

## Dextran Sulfate Sodium 유도 마우스 대장염에 미치는 오미자와 매실의 상승효과

장선일, 목지예, 최효정, 전인화, 이강수\*\*, 윤용갑\*  
전주대학교 대체의학대학 건강관리전공, \*\*전북대학교 농업생명과학대학,  
\*원광대학교 한의과대학 방제학교실

### ABSTRACT

## Synergic Effect of Methanol extracts of *Schizandrae* Fructus and *Mume* Fructus on Experimental Mouse Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium

Seon-Il Jang, Ji-Ye Mok, Hyo-Jung Choi, In-Hwa Jeon, Kang-Soo Lee\*\*, Young-Gab Yun\*  
School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeonju University,  
\*\*Faculty of Biological Resources Science, Jeonbuk National University,  
\*Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University

The fruits of *Schisandra chinensis* and *Prunus mume* have been traditionally used in the Oriental countries as an astringent against diarrhea and abdominal pain, a protectant for liver disease, an antimicrobial, and a blood tonic. However, little is known about the extract of *Schizandrae* Fructus and *Mume* Fructus (SMF-Ex) on dextran-sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. In this study, we investigated the protective effects of SMF-Ex on DSS-induced colitis in mice.

- 
- 교신저자 : 윤용갑
  - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 방제학교실
  - Tel : 063-850-6834 Fax : 063-856-5056 E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr
  - 접수 : 2009/ 11/ 30 수정 : 2009/ 12/ 09 채택 : 2009/ 12/ 11

An experimental colitis was induced by daily treatment with 5% DSS. SMF-Ex was orally administrated the single dose (80 mg/kg, body weight/day) for 7 days with one time per day. SMF-Ex reduced significantly clinical sign of DSS-induced colitis, including body weight loss, shorten colon length, increased disease activity index (DAI), and histological colon injury. SMF-Ex also inhibited significantly nitric oxide (NO) and prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) productions in DSS-induced colitis mice. Futhermore, SMF-Ex increased significantly an superoxide anion (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (Gpx) activity of the colon tissue in DSS-induced colitis mice. These results suggest that SMF-Ex administration could reduce significantly the clinical signs and inflammatory mediators, and increase antioxidant activity in DSS-induced colitis model mice and is a good candidate for further evaluation as an effective anti-ulcerative agent.

**Key word :** *Schizandrae* Fructus and *Mume* Fructus (SMF-Ex), Ulcerative colitis, Antioxidant activity, Dextran sulfate sodium (DSS)

## 1. 서 론

한방에서는 오미자와 매실은 모두 수렴, 지사 효능이 있어 설사를 동반한 위장질환에 널리 사용되어왔다<sup>1-7</sup>. 오미자 열매(*Schizandrae* Fructus)는 전통적으로 한국과 중국에서 호흡곤란, 기침, 입마름증, 다한증, 각종 발한증, 몽정, 이질, 불면증 및 기억상실증 등 다양하게 인체에 사용해왔다<sup>1,3,6</sup>. 오미자 열매에 대한 최근의 약리학적 연구는 schizandrin A, B and C, schizandrol A and B, schizandrer A and Blignauralcludiiz schizandrin A, B와 C, schizandrol A와 B 그리고 schizandrer A와 B를 대상으로 지질산화작용을 억제하고<sup>8</sup>) glutathione 매개 항산화작용을 증진시키는 결과를 얻어 보고하였다<sup>9,10</sup>.

매실(*Mume* Fructus)은 한국과 일본을 비롯한 동양에서 전통적으로 위장 및 간질환과 혈행 개선을 비롯한 동양에서 사용하고 있다. 최근에 매실

에서 분리된 MK615 화합물은 유방암, 대장암 및 결장암 등 세포주의 증식을 억제하며<sup>11,12</sup>, 특히 결장암 세포주로 알려진 SW480, COLO 및 WiDr 등 암 세포에 효과적으로 아포토시스를 유도하는 것으로 알려졌다<sup>12</sup>. 또한 매실은 flavonoid계 및 phenolic acid와 같은 natural phenolic계 phytochemical들이 다량 함유되어 있어 항산화 및 암세포 증식을 억제하는 효과가 있다<sup>13,14</sup>.

최근에 우리는 오미자와 오수유(*Evodia rutaecarpa*) 추출 혼합물이 dextran-sulfate sodium (DSS) 유도 대장염 모델 동물에서 대장염의 임상적 증후를 개선하는 효과를 보고하였다<sup>15</sup>. 그러나 오미자와 매실 추출 혼합물에서 DSS 유도 대장염의 개선에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다.

궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)은 유전성 염증 질환으로, 직장 염증을 시작으로 악화되면 대장 내층이 파괴되면서 병원성 세균뿐만 아니라 대장균과 같은 장내세균도 침입되어 면역체계를

자극하여 대장 전체로 확산될 수 있다. UC은 직장출혈, 설사, 복통, 체중감소 및 발열과 같은 임상적 특징을 나타내는데, 이것이 결장(colon)에 만성적이고 특발성적인 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)이다<sup>16)</sup>. UC의 조직학적 소견은 결장 간질(colonic interstitium)에 호중구(neutrophils), 단핵구와 림프구 등 백혈구가 유입되어 염증을 야기하는 것으로 알려졌다<sup>17)</sup>. 이러한 염증반응은 수많은 활성산소를 대량 생산하여 조직손상을 더욱 악화시킬 뿐만 아니라 심각한 질환을 야기할 수 있다.

산업화되기 전에 아시아 태평양 전 지역에서 IBD와 같은 UC는 매우 희귀한 질환으로 여겨졌지만, 현재는 한국과 중국을 포함한 아시아 전 지역에서 발견되는 염증성 장 질환임이 보고되었다<sup>18-20)</sup>. 스테로이드와 salicylazosulfapyridine이 UC 치료에 사용되어 왔지만, 심각한 부작용이 나타나 큰 임상적 문제점으로 남아있다. 그러므로 한국 및 중국을 비롯한 동양권에서 전통적으로 사용되는 항염증 및 항산화 소재를 활용하여 UC를 치료할 수 있다면 새로운 소재의 발굴과 함께 그 관심이 증가되고 있다<sup>21)</sup>.

따라서 우리는 이 연구에서 오미자와 매실을 메탄올로 추출하고 혼합하여 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 임상적 증후에 대한 개선 효과와 항산화 효과를 조사한 결과 오미자와 매실을 단독 투여한 경우에 비해 오미자와 매실 추출물을 혼합하여 투여할 때, 그 효과가 상승적으로 나타나는 흥미로운 결과를 얻어 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시 약

DSS (mol wt, 36,000-50,000)은 MP biomedical사(LLC, France)로부터 구입했다. Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> assay kit는 R&D System사(MN, USA)로부터 구입했으며, nitric oxide (NO) colorimetric

assay kit는 Biovision사(CA, USA)로부터 구입했다. Superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (Gpx) 등의 assay kit는 Calbiochem사(CA, USA)로부터 구입했다. Paraformaldehyde, hematoxylin, eosin과 기타 reagent급 시약은 Sigma - Aldrich Chemical사(Louis, MO, USA)로부터 구입했다.

### 2. 오미자와 매실

오미자 열매(*S. chinensis*)와 매실(*Prunus mume*)은 전라북도 장수군의 농가 제품을 구입하였고, 표본(2009-Jansu-SC와 2009-Jansoo-PM)은 원광대학교 한의과대학 방제학교실 약재 보관실에 보관하였다.

### 3. 추출물의 제조

잘 건조된 오미자(200 g)와 매실(200 g)을 유리 용기에 넣고, 메탄올을 충분히 넣어 1주일 동안 방치한 후, 0.45 µm 필터를 이용하여 여과하였다. 여과액은 회전증발기(EYELA, J, an)로 메탄올을 약 80% 증발시키고, 증류수 100 ml을 첨가하여 동결건조기(ilShin Lab, Korea)로 완전히 건조하여 추출물 약 20 g을 얻고, -20°C에 보관하면서 실험 80%했다. 추출물은 인산완충액(H, 7.0) 8ml 부유시켜 존테(feeding needle, Sonde)를 이용하여 마우스에 경구 투여하였다.

### 4. 실험동물

10주령의 수컷 NC/Nga 마우스는 중앙실험동물(주)(서울)로부터 구입하여 1주간 낮과 밤의 주기를 12시간씩 고정하여 사료(중앙실험동물(주))와 멸균 물을 공급하면서 사육한 후 실험에 사용하였다. 실험은 전주대학교 동물윤리위원회의 규정에 따라 수행하였다.

### 5. DSS 유도 대장염 모델과 추출물의 투여

급성 대장염의 유도는 무균 정제수에 DSS을 5%되게 적정하여 7일간 투여했다<sup>22,23)</sup>. 대조군은 모든 실험 기간 동안 정제수와 식염수를 투여했다. 양성 대조군은 5% DSS을 자연스럽게 공급하였고, 5% DSS와 오미자(*Schizandrae Fructus extract*, SF-Ex), 매실(*Mume Fructus extract*, MF-Ex)은 마우스 체중 kg 당 25-75 mg를 각각 경구투여하였고, 오미자와 매실(*Schizandrae Fructus plus Mume Fructus extracts*, SMF-Ex)은 마우스 체중 kg 당 100 mg를 투여했다. 투여할 때 약물의 양은 마리당 200  $\mu$ l를 하루에 1회씩 7일간 존데(feeding needle, Sonde)를 이용하였다. 실험기간 중 마지막으로 DSS 용액과 약물이 투여된 마우스는 24시간 후에 희생시켰다.

## 6. DSS 유도 대장염 임상적 증후 평가

DSS을 투여하면서 질병의 진행 상태는 질병활성지수(disease activity index, DAI)로 평가했으며 범위는 0-10으로 구분하였다<sup>23,24)</sup>. DAI는 체중감소, 설사, 직장출혈 등 3가지 주요 변화를 중심으로 평가했다. 체중감소 평가는 실험시작 직전부터 1일 간격으로 7일 동안 측정하였고, 설사는 결장에 형성된 연속적인 용액상태의 배설물의 상태를 조사하였으며, 설사에 의한 배설물의 출혈흔과 직장의 출혈 등을 조사하여 이들의 지수를 종합하여 계산하였다.

## 7. 혈청의 분리

실험이 종료된 마우스는 에테르로 마취하여 복강을 절개하고 간 문맥(hepatic portal vein)에서 약 600  $\mu$ l을 채혈하여 4°C에서 12시간 방치한 후 3,000 rpm으로 원심하여 상층액의 혈청을 얻어 NO와 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다.

## 8. NO와 PGE<sub>2</sub>

혈청 내 염증 매개물질인 NO와 PGE<sub>2</sub> 함량을 측

정하기 위해서 NO는 Biovision사가 제공하는 assay kit와 측정 방법에 따라 수행하였다. PGE<sub>2</sub>는 R&D System사가 제공하는 ELISA assay kit와 방법에 따라 각각 측정하였다. 요약하면, 혈청을 10배 또는 25배 희석하여 각 well에 주입하고 R&D System사가 제공하는 표준시료를 주입하여 제조회사에서 제시하는 방법에 준하여 측정하였다.

## 9. 결장의 길이와 조직 용출액의 준비

실험이 종료된 마우스를 대상으로 혈액을 얻은 후 장을 정리하고 결장을 적출하였다. 적출된 결장의 설사 및 출혈 상태를 조사하고, 디지털 캘리퍼(Mitutoyo, Japan)로 결장의 길이를 측정하였다. 대조군과 실험군의 결장 길이를 비교하기 위해 모눈종이 위에 결장과 측정자를 올려놓고, 카메라(Canon, Japan)로 촬영하여 계측하였다. 적출된 결장의 일정 부위를 선정하고 약 30 mm를 떼어낸 후, 결장 내 잔여 분뇨를 인산완충액으로 잘 세척하고, 물기를 제거한 다음 Invitrogen사(CA, USA) 제공하는 tissue lysis 완충액을 소량 주입하고 안과용 가위를 사용하여 세절하였다. 잘 세절된 시료에 Invitrogen사가 제공하는 방법에 준하여 tissue lysis 완충액과 단백질분해 억제물을 주입한 후 Vibra cell 초음파분쇄기(Sonics & Materials, CA USA)를 사용하여 조직을 용출시키고, 지방을 제거하기 위해서 거즈를 통과시킨 후 10,000 rpm으로 10분간 원심하여 상등액을 얻고, -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 10. SOD, catalase 및 Gpx 측정

SOD, catalase 및 Gpx의 활성의 측정은 Calbiochem사(CA, USA)가 제공하는 assay kit를 사용하여 회사가 제공하는 방법에 준하여 수행했다. 앞서 준비된 조직 용출 시료를 대상으로 Biorad사(CA, USA)가 제공하는 단백질 assay kit를 활용하여 단백질을 정량 하였다. 그 후 Calbiochem사가 제공

하는 방법대로 수행하여 Multiple spectrophotometer (Molecular Devise, CA USA)을 활용하여 SOD (450 nm), catalase (540 nm) 및 Gpx (340 nm)의 활성을 측정하였다. SOD의 활성은 ml당 Unit로, catalase는 ml/min 당 nM로, Gpx는 ml/min 당 nM로 각각 계산하였다.

### 11. 조직학적 평가

적출된 결장 내 잔여 분뇨를 인산완충액을 사용하여 깨끗이 제거하고 4% paraformaldehyde를 주입하여 4°C 냉장 상태에서 24시간 고정 후 전북대학교 임상연구센터에 의뢰하여 파라핀 조직표본을 제작하여 5 µm로 각 조직표본을 절편하였다. 조직학적 검사와 백혈구 침윤을 검사하기 위해서 hematoxylin & eosin으로 염색하여 저배율(X40)에서 관찰하고 확대하면서 X200 현미경 시야에서 사진을 찍어 제시하였고, 백혈구의 침윤을 확인하기 위해서 X400 현미경 시야에서 검경하였다(Olympus, 일본). 조직학적 소견은 2명의 블라인드 병리학자에게 의뢰하여 판명하였으며, 조직학적 스코어(histopathological score)는 crypt distortion의 수, muco-secretive capability의 감소, severe ulcers의 비율 및 inflammatory infiltrate량 등을 합산하여 0-15로 계산하였다. Inflammatory score는 과립백혈구(granulocytes)/괴양 두께(ulcer thickness)의 비율을 적용하여 0-5로 계산하였다.

### 11. Statistical analysis

모든 실험값은 평균±표준오차(mean±SE)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 한계는  $P<0.05$ 로 정하였다.

## III. 결 과

### 1. DSS 유도 대장염에 대한 오미자 플러스 매실(SMF-Ex)의 효과

우리는 오미자(SF-Ex)와 매실(MF-Ex) 투여가 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 오미자와 매실의 농도를 각각 20-80 mg/kg의 농도로 DSS와 동시에 7일간 투여하였다. 그 결과 Fig. 1A와 B와 같이 20 mg/kg의 저농도의 SF-Ex와 MF-Ex 투여군에서는 체중의 감소율이 DSS만 투여한 양성 대조군에 비해 차이가 없었으나, 40 mg/kg과 80 mg/kg 투여군에서는 유의하게 체중의 감소가 억제되었다( $p<0.05$ ). 두 약물의 체중감소 억제 비율은 MF-Ex에 비해 SF-Ex의 효과가 더 좋았다.

이러한 SF-Ex와 MF-Ex의 체중감소 억제비율에 유의한 효과가 있는 약물 농도인 80 mg/kg을 선택하여 오미자와 매실 추출물을 동량 혼합하여 SMF-Ex를 제조하고, 마우스 kg 당 80 mg을 DSS와 동시에 7일간 투여했다. 그 결과 Fig. 1C와 같이 SMF-Ex 투여군은 DSS만 투여한 양성대조군에 비해서 현저히 체중감소를 억제하였을 뿐만 아니라 SF-Ex와 MF-Ex 단독 투여군에 비해 그 효과가 좋았으며( $p<0.01$ ), 음성대조군의 체중과 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과는 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 오미자와 매실을 단독으로 투여하는 것 보다는 혼합하여 투여하는 것이 대장염 치료에 효과가 있음을 제시해 주었다. 따라서 다음 실험부터는 SF-Ex, MF-Ex 및 SMF-Ex 투여 농도는 모두 80 mg/kg으로 정하여 약물의 효과를 비교하였다.

DSS 유도 대장염 모델 마우스의 결장 길이와 질병활성지수(disease activity index, DAI)에 미치는 SF-Ex, MF-Ex 및 SMF-Ex의 효과를 조사하였다. Fig. 2A와 같이 음성대조군의 결장 길이에 비해 DSS만 투여한 양성대조군의 결장 길이는 현저히 줄어든 반면, MF-Ex과 SF-Ex 투여군은 결장 길이의 감소가 억제되었으며( $p<0.05$ ), SMF-Ex 투여군에서는 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 결장 길이가 줄어들지 않았다( $p<0.01$ ).

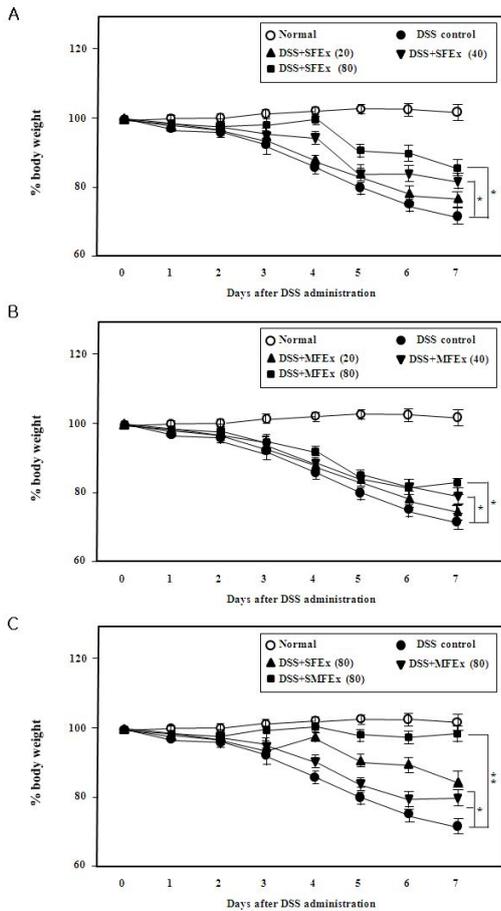


Fig. 1. Synergistic effect of SMF-Ex on body weight in DSS-induced colitis mice.

Mice were given 5% DSS for 7 days. SF-Ex (A) or MF-Ex (B) was administrated orally at various doses (20, 40 and 80 mg/kg) for 7 days. SMF-Ex was administrated orally at singl dose (80 mg/kg) for 7 days. Body weight (BW) was measured daily and means  $\pm$  SE of percent BW are plotted. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ < 0.01 on day 7 indicate significant differences with extract untreated control group (DSS alone).

또한 DAI의 경우도 Fig. 2B와 같이 결장 길이의 변화와 유사한 결과 얻었다. DSS만 투여한 양성 대조군의 경우 설사, 출혈, 혈흔분뇨 등 심각한 전형적인 대장염 질환 증세를 보인 반면, MF-Ex과 SF-Ex 투여군은 양성 대조군에 비해

개선되는 효과를 보였으며( $p$ <0.05), SMF-Ex 투여군은 대장염 질환 증세가 매우 호전되었다( $p$ <0.01). 이러한 결과는 DSS 유도 대장염 증후에 SMF-Ex가 가장 좋은 효과를 보여 대장염 치료에 좋은 후보로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

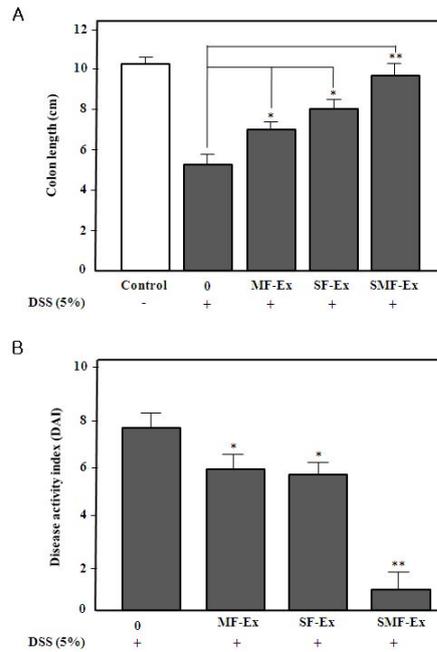


Fig. 2. Effect of SMF-Ex on colon length and disease activity index (DAI) rate in DSS-induced colitis mice.

Mice were given 5% DSS for 7 days. MF-Ex, SF-Ex or SMF-Ex was administrated orally at singl dose (80 mg/kg) for 7 days. Colon length (A) and DIA (B) was measured on day 7. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ < 0.01 on day 7 indicate significant differences with SMF-Ex untreated control group (DSS alone).

## 2. DSS 유도 결장조직 손상에 대한 오미자 플러스 매실(SMF-Ex)의 효과

우리는 SF-Ex, MF-Ex 또는 SMF-Ex 투여가 DSS 유도 대장염 모델 마우스의 결장 조직 손상에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 각

실험군의 결장 형태와 조직을 hematoxylin과 eosin 으로 염색하여 조사하였다. Fig. 3의 A-E는 결장의 형태적 특징으로 Fig. 2A에서 보여준 바와 같이 DSS만 투여한 양성대조군에 비해 SF-Ex와 MF-Ex 투여군이 유의하게 증가되었고, SMF-Ex 투여군은 조직의 내용물에서 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 차이가 있었지만 결장의 길이는 유사했다.

DSS 유도 대장염 모델 마우스 조직의 변화에 미치는 SF-Ex, MF-Ex 또는 SMF-Ex의 효과는 Fig. 3F-J에서 보여주는 바와 같다. DSS만 투여한 양성대조군의 경우 조직의 손상이 crypt distortion의 수, muco-secretive capability의 감소, 궤양 등 심각한 수준이었다. MF-Ex 투여군은 조직손상이 약간 개선되는 효과를 보였고, SF-Ex 투여군은 MF-Ex 투여군보다 개선효과가 좋았다. SMF-Ex 투여군은 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 현저한 개선 효과가 있었다.

DSS 유도 대장염 모델 마우스의 조직학적 스코어(histological score)와 염증반응침윤 지수(inflammatory infiltrate)를 조사한 결과 Fig. 4A와 B에서 보여준 바와 같이 DSS 단독 투여 양성대조군은 심각한 상태로 조직이 손상되었을 뿐만 아니라 염증반응을 야기하는 과립백혈구와 림프구의 침윤이 현저히 높았다. 그러나 SF-Ex와 MF-Ex 투여군의 경우 양성 대조군에 비해 조직손상의 개선과 염증반응침윤 지수가 낮아짐을 확인할 수 있었고( $p<0.05$ ), SMF-Ex 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 조직손상과 염증반응이 현저히 개선되는 효과를 보였다( $p<0.01$ ).

### 3. DSS 유도 대장염 마우스 혈청의 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 오미자 플러스 매실(SMF-Ex)의 효과

한편 SF-Ex, MF-Ex 또는 SMF-Ex 투여가 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 염증 매개물질

로 잘 알려진 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 우리는 실험이 종료된 마우스의 간문맥으로부터 혈액을 얻어 혈청을 분리하여 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5A와 B에서 보여준 바와 같이 DSS만 투여한 양성대조군에서는 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성이 매우 높았지만, SF-Ex와 MF-Ex 투여군에서는 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성이 유의하게 억제되었고( $p<0.05$ ), SMF-Ex 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성이 현저히 억제 되었다( $p<0.01$ ). 이러한 결과는 SF-Ex와 MF-Ex 투여군보다 SMF-Ex 투여군이 염증 매개물을 현저히 줄여줄 수 있는 효과가 있음을 제시해주었다.

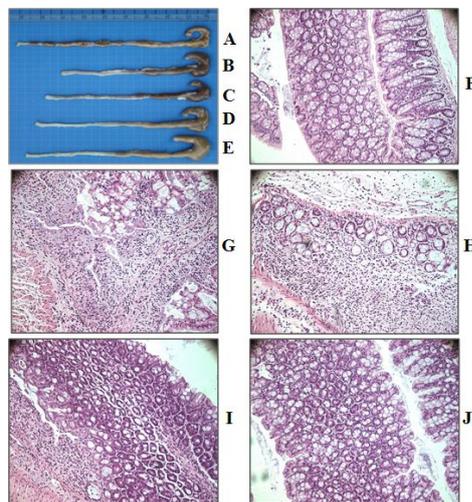


Fig. 3. Macroscopic findings of SMF-Ex effect on the histological damages in colon tissue of DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate (DSS) for 7 days. MF-Ex in colon or SMF-Ex was administered orally at single dose (80 mg/kg) for 7 days. Shown are the representative gross appearance (a: normal; b: DSS alone; c: DSS plus 80 mg/kg MF-Ex; d: DSS plus 80 mg/kg SF-Ex; e: DSS plus 80 mg/kg SMF-Ex) and microscopic views of haematoxylin and eosin-stained sections (f: normal control; g: DSS alone; h: DSS plus 80 mg/kg MF-Ex; i: DSS plus 80 mg/kg SF-Ex; j: DSS plus 80 mg/kg SMF-Ex) of the colons. Original magnification in  $\times 100$ .

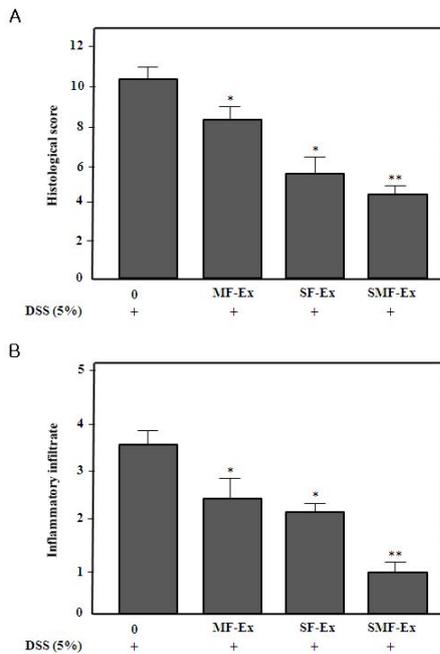


Fig. 4. Effect of SMF-Ex on histological score and inflammatory infiltrate in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate (DSS) for 7 days. MF-Ex, SF-Ex or SMF-Ex was administered orally at single dose (80 mg/kg) for 7 days. Histological score (A) and inflammatory infiltrate (B) was measured from the conlon tissues on day 7. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 on day 7 indicate significant differences with extract untreated control group (DSS alone).

#### 4. DSS 유도 대장염 마우스 결장조직의 항산화 효소 활성에 미치는 오미자 플러스 매실(SMF-Ex)의 효과

마지막으로 우리는 SF-Ex, MF-Ex 또는 SMF-Ex 투여가 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 생체 내 항산화 효소로 잘 알려진 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (Gpx) 등의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 실험이 종료된 마우스의 결장 조직을 적출하여, 조직을 tissue lysis 완충액과 초음파분쇄기를 활용하여

조직 용출액을 제조한 후 단백질을 정량하고 효소 활성을 측정 하였다.

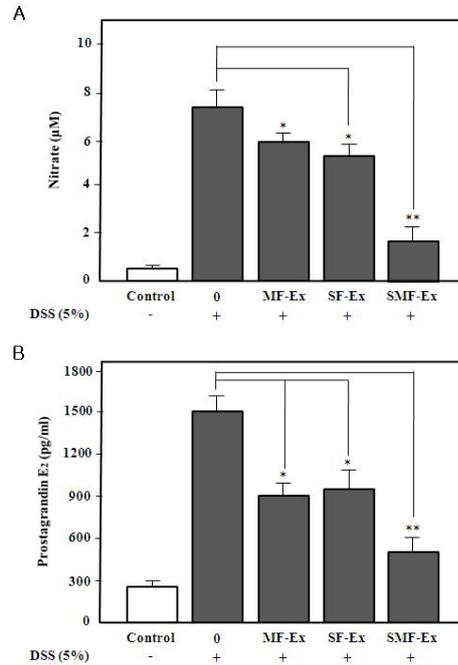


Fig. 5. Effect of SMF-Ex on NO and PGE<sub>2</sub> production in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate (DSS) for 7 days. MF-Ex, SF-Ex or SMF-Ex was administered orally at single dose (80 mg/kg) for 7 days. NO (A) and PGE<sub>2</sub> production (B) was measured from the serum on day 7. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 mice. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 on day 7 indicate significant differences with extract untreated control group (DSS alone).

그 결과 SOD와 catalase의 활성은 Fig. 6A-B와 같이 DSS 단독 투여군인 양성대조군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군에 비해 그 활성이 현저히 줄어들었으나, SF-Ex 또는 MF-Ex를 투여한 결과 효소 활성이 증가하는 효과가 있었다 ( $p$ <0.05).

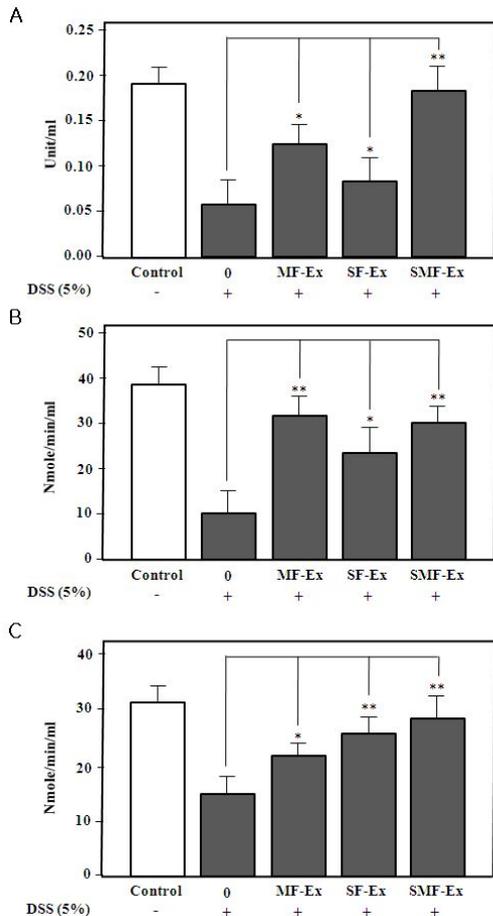


Fig. 6. Effect of SMF-Ex on antioxidant enzyme activity in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate (DSS) for 7 days. MF-Ex, SF-Ex or SMF-Ex was administered orally at single dose (80 mg/kg) for 7 days. Superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (B), and glutathione peroxidase (Gpx) (C) was measured from the colon tissue extracts. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. from 5 mice. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  on day 7 indicate significant differences with extract untreated control group (DSS alone).

특히 catalase의 경우 MF-Ex를 투여했을 때 SF-Ex보다 우수한 효소 활성 효과가 있었고, SMF-Ex 투여군과 함께 대조군과 유사하게 그 활성이 현저히 증가했다( $p < 0.01$ ). 또한 Fig. 6C와 같

이 Gpx의 활성의 경우는 DSS에 의해 억제되었던 효소의 활성이 SF-Ex 또는 MF-Ex를 투여함으로써 그 활성이 증가하는 효과가 있었다( $p < 0.05$ ). 특히 SMF-Ex를 투여한 경우 대조군과 유사하게 그 활성이 현저히 증가했다( $p < 0.01$ ).

## IV. 고 찰

오미자는 전통적으로 한국과 중국에서 호흡곤란 및 기침 등 호흡기질환과 다한증 및 오열, 몽정, 이질, 불면증 및 기억상실증 등 다양하게 인체에 사용해왔다<sup>1-7</sup>. 최근에 오미자 열매로부터 추출한 유용 화합물인 schizandrin계열은 지질산화작용을 억제하고<sup>8</sup>) glutathione 매개 항산화작용을 증진시키는 결과를 얻어 보고하였다<sup>9,10</sup>. 최근에 우리는 오미자와 오수유(*Evodia rutaecarpa*) 추출물을 혼합하여 dextran-sulfate sodium (DSS) 유도 대장염 모델 동물에서 대장염의 임상적 증후를 개선하는 효과를 보고하였다<sup>15</sup>. 또한 매실은 한국과 일본을 비롯한 동양에서 전통적으로 위장 및 간질환과 혈행 개선을 비롯한 동양에서 사용하고 있다. 최근에 매실로부터 분리된 MK615 화합물은 유방암, 대장암 및 결장암 등 세포주의 증식을 억제하며<sup>11,12</sup>, 특히 결장암 세포주로 알려진 SW480, COLO 및 WiDr 등 암 세포를 효과적으로 아포토시스를 유도하는 것으로 알려졌다<sup>12</sup>. 더욱이 매실은 flavonoid계 및 phenolic acid와 같은 natural phenolic계 phytochemical들이 다량 함유되어 있어 항산화 및 암세포 증식을 억제하는 효과가 있다<sup>13,14</sup>. 그러나 오미자와 매실 추출물을 혼합한 DSS 유도 대장염의 개선에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다. 우리는 이 연구에서 오미자와 매실을 동량을 혼합한 SMF-Ex를 대상으로 SF-Ex와 MF-Ex와 비교 조사하여 DSS 유도 대장염 모델 마우스의 임상적 증상을 개선하는 우수한 효과를 처음으로 증명했다.

한편 UC는 악화와 완화가 반복적으로 나타나는 만성 대장질환으로 병리학적 특징은 심각한 염증을 수반한다<sup>18-23</sup>. 마우스에 DSS를 투여할 경우 UC와 유사한 질환을 야기 할 수 있는데, 2.5% 이하를 투여하면 그 병적 특징이 만성적으로 나타나는 반면, 5%의 고농도로 투여하면 급성 대장염을 일으키는 모델을 만들 수 있어서 UC의 병리 및 면역학적 특징을 연구하는 좋은 모델로 알려졌다<sup>22</sup>. DSS로 유도된 마우스 결장의 병리학적 특징은 표피주위에 괴양 형성, 조직벽의 심각한 부종, 점액조직의 비대, 호산구를 비롯한 과립백혈구의 침윤이 과도하게 나타난다<sup>25,26</sup>. 이러한 DSS 유도에 의한 병리학적 특징을 토대로 전 염증성 사이토카인 및 케모카인 등 염증 기전에 대한 연구 결과가 매우 활발히 진행되고 있다<sup>26-28</sup>.

우리는 이 연구에서 급성 UC 모델을 만들기 위해서 5% DSS를 정제수 대신 드링크제로 7일 동안 투여했다. 그 결과 다른 전 연구자들의 결과와 같이 심각한 체중의 감소, 설사, 결장의 길이 감소, DIA, histological score 및 염증침윤지수 등 전형적인 급성 UC의 특징을 보였다. 그러므로 우리는 UC에 오미자와 매실의 효과를 알아보기 위해서 DSS 투여와 동시에 각각의 약물 20-80 mg/kg을 하루에 1회 씩 경구투여하면서 7일 동안 병리적 현상을 조사하였다. 오미자 추출물인 SF-Ex 또는 매실 추출물인 MF-Ex를 투여한 결과 저 농도에서는 효과가 없었으나, 40 mg/kg과 80 mg/kg 투여군에서는 개선의 효과가 있었다. 그러나 이들 약물을 단독 투여할 경우 DSS 단독 투여 양성대조군에 비해 개선되었지만, 정상 대조군에 비해 큰 호전의 효과는 없었다. 따라서 우리는 Fig. 1C와 SF-Ex(40 mg/kg)와 MF-Ex(40 mg/kg)을 두 약물을 혼합한 80 mg/kg 단일 농도 SMF-Ex 실험군을 선택하고 SF-Ex(80 mg/kg) 또는 MF-Ex(80 mg/kg) 투여군과 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 그 효과를 비교하였다. 그 결과 Fig. 1C와 같이 SF-Ex 또는 MF-Ex를 단독 투여할 때 보

다 SMF-Ex를 투여할 때 UC의 체중의 감소는 물론 병리적 특징이 크게 개선됨을 알 수 있었다(Fig. 1-4). 이러한 결과는 UC 치료에 있어서 오미자와 매실을 단독으로 투여하는 것보다는 이들 약물을 혼합하여 투여할 때 그 치료 효과가 극대화 될 수 있음을 제시해 주었다.

한편 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로서, NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 생체가 염증상태에 빠지게 되면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생산한다<sup>29</sup>. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌다는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 활성화된 대식세포에서 COX-2의 발현이 촉진되어 많은 양의 PGE<sub>2</sub>를 생산하게 된다<sup>30</sup>. 이렇게 생성된 NO와 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증촉진 매개물은 DSS 유도 대장염 마우스 모델에서도 더욱더 염증을 악화시키는 것으로 알려졌다<sup>30-32</sup>. DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성에 SF-Ex, MF-Ex 또는 SMF-Ex의 투여가 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. DSS만 투여한 양성대조군은 혈청 내 대량의 NO와 PGE<sub>2</sub>가 생성되었지만, SMF-Ex를 투여할 경우 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성이 SF-Ex 또는 MF-Ex 투여보다 현저히 억제되는 결과를 얻었다(Fig. 5)였다.

한편 생체에서 염증반응이 진행되면, 일련의 반응산소 중간물질(reactive oxygen species, ROS)이 대량 생산되어 염증반응을 더욱 촉진시킨다. 내장의 염증반응이 원인인 IBD 환자의 경우에도 ROS가 대량 생산된다는 사실이 밝혀지면서 생체의 항산화 효소의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 전통적으로 ROS에 대한 연구는 지질, DNA 및 단백질 등의 세포질에 비특이적으로 독성을 야기하여 손상을 주는 방향으로 연구되었으나<sup>33,34</sup>,

최근의 ROS 연구는 세포내 특정 신호전달 반응에 의한 체계적인 경로를 통하여 세포에 손상을 주는 기전을 밝히고 있다. 특히 IBD의 경우 redox-sensitive transcription factors 가 활성화 되면서 염증에 관여하는 전 염증성 사이토카인과 케모카인 등 일련의 염증 관련 매개물들을 생성시켜 질병을 더욱 악화 시키는 것으로 알려졌다. 그러므로 IBD와 같은 UC의 치료에 있어서 항산화 작용을 하는 생체 효소의 역할이 주목을 받게 되었다<sup>35,36</sup>. 이러한 UC의 특징을 고려하여 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 항산화 효과로 잘 알려진 오미자와 매실을 대상으로 각각의 추출물인 SF-Ex와 MF-Ex을 투여하였다. 그 결과 SOD와 catalase의 경우 SF-Ex와 MF-Ex 모두 SOD의 활성을 유도하였지만 매실이 더 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그러므로 같은 양의 매실과 오미자를 혼합한 추출물인 SMF-Ex를 투여한 결과 각각을 투여한 실험군에서 보다 현저히 그 활성이 증가되었다. 더욱이 SCMF-Ex의 투여는 DSS에 의해 고갈된 Gpx의 활성을 유도하는데 우수한 효과가 있었음을 확인하였다(Fig. 6).

IBD와 같은 환자의 결장조직에서는 SOD가 과량 발현되어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 대량 생성하여 치명적인 조직의 손상을 야기하는 것으로 알려졌다<sup>37</sup>. 그러나 우리의 결과에서 보여준 DSS 유도 대장염 모델 마우스 결장 조직의 SOD 발현은 현저히 줄어든 상태로 조사되었는데, 이러한 이유는 5% DSS를 투여하고 7일 후 실험하였기 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하면, 오미자와 매실은 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 체중의 감소, 조직 병리학적 악화, 염증반응 및 산화적 스트레스를 개선하는 효과가 있었다. 특히 오미자와 매실을 혼합한 추출물인 SMF-Ex의 효과는 오미자 또는 매실을 단독으로 투여하는 것보다 DSS 유도 대장염의 병리학적 임상 증후를 개선시키는데 우수한 효과를 증명하였다. 따라서 오미자와 매실을 혼합

하여 복용한다면 UC와 같은 염증성 내장질환 치료에 우수한 효과를 줄 수 있는 기능성 식품으로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

## V. 결 론

오미자(*Schizandrae Fructus*)와 매실은 (*Mume Fructus*)은 전통적으로 한국을 비롯한 동남아권에서 설사와 복통 치료 및 혈행 개선에 활용되어 왔다. 그러나 오미자와 매실을 혼합한 추출물(*Schizandra Fructus and Mume Fructus extracts* (SMF-Ex))을 대상으로 하여 dextran-sulfate sodium (DSS) 유도 대장염 마우스에 적용된 연구사례는 전혀 없는 실정이다. 이 연구에서 우리는 DSS 유도 모델 마우스를 대상으로 SMF-Ex의 대장염 개선 효과를 조사하였다. 대장염 모델은 5% DSS를 음용수로 투여하여 유도하였다. SMF-Ex는 DSS 투여와 동시에 80 mg/kg의 농도로 하루에 1회씩 7일간 경구투여 하였다. 그 결과 SMF-Ex는 DSS 유도 체중의 감소, 결장길이의 감소, 증가된 질병활성지수(disease activity index, DAI) 및 결장조직의 손상을 개선하는데 우수한 효과가 있었다. 더욱이 SMF-Ex는 DSS 유도에 의한 감소된 결장조직의 superoxide anion (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (Gpx) 등 효소활성을 증가시키는 우수한 효과가 있었다. 이러한 결과는 DSS 유도 대장염 모델 마우스에서 SMF-Ex 투여가 대장염의 임상적 증상의 개선과 항염증 효과 및 항산화 효소 활성을 유도하는데 우수한 효과가 있음을 보여주었다 따라서 오미자와 매실 혼합추출물인 SXPM-Ex는 항궤양 치료에 활용될 수 있는 효과적인 기능성 식품이라 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 2009년도 장수오미자 클러스터사업단

연구비 지원에 의한 것임.

### 참고문헌

- 허준. 동의보감. 서울:법인문화사. 2007:1267, 1923.
- 신길구. 신씨본초학. 서울:수문사. 1982:163-5, 183-888.
- 임상본초학. 서울:남산당. 1986:241-2, 581-2.
- 강병수. 임상배합본초학. 서울:영림사. 1994:674-8.
- 이영노. 한국식물도감. 서울:교학사. 2002:153-4, 342.
- 뇌계권. 중화임상중약학. 북경:인민위생출판사. 1998 :1623-7, 1845-9.
- 전대화. 실용중약사전. 북경:인민위생출판사. 2002 :304-12, 378-82.
- Zhang TM, Wang BE, Liu GT. Effect of schisandrin B on lipoperoxidative damage to plasma membrane of rat liver in vitro. *Acta Pharmacology Sinica*. 1992;13:255-8.
- Ip SP, Poon MKT, Wu SS, Che C, Ng KH, KongYC, Ko KM. Effect of schisandrin B on hepatic glutathione antioxidant system in mice: protection against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Medica*. 1995;61:398-401.
- Ip SP, Ko KM. The crucial antioxidant action of schisandrin B in protecting against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice: a comparative study with butylated hydroxytoluene. *Biochemistry and Pharmacology*. 1996;52:1687-93.
- Kraus E, Galvin JW, Boumakis S, Boamah EK, Canning MT, Yarosh DB, Brown DA. Effects of a melanogenic bicyclic monoterpene diol on cell cycle, p53, TNF-alpha, and PGE2 are distinct from those of UVB. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19:295-302.
- Mori S, Sawada T, Okada T, Ohsawa T, Adachi M, Keiichi K. New anti-proliferative agent, MK615, from Japanese apricot "Prunus mume" induces striking autophagy in colon cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol*. 2007;13(48):6512-7.
- Yoshikawa M, Murakami T, Ishiwada T, Morikawa T, Kagawa M, Higashi Y, Matsuda H. New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*. *J Nat Prod*. 2002 :65(8):1151-5.
- Zhang QH, Zhang L, Shang LX, Shao CL, Wu YX. Studies on the chemical constituents of flowers of *Prunus mume*. *Zhong Yao Cai*. 2008;31(11):1666-8.
- Jang SI, Jeong SI, Kwon TO, Yun YG. Effect of aqueous extract of *Schizandra chinensis* and *Evodia rutaecarpa* Fruits on experimental mouse colitis induced by dextran sulfate sodium. *Korean J Orien Med Prescrip*. 2008;16(2):171-82.
- Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Scholmerich J, Reinisch W: European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*. 2006; 55 Suppl 1:i1-i15.
- Zhong YQ, Huang HR, Zhu ZH, Chen QK, Zhan J, Xing LC. Effects of sulfasalazine on biopsy mucosal pathologies and histological grading of patients with active ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11:4435-8.
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol*. 2002;8:158-61.
- Leong RW, Lau JY, Sung JJ. The epidemiology

- and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:646-51.
20. Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21:408-13.
  21. Leong RW, Lawrance IC, Ching JY, Cheung CM, Fung SS, Ho JN, Philpott J, Wallace AR, Sung JJ. Knowledge, quality of life, and use of complementary and alternative medicine and therapies in inflammatory bowel disease: a comparison of Chinese and Caucasian patients. *Dig Dis Sci.* 2004;49:1672-6.
  22. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R.A. Novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98:694-702.
  23. Cooper HS., Murphy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 1993;69:238-49.
  24. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1328-38.
  25. Melgar S, Engström K, Jägervall A, Martinez V. Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress.* 2008;11:348-62.
  26. Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, Brandolini L, Mosca M, Cattani F, Pellegrini L, Biordi L, Coletti G, Sorrentino C, Fedele G, Colotta F, Melillo G, Bertini R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J Leukoc Biol.* 2007;82:1239-46.
  27. Luther SA and Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immun.* 2001;2:102-7.
  28. Allavena P, Bianchi G, Zhou D, Van Damme J, Jilek P, Sozzani S, and Mantovani A. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemoattractant protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* 1994;24:233-3236.
  29. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35(1):116-26.
  30. Myung SJ, Kim IH. Role of prostaglandins in colon cancer. *Korean J Gastroenterol.* 2008;51(5):274-9.
  31. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol.* 2003;199:28-35.
  32. McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McComick PA, Sheahab K, Aird AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res.* 2001;50:491-5.
  33. Sun FF, Lai PS, Yue G, Yin K, Nagele RG, Tong DM, Krzesicki RF, Chin JE, Wong PY. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat. *Inflammation.* 2001;25:33-45.
  34. Sainathan SK, Hanna EM, Gong Q, Bishnupuri KS, Luo Q, Colonna M, White FV, Croze E, Houchen C, Anant S, Dieckgraefe BK. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor ameliorates DSS-induced experimental

- colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:88-99.
35. Ko KM, Ip SP, Poon MK, Wu SS, Che CT, Ng KH, Kong YC. Effect of a lignan-enriched fructus schisandrae extract on hepatic glutathione status in rats: protection against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Med.* 1995;61:134-7.
36. Kim SR, Lee MK, Koo KA, Kim SH, Sung SH, Lee NG, Markelonis GJ, Oh TH, Yang JH, Kim YC. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced toxicity. *J Neurosci Res.* 2004;76:397-405.
37. Simmonds NJ, Rampton DS. Inflammatory bowel disease: a radical view. Simmonds NJ, Rampton DS. *Gut.* 1993;34:865-8.