

대장내 항염증 작용이 있는 천연 소재의 개발

조성완*

*건양대학교 제약공학과

e-mail:swcho@konyang.ac.kr

Studies on Protective Effect of Herbal medicines against Experimental Inflammotory Bowel Disease Model

Seong-Wan Cho*

*Dept of Pharmaceutical Engineering, Konyang University

요 약

The Efficacy of PSB-2061, was investigated in comparision with prednisolone in acetic acid and Picrylsulfonic acid solution (TNBS)-induced rat inflammatory bowel disease (IBD) for 5 days. 5 % TNBS solution were administered with polyethylene (P.E) tube inserted to rats intracolon, which causing colitis to the rats. The TNBS control group (the saline treated colitic rat) exhibited ulceration and inflammation of the distal colon with formation of granuloma and pathologic connections. We checked the inflammatory parameters like rat's weight, food intake quantity change during administration. After 5 days, we sacrificed the rats and checked the colon's length, ulcer and pathologic condition. Oral treatment with PSB-2061 resulted in significant recovery of macroscopic parameters like weight and diet intake change. Especially, PSB-2061 extract had a more potent effect than mesalazine® on macroscopic colonic damage score. We can suggest that PSB extract could be a promising drug in the treatment of IBD.

1. 서 론

염증성 대장염 질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)은 일종의 반복적으로 발생하는 난치성 소화기 계통의 장 질환으로 지난 수십 년간 전 세계적으로 많은 연구자들에 의해 연구되어 오고 있으나 이러한 노력에도 불구하고 이 질환의 병인과 병태생리 및 효과적인 치료는 여전히 불분명한 상태이다 [1-2]. IBD는 임상에서는 흔히 복통, 설사 및 농혈 점액변이 주요한 증상이며 병변은 점막 및 점막 하층에서 주로 나타나고 병리학적으로 볼 때 궤양이 형성되고 농양돌기가 되고 작은 혈관염증, 배상세포의 감소 및 각종 유형의 염증 세포가 생성되는 등의 비 특이성 증상이 있다. 특히 궤양이 형성된 후 IBD 환자의 13 %정도가 대장암으로 진행되는 것으로 보고되고 있다 [3-4]. 현재까지 인정되고 있는 병인을 보면 흡연이나 식이와 같은 환경적 요인, 유전적 요인 또는 세균 감염 등이 그 원인으로 제시되고 있으며, 각 인자들은 단독 또는 복합적으로 관여할 수 있는데 특히 유전학적 소인이 있는 사람은 원인 혹은 유발 인자에 노출되어 장 점막에 염증 및 면역반응이 초래되고 이 반응이 소멸되지 않고 비정상적으로 지속 증폭되어 만성적인 조직 손

상을 일으키는 상태로 알려져 있다. 증상의 악화와 회복단계를 반복하는 특징을 지닌 만성 질환으로 장기간 치료를 요하는 IBD질환은 과거 유럽이나 미국 등 육식을 주로 하는 서구에 흔한 질병으로 알려져 왔으나 최근 10년간 전 세계적으로 발병률은 급격하게 증가되는 것으로 보고하고 있으며, 우리나라에서도 식단의 급격한 서구화로 인하여 최근의 발병률을 기준으로 전망해 보면 조만간 서구의 발병율과 거의 유사하게 접근할 것으로 예상하고 있다. IBD의 치료를 위하여 살리실산과 스테로이드 제제가 현재까지 염증성 장 질환의 주 치료 약물로서 사용되고 있으나 이런 약물들은 장기적으로 복용할 때 약물의 용량과 관련하여 부작용과 독성 그리고 내성이 생기게 된다 [5-6]. 따라서 천연자원으로부터 새로운 고 부가 가치의 식품 소재 및 대장 염증 질환을 목표로 하는 신 개념의 항염증 기능성 소재를 발굴하는 것은 매우 중요한 의미를 갖는다 할 수 있다.

생약물질인 Phaseolus calcaratus의 유효물질인 PSB-2061은 미나리과에 속하는 다년초로 궤양성 대장염 치료제로 개발 중인 후보물질로서 천연에 많이 존재하는 물질로서 독성이 적은 매우 안전한 화합물로 예상되고 있다.

본 연구에서는 PSB-2061의 염증성 장 질환 치료제로서의 가능성을 검토하고자 TNBS를 사용하여 만성 염증성 장 질환이 유발된 Rat모델을 이용하여 그 효력을 평가하여 유의한 치료효과를 얻었기에 보고하고자 한다.

2. 기기 및 시약

2.1 시약

시험 약물로는 Phaseolus calcaratus에서 추출한 PSB-2061을, 대조약물로는 심한 궤양성 대장염 환자의 치료에 사용하는 Mesalazine을 생리식염수에 용해하여 사용하였다. IBD 유발 물질로는 TNBS 5% 용액 (picrylsulfonic acid solution, trinitrobenzene sulfonic acid, SIGMA, U.S.A)를 사용하였다.

2.2 실험동물

7주령 수컷의 Sprague-Dawley 계통의 rat (200-230g)를 오리엔트사에서 구입하여 일반 동물실험실에서 순화 사육한 후에 시험에 사용하였다. 사육환경은 온도와 습도, 조명시간을 일정하게 유지하였으며, 동물은 Cage당 한 마리씩 분리하여 수용하였다. 사료는 rat용 고형사료를, 음수는 일반 수도수를 자유 섭취 시켰다.

3. 실험 방법

3.1 TNBS-유도 IBD 모델

24시간 절식시킨 7주령의 흰 쥐에 길이 8 cm의 polyethylene 튜브 (직경0.76 mm)를 항문으로 밀어 넣은 후 TNBS용액을 주입하여 대장염을 유발하였다. TNBS는 5% 용액을 한 마리당 1 ml의 용량으로 0.1 ml씩 직장을 통하여 천천히 점적 주사하여 주입하였다 [7-9]. TNBS 주입 후 24시간 후부터 5일 동안 1일 1회씩 Rat용 존데를 이용하여 약물을 경구로 투여하였다. 시험군과 대조군, 비교군은 초산을 이용한 동물 모델과 동일하게 설정하여 사용하였다.

3.2 평가방법

3.2.1 중량 변화

5% TNBS로 대장염 유발을 하기 직전과 유발 후 경구 투여하기 직전 각 동물의 체중을 매일 측정하여 각 동물의 체중 감소량을 확인하였다. 체중감소

량은 대장염 유발을 하기 직전의 체중에 대한 그 날의 체중의 비율로 나타내었으며 그 식은 아래 (1)과 같다.

$$\text{무게변화}(\%) = \frac{D_x}{D_1} \times 100 \quad \text{----- (1)}$$

(D_x : X일째의 체중, D_1 : 유발 전 체중)

3.2.2 식이섭취량 및 설사

5% TNBS로 대장염 유발한 후 각 동물의 사료무게를 50 g으로 하고 24시간 후부터 매일 경구투여하기 직전 사료의 감소량을 측정하여 각 동물의 식이섭취량을 확인하였다. 식이섭취량변화는 대장염 유발을 하기 직전의 식이섭취량에 대한 그 날의 식이섭취량의 비율로 나타내었으며 그 계산식은 다음 식 (2)와 같다.

$$\text{식이섭취량변화}(\%) = \frac{F_x}{F_1} \times 100 \quad \text{----- (2)}$$

(F_x : X일째의 식이섭취량 F_1 : 유발 전 식이섭취량)

3.2.3 결장 길이, 무게 및 형태

마지막 약물투여 후 24시간 후에 각 군의 동물들을 에테르 마취하에 희생 시킨 후 부검을 실시하고 대장을 적출하여 직장 쪽으로 부터 3.5 cm를 제외한 부분의 대장의 길이 및 무게를 측정하였다. 또한 대장벽의 두께 정도를 측정하고 대장을 절개하여 궤양 및 염증상태의 육안병변을 Wallace의 기준을 응용하여 절개된 대장의 발적, 궤양유무 그리고 궤양의 크기에 따라 0에서 10까지 정하였고 그 기준에 따라 점수화하였다 [10-15].

4. 결 과

4.1 체중 변화량

TNBS 5 w/v%로 대장염을 유발하기 직전과 매일 경구투여하기 직전 각 동물의 체중을 측정하여 각 동물의 체중감소량을 확인하였다. 체중감소량은 대장염 유발을 하기 직전의 체중에 대한 그 날의 체중의 비율(%)로 나타내었다. 음성 대조군을 제외한 모든 군에서 투약 직후부터 체중은 꾸준히 증가하는 양상을 보였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다. 특히 하게, 적소두의 에탄올 수용액 추출물이 적소두 물 추출물 대비 체중 증가 효과가 탁월하였다.

[표 1] 실험동물에서의 체중 변화량

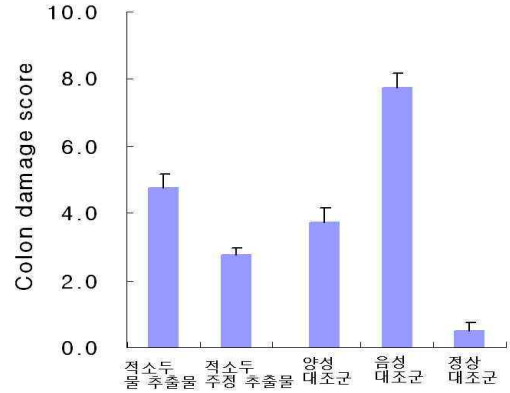
추출물명	투여 5일 후의 평균 체중 증가 백분율(%)
적소두 물 추출물	7%
적소두 50% 주정 추출물	21%
양성 대조군 (mesalazine)	21%
음성 대조군	-3%
정상 대조군	22%

4.2 설사발생률 평가

TNBS 5 w/v%로 대장염을 유발하고 난 24시간 후 매일 경구투여하기 직전 각 동물의 설사의 유무를 확인하였다. 적소두 에탄올 수용액 추출물 투여군은 3일 이후부터 변의 양이 줄어들면서 냄새가 심해졌다가 나날이 그 정도가 감소하였고, 4일째에는 네 마리 모두 변의 양이 줄어들었는데 정상 쥐들에 비해 단단하고 된 변을 보였다. 적소두 물 추출물 투여군 또한 음성 대조군 대비 개선되는 결과를 나타내었으나, 그 효과는 적소두 에탄올 수용액 추출물 투여군보다 떨어졌다. 양성 대조군 투여 후 4일째까지 피가 섞인 설사를 조금 했지만, 5일째부터는 상태가 나아졌다. 정상 대조군의 경우에는 정상 변의 형태를 나타내었다.

4.3 대장(colon)의 형태 평가

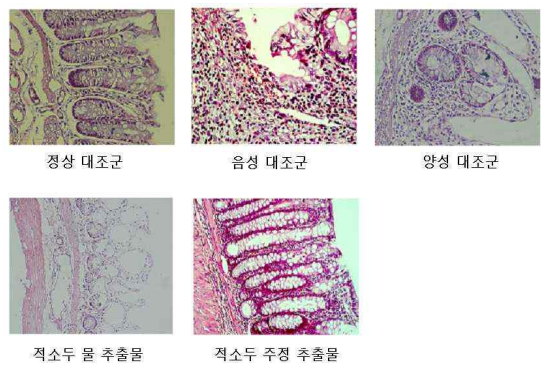
대장의 벽두께를 측정하고 대장을 절개하여 궤양 및 염증상태의 육안 병변을 점수화하였다. 정상군과 비교하여 보았을 때 대장의 형태는 적소두 추출물 투여 군에서 상대적으로 정상 형태를 띠고 있음을 관찰할 수 있었다. 양성 대조군은 대장의 형태가 정상군에 비하여 상대적으로 손상의 정도가 심하다는 것을 관찰할 수 있었다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 또한 대장의 벽 두께 정도를 측정하고 대장을 절개하여 반으로 자른 후, 궤양 및 염증상태의 육안 병변을 그림 1에 나타내었다. 그림 1에 나타나는 바와 같이, 적소두 에탄올 수용액 추출물의 효과가 가장 뛰어났으며, 적소두 물 추출물의 효과는 양성 대조군보다 약간 떨어졌다.



[그림 1] TNBS로 유발된 급성 염증성 대장염 실험 모델 rat에서의 대장 손상 정도. (평균±표준오차).

4.4 염색학적 소견 평가

대장을 적출하여 실체현미경으로 관찰한 결과 음성 대조군의 경우는 대장의 병변이 확인 가능하여 IBD가 유발됨을 확인할 수 있었으나, 시험군인 적소두 추출물 투여군의 경우는 병변의 정도가 완화되었음을 관찰할 수 있었다. 또한 H&E 염색 결과에서 관찰할 수 있는 것처럼 궤양성 대장염(IBD)이 유발된 음성 대조군은 점막하조직 상의 염증세포 침윤, 상피세포의 파괴, 점액세포의 파괴 등의 염증 소견이 관찰되었지만, 양성 대조군 및 적소두 추출물 투여군에서 점액세포, 선와 등이 정상적인 형태를 보여 치료 효과를 나타내는 것으로 사료되었다. 또한 적소두 에탄올 수용액 추출물 투여군이 적소두 물 추출물 투여군 보다 더 우수한 개선 효과를 나타내었다. 그 결과를 그림 2에 나타내었다.



[그림 2] TNBS로 유발된 만성 염증성 대장염 실험 모델 rat에서의 H&E 염색.

5. 고 찰

IBD는 병변의 주요부위가 점막과 점막하층으로 염증과 궤양으로 나타나며 먼저 직장에서 발생하

여 점차 상부로 확산되며 전체 결장으로 까지 퍼지게 된다. 흔히 쓰이는 약물인 살리실산과 스테로이드 제제는 궤양성 대장염 치료에 80% 정도의 효과가 있는 것으로 보고 되었으며 가장 좋은 효과를 유지하는 방안도 재발율을 50% 정도 밖에 낮추지 못하여 대부분의 치료제들은 부작용 때문에 그 사용이 제한을 받고 있다 [16]. 그러므로 새로운 약물과 그 치료방법을 개발하는 것은 IBD 치료제 연구의 핵심중의 하나라고 할 수 있지만 인체실험의 국한적 요인들로 말미암아 동물 모델로 발병원인 및 발병기전을 연구하는 것은 이미 약물 개발의 중요한 평가 수단 하나가 되었다 [3]. IBD의 동물모델로는 여러 가지가 알려져 있는데, 그 중 picrylsulfonic acid(TNBS)를 이용한 염증성 대장염 rat모델은 사람의 IBD와 병태생리가 유사하고 만성염증을 유발할 수 있어 치료제의 효력연구 및 기전 연구에 많이 이용되고 있는 모델이다 [12]. 본 연구에서는 가장 일반적으로 사용되고 있는 동물 모델을 이용하여 IBD를 실험적으로 유발하고 PBS-2061을 투여하여 그 치료제로서의 가능성을 평가해 보고자 하였다. PSB-2061은 TNBS로 유도된 염증성 대장염 모델 모두에서 치료약물인 Mesalazine의 효과에 필적할 수 있는 우수한 치료 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 특히 대장의 손상 정도 평가 실험에서 양호한 결과를 나타내어 염증성 대장염의 치료제로서의 개발 가능성을 보였으며 이러한 결과를 바탕으로 생약 물질의 각 성분에 대한 약리 작용을 규명하는 방향으로 진행 되어 체계적인 실험이 이루어진다면 향후 염증성 대장염 치료제로서 개발 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 (유) 한풍제약의 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

[1] J. Andrews et al., "Inflammatory bowel disease-its history, current status and outlook", *Am. J. Med.* 100:656-659, 1996.
 [2] C. O. Elson et al., "The basis of current and future therapy for inflammatory bowel disease", *Med. J. Aus.* 160:219-225, 1994.
 [3] H. D. Yuan et al., "The effects of Curcumin on the Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis

in the Rat", *Cancer prevention research* 11:137-143, 2006.
 [4] S. A. Weitzman et al., "Inflammation and cancer, role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis", *Blood* 76:655-663, 1990.
 [5] 안중환, 황련해독탕이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. 동국대학교 석사학위논문, 2005.
 [6] 최규완, 한국인의 염증성 장질환, 대한내과학과 추계학술대회지, 1996.
 [7] B. O. Ahn et al., "Beneficial Effect of DA-9601, an Extract of Artemisiae Herba, on Animals Models of Inflammatory Bowel Disease", *The Journal of Applied Pharmacology* 5:165-173, 1997.
 [8] Y. S. Kim, et al., "Effect of DA-6034, a Derivative of Flavonoid, on Experimental Animal Models of Inflammatory Bowel Disease", *Archives of Pharmacol Research* 22: 354-360, 1999.
 [9] M. W. Son, et al., "Effect of Taurine on TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease in Rats", *Archives of Pharmacol Research* 21: 531-536, 1998.
 [10] J. L. Wallace et al., "Release of platelet-activating factor (PAF) and accelerated healing induced by a PAF antagonist in animal model of chronic colitis", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66:422-425, 1988.
 [11] R. B. Sartor et al., "Granulomatous enterocolitis induced in rats by purified bacterial cell wall fragments", *Gastroenterology* 89:587-595, 1985.
 [12] 최윤경, "Inhibitory Action of Sinapinic Acid on Trinitrobenzen Sulphonic Acid(TNBS)-induced Colitis", 중앙대 석사학위논문, 2006.
 [13] J. Vilaseca et al., "Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model granulomatous colitis", *Gut* 31: 539-544, 1990.
 [14] 손홍문, "The Study on the Effects of Gliotoxin on TNBS-induced Colitis", 원광대학교 박사학위논문, 2003.
 [15] J. M. Oh, et al., "Protects against TNBS Induced Colitis Through HO-1 Induction", *The Korean J. Anat.* 37:459-466, 2004.
 [16] Y. Q. Ou, Recent advances in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and its therapy, *Chinese J. Digest.* 23:453-454, 2003.