

黃連解毒湯이 Dextran Sulfate Sodium 유도 마우스 대장염에 미치는 영향

임대환¹, 윤지연³, 장선일², 윤용갑^{3,4}

¹감초한의원, ²전주대학교 대체의학대학, ³원광대학교 한의과대학 방제학교실, ⁴한국전통의학연구소

ABSTRACT

Effect of *Hwangyeonhaedok-tang* on Experimental Mouse Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium

Dae-Hwan Lim¹, Ji-Yeon Yun³, Seon-Il Jang², Young-Gab Yun^{3,4}

¹Gam-Cho Oriental Medicine

²School of Alternative Medicine & Health Science, College of Alternative Medicine, Jeon-Ju University

³Dept. of Oriental Medical Prescription, Won-Kwang University

⁴Research Center of Traditional Korean Medicine

Objectives : *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) has been traditionally used for various clinical symptoms associated with gastrointestinal disorder, cardiovascular diseases, and inflammation in the Oriental medicine. However, little is known for antioxidant and anti-inflammatory effects of HHDT on dextran-sulfate sodium(DSS)-induced colitis in mice.

Methods : In this study, we investigated an antioxidant and anti-inflammatory effects of HHDT on DSS-induced colitis in mice. An experimental colitis was induced by daily treatment

-
- 교신저자 : 윤용갑
 - 전북 익산시 신용동 344-2번지 원광대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 063-850-6834 E-mail : yunyg@wku.ac.kr
 - 접수 : 2011/ 11/ 07 수정 : 2011/ 11/ 18 채택 : 2011/ 12/ 02

with 5% DSS. HHDT was orally administrated the various concentrations(25-100 mg/kg, body weight/day) for 7 days with one time per day.

Results : HHDT reduced significantly clinical sign of DSS-induced colitis, including body weight loss, shorten colon length, disease activity index(DAI), and histological colon injury. HHDT also inhibited significantly serum NO and prostaglandine E₂(PGE₂) productions in DSS-induced colitis mice. Futhermore, HDDT increased significantly an superoxide anion(SOD), catalase, and glutathione peroxidase(GPx) activity of the colon tissue in DSS-induced colitis mice.

Conclusions : These results suggest that HHDT 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 : *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT), Dextran-sulfate sodium(DSS) disease activity index (DAI), Anti-inflammation, Antioxidant

1. 緒 論

黃連解毒湯은 黃芩(*Scutellariae Radix*), 黃連(*Rhizoma Coptidis*), 黃柏(*Cortex Phellodendri*), 梔子(*Fructus Gardeniae*)로 구성된 처방으로 淸熱瀉火 解毒의 基本方으로 一切實熱 火毒之症, 大熱煩燥, 口燥咽乾, 錯語不眠, 或熱病吐血, 衄血, 或熱甚發斑, 身熱下痢, 濕熱黃疸, 外科膿瘍疔毒, 小便黃赤, 因飲酒復劇, 舌紅苔黃, 脈數有力한 症狀 等の 치료에 널리 사용되어왔다¹⁻³⁾.

『東醫寶鑑』에는 黃連解毒湯을 主藥으로 사용한 경우로는 加味金花丸, 加味四物湯, 當歸羌活湯, 赴宴散, 速效散, 柴胡連翹湯, 退黃散, 解毒四物湯, 解毒湯, 黃連解毒湯 등 11개 연계방이 있고 보조약으로 사용한 경우로는 祛風至寶丹, 三黃石膏湯, 三黃敗毒散, 龍虎湯, 淸熱解毒湯, 淸腸湯, 通明利氣湯 등 7 가지 처방이 있다. 이와 같이 黃連解毒湯의 18개 연계방은 傷寒病, 火熱病, 皮膚外科疾患, 眼

耳卑咽喉科疾患, 中風, 出血病, 黃疸, 瘧疾, 頭痛, 臟毒症에 활용하고 있음을 알 수 있다⁵⁻⁶⁾.

黃連解毒湯 및 구성약물은 抗菌, 消炎, 鎮痛, 解熱, 鎮靜, 止血, 抗潰瘍, 止瀉作用과 광범위한 spectra 작용과 항바이러스 작용이 있어 인플루엔자, 뇌염, 패혈증, 뇌막염 등의 急性 感染症과 피부의 화농증, 급성출혈증, 급성위장염, 細菌性下痢 等に 사용되어 왔다⁸⁾. 현대생물의학적인 측면에서 黃連解毒湯에 대한 연구는 혈압 및 신장기능에 미치는 영향, 항균활성작용, 항 알러지 효과, 항염증효과 등이 보고되었다⁹⁻¹²⁾.

궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)은 유전성 염증 질환으로, 염증작용이 심화되면서 결장 내층이 파괴되어 설사와 출혈이 동반되고, 더불어 병원성 세균뿐만 아니라 대장균과 같은 장내세균도 침입되어 면역체계를 자극함으로써 대장 전체로 확산될 수 있다¹³⁻⁹⁾. UC은 직장출혈, 설사, 복통, 체중감소 및 발열과 같은 임상적 특징을 나타내는

데, 이것이 결장에 만성적이고 특발성 적인 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)이다¹⁷⁾. UC의 조직학적 소견은 결장 간질(colonic interstitium)에 호중구(neutrophils), 단핵구(monocytes)와 림프구(lymphocytes) 등 백혈구가 유입되어 염증을 야기하는 것으로 알려져 있으며^{15,16)}, 이러한 염증 반응은 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^{15,16)}. 스테로이드(glucocorticoid)와 salicylazosulfapyridine이 UC 치료에 사용되어 왔지만, 심각한 부작용이 임상적 문제점으로 남아있다. 그러므로 한국 및 중국을 비롯한 동양권에서 전통적으로 사용되는 항염증 및 항산화 소재를 활용하여 UC를 치료할 수 있다면, 새로운 소재의 발굴을 촉진하기 때문에 그 관심이 증가되고 있다¹⁶⁾.

따라서 본 연구는 黃連解毒湯이 臟毒症을 치료한다고 하는 韓醫學的 측면과 광범위한 spectra작용 소염, 해열, 항균 항바이러스 작용이 있는 약리학적 측면에 착안하여 黃連解毒湯 자체의 항산화 효과를 검증한 후 dextran sulfate sodium(DSS) 유도 마우스 대장염에서 黃連解毒湯이 항산화 및 항염증 효과를 입증하는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1) 試 藥

DSS(mol wt, 36,000-50,000)은 MP biomedical 사(LLC, France)로부터 구입했다. Prostaglandin(PG) E₂ 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 시약은 Sigma-Aldrich Chemical사(Louis, MO, USA)로부터 구입했다.

2) 黃連解毒湯의 構成 및 抽出物 製造

黃芩(Scutellariae Radix), 黃連(Rhizoma Coptidis), 黃柏(Cortex Phellodendri), 梔子(Fructus Gardeniae)로 구성된 黃連解毒湯의 약제는 경동시장(서울, 대한민국)으로부터 구입하였고, 약제는 원광대학교 한의과대학 방제학교실에서 형태학적으로 동정하였고, 표본(2010-HHDT)는 원광대학교 한의과대학 방제학교실에 보관 중에 있다. 藥物의 제조는 잘 건조된 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子를 각각 100 g씩 정량하여 총 400 g을 한약추출기(대용약탕기, SK-1600)에 주입하였고, 4,000 mL증류수를 첨가하여 100°C에서 2시간 30분 동안 煎湯하였다. 이와 같이 추출한 藥物을 -70°C에서 동결 건조하여 38.5g 얻어 실험에 사용 하였다.

3) 實驗動物

8 주령의 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 원광대학교 동물윤리위원회의 규정에 따라 수행하였다.

2. 方 法

1) DSS 유도 대장염 모델과 추출물의 투여

급성 대장염의 유도는 무균 정제수에 DSS를 5%되게 적정하여 7일간 투여했다¹⁹⁾. 대조군은 모든 실험 기간 동안 정제수와 식염수를 투여했다. 양성 대조군은 5% DSS를 자연스럽게 공급하였고, 5% DSS와 黃連解毒湯(HHDT)은 마우스 체중 kg 당 25-100 mg를 각각 경구투여 하였다. 투여할

때 약물의 양은 마리 당 200 μ l를 하루에 1회씩 7일간 존데(feeding needle, Sonde)를 이용하였다. 실험기간 중 마지막으로 DSS 용액과 약물이 투여된 마우스는 24시간 후에 희생시켰다.

2) DSS 유도 대장염 질병활성지수 평가

DSS을 투여하면서 질병의 진행 상태는 질병활성지수(disease activity index, DAI)로 평가했으며 범위는 0-10으로 구분하였다^{20,21)}. 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.

3) 혈청의 분리

실험이 종료된 마우스는 에테르로 마취하여 복강을 절개하고 간 문맥(hepatic portal vein)에서 약 600 μ l을 채혈하여 4°C에서 12시간 방치한 후 3,000 rpm으로 원심하여 상층액의 혈청을 얻어 NO와 PGE₂ 측정에 사용하였다.

4) NO와 PGE₂

혈청 내 염증 매개체인 NO와 PGE₂ 함량을 측정하기 위해서 NO는 Biovision사가 제공하는 assay kit와 측정 방법에 따라 수행하였다. PGE₂는 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.

5) 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, 카

메라(Canon, Japan)로 촬영하여 측정하였다. 적출된 결장의 일정 부위를 선정하고 약 30 mm을 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.

6) 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 제공하는 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.

7) 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 μ m로 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.

8) 통계처리

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

III. 實驗結果

1. 체중과 결장의 길이에 대한 黃連解毒湯의 효과

黃連解毒湯 투여가 DSS 유도 마우스 대장염에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 농도를 각각 25-100 mg/kg의 농도로 DSS와 동시에 7일간 투여하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 DSS만 투여하였을 때 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군에 비해서 3일째부터 체중이 현저히 감소되었다. 그러나 黃連解毒湯이 투여된 실험군에서는 DSS 단독 투여군에 비해서 약물의 농도에 의존적으로 체중의 감소가 억제되었다. 25 mg/kg 투여군은 5일까지 계속적으로 체중이 감소되었으나, 6일째부터 DSS 단독 투여군에 비해 체중의 감소가 억제되었다($p<0.05$). 50 mg/kg 투여군은 4일째부터 체중 감소가 억제되기 시작하여($p<0.05$) 6일부터는 현저히 체중의 감소가 억제되는 효과가 있었다($p<0.01$). 또한 100 mg/kg 투여군은 4일째까지 체중이 약간 감소하였으나, 정상군과 유사하였고, 실험종료시까지 체중이 DSS 단독 투여군에 비해서 현저히 감소되는 효과가 있었다($p<0.01$).

한편 DSS 유도 마우스 대장염의 체중 감소에

대한 黃連解毒湯의 투여효과를 검증하기 위해서 결장의 길이를 측정하고 조직의 형태학적인 관찰을 통하여 질병활성지수(disease activity index, DAI)를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2A와 같이 결장의 길이는 정상군에 비해서 DSS 단독 투여군의 결장의 길이는 현저히 줄어들었다. 그러나 DSS 단독 투여군의 결장 길이에 비해서 黃連解毒湯의 투여 농도에 의존적으로 증가되었다. 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군은 DSS 단독투여군에 비해서 유의하게 증가되었다($p<0.05$, $p<0.01$). 또한 DAI의 경우도 Fig. 2B와 같이 결장 길이의 변화와 유사한 결과 얻었다. DSS 단독 투여군의 경우 설사, 출혈, 혈흔분뇨 등 심각하고 전형적인 대장염 질환 증세를 보인 반면, 黃連解毒湯 투여군은 농도에 의존적으로 DSS 단독 투여군에 비해 개선되는 효과를 보였으며, 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군은 DSS 단독 투여군에 비해서 유의하게 증가되었다($p<0.05$, $p<0.01$).

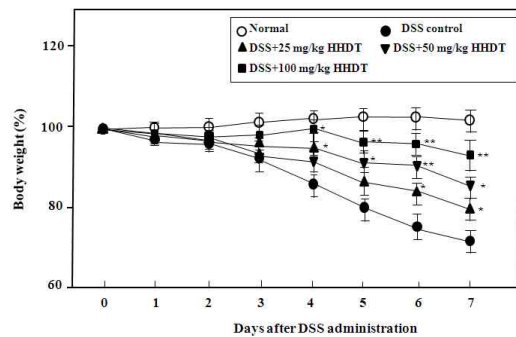


Fig. 1. Effects of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) on body weight in DSS-induced colitis mice.

Mice were given 5% DSS for 7 days. HHDT was administrated orally at various doses(25, 50 and 100 mg/kg) for 7 days. Body weight was measured daily. Values are shown as mean±SE of 5 mice. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ on day 7 indicate significant differences with HHDT untreated control group(DSS alone).

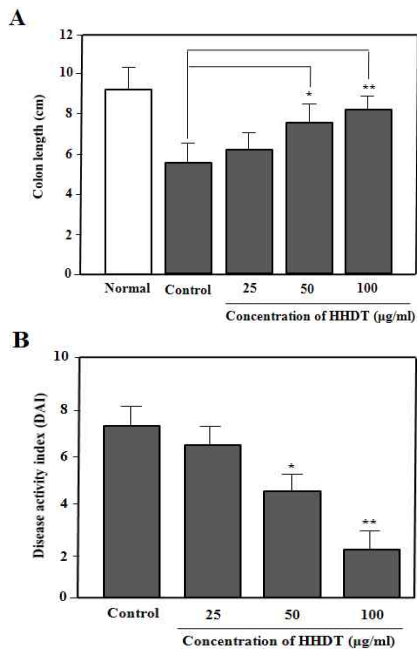


Fig. 2. Effect of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) on colon length and disease activity index (DAI) rate in DSS-induced colitis mice.

Mice were given 5% DSS for 7 days. HHDT was administrated orally at various dose(25-100 mg/kg) for 7 days. Colon length (A) and DIA (B) was measured on day 7. Each column represents the mean \pm SE from 5 mice. * p <0.05 and p <0.01 on day 7 indicate significant differences with HHDT untreated control group(DSS alone).

2. DSS 유도 결장조직 손상에 대한 黃連解毒湯의 효과

黃連解毒湯 투여가 DSS 유도 마우스 대장염의 결장 조직 손상에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서, 각 실험군의 결장 형태와 조직을 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 조사하였다. Fig. 3의 A-E는 결장의 형태적 특징으로 Fig. 2A에서 보여준 바와 같이 DSS 단독 투여군에 비해 黃連解毒湯 투여군이 유의하게 증가되었고, 100 mg/kg 투여군은 조직의 내용물에서 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군과 차이가 있었지만, 결장의 길이는 유사했다.

DSS 유도 마우스 대장염에서 결장 조직의 변화에 미치는 黃連解毒湯의 효과는 Fig. 3F-J에서 보여주는 바와 같다. DSS 단독 투여군의 경우 결장 조직의 손상이 crypt distortion의 수, muco-secretive capability의 감소, 궤양 등 심각한 수준이었다. 黃連解毒湯 25 mg/kg 투여군은 조직손상이 약간 개선되는 효과를 보였지만 유의한 효과는 없었으나, 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군은 뚜렷한 개선효과가 있었다. 특히 100 mg/kg 투여군은 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군과 유사하게 현저한 개선효과가 있었다.

DSS 유도 마우스 대장염의 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 黃連解毒湯 투여군의 경우 25 mg/kg을 제외한 50 mg/kg과 100 mg/kg의 경우 양성 대조군에 비해 조직손상의 개선과 염증반응 침윤 지수가 낮아짐을 확인할 수 있었고(p <0.05, p <0.01), 100 mg/kg 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 조직손상과 염증반응이 현저히 개선되는 효과를 보였다.

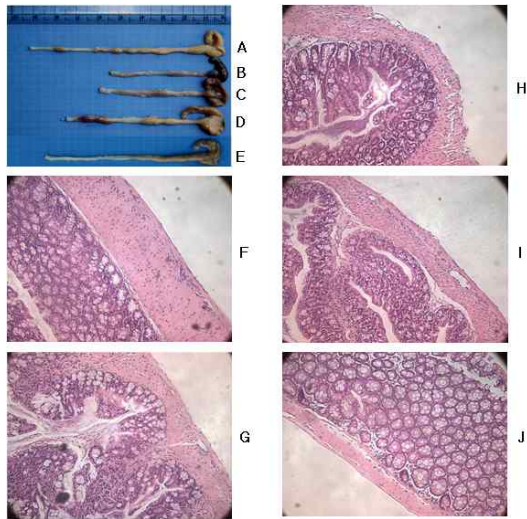


Fig. 3. Macroscopic findings of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) effect on the histological damages in colon tissue of DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate(DSS) for 7 days. HHDT was administrated orally at various dose(25-100 mg/kg) for 7 days. Shown are the representative gross appearance(A: normal; B: DSS alone; C: DSS plus 25 mg/kg HHDT; D: DSS plus 50 mg/kg HHDT; E: DSS plus 100 mg/kg HHDT) and microscopic views of haematoxylin and eosin-stained sections(F: normal control; G: DSS alone; H: DSS plus 25 mg/kg HHDT; I: DSS plus 50 mg/kg HHDT; J: DSS plus 100 mg/kg HHDT) of the colons. Original magnification in $\times 100$.

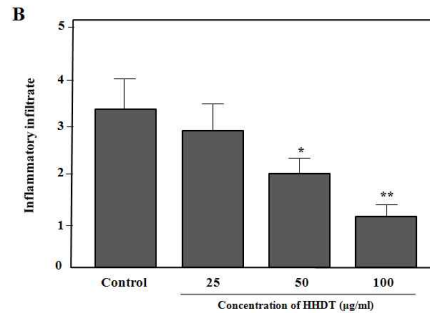
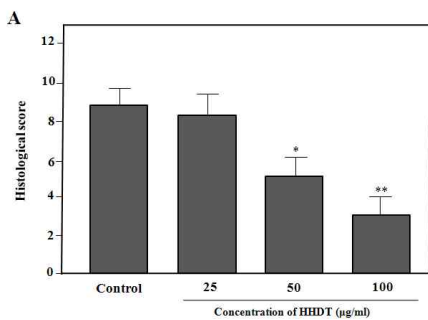


Fig. 4. Effect of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) on histological score and inflammatory infiltrate in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate(DSS) for 7 days. HHDT was administrated orally at various dose(25-100 mg/kg) for 7 days. Histological score (A) and inflammatory infiltrate (B) was measured from the colon tissues on day 7. Each column represents the mean \pm SE from 5 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ on day 7 indicate significant differences with HHDT untreated control group(DSS alone).

3. 혈청 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 黃連解毒湯의 효과

한편 黃連解毒湯 투여가 DSS 유도 마우스 대장염에서 염증 매개물질로 잘 알려진 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해서, 실험이 종료된 마우스의 간문맥으로부터 혈액을 얻어 혈청을 분리하여 NO와 PGE₂의 생성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5A와 B에서 보여준 바와 같이 DSS 단독 투여군에서는 NO와 PGE₂ 생성이 매우 높았지만, 黃連解毒湯투여군 25 mg/kg을 제외하고 50 mg/kg과 100 mg/kg에서는 NO와 PGE₂ 생성이 유의하게 억제되었다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 특히 100 mg/kg 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군과 유사하게 NO와 PGE₂ 생성이 현저히 억제 되었다. 이러한 결과는 黃連解毒湯 투여는 염증 매개물을 현저히 줄여줄 수 있는 효과가 있음을 제시해주었다.

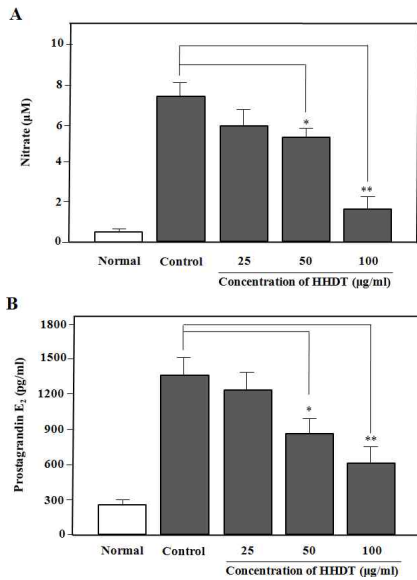


Fig. 5. Effect of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) on NO and PGE₂ production in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate(DSS) for 7 days. HHDT was administrated orally at various dose(25-100 mg/kg) for 7 days. NO (A) and PGE₂ production (B) was measured from the serum on day 7. Each column represents the mean \pm SE from 5 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$ on day 7 indicate significant differences with HHDT untreated control group (DSS alone).

4. 결장조직의 항산화효소 활성에 미치는 黃連解毒湯의 효과

마지막으로 黃連解毒湯 투여가 DSS 유도 마우스 대장염에서 생체 내 항산화효소로 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 초음파 분쇄기를 활용하여 조직 용출액을 제조한 후 단백질을 정량하고 효소 활성을 측정 하였다. 그 결과 SOD와 catalase의 활성은 Fig. 6 A-B와 같이 DSS 단독 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군에 비해 그 활성이 현저히 줄어들었으나, 黃連解毒湯을 투여한 결과 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 효소 활성이 증가하는 효과가 있었다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 또한 Fig. 6C와 같이 GPx의 활성의 경우는 DSS에 의해 억제되었던 효소의 활성이 黃連解毒湯 50 mg/kg과 100 mg/kg을 투여함으로써 그 활성이 증가하는 효과가 있었다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). 특히 黃連解毒湯 100 mg/kg의 투여는 DSS에 의해 억제되었던 항산화효소의 활성을 증가시켜 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군과 유사하게 그 활성이 현저히 증가했다($p < 0.01$).

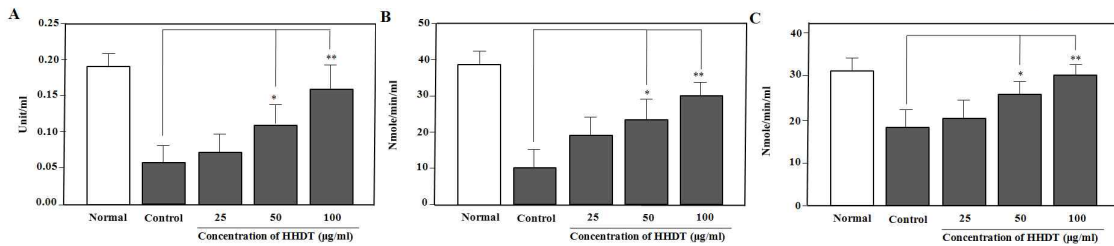


Fig. 6. Effect of *Hwangyeonhaedok-tang*(HHDT) on antioxidant enzyme activity in DSS-induced colitis mice.

Mice were administered with or without dextran sodium sulphate(DSS) for 7 days. HHDT was administrated orally at various dose(25-100 mg/kg) for 7 days. Superoxide dismutase(SOD) (A), catalase (B), and glutathione peroxidase (Gpx) (C) was measured from the colon tissue extracts on day 7. Each column represents the mean \pm SE from 5 mice. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ on day 7 indicate significant differences with extract untreated control group(DSS alone).

IV. 考 察

염증성 장질환(IBD)은 소화관을 침범하는 원 인미상의 만성 염증성 질환이다^{13,17)}. 이러한 만성 염증성 장질환은 크게 두 개의 그룹으로 나눌 수 있는데 그 하나가 만성 비특이적 궤양성 대장염 (ulcerative colitis, UC)이며¹⁵⁾, 다른 하나가 크론 병(Crohn's disease, CD)이다¹³⁾. 크론병이 대장을 침범하는 대부분의 경우에는 궤양성 대장염과 임상적으로 또한 병리학적으로 구별이 가능하기 때문이며 궤양성 대장염은 병변이 대장에 국한되어 나타난다¹⁵⁾.

UC는 악화와 완화가 반복적으로 나타나는 만성 대장질환으로 병리학적 특징은 심각한 염증을 수반 하는데, 한의학적으로 UC는 臟毒症, 實熱火毒症의 범주에 속하는 것으로 볼 수 있고 治法으로는 清熱瀉火法을 사용하며 이에 관한 대표적인 처방이 黃連解毒湯이다³⁻⁵⁾. 黃連解毒湯이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향에 대해 연구는 육안적 형태 변화, 조직학적 염색소견, 면역 조직화학적 염색소견, 전자 현미경 소견을 중심으로 보고된바 있다²²⁾. 그러나 항산화 효소의 활성화에 대한 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 DSS로 유도 된 마우스 대장염에 대하여 黃連解毒湯의 항염증 및 항산화 효과를 검증하였다.

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 알려졌다²⁰⁻²¹⁾. DSS로 유도된 마우스 결장의 병리학적 특징은 표피주위에 괴양 형성, 조직벽의 심각한 부종, 점액조직의 비대, 호산구를 비롯한 과립백혈구의 침윤이 과도하게 나타난다¹⁹⁻²¹⁾. 이러한 DSS 유도에 의한 병리학 적 특징을 토대로 전 염증성 사이토카인 및 케모

카인 등 염증 기전에 대한 연구 결과가 매우 활발히 진행되고 있다²³⁾. 따라서 본 연구는 黃連解毒湯이 DSS 유도 급성 UC 유사 대장염 발달에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

본 연구에서 급성 UC 모델을 만들기 위해서 5% DSS 드링크제를 제조하여 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 본 연구는 UC에 黃連解毒湯의 효과를 알아보기 위해서 DSS 투여와 동시에 각각의 약물 25-100 mg/kg을 하루에 1회 씩 경구투여하면서 7일 동안 병리적 현상을 조사하였다. 黃連解毒湯 추출물인 HHDT를 25-100 mg/kg 투여한 결과 저 농도에서는 효과가 없었으나, 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군에서는 DSS 단독 투여군에 비해서 체중 감소 억제와 결장길이의 복원 및 DAI가 현저히 개선의 효과를 얻었다(Fig. 1과 2). DSS 유도 마우스 대장염에서 黃連解毒湯의 증상적 개선에 대해서 본 연구는 조직학적 조사를 수행하였다. 정상 대조군은 결장 점막에서 술잔세포가 선와의 벽을 잘 이루고 있었으며, 그 사이로 표면 상피세포가 규칙적으로 존재하였다(Fig. 3F). 그러나 DSS만 투여한 양성 대조군의 경우 대부분의 선와가 뭉개져 없어졌으며, 그 벽을 이루는 술잔세포와 그 주변세포가 사라졌으며, 상피세포의 탈락 및 괴사 그리고 염증세포가 심하게 침윤되는 반응을 보였다(Fig. 3과 4). 술잔세포는 결장내에서 점액을 생산하는 중요한 세포로서 점액분비를 통한 장의 보호를 하는 중요한 작용을 한다⁴⁷⁻⁴⁸⁾. 결장의 상피세포에 존재하는 점막은 산(acid), 효소(enzyme), 병원성세균 및 독소와 같은 장관내의 유해물질에 대한 방어작용을 하는데, 이러한 장벽의 파괴는 염증성 장질환을 일으키게 된다²⁴⁾. 그러나 黃連解毒湯을 투여할 경우 25 mg/kg의 저농도 에서는 DSS가 유도한 결장내 손상을 개선하지 못했을 지라도 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군에서

는 술잔세포와 주변세포는 물론 상피세포의 괴사가 현저히 개선되는 효과를 보여주었다. 이러한 결과는 黃連解毒湯이 DSS 유도에 의한 결장내 세포 및 장벽물질을 효과적으로 보호해 준다는 것을 제시해 주었다.

한편 NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써, 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 생산한다²⁵⁾. 또한 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid에서 prostanoid로 전환시키는 효소로 알려졌는데, COX-1과 COX-2에 의해 합성된 적은양의 prostanoid는 생체의 항상성 유지에 필요하지만, 과량의 prostanoid는 NO와 비슷하게 활성화된 대식세포에서 COX-2의 발현이 촉진되어 많은 양의 PGE₂를 생산하게 된다²⁶⁾. 이렇게 생성된 NO와 PGE₂와 같은 염증촉진 매개물은 DSS 유도 마우스 대장염에서도 더욱더 염증을 악화시킨다. DSS 유도 마우스 대장염에서 NO와 PGE₂의 생성에 黃連解毒湯 투여가 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. DSS만 투여한 양성 대조군은 혈청 내 대량의 NO와 PGE₂가 생성되었지만, 黃連解毒湯을 투여할 경우 NO와 PGE₂ 생성이 현저히 억제되는 결과를 얻었다(Fig. 5). 따라서 본 연구의 결과 黃連解毒湯의 투여에 따른 염증 백혈구의 침윤이 억제되는 이유는 NO와 같은 염증 매개물을 억제할 뿐만 아니라 염증 야기 사이토카인 및 케모카인 그리고 즉시형 과민반응을 억제시켜 DSS가 유도하는 대장염을 개선하는 것이라 생각된다.

또한 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 항산화효소의 역할에 대한 연구가 활발히 진행되고

있다²⁷⁾. 이러한 UC의 특징을 고려하여 DSS 유도 마우스 대장염에서 항산화 효과가 우수한 黃連解毒湯을 투여하였다. 그 결과 SOD와 catalase의 활성은 Fig. 6A-B와 같이 DSS 단독 투여군의 경우 아무런 약물이 투여되지 않은 정상군에 비해 그 활성이 현저히 줄어들었으나, 黃連解毒湯을 투여한 결과 50 mg/kg과 100 mg/kg에서 효소 활성이 증가하는 효과가 있었다. 또한 Fig. 6C와 같이 GPx의 활성의 경우는 DSS에 의해 억제되었던 효소의 활성이 黃連解毒湯 50 mg/kg과 100 mg/kg을 투여함으로써 그 활성이 증가하는 효과가 있었다. 특히 黃連解毒湯 100 mg/kg의 투여는 DSS에 의해 억제되었던 항산화효소의 활성을 증가시켜 아무런 약물이 투여되지 않은 대조군과 유사하게 그 활성이 현저히 증가했다. 사실 IBD와 같은 환자의 결장조직에서는 SOD가 과량 발현되어 H₂O₂을 대량 생성하여 치명적인 조직의 손상을 야기하는 것으로 알려졌다¹⁸⁾. 그러나 본 연구의 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 생각 된다²⁸⁾.

이상의 결과를 종합하면, 黃連解毒湯은 약물자체의 항산화력이 우수하였으며, DSS 유도 마우스 대장염에서 체중의 감소, 조직병리학적 악화, 염증반응 및 산화적 스트레스를 개선하는 효과가 있었다. 따라서 黃連解毒湯을 UC와 같은 염증성 내장 질환 치료에 응용할 수 있음을 제시해 주고 있다.

V. 結 論

黃連解毒湯(*Hwangyeonhaedok-tang*, HHDT)은 黃芩(*Scutellariae Radix*), 黃連(*Rhizoma Coptidis*), 黃柏(*Cortex Phellodendri*), 梔子(*Fructus Gardeniae*)로 구성된 처방으로서 전통적으로 동양에서 장질환, 심혈관계질환 및 염증성 질환 등 여러 가지 임

상적 증후의 치료에 사용되어 왔다. 그러나 dextran-sulfate sodium (DSS) 유도 마우스 대장염에서 黃連解毒湯의 항산화 및 항염증 효과에 대한 조사는 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 DSS 유도 마우스 대장염에서 黃連解毒湯의 항산화 및 항염증 효과를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻게 되었다.

1. 黃連解毒湯 투여에 따른 DSS 유도 증상 완화 효과 체중의 감소, 결장길이의 감소, 증가된 질병활성지수(disease activity index, DAI) 및 결장조직의 손상을 개선하는데 우수한 효과를 보여 주었다.
2. 黃連解毒湯 투여에 따른 DSS 유도 항염증 효과 DSS 유도 염증 매개물인 NO와 PGE₂를 억제하는 우수한 항염증 효과가 있었다.
3. 黃連解毒湯 투여에 따른 DSS 유도 항산화 효과 DSS 유도에 의한 감소된 결장조직의 SOD, catalase 및 GPx 등 효소 활성을 증가 시키는 우수한 효과가 있었다.

이러한 결과는 DSS 유도 마우스 대장염에서 黃連解毒湯이 대장염의 증상 개선과 항염증 효과 및 항산화효소 활성을 유도하는데 우수한 효과가 있음을 보여 주고 있다. 따라서 黃連解毒湯을 항궤양 치료에 응용할 수 있음을 제시하고 있다.

參考文獻

1. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1996:72.
2. 辛民教. 원색 임상본초학. 남산당. 1986:310, 312, 313, 308, 309, 279.
3. 金亨律. 東醫寶鑑 中 황련해독탕의 활용에 대한 연구. 원광대학교대학원. 2007.
5. 許浚. 對譯 東醫寶鑑. 동의보감출판사. 2006:1172, 1194, 1195.
6. 尹用甲. 新東醫方劑 2223 도해임상활용. 鼎談. 2006:2456.
7. 류기원, 염증성장질환. 한방내과학회지. 2005; spr(1):24-31.
8. 한중현. 한방약리학. 서울:의성당. 2004:187-90.
9. 孫昌鳳. 항균활성작용에 대한 황련해독탕의 효능에 관한 연구. 원광대학교. 1986.
10. 鞠潤範. 황련해독탕이 자발적 고혈압白鼠의 혈압 및 신장기능에 미치는 영향. 원광대학교. 2001.
11. 鄭在銀. 황련해독탕이 저산소증에 의한 배양 심근세포枯死에 미치는 영향. 원광대학교. 2004.
12. 김대희. 황련해독탕 추출물의 항염증효과. 대구한의대. 2009.
13. 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.
14. 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.
15. Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. World J Gastroenterol. 2002;8:158-61.
16. 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.
17. 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.
18. Anonymous. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China. English Edition.* Guangdong Science and Technology Press. Guangzhou. 1992:82-3.
 19. Cooper HS, Murphy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 1993;69:238-49.
 20. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1995;109:1344-67.
 21. Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/cmice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288:G1328-338.
 22. 안중환. 황련해독탕이 DSS로 유발된 흰쥐의 췌양성 대장염에 미치는 영향. 동국대 대학원. 2006.
 23. 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.
 24. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol.* 1991 Feb;260(2 Pt 1):C183-93.
 25. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase(iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood.* 1995;86(3):1184-95.
 26. Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J. Exp. Med.* 2000;191(12):2131-44.
 27. 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.
 28. Simmonds NJ, Rampton DS. Inflammatory bowel disease: a radical view. Simmonds NJ, Rampton DS. *Gut.* 1993;34:865-8.