

감초 추출물의 Dextran Sulfate Sodium 유도 마우스 궤양성 대장염 억제 효과

이 경 호* · †이 기 형

*코오롱 생명과학연구소, 공주대학교 산업과학대학

Anti-Inflammatory Effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne Extract in a Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mouse Model

Keyong Ho Lee* and †Ki-Hyeong Rhee

*Kolon Life Science Inc., Yongin 449-797, Korea

College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract on ulcerative colitis induced by 3% dextran sulfate sodium in mice. The experimental animals were divided into six groups: control(normal), DSS-induced colitis(control), 1 mg/kg, 10 mg/kg, and 100 mg/kg of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract, and 150 mg/kg 5-aminosalicylic acid(5-ASA)(positive control). We evaluated the pathological disease activity index(DAI), change in weight, colon mucosa damage and myeloperoxidase(MPO) in colon mucosa. Treatment with 10 mg/kg and 100 mg/kg of *Glycyrrhiza glabra* Linne extract led to significant loss of body weight, the decrease of MPO activity and clinical symptoms such as DAI and histological change. In particular, 100 mg/kg *Glycyrrhiza glabra* Linne extract led to markedly greater improvement than 150 mg/kg 5-ASA treatment. These results suggest that *Glycyrrhiza glabra* mediated anti-inflammatory action on colorectal sites may be a useful therapeutic approach to ulcerative colitis.

Key words: *Glycyrrhiza glabra* Linne, ulcerative colitis, dextran sulfate sodium.

서 론

궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)이나 크론병(Crohn's disease, CD) 등의 염증성 대장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 특정한 병인이 없이 소화기계에 반복적으로 재발되는 염증과 관련이 있으며, 장강의 항체에 의한 세포벽의 장애나 대장 상피세포의 병원체 및 장내 세균총의 비정상적인 면역반응 등에 의해 촉진되어 소화기계에 염증이 발생하는 것을 의미한다(Podolsky DK 2002; Adachi 등 2006). 궤양성 대장염은 일종의 반복적으로 발생하는 난치성 소화기계통의 장 질환으로 임상에서는 흔히 복통, 설사 및 농혈 점액변이 주요한 증상이며, 병변은 점막 및 점막 하층에서 주로 나타난

다(Porter 등 1998; Ahn 등 2001; Lakatos 등 2003). 정상적인 대장 조직은 점막, 점막하조직, 근육층, 장막의 4층으로 나뉘어져 있으며, 궤양성 대장염의 발생에 따라 점막과 점막 하조직에서 병리학적인 변화가 나타난다. 궤양이 형성됨에 따라 인접한 층에 염증이 발생한 세포들의 침투가 발생하고, 농양돌기(crypt abscess)와 주변 혈관에 염증의 발생 및 호중구, 호산구와 같은 각종 염증세포가 나타나는 비특이적인 변화가 관찰된다(Fan 등 2005). 이 병은 유럽이나 미국 등 육식을 주로 하는 나라에서 흔하며, 최근에는 한국에서도 현저히 증가되는 추세를 보이고 있다(Chang 등 2005). 그러나 이 병이 발생하는 원인과 발병 기전이 비교적 복잡하여 아직까지도 정확히 알려져 있지 않고 있다(Dong 등 2003).

†Corresponding author: Ki-Hyeong Rhee, College of Industrial Sciences, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea. Tel: +82-41-330-1626, Fax: +82-41-330-1629, E-mail: howard@kongju.ac.kr

흰쥐, 마우스 및 햄스터에서 dextran sulfate sodium(DSS)으로 유발시킨 궤양성 대장염 동물 모델의 경우, 초기에는 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 등이 생긴다. 또한 조직학적으로 대장 상피세포에 손상을 유발해 상피층의 장샘이 염증 없이 떨어져 가는 것이 특징이다. 급성기에는 면역매개반응이 일어나지 않다가 만성으로 발전할 경우에는 점막 내에 여러 면역물질의 양이 증가해서 장관의 염증을 유발하는 것으로 보인다. 이러한 양상은 사람의 궤양성 대장염과 흡사한 부분이 많아 DSS는 실험 동물 모델을 만드는 데 널리 쓰이고 있다(Ishioka 등 1987; Frank 등 2001).

궤양성 대장염의 치료에는 주로 sulfasalazine과 스테로이드를 치료제로 사용되고 있고, 최근 5-aminosalicylic acid(5-ASA)가 다양하게 사용되고 있으며, 국소적 치료제도 많이 개발되고 있다(Buchman 2001; Hanauer & Sperrow 2004; Klotz U 2005). 또한 면역억제제의 효능이 보고되고 있으며, 항균제 사용의 유용성도 보고되고 있다(Hanauer & Hibi 2005; Hisamatsu 등 2005). 하지만 이런 약물들을 장기적으로 복용할 때 약물의 용량과 관련하여 부작용과 독성 그리고 내성이 생기게 된다(Kim 등 2003).

감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 전통약재로 해독 작용에 의한 만성간염 및 합병증 효과에 의한 위궤양 억제 등 다양한 약리학적 작용이 있음이 보고되었고, 이러한 효능과 관련 있는 활성물질로는 glycyrrhizin 등이 알려져 있다(Shibata 등 2000; Jeong 등 2002; Matsui 등 2004; Agarwal 등 2005).

본 연구에서는 합병증 성분들이 함유된 감초 추출물을 이용하여 마우스에서 DSS로 유발시킨 궤양성 대장염 동물 모델을 이용하여 감초 추출물의 궤양성 대장염 억제 효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

궤양성 대장염 유발 물질인 dextran sulfate sodium(DSS, MW 35,000~45,000), 실험 대조약물인 5-amino salicylic acid(5-ASA) 및 MPO kit는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 감초 추출물 조제

감초는 약령시장으로부터 구입하여 Warning blender로 분쇄한 후 30 mesh와 60 mesh 사이의 크기를 갖도록 제조하여 연구에 사용하였다. 초임계 유체 추출 용매로 순도 99.995% 이산화탄소를, 보조 용매, 유기 용매 추출 및 HPLC 분석에 사용된 용매는 모두 HPLC급을 사용하였다. 초임계 유체 추출은 ISCO사(USA)의 SFX 3560을 사용하여 압력은 300 bar, 60°C에서 보조 용매로써 70% methanol을 사용하여 초임계 이산화

탄소에 대해 15%(v/v)를 첨가하고, 3 mL/min의 유속으로 50분 동안 흘려주는 것으로 추출을 수행하였다.

3. 궤양성 대장염의 유도

실험 동물은 ICR 웅성 마우스(20~25 g)로 6주령을 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 1주 동안 고휘사료와 물을 자유롭게 섭취시키면서 55±5%의 습도와 22±2°C의 온도 및 12시간 주기로 명암이 조절되는 실험 환경에 1주간 적응시켰고, 한 군에 8마리씩 5군으로 나누었다. 즉, 정상대조군, 궤양 유발군, 감초 추출물은 각각 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg으로 양성 대조군 5-ASA는 150 mg/kg으로 나누었다. 감초 추출물 및 5-ASA는 2.5% carboxymethyl cellulose로 용해시킨 후, 3% DSS 섭취 3일 전부터 하루에 한 번씩 경구 투여를 10일간 하였으며, 정상 대조군과 궤양 유발군은 2.5% carboxymethyl cellulose를 경구 투여하였다(Juskiewicz 등 2004). 궤양 유발군과 감초 추출물 투여군은 3% DSS를 1주일간 자유롭게 섭취하였으며, 정상 대조군은 물을 자유롭게 섭취하였다. 3% DSS는 사용하기 전에 증류수를 이용하여 만들어 사용하였다.

4. 결장 조직에서의 Myeloperoxidase(MPO) 측정

다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte: PMN)의 침착 정도를 나타내는 MPO의 활성도를 Cuzzocrea 등(2000)의 방법에 따라 아래와 같이 측정하였다. 장조직을 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7)에 용해시킨 0.5% hexa-decyl-trimethyl-ammonium bromide 용액에 균질화 시켰다. 4°C에서 20,000×g로 30분간 원심 분리시켜 얻은 상층액을 tetra-methyl-benzidine 과 H₂O₂ 용액에 1분간 반응시킨 후 sulfuric acid로 반응을 중지시켜 spectrophotometer(micropate reader Model 450, BIO-RAD, Hercules, CA, USA.)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 조직학적 평가

마우스의 체중 변화, 변의 형태 변화와 변에 피가 섞인 정도에 따라 질환 활성 지표(disease activity index, DAI)로 평가하였으며, 정상 상태의 변을 0으로 하여 무른 변만 보일 경우는 1이며, 무른 변과 잠혈이 보이면 2이고, 설사와 잠혈이 모두 관찰되면 3, 설사와 직장 주위에 피가 나며 허는 경우를 4로 하여 측정하였다(Table 1).

장 점막의 손상 정도 평가는 Dieleman 등(1998)의 방법에 따라서 현미경하에서 점막이 손상된 최대의 길이를 측정, 계산하여 8 cm 길이에서 점하는 백분비를 병변의 범위로 정하고, 백분비에 근거하여 병변의 범위를 5개 등급으로 나누었다. 장관의 소낭선과 내피의 손상 정도에 따라 점막의 손상 정도를 Table 2와 같이 5개 등급으로 평가하였다. 또한 조직학적

Table 1. Criteria for scoring disease activity index(DAI)

DAI score	Stool consistency	Occult or gross rectal bleeding
0	Normal stools	Negative
1	Loose stools	Negative
2	Loose stools	Hemoccult-positive
3	Diarrhea	Hemoccult-positive
4	Diarrhea	Gross bleeding

Normal stools=well-formed pellets, Loose stools=pasty stool that does not stick to anus, Diarrhea=liquid stools that stick to anus.

인 변화는 Chen 등(2002)의 방법에 준수하여 점막 손상의 정도를 평가하였다. 즉, 병변의 범위를 두 가지 방법으로 종합하여 판단하였다. 포르말린에 고정시킨 결장을 항문으로부터 3 cm 되는 부분의 조직을 취하여 일반적인 방법대로 파라핀으로 고정시킨 후에 5 μ m의 절편으로 자르고 H & E 이중염색을 하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 및 대장염 활성 지표(DAI)의 변화

7일간 3% DSS 섭취에 의한 궤양성 대장염 유발군의 체중을 시간별로 관찰한 결과, 3% DSS 단독 섭취군은 7일째 DSS 섭취한 날에는 처음과 비슷한 체중으로 정상군에 비해 유의성 있는 체중 감소를 보였다. 감초 추출물 10 mg/kg 및 5-ASA 150 mg/kg 투여군에서의 체중 변화는 비슷한 양상의 변화를 보였으며, 염증의 발생에 따른 체중의 변화에서는 정상군에는 미치지 못하였다. 그러나 감초 추출물 10 mg/kg 및 5-ASA 150 mg/kg을 포함한 모든 시험구에서 DSS 단독 처리군에 비해 유의성 있는 체중 증가가 관찰되었다(Table 3). 식이 섭취량은 모든 군에서 유의적인 차이가 보이지 않았다(data not shown). 감초 추출물 1, 10 및 100 mg/kg 투여군의 DAI 변화는 각각 2.15 \pm 0.51, 1.59 \pm 0.41 및 1.30 \pm 0.31로 나타나 농도 의존적으로 유의하게 개선되었다(Table 3). 궤양성 대장염 유발군의 실험 동물에서 8마리 모두에서 혈변 및 묽은 변이 나타났으며, 2마리의 경우는 직장 주위에서 출혈이 발생하였다. 감초

Table 2. Histological scoring system

Histological changes	Score
Normal colonic mucosa	0
Cryptal defect less than 1/3	1
Cryptal defect 1/3-2/3	2
Slight inflammatory infiltration in proper lamina	3
Mucosal erosion or ulcer with significant inflammatory infiltration	4

Table 3. DAI, morphologic injury and histological changes in rats assigned to the different treatment groups

Group ¹⁾	Weight gain (g/7 day)	DAI ²⁾	Histological changes
Normal	3.51 \pm 0.51 ^a	0.00 \pm 0.00	0.34 \pm 0.51 ^e
DSS	0.25 \pm 0.03 ^e	2.70 \pm 1.00 ^a	3.55 \pm 0.13 ^a
5-ASA	1.75 \pm 0.21 ^c	1.50 \pm 0.41 ^b	1.31 \pm 0.37 ^d
G-100	2.05 \pm 0.51 ^b	1.30 \pm 0.31 ^c	1.21 \pm 0.43 ^d
G-10	1.67 \pm 0.53 ^c	1.59 \pm 0.41 ^b	2.15 \pm 0.37 ^c
G-1	0.98 \pm 0.15 ^d	2.15 \pm 0.51 ^a	3.05 \pm 0.45 ^b

¹⁾ G-100, G-10 and G-1 are stand for 100 mg/kg, 10 mg/kg and 1 mg/kg of extract of *Glycyrrhiza glabra* respectively. Dose of 5-ASA is 150 mg/kg.

²⁾ DAI was calculated as the sum of scores assigned as follows: percentage of body weight reduction(0: no change, 1: 1~5%, 2: 6~10%, 3: 11~15%, 4: >15%), Stool consistency(0: normal, 2: loose, 4: diarrhea) and the presence of fecal blood(0: normal, 2: positive occult blood test, 4: visible bleeding). Values with different letters above each bar are significantly different(p <0.05) among different treatments.

추출물 100 mg/kg 투여군에서는 거의 정상군과 비슷한 변의 형태를 보였으며, 1마리에서는 혈변이 나타났다. 그리고 감초 추출물 10 mg/kg을 투여한 군과 양성 대조군인 5-ASA 150 mg/kg 투여군에서는 2마리가 묽은 변을 보였으며, 그 중 1마리는 잠혈이 보였다.

2. MPO 함량 변화

다형핵 백혈구의 침착 정도를 나타내는 MPO는 DSS 투여군의 경우 3.10 \pm 0.2 nM/mg tissue이었는데, 이는 양성 대조군인 5-ASA 150 mg/kg 투여군 (2.20 \pm 0.4 nM/mg tissue)에 비해 유의하게 감소하였다. 감초 추출물 1, 10 및 100 mg/kg 투여군에는 각각 2.80 \pm 0.3, 2.30 \pm 0.1 및 0.70 \pm 0.1 nM/tissue로 나타나, 농도 의존적으로 유의하게 감소하였고, 감초 추출물 10 mg/kg 투여군은 양성 대조군인 5-ASA 150 mg/kg 투여군과 유사한 정도의 효능을 나타내었으며, 감초 추출물 100 mg/kg 투여군은 5-ASA 투여군보다 우수한 효능을 나타내었다(Fig. 1).

3. 조직적 변화

결장조직의 H&E 이중염색조건에서 DSS 투여군에서는 충혈, 염증과 궤양이 관찰되었고, 많은 염증세포들이 관찰되었지만, 감초 추출물 투여군에서는 위의 병리소견들이 현저히 감소하였다. DSS 투여군에서의 조직학적 변화는 3.55 \pm 0.13으로 결장점막 조직에 염증세포가 침투되었고, 장조직의 용모와 장샘(crypt)이 상실됨이 관찰되었다. 감초 추출물 1, 10 및

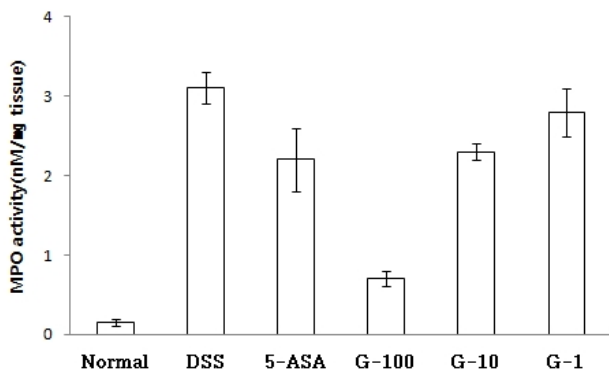


Fig 1. MPO activity in colonic tissue DSS rats model. G-100, G-10 and G-1 are stand for 100 mg/kg, 10 mg/kg and 1 mg/kg of extract of *Glycyrrhiza glabra* respectively. Dose of 5-ASA is 150 mg/kg. Values with different letters above each bar are significantly different ($p < 0.05$) among different treatments.

100 mg/kg 투여군의 조직학적 변화는 각각 3.05 ± 0.45 , 2.15 ± 0.37 및 1.21 ± 0.43 으로 나타나 농도 의존적으로 유의하게 개선되었고, 조직학적 변화에 있어서는 감초 추출물 10 mg/kg 투여군은 양성 대조군인 5-ASA 150 mg/kg 투여군보다 개선 정도가 낮게 나타났지만, 다른 효능지표인 체중, DAI 및 MPO activity와 일치하지 않은 결과를 나타내었고, 오히려 감초 추출물 100 mg/kg 투여군과 유사한 효능을 나타내었다 (Table 3). 이는 전체 장조직의 일정 부분에서의 조직학적 관찰에 따른 차이로 사료가 되지만, 감초 추출물의 농도의존적 활성에 있어서는 다른 지표들과 일치하는 결과를 나타내었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 DSS로 유발시킨 궤양성 대장염 동물 모델을 이용하여 감초 추출물(*Glycyrrhiza glabra* Linne)의 궤양성 대장염 억제 효과를 조사하였다. 대조구에서는 체중 감소가 관찰되었으나, 감초 추출물 투여에 의하여 농도의존적으로 체중 감소의 개선 효과가 관찰되었다. 생화학적 지표인 MPO 활성의 경우, 감초 추출물 1, 10 및 100 mg/kg 투여군에서는 각각 2.80 ± 0.3 , 2.30 ± 0.1 및 0.70 ± 0.1 nM/mg tissue로 나타나 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다. 결장조직의 변화에서 감초 추출물 1, 10 및 100 mg/kg 투여군의 조직학적 변화는 각각 3.05 ± 0.45 , 2.15 ± 0.37 및 1.21 ± 0.43 으로 나타나 농도 의존적으로 유의하게 개선되었다. 따라서 감초 추출물의 항염증 효과는 염증성 장 질환에 효능이 있는 것으로 동물 모델에서 확인하였다. 추가적으로 감초 추출물에 의한 사이토카인의

변화 등의 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

- Adachi M, Kurotani R, Morimura K, Shah Y, Sanford M, Madison BB, Gumucio DL, Marin HE, Peters JM, Young HA, Gonzalez FJ. 2006. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 55:104-1113
- Agarwal MK, Iqbal M, Athar M. 2005. Inhibitory effect of 18 β -glycyrrhetic acid on 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate-induced cutaneous oxidative stress and tumor promotion in mice. *Redox Rep* 10:151-157
- Ahn BO, Ko KH, Oh TY, Cho H, Kim WB, Lee KJ, Cho SW, Hahm KB. 2001. Efficacy of use of colonoscopy in dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in rats: The evaluation of the effects of antioxidant by colonoscopy. *Int J Colorectal Dis* 16:174-181
- Buchman AL. 2001. Side effects of corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 33:289-294
- Chang DK, Kim YH, Byeon JS, Yang SK, Chung YW, Han DS, Kim SG, Kim TI, Kim WH, Jeon YT, Eun CS, Choi H, Choi KY, Song IS. 2005. The current status of ulcerative colitis associated colorectal cancer in Korea: A KASID study. *Korean J Gastroenterol* 46:276-282
- Chen WX, Chen JL, Da W, Chen NW, Zhu JS. 2002. Study on P-selectin and ICAM-1 of mouse with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 10:722-724
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabrò G, Cucinotta G, De Sarro A, Caputi AP. 2000. Beneficial effects of N-acetylcysteine on ischemic brain injury. *Br J Pharmacol* 130:1219-1226
- Dieleman LA, Palmén MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. 1998. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium(DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114: 385-391
- Dong WG, Liu SP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. 2003. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanism in rats. *World J Gastroenterol* 9:2533-2538
- Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. 2005. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 11:4800-4806

- Frank K, Helmut M, Marianne A, Volker G, Tina B, Jürgen S, Josef R. 2001. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rats. *Int J Colorectal Dis* 16:238-246
- Hanauer SB, Sperrow M. 2004. Therapy of ulcerative colitis. *Curr Opin Gastroenterol* 20:345-350
- Hanauer SB. 2005. Infliximab or cyclosporine for severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 129:1358-1359
- Hisamatsu T, Hibi T. 2005. Immunosuppressants for therapy of patients with ulcerative colitis. *Nippon Rinsho* 63:831-835
- Ishioka T, Kuwabara N, Oohashi Y, Wakabayashi K. 1987. Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides. *Crit Rev Toxicol* 17:215-244
- Jeong HG, You HJ, Park SJ, Moon AR, Chung YC, Kang SK, Chun HK. 2002. Hepatoprotective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression. *Pharmacol Res* 46: 221-227
- Juskiewicz J, Zdunczyk Z. 2004. Effects of cellulose, carboxymethylcellulose and inulin fed to rats as single supplements or in combinations on their cecal parameters. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 139:513-519
- Kim WH, Cho JH, Kim TI. 2003. Rational dosing of azathioprine and 6-mercaptopurine in inflammatory bowel diseases. *Korean J Gastroenterol* 41:423-437
- Klotz U. 2005. Colonic targeting of aminosalicylates for the treatment of ulcerative colitis. *Dig Liver Dis* 37:381-383
- Lakatos L, Pandur T, David G, Balogh Z, Kuronya P, Tollas A, Lakatos PL. 2003. Association of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary with disease phenotype: Results of a 25-year follow-up study. *World J Gastroenterol* 9:2300-2307
- Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, Ando K, Aizu-Yokota E, Sato T, Kasahara T. 2004. Glycyrrhizin and related compounds downregulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line. *Int Immunopharmacol* 15:1633-1644
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Eng J Med* 347:417-429
- Porter SN, Howaeth GS, Butler RN. 1998. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 33: 967-974
- Shibata S. 2000. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi* 120:849-862

접 수 : 2010년 7월 19일
 최종수정 : 2010년 9월 16일
 채 택 : 2010년 10월 1일