

# 槐花散이 Dextran Sulfate Sodium으로 유도된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향

배광호, 공경환

세명대학교 한의과대학 부속 충주한방병원 내과학교실

## Effects of *Goihwa-san* on Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in Mice

Kwang-ho Bae, Kyung-hwan Kong

Dept. of Internal Medicine, Oriental Medical College, Se-Myung University

### ABSTRACT

**Objectives :** This study was carried out to investigate the effects of *Goihwa-san*(GHS) against ulcerative colitis induced by DSS (dextran sulfate sodium).

**Method :** The sample group was divided into three. The control group consisted of mice that were not inflammation-induced. The pathological group was composed of untreated colitis elicited mice. The experimental group was administered GHS after colitis elicitation. The effects on ulcerative colitis were evaluated by the morphological change of colonic mucosa, the anti-oxidant effect, HSP 70, NF- $\kappa$ B, COX-1, COX-2 and iNOS.

**Results :** In terms of immunohistochemical changes, the distribution of COX-1 in mice treated with GHS increased noticeably more than that in the pathological group. The distributions of HSP70, NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS in mice treated with GHS more decreased than those in the pathological group. Regeneration of surface epithelial cell and goblet cell in mucosa was observed by optical microscope. The colonic lengths in GHS-treated mice were more elongated than those of DSS only treated mice.

**Conclusion :** GHS is a candidate treatment for ulcerative colitis.

**Key words :** *Goihwa-san*, ulcerative colitis, NF- $\kappa$ B, immunohistochemistry.

## 1. 서론

궤양성 대장염은 비특이성 염증성 장질환의 하나로서 주된 증상은 혈성 설사, 복통이며 심한 경우에는 대개 발열과 체중감소를 동반한다. 그 원인과 병태생리가 정확히 밝혀져 있지 않아 근원적인 약물요법은 없으며 증상의 완화 및 관해가 치료의 요점이 되는 질환이다<sup>1</sup>.

궤양성 대장염은 유럽과 미국의 보고를 분석해 볼 때 유병율이 인구 10만 명당 70-150 예로 추정되는 질환으로 비교적 흔한 질환이지만 국내에서는 드문 질환으로 인식되어 왔는데, 최근 들어 그 발생 빈도가 점차 늘어나고 있는 추세이다<sup>2</sup>.

최근 궤양성 대장염과 관련된 국내 한의학 논문을 살펴보면 최<sup>3</sup>는 궤양성 대장염을 赤痢의 범주로 보고 赤小豆當歸散으로 실험보고를 하였으며, 최 등<sup>4</sup>은 沙蔞麥門冬湯, 이 등<sup>5</sup>은 導滯湯, 이 등<sup>6</sup>은 地榆湯, 김 등<sup>7</sup>은 導赤地榆湯이 염증성 장질환의 치료에 효과가 있다는 실험적 보고를 하였다. 국외

· 교신저자: 공경환 충북 충주시 봉방동  
세명대학교 부속 충주 한방병원  
TEL: 043-841-1772 FAX: 043-856-1731  
E-mail: kong124@semyung.ac.kr

논문으로는 Yu Jin 등<sup>8</sup>이 American ginseng이 생쥐의 대장염에 항염증 효과가 있다는 보고를 하였으며 Ho-lam Chung 등<sup>9</sup>은 Scutellariae radix가 생쥐의 대장염에 치료 효과가 있다는 보고를 하였다.

궤양성 대장염은 한의학에서는 주로 腸滯, 便血, 腹痛, 積聚, 休息痢, 久痢, 泄瀉, 久瀉 등의 범주로 보고 치료하는데<sup>10</sup> 槐花散은 『丹溪心法』<sup>11</sup>에 처음 수록된 처방으로 『東醫寶鑑』<sup>12</sup> 便血門에서 이를 이용하여 腸胃에 濕邪가 있어 脹滿하며 下血하는 것을 치료한다고 하였다. 이 槐花散은 현재 韓醫學에서 궤양성 대장염의 주된 처방으로 쓰이지 않으나 腸胃의 濕을 없애고 便血을 치료한다는 점에서 혈성 설사가 주증상인 궤양성 대장염의 치료 목표에 부합한다고 여겨진다.

이에 저자는 槐花散이 혈성 설사를 주증상으로 하는 궤양성 대장염에 치료효과를 보일 것으로 생각되어 DSS(Dextran sulfate sodium)로 유발된 대장점막 손상에 대해 槐花散의 효과를 규명하기 위하여, 생쥐 대장점막의 염증효소 억제효과, 점막방어 체계의 회복과 육안적 소견, 조직 손상 완화 등의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

태령 6주된 Balb/C 수컷 생쥐 (오리엔트, 한국)를 분양받아 항온항습항균장치가 있는 사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐 30마리를 선별하여 사용하였다. 전 실험기간 동안 물과 사료를 자유섭취하게 하였다.

#### 2) 실험 약제

본 실험에 사용된 槐花散(Goihwa-san, GHS)은 『東醫寶鑑』<sup>12</sup>에 준하여 세명대부속 충주한방병원에서 구입한 것으로 1점의 분량은 Table 1과 같으며, 槐花는 약물을 용기에 넣고 약한 불로 표면이 황

색이 될 때까지 炒黃하였으며, 甘草는 약물과 물, 蜂蜜을 용기에 함께 넣어 약한 불로 炙하여 사용하였다.

Table 1. Amount and Composition of Goihwa-san

Herb	Scientific Name	Part used	Amount (g)
槐花	<i>Sophora japonica</i> L.	Flower	8
蒼朮	<i>Atractylodes japonica</i> KOIDZ.	Rootstock	4
厚朴	<i>Magnolia officinalis</i> REHD. et WILS.	Bark	4
陳皮	<i>Citrus unshiu</i> MARKOVICH	Pericarp	4
當歸	<i>Angelica gigas</i> NAKAI.	Root	4
枳殼	<i>Citrus aurantium</i> L.	Fruit	4
烏梅肉	<i>Prunus mume</i> SIEB	Fruit	2
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Root	2
Total Amount			32

### 2. 실험 방법

#### 1) 실험 약물의 조제 및 투여

槐花散 2점을 증류수 500 ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압·농축하여 DGA군에 DSS 처리 시작과 함께 5일 동안 2.5 ml/kg/day 량으로 경구투여 하였다. *in vitro*에 사용되는 槐花散의 추출은 감압·농축 후 동결 건조하여 사용하였으며 수득률은 21.7%였다. MTT assay 결과 槐花散 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

#### 2) 실험군 설정

아무런 처치를 가하지 않고 물과 사료를 먹인 대조군 (Control group, CON), DSS로 궤양성 대장염을 유발시킨 군 (DIC group, DIC), DSS와 槐花散을 동시 투여한 군 (DGA group, DGA)으로 나누었으며, 각 군마다 10마리씩 배정하였다.

#### 3) 항산화효과 측정

槐花散 추출물의 항산화효과를 측정하기 위해 riboflavin 을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40 mm buffer 2.6 ml, nitroblue tetrazolium 100  $\mu$ l, EDTA/cyanide 200  $\mu$ l, riboflavin 100  $\mu$ l 그리고 농도별 (1-10 mg) 槐花散 추출물 100  $\mu$ l 을 넣고 3번 섞어주었다. Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 계산하였다.

4) *In vitro*

(1) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank (KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin (Sigma, USA), 100 $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

(2) NF- $\kappa$ B 활성 관련 염증효소 유전자 발현 억제 효과

槐花散이 NF- $\kappa$ B 활성화에 관여하는 I $\kappa$ B kinase (IKK), 염증효소인 induce nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well을 6 well에 plating 하고 12시간 후에 1  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA)를 2시간 처리하여 NF- $\kappa$ B 활성을 유도한 후 槐花散 추출물 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0 mg/ml를 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent (Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit (Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK, iNOS, COX-2 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 2). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

Table 2. Primer of IKK, COX-2, iNOS and  $\beta$ -actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product (bp)	No. of cycles
IKK	sense	5' CCA CCC AGT TCC ACA AGT CT 3'	380	35
	antisense	5' CCT CCA CTG CGA ATA GCT TC 3'		
iNOS	sense	5' AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC 3'	527	30
	antisense	5' AGA ACT GAG GGT ACA TGC TGG AGC C 3'		
COX-2	sense	5' TCT CCA ACC TCT CCT ACT AC 3'	624	35
	antisense	5' GCA CGT AGT CTT CGA TCA CT 3'		
$\beta$ -actin	sense	5' GGA GAA GAT CT GCA CCA CAC C 3'	840	35
	antisense	5' CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG 3'		

IKK, I $\kappa$ B kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2.

5) *In vivo*

(1) DSS를 통한 케양성 대장염 유발

케양성 대장염을 유발하기 위해 5일 동안 5% (wt/vol) dextran sulfate sodium (DSS, 40,000 molecular

weight, ICN, Aurora, OH, USA)을 DIC군과 DGA 군에 voluntary administration 시켰다.

(2) 조직표본제작

DSS 처리 후 sodium pentobarbital 용액으로 마

취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류 고정을 실시하였다. 맹장에서 내림주름창자까지 적출하여 길이를 측정하고 내림주름창자만 따로 분리한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다. 창자 점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### (3) 창자 점막 손상 완화 관찰

#### ① 창자세포의 폐쇄이음 단백질 변화 관찰

Intestinal permeability는 폐쇄이음의 손실과 연관되는데, 폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin-1 (ZO-1)의 분포 변화 관찰을 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 20  $\mu$ g/ml proteinase K에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum (DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti ZO-1 (1:20, Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex (ABC) kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, USA)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하였다.

#### ② 점막 손상 스트레스 변화 관찰

점막 손상 스트레스를 조사하기 위해 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질 (heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화를 mouse anti mouse HSP70 (1:250, Santa Cruz Biotech, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

#### ③ 점막내 술잔세포의 변화 관찰

중성점액질 (neutral mucin)을 분비하여 점액 방벽작용을 하는 술잔세포의 분포 변화를 조사하기 위해서 periodicacid-Schiff reaction (PAS) 염색을 실시하였는데 우선 periodicacid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 hematoxylin에서 1분 동안 대조 염색하였다.

#### ④ 점막고유막내 COX-1의 분포 변화 관찰

창자세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위해 rabbit anti-mouse COX-1 (1:250, Chyman, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### (4) NF- $\kappa$ B 활성 억제와 염증효소 생성 억제 관찰

##### ① NF- $\kappa$ B 활성 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 분포 변화를 조사하기 위해 mouse anti-mouse NF- $\kappa$ B p65 (1:250, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

##### ② 염증효소 생성 변화 관찰

염증 효소인 iNOS와 COX-2의 조직 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS (1:250, Santa Cruz Biotech, USA)와 mouse anti-mouse COX-2 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### (5) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 본 실험 결과의 유의성 검증을 위해 Student T-test를 실시하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.

## III. 결 과

### 1. 항산화효과

槐花散 추출물의 항산화효과는 1 mg/ml에서  $21 \pm 1.4\%$ ,

2 mg/ml에서 31±2.1%, 4 mg/ml에서 41±2.0%, 6 mg/ml에서 54±1.4%, 8 mg/ml에서 63±1.2%, 10 mg/ml에서 70.±2.0%로 용량-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

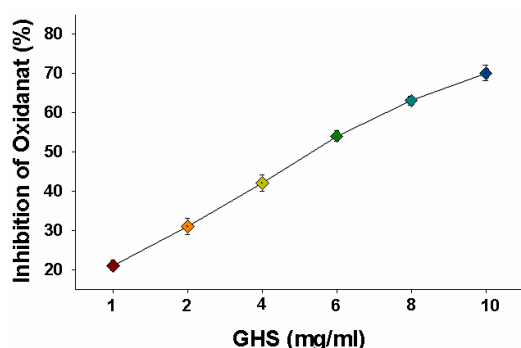


Fig. 1. Anti-oxidant effects of GHS.

The superoxide dismutase abilities of GHS were dose-dependantly increased. GHS, *Goihwa-san*.

## 2. NF-κB 활성화 관련 염증효소 유전자 발현 억제 효과

### 1) NF-κB 활성화 억제

RAW 264.7 macrophages에서 lipopolysaccharide (LPS) 자극에 의한 IKK mRNA 발현은 증가하였는데, 槐花散 추출물 처리 후 용량-의존적으로 발현이 감소되었다. 槐花散 추출물 처리 후 IKK mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 1%, 1 mg/ml에서 6%, 1.5 mg/ml에서 12%, 2 mg/ml에서 30%가 감소하였다(Fig. 2).

### 2) 염증효소 iNOS 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 槐花散 추출물 처리 후 용량-의존적으로 발현이 감소되었다. 槐花散 추출물 처리 후 iNOS mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 5%, 1 mg/ml에서 21%, 1.5 mg/ml에서 36%, 2 mg/ml에서 63%가 감소하였다(Fig. 2).

### 3) 염증효소 COX-2 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 COX-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 槐花散 추출물 처리 후 용량-의존적으로 발현이 감소되었다. 槐花散 추출물 처리 후 COX-2 mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 12%, 1 mg/ml에서 20%, 1.5 mg/ml에서 31%, 2 mg/ml에서 54%가 감소하였다(Fig. 2).

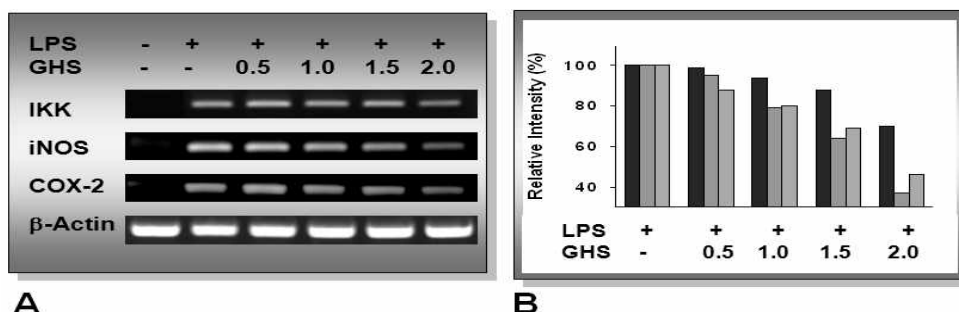


Fig. 2. *In vitro* test for anti-inflammation effects of GHS.

A. Inhibition of IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression. The LPS-induced IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression were dose-dependantly decreased in RAW 264.7 macrophage cells treated with GHS.

B. Relative intensity for IKK (■), iNOS (■) and COX-2(■) mRNA expression.

The LPS-induced IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression were dose-dependantly decreased in RAW 264.7 macrophage cells treated with GHS.

LPS, lipopolysaccharide; GHS, *Goihwa-san*; IKK, IκB kinase; iNOS, induce nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2.

3. DSS로 유도된 생쥐 궤양성 대장염의 항염증효과

1) 창자 길이 변화

대조군의 맹장에서 내림주름창자까지의 길이는 106±5.6 mm 였으나, DSS 처리로 궤양성 대장염이

유도된 DIC군에서는 대조군에 비해 40% 감소한 64±4.8 mm로 측정되었다. 그러나 槐花散을 동시 투여한 DGA군에서는 DIC군에 비해 34% 증가한 86±1.6 mm로 측정되었다(Fig. 3).

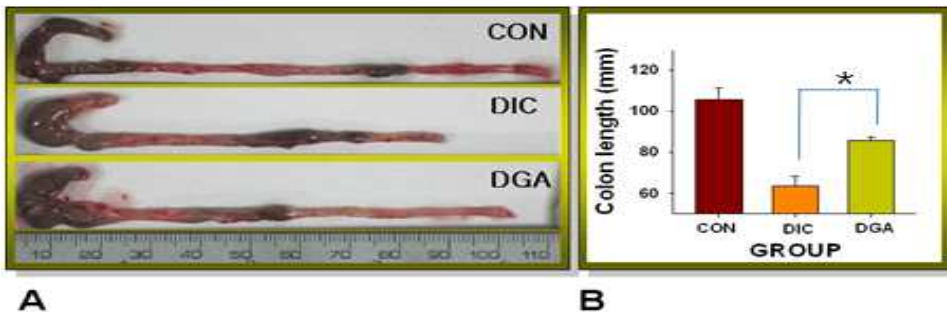


Fig. 3. Comparison of colonic length.

A. Photograph of colon.

The colonic lengths in mice treated with GHS were more elongated than those in DIC.

B. Graph for changes of colonic length.

The colonic lengths in mice treated with GHS were more elongated than those in DIC.

2) 창자 점막 손상 완화

(1) 일반적인 형태 변화

DIC군의 점막에서 창자세포와 술잔세포가 유실된 출혈성 침식 (hemorrhagic erosion)이 관찰되었는데, 많은 수의 림프구, 섬유모세포, 과립백혈구 등 염증관여세포의 침윤 (infiltration)이 점막고유층에서 관찰되었다(Fig. 4-A②). 일부 창자 점막에서 일어난 출혈성 침식이 점막근층 (muscularis mucosae)을 지나 점막밑층 (submucosa)까지 확대된 것도 확인 할 수 있었다. 표면상피 상층부 (apical surface)에 위치한 창자세포는 거의 손상된 형태로 나타났고, 솔모양가장자리도 관찰되지 않았다. 한편 槐花散을 투여한 DGA군에서는 DIC군에 비해서는 출혈성 침식이 완화된 것으로 나타났으며, 점막고유층에서 염증관여세포의 침식 감소가 확인되었다(Fig. 4-A③). 일부 지역의 표면상피 상층부를 제외하고는 정상적인 창자세포의 배열을 확인할 수 있었으며, 창자세포에서 솔모양가장자리도 관찰되었다.

(2) 창자세포의 폐쇄이음 단백질 변화

대조군에서 ZO-1 양성반응은 창자세포 이음복합체의 상층부인 폐쇄이음 부위 세포막에서 잘 관찰되었다(Fig. 4-B①). DSS 처리 후 ZO-1 양성반응은 감소하였는데, 창자세포 이음복합체가 심하게 손상 받은 DIC군에서는 ZO-1 양성반응이 대조군에 비해 59% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-B②). 한편 창자세포 이음복합체가 회복된 DGA군에서는 DIC군에 비해 ZO-1 양성반응이 30% 증가하였고, ZO-1 양성반응을 창자세포의 세포막 상층부에서 관찰할 수 있었다(Table 3, Fig. 4-B③).

(3) 점막 손상 스트레스 변화

DDS 처리로 궤양성 대장염을 유발한 후 스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70의 양성반응세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응세포의 핵과 주변세포질에서 강하게 양성반응을 보였다. DIC군은 대조군에 비해 양성반응세포의 분포가 251% 증가하였다(Table 3, Fig. 4-C②). 이에 반해 DGA군에서는 HSP70 양성반응세포의 분포가

DIC군에 비해 52% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-C③).

(4) 점막 내 술잔세포의 변화

중성점액질을 분비하는 점막 내 술잔세포의 변화를 조사하기 위해 PAS 염색을 실시하였다. 대조군에서 술잔세포는 검붉은색으로 염색되었고, 세포 기저부에 더 많은 분비과립을 축적하고 있었다(Fig. 4-D①). DIC군의 출혈성 침식 주변 창자 점막에서 술잔세포의 분포가 대조군에 비해 줄어들었는데, 표면상피 상층부 (apical surface)로 갈수록 숫자는 적었다(Fig. 4-D②). DGA군에서는 술잔세포의 분포가 DIC군에 비해 증가된 양상으로 관찰되었으며, 일부 표면상피 상층부에서 대조군과 유사한 정상적인 배열로 나타났다(Fig. 4-D③).

(5) 점막고유막내 COX-1의 분포 변화

대조군에서 COX-1 양성반응세포는 주로 창자

세포 및 점막고유층에서 관찰되었으며(Fig. 4-E①), 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났다. 이러한 COX-1 양성반응은 DIC군에서 52% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-E②). 이에 반해 DGA군은 COX-1 양성반응이 DIC군에 비해 62% 증가한 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 4-E③).

Table 3. Image Analysis for Repair of Ulcerative Colitis

Objective	Group		
	CON	DIC	DGA
ZO-1	2555±39	1041±19	1350±19*
HSP70	679±11	2383±10	1140±11*
COX-1	1679±11	813±11	1313±37*

ZO-1, zonula occludin-1; HSP70, heat shock protein 70; COX-1, cyclooxygenase-1; CON, no treated mouse; DIC, DSS only treated mouse; DGA, DSS and GHS treated mouse; \*,  $p < 0.05$  compared with DIC.

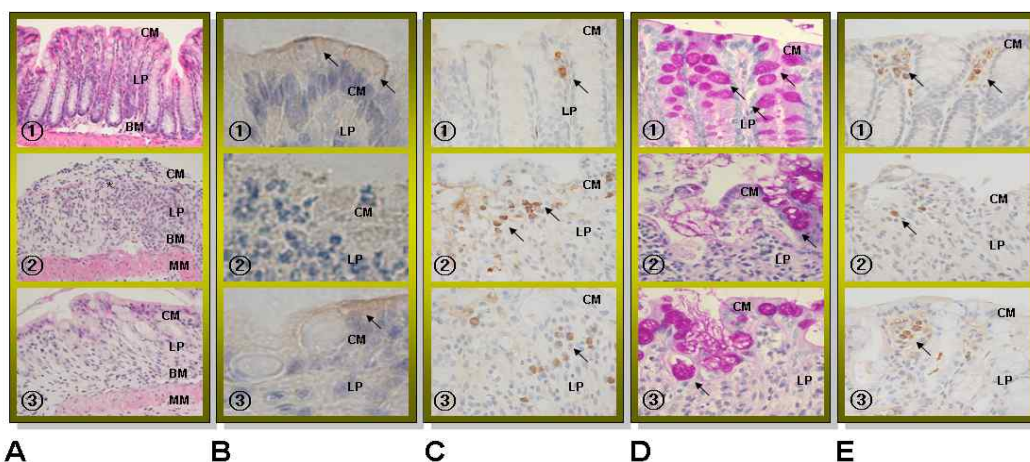


Fig. 4. Mitigative effects of DSS induced ulcerative colitis by GHS (①, no treated mouse; ②, only DSS treated mouse; ③, DSS & GHS treated mouse).

- A. The hemorrhagic erosion (arrow) in mice treated with GHS noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (H&E, x200).
  - B. The zonula occludin-1 (ZO-1) positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more increased than that of DSS only treated mouse (ZO-1 immunohistochemistry, x1000).
  - C. The heat shock protein (HSP) 70 positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (HSP70 immunohistochemistry, x400).
  - D. The PAS positive reacted goblet cells (arrow) in mice treated with GHS noticeably more repaired than that of DSS only treated mouse (PAS, x400).
  - E. The cyclooxygenase-1(COX-1) positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more increased than that of DSS only treated mouse (COX-1 immunohistochemistry, x400).
- CM, colonic mucosa; LP, lamina propria; BM, basement membrane; MM, muscularis mucosa.

3) NF-κB 활성 억제와 염증효소 생성 억제 관찰

(1) NF-κB 활성 변화

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DGA군에서는 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 점막고유판에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 대조군에 비해 154% 증가하였고, DGA군은 DIC군에 비해 22% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-A).

(2) 염증효소 iNOS 분포 변화

염증 효소인 iNOS의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DGA군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 점막고유판에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 대조군에 비해 1557% 증가하였고, DGA군은 DIC군에 비해 67% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-B).

(3) 염증효소 COX-2 분포 변화

염증 효소인 COX-2의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DGA군에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 점막고유판에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 대조군에 비해 570% 증가하였고, DGA군은 DIC군에 비해 50% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-C).

Table 4. Image Analysis of Anti-inflammation by GHS.

Objective	Group		
	CON	DIC	DGA
NF-κB p65	1082±9	2747±18	2136±14*
iNOS	287±6	4757±22	1571±14*
COX-2	469±6	3143±20	1574±11*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)

NF-κB p65, Nuclear factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; CON, no treated mouse; DIC, DSS only treated mouse; DGA, DSS and GHS treated mouse; \*,  $p < 0.05$  compared with DIC.

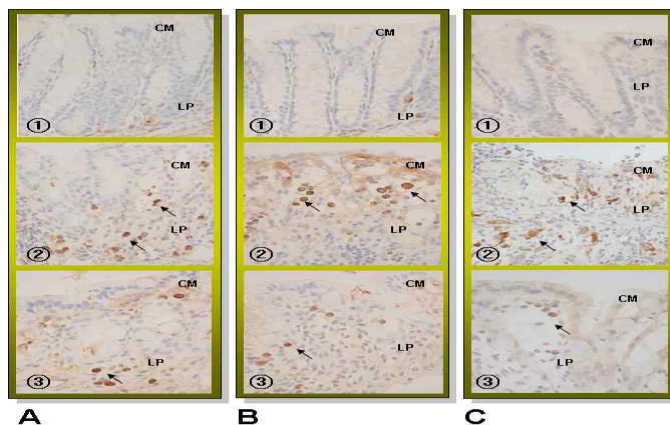


Fig. 5. Anti-inflammation of GHS through suppression of NF-κB activation (①, no treated mouse; ②, only DSS treated mouse; ③, DSS & GHS treated mouse).

- A. The Nuclear factor-κB (NF-κB) p65 positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (NF-κB p65 immuno- histochemistry, x400).
  - B. The inducible nitric oxide synthase (iNOS) positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (iNOS immuno- histochemistry, x400).
  - C. The cyclooxygenase-2 (COX-2) positive reaction (arrow) in mice treated with GHS noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (COX-2 immunohistochemistry, x400).
- CM, colonic mucosa; LP, lamina propria.



#### IV. 고 찰

염증성 장질환은 소장, 대장 등에 염증이 생기는 질환을 일컫는데, 비특이성 염증성 장질환에 해당하는 궤양성 대장염과 크론병을 통상적으로 염증성 장질환이라고 한다<sup>1</sup>.

궤양성 대장염은 크론병에 비하여 침범부위가 넓고 크론병이 장전층을 침범하는 경우와는 달리 점막하 심부조직까지의 침범은 없다. 이러한 병리기전의 차이로 크론병에서는 혈성 설사가 거의 없는 반면, 궤양성 대장염에서는 혈성 설사가 흔히 관찰 된다<sup>2</sup>.

발생률은 지역에 따라 다르며 미국, 영국, 노르웨이, 스웨덴과 같은 북부 지역에서 발생률이 매우 높다. 우리나라에서도 염증성 장질환이 점차 늘고 있는 추세로서 송<sup>13</sup>에 의하면 직장, 대장경 검사 예중 염증성 장질환으로 진단된 예의 비율을 보면 크론병은 1980년 0.2%에서 1995년 1.7%로 증가하였으며 궤양성 대장염은 3.8%에서 8.1%로 증가하였다고 한다.

이 질환의 원인은 명확히 밝혀진 것은 없으나 식생활 습관, 정신적 요인, 감염, 자가면역 등을 원인으로 들고 있다. 최근 발병 기전에 관한 다양한 연구가 진행되고 있는데 특히 전염증효소, 전사인자, arachidonic acid metabolites, reactive oxygen and nitrogen species (RONS) 등과 같은 염증반응 조절을 통한 치료법에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>14-16</sup>.

이러한 노력에도 불구하고 현재 궤양성 대장염의 치료는 근원적인 치료법이 없어 관해에 치료의 초점이 맞추어져 있으며 면역억제제, 5-aminosalicylate 계통의 항염증제가 치료제의 근간을 이루고 있다<sup>12</sup>. 그 외에는 증상에 맞추어 영양상태의 개선, 수액 및 전해질의 공급, 수혈, 정신적 요법, 국소적 corticosteroid 관장이 사용되며 내과적 치료에 의해 합병증이 생기거나 호전이 없을 경우, 또는 이형성 또는 암의 증거가 있을 때에는 수술 적응증이 된다<sup>2</sup>.

궤양성 대장염은 한의학에서는 腸滯, 便血, 腹痛, 積聚, 休息痢, 久痢, 泄瀉, 久瀉의 범주에서 다루며 그 증상에 따라서 脾虛濕阻型과, 脾腎陽虛型, 陰血虧虛型, 肝鬱脾虛型, 濕熱內蘊型, 氣滯血瘀型으로 나누어 辨證施治한다<sup>10</sup>.

위의 분류에 입각하여 살펴보면 槐花散은 濕熱內蘊型에 속한다고 할 수 있으며, 熱보다 血便에 초점이 맞추어진 처방으로서 平胃散의 구성약재인 蒼朮, 厚朴, 陳皮, 甘草가 들어가 있어 和胃去濕하는 작용을 갖고 있으며, 여기에 涼血止血하여 便血, 衄血 등을治하는 槐花와 收斂, 澀腸, 生津하여 腹痛, 久痢滑腸을治하는 烏梅, 補血和血하고 潤燥滑腸하는 當歸, 破氣, 行痰, 消積하여 下痢後重을治하는 枳殼이 가미된 처방이다<sup>17-19</sup>.

『東醫寶鑑』<sup>12</sup> 便血門에서는 腸胃에 濕邪가 있어 脹滿하며 下血하는 것을 치료한다고 하였다. 이처럼 腸胃의 濕을 없애고 便血을 치료한다는 점이 궤양성 장염의 치료의 목표에 부합한다고 여겨진다.

槐花散의 궤양성 대장염에 대한 치료 효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 槐花散의 항산화효과, NF-κB 활성 관련 염증효소 유전자 발현 억제, DSS 처리를 통해 인위적으로 궤양성 대장염이 유발된 생쥐의 주름창자의 길이, 창자점막 손상 그리고 NF-κB 활성과 관련된 면역조직학적 변화를 관찰하였다.

호기성 생물체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명 유지에 필요한 에너지를 생성하는 과정에서 활성 산소를 발생하게 되는데 이 활성산소는 생체에 산화적 손상을 가하여 염증 반응을 통하여 조직손상을 일으킨다<sup>20</sup>. 때문에 항산화작용은 염증억제에 있어 중요한 작용을 하는데 槐花散 추출물의 항산화효과는 본 실험에서 용량-의존적으로 증가하였다.

*In vitro* 상에서는 RAW 264.7 macrophages를 가지고 실험 하였는데 macrophage는 전염증효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2

(COX-2)를 생산할 뿐만 아니라, 궤양성 대장염 발병 초기의 염증과 면역반응 조절에 중요한 역할을 한다<sup>21-24</sup>.

본 실험에서는 RAW 264.7 macrophages에 LPS로 NF- $\kappa$ B 활성을 유도하여 IKK, iNOS, COX-2 mRNA 발현을 관찰하였다.

NF- $\kappa$ B는 궤양성 대장염에서 산화적 스트레스에 의한 염증과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 물질이다. 산화적 스트레스의 증가는 I $\kappa$ B kinase(IKK)를 활성화시켜 I $\kappa$ B protein의 serine residue를 인산화시키면, 인산화된 I $\kappa$ B protein은 ubiquitination되어 26S proteasom에 의해서 분해되며, 이 때 불활성화된 상태로 세포질에 존재하는 NF- $\kappa$ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site에 결합하게 되어 염증관련유전자의 발현을 유도한다<sup>20,24,25</sup>.

iNOS는 과도한 nitric oxide(NO)를 생산하며 장내 항산화방어체계의 불균형을 초래하여 궤양성 대장염에서 장내 산화스트레스에 의한 조직손상을 일으키는 물질이다<sup>21,22</sup>.

COX-2는 염증세포와 중추신경계에서 prostaglandin 합성을 주도하여 만성염증을 유발하는 물질이다<sup>26-28</sup>.

본 실험에서 槐花散 추출물 처리 후 IKK mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 1%, 1 mg/ml에서 6%, 1.5 mg/ml에서 12%, 2 mg/ml에서 30%가 감소하였으며, iNOS mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 5%, 1 mg/ml에서 21%, 1.5 mg/ml에서 36%, 2 mg/ml에서 63%가 감소하였고, COX-2 mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 12%, 1 mg/ml에서 20%, 1.5 mg/ml에서 31%, 2 mg/ml에서 54%가 감소하였다. 이는 항산화 효과가 있는 槐花散이 용량의 증가에 따라 IKK, iNOS, COX-2의 mRNA 발현량이 감소하는 것을 볼 때 항염증 작용을 가지고 있는 것으로 생각된다.

*In vivo*상에서 槐花散의 치료효과를 조사하기 위한 실험에서는 궤양성 대장염의 유발을 위해 dextran sulfate sodium (DSS)를 사용하였는데, 궤양성 대

장염의 유발물질로 DSS를 사용한 이유는 Polyanionic compound인 DSS가 대식세포에 탐식되어 장막의 구성 변화를 일으켜 점막내로 luminal antigen 유입을 자극하고 장내 염증반응을 유도하여 설사, 혈변, 체중 감소, 점막 궤양 그리고 대장-직장 길이 감소 등 실제 궤양성 대장염과 유사한 증상을 일으키기 때문이다<sup>29,30</sup>.

DSS로 유도된 생쥐의 대장점막염증에 대한 항염증효과를 살펴보기 위하여 창자길이 변화와 창자 점막 손상 완화, NF- $\kappa$ B 활성 억제와 염증효소 생성 억제를 관찰하였는데, 창자 점막 손상 완화는 일반적인 형태 변화 뿐 아니라 창자세포의 폐쇄이음 단백질 변화, 스트레스 변화, 슬잔세포의 변화, 점막 고유막내 COX-1의 분포 변화를 통해 관찰하였다.

궤양성 대장염에서는 폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin-1 (ZO-1) 분포가 감소되는데, 이는 점막상피세포사이에 있는 이음 복합체의 가장 꼭대기 부분에 존재하는 폐쇄띠(zonula occludens)의 손상에 의한 것이며 폐쇄띠의 손상에 따른 투과성의 증가는 장내 염증반응을 유도한다<sup>31,32</sup>.

또한 궤양성 대장염에서는 점막 상피 손상이 일어나 Heat shock protein 70 (HSP 70)이 대량 합성되는데 HSP 70은 대부분의 생물체에서 발견되는 스트레스 저항 단백질로 허혈, 발열, 저혈당, 바이러스 감염, 경련, 중금속 오염 등 다양한 형태의 스트레스 상황에서 농도가 증가한다. 세포내 변성된 단백질은 열성단백질 인자를 자극하여 HSP70 유전자의 전사를 유도하여 HSP70을 생성하며, HSP70은 세포상해에 저항이 있는 지역에서 주로 발견된다<sup>33-35</sup>.

House-keeping enzyme인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데 궤양성 대장염에서는 COX-1 생성 감소가 일어난다<sup>36</sup>.

대장에 존재하는 슬잔세포는 대장 내의 점액을 생산하는 주된 세포로서 생산된 점액은 점막을 보

호하는 역할을 하는데 궤양성 대장염에서는 이 술잔세포의 감소가 나타난다<sup>36</sup>.

실험 결과 DGA군에서 DIC군에 비하여 생쥐의 주름창자 길이는 34% 증가한  $86 \pm 1.6$  mm로 측정되었는데, 이 등<sup>5</sup>의 導滯湯 실험에서의 21%, 이 등<sup>6</sup>의 地榆湯 실험에서의 약 11.4% 보다 높은 수치를 보였다.

창자 점막손상도 완화되어 출혈성 침식이 완화되었으며, 점막고유층에서 염증관여세포의 침식감소가 확인되었고, 정상적인 창자세포의 배열, 솔모양가장자리도 관찰되었다. 또한 폐쇄이음 단백질인 ZO-1 양성반응이 DGA군에서 DIC군에 비해 30% 증가하였으며 점막 손상 스트레스 변화에 있어 HSP70 양성반응세포의 분포가 52% 감소하였다. 술잔세포의 변화에 있어서도 술잔세포의 분포가 DIC군에 비해 증가된 양상으로 관찰되었으며 COX-1 양성반응은 DGA군에서 DIC군에 비해 62% 증가한 것으로 관찰되었다.

이는 槐花散이 폐쇄대 손상을 완화하여 장내 투과성을 감소시켰으며, 점막 상피 손상에 따른 스트레스를 감소시키고, 점막 보호역할을 하는 COX-1의 생성을 증가시켜 점막손상의 완화와 함께 창자 길이 감소의 완화 또한 가져왔을 것으로 생각된다.

창자 점막에서의 NF- $\kappa$ B 활성화 억제를 통한 항염증작용은 NF- $\kappa$ B p65 양성반응에서 DGA군이 DIC군에 비해 22% 감소하였으며, iNOS는 67%감소, COX-2는 50%감소하였다. 이러한 결과는 *in vitro*와 마찬가지로 槐花散이 NF- $\kappa$ B 활성화억제를 통해 과도한 염증작용을 조절한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 槐花散의 항산화작용, 항염증 작용 및 위점막 보호작용으로 인하여 궤양성 대장염 치료제의 가능성을 제시해 주고 있으며, 이에 대해 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

槐花散이 Dextran sulfate sodium(DSS)으로 유

도된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향을 조사하기 위해 행해진 본 연구는 槐花散의 항산화효과, NF- $\kappa$ B 활성화 관련 염증효소 유전자 발현 억제, DSS 처리를 통해 인위적으로 궤양성 대장염이 유발된 생쥐의 주름창자의 길이, 창자점막 손상 그리고 NF- $\kappa$ B 활성화와 관련된 면역조직학적 변화를 관찰하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 항산화효능을 가지고 있는 槐花散은 *in vitro* 실험에서 LPS로 NF- $\kappa$ B 활성화가 유도된 RAW 264.7 macrophages에서 IKK, iNOS, COX-2 mRNA 발현을 용량-의존적으로 감소시켰다.
2. 槐花散이 투여된 생쥐의 창자 길이는 DIC군에 비하여 감소의 완화를 보였다.
3. 槐花散이 투여된 생쥐의 창자 점막은 DIC군에 비하여 출혈성 침식의 완화와 염증관여세포의 침식감소를 보였다.
4. 槐花散이 투여된 군에서는 DIC군에 비하여 ZO-1 증가, HSP70 감소, 술잔세포 증가, COX-1 증가를 통하여 창자 점막손상이 완화되었음을 알 수 있었다.
5. 槐花散이 투여된 군의 창자 점막에서 NF- $\kappa$ B 활성화 억제를 통한 항염증작용 (NF- $\kappa$ B p65 감소, iNOS 감소, COX-2 감소)이 일어났다.

## 참고문헌

1. 김정룡. 소화기계 질환. 서울: 일조각; 2005, p. 277-315.
2. 해리슨내과학편찬위원회. 해리슨내과학. 서울: 도서출판MIP; 2006, p. 1937-50.
3. 최은영. Indomethacan으로 유발된 생쥐의 대장점막 손상에 대한 赤小豆當歸散의 치료효과. 대한한방내과학회지. 2005;26(2):341-52.
4. 최준혁, 임성우. 沙蔘麥門冬湯이 궤양성 대장염 유발흰쥐에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002; 23(4):169-85.

5. 이주아, 공경환. DSS로 유발된 생쥐의 대장점막 손상에 대한 導滯湯의 효과. 대한한방내과학회지. 2008;29(3):752-64.
6. 이성환, 최흥민, 임성우. DSS으로 유발된 생쥐의 대장염에 미치는 地榆湯의 효과. 대한한의학회지. 2007;28(1):187-97.
7. 김승욱, 임성우. 導赤地榆湯이 궤양성 대장염 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한 한의학회지. 2002; 23(3):200-10.
8. Yu J, Venkata S, Lei Y, Anne BH, Xiangli C, Patricia A et al. American ginseng suppresses inflammation and DNA damage associated with mouse colitis. Carcinogenesis. 2008;29(12):2351-59.
9. Chung HL, Yue GL, To KF, Su YL, Huang Y, Ko WH. Effect of Scutellariae Radix extract on experimental dextran-sulfate sodium-induced colitis in rats. World Gastroenterol. 2007;13(42):5605-11.
10. 전국한의과대학 비계내과학교실. 脾系內科學. 서울: 군자출판사; 2008, p. 36-75.
11. 朱震亨原著, 方廣編註. 丹溪心法附餘 上卷. 서울: 대성문화사; 1993, p. 406.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 동의보감출판사; 2005, p. 138-40.
13. 송인성. 한국인의 염증성 장질환. 대한내과학회지. 1999;57(4):661-74.
14. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in Inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;287(1):7-17.
15. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. 2001;1:480-1.
16. Fazio V. Current status of surgery for inflammatory bowel disease. Digestion. 1998;59(5):470-80.
17. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 中國:施風出版社;中華民國 64年, 券3, 第四葉.
18. 강순수. 바른방제학. 서울: 대성문화사; 1996, p. 102-3.
19. 康秉秀, 高雲彩, 金圭烈, 金先熙, 金仁洛, 金護哲 등. 本草學. 서울: 영림사; 2000, p. 394, 615, 579.
20. Baeuerle PA. Ikb-NF-kB structure: at the interface of inflammation control. Cell. 1998;95:729-31.
21. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994;9:1199-206.
22. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 1991;288(2):481-7.
23. Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91(26):12383-7.
24. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. Engl J Med. 1997;336(15):1066-71.
25. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kB - Ten years after. Cell. 1996;87(1):13-20.
26. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. J Hepatol. 1993;17(2):38-40.
27. Rothkötter HJ, Pabst P, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. Veterinary Immunology Immunopathology. 1999; 72:157-65.
28. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93(5):705-16.
29. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. Scand J Gastroenterol. 1992;27(7):529-37.

30. Björck S, Jennische E, Dahlström A. Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate-induced colitis in rats. *Ahlman Dig Dis Sci.* 1997;42(4):824-32.
31. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):216-28.
32. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2001-9.
33. Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR. Heat shock proteins as markers of neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 1989;6(1):93-100.
34. Vass K., Beger ML., Nowak TS Jr, Welch WJ, Lassmann H. Induction of stress protein HSP70 in nerve cell after status epilepticus in the rat. *Neurosci Lett.* 1989;100(1-3):259-64.
35. Bergstedt K, Hu BR., Weiloch T. Initiation of protein synthesis and heat shock protein-72 expression in the rat brain following severe insulin induced hypoglycemia. *Acta Neuropathol.* 1993;86(2):145-53.
36. Choitsu S. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal patho-physiology. *J Gastroenterol.* 1998;33:618-24.