

해조가 2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid로 유발된 염증성 장질환 동물모델에 미치는 영향

이상욱, 류봉하, 박재우
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of *Sargassum pallidum* on 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in Mice

Sang-wook Lee, Bong-ha Ryu, Jae-woo Park
3rd Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : The aim of the current study was to investigate the effects of *Sargassum* (*Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.; SP) on the experimental colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in mice.

Methods : ICR mice were divided into 7 groups (NOR, CON, SS50×5, SP20×3, SP50×3, SP20×5, SP50×5). TNBS processing was intrarectally applied to all experimental groups on the 3rd experiment day, except the normal group (NOR). For investigating the prophylactic effect, SP at doses of 20 mg/kg (SP20×5) and 50 mg/kg (SP50×5) were orally administered for 5 days. The SP at doses of 20 mg/kg (SP20×3) and 50 mg/kg (SP50×3) were orally administered for 3 days after the colitis induction in order to check the effect of treatment. As a positive control group, sulfasalazine 50 mg/kg (SS50×5) was administered.

Macroscopic findings of epithelial tissue on mice were measured by colon length and macroscopic score.

Histologic findings were also checked by crypt cell, epithelial cell, inflammatory cell and edema of submucosa.

We measured the ability of SP to inhibit lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. We also measured levels of the inflammatory markers, interleukin (IL)-1 β and cyclooxygenase-2 (COX-2), its transcription factor activation, phospho-NF- κ B (pp65), in the colon by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis. We measured activation of fecal bacterial enzyme, β -glucuronidase and degradation activation of fecal glycosaminoglycan (GAG), and hyaluronic acid.

Results : Oral administration of SP on mice inhibited TNBS-induced colon shortening and myeloperoxidase activity in the colon of mice as well as IL-1 β and COX-2 expression. SP also inhibited TNBS-induced lipid peroxidation and pp65 activation in the colon of mice. SP inhibited β -glucuronidase activation and fecal hyaluronic acid degradation activation as well.

Conclusions : SP could be a possible herbal candidate and preventive prebiotic agent for treating inflammatory bowel disease (IBD). Further experiments to differentiate effects of SP on IBD, such as other solutions and extracting times, might be promising.

Key words : *Sargassum pallidum*, inflammatory bowel disease, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, lipid peroxidation, fecal enzyme

1. 서론

염증성 장질환은 장에 만성적인 원인불명의 염

· 교신저자: 류봉하 서울특별시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 한의과대학 한방병원 한방3(비계)내과
TEL: 02-958-9137 FAX: 02-958-9136
E-mail: rbongh@khu.ac.kr

증을 일으키는 질환으로 궤양성 대장염과 크론병을 지칭한다¹.

궤양성 대장염과 크론병은 발생기전상 중요한 부분을 공유하고 있고, 부분적으로는 임상양상 및 침범부위, 형태학적 양상들이 겹치는 부분이 있어, 염증성 장질환으로 묶어 원인 및 발생기전을 설명

하고 있다².

현재까지 정확한 병태 생리는 알려져 있지 않지만, 가능한 원인들로는 환경적 소인, 세균감염에 의한 면역조절 기능의 결함, 유전적 인자 등이며, 각 인자들은 단독 또는 복합적으로 관여한다³.

염증성 장질환은 장기간에 걸쳐 혈변, 설사, 체중감소 등의 증상이 호전과 악화를 반복하는 특징을 지니며, 장압, 천공, 폐색, 출혈 등 각종 합병증을 초래한다⁴.

염증성 장질환의 고발생 지역인 북유럽과 코카시안들에서는 1980년 이래 발생률이 일정 수준을 유지하고 있는 것에 비해, 저발생 지역의 발생률이 빠른 속도로 증가하고 있어, 지역적, 인종적 차이에 따른 발생률의 간격이 좁아지고 있다⁵.

서양의학에서는 염증 및 면역반응을 억제하는 치료법을 사용하고 있다. 근본 치료가 불가능하여 대증적인 치료법을 시행하고 있으며, 장기간 사용 시 소화기 증상, 다양한 과민반응, 혈액학적 부작용 등이 보고되어 있다⁶. 서양의학에서는 biological agents, leukocytapheresis, probiotics, 기생충의 면역반응 억제력을 이용하는 등 부작용을 낮춘 효과적인 치료법을 찾기 위한 연구가 이루어지고 있으나¹, 아직까지 뚜렷한 치료제를 찾지 못하고 있어, 한의학적 처방 및 본초 자원을 이용한 염증성 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다.

한의학에서도 염증성 장질환에 대한 연구가 증가 추세에 있어서, 실험적으로는 dextran sulfate sodium 이나 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 동물모델을 이용해 소염정장탕⁷, 사미연견탕⁸ 등의 한방처방으로 치료효과를 연구한 사례가 있고, 전침⁹, 구진약침³ 등의 치료법에 대한 효과가 보고되었다. 임상적으로는 청심연자탕¹⁰, 보장건비탕¹¹ 등을 사용한 치험사례가 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 한약 단미재 및 한약 처방에서 염증성 장질환에 대한 효과적인 한방 치료제를 찾을 가능성이 높을 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 金⁸에 의해, 실험적 염증성 장질

환에 대한 효능이 검증되었으나, 구성 약물 중 주된 효능을 나타내는 약물이 밝혀지지 않은 사미연견탕에 대해, 처방 구성 약물 중 항염증¹², 항산화¹³, 항암효과¹⁴가 뛰어난 것으로 알려진 해조 (Sargassum, *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.; SP)가 주된 효능을 나타낼 것으로 추정하여, 생쥐를 이용해 TNBS로 염증성 장질환을 유발하고, 해조를 투여하여 생쥐의 대장점막의 육안 형태 변화, 대장 길이, 조직학적 염색소견, 장점막 효소활성, immunoblot을 이용한 생화학적 지표, enzyme linked immunosorbent assay를 이용한 생화학적 지표 및 분변 중 세균성 효소활성, hyaluronic acid 분해활성에 대한 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 시료의 제조 및 동물

1) 시료의 제조

해조 (*Sargassum*, *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.; SP)는 경희의료원 약제과에서 구입하여 사용하였다. SP 100g을 절편하여 round flask에 넣고, 20배 (2 l)의 증류수를 가한 후 120°C에서 2 시간동안 진탕기 (Misung Scientific Co., Korea)로 열수 추출한 후 이 과정을 2회 반복하고, rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 사용하여 감압농축하였다. 이 농축액을 동결건조하여 수율 4.6%를 얻어 검액으로 사용하였다. 투여시에는 0.2 ml의 멸균된 증류수에 녹여 경구 투여하였다.

2) 동 물

5주령 ICR계 수컷 생쥐 (24-28 g)는 Orient Experimental Animal Breeding Center (Seoul, Korea)에서 공급되었다. 20-22°C, 50±10% 습도 조건에서 표준 실험실 먹이 (Samyang, Korea)와 물을 임의로 먹도록 하여 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후에 사용하였다.

모든 과정에서 동물과 동물의 사육과 관련된 절차는 국제 가이드라인 'Principles of Laboratory

Animals Care' (NIH publication no. 85-23 revised 1985)를 따랐다.

2. 방법

1) 동물모델 제작 및 검액 투여

생쥐에 대장염을 유발하기 위해, 에테르로 가볍게 마취된 생쥐에 존대를 항문으로 3.5-4 cm 삽입하여 2.5% (w/v) TNBS (Sigma, USA) 함유 50% 에탄올 용액을 0.1 ml 주입하였으며, 주입 후 30초간 꼬리를 위로 들어서 주입된 약물이 항문을 통해 흘러나오지 않도록 하여 최대한 직장내로 약물이 흡수되도록 하였다. 생쥐의 95%는 TNBS 관장을 유지하였으나, 혼합액이 흘러나온 경우는 실험에서 제외시켰다.

정상군 (NOR)은 멸균식염수만 주입하였고, 대장염 유발 대조군 (CON)은 3일째에 TNBS로 대장염을 유발시켰다. 대장염 유발 이틀 전부터 검액을 투여한 실험군으로 검액 20 mg/kg을 투여한 실험군 (SP20×5)과 50 mg/kg을 투여한 실험군 (SP50×5), 대장염 유발한 후에 검액 20 mg/kg을 투여한 실험군 (SP20×3)과 50 mg/kg을 투여한 실험군 (SP50×3)으로 나누었다. 양성 대조군으로 sulfasalazine (Sigma, USA) 50 mg/kg을 대장염 유발 이틀 전부터 투약한 군 (SS50×5)의 7개 그룹으로 나누었고, 생쥐는 무작위로 선정하였으며, 각 그룹은 5마리의 생쥐로 구성하였다. 검액의 투여는 매일 오전 10시에 1회 투여하였다(Fig. 1).

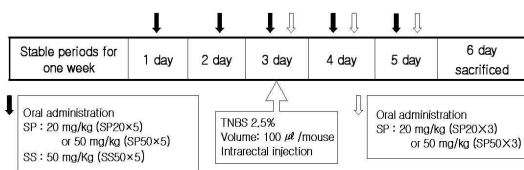


Fig. 1. The Schematic Outline for Induction of Colitis by TNBS and SP Treatments.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. Ag.
 SS: Sulfasalazine(positive control)

2) 육안적 형태 변화 소견 및 대장의 길이 측정
 에테르 마취하에 생쥐를 경추탈골로 희생하여 복부를 정중 절개하고, 항문에서 ileocecal junction까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지 길이를 측정하고, 대장을 가른 후 대장 내용물을 제거하고, phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하여 직장에서부터 맹장까지 궤양과 미란 등의 병변이 있는지, 두 명의 실험자가 관찰한 후 대장병변의 정도를 Table 1의 기준으로 분류하였다¹⁵.

Table 1. Grading Criteria for Macroscopic Damage Score of Intestine

Grade	Description
0	No ulcer, no inflammation
1	No ulcer, local hyperemia
2	Ulceration without hyperemia
3	Ulceration and inflammation at one site only
4	Two or more sites of ulceration and inflammation
5	Ulceration extending more than 2cm

일부는 장점막을 분리하여 myeloperoxidase (MPO) 활성, 염증 관련 효소와 인자, cytokine들의 발현량을 측정하는데 사용하였다. 일부는 조직검사를 위해 10% 완충된 포르말린으로 고정하였다.

3) 조직학적 염색소견에 대한 관찰

조직을 4% para-formaldehyde에 담귀 고정시켰다. 다음날 PBS로 3번 (1hr/each time) 세척하고, 15% sucrose에 2번 (1hr/each time) 세척하여 30% sucrose에 8시간 동안 담귀 탈수시켰다. 3일째 되는 날, 블록틀에 넣고, -25℃에서 optimal cutting temperature (OCT) compound (Sakura Finetek, USA)로 section용 block을 만들어 Cryout Microtome-CM1850 (Leica Microsystems, Germany)을 이용해 5 µm로 조직 section을 하였다. 슬라이드 글라스에 5 µm 절편을 붙이고, 슬라이드에 붙어 있는 OCT compound를 PBS로 2분간 세척하였다. Hematoxylin-eosin (HE) 염색을 한 후 현미경으로 관찰하였다.

4) 장점막의 효소활성 측정

(1) 장점막 처리

장점막을 분리 후 장벽을 끊어내어 ice-cold 관류 용액 (0.15 M KCl, 2 mM EDTA, pH 7.4)으로 관류하고, 50 mM 트리스 염산 완충액 (Tris-HCl buffer, pH 7.4)에서 균질화하였다. 4°C, 10000×g으로 30분동안 원심분리한 후 상층액은 산화방지제 방어체계의 측정에 사용하였다.

(2) MPO 활성

Mullane 등¹⁶에 따라, 50 µl의 대장 상층액에 1.6 mM의 tetramethyl benzidine (Sigma, USA)과 0.1 mM의 H₂O₂를 가해서 37°C로 유지하여, 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. MPO 활성은 37°C에서 peroxide를 저하시키는 효소의 수량으로 규정하고, 단백질 mg당 MPO unit(U)로 표시하였다. 단백질 함량은 Bradford 방법¹⁷에 의해 분석하였다.

(3) Lipid peroxidation(LPO) 활성

지질과산화는 Ohkawa 등¹⁸에 의해 기술된 것처럼, 대장의 균등액에서 측정하였다. 50 mM 트리스 염산 완충액 (Tris-HCl buffer, pH 7.4), 500 µM tert-butyl hydroperoxide 에탄올 용액과 1 mM 염화제일철을 포함하는 반응 혼합물을 37°C에서 90분간 배양하였다. 0.2 ml 8% sodium dodecyl sulfate와 1.5 ml 20% acetic acid (pH 3.5)를 넣어 반응을 정지시켰다. Malondialdehyde (MDA)의 양은 1.5% thiobarbituric acid (TBA)를 추가하고 95°C에서 45분간 가열해서 평가하였다. 냉각한 후, 샘플은 원심분리기로 분리하여, 상층액의 TBA 반응 물질 (TBA reactive substances=TBARS)은 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화의 정도는 단백질 mg당 90분간 반응시켜 생성된 TBARS nmol로 표시하였다.

(4) Reduced glutathione 정량

조직 혼탁액의 환원형 glutathione 양은 Pagalia와 Valentine의 방법¹⁹에 따라 측정하였다. 대장조직 상층액 0.2 ml에 25% trichloroacetic acid 0.5 ml를 넣고, 13000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액 300 µl를 취하고, 1 mM DTNB 2.7 ml를 넣은 후

상온에서 20분간 방치한 후, 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Liposome 준비와 지질과산화 억제활성

Liposome 준비를 위해, 0.1 g의 *L*- α -phosphatidylcholine(type IV-S; Form soybean, Sigma, USA)을 10 ml의 diethyl ether에 용해하고, 0.6 ml 증류수를 추가하였다. 혼합물은 ultrasonic disrupter (Eyeler Co., Japan)로 초음파 처리하여 동결건조하였다. 추출물은 30 ml 0.1 M *N*-(2-acetamido)-imidinodiacetic acid 나트륨 완충액 (pH 6.7)에 부유시켜, 15분간 초음파 처리하고, 4°C에서 1500×g으로 10분간 원심분리하였다. 상층액은 liposome 현탁액으로 이용되었다. 지질과산화 억제활성을 분석하기 위해, 100 µl liposome 현탁액은 berberine이나 장내 세균이 있고 없는 상태에서 37°C에 1시간 동안 1.5 ml 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 100 µl 2 mM 염화제일철, 100 µl 4 mM ascorbic acid에서 배양되었다. 반응 혼합물의 지질과산화물은 이전에 보고된 것처럼 TBARS로 측정하였다²⁰.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 생화학적 분석

Interleukin-1 β (IL-1 β)의 ELISA를 위해, 대장조직을 1% protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Germany)과 1% phosphatase inhibitor cocktail이 포함된 ice-cold radio-immunoprecipitation assay (RIPA) 용해 완충액 (Sigma, USA) 1 ml를 넣어 균질화하였다. 용해물은 4°C 15000×g으로 15분간 원심분리하여 상층액을 96-well ELISA plates에 옮겼다. IL-1 β 농도는 상업용 ELISA kits (Pierce Biotechnology Inc., USA)를 이용하여 측정되었다.

6) Immunoblot을 이용한 생화학적 분석

Cyclooxygenase-2 (COX-2), phospho-nuclear factor- κ B (phospho-NF- κ B, pp65), β -actin의 immunoblot 분석을 위해, 현탁된 생존 세포를 획득하기 위해 1% protease inhibitor cocktail과 1% phosphatase

inhibitor cocktail이 포함된 RIPA 용해 완충액 1 ml 내에 대장조직을 주의깊게 균질화시켰다. 원심 분리 후에, 상층액은 immunoblot 분석에 사용되었다. 모은 세포 단백질은 8-10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 위에서 전기영동을 해서, nitrocellulose membrane으로 옮겨졌다. COX-2, pp65, β -actin의 레벨은 이전에 기술한 것처럼 분석되었다²¹. 면역검출은 enhanced chemiluminescence detection kit (Pierce Biotechnology Inc., USA)를 이용하여 수행되었다.

7) 분변 중 세균성 효소활성 및 hyaluronic acid 분해활성

(1) 분변처리 및 장내총균 조효소액의 제조

생쥐의 신선한 분변 (또는 장내용물)을 무작위로 모아 약 1 g을 20 ml의 멸균 cold 생리식염수에 현탁하여 500×g에서 5분간 원심분리하여 섬유질과 기타 불순물을 제거한 상층액을 10000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 20 mM phosphate 완충액에 현탁하여 조효소액으로 사용하였다. 침전물은 cold saline으로 1회 세척하여 -70°C에서 보관하였다.

(2) β -glucuronidase 활성

분변 침전물을 0.1 M potassium phosphate 완충액 (pH 7.0)으로 현탁한 후 10배 희석한 것을 효소액으로 사용하였다. 효소액 100 μ l, 0.1 M potassium phosphate 완충액(pH 7.0) 380 μ l, 기질인 10 mM *p*-nitrophenyl- β -glucuronide (Sigma, USA) 20 μ l를 60분간 37°C에서 반응시킨 후, 반응 정지액으로 0.5 N NaOH 500 μ l를 가한 후 3000×g에서 원심분리하여 405 nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다.

(3) Hyaluronic acid 분해활성

0.2 ml hyaluronic acid (1.0 mg/ml, Sigma, USA)와 0.6 ml 대변 부유물을 함유하는 반응 혼합물은 37°C에서 1시간동안 배양하여, 4°C에서 3000×g으로 원심분리하였다. 500 μ l의 상층액에 0.1 ml 0.4 M NaOH과 0.1 ml 0.4 M 칼륨 붕산염을 넣어 5분간 끓여서, 실온으로 냉각하여, 3 ml 67 mM *p*-dimethylaminobenzaldehyde

를 추가하여, 585 nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다.

3. 통계

모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였으며, 통계 유의성 평가는 one-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) 또는 student t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의성있는 결과로 판정하였다. 통계프로그램은 SPSS for windows version 12.0 (SPSS inc., USA)을 사용하였다.

III. 결과

1. 육안적 형태 변화 소견 및 대장 길이에 대한 효과

1) 대장 길이의 변화

맹장부터 대장 끝까지의 길이를 측정한 결과, NOR군은 7.14±0.15 cm, CON군은 6.70±0.19 cm, SS50×5군은 7.04±0.23 cm, SP20×3군은 6.94±0.42 cm, SP50×3군은 7.02±0.11 cm, SP20×5군은 6.88±0.28 cm, SP50×5군은 7.08±0.28 cm로 나왔다. SP50×3군과 SP50×5군은 CON군과 비교했을 때, 통계적으로 유의하게 대장 길이 단축을 억제하였다($p < 0.05$). SP20×3군과 SP20×5군은 CON군에 비해 대장 길이는 길었으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

2) 대장의 육안 형태 변화

대장의 육안적 손상 정도를 객관화하여 수치로 나타내기 위해 Hollenbach의 기준¹⁵을 이용하여 대장 손상의 정도를 분석하였다(Table 1). 육안 형태 손상 점수 측정 결과, NOR군은 0.4±0.55, CON군은 3.0±0.71, SS50×5군은 1.4±0.89, SP20×3군은 2.2±0.84, SP50×3군은 1.6±1.14, SP20×5군은 1.6±0.55, SP50×5군은 1.6±0.55로 나왔다. SP20×5군과 SP50×5군은 CON군과 비교했을 때, 육안 형태 손상 점수가 통계적으로 유의하게 낮았다($p < 0.01$). SP20×3군과 SP50×3군은 CON군에 비해 육안 형태 손상 점수가 낮게 나왔으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

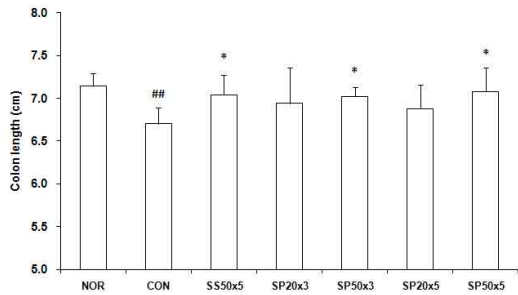


Fig. 2. Effects of SP on Colon Length on TNBS-Induced Colitis.

The colon lengths were measured on 3rd day after the intrarectal injection of TNBS. Values of colon lengths indicate the mean±S.D.(n=5). # Significantly different from normal group(## p<0.01).

* Significantly different from control group(* p<0.05).

NOR: Normal group without any treatment.
CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50x5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.
SP20x3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.
SP50x3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.
SP20x5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.
SP50x5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.
SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.
SS: Sulfasalazine

CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50x5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.
SP20x3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.
SP50x3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.
SP20x5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.
SP50x5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.
SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.
SS: Sulfasalazine

2. 조직학적 염색소견에 대한 효과

HE 염색한 조직을 현미경으로 관찰한 결과, NOR 군은 선와 (crypt), 상피세포, 점액세포가 잘 발달되어 있었으며, CON군에서는 표면 상피세포가 탈락되었고, 선와가 손상되었고, 점막하층에 많은 염증세포들이 모였고, 점막하층의 부종을 관찰할 수 있었다. SS50x5군은 CON군에 비하여 상피의 재생 현상을 관찰할 수 있었고, 재생된 선와를 관찰할 수 있었다. 점막하층의 부종과 염증세포들도 적게 관찰되었다. SP50x3군, SP50x5군은 CON군에 비하여 상피세포의 재생이 관찰되었고, 점막하층의 부종과 염증세포가 적게 관찰되었다. SP20x3군, SP20x5군은 SP50x3군, SP50x5군에 비하여 상피세포의 재생 및 점막하층의 염증반응으로부터의 회복이 미흡하였다(Fig. 4).

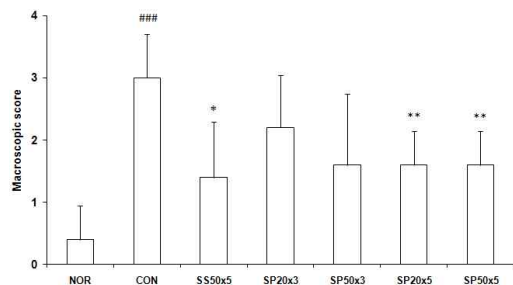


Fig. 3. Comparison on Macroscopic Scores between Each Group.

Values of macroscopic scores indicate the mean±S.D.(n=5).

Significantly different from normal group(### p<0.001).

* Significantly different from control group(* p<0.05, ** p<0.01).

NOR: Normal group without any treatment.

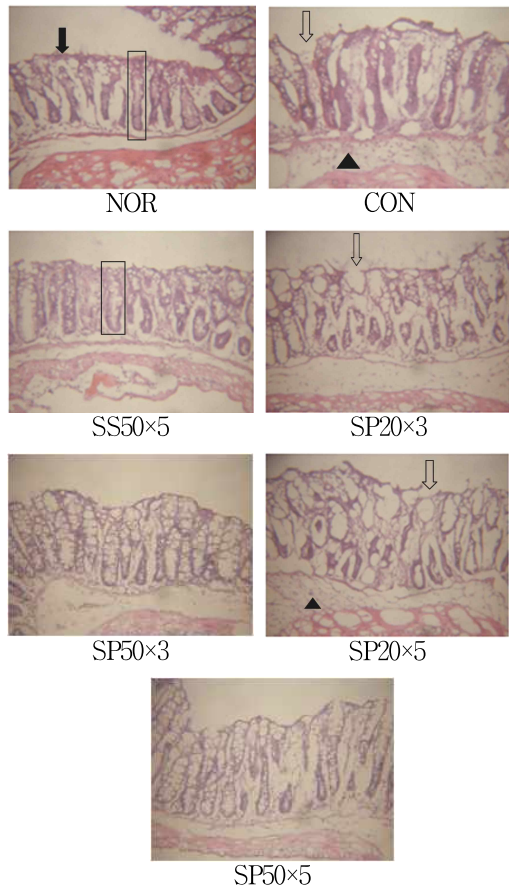


Fig. 4. Histologic findings.

↓ Black arrow indicate normal epithelial tissue. ↯ White arrow indicate epithelial tissue disruption. ▲ Black triangle indicate inflammatory cell. □ White box indicate crypt. NOR: Normal group without any treatment. CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection. SS50x5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days. SP20x3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days. SP50x3: SP 50 mg/kg oral administration for 3 days. SP20x5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days. SP50x5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days. SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG. SS: Sulfasalazine (H&E stain, ×100)

3. 장점막 효소활성에 대한 효과

1) MPO 활성의 변화

MPO 활성 측정 결과, NOR군은 5.38±1.38 μ unit/mg, CON군은 17.27±0.37 μ unit/mg, SS50x5군은 10.11±2.38 μ unit/mg, SP20x3군은 13.76±0.44 μ unit/mg, SP50x3군은 10.02±1.55 μ unit/mg, SP20x5군은 10.31±1.00 μ unit/mg, SP50x5군은 8.25±1.62 μ unit/mg으로 나왔다. CON군과 비교했을 때, MPO 활성이 SP20x3군 ($p<0.05$) 및 SP50x3군, SP20x5군, SP50x5군 ($p<0.01$)에서 유의하게 억제되었다(Fig. 5).

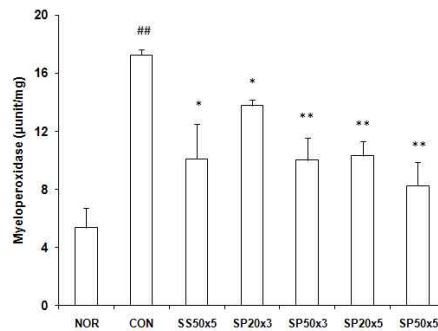


Fig. 5. Effects of SP on Colonic Myeloperoxidase Activities on TNBS-Induced Colitis.

Values of enzyme activities indicate the mean±S.D.(n=3).

Significantly different from normal group(# $p<0.01$).

* Significantly different from control group(* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

NOR: Normal group without any treatment. CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50x5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20x3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50x3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20x5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50x5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

2) MDA 활성의 변화

MDA 활성 측정 결과, NOR군은 1.0±0.8 μ mol/mg, CON군은 2.5±0.7 μ mol/mg, SS50x5군은 1.4±0.3 μ mol/mg, SP20x3군은 0.8±0.7 μ mol/mg, SP50x3군은 1.2±0.7 μ mol/mg

μmol/mg, SP20×5군은 1.2±0.4 μmol/mg, SP50×5군은 0.8±0.4 μmol/mg으로 나왔다. CON군과 비교했을 때, MDA 활성이 SP20×3군, SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군 (p<0.05)에서 유의하게 억제되었다 (Fig. 6).

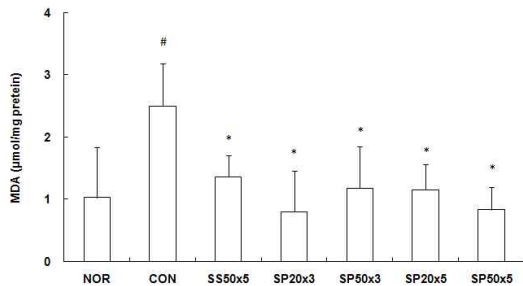


Fig. 6. Effects of SP on Colonic Malondialdehyde Activities on TNBS-Induced Colitis.

Values of enzyme activities indicate the mean±S.D.(n=4).

Significantly different from normal group(# p<0.05).

* Significantly different from control group(* p<0.05).

NOR: Normal group without any treatment.

CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

3) Reduced glutathione의 변화

Reduced glutathione을 측정된 결과, NOR군은 1.8±0.3 μg/ml, CON군은 0.6±0.1 μg/ml, SS50×5군은 1.6±0.2 μg/ml, SP20×3군은 1.3±0.3 μg/ml, SP50×3군은 1.6±0.1 μg/ml, SP20×5군은 1.3±0.1 μg/ml, SP50×5군은 1.3±0.1 μg/ml로 나왔다.

CON군과 비교했을 때, reduced glutathione 회복이 SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군 (p<0.05)에서 유의하게 증가되었다(Fig. 7).

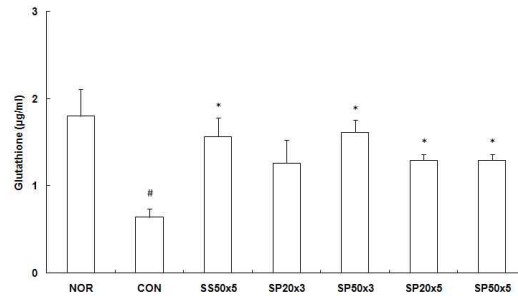


Fig. 7. Effects of SP on Colonic Glutathione Activities on TNBS-Induced Colitis.

Values of enzyme activities indicate the mean±S.D.(n=4).

Significantly different from normal group(# p<0.05).

* Significantly different from control group(* p<0.05).

NOR: Normal group without any treatment.

CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

4) 지질과산화 억제활성의 변화

대표적인 합성항산화제로 쓰이는 butylated hydroxytoluene (BHT) 30 μg/ml의 지질과산화 억제능력은 91±3.4%로 나타났다. SP의 농도에 따른 지질과산화 억제능력은, 70 μg/ml는 25±1.4%, 150 μg/ml는 29±7.9%로 나타나서, BHT 30 μg/ml와 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (p<0.05). SP 300 μg/ml의 지질과산화 억제능력은 44±3.2%로 BHT 30 μg/ml와 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 8).

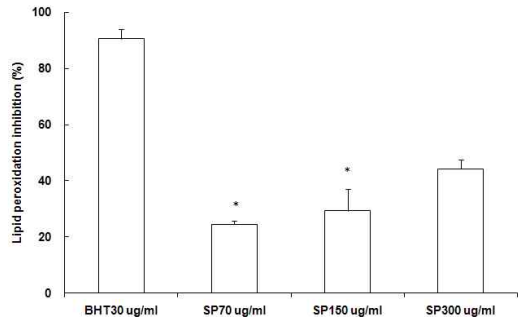


Fig. 8. The Comparison of the Lipid Peroxidation Inhibition of the SP and BHT.

Values of lipid peroxidation inhibition activities indicate the mean±S.D.(n=2).

* Significantly different from BHT(30µg/ml) group(* p<0.05).

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

BHT: Butylated hydroxytoluene

4. Immunoblot을 이용한 생화학적 지표에 대한 효과

pp65, COX-2 단백질 발현을 immunoblot으로 측정된 결과, 염증 관련 효소인 pp65, COX-2의 발현이 NOR군에 비해 CON군에서 증가되어 있고, 모든 SP 투여 실험군에서는 CON군에 비해 감소된 결과를 보였다. SP20×3군에서 pp65, COX-2 발현억제는 다른 SP 투여 실험군에 비해 미흡하였다 (Fig. 9).

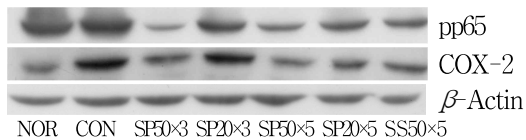


Fig. 9. Effects of SP on Protein Expression of pp65, COX-2 in TNBS-Induced Murine Colitis.

NOR: Normal group without any treatment.
 CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.
 SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.
 SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.
 SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.
 SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.
 SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.
 SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.
 SS: Sulfasalazine

5. ELISA를 이용한 생화학적 지표에 대한 효과

Proinflammatory cytokine 중 IL-1β의 발현량을 ELISA 방법으로 정량 측정된 결과, NOR군은 13.7 ±1.70 pg/ml, CON군은 129.65±6.58 pg/ml, SS50×5군은 21.25±3.18 pg/ml, SP20×3군은 79.95±4.88 pg/ml, SP50×3군은 25±4.95 pg/ml, SP20×5군은 28.3±0.99 pg/ml, SP50×5군은 28.7±5.09 pg/ml로 나왔다. CON군과 비교했을 때, IL-1β 활성이 SP20×3군 (p<0.05) 및 SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군 (p<0.01)에서 유의하게 억제되었다(Fig. 10).

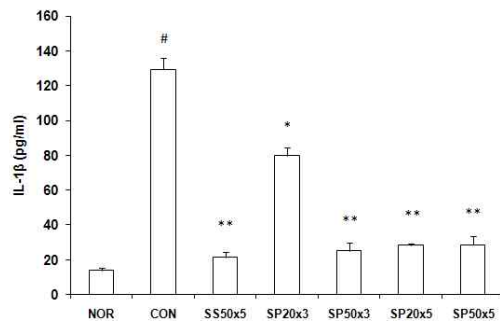


Fig. 10. Effects of SP on Protein Expression of Inflammatory Cytokines IL-1β on TNBS-Induced Colitis.

Values of cytokine production indicate the mean ±S.D.(n=2).

Significantly different from normal group(# p<0.05).

* Significantly different from control group(* p<0.05, ** p<0.01).

NOR: Normal group without any treatment.

CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

6. 분변 중 세균성 효소활성 및 hyaluronic acid 분해활성에 대한 효과

1) β-glucuronidase 활성 변화

β -glucuronidase 활성 측정 결과, NOR군은 0.074 ± 0.045, CON군은 1.723 ± 0.411, SS50×5군은 0.363 ± 0.296, SP20×3군은 0.394 ± 0.162, SP50×3군은 0.211 ± 0.146, SP20×5군은 0.377 ± 0.383, SP50×5군은 0.317 ± 0.118로 나왔다. CON군과 비교했을 때, β -glucuronidase 활성이 SP20×3군, SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군 ($p < 0.05$)에서 유의하게 억제되었다(Fig. 11).

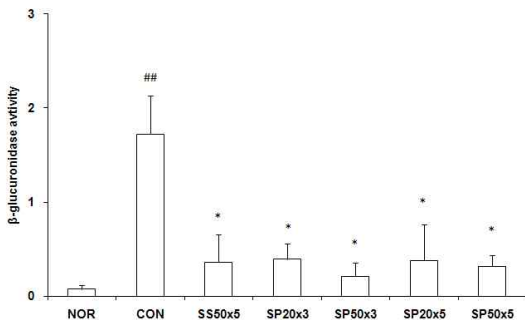


Fig. 11. Effects of SP on Fecal β -glucuronidase Activities on TNBS-Induced Colitis.

Values of enzyme activities indicate the mean ± S.D.(n=4).

Significantly different from normal group(## $p < 0.01$).

* Significantly different from control group(* $p < 0.05$)

NOR: Normal group without any treatment.
CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

2) Hyaluronic acid 분해활성 변화

Hyaluronic acid 분해활성 측정 결과, NOR군은 0.013 ± 0.009, CON군은 0.094 ± 0.009, SS50×5군은 0.055 ± 0.010, SP20×3군은 0.022 ± 0.006, SP50×3군은 0.034 ± 0.012, SP20×5군은 0.027 ± 0.010, SP50×5군은 0.025 ± 0.011로 나왔다. CON군과 비교했을 때, hyaluronic acid 분

해활성이 SP20×3군, SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군 ($p < 0.01$)에서 유의하게 억제되었다(Fig. 12).

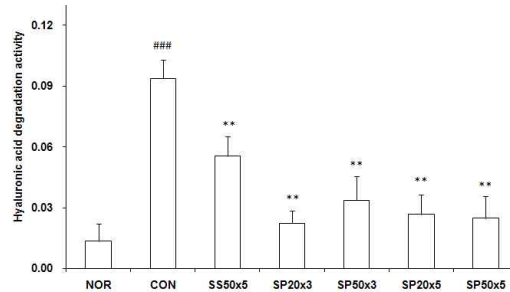


Fig. 12. Effects of SP on Fecal Hyaluronic acid Degradation Activities on TNBS-Induced Colitis.

Values of hyaluronic acid degradation activities indicate the mean ± S.D.(n=4).

Significantly different from normal group(## $p < 0.001$).

* Significantly different from control group(** $p < 0.01$).

NOR: Normal group without any treatment.
CON: Control group provided with only TNBS intrarectal injection.

SS50×5: SS 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP20×3: SP 20mg/kg oral administration for 3 days.

SP50×3: SP 50mg/kg oral administration for 3 days.

SP20×5: SP 20mg/kg oral administration for 5 days.

SP50×5: SP 50mg/kg oral administration for 5 days.

SP: *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.

SS: Sulfasalazine

IV. 고찰

서양에서 궤양성 대장염의 발병률은 인구 10만 명당 6-12명, 유병률은 인구 10만명당 70-150명으로 추산되며, 크론병의 발병률은 인구 10만명당 3-7명, 유병률은 인구 10만명당 30-100명으로 추산된다¹. 일본에서는 1991년도 궤양성 대장염의 발병률 및 유병률은 인구 10만명당 각각 1.95명 및 18.12명이며, 같은 해 크론병의 발병률 및 유병률은 인구 10만명당 각각 0.51명 및 5.85명이던 것이 1998년 통계에서는 크론병의 발병률 및 유병률이

인구 10만명당 각각 1.2명 및 13.5명으로 증가하였다¹. 한국에서는 대규모 역학조사가 시행된 바 없으나, 서울시 송파구와 강동구에서 시행된 다기관 공동연구에 따르면, 궤양성 대장염의 연간 발병률은 1986-1988년 사이에 인구 10만명당 0.20명에 불과하던 것이 1995-1997년 사이에 1.23명으로 빠르게 증가하는 추세를 보였으며, 1997년말 현재 유병률도 인구 10만명당 7.57명에 이른 것으로 보고되었다¹. 1989-1991년 사이에 크론병 환자의 비율이 궤양성 대장염에 비해 약 20%에도 미치지 못했지만, 1998-2000년 사이에는 약 50%에 가깝게 증가하였다¹.

한의학에서 염증성 장질환은 腸滯, 변혈, 복통, 적취, 휴식리, 久痢, 설사, 久瀉 등의 범주로 보고, 간신히가 위주로 습열, 혈어, 기체의 標實證을 동반한 本虛標實의 양상을 나타내는 것으로 보았다²².

병인병기는 感受濕熱, 飲食所傷, 情志不暢, 勞倦過度로 脾氣가 손상되어, 內濕이 생기고, 오래되면 熱化되어, 濕熱薰蒸, 壅滯腸間하여 傳導失調하고, 氣血相搏하여 血絡이 손상되어, 氣凝血滯되고 血敗肉腐하여 瘕양이 생기고, 오래되면 脾腎兩虛, 正虛邪實하여 치료하기 어려워진다고 보았다²³. 주요 치법은 健脾, 溫腎, 清熱, 利濕, 疏肝, 活血, 固澁, 養陰 등으로 健脾溫腎爲主로 하고, 清熱祛濕의 祛邪의 치법을 시행한다고 하였다. 임상에서는 濕熱證, 氣滯證, 脾胃虛弱證, 瘀血內結證으로 나누어 변증시치한다고 하였다²³.

본 연구는 발생률과 유병률이 증가하고 있는 염증성 장질환에 대해 부작용이 적고, 효능이 우수한 한의학적 치료제를 개발하기 위해 시행하였다. 사미연건탕의 구성 약물 중 자체 항균²⁴, 항염¹², 항산화 작용²⁵과 식이섬유에 의한 정장작용¹²을 갖는 SP와 海帶가 주요한 역할을 할 것으로 추정하여, 예비 실험을 한 결과 SP에서 더욱 뚜렷한 효과를 보여 SP의 염증성 장질환에 대한 효과를 연구하게 되었다.

실험에 사용된 본초 SP의 기원식물은 모자반과

(馬尾藻科; Sargassaceae)에 속한 다년생 갈조식물인 羊栖菜 (小葉海藻, *S. fusiforme*(HARV.) SETCH.) 및 동속 근연식물의 전초를 건조한 것이나, 海蒿子 (大葉海藻, *S. pallidum*(TURN.) C. AG.)를 기원으로 한다. 여름과 가을에 바다 속에서 채취하여 잡질을 제거하고 담수로 세정한 다음 햇볕에 말려 쓴다. 약성은 鹹, 寒하고 肝, 胃, 腎經으로 들어가 消痰軟堅하므로, 痰涎으로 인한 癰癤, 癭瘤 등을 치료하고, 경미한 利水消腫 작용이 있어 각기부종, 수종 등을 치료한다. 성분은 *S. fusiforme*는 alginic acid, manitol, 다당류, I, Ca, P, Fe, K과 단백질, 지방, 섬유질, 점액질 등으로 구성되어 있고, *S. pallidum*은 alginic acid, sargassan, I, Ca, Fe, 단백질, 지방, vitamin C 등을 함유한다. 약리작용은 갑상선에 대한 작용, 항응고 작용, 혈청 지질강화 작용, 항균 작용, creatinin 중독에 대한 작용, 항흡혈충작용 등이 있어, 갑상선종대, 경부 임파선 결핵, 유방 종결, 다발성 결절, 궤양, 만성후두염 등에 사용한다고 알려져 있다²⁶. 그러나, SP의 대장염에 대한 항염증, 항산화 작용 및 장내 세균에 대한 영향을 실험한 연구는 아직 없었다.

염증성 장질환의 발병에 기여하는 요인은 유전적 감수성, 환경적 요인, 후천적 면역, 선천적 면역, 비특이적 염증반응, 상처 치유 등 6가지로 나누어 볼 수 있다. 이들 요인 중 앞의 3가지는 질병이 발생하는 초기 단계에 관여하는 것이고, 뒤의 3가지 요인은 염증의 치유단계에 공통적으로 관여한다. 동물모델의 선택은 연구의 목적이 6개 요인 중 어떠한 것에 중점을 두고 있는지에 따라 결정하는데²⁷, 비용 및 유도의 용이성을 고려해 환경적 요인을 제외한 5개 요인을 관찰할 수 있는 실험동물모델인 TNBS 유도 생쥐 모델을 선택하였다²⁸. TNBS 유도 염증성 장질환 모델은 값싼 생쥐를 이용할 수 있고, 반복성이 있으며, 전벽성 궤양을 얻을 수 있고, 면역기전을 통한 병변이므로 만성 염증까지 유발할 수 있으며, 사람의 염증성 장질환에 근접한 특성을 갖는 장점이 있어 염증성 장질환 모델로

많이 활용되고 있어 선택하게 되었다²⁷. 생쥐 모델에서 TNBS 투여량은 다른 실험^{29,30}에서 유도율 95%를 유지하면서, 염증성 cytokine 및 장내 효소 수치의 변화가 일어나고, 대장 길이가 단축되는 것으로 알려진 2.5% TNBS 함유 50% 에탄올 용액 0.1 ml로 결정하여 병태 모델을 만들었다. 염증성 장질환 동물모델을 이용한 예비 실험에서 SP 50 mg/kg과 100 mg/kg 간의 치료 반응에 차이가 없어, 본 실험에서 SP 농도를 고농도 50 mg/kg과 저농도 20 mg/kg으로 결정하였다. SP가식이섬유가 풍부하고, 정상작용이 있는 것으로 알려져 있어¹², prebiotic 작용에 의해 염증성 장질환 예방효과가 실험적으로 확인된 올리고당³¹과 같은 예방적 효과가 있는지 알아보기 위해, 대장염 유발 전처치군 (SP20×5군, SP50×5군)과 대장염 유발 후처치군 (SP20×3군, SP50×3군)으로 나누어 설정하였다. 서양의학에서 염증성 장질환에 널리 사용되는 sulfasalazine³⁶을 양성 대조군으로 설정하였다.

본 연구에서는 염증성 장질환 실험에서 가장 기본적인 측정 요소로써, 육안적 소견인 대장 길이를 측정하였으며, 현미경으로 조직학적 변화를 관찰하여 염증성 장질환의 유도 및 치유 정도를 관찰하였다. 육안적 조직 손상 정도를 객관적으로 평가하기 위해 Hollenbach¹⁵의 기준을 적용하여 점수화하였다.

대장 길이의 변화에서 CON군에 비해 통계적 유의성을 갖는 SP 투여 실험군은 SP50×3군과 SP50×5군으로 나타났다. SP 20 mg/kg을 투여한 실험군에서는 TNBS에 의한 대장 길이 단축 억제효과가 통계적으로 유의성이 없는 것과 달리, SP 50 mg/kg을 투여한 실험군에서는 대장 길이 단축 억제효과가 통계적으로 유의하게 나타났다. 이로써 SP 투여가 대장염에 의한 대장 길이 단축을 농도의존적으로 억제하는 효과가 있을 것으로 추정되었다. 이는 四味軟堅湯을 이용한 선행 실험에서와 유사한 결과였다⁸.

육안 형태 손상 점수에서 CON군에 비해 통계

적으로 유의하게 낮은 수치를 나타낸 SP 투여군은 SP20×5군, SP50×5군이였다. SP20×5군은 대장염 유발에 의한 길이 단축을 억제하는 능력이 가장 낮고, 통계적 의미도 없는 것으로 나왔으나, 육안 형태 손상 점수는 통계적 유의성을 갖는 것으로 나와 상반된 결과를 나타냈다. 이는 TNBS 생쥐 모델을 만들 때, 효과적인 용량이 치사량에 가까우므로, Hollenbach의 기준¹⁵에서 3, 4에 해당하는 병변을 유발할 경우, 동물모델의 생존율이 떨어져 실험을 유지할 수 없어서, 적절한 용량^{29,30}으로 조절한 결과, CON군의 평균 육안 형태 손상 점수가 3±0.7을 유지할 정도로 병변이 경미하다는 것과 Hollenbach의 기준이 Vilaceca의 기준³ 등 타기준에 비해 편차가 적어 변별력이 떨어진다는 점이 작용한 것으로 판단되었다. 육안 형태 손상 점수만을 볼 때, 대장염 유발 전처치군이 대장염 유발 후처치군에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 것을 알 수 있었다.

조직학적 소견을 보면, SP50×3군, SP50×5군에서 염증반응이 뚜렷하게 억제된 것으로 나타나, 염증에 의한 대장 길이 단축 억제효과가 고용량 처치군에서 뚜렷했던 것과 상관성이 있게 나타났다.

염증성 장질환에서는 MPO를 포함한 탐식세포가 만성적으로 활성화되고 증가되어 있다. 탐식세포 증가로 활성산소류도 과생산되는데, 이를 제거하여 조직세포를 보호하는 항산화효소의 능력을 초과하면, 대장 점막 조직은 산화적 손상을 입는다. 염증성 장질환 환자의 장조직에서는 MPO를 포함한 중성구로부터 유리된 활성산소류의 과생성이 관찰된다. MPO의 활성 측정은 중성구의 침착 정도를 파악할 수 있어, 장의 염증 정도를 평가하는 수단으로 사용되어 왔다³³. MPO의 활성을 감소시키는 물질은 항염증효과를 나타내는 것으로 볼 수 있어³⁴, 다양한 염증성 장질환 연구^{3,4,7-9}에서 활용되고 있다.

MPO 활성수치는 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 억제된 결과

를 나타내었다. SP 투약 기간이 동일한 군들간의 비교인, SP20×3군과 SP50×3군의 비교, SP20×5군과 SP50×5군의 비교에서는, 농도가 높은 군에서 MPO 활성수치 억제에 좀더 개선된 결과를 나타내었다. 이는 四味軟堅湯을 이용한 선행 연구에서 25 mg/kg을 투여한 군에 비해 100 mg/kg을 투여한 군에서 효소활성 억제에 좀더 개선된 것으로 나타난 것보다 유사한 결과였다⁸. SP 투약 용량이 동일하고 투약 시기가 다른 군들간의 비교인, SP20×3군과 SP20×5군의 비교, SP50×3군과 SP50×5군의 비교에서, 대장염 유발 전부터 투약한 군에서 MPO 활성수치 억제에 좀더 개선된 것으로 나타났으나, 통계적 유의성은 없었다.

세포는 산패되기 쉬운 불포화 지방산을 필수 성분으로 함유하는 막조직으로 구성되어 있어, 지질과산화이 일어나면 세포의 막조직이 손상된다. 지질과산화의 평가는 expired pentane, MDA, lipid hydroperoxides, isoprostanes, conjugated dienes 등을 측정하는데³⁵, MDA는 지질과산화의 마지막 분해산물로, free radical이 증가하면 MDA가 과량생산된다³⁵. MDA는 일반적으로 산화적 스트레스의 표지자로 알려져 있으며, 염증성 장질환에서도 이용되고 있다³⁶. 본 실험에서는 장점막세포 손상의 한 요인으로 작용하는 지질과산화를 평가하기 위해 MDA를 측정하였다.

흰쥐 대장 점막에 TNBS를 넣었을 때 superoxide와 O₂ 생성이 의미있게 증가하는데, 생체내의 ascorbate와 환원된 glutathione 등의 물질과 TNBS가 작용하는 중에 생성되는 reactive oxygen metabolite가 TNBS의 병변 유발기전의 하나로 작용하리라 추측되고 있다⁴. 본 실험에서는 superoxide radical을 측정하지 않고, 대신 oxygen radical을 제거시켜 생물체를 보호하는 효소인 glutathione을 측정하였다. Glutathione은 산화적 스트레스와 염증반응시 세포내의 함량이 낮아져, 세포손상과 독성에 대한 민감도가 높아진다³⁷. 그러므로, 세포내에 glutathione의 수치가 회복되는 것은 세포의 항산화능력이 회복

되는 것을 의미하며, 산화적 손상으로부터의 회복 정도를 알 수 있어 본 실험에서 측정하게 되었다. SP 자체가 항산화작용을 갖고 산화적 손상을 억제하는 능력이 있는지, 세포의 항산화능력을 촉진시키는 능력만 있는지를 평가하기 위해, 대표적인 합성항산화제인 BHT의 항산화능력과 비교 실험을 하였다.

MDA 활성수치는 CON군에 비해 모든 SP 투여 실험군에서 통계적으로 유의하게 억제되어 지질산화가 억제되었음을 알 수 있었다. 대표적인 항산화 효소인 glutathione의 회복을 보면, CON군과 비교해 통계적으로 유의한 회복을 보인 군은 SP50×3군, SP20×5군, SP50×5군이다. 지질산화가 가장 많이 억제된 SP20×3군과 SP50×5군에서 항산화효소인 glutathione의 회복이 가장 높아야 되지만, 지질과산화가 가장 적게 억제된 SP50×3군의 glutathione 회복이 더 높게 나왔다. 이러한 결과가 나온 이유로, 항산화효소는 glutathione 이외에도 superoxide dismutase, catalase 등도 작용하므로³⁷, 지질과산화의 최종 산물인 MDA 수치와 항산화효소인 glutathione 회복 수치간의 차이가 생기는 것으로 추측되었다.

SP 자체의 항산화능력은 실험 결과, 대표적인 인공항산화제인 BHT의 10배 농도인 경우, 통계적으로 유의하게 BHT의 50%에 해당하는 항산화능력을 발휘하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, SP는 세포에서 항산화효소의 생산을 촉진시키고, 직접 free radical이나 활성산소를 제거하는 작용을 통해 지질과산화를 억제하여 염증성 장질환을 억제하는 것으로 추측되었다.

염증성 장질환 환자의腸조직 및 만성 대장염 동물모델의腸조직에서 NF-κB (p65)의 활성이 크게 증가되어 있고³⁸, 염증성 장질환에서 전사조절인자인 p65가 활성화되면 세포핵 내로 이동해 전염증 cytokine인 tumor necrosis factor-α, IL-1β를 발현시켜 대장염을 지속시킨다³². Sulfasalazine, mesalazine, corticosteroids 등의 약들이 이러한 경

로를 억제해 염증성 장질환을 억제한다³². SP의 염증성 장질환에 대한 항염증작용 경로의 하나로 이러한 경로가 작용하는지를 평가하기 위해, p65의 활성화 형태인 pp65를 immunoblot으로 측정하였고, pp65에 의해 활성화되는 전염증 cytokine 중의 하나인 IL-1 β 를 정량 측정하였다.

염증, 통증 전달, 체온 조절 등의 세포기능조절 인자로 작용하는 prostaglandin은 세포막의 아라키돈산으로부터 cyclooxygenase(COX)에 의해 생산된다. COX는 2가지 형태로 존재하는데, COX-1은 정상 세포의 생리기능을 유지하는 중요한 housekeeping 효소임에 반해, COX-2는 염증을 유발할 수 있는 외부 자극에 의해 일시적으로 발현되는 유도성 효소이다³⁹. 염증성 장질환 환자의 대장 상피세포에서 COX-2가 과발현되고, prostaglandin도 과량생산되는 것이 관찰된다⁴⁰. COX-2는 염증성 장질환의 화학적 매개자로 알려져 있어⁴, 염증성 장질환의 실험에서 측정되는 주요 효소로 본 실험에서도 immunoblot을 통해 측정하였다.

pp65와 COX-2의 단백질 발현을 측정한 결과, CON군에 비해 SP50 \times 3군과 SP50 \times 5군은 단백질 발현이 뚜렷하게 감소하였다. SP20 \times 3군과 SP20 \times 5군은 SP50 \times 3군과 SP50 \times 5군에 비해서 약하지만, CON군에 비해 pp65, COX-2 단백질 발현이 억제되었다. pp65에 의해 활성화되는 전염증 cytokine인 IL-1 β 의 정량 측정치를 보면, SP20 \times 3군에서 cytokine 발현억제가 약하게 나오는데, immunoblot에서 pp65 발현억제가 약하게 나온 것과는 일치하는 결과였다.

이상의 결과를 통해, SP는 *Lactobacillus suntoryeus*가 실험적 염증성 장질환에서 p65경로를 억제해서 효과를 나타내는 것과 유사한 경로²⁹를 통해 효과를 나타내는 것으로 추정되었다.

염증성 장질환의 한 요인으로 유전적으로 발병하기 쉬운 개체에서 환경적 요인에 의해 장내 정상 세균총을 변화시켜, 장점막 면역계의 장내 유해미생물에 대한 내성을 상실하게 해서, 장점막 면역계가 비정상적으로 활성화되어 장점막 조직에 염증반응을

발생시키는 것으로도 본다⁷. 본 실험에서는 장내 세균총의 변화를 알아보기 위해 β -glucuronidase 활성과 hyaluronic acid 분해활성을 측정하였다. β -glucuronidase는 간에 의해 무독화된 glucuronide 포함체를 再毒化시키는 효소로 장내 세균총에서 생산되며, 발암 촉진인자로 알려져 있다⁴¹. 다른 실험^{7,8}에서 대장염이 유발되었을 때 β -glucuronidase가 증가한 것을 보면, 이를 생산하는 세균이 늘어나, 장내 정상 세균총에 변화를 일으켜, 염증을 지속시키는 것으로 추정되었다. Hyaluronic acid는 장점막 세포외간질의 대표적 glucoseaminoglycan (GAG)으로 장점막의 세포벽을 보호하는 역할을 하는데, 염증이 생기면 hyaluronic acid의 분비가 증가되고, 이를 분해하는 세균도 증가하게 된다^{30,41}. Chondroitin sulfates와 hyaluronic acid는 대장에서 발견되는 가장 흔한 형식의 GAG로 장내 세균총의 chondroitinase나 hyaluronidase라는 분해효소에 의해 단량체로 분해된다. 이러한 이당류는 β -glucuronidase와 acetylase에 의해 iuronic acid, D-uronic acid나 D-glucuronic acid나 D-galactosamine 또는 D-glucosamine으로 분해되는데, D-galactosamine, D-glucosamine은 in vitro 실험에서 장세포에 대한 세포독성과, TNBS에 의한 세포독성을 증가시키는 것으로 알려져 있다^{30,41}. 이러한 hyaluronic acid의 분해활성을 측정함으로써, 이를 분해하는 세균의 증감을 추정할 수 있고, 염증성 장질환을 악화시키는 대사물질의 증감을 평가할 수 있어, 세균총의 변화에 따른 염증성 장질환의 악화와 호전을 평가하는 수단으로 쓸 수 있어 본 실험에서 측정하였다.

β -glucuronidase의 활성은 CON군에 비해 모든 SP 투여 실험군에서 통계적으로 유의하게 낮게 나왔다. 四味軟堅湯을 이용한 선행 실험에서는 β -glucuronidase의 억제효과가 통계적 의미를 갖지 못하였고⁸, 消炎整腸湯을 이용한 염증성 장질환 실험에서도 β -glucuronidase의 억제효과가 통계적인 의미를 갖지 못하였으나⁷, 본 실험에서는 모든 SP 투여 실험군에서 통계적으로 유의하게 억제효

과가 나타났고, 특히 SP50×3군은 β-glucuronidase의 수치를 CON군의 1/8, SS50×5군의 3/5으로 억제하였다. 이는 앞서 언급한 SP의 풍부한 식이섬유가 장내 세균총의 먹이가 되어 우리 몸에 유익한 장내 세균총의 증식을 도와 장내 환경을 개선시키는 prebiotic 작용과 연관된 것으로 추정되었다¹².

Hyaluronic acid 분해활성은 CON군에 비해 모든 SP 투여 실험군에서 통계적으로 유의하게 낮게 나왔으며, 양성 대조군보다도 낮게 나왔다.

이상과 같은 결과는 *Lactobacillus suntoryeus*²⁹, Lactic acid bacteria⁴¹를 이용한 염증성 장질환에 대한 실험연구를 통해 알려진 것과 같이, SP도 장내 세균총을 정상화시켜 장내 세균의 독성 효소 및 독성 대사물질의 생성을 억제하여 염증성 장질환의 진행을 억제시키는 것으로 판단되었다.

본 연구결과로 볼 때, SP는 임상에서 염증성 장질환의 치료에 활용할 수 있을 것으로 보이며, 타 연구에서 해조류의 항균력이 물 추출물보다는 에탄올 추출물에서 뛰어났다는 보고⁴², 가열 시간에 따른 식이섬유의 구성당류의 저분자화가 이루어진다는 보고¹²를 바탕으로 차후에는 용매, 가열용출 시간에 따른 심도있는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 결론

본 실험은 해조 (*Sargassum*, *Sargassum pallidum* (TURN.) C. AG.; SP)의 염증, 조직 산화, 장내 세균에 미치는 영향을 평가해 염증성 장질환에 대한 치료효과가 있는지 연구하기 위해, 생쥐에 2.5% TNBS 함유 50% 에탄올 용액 0.1 ml를 관장하여 대장염을 유발한 대조군 (CON)과 대장염 예방효과를 보기 위해 대장염 유발 2일전부터 SP 20 mg/kg (SP20×5), 50 mg/kg (SP50×5) 용량으로 투여를 시작해 대장염 유발 3일 후까지 투여한 실험군과 대장염 유발 후의 치료효과를 보기 위해 대장염 유발 후 3일간 SP 20 mg/kg (SP20×3), 50

mg/kg (SP50×3) 용량으로 투여한 실험군, 양성 대조군으로 대장염 유발 2일 전부터 sulfasalazine 50 mg/kg을 투여한 실험군 (SS50×5), 대장염을 유도하지 않은 정상군 (NOR)으로 나누어 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대장염 유발에 의한 대장 길이의 단축은 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 단축이 억제되었으나, 통계적 유의성을 갖는 것은 SP50×3군과 SP50×5군이였다. 육안 형태 손상 점수는 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 감소하였으나, SP20×5군과 SP50×5군만이 통계적으로 유의하게 감소하였다.
2. 조직학적 관찰 결과, SP50×3군과 SP50×5군은 CON군에 비해 명확하게 상피세포와 선와 (crypt)의 재생이 관찰되었고, 염증세포의 침착 및 부종이 억제된 것을 알 수 있었다. SP20×3군과 SP20×5군은 CON군에 비해 염증세포의 침착만 감소된 것이 관찰되었다.
3. 대장 점막에서 MPO 활성을 측정된 결과, 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다.
4. 대장 점막에서 MDA, glutathione 수치를 측정된 결과, 지질대사산물인 MDA는 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었다. 항산화물질인 glutathione 수치는 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 회복되어 있었으나, SP20×3군은 통계적 유의성이 없었다.
5. Immunoblot으로 pp65, COX-2의 단백질 발현을 비교한 결과, CON군에서는 증가되었으나, 모든 SP 투여 실험군에서는 감소되었으며, 특히 SP50×3군과 SP50×5군에서 단백질 발현 감소가 더욱 뚜렷하였다.
6. ELISA로 IL-1β의 발현량을 정량 측정된 결과, 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다.
7. 분변 중 장내 세균 유해효소인 β-glucuronidase

는 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 활성이 억제되었다. Hyaluronic acid 분해활성도 모든 SP 투여 실험군에서 CON군에 비해 통계적으로 유의하게 낮게 나왔다.

상기 결과로 볼 때, SP는 pp65 관련 염증반응 경로의 억제와 항산화 작용 및 장내 환경 개선을 통하여 염증성 장질환의 증상을 개선시킬 수 있는 한방 치료제로 개발 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 양석균. 한국인의 염증성 장질환의 현황과 임상적 특징. 대한소화기학회지. 2002;40(1):1-14.
2. 홍은경. 염증성 장질환의 원인과 발생기전. 녹십자의보. 1997;25(1):14-24.
3. 김영태, 안성훈, 김재효, 손일철. 천추상응부위에 구진약침 자극이 TNBS로 유도된 크론병에 미치는 영향. 경락경혈학회지. 2008;25(2):159-77.
4. 김나영, 김재준, 송인성, 김정룡, 김우호. 흰쥐에서 TNBS로 유발된 염증성 대장염의 병태생리에 관한 연구. 대한내과학회지. 1994;47(1):20-35.
5. 김정룡편저. 소화기계 질환. 제2판. 서울: 일조각; 2008, p. 277-8.
6. 전정열, 이철호, 이광열, 유정준, 박세영, 임석원 등. 염증성 장질환에서 cyclosporine의 치료효과. 대한외과학회지. 1997;53(1):62-78.
7. 송영근, 류봉하, 윤성우. 소염정장탕이 DSS로 유발된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(2):385-400.
8. 김소연, 류봉하, 박재우. 궤양성 대장염 동물모델에서 사미연건탕의 항염증 및 장내세균 효소활성 억제효과. 대한한의학회지. 2008;29(3):50-62.
9. 劉慧榮, 馬曉梵, 趙天平, 吳煥淦. 鍼灸對克羅恩病大鼠結腸膠原合成及 TGFβ mRNA表達的調節. 安徽中醫學院學報. 2005;24(4):25-9.
10. 손덕칭, 장혜진, 선종기. 청심연자탕으로 치료하여 호전된 강직성척추염을 동반한 중증 궤양성대장염 1례. 대한한방내과학회지. 2005;26(3):685-91.
11. 서수현, 정재욱, 이은형, 최인선, 박상은, 김원일 등. 보장건비탕으로 증상 호전 보인 크론병의 증 1례. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):648-54.
12. 이종수. 해조의 화학과 이용. 초판. 서울: 도서출판 효일; 2008, p. 18, 98-9, 112, 229-36, 282-7, 291-301, 321.
13. Hong Ye, Keqi Wang, Chunhong Zhou, Jun Liu, Xiaoxiong Zeng. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem*. 2008;111(2):428-32.
14. 배송자. 모자반 분획물의 in vitro에서의 항발암 효과. 한국식품영양과학회지. 2004;33(3):480-6.
15. Hollenbach E, Vieth M, Rosessner A, Neumann M, Malferttheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/Nuclear factor-kB and p38 signalling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn Disease. *J Biol chem*. 2005;280:14981-8.
16. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods*. 1985;14(3):157-67.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1978;95(2):351-8.
19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidases. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-69.
20. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada

- H. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overload mice. *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4456-60.
21. Kruis W. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20(suppl.4):75-8.
 22. 전국한 의과대학 비계내과학교실. 비계내과학. 첫 재판. 서울: 군자출판사; 2008, p. 366-75.
 23. 呂永慧. 炎症性腸病의中醫治療. 實用醫學雜誌. 2003;19(5):457-9.
 24. 김수현, 임상빈, 고영환, 오창경, 오명철, 박제석. 추출 용매에 따른 톱 추출물의 수율 및 항균성 검정. 한국수산학회지. 1994;27(5):462-8.
 25. 한국과학재단. 해조류로부터 수용성 항산화제의 효과적인 추출. 대전: 한국과학재단; 1995, p. 13-29.
 26. 김호철. 한약약리학. 1판. 서울: 집문당; 2008, p. 360-1.
 27. 정현채. 염증성 장질환의 실험 동물모델. 대한소화기학회지. 2001;37:69-75.
 28. 유효민, 김원호. 염증성 장질환의 실험동물모델. 녹십자의보. 1999;27(3):131-40.
 29. Lee JH, Lee BM, Lee HS, Bae EA, Lee HY, Ahn YT et al. *Lactobacillus suntoryeus* inhibits proinflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF- κ B activation in experimental colitis. *Int J colorectal Dis.* 2009;24:231-7.
 30. Lee HS, Han SY, Ryu KY, Kim DH. The degradation of glycosaminoglycans by intestinal microflora deteriorates colitis in mice. *Inflammation.* 2009;32(1):27-36.
 31. Daddaoua A, Martinez-Plata E, Lopez-Posadas R, Vieites JM, Gonzalez M, Requena P et al. Active hexose correlated compound acts as a prebiotic and is antiinflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr.* 2007;137(5):1222-8.
 32. Kim SJ, Choi DH, Chung YT. Gliotoxin protects against TNBS-induced colitis via down-regulation of NF- κ B activation. *Kor J Anat.* 2004;37(3):309-15.
 33. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984;87(6):1344-50.
 34. Cestari SH, Bastos JK, Di Stasi LC. Intestinal anti-inflammatory activity of baccharis dracunculifolia in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009 Jul 10. [Epub ahead of print]
 35. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 2003 ;189:41-54.
 36. Daniel K, Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2002;347(6):417-29.
 37. Jackson MJ. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc Nutr Soc.* 1999;58(3):673-6.
 38. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1066-71.
 39. 서영준. 선택적 COX-2 저해약물의 화학 암 예방 효과 및 작용기전 연구. 과천: 보건복지부; 2003, p. 1.
 40. 박영숙. 염증성장질환에서 COX-2 억제제의 역할; 이로운가? 해로운가? 대한소화기학회지. 2007 ;50:350-5.
 41. Lee HS, Han SY, Bae EA, Huh CS, Ahn YT, Lee JH et al. Lactic acid bacteria inhibit proinflammatory cytokine expression and bacterial glycosaminoglycan degradation activity in dextran sulfate sodium-induced colitic mice. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(4):574-80.

42. 이소영, 송유진, 김진희, 김아람, 김꽃봉우리, 박선미 등. 수산이용가공분야: 구두발표; 식품 부패 미생물에 대한 해조류 추출물의 항균활성.

2006년 수산관련학회 공동학술대회 발표 요지집. 2006:2006:93-4.