 복강 대식세포에서 백두옹 추출물의 항염증 효과. 대한본초학회지. 2007 ; 22(1) : 111-7.
  18. 배기상, 박희재, 김도운, 서상완, 박경배, 김병진, 송제문, 이경용, 나철, 신병철, 박성주, 송호준, 황성연. 광향 추출물의 염증성세포활성물질 억제효과. 대한본초학회지. 2008 ; 23(3) : 119-25.
  19. 이지영, 김영진, 박완수. 白蔘이 포함된 理中湯약침액의 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 nitric oxide 및 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2011 ; 28(1) : 61-9.
  20. Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell. 1992 ; 70 : 705-7.
  21. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. Cell. 1994 ; 78 : 915-8.
  22. Rocca B, FitzGerald GA. Cyclooxygenases and prostaglandins: Shaping up the immune response. Int Immunopharmacol. 2002 ; 2 : 603-30.
  23. HO SC, TSAI PJ. Comparison of the Effects of Hot and Cold Chinese Medicinal Plants on the Production of Inflammatory Mediators by RAW 264.7 Cells. Journal of Food and Drug Analysis. 2004 ; 12(2) : 120-7.
  24. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol. 1983 ; 3 : 295-315.
  25. Turini ME, DuBois RN. cyclooxygenase-2: A Therapeutic Target. Annu Rev Med. 2002 ; 53 : 35-57.
  26. 이준혁, 정경태, 이용태, 최영현, 최병태. 마늘추출물이 운동부하 흰쥐의 심장내 MAPK signaling 활성화에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2008 ; 22(5) : 1299-303.
  27. 이자영, 김동철. 오수유 투여가 자성생쥐의 생식능력과 caspase-3, MAPK 및 MPG유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009 ; 22(2) : 60-78.
  28. 서운교, 이주일, 박준홍, 박용기. 북강활 에틸아세테이트분획의 비만세포에서의 염증반응 억제효과. 대한본초학회지. 2008 ; 23(4) : 81-9.
  29. Bak MJ, Jeong JH, Kang HS, Jin KS, Ok S, Jeong WS. Cedrela sinensis Leaves Suppress Oxidative Stress and Expressions of iNOS and COX-2 via MAPK Signaling Pathways in RAW 264.7 Cells. J Food Sci Nutr. 2009 ; 14(4) : 269-76.
  30. Lee GI, Ha JY, Min KR, Nakagawa H, Tsurufuji S, Chang IM, Kim Y. Inhibitory effects of oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. Planta Med. 1995 ; 61 : 26-30.
  31. 최유진, 김형우, 정희진, 정영민, 신동선, 조수인. 肉桂가 Estradiol valerate에 의하여 유발된 고콜레스테롤 혈증에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2011 ; 25(2) : 264-9.
  32. 정한성, 송범용, 이창현, 육태한. 육계·부자의 약침과 경구투여가 2형 당뇨 모델 생쥐의 혈당강화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2010 ; 27(5) : 1-12.
  33. Ko JM, Lee SH, Baek YH, Choi DY. Stimulatory Effect of Cinnamomum cassia Extract on Angiogenesis Through Regulation of VEGF. 대한침구학회지. 2009 ; 26(1) : 153-62.
  34. 白銀景, 金大根, 李鎭宇, 金元信, 田炳薰, 禹元洪, 鄭遇悅. 肉桂로부터 抽出된 Cinnamaldehyde가 F9 畸形癌腫細胞柱에 미치는 抗癌效果. 동의병리학회지. 1999 ; 13(2) : 99-107.
  35. 이승연, 김희석, 김정옥, 황성완, 황성연. 육계 에탄올 추출물이 HT-29 대장암 세포주의 성장 및 COX-2 기전에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지. 2006 ; 35(9) : 1115-20.
  36. 김성준, 박성민, 강희, 심범상, 김성훈, 최승훈, 안규석. 桂枝의 collagen 유발 관절염에 대한 소염

- 효과 : DBA/1J mouse에서의 병태 관찰 및 RAW 264.7에서의 cytokine 분비측정. 동의생리병리학회지. 2008 ; 22(3) : 542-7.
37. 安炯俊, 都垣錫, 張俊赫, 金甲成. 桂枝藥鍼刺戟이 白鼠의 LPS誘發 關節炎中 免疫組織化學的 變化에 미치는 影響 : Macrophage, NK-cell, ICAM을 중심으로. 한의정보학회지. 1998 ; 4(1) : 35-48.
38. 최유행, 김갑성, 이승덕. 桂枝藥鍼刺戟이 mouse의 LPS誘發 關節炎 中 細胞性免疫反應에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 100-12.
39. 도원석, 김경호, 김갑성. 榆白皮, 桂枝, 牛膝, 蜂毒 및 牛黃·熊膽·麝香복합제제 藥鍼이 mouse의 LPS誘發 關節炎의 血液學的 變化에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 157-69.
40. 도원석, 김갑성. LPS로 誘發된 류마티스 關節炎에 榆白皮, 桂枝, 牛膝, O.K. 및 蜂毒 藥鍼刺戟이 미치는 影響. 한의정보학회지. 1998 ; 4(1) : 81-93.