

감태나무 에틸아세테이트 분획의 항염증 및 진통 효과

김종수¹ · 강보혜¹ · 박승주¹ · 양우인¹ · 김명수¹ · 이병수¹ · 차동석¹ · 이세연¹ · 권진² · 전훈^{1*}

¹우석대학교 약학대학, ²한국복지대학 의료보장구과

Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Ethyl Acetate Fraction of *Lindera glauca*

Jong Soo Kim¹, Bo Hye Kang¹, Seung Ju Park¹, Woo In Yang¹, Myung Soo Kim¹, Byung Soo Lee¹, Dong Seok Cha¹, Se Youn Lee¹, Jin Kwon², and Hoon Jeon^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonbuk 55338, Korea

²Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Welfare, Pyongtaek, Korea

Abstract – The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory and anti-nociceptive potential of the ethyl acetate fraction of *Lindera glauca* (ELG). We found that ELG significantly suppressed NO production through decreased enzyme activity and expression of iNOS in the IFN- γ /LPS-activated murine peritoneal macrophages. The treatment of ELG also down-regulated the expression of COX-2. Our western blot data revealed that inhibitory effects of ELG on these pro-inflammatory mediators were attributed to inactivation of NF- κ B. In addition, ELG-fed mice showed a marked decrease in paw edema induced by subplantar injection of trypsin, suggesting *in vivo* anti-inflammatory potential of ELG. We further investigated the anti-nociceptive properties of ELG using thermal and chemical nociception model. We found that ELG has a strong anti-nociceptive activities in both central and peripheral mechanism. An additional combination test with naloxone revealed that opioid receptor was not involved in the ELG-mediated anti-nociception. In conclusion, ELG may possibly be used as valuable anti-inflammatory and anti-nociceptive agent for the treatment of inflammatory diseases and pains.

Keywords – *Lindera glauca*, Anti-inflammatory, Anti-nociceptive

염증은 신체의 손상에 대한 생리적 반응으로, 감염, 물리적 혹은 화학적 외상 등 다양한 요인에 의해 유발된다.^{1,2)} 염증에 반응하여 활성화된 대식세포는 세포 내 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)의 신호 전달을 유도하여 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 cyclooxygenase-2(COX-2)를 발현시켜 nitric oxide(NO), prostaglandins(PGs), 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 등과 같은 염증 촉진성 매개 물질들을 생성한다.^{3,4)} 염증 매개 물질 중 NO는 다양한 기관계에 여러 영향을 주는 자유 라디칼로서, cGMP 매개 혈관확장, 신경 정보 교환 및 숙주 방어 등의 생리 활성을 가진다.⁵⁾ NO를 생성하는 세 가지 NO synthase(NOS) isoforms 중에서 iNOS는 염증성 사이토카인 혹은 박테리아의 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도되며 다량의 NO 생성을 촉매하여 염증을 일으켜 인접 세포를 손상한다.⁵⁾ 또 다른

염증 매개 물질인 PGE₂는 cyclooxygenase에 의해 촉매되며, 이전의 연구에서 COX-2에 의한 PGE₂의 이상 유도가 염증의 병리 형성과 관련 있음이 밝혀져 있다.^{6,7)} 따라서 iNOS의 감소를 통한 NO 생성과 COX-2 매개 PGE₂의 억제는 염증성 손상을 줄이는 주요 표적이 되며, iNOS와 COX-2를 발현시키는 전사인자 NF- κ B 또한 염증 반응 조절에 핵심적인 역할을 한다.^{8,9)} 실제로 NSAIDs로 알려진 수많은 COX 억제제는 염증성 질환의 치료에 널리 이용되고 있다.

통증의 감각은 일반적으로 말초 통증수용체(peripheral nociceptor)에서 비롯된다. 이 뉴런들은 유해한 자극을 말초에서 중추신경계로 전달하게 되는데, 뇌의 피질 변연에서 자극이 통합되며 이 과정은 유기체의 생존에 필수적이다.¹⁰⁾ 그러나 지속하는 만성 통증은 신체적 정서적 기능에 악영향을 끼쳐 삶의 질을 떨어뜨린다. 강력한 진통제인 opioid는 여러 만성적 혹은 극심한 통증에 쓰일 수 있으나, 높은 중독성과 호흡억제, 메스꺼움, 진정, euphoria나 dysphoria, 변비 그리고 소양감 등의 부작용이 있어 이용이 매우 제한되

*교신저자(E-mail): jeonh@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1577

어 있다. 이에 따라 높은 효과와 함께 부작용이 적은 진통제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 그 중에서도 천연물에서 유래한 식물 추출물이 그 대상으로 많은 관심을 받고 있다.¹¹⁻¹³⁾

녹나무과(Lauraceae)에 속하는 감태나무(*Lindera glauca*)는 우리나라, 중국, 일본 등지에 분포하는 낙엽관목으로 열매, 잎, 가지, 뿌리 등을 모두 약용으로 사용하며 전통적으로 뇌졸중, 암, 마비, 탈장, 심장 및 복부 통증 등의 치료에 활용되어왔다. 또한 감태나무의 뿌리는 전통적으로 류마티스 관절염으로 인한 유출, 타박상 및 통증에 대한 치료제로 의약품으로 사용하고 있다.^{14,15)} 현재까지 감태나무의 약리활성은 항균,¹⁶⁾ 항암,¹⁷⁾ 항산화 효과,¹⁸⁾ α -glucosidase와 LDL oxidation 저해작용^{19,20)}이 보고되어 있으며, 성분으로는 alkaloid, diarylpropanoids, sesquiterpenoid, flavonoid, phenolic compound와 steroid 등을 함유한다고 알려져 있다.²¹⁻²³⁾ 전통적으로 감태나무가 심장 및 복부 통증의 개선에 사용됨에도 불구하고 이에 대한 약리 활성 연구는 매우 미비한 실정이며, 이에 본 연구에서는 감태나무 ethyl acetate 분획의 항염증 및 진통 효과에 미치는 약리작용을 다양한 통증 모델을 통하여 확인하였다.

본 연구에서는 IFN- γ 및 LPS로 유도된 마우스 복강 대식세포(murine peritoneal macrophage)를 이용한 *in vitro* 실험과 trypsin으로 유도된 paw edema *in vivo* 실험을 통해 감태나무 추출물(ethyl acetate fraction of *L. glauca*, ELG)의 항염증 활성을 확인하였다. 또한, 다양한 통증 모델을 통해 중추성 통증 및 말초성 통증에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

재료 - 실험에 사용된 감태나무(*L. glauca*)는 2012년 7월 강원 원주 소재의 강원약초에서 구매하였다. 약재는 건조하여 우석대학교 약학대학 한약학과에 보관되었다(WH085). 건조된 줄기 및 가지 2.4 kg은 15,000 mL의 MeOH을 용매로 초음파 추출기를 이용해 50°C에서 추출되었다. 그 뒤 methanol 추출물은 회전식 농축기를 이용하여 98.7g(수율 : 4.113%)으로 농축되었으며 후속적인 용매 분할을 통해 *n*-hexane(20.8 g), CH₂Cl₂(5.1 g), EtOAc(7.4 g) 그리고 *n*-BuOH(18.5 g)의 분획을 생성하였다. 각 분획은 건조된 후 -20°C에서 보관되었다. 본 연구에서는 EtOAc 분획을 활성평가에 사용하였다.

실험동물 - 복강 대식세포의 추출과 항염증 및 진통실험을 위해서 각각 C57BL/6와 ICR 마우스(6주령, 수컷, 18-22 g)를 대전 소재의 다물 사이언스(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 실험동물은 일정 온도(22 ± 1°C), 12시간 명암 주기로 사육되었으며 일정한 양의 사료와 식수를 주기적으로 공급하였다. 복강 대식세포 채취를 위해 채취 3일 전에 C57BL/6

마우스에 2.5 mL의 thioglycollate(TG) 용액을 투여하였다. 분리한 세포는 10% FBS와 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 DMEM 배지에 배양하였으며, 5% CO₂, 37°C 조건을 유지하였다. 3시간 뒤 세포를 PBS로 세척한 후, 추출물 투여 전 10% FBS를 함유한 DMEM으로 안정화시켰다. 본 연구에서 수행된 진통 실험은 International Association for the study of pain에서 규정하는 동물실험 윤리(승인번호 WS2017-2)를 준수하였다.²⁴⁾ 실험동물은 8마리에서 12마리가 무작위로 선택되어 구획되었다. 각각의 실험에서 ELG는 증류수를 용매로 하여 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다. 양성대조군으로 사용된 약물 중 tramadol(15 mg/kg)은 복강 주사하였고, indomethacin(5 mg/kg)은 경구투여 하였다.

세포 독성 실험 - 복막 대식세포(3 × 10⁵ cells/well)에 ELG를 과량 투여할 때 유의적인 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 본 실험 농도에서(ELG 0~500 µg/mL) 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1A).

Nitrate 생성 실험 - 복막 대식세포(3 × 10⁵ cells/well)는 다양한 농도의 ELG를 투여하여 배양되었다. 세포에 rIFN- γ (20 U/mL)를 가하여 자극을 주었으며, 6시간 뒤 세포는 LPS(10 µg/mL)로 처리되었다. NO 합성은 microplate assay로 측정되었다. Nitrate 측정을 위해 배양액 100 µl에 동일한 용량의 Griess 시약과 혼합하여 실온에서 10분간 암반응시킨 후, micoplate reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 양은 sodium nitrite 기준으로 계산하였다. L-NAME은 참조 약물로 사용하였다.

iNOS 효소 활성 실험 - Israf 실험법²⁵⁾을 참고하여 수행하였다. 세포는 12시간 동안 IFN- γ (20 U/mL)와 LPS(10 µg/mL)로 iNOS를 생성하도록 유도되었다. 배지를 교체한 후, 다양한 농도의 ELG로 처리되어 12시간 동안 배양되었다. 이후 상등액을 제거하고 Griess 시약을 사용하여 nitrite를 측정하였다.

Nuclear extracts 준비 - 핵 추출물은 이전 연구²⁶⁾에서와 같이 Lysis buffer(10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 세포가 부풀어 오르게 하였다. 조핵을 함유한 펠릿을 extraction buffer(20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 첨가하여 얼음 위에서 30분간 배양하였다. 샘플을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 핵 추출물이 함유된 상등액을 얻었다. 추출물은 사용하기 전까지 -70°C에서 보관되었다.

Western blot 분석 - 세포 lysate는 복막 대식세포를 sample buffer(62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate(SDS), 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)를 첨가한 뒤 끓여 준비하였다. 세포 lysate의 단백질은 10% SDS-

polyacrylamide 겔 전기영동에 의해 분리되고 nitrocellulose membrane에 transfer되었다. 막은 상온에서 3시간 동안 0.2% tween20을 첨가한 5% BSA 용액으로 blocking 특정 항체로 배양하였다. 0.05% tween20을 함유한 인산염 완충식염수 (PBS)로 세척한 후 2차 항체로 배양하고 표적 단백질을 enhanced chemiluminescence detection system(Milipore Corporation, MI, USA)으로 시각화하였다. 밴드의 intensity는 ImageQuantTL(GE Healthcare, Sweden) 프로그램을 이용하여 측정되었다.

Trypsin-induced paw edema – 실험동물의 오른쪽 후족 부에 30 μ L의 intraplantar(i.p.) 주사로 트립신(30 μ g/paw, 식염수로 제조)을 주입하여 부종을 유발하였다. 왼쪽 발에는 30 μ L의 식염수가 주입되어 대조군으로 사용되었다. 부종은 평압계(LE7500, Panlab, Spain)로 측정되었으며, 트립신 투여 1시간 후에 오른발과 왼발의 차이로 표현되었다.

급성 독성 실험 – 실험동물에 ELG를 과량 투여할 때 유의적인 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 급성 독성 실험을 수행하였다. 실험동물을 음성대조군과 실험군으로 나누고 후 실험군에는 과량의 ELG를 투여하였으며, 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다.²⁷⁾ 그 후 24시간 동안 실험동물의 변화와 생존도를 측정하였다.

Tail-immersion test – 본 연구에서 tail-immersion test는 Wang 등의 방법을 약간 수정하여 수행하였다.²⁸⁾ ICR mouse의 꼬리 절반을 $50 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 의 온도가 유지되는 water bath안에 담근 후 꼬리를 다시 들어올리는 시간을 측정하였다. 측정시간은 ELG(250, 500 mg/kg; p.o.)와 tramadol(15 mg/kg; i.p.) 투여 후 0, 30, 60, 90, 120분이 지난 뒤에 시행되었다. 또한, 조직 손상을 피하기 위해 측정시간은 20초를 최대로 하였다.

$$\text{Analgesic activity (\%)} = \frac{T_b - T_a}{T_a} \times 100$$

T_a : 음성대조군의 지연 시간

T_b : 약물투여군의 지연 시간

Hot-plate test – Hot-plate test는 ICR mouse를 각 군으로 구획한 후, hot-plate를 $55 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지시킨 상태에서 실험동물을 그 위에 올려놓은 뒤 통증 반응(앞발 핏기, 뒤로 가기, 제자리 뛰기)을 보일 때까지의 시간을 측정하였다.²⁹⁾ 시간 측정은 ELG(250, 500 mg/kg; p.o.)와 tramadol(15 mg/kg; i.p.)을 투여 후 0, 30, 60, 90, 120분이 지난 뒤에 시행되었다. 또한, 조직 손상을 피하기 위해 측정시간은 30초를 최대로 하였다.

$$\text{Analgesic activity (\%)} = \frac{T_b - T_a}{T_a} \times 100$$

T_a : 초기 반응 시간

T_b : 실험군 반응 시간

Acetic acid-induced writhing test – ICR mouse의 복강에 생리식염수를 용매로 희석한 acetic acid(0.9%)를 주사한 후 나타나는 writhing motion의 횟수를 투여 후 5분 뒤부터 20분간 측정하였다.³⁰⁾ ELG(250, 500 mg/kg)와 양성대조군으로 사용된 indomethacin (10 mg/kg)은 증류수를 용매로 하여 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다. 또한 양성대조군 및 ELG는 모두 acetic acid를 복강 주사하기 60분 전에 투여되었다.

$$\text{Analgesic activity (\%)} = \frac{N_b - N_a}{N_a} \times 100$$

N_a : 음성대조군 반응 횟수

N_b : 실험군 반응 횟수

Formalin test – Formalin test는 Santos 등의 실험 방법에서 약간의 수정을 가한 후 수행되었다.³¹⁾ 생리식염수를 용매로 한 formalin(0.9%, 30 μ L)을 mouse의 족부에 투여하였을 때 실험동물은 주사부위를 핏는 행동을 보인다. 이러한 통증 반응을 formalin 주사 직후 5분간(first phase, 신경성) 또한 주사 후 25–40분 간(second phase, 염증성) 총 2회 측정하였다. ELG(250, 500 mg/kg)는 증류수를 용매로 하여 formalin 투여 60분 전에 구강을 통해 투여되었고 음성대조군에서는 같은 양의 증류수를 투여하였다. 양성대조군으로 사용된 약물 중 tramadol(15 mg/kg)은 formalin 투여 30분 전에 복강 주사 하였고, indomethacin(5 mg/kg)은 formalin 투여 60분 전 경구투여 하였다. 또한 opioid 수용체와의 연관성을 알아보기 위해 전 처리한 naloxone(5 mg/kg; i.p.)은 각각의 약물 처리 15분 전에 복강주사로 투여되었다.

$$\text{Analgesic activity (\%)} = \frac{T_b - T_a}{T_a} \times 100$$

T_a : 초기 반응 시간

T_b : 실험군 반응 시간

통계 분석 – 통계 자료의 값은 평균값 \pm 표준오차(mean \pm S.E.M.)으로 표시하였다. 유의성 검증은 one-way ANOVA 분석 방법으로 결정하였으며, 사후 검정으로 Duncan test를 실시하였다.

결과 및 고찰

NO는 신경전달, 혈관확장 및 숙주방어와 같은 다양한 생리학적 기능에 대한 중요한 염증 매개체이자 조절 분자이

다.³²⁾ 그러나, NO의 과잉생성은 패혈증, 건선, 관절염, 다발성 경화증 및 전신 루푸스 홍반증 등의 염증 질환과 밀접한 관련이 있다.^{33,34)} 이에 본 연구에서는 마우스 복강 대식세포에서 IFN- γ 와 LPS로 유도된 NO 생성 실험을 통해 ELG의 항염 활성을 평가하였다. 실험 결과 ELG는 농도 의존적으로 IFN- γ 와 LPS에 의해 유도된 과량의 NO 생성을 효과적으로 억제하였으며, 모든 투여농도에서 뚜렷한 세포독성을 나타내지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A and 1B). ELG의 NO 억제 효과가 iNOS 효소 활성의 변화와 관련이 있는지 알아보기 위해서 iNOS를 유도한 후 ELG를 처리하여 NO 생성의 변화를 확인하였다. 실험 결과, 최고농도의 ELG 처리군(250

$\mu\text{g/mL}$)은 대조군에 비해 NO를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 1C). 이러한 결과는 ELG가 iNOS 효소에 결합함으로써 활성을 억제하거나 NO 라디칼을 직접 소거함으로써 iNOS의 활성을 억제할 수 있음을 의미한다. Western blot을 통해서 ELG가 iNOS의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 IFN- γ /LPS 자극에 의해 증가된 iNOS 발현이 ELG에 의해 유의적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1D). 이는 iNOS 단백질 발현의 감소 또한 ELG의 NO 억제 활성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 한편, 염증 조절에 중요한 또 다른 매개 물질인 COX-2는 arachidonic acid의 PGE₂로의 전환을 촉매하는 것으로 알려져 있으며,

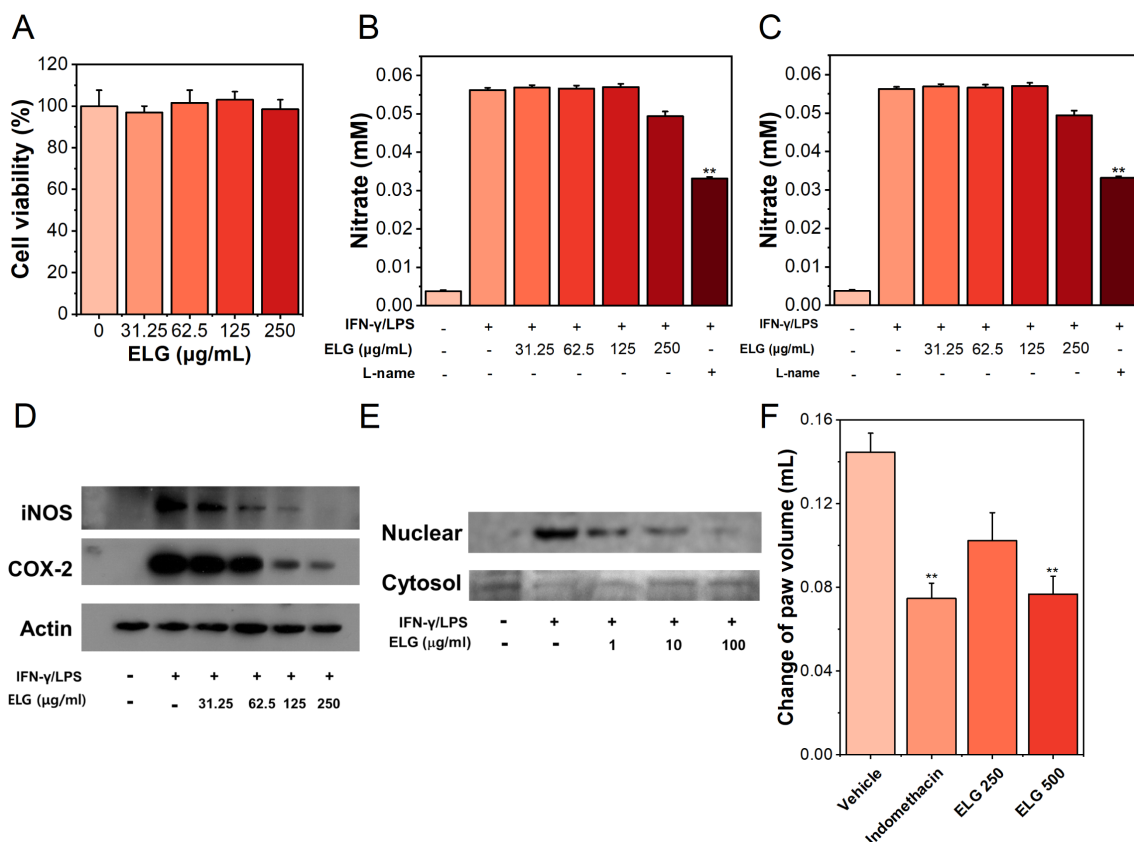


Fig. 1. Anti-inflammatory effects of ELG (A) Cell viability was evaluated by MTT assay as described in the method. The results are expressed as means \pm S.D. of three independent experiments duplicate in each run. (B) NO production. NO release was measured by the Griess method. NO (nitrite) released into the medium is presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments duplicate in each run. The nitrite volume was determined by using sodium nitrite (NaNO_2) standard curve.; * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared to IFN- γ /LPS-treated control group. (C) iNOS enzyme activity was measured by stimulating peritoneal macrophages (3×10^5 cells/well) with IFN- γ (20 U/mL) for 6 h, then stimulated with LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). After 12 h, various concentrations of ELG were treated and incubated for another 12 h. The supernatant were obtained and measured by the Griess method as described previously. ** $p < 0.001$ compared to IFN- γ /LPS-treated control group. (D) iNOS and COX-2 expression. The protein extracts were prepared; samples were analyzed for iNOS and COX-2 expression by western blotting as described in the method. (E) NF- κB translocation. The nuclear extracts were prepared; samples were analyzed by western blotting. (F) Trypsin-induced paw edema assay. Mice were pre-treated distilled water, Indomethacin, ELG before injected trypsin solution. After 1 h, the trypsin solution was injected in a volume of 30 μL subplantarily. Trypsin was dissolved in sterile 0.9% saline. The size of edema was assessed by measuring the volume of the hindpaw immediately before and 1 h after the agonist injection. Data shown represent the mean \pm S.E.M. (n = 8–12). * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$ compared to the control group.

본 연구에서는 ELG 투여가 IFN- γ /LPS로 활성화된 대식세포에서 COX-2의 발현 역시 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 1D).

전염증성 매개 물질은 주로 전사 활성화에 의해 조절된다고 알려져 있으며,³⁵⁾ 그 중에서도 NF- κ B는 iNOS 및 COX-2를 포함한 급성 염증 반응에 관여하는 염증유발 물질들을 합성하기 위한 유전자의 전사에 필수적인 전사인자이다.³⁶⁾ ELG가 NF- κ B의 전사 조절에 미치는 영향을 알아보기 위해 수행한 실험에서 대식세포에 IFN- γ /LPS 처리 후 NF- κ B의 핵으로의 이동(nuclear translocation)이 현저하게 증가하였으며 이러한 증가는 ELG 처리군에서 크게 감소됨을 확인하였다(Fig. 1E). 이와 같은 결과는 ELG가 NF- κ B의 전사 억제를 통해 iNOS와 COX-2를 비롯한 다양한 항염증 매개 물질 생성을 억제함을 시사한다.

ELG의 *in vitro* 항염증 효과를 바탕으로 *in vivo*에서도 항염증 효능을 나타내는지 확인하기 위해 proteinase-activated receptor-2(PAR2) 작용제인 trypsin으로 유도한 족부 부종 시험을 수행하였다. 실험 결과, ELG는 trypsin으로 유도된 족부 용적의 증가를 현저하게 줄이는 효과가 있는 것을 확인하였다(Fig. 1F). Koetzner 등은 PAR2의 활성화가 COX-2의 활성화 및 PG의 생성과 관련이 있다고 밝혔으며,³⁷⁾ 따라서 ELG의 부종 완화 효과가 COX-2 억제와 관련 있을 것으로 사료된다.

다음으로 ELG의 진통 효능을 평가하기 위해서 통증 작용기전에 따라 중추성 통증과 말초성 통증으로 구분하여 실험을 진행하였으며, 진통 실험에 앞서 ELG의 급성 독성을 확인하기 위해 다양한 농도(최대 2000 mg/kg 이상)의 ELG

를 마우스에 경구 투여하였다. 24시간 동안 관찰한 결과, 음성대조군과 마찬가지로 실험군에서는 이상 행동이 발견되지 않았으며, 빈사 혹은 사망 상태의 실험동물 또한 발견되지 않았다.

중추성 통증은 대뇌 피질과 척수가 직접 통증 자극의 주체가 되며 기계적, 열자극에 의한 통증이다. 특히 중추신경계에는 opioid receptor가 분포하여 자극의 전달에 큰 영향을 미친다고 알려져 있다.³⁸⁾ 본 연구에서는 ELG의 중추성 통증 억제능을 확인하기 위해 열 자극에 의한 통증 실험인 tail immersion test, hot-plate test를 실행하였다. 실험 결과, tail immersion test에서 비교 대조군으로 사용된 비마약성 진통제인 tramadol은 투여 30분 후 가장 높은 진통 효과(70.55%)를 보인 뒤 점차 감소하였으며, ELG는 저농도(250 mg/kg)와 고농도(500 mg/kg) 모두 약물 투여 60분 뒤에 각각 37.86%, 78.15%의 최대 진통 효과를 나타내었다(Fig. 2A). Hot-plate test에서도 tail-immersion test의 결과와 유사하게 tramadol은 약물 투여 30분 후 가장 높은 진통 효과(62.4%)를 보였으며 ELG는 투여 60분 뒤에 가장 높은 효과를 보였다(저농도 33.87%, 고농도 61.29%)(Fig. 2B). 이상의 결과를 통해서 ELG는 우수한 중추성 통증 억제능이 있음 확인할 수 있었으며, tramadol과 ELG의 최대 진통 효과가 나타나는 시간이 상이한 것은 약물의 투여 방법 또는 대사 속도의 차이에서 기인한 것으로 보인다.

말초성 통증은 특정 신경 섬유에 인접해 있는 조직에 부분적 손상이 일어남으로써 생기며 염증성, 화학적 자극으로 인한 통증이다.³⁶⁾ 본 연구에서 ELG의 말초성 통증 억제 효과는 약물의 중추성과 말초성 통증 억제 효과를 검증할 때

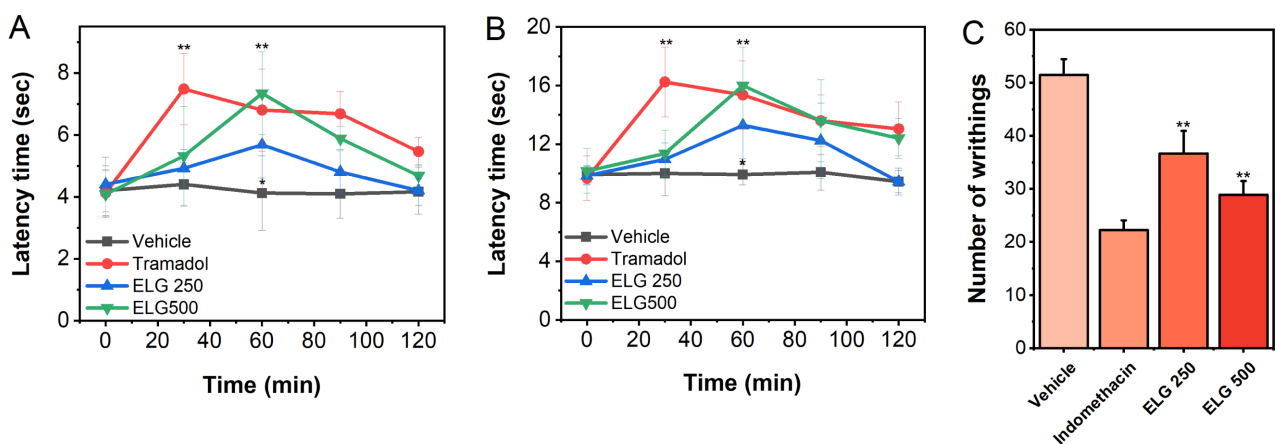


Fig. 2. Anti-nociceptive effects of ELG (A) Tail immersion test. The mice were treated with Tramadol (15 mg/kg; i.p.), ELG (250, 500 mg/kg; p.o.), or distilled water. Values expressed as mean \pm S.E.M. and units are in seconds (n = 10–12). (B) Hot-plate test. The mice were treated with Tramadol (15 mg/kg; i.p.), ELG (250, 500 mg/kg; p.o.), or distilled water. Values expressed as mean \pm S.E.M. and units are in seconds (n = 10–12). (C) Acetic acid-induced writhing test. The mice were treated with Indomethacin (10 mg/kg), ELG (250, 500 mg/kg), or distilled water orally. Values expressed as mean \pm S.E.M. (n = 8). Differences between groups were statistically analysed by one-way ANOVA. * p < 0.01 and ** p < 0.001 compared to vehicle-treated group.

Table I. Analgesic activity of ELG on formalin test

Treatment	Dose (mg/kg)	Naloxone (5 mg/kg)	First Phase (0–5 min)		Second Phase (25–40 min)	
			Licking time (s)	Inhibition (%)	Licking time (s)	Inhibition (%)
Vehicle	-	-	129.68 ± 11.48	-	153.85 ± 11.84	-
Tramadol	15	-	76.54 ± 9.12*	40.97	80.80 ± 5.26**	47.48
	15	+	100.10 ± 6.91 [#]	22.80	130.50 ± 12.09 ^{##}	15.17
Indomethacin	5	-	125.22 ± 6.70	3.44	90.16 ± 6.51*	41.40
	5	+	121.36 ± 8.79	6.41	92.63 ± 9.04 ^{##}	40.80
ELG	250	-	98.40 ± 12.54	24.12	119.20 ± 11.96*	22.52
	500	-	84.30 ± 9.27*	34.99	91.50 ± 12.73**	40.53
	500	+	74.17 ± 13.63 ^{##}	32.60	97.63 ± 5.53 [#]	39.80

The mice were treated with tramadol (15 mg/kg), indomethacin (5 mg/kg), ELG (250, 500 mg/kg) or distilled water. Values expressed as mean ± S.E.M. (n=8–10). Naloxone (5 mg/kg) treatment was performed 15 min prior to drug administration. Differences between groups were statistically analyzed by one-way ANOVA. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated group, while [#] $p < 0.01$ and ^{##} $p < 0.001$ compared to naloxone-untreated group.

사용되는 acetic acid-induced writhing test를 통해 확인하였다.³⁹⁾ Acetic acid-induced writhing test의 통증 발현기전은 복막 유동체 내의 PGs 특히 PGE₂의 증가와 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며,⁴⁰⁾ 따라서 말초에서 나타나는 염증성 통증 연구에 적합한 실험모델로 사용할 수 있다.⁴¹⁾ NSAID 계 약물은 PG 합성을 저해하여 말초성 통증을 억제하므로 해당 실험모델에서 진통효능을 나타낼 수 있으며, 본 연구에서 비교 대조군으로 사용된 indomethacin은 ICR mouse의 writhing motion을 효과적으로 감소시켰다. 이번 연구에서 ELG는 COX-2를 억제하고 trypsin으로 유도된 족부종도 억제하는 효과가 있는 것을 확인한만큼 염증성 말초통증 모델에서도 진통효능을 나타낼 것으로 예상되었으며, 실제로 ELG 고농도 투여군에서는 유의미한 writhing motion 감소율(22.59%)을 확인할 수 있었다(Fig. 2C).

ELG의 진통활성을 추가로 검증하기 위해 formalin test를 수행하였다. 말초성 유해 자극원인 formalin을 피하주사하면 두 가지 통증 매커니즘을 통해 통증반응을 유도하게 된다.⁴²⁾ C 섬유를 통한 직접적인 자극에 의한 first phase의 반응은 신경성 통증 반응으로서 morphine과 같은 opioid 또는 그 유사체에 의해 저해될 수 있다.⁴³⁾ Second phase는 염증성 통증 반응으로서 말초 조직 내에서 prostaglandins, serotonin, histamine 등과 같은 염증 매개체의 영향을 받게 된다.⁴²⁾ 실험 결과, 비마약성 진통제인 tramadol은 first phase와 second phase에서 모두 뛰어난 진통 효과를 보였다(first phase : 40.97%, second phase : 47.48%). 반면 NSAIDs계열 약물인 indomethacin은 second phase에서만 진통 효과(41.40%)를 나타내었다(Table I). 선행 연구에서 주로 중추신경계에 작용하는 약물은 formalin test의 두 phase에 모두 작용하는 반면, 말초신경계에 작용하는 스테로이드나 NSAIDs 계열 약물은 first phase에서의 진통 효과가 미미하다고 밝혀졌다.⁴⁴⁾

본 연구에서 ELG는 모든 phase에서 실험동물의 licking time을 효과적으로 감소시켰으며(first phase : 34.99%, second phase : 40.53%), 이는 ELG가 중추성 통증과 말초성 통증 모두를 억제함을 보여준다(Table I). 이러한 ELG의 진통 효능이 opioid receptor와 관련이 있는지 알아보기 위하여 naloxone의 전처리 후 ELG의 진통활성 변화 여부를 조사하였다. Tramadol 투여군은 naloxone의 전처리 후 진통 효과가 감소하였으나 진통 활성이 완전히 사라지는 않았으며, 이러한 결과는 tramadol이 opioid receptor에 영향을 줌과 동시에 다른 기전으로 진통 효능을 나타냄을 의미한다.⁴⁵⁾ 반면 indomethacin은 second phase에서 naloxone에 의한 진통 효능 감소를 관찰할 수 없었다. 흥미롭게도 ELG 투여군은 naloxone의 전처리 후 first phase와 second phase에서 모두 진통 효능이 유의적인 변화를 나타내지 않았으며(Table I), 이는 ELG의 진통활성이 opioid receptor를 경유하지 않음을 나타낸다.

결 론

감태나무 EtOAc 분획의 항염증 및 진통 효과를 검증하기 위해 여러 실험을 수행한 결과, 감태나무는 iNOS의 발현 억제를 통한 NO 생성 저해와 더불어 COX-2의 발현을 감소시켜 항염증 효과를 나타내었다. 이러한 iNOS와 COX-2의 발현 억제는 염증 반응을 유도하는 전사인자인 NF- κ B의 핵내로의 이동을 저해함으로써 이루어짐이 확인되었다. 진통 효과를 검증하기 위해 수행한 다양한 실험동물 모델에서 감태나무는 중추성 통증과 말초성 통증 모두에 opioid receptor 비의존적으로 진통 효능이 있는 것을 확인하였다. 따라서 감태나무는 염증성 질환과 통증의 치료에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

1. Ahn, K. S., Noh, E. J, Zhao, H. L., Jung, S. H., Kang, S. S. and Kim, Y. S. (2005) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-kappaB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sciences* **76**: 2315-2328.
2. Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. and Ikeda, H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* **100**: 171-194.
3. Griscavage, J. M., Wilk, S. and Ignarro, L. J. (1996) Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *PNAS* **93**: 3308-3312.
4. Karin, M. and Delhase, M. (2000) The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* **12**: 85-98.
5. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**: 109-142.
6. Muller-Decker, K., Neufang, G., Berger, I., Neumann, M., Marks, F. and Furstenberger, G. (2002) Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. *PNAS* **99**: 12483-12488.
7. Neufang, G., Furstenberger, G., Heidt, M., Marks, F. and Muller-Decker, K. (2001) Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *PNAS* **98**: 7629-7634.
8. Tegeder, I., Pfeilschifter, J. and Geisslinger, G. (2001) Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* **15**: 2057-2072.
9. Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-260.
10. Bromm, B. and Lorenz, J. (1998) Neurophysiological evaluation of pain. *Clin. Neurophysiol.* **107**: 227-253.
11. Verpoorte, R. (1999) Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov.* **3**: 232-238.
12. Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C. and Yunes, R. A. (2000) Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *PTR* **14**: 401-418.
13. Tornos, M. P., Saenz, M. T., Garcia, M. D. and Fernandez, M. A. (1999) Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. *J. Ethnopharmacol.* **68**: 229-234.
14. Niu, J., Hou, X., Fang, C., An, J., Ha, D., Qiu, L., Ju, Y., Zhao, H., Du, W. and Qi, J. (2015) Transcriptome analysis of distinct *Lindera glauca* tissues revealed the differences in the unigenes related to terpenoid biosynthesis. *Genes* **559**: 22-30.
15. Yu, J. S., Moon, E. and Kim, K. H. (2017) A new cerebroside from the twigs of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume. *Bioorg. Chem.* **74**: 122-125.
16. Yang, D., Wang, F., Ren, S., Zhang, H. and Peng, J. (1999) Chemical constituents of the essential oil from the fruits of *Lindera glauca* and its antifungal activities. *J. Chin. med. mater.* **22**: 295-298.
17. Wang, R., Tang, S., Zhai, H. and Duan, H. (2011) Studies on anti-tumor metastatic constituents from *Lindera glauca*. *Chin. Med.* **36**: 1032-1036.
18. Kim, Y. U. and Yoon, J. M. (2015) Antioxidative and anti-proliferative effects of *Lindera glauca* Blume on human colorectal cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **44**: 635-640.
19. Cao, N. F., Wu, X. H. and Kang, W. Y. (2010) a-Glucosidase inhibitory activity in vitro and vivo of *Lindera glauca* (Sieb et Zucc) Blume. *Fine Chem. Intermed.* **27**: 546-548.
20. Huh, G. W., Park, J. H., Shrestha, S., Lee, Y. H., Ahn, E. M., Kang, H. C. and Baek, N. I. (2011) Sterols from *Lindera glauca* Blume stem wood. *J. Appl. Biol. Chem* **54**: 309-312.
21. Huh, G. W., Park, J. H., Shrestha, S., Lee, Y. H., Ahn, E. M., Kang, H. C. and Baek, N. I. (2011) Sterols from *Lindera glauca* Blume stem wood. *J. Appl. Biol. Chem.* **54**: 309-312.
22. Huh, G. W., Park, J. H., Shrestha, S., Lee, Y. H., Ahn, E. M., Kang, H. C., Kim, Y. B. and Baek, N. I. (2012) New diarylpropanoids from *Lindera glauca* Bl. heartwood. *Holz-forschung* **66**: 585-590.
23. Chang, Y. C., Chen, C. Y., Chang, F. R. and Wu, Y. C. (2001) Alkaloids from *Lindera glauca*. *J. Chin. Chem. Soc.* **48**: 811-815.
24. Zimmermann, M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**: 109-110.
25. Israf, D. A., Khaizurin, T. A., Syahida, A., Lajis, N. H. and Khozirah, S. (2007) Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF-kappaB nuclear translocation and Ikappa-B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. *Mol. Immunol.* **44**: 673-679.
26. Baek, W. K., Park, J. W., Lim, J. H., Suh, S. I., Suh, M. H., Gabrielson, E. and Kwon, T. K. (2002) Molecular cloning and characterization of the human budding uninhibited by benomyl (BUB3) promoter. *Gene* **295**: 117-123.
27. Bruce, R. D. (1985) An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundam. Appl. Toxicol.* **5**: 151-157.
28. Wang, Y. X., Gao, D., Pettus, M., Phillips, C. and Bowersox, S. S. (2000) Interactions of intrathecally administered ziconotide, a selective blocker of neuronal N-type voltagesensitive calcium channels, with morphine on nociception in rats. *Pain* **84**: 271-281.
29. Franzotti, E. M., Santos, C. V., Rodrigues, H. M., Mourão, R. H., Andrade, M. R. and Antonioli, A. R. (2000) Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J. Ethnopharmacol.* **72**: 273-277.
30. Olajide, O. A., Awe, S. O., Makinde, J. M., Ekhelar, A. I.,

- Olusola, A., Morebise, O. and Okpako, D. T. (2000) Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *J. Ethnopharmacol.* **71**: 179-186.
31. Santos, A. R. S. and Calixto, J. B. (1997) Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* **31**: 381-389.
32. MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.
33. Clancy, R. M., Amin, A. R. and Abramson, S. B. (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheumatol.* **41**: 1141-1151.
34. Kroncke, K. D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **113**: 147-156.
35. Park, J. E., Kang, Y. J., Park, M. K., Lee, Y. S., Kim, H. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Hye Sook, Y. C., Shin, J. S., Lee, H. W., Ahn, S. K. and Chang, K. C. (2006) Enantiomers of higenamine inhibit LPS-induced iNOS in a macrophage cell line and improve the survival of mice with experimental endotoxemia. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 226-233.
36. Muller, J. M., Ziegler-Heitbrock, H. W. and Baeuerle, P. A. (1993) Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* **187**: 233-256.
37. Koetzner, L., Gregory, J. A. and Yaksh, T. L. (2004) Intrathecal protease-activated receptor stimulation produces thermal hyperalgesia through spinal cyclooxygenase activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**: 356-363.
38. Li, S. and Tator, C. H. (2000) Action of locally administered NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists in spinal cord injury. *NRP* **22**: 171-180.
39. Fukawa, K., Kawano, O., Hibi, M., Misaki, N., Ohba, S. and Hatanaka, Y. (1980) A method for evaluating analgesic agents in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **4**: 251-259.
40. Derardt, R., Jougnay, S., Delevalcee, F. and Falhout, M. (1980) Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology* **51**: 17-24.
41. Bley, K. R., Hunter, J. C., Eglen, R. M. and Smith, J. A. (1998) The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**: 141-147.
42. Hunskar, S., Fasmer, O. B. and Hole, K. (1985) Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods* **14**: 69-76.
43. Amaral, J. F., Silva, M. I. G., Neto, M. R. A., Neto, P. F. T., Moura, B. A., Melo, C. T. V., Araujo, F. L. O., DeSousa, D. P., Vasconcelos, P. F., Vasconcelos, S. M. and Sousa, F. C. F. (2007) Antinociceptive effect of the monoterpene R(-)-limonene in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1217-1220.
44. Vontagu, H., Abbah, J., Nagazal, I. E., Kunle, O. F., Chindo, B. A., Otsapa, P. B. and Gamaniel, K. S. (2004) Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of *Parinari polyandra* stem bark in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **90**: 115-121.
45. Yalcin, I. and Aksu, F. (2005) Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **80**: 69-75.

(2022. 3. 16 접수; 2022. 3. 21 심사;
2022. 3. 23 게재확정)