pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 4, pp. 367~375 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.4.367

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

해동피 및 유사생약 추출물의 위 손상에 대한 효과

황인영 · 황선아 · 정춘식*
덕성여자대학교 약학대학

Effects of *Kalopanax Pictus* Extracts and Their Related Origin on Gastric Lesions

In Young Hwang, Seon A Hwang, and Choon Sik Jeong*
College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
(Received August 13, 2013/Revised September 14, 2013/Accepted December 18, 2013)

ABSTRACT - *Kalopanax pictus* has pharmacologically anti-inflammatory and analgesic effect and is known to respond to treatment of backache, knee pain and etc. In this study, we investigated the effects on gastric lesions of *Kalopanax pictus* both from Korea (KPK) and China (KPC) compared with their related origin, *Znthoxylum ailanthoide* both from Korea (ZAK) and China (ZAC), and Korean *Bombax malabaricum* (BMK). In preliminary screening, KPK and KPC shown effective inhibition of HCl·EtOH-induced gastritis in rats. To elucidate their protective effects on gastric lesions, we assessed inhibition of *H. pylori* colonization, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) radical scavenging activities, reducing power test, and inhibition of lipid peroxidation. KPK was the most effective from antioxidant assays. KPK also shown the inhibition of indomethacin-induced gastric ulcer in rats. Gastric secretion in rats, KPK reduced the secretion of gastric juice and total acidity and raised pH. Therefore, it is possible that KPK can be developed as health functional food and natural medicine. In addition, it can contribute to the standardization with objectivity and reliability for KPK through the criteria establishment of the precise origin of medicine, the prevention of indiscriminate distribution of imitation, and the rising rate of dependence on imports of medicinal herbs, and mixing prevention of low-quality goods.

Key words **:** *Kalopanaxpictus*, gastritis, gastric ulcer, anti-oxidant, *H.pylori*

엄나무(*Kalopanax pictus* Nakai)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽 활엽교목으로, 한국, 일본, 만주, 중국 등지에 분포하고 한방에서는 수피(樹皮)를 채취하여 약재로 이용한다. 해동피는 엄나무의 껍질로 신체가 무겁거나 부으면서 관절통이나 신경통을 일으키는 풍습증상(風濕症狀)을 없애고 경락의 기운을 잘 소통하게 하는 효능이 있어 허리와 무릎의 통증 등을 치료하는데 이용된다. 또한 살충・살균작용과 소양감을 멈추게 하는 효능이 있어 치통, 이질(痢疾)과 옴(개선・疥癬) 등의 피부질환에 외용약으로 활용되고, 피부 진균류에 대한 저지효과도 있어 피부질환과 구내염(口內炎) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[1].

위염은 일반적으로 급성위염과 만성위염으로 구분한다. 급성위염은 출혈과 미란이 동반되는 급성 미란성 위염과 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)의 감염으로 인해 발생하는 *H. pylori* 위염으로 나눌 수 있다. 최근 급성위염은 각종 약제 특히 아스피린, 항암 화학제의 투여 또는 흡연 등으로 발생빈도가 높아지고 있고, 직접적인 외상과 스트레스, 알레르기와 식중독, 방사선, 국소빈혈, 세균성, 바이러스성 및 곰팡이성 감염 등이 그 원인으로 중요시되고 있다. 만성위염은 의학적으로 위 내시경 검사에 따르는 조직검사로서 염증세포의 침윤이 있는 상태를 말하고 그 정도에 따라 단핵구의 증가만 있는 만성위염과 단핵구 및 다형백혈구의 동시 침윤을 보이는 활동성 만성위염으로 분류된다. 위궤양은 위장 점막이 손상되어 가장 표면에 있는 점막층보다 깊이 패여 점막근층 이상으로 손상이 진행된 상태를 말한다[2]. 자유라디칼은 위염과 위궤양에 있어 중요한 역할을 한다. 자유라디칼 중에서 생체 내에서 가장 빈번하게 생성되는 것이 oxygen radical인데, 주요 oxygen radical 로는 superoxide(O^{2-}), hydroxyl(·OH), hydroperoxide (H_2O_2·), alkoxy(RO·), peroxy(ROO·) radical 등이 있다. 또

*Correspondence to: Choon Sik Jeong, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
Tel: 82-2-901-8382, Fax: 82-2-901-8386
E-mail: choonsik@duksung.ac.kr

한 라디칼류는 아니지만 반응성이 강한 활성산소종(reactive oxygen species)으로 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 singlet oxygen를 포함한다[3,4,5]. 손상에 대한 숙주의 반응은 손상된 부위에 부종이 형성되고, 혈관의 침투성이 증가하여 백혈구 침윤의 과정을 일으킨다. 다핵형 혈구와 대식세포는 이물질과의 접촉에 의해 활성화되면, 산소의 소비가 증가되고, 소비된 산소는 과산화된 라디칼(superoxide radical)로 변환 된다[6]. 뿐만 아니라 염증반응의 방어기전으로서 증가되는 중성구, 대식세포, 사이토카인(cytokine), 프로스타글란딘(prostaglandin)등 에서도 자유라디칼이 발생한다. 이러한 자유라디칼은 여러 효소 반응을 통해 신속하게 제거되지만, 과량의 자유라디칼은 독성을 일으키고 주변조직에 손상을 주게 된다. 산소라디칼생성을 관여하는 효소의 억제는 국소허혈, 에탄올, 출혈성 쇼크 및 비스테로이드성 약물에 의해 유도된 점막 손상을 감소시킨다는 것이 밝혀졌다[7]. 이후의 연구에서도 위장 점막에서 항산화 방어시스템의 장애는 허혈-재관류로 유도된 점막병변의 진행과 관련되어 있다고 보고되었다[8].

본 연구에서는 해동피(*Kalopanax pictus*)의 국산 및 중국산과 그 유사생약으로 사용되는 절동피(*znthoxylum ailanthoides*)의 국산과 중국산, 목면피(*bombax malabaricum*) 국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물의 위 손상에 미치는 영향과 그 기전에 대한 실험을 시행하였다. 이를 통하여 오랜 세월 한약재로 사용되어 온 해동피의 기원이 다른 유사품 및 불량 약재의 무분별한 유통, 정확한 기원의 약재에 대한 기준설정, 높아지는 한약 재수입 의존도에 따른 위품, 저질품의 혼입 방지와 객관적이고 신뢰성 있는 표준규격을 설정하고자 수행하였다.

재료 및 방법

재료

해동피, 절동피 및 목면피는 2009년 충청남도 금산에서 구입하여 충남대학교 약학대학 김영호 교수님께서 확인하였으며(CNU09105~9) H_2O 및 70% EtOH로 추출하여 건조된 것을 제공받아 사용하였다.

시약 및 기기

Fetal bovine serum (FBS), RPMI Medium 1640, bacto agar, brucella broth는 Gibco (Rockville, MD, USA)제품을, MTT (dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt) agent, penicillin-streptomycin, tris-HCl, trypan blue, trypsin-EDTA, sodium biocarbonate, cimetidine, ampicillin, indomethacin, bradford는 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을, albumin standard는 Pierce (Rockford, IL, USA)제품을 사용하였고 ethanol (EtOH), methanol (MeOH), hydrogen peroxide (H_2O_2), trichloroacetic acid (TCA), ferric chloride ($FeCl_3$) 및 HCl은 Duksan (Gyeonggi-Do, Korea)제품을 구입하여 사용했으며 기타 시약 및 추출 용매는 분석용 일급시약을 사용하였다. 기기는 inverted microscope (Olympus, Tokyo, JPN), pH meter (IQ240, Sandiago, GC, USA), centrifuge 5810R (eppendorf, Westbury, NY, USA), high speed centrifuge RT-6000 (Sorvall, Newtown, CT, USA) 및 UV spectrophotometer UVM340 (ASYS, Eugendorf, Austria) 등을 사용하였다.

실험동물

샘타고 (주)에서 분양 받은 6주령, 체중 180~200 g 의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 22 ± 2°C에서 2 주간 사육하여 적응시킨 뒤 실험에 사용 하였으며 동물실내의 명암은 12 시간씩 자동조절 시켰고 고형사료(삼양사료) 및 물은 충분히 공급하였다.

위암세포주 및 균주

AGS는 Korean Cell Line Bank (KCRB)에서 구입하였고, 배양액은 RPMI1640에 10% FBS, 100 units/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin을 혼합하여 사용하였다. 세포 배양액은 5% CO_2 로 조정된 배양기내에서 37°C로 배양하였으며 배양된 세포는 1% trypsin-EDTA로 부유시킨 후 사용하였다. *H. pylori*는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다.

HCl · EtOH에 의한 흰쥐 위염

체중 190 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후, 검체를 경구로 투여했다. 30분 후 HCl · EtOH 1 mL를 경구 투여하여 절식, 절수 하에 1시간 방치한 뒤 ether로 치사시켜 위를 적출하였다. 적출한 위를 2% formalin 수용액으로 30분간 침적하여 위 내 · 외를 가볍게 고정한 다음 대만부를 절개하여 선위부에 발생한 손상의 길이(mm)를 현미경(× 10) 하에서 측정하여 gastric lesion index 로 하였다[9].

*H. pylori*에 대한 항균효과

H. pylori 생장억제효과를 확인하기 위하여 먼저 7 mL 의 brucella agar 배지 및 7% 의 horse serum이 담긴 petri dish 에 해당농도로 용해한 1 mL 의 검체를 주입하였다. 여기에 5×10^5 CFU 의 *H.pylori*를 분주하고 37°C에서(AnaeroPak Campylo : 85% N_2, 10% CO_2, and 5% O_2) 3일간 배양하였다. 양성대조군으로는 ampicilin을 사용하였다[10,11].

항산화 효과 실험

DPPH 시험법

*In vitro*에서의 직접적인 free radical scavenging 효과를 측정하기 위해 DPPH radical 제거활성을 측정하였다. 즉

시료에 MeOH을 가하여 각각의 농도가 되도록 조제하고 0.4 mL를 tube에 취하였다. 여기에 1.5×10^{-4}M DPPH/MeOH 용액 0.1 mL를 가한 다음 잘 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화효과는 DPPH radical을 50% 제거하는 농도(IC_{50})로 표시하고, 양성대조약물로 L-ascorbic acid를 사용하였다[12].

환원력 시험법

자유라디칼의 발생을 차단할 수 있는 환원력의 reducing power 측정은 Oyaizu(1986) 의 방법[13]을 변형하여 사용하였다. Tube에 시료 200 μL와 0.05 M 의 phosphate buffer (pH 6.6) 500 μL를 넣는다. 1% $K_3Fe(CN)_6$를 500 μL써서 분주한 후 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 3분 동안 찬물에서 냉각시키고 10% TCA를 500 μL 넣었다. 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 상층 액을 500 μL 취하고 deinoized water 500 μL와 0.1% $FeCl_3$ 100 μL를 넣은 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지질과산화 억제 활성

지질과산화억제작용은 Koleva(2002) 등[14]의 β-carotene/linoleic acid system을 약간 변형하여 측정하였다. β-carotene/linoleic acid emulsion 은 산화되어 탈색반응이 발생하며, 산화물질이 존재 시 본래 색을 유지하게 된다. β-carotene 용액(2 mg/20 mL in chloroform) 3 mL에 linoleic acid 40 mg, tween 40 400 mg을 첨가하고 chloroform을 N_2 gas를 이용하여 완전히 제거하였다. 잔사에 증류수 100 mg을 천천히 넣으면서 격렬하게 잘 섞어준 후 0.2 mL 시료가 들어있는 시험관에 용액(emulsion) 5 mL를 첨가하였다. 시험관을 40°C water bath에 24시간 incubation 한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide radical 소거 활성

추출물의 superoxide radical에 대한 소거활성은 Nishikimi 등(1972)의 방법[15]에 따라 다음과 같이 실험하였다. 추출물의 최종농도를 실험에 맞게 조제한 후 각각 0.5 mL씩 취해서 Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 0.1 mL, 500 μM NBT 0.5 mL 및 100 μM PMS 0.2 mL를 가한 후 500 μM NADH 0.4 mL과 함께 5분후, 560 nm에서 흡광도 측정하여 superoxide 소거능(%)을 산출하였다.

Hydrogen peroxide 소거 활성

Hydrogen peroxide 에 대한 소거 활성은 산성조건하에서 Fe^{2+}이 Fe^{3+}로 산화하는 원리를 이용한 FOX reagent 방법을 응용하여 실험하였다. 즉, 일정농도의 시료 0.5 mL에 hydrogen peroxide solution (50 mM in phosphate buffer pH 7.4) 0.5 mL을 첨가한 다음 30분 후, 90 μL의 $H_2O_2^-$ sample 에 10 μl의 HPLC급 mEtOH 과 0.9 mL FOX reagent를 첨가하였다. (FOX reagent는 HPLC급 mEtOH에 녹인 4.4 mM BHT (butylatedhydroxytoluene) 9 volume과 0.25 M H_2SO_4에 녹인 1 mM xylenol orange and 2.56 mM ammonium ferrous sulfate를 1 volume 넣어 만들었다. Reaction mixture를 voltex하고 30분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 hydrogen peroxide 소거능(%)은 [(Ac – As)/Ac] × 100 식으로 계산하였다. 여기서 As와 Ac는 각각 시료를 첨가한 실험군과 대조군에서의 흡광도를 나타내었다.

Indomethacin에 의한 흰쥐 위궤양

Kasuya(1979) 등의 방법[16]을 조금 변형하여 체중 190 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후, 30 mg/kg의 indomethacin을 50 mM sodium biocarbonate solution에 함께 녹여 2 mL/kg의 용량으로 피하주사 하였다. 실험동물은 indomethacin투여 7시간 후에 희생하여 위를 적출하고 적출한 위를 2% formalin 수용액으로 30분간 침적하여 위내외를 가볍게 고정하고 대만부를 절개하여 선위부에 발생한 손상을 현미경(× 10) 하에서 측정하였다.

MTT 검색법

MTT assay는 생존 암세포의 탈수소 효소작용을 이용하여, 항암물질에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정하는 실험으로 세포 부유 용액을 24 well 에 똑같이 나눈 후, 배지 250 μL를 넣었다. CO_2 incubator (37°C, 5% CO_2) 에서 24시간 보관하였다. 24시간 후 배지를 갈아주고, 미리 결정한 농도의 약물을 넣었다. 24시간 후 MTT 시약 100 μL를 넣고 4시간 후 보라색 결정이 바닥에서 떨어지지 않게 조심스레 용액을 제거하여 DMSO로 녹인 후 96 well에 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정 하였다[17].

제산력 시험법

제산력 시험법은 위산과 반응하여 제제의 제산작용을 확인하는 시험으로 대한약전에 명시된 제산력 시험법을 변경하여 실험하였다. 0.1 N HCl 100 μL에 검체 1 μg의 농도로 취하여 혼합 후 37°C의 shaking incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1 N NaOH로 적정하였다. 지시약으로 methyl orange, 양성대조약물로 hydrotalcite를 사용하였다.

흰쥐의 위액분비량, pH 및 산 분비량에 미치는 작용

흰쥐의 위액분비량과 pH 및 산 분비량에 미치는 작용 실험을 통해 공격인자인 위액에 의한 위 손상억제 mechanism을 확인하였다. 실험방법은 체중 190 g 내외의 수컷 흰쥐를 사용하여 24시간 절식시킨 후 ether 마취하에 개복하고 위의 유문부를 결찰하고 검체를 십이지장 내로 주입한 뒤 4시간 후에 치사시켜 위를 적출하여 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 3,000 rpm 에서 10분간 원심분리한

후 위액량, pH 및 산 분비량을 측정하였다. 산도는 phenol red를 지시약으로 하여 0.1 N NaOH로 적정하며 pH 는 electrode pH meter로 측정하였다[18].

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군 차이는 Student's *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 여러 가지 실험방법에 따라 위염 및 위궤양을 유발했을 때 실험약물에 의한 위염 및 위궤양의 억제작용은 다음과 같이 inhibition ratio(%)로 나타내었다.

$$*\text{Inhibition}(\%) = \left[\frac{\text{Control lesion index} - \text{Sample lesion index}}{\text{Control lesion index}}\right] \times 100$$

결 과

HCl · EtOH에 의한 흰쥐 위염

해동피 국산 및 중국산과 그 유사생약인 절동피 국산과 중국산 및 목면피 국산 추출물을 각각 300 mg/kg 투여하여 HCl · EtOH로 유발된 위 손상에 미치는 영향을 보고자 실험한 결과, 국산 절동피의 H_2O 추출물에서 위 손상지수가 39.0 ± 12.8 mm로, 62.3%의 억제효과를 나타내었고, 목면피 국산의 경우, H_2O 추출물 투여 시 위 손상지수가 41.3 ± 18.0 mm로 60.1%의 억제효과를 나타내었다. 해동피는 중국산 70% EtOH 추출물에서 투여 시 위 손상지수가 8.5 ± 6.2 mm로, 91.8%의 억제효과를 나타내었고, 국산 70% EtOH 추출물에서는 위 손상지수가 25.9 ± 18.4 mm로, 75.0%의 억제효과를 나타내었다. 양성대조군으로 사용한 cimetidine은 65.0 ± 18.3 mm로 37.1%의 억제효과를 보였다(Table 1).

Table 1. Effect of *Znthoxylum ailanthoides*, *Bombax malabaricum* and *Kalopanax pictus* on HCl·EtOH-induced gastritis in rats

Material	Extraction	Dose (mg/kg)	Lesion index (mm)	Inhibition (%)
Control	-	300	103.5 ± 15.8	-
Znthoxylum ailanthoides (Korea)	H_2O	300	39.0 ± 12.8***	62.3
	70% EtOH	300	55.5 ± 9.9***	46.3
Znthoxylum ailanthoides (China)	H_2O	300	62.3 ± 7.8***	39.8
	70% EtOH	300	55.8 ± 14.2***	46.0
Bombax malabaricum (Korea)	H_2O	300	41.3 ± 18.0***	60.1
	70% EtOH	300	72.3 ± 14.9*	30.1
Kalopanax pictus (China)	H_2O	300	42.5 ± 12.4***	58.9
	70% EtOH	300	8.5 ± 6.2***	91.8
Kalopanax pictus (Korea)	H_2O	300	51.5 ± 25.1**	50.2
	70% EtOH	300	25.9 ± 18.4***	75.0
Cimetidine	-	150	65.0 ± 18.3**	37.1

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ compared to the control.

*H. pylori*에 대한 항균효과

위염 및 위궤양과 위암의 원인 인자로 잘 알려진 *H. pylori*의 colony 억제작용을 확인한 결과, 해동피 국산 및 중국산과 그 유사생약인 절동피 국산과 중국산 및 목면피 국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물은 모두 100 μg/mL의 농도에서 colony의 수(++이하)가 감소되었다(Table 2).

제산력 시험법

과다한 위산을 중화시키는 제산력을 확인한 결과 해동피 국산의 H_2O 추출물 및 70% EtOH 추출물은 각각 24.6%,

Table 2. Colonization inhibiting effect of *Znthoxylum ailanthoides*, *Bombax malabaricum* and *Kalopanax pictus* at *H.pylori*

Material	Extraction	Dose (μg/mL)	Colonization
Control	-	-	
Znthoxylum ailanthoides (Korea)	H_2O	10	+
		50	+
		100	+
	70% EtOH	10	+
		50	+
		100	+
Znthoxylum ailanthoides (China)	H_2O	10	+
		50	+
		100	+
	70% EtOH	10	+
		50	+
		100	+
Bombax malabaricum (Korea)	H_2O	10	+
		50	+
		100	+
	70% EtOH	10	+
		50	+
		100	+
Kalopanax pictus (China)	H_2O	10	+
		50	+
		100	+
	70% EtOH	10	+
		50	+
		100	+
Kalopanax pictus (Korea)	H_2O	10	++
		50	++
		100	++
	70% EtOH	10	++
		50	+
		100	+

-: none, +: colonies(0-2 × 10^4 CFU), ++: colonies(2-4 × 10^4 CFU), +++: colonies(4-6 × 10^4 CFU), ++++: colonies(> 6 × 10^4 CFU)

Table 3. Acid-neutralizing capacity of *Znthoxylum ailanthoides*, *Bombax malabaricum* and *Kalopanax pictus*

Material	Extraction	NaOH consumption volume(μm)	Inhibition (%)
Control	-	96.3 ± 2.0	-
Znthoxylum ailanthoides (Korea)	H_2O	92.3 ± 1.2**	4.2
	70% EtOH	92.0 ± 1.0**	4.5
Znthoxylum ailanthoides (China)	H_2O	94.0 ± 1.0*	2.4
	70% EtOH	93.7 ± 1.5*	2.8
Bombax malabaricum (Korea)	H_2O	92.0 ± 1.0**	4.5
	70% EtOH	93.5 ± 1.3*	2.9
Kalopanax pictus (China)	H_2O	92.0 ± 1.0**	4.5
	70% EtOH	92.3 ± 1.2**	4.2
Kalopanax pictus (Korea)	H_2O	72.6 ± 7.8***	24.6
	70% EtOH	82.6 ± 3.8***	14.2
Hydrotalcite	-	7.9 ± 1.6***	91.8

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control.

14.2%의 우수한 제산력을 보였다. 절동피 국산과 중국산, 목면피 국산 및 해동피 중국산 추출물에서는 4.5%이하의 제산력을 보였다(Table 3).

항산화 효과 실험

*In vitro*에서의 직접적인 free radical 소거 효과를 측정하고자 0.15×10^{-4} M/mL DPPH에 대한 free radical의 소거능을 측정하여 그 억제력을 IC_{50}으로 나타낸 결과, 해동피 국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물은 각각 25.1 μg/mL, 22.8 μg/mL 로 추출물 중 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 목면피 국산의 H_2O 추출물과 해동피 중국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물의 실험 농도 내에서는 유의성 있는 결과를 나타내지 않았다(Table 4). 환원력 측정 결과는 해동피 국산의 H_2O 및 70% 에탄올에서 유사생약인 해동피 중국산, 절동피 국산과 중국산, 목면피 국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물 보다 우수한 환원력을 확인하였다. 지질과산화 억제 활성 결과로는, 해동피 국산의 H_2O 및

Table 4. Free radical scavenging activities of *Znthoxylum ailanthoides*, *Bombax malabaricum* and *Kalopanax pictus*

Material	Extraction	IC_{50}(μg/mL)
Znthoxylum ailanthoides (Korea)	H_2O	76.2
	70% EtOH	74.6
Znthoxylum ailanthoides (China)	H_2O	50.2
	70% EtOH	158.6
Bombax malabaricum (Korea)	H_2O	> 160
	70% EtOH	62.5
Kalopanax pictus (China)	H_2O	> 160
	70% EtOH	> 160
Kalopanax pictus (Korea)	H_2O	25.1
	70% EtOH	22.8

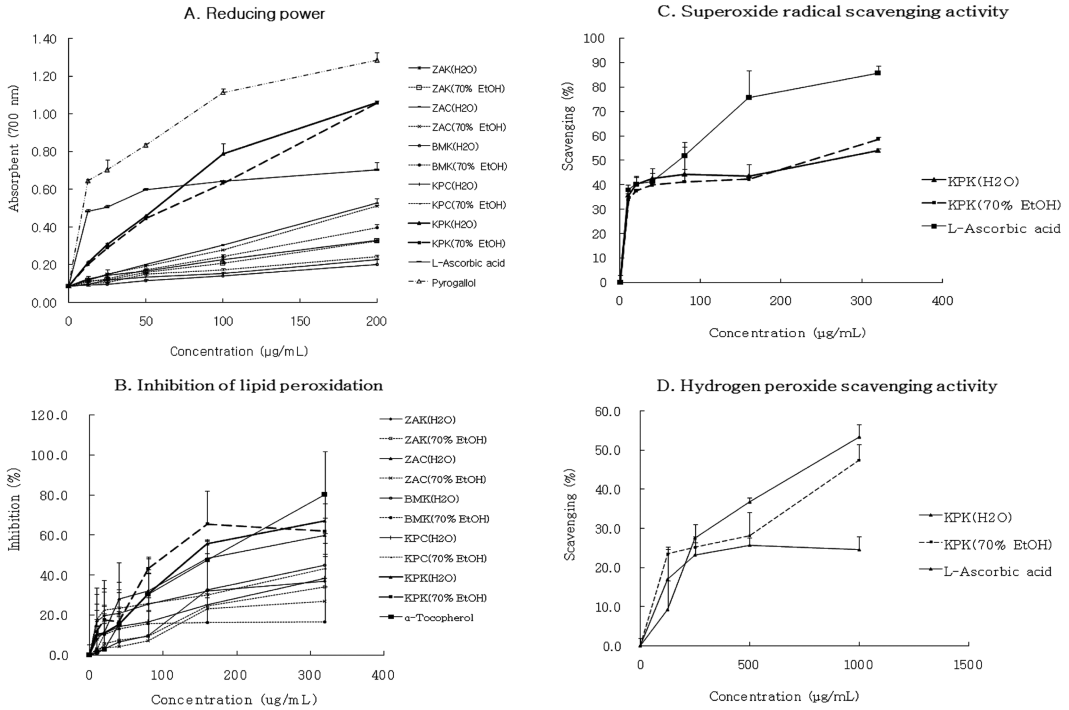


Fig. 1. Anti-oxidative activities of *Znthoxylum ailanthoides*, *Bombax malabaricum* and *Kalopanax pictus*
KPK: *Kalopanax pictus* from Korea; KPC: *Kalopanax pictus* from China; ZAK: *Znthoxylum ailanthoide* from Korea; ZAC: *Znthoxylum ailanthoide* from China; BMK: *Bombax malabaricum* from Korea.

70% EtOH 추출물 320 μg/mL에서, 각각 67%, 61.9%의 억제능을 확인하였다. 해동피 국산은 다른 유사생약 추출물보다 우수한 지질과산화 억제능을 나타내었다. Nitro blue tetrazolium (NBT)를 이용한 비효소적 실험으로 NBT반응을 통해 발생하는 superoxide를 potassium peroxide의 형태로 측정 할 수 있는 superoxide radical 소거 실험[19]결과는 해동피 국산의 H_2O 및 70% EtOH 추출물이 320 μg/mL에서 각각 53.9%, 58.6%의 우수한 제거능을 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거 활성은 샘플의 종류에 따라 lipid hydroperoxide 뿐만 아니라 hydrogen peroxide의 총량을 시험 할 수 있는 시험법으로, 해동피 국산 H_2O 추출물은 용량 의존적으로 hydrogen peroxide의 제거능을 보였다(Fig. 1).

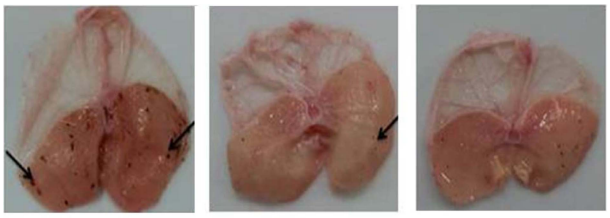
Indomethacin에 의한 흰쥐 위궤양

Indomethacin을 피하로 투여 하였을 때 산화손상을 특징으로, 점막혈류의 감소와 PG분비의 억제로 인한 점액층과 HCO_3^-의 감소에 의해 위장 내 병변이 유도된다. Indomethacin 투여 후 대조군에서는 29.7 ± 3.0 mm^2의 위 손상이 관찰되었고 해동피 국산 H_2O 추출물은 8.0 ± 4.2 mm^2로 약 73.1%의 억제효과를 보였으며, 70% EtOH 추출물은 13.9 ± 5.7 mm^2로 약 53.5%의 억제효과를 볼 수 있었다. 이는 cimetidine 투여 시 발생한 14.0 ± 5.7 mm^2 (52.7%)와 비교하였을 때 유의성 있는 효과를 확인 할 수 있었다(Table 5, Fig. 2).

Table 5. Effects of *Kalopanax pictus* on indomethacin-induced gastric ulcer in rats

Treatment	Extraction	Dose (mg/kg)	Lesion index (mm^2)	Inhibition (%)
Control		-	29.7 ± 3.0	-
Kalopanax pictus	H_2O	300	8.0 ± 4.2**	73.1
(Korea)	70% EtOH	300	13.9 ± 5.7*	53.5
Cimetidine		200	14.0 ± 5.7*	52.7

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.01, **p < 0.001 compared to the control.



A. Control　B. Kalopanax pictus Korea(H_2O)　C. Kalopanax pictus Korea(70% EtOH)

Fig. 2. The effects of *Kalopanax pictus* on indometacin-induced gastric ulcer in rats

흰쥐의 위액분비량, pH 및 산부비량에 미치는 작용

위장점막은 공격인자와 방어인자의 불균형이 있을 때 손상받기 쉽고, 또한 궤양이 발생 할 수 있다는 것은 널리 알려져 있다. Pylorus ligation은 위궤양의 초기단계에서 위산분비의 강한자극을 유도하는 것으로 알려져 있기 때문에, 흰쥐의 위액분비량과 pH 및 산분비량에 미치는 작용 실험을 통해 공격인자인 위액에 의한 위 손상억제 mechanism을 확인하였다. 해동피 국산 H_2O 추출물과 70% EtOH 추출물 각각 300 mg/kg투여 시 위액분비량은 5.88 ± 1.0 mL, 4.00 ± 1.1 mL로 각각 감소하였고, pH는 각각 1.43 ± 0.4, 1.20 ± 0.2로 대조군(1.13 ± 0.1)에 비해 산성도가 감소하였다. Total acid output의 경우 대조군의 1.29 ± 0.4 mEq/4hrs 보다 H_2O 추출물 에서는 0.65 ± 0.2, 70% EtOH 추출물에서는 0.35 ± 0.1로 유의적인 감소를 확인하였다(Table 6).

MTT 검색법

세포내 소기관의 활성을 비색방법을 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교하는 방법인 MTT assay는 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase(탈수소효소)가 MTT를 환원시키며 생성한 formazan의 흡광도를 측정하는 방법으로 시

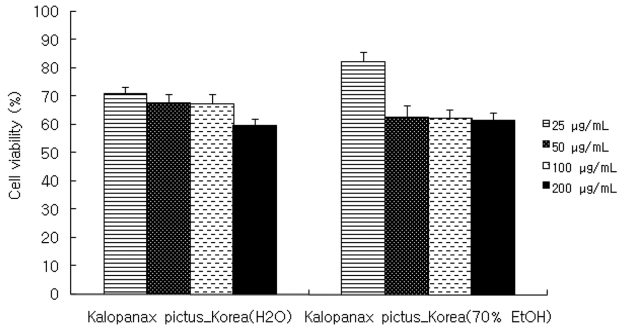


Fig. 3. Cell viablity of *Kalopanax pictus* at AGS cells

Table 6. Effect of *Kalopanax pictus* on gastric secretion in pylorus-ligated rats

Treatment	Extraction	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	Total acid output (mEq/4hrs)
Control		-	8.45 ± 1.0	1.13 ± 0.1	1.29 ± 0.4
Kalopanax pictus	H_2O	300	5.88 ± 1.0	1.43 ± 0.4	0.65 ± 0.2*
(Korea)	70% EtOH	300	4.00 ± 1.1*	1.20 ± 0.2	0.35 ± 0.1**
Cimetidin		150	3.16 ± 1.7***	2.55 ± 1.3*	0.31 ± 0.1***

The value represents the mean ± S.D. Significantly difference, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to the control.

료처리 후 24시간 배양하여 위암세포주인 AGS에 세포생존율을 대조군과 비교한 결과, 해동피국산 H_2O 추출물은 25, 50, 100, 및 200 μg/mL의 농도에서 각각 71.76 ± 4.5%, 69.84 ± 2.8%, 69.1 ± 5.0%, 및 60.03 ± 4.1% 의 생존율을 나타내었다. 70% EtOH 추출물은 83.49 ± 9.8%, 63.77 ± 5.5%, 63.34 ± 7.5%, 62.17 ± 7.6%의 생존율을 보였다(Fig. 3).

고 찰

해동피는 약리학적으로 소량 사용할 때는 중추신경계 흥분작용이 있으며, 다량 사용할 때 진정작용이 있고 위액분비를 항진시키며 거담작용 등이 있는 것으로 밝혀져 있다. 또한 진통(鎭痛), 소염(消炎) 작용이 있기 때문에 신경통, 근육통, 관절염 등 각종 통증에 일정한 효과가 있다고 알려져 있다. 해동피 추출물의 효능 연구로는 MeOH 추출물의 항염증 작용으로 생쥐에서 혈관투과성(vascular permeability)의 억제, 흰쥐에서 CMC로 유발한 부종(edema)의 억제[20] 및 항 지질산화작용이 보고되었다[21]. 또한 MeOH 추출물 및 ethyl acetate (EtOAc) 분획물의 진통작용이 확인되었으며, 흰쥐 adjuvant로 유발된 관절염(arthritis) 모델에서 유의성 있는 억제력을 보였다[22]. 최근에는 EtOAc 분획물의 항암활성이 보고되었는데, HT-29 세포주의 성장을 저해하며, 이 활성은 apoptosis에 의한 것으로 확인되었다[23]. H_2O 추출물의 항염증 작용기전 보고로는, heme oxygenase-1을 유도하고 NF-kB의 활성화를 억제하는 기전임이 증명되었다[24].

본 연구에서는 해동피 국산 및 중국산과 그 유사생약으로써 절동피의 국산과 중국산 및 목면피 국산의 위 손상에 대한 효과를 알아보았다. 먼저, 각각의 추출물을 300 mg/kg으로 경구투여 하여 HCl · EtOH로 유발된 흰쥐 위염에 미치는 영향을 보고자 실험한 결과, 양성 대조군으로 사용한 cimetidine의 37.1% 억제효과에 비하여 절동피 국산 H_2O 추출물에서 62.3%, 목면피 국산 H_2O 추출물에서 60.1%의 억제효과를 확인하였다. 특히 해동피는 70% EtOH 추출물에서 중국산이 91.8%, 국산이 75.0%로 위 손상이 현저히 감소하여 실험에 사용한 추출물 중 가장 우수한 효과를 확인할 수 있었다.

*H. pylori*는 균 자체에서 생산되는 각종 독성인자에 의한 직접적 위 손상과 위 점막에 생리작용을 변화시키거나 염증반응을 지속적으로 유발하는 간접적 위 손상을 초래할 수 있다. 최근 국내에서 분리된 *H. pylori*는 metronidazole에 대한 내성률이 높은 것으로 보고되고 있고, 특히 우리나라에서는 *H. pylori* 감염률 뿐 아니라 항생제 내성률이 다른 나라에 비해 상대적으로 높은 경향을 보이고 있으므로 항생제내성이 사회적인 문제점으로 대두 될 가능성이 있다. 따라서 새로운 가능성을 가진 항균제의 개발이 필요한 시점이므로 *H. pylori*균에 대한 colonization 억제활성 실험을 실시하였고 그 결과, 실험에 사용한 각각의 추출물에서 모두 100 μg/mL의 농도에서 colony의 수(++이하)가 감소하였다. *H. pylori*와 함께 과다한 위산은 위 손상을 유발하는 대표적인 공격인자로 이에 대한 방어효과를 알아보고자 제산력을 확인한 결과 해동피 국산의 H_2O 추출물 및 70% EtOH 추출물이 각각 24.6%, 14.2%로 실험에 사용한 추출물 중 가장 우수한 제산력을 보여 장기간 복용 시 효과가 있을 것으로 기대된다. 자유라디칼은 동물과 사람에서 위장점막에 염증과 손상을 일으키는 병원성 요소로 직접적인 free radical 소거 작용을 측정하기 위한 DPPH 시험법과 환원력 시험법, β-carotene/linoleic acid system을 이용한 지질과산화 억제활성시험을 시행하였다. 이 세 가지 실험에서 실험에 사용한 해동피 및 유사생약의 추출물들은 각각 농도 의존적으로 효과를 나타내는 경향을 보였으며, 추출물 중 해동피 국산 추출물이 가장 효과가 우수하였다. 따라서 해동피 국산 추출물로 항산화 기전을 알아보기 위해 실시한 superoxide radical 소거 작용과 hydrogen peroxide 소거 작용 실험에서 농도 의존적인 효과를 보였다. 이로써 해동피 국산 추출물은 DPPH radical, superoxide radical, hydrogen peroxide를 효과적으로 억제함을 확인하였으며 환원력과 지질과산화 억제능이 있음을 확인하였다.

추출물 중 항산화 활성이 가장 우수하였고, *H. pylori*균에 대한 colonization 억제 작용 및 *in vivo*에서 유의적인 위염 억제 효과를 보인 해동피 국산 추출물은 indomethacin으로 유발한 흰쥐 위궤양 모델에서도 H_2O 및 70% EtOH 추출물이 각각 73.1%, 53.5%로 유의적인 효과를 나타내어 위염 뿐 아니라 위궤양에 대한 억제효과가 있음을 확인하였다. 위장관 손상의 mechanism으로 위장점막내벽(mucosa)의 공격인자 중, 위산과 펩신은 위 점막의 손상을 초래 할 수 있는 주요 위 분비 산물이다. *in vivo* 실험으로 gastric secretion을 실시한 결과, 해동피 국산 H_2O 및 70% EtOH 추출물이 위액의 분비를 줄이고, pH를 상승시켰으며 총 산도를 감소시킴을 확인하였다.

본 실험의 결과로, 해동피 국산 및 중국산, 절동피 국산 및 중국산, 목면피 국산 추출물 중 해동피 국산의 항산화 효과가 가장 우수함을 확인하였고, 해동피 국산은 동물을 이용한 위염 및 위궤양 모델에서도 유의성 있는 효과를 보였다. 따라서 해동피 국산 추출물을 이용한 우수한 건강기능성식품 및 천연물의약품으로서의 개발가능성을 확인 할 수 있었다. 또한 이 결과는 오랜 세월 한약재로 사용되어 온 해동피의 기원이 다른 유사품 및 불량약재의 무분별한 유통, 정확한 기원의 약재에 대한 기준설정, 높아지는 한약재수입 의존도에 따른 위품, 저질품의 혼입 방지와 객관적, 신뢰성 있는 표준 규격 설정에 기여할 것으로 예상된다.

감사의 말

본 연구는 2013년 덕성여자대학교의 지원으로 수행된 것으로 연구비 지원에 깊이 감사드립니다.

요 약

해동피는 약리학적으로 진통, 소염작용이 있어, 허리와 무릎의 통증 등을 치료하는데 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 해동피(*Kalopanax pictus*)의 국산 및 중국산과 그 유사생약으로 사용되는 절동피(*znthoxylum ailanthoides*)의 국산과 중국산, 목면피(*bombax malabaricum*)의 H_2O 및 70% EtOH 추출물의 항위염 효과와 항산화효과에 대해 알아보았다. 먼저 HCl · EtOH로 유발한 흰쥐 위염 모델을 통해 효과를 확인하였고, 위염 및 위궤양, 위암의 원인으로 잘 알려진 *H. pylori*에 대한 colony 억제작용과 대표적 공격인자인 과다한 산에 대한 억제작용을 확인 하고자 제산력 시험법을 실시하였다. 항위염 효과에 대한 항산화 기전으로는 DPPH 시험법, 환원력 시험법, β-carotene/linoleic acid syetem을 이용한 지질과산화 억제활성 시험을 실시하였고, 실험에 사용한 추출물 중 가장 효과가 우수한 해동피 국산 추출물을 이용하여 superoxide radical 및 hydrogen peroxide 소거 작용을 확인하였다. Indomethacin으로 유발한 흰쥐 위궤양 모델에서는 해동피 국산 H_2O 및 70% EtOH 추출물에서 각각 73.1%, 53.5%로 손상을 억제시킴을 확인하였다. 흰쥐를 이용한 gastric secretion 실험으로는 해동피 국산 H_2O 및 70% EtOH 추출물이 위액의 분비를 줄이고, pH를 상승 시켰으며 총 산도를 감소시킴을 확인하였다. 그 결과, 해동피국산 및 중국산, 절동피국산 및 중국산, 목면피중국산 해동피의 항산화 효과가 가장 우수하였으며 해동피 국산은 위염 및 위궤양에서 우수한 효과를 확인하였고, 건강 기능성 식품 및 천연물 의약품으로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었다. 또한, 이 결과를 토대로 오랜 세월 한약재로 사용되어 온 해동피의 기원이 다른 유사품 및 불량약재의 무분별한 유통, 정확한 기원의 약재에 대한 기준 설정, 높아지는 한약재 수입 의존도에 따른 위품, 저질품의 혼입 방지와 객관적, 신뢰성 있는 표준규격 설정에 기여할 것으로 예상된다.

참고문헌

1. 생약학교재편찬위원회: 생약학. 동명사, 경기, pp. 549 (2006).
2. Massimo, R. and Robert, M.G.: Staging and grading of chronic gastritis. *Human Pathol*., **36**, 228-233 (2005).
3. Long, L.H., Evans, P.J. and Halliwell, B.: Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **263**, 605-609 (1999).
4. Nishimiki, M., Rao, N.A., Appaji, N. and Yagi, K.: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced henazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **46**, 849-854 (1972).
5. Subhashinee, S., Wijeratne, K., Susan, L. and Vicky, S.: Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in caco-2 human colon cells. *J. Agric. Food Chem*., **53**, 8768-8774 (2005).
6. Warren, J.S., Kunkel, S.L., Cunningham, T.W., Johnson, K.J. and Ward, P.A.: Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O^{2-}. responses by rat alveolar macrophages. *Am. J. Pathol*., **130**, 489-495 (1988).
7. Yoshikawa, T., Takemura, T., Seto, O., Tanigawa, T., Tainaka, K., Morita, Y., Yoshida, N., Sugino, S. and Kondo, M.: Role of lipid peroxidation and polymorphonuclear leukocytes-derived oxygen radicals in acute gastric lesions induced by hyperthermic treatment. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, **86**, 159-164 (1989).
8. Itoh, M. and Guth, P.H.: Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. Gastroenterology, **88**, 1162-1167 (1985).
9. Mizui, T. and Dodeuchi, M.: Effect of polyamines on acidified EtOH induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol*., **33**, 939-945 (1983).
10. Bae, E.A., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D.H.: *In vitro* anti *Helicobacter pylori* activity of panaxtriol isolated from ginseng. *Arch. Pharm. Res*., **24**, 297-299 (2001).
11. Kim, J.M., Shin, J.E., Han, M.J., Baek, N.I. and Kim, D.H.: Inhibitory effect of ginseng polyacetylenes on infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Natural Product Sciences*, **9**, 158-160 (2003).
12. Uchiyama, M., Suzuki, Y. and Fukuzawa, K.: Biochemical studies of physiological function of tocopherolactone. *Yakugaku Zasshi*, **88**, 678-683 (1968).
13. Oyaizu, M.: Studied on products of browning reaction; antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr*., **44**, 307-315 (1986).
14. Koleva, I.I., Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A. and Evastatieva, L.N.: Screening of plant extracts for antioxidant activity; a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal*., **13**, 8-17 (2002).
15. Nishimiki, M. Rao, N.A., Appaji, N. and Yagi, K.: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced henazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **46**, 849-854 (1972).
16. Kasuya, Y., Urushidani, T. and Okabe, S.: Effects of various drugs and vagotomy on indomethacin-induced gastric ulcers in the rat. *Jpn. J. Pharmacol*., **29**, 670-673 (1979).
17. Choi, C.H., Cha, Y.J., An, C.S., Kim, K.J., Kim, K.C., Moon, S.P., Lee, Z.H. and Min, Y.D.: Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: less involvement of metallothionein. *Cancer Cell Int*., **4**, 6-17 (2004).
18. Shay, H. and Komarov, S.A., Fels, S.S. and Meranze, D.: A simple method for the uniform production of gastric ulcer-

ation in the rat. *Gastroenterol*., **4**, 43-61 (1945).
19. Behera, B.C., Adawadkar, B. and Makhija, U.: Inhibitory activity of xanthine oxidase and superoxide-scavenging activity in some taxa of the lichen family Graphidaceae. *Phytomed*., **10**, 536-543 (2003).
20. Lee, E.B., Li, D.W., Hyun, J.E., Kim, I.H. and Whang, W.K.: Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its fractions. *J. Ethnopharmacol*., **77**, 197-201 (2001).
21. Choi, L., Han, Y.N., Lee, K.T., Park, K.Y., Kwak, T.S., Kwon, S.H. and Park, H.L.: Anti-lipid peroxidative principles from the stem bark of *Kalopanax pictus* Nakai. *Arch. Pharm. Res*., **24**, 536-540 (2001).
22. Choi, J., Huh, K., Kim, S.H., Lee, K.T., Park, H.J. and Han, Y.N.: Antinociceptive andanti-rheumatoidal effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. *J. Ethnopharmacol*., **79**, 199-204 (2002).
23. Hu, W., Lee, S.K., Jung, M.J., Heo, S.I., Hur, J.H. and Wang, M.H.: Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the ethyl acetate fraction of *Kalopanax pictus* leaves in human colon cancer cells. *Bioresour. Technol.,* **101**, 9366-9372 (2010).
24. Bang, S.Y., Park, G.Y., Park, S.Y., Kim, J.H., Lee, Y.K., Lee, S.J. and Kim, Y.: The stem bark of *Kalopanax pictus* exhibits anti-inflammatory effect through heme oxygenase-1 induction and NF-κB suppression. *Immune Netw*., **10**, 212-218 (2010).