

薏苡仁 추출물이 DSS(dextran sulfate sodium)로 유발된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향

허 경, 장명웅, 임성우
동국대학교 한의과대학 한방내과

The Effects of Coicis Semen Extract (CSE) on Dextran Sulfate Sodium - Induced Colitis in Mice

Gyeong Heo, Myeong-woong Jang, Seong-woo Lim

Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to investigate the effects of Coicis Semen Extract (CSE) on the experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in mice.

Methods : Experimental colitis was induced by daily treatment with 5% DSS in the drinking water for 7 days in 6-week-old male ICR mice. The colitic mice were divided into three groups: the normal (N) group consisted of mice that were not inflammation-induced. The control (C) group was composed of untreated colitis elicited mice. The sample (S) group was administered CSE after colitis elicitation. The effects on colonic mucosal ulcers were evaluated by the morphological, histological and immunohistochemical change of the large intestine.

Results : Inhibition of LPS-induced NO decreased in the S group. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 mRNA noticeably decreased in the S group from 0.25 mg/ml. In the common morphological and histochemical change, the erosion and the infiltration of inflammatory cells increased in the C group, while they noticeably decreased in the S group. The length of colon was shortened more in the C group than in the S group. The distributions of MUC2 and Hsp70 treated with CSE increased noticeably more in the S group than in the C group ($p < 0.05$). It was confirmed histochemically and immunohistochemically that the distributions of iNOS, COX-2, MAC387, serotonin, apoptosis and PCNA treated with CSE decreased in the S group more than in the C group ($p < 0.05$).

Conclusions : It is confirmed that CSE has cytoprotective effect, so can alleviate inflammation process. Therefore, it is expected to have potential protective effect on colitis.

Key words : Coicis semen extract, colitis, dextran sulfate sodium (DSS)

1. 서 론

궤양성 대장염은 직장에서 대장의 근위부로 침범하는 점막 또는 점막하층의 염증을 특징으로 하

는 원인 불명의 만성 염증성 장질환으로, 호전과 악화가 반복되는 혈성설사와 대변절박증(urgency) 및 복통, 점액변 등이 주증상이다¹.

유전, 환경 요인과 함께 면역염증반응, 장내세균 등의 복합적인 작용으로 발생하며², 전 세계적으로 분포하지만 북미와 북유럽에서 호발한다. 하지만 최근에는 남유럽과 우리나라를 포함하는 아시아 국가, 그리고 다른 개발도상국에서도 발병률이 증

· 교신저자: 임성우 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지
동국대학교 한의과대학 일산한방병원 한방내과
TEL: 031-961-9043 FAX: 031-961-9049
E-mail: omdslw@naver.com

가하고 있다³.

케양성 대장염의 한의학적 증후는 便血, 腸風, 腸癰, 火泄, 泄瀉, 腸澼, 赤痢, 膿血痢, 痢疾이라 할 수 있으며⁴, 임상연구로는 補腸健脾湯加減方⁵, 清心蓮子湯⁶, 芍藥湯加味方⁷, 惜紅煎加味方⁸, 丹蔘補血湯加減⁹, 平胃地榆湯加味方¹⁰ 등이 있고, 導赤地榆湯¹¹, 沙蔘麥門冬湯¹², 赤小豆當歸散¹³, 黃連解毒湯¹⁴, 地榆湯¹⁵, 消炎整腸湯¹⁶, 導滯湯¹⁷, 槐花散¹⁸ 등의 실험연구가 있다.

薏苡仁은 衛生湯, 蔘苓白朮散, 三仁湯, 牡丹散, 敗醬散 등의 처방에서 泄瀉, 腸風, 腸癰 등에 사용되었으며⁴, 健脾滲濕과 除痺止瀉 및 清熱排膿의 효과¹⁹, 면역증강²⁰⁻²³, 항산화작용^{24,25}, 염증치료^{20,21}의 실험적 효과가 있어서, 본 연구에서는 dextran sulfate sodium(DSS)로 유발된 생쥐의 케양성 대장염에 薏苡仁 추출물(CSE)을 투여하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

II. 실험

1. 재료

1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 정상군(N) 20.7±0.1 g 5마리, 대조군(C) 20.5±0.3 7마리, 실험군(S) 20.3±0.3 g 7마리의 ICR계 6주령 수컷 생쥐를 대한실험동물센터로부터 구입하였으며, 일주일 동안 온도 22±1 °C, 습도 55±3%인 실험실 환경에서 적응시킨 후 사용하였다.

2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 세포주는 마우스의 RAW264.7 세포를 한국세포주은행에서 구입하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Welgin, Korea)에 배양하고, 오염방지를 위해 항생제 100 unit/ml penicillin (Sigma, USA)와 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하여 사용하였다.

3) 약재

약제는 薏苡仁 추출물(Coicis Semen Extracts, CSE)로 薏苡仁 2점(206.8 g)에 물 2 ℓ를 넣어 90 °C에서 3시간 달인 후 50 ml까지 감압 농축한 다음, 농축된 CSE(수율, yield=4.06%)를 50 ml/60 kg의 3배 농도 하루 1회씩 3일 동안 구강 투여하였다. 단, 세포처리를 위해서 동결건조하여 사용하였다.

4) 대장염 유발 및 실험동물군

대장염 유발을 위해 5% DSS(dextran sodium sulfate, MW 5,000, Wako, Japan)를 7일간 음용시켰다. 이후 3일 동안 생리식염수를 구강으로 직접 투여한 군인 대조군(Control group, C), CSE를 투여한 군인 실험군(Sample group, S)으로 나누었으며, DSS 대신 생수를 음용시킨 후 생리식염수를 3일 투여한 군은 정상군(Normal group, N)으로 하였다.

5) 세포에 CSE 첨가량

MTT assay 결과 RAW264.7 세포 수 1×10⁵개에서 CSE 2.0 mg/ml까지는 세포 생존율의 변화가 전혀 없음을 확인한 후 최대 농도를 2.0 mg/ml로 결정하였다.

2. 방법

1) NO 생성 측정

배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포에 CSE를 0.05, 0.5, 0.15, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml의 농도로 전처리하고 1시간 후 100 ng/ml LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 18시간 배양한 후 배양액 50 µl와 동량의 Griess Reagent를 넣어주고 10분간 상온에서 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 염증효소 유전자 발현 측정

역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW264.7 세포 1×10⁵/ml을 6 well에 plating하고 12시간 후 1 µl/ml LPS를 처리한 다음 2시간 뒤 CSE를 농도별(0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml)로 처리

하였다. CSE 처리 24시간 후 Trizol reagent(Sigma, USA)를 이용하여 RNA를 추출하고 Nano Drop (ND-1000, USA)을 이용해 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Promega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS와 COX-2의 primer로 반응시켰으며 internal standard로 β -actin을 동시에 실시한 후 증폭된 mRNA를 1% agarose gel에 전기영동하여 얻어진 밴드로 평가하였다.

3) 조직표본 준비

동물을 sodium pentobarbital(0.3 ml/100 g)로 마취시킨 후 복부를 절개하여 대장을 절취한 후 길이 측정 후 다음 얻어진 조직을 10% 포르말린에 12시간 고정시킨 후 흐르는 물에 수세하였으며, 탈수화 과정을 거친 다음 파라핀에 포매시켜 5 μ m로 연속 절편하여 조직화학 및 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

4) 조직화학 및 면역조직화학적 염색

절편된 조직 표본을 xylene을 이용하여 탈파라핀한 후 가수화하여 조직화학적 염색으로는 일반적으로 시행하는 Hematoxylin-Eosin(HE)염색과 산성점액다당류를 청색으로 염색시키는 alcian blue, 혈구염색법은 Wright를 행하였다. 또한 면역조직화학적 염색으로 표본을 proteinase K(20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 3% H_2O_2 로 5분간 처리하여 조직 내의 내인성 과산화효소를 제거하고, 1차 항체를 처리하여 4 $^{\circ}C$ humidified chamber에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 0.02M phosphate buffered saline(PBS)에 충분히 수세한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit/mouse IgG(Dako, USA)에 실온에서 10분간 link하였다. PBS로 수세한 후 streptavidin peroxidase(Dako, USA)에 10분간 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)로 발색 반응을 확인하였으며, Hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus BX50, Japan) 하에서 비교 관찰한 후 디지털 카메라(Nikon E995, Japan)로 촬영하였다. 단, serotonin의 경우는 이차항체를 goat anti-rabbit IgG fluorescein

conjugated secondary antibody로 처리 후 발색 반응 없이 형광현미경 하에서 관찰하였다.

5) 세포자연사

세포자연사(apoptosis) 확인을 위해 in situ apoptosis detection kit(Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL(terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) 염색을 실시하였다. 절편된 조직을 탈파라핀한 후 proteinase K에 5분간 proteolysis시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 하였다. Strength TdT enzyme을 37 $^{\circ}C$ 에서 1시간동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분, anti-digoxigenin-peroxidase에서 1시간 처리한 후 DAB로 발색 반응을 확인한 다음 hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

6) 영상분석 및 통계처리

염색한 조직 표본 중 alcian blue, COX-2, MAC387, Hsp70, MUC2 발현을 관찰한 샘플은 400 배율에서, 그리고 serotonin과 apoptosis는 100 배율에서 각각 그 발현값을 영상분석(Image-Pro Plus, ver. 7.0)하였으며, 각 조직표본당 3곳을 측정하여 통계 처리하였다. 각 군간의 유의성 검증을 위해 SPSS(ver. 18.0) program을 이용하였으며, one-way ANOVA로 분석하고 DUNCAN으로 사후 검증하였다. 유의수준은 $p < 0.05$ 에서 판별하였다.

III. 결 과

1. RAW264.7 세포를 이용한 염증억제 효과

1) RAW264.7 세포에서의 NO 생성억제 효과

염증유발물질로 주로 사용되는 LPS를 RAW264.7 세포에 CSE의 농도별(0, 0.005, 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml)로 처리한 결과 LPS만 처리한 것을 nitro oxide(NO) 생성 100% 기준으로 했을 때, LPS와 CSE를 모두 처리하지 않았을 경우는 $23.41 \pm 0.37\%$ 였으며, CSE 1.0과 2.0 mg/ml 처리 시 각각 89.94 ± 5.82 , $85.18 \pm 2.85\%$ 로 측정되어, 2.0 mg/ml의 처리 시 LPS로 유도된 NO의 생성량을 약 14.8%

감소시키는 효과가 있었다(Fig. 1).

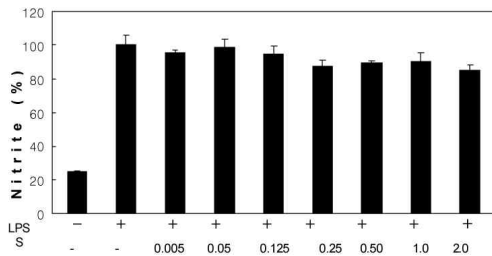


Fig. 1. Inhibition of LPS-induced NO by sample group (S).

In RAW264.7 cell, NO inhibitory effect of 2.0 mg/ml S treated group was counted to be 14.8%. S : sample group, LPS : lipopolysaccharide, NO : nitro oxide

2) RAW264.7 세포에서의 염증호소 유전자 발현 억제 효과

RAW264.7 세포에 LPS를 처리한 후 CSE가 염증호소 유전자 중 iNOS와 COX-2 mRNA 발현억제 효과를 확인한 결과, iNOS mRNA는 0.25 mg/ml의 농도에서부터 발현억제 효과를 보였으며, COX-2 mRNA는 농도 의존적으로 발현억제 현상이 나타났다(Fig. 2).

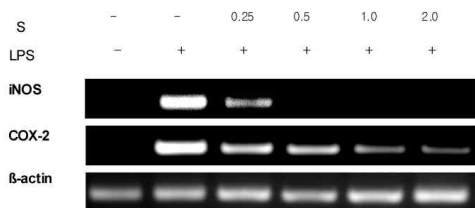


Fig. 2. Inhibition of LPS-induced iNOS and COX-2 mRNA expression by S.

S : sample group, LPS : lipopolysaccharide

2. 동물실험을 이용한 CSE의 효과

1) 대장의 길이 변화

대장의 길이 변화에서는 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)이 각각 7.8±0.1, 6.4±0.6, 6.8±0.6 cm였으며, 실험 첫날 몸무게 대비 정상군(N), 대조군(C),

실험군(S)이 각각 11.4, -8.6, -1.5%의 길이 변화가 있었다. 실험군(S)이 대조군(C)보다 약 6.25% 증가되어, CSE가 대장의 길이 변화에 영향을 미친 것으로 확인되었다(Fig. 3).

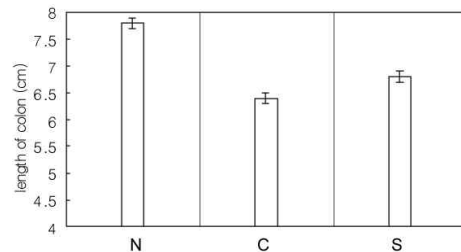


Fig. 3. The change of length of colon.

N : normal group, S : sample group, C : control group

2) 대장의 형태적 변화

Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색을 통한 대장의 형태적 변화에서 정상군(N)은 전형적인 대장의 조직을 나타내고 있으나(Fig. 4A), 대조군(C)은 mucosa 부분이 짓무름(erosion) 현상으로 매우 손상되었으며 crypt가 소실되었고 많은 염증세포들의 침투 현상이 관찰되었다(Fig. 4B). 한편, 실험군(S)은 정상군(N)에 비해 조직의 손상이 있었으나 대부분의 동물조직에서 대조군(C)에 비해 그 손상 정도가 낮았다(Fig. 4C).

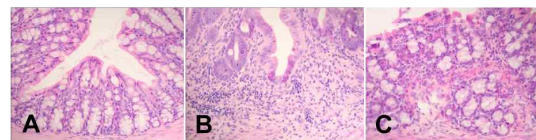


Fig. 4. The changes of mucosa and submucosa. Light micrograph of H&E stain.

A : Normal group without of DSS, B : saline treatment after DSS-induced colitis (Control group), Control group showed the erosion and increase the infiltration of inflammatory cells. C : Sample group treatment after DSS-induced colitis (Sample group). Sample group showed the decrease of damage when compared with control group. (magnification 200x)

N : normal group, S : sample group, C : control group, H&E : Hematoxylin and Eosin

3) CSE의 세포보호 효과

(1) Alcian blue와 MUC2 positive cell

세포보호 효과를 확인하기 위해 먼저 술잔세포 (goblet cell)의 산성점액다당류를 청색으로 나타내는 alcian blue 염색과 이 세포에서 분비되는 mucin 중 mucin2(MUC2) 발현을 확인한 결과, 정상군(N)에서는 mucosa 대부분에서 alcian blue에 청색으로 염색되고, MUC2 또한 많은 발현을 확인할 수 있었으며 특히, MUC2가 상피의 표면에 코팅되어 있어 내강으로부터 보호되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5A, B). 대조군(C)에서는 술잔세포의 소실로 인해 alcian blue에 대한 염색성은 감소되었으며 MUC2 발현 또한 정상군(N)에 비해 감소되었는데, 술잔세포가 존재하더라도 발현되지 않는 세포가 많았으며 간혹 상피 표면 부위에 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C, D). 그러나 실험군(S)에서는 대조군(C)에 비해 발현이 증가되었는데, 특히 MUC2의 발현은 정상군(N)처럼 mucosa 대부분에서 나타나지는 않았으나, 대조군(C)에서처럼 주로 상피 표면, 즉 내강과 접하는 최고층 부위에서 뚜렷한 발현이 나타났고, 대조군(C)에 비해 증가되었다(Fig. 5E, F).

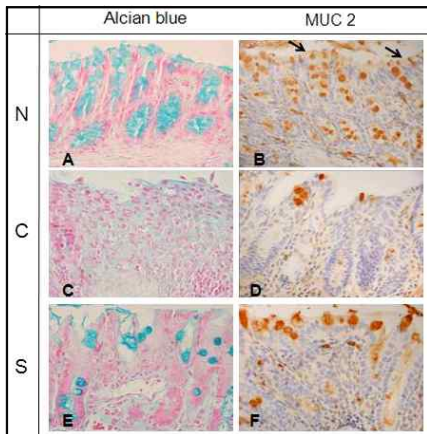


Fig. 5. Alcian blue-positive goblet cells (A, C, E) and expression of MUC2 (B, D, F).

arrow : epithelial surface was coated with MUC2. (magnification 200x)
N : normal group, S : sample group, C : control group

영상분석 결과로는, 먼저 alcian blue에 염색된 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)이 각각 12.4±0.67, 7.4±0.03, 7.8±0.12로 측정되어 대조군(C)과 실험군(S) 간에 차이가 거의 없고, 유의성이 없었다($p>0.05$). MUC2 발현에 대한 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)은 각각 7.7±0.07, 6.9±0.12, 7.3±0.09로 측정되어 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 발현이 증가되었으며, 각 군 간에 모두 유의적이었다($p<0.001$)(Fig. 6).

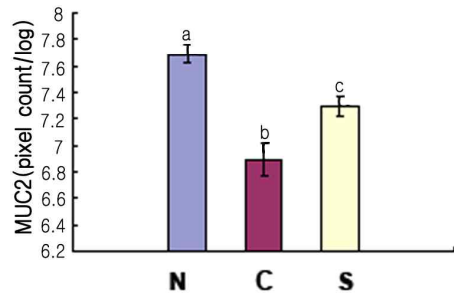


Fig. 6. Image analysis of MUC 2 expression.

Significantly different between the groups ($p<0.001$). means±S.E.

N : normal group, S : sample group, C : control group

(2) Heat shock protein (Hsp70) 발현

장 세포에서 세포보호 효과물질로 알려진 Hsp70의 발현 정도를 확인한 결과, 정상군(N)에서는 전체적으로 약한 양성 반응과 crypt 바닥 부분에서 간혹 양성 반응을 보였으나(Fig. 7A), 대조군(C)에서는 손상된 부위에서의 발현이 전혀 없거나 정상군(N)에 비해 발현이 감소되었다(Fig. 7B). 그러나 실험군(S) mucosa 전체는 정상군(N)에 비해 강한 양성 반응을 나타내고 있었다(Fig. 7C).

영상분석 결과로 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)이 각각 6.7±0.18, 6.6±0.45, 7.6±0.12로 측정되어 정상군(N)에 비해 대조군(C)에서 감소되었으나 실험군(S)에서는 오히려 유의성 있게 증가되어 ($p<0.01$), CSE에 의해 Hsp70 발현이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 7D).

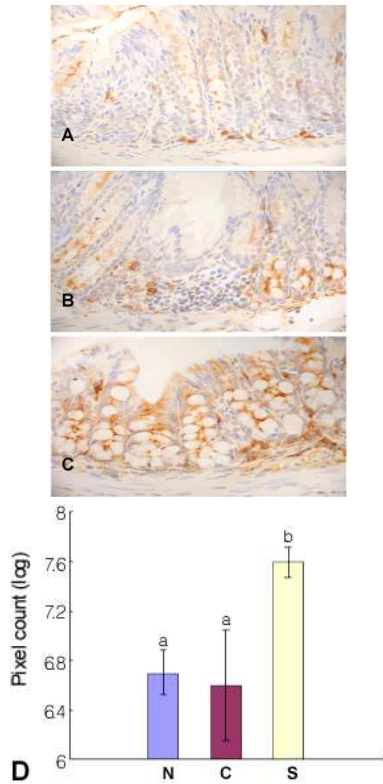


Fig. 7. The expression of Hsp70 in colon.

A : N, B : C (the expression of Hsp70 were increased in the lamina propria and the submucosa), C : S (the expression was increased in mucosa as compared to N, magnification 200x. D : image analysis of Hsp70 in mucosa. differences were observed for N and S ($p < 0.01$). means \pm S.E.

N : normal group, S : sample group, C : control group

4) CSE의 염증억제 효과

(1) Infiltration of leukocytes and macrophages
 혈구세포를 염색하는 Wright 염색과 macrophage 확인을 위한 MAC387 발현을 관찰한 결과, 정상군(N)에서는 조직 내로 백혈구의 침투를 거의 관찰할 수 없었던 반면, 대조군(C)에서는 조직 내로 침투한 많은 백혈구들이 관찰되었으며, 실험군(S)에서는 정상군(N)에 비해 그 수가 증가되었으나, 대조군(C)에 비해서는 감소되었다(Fig. 8A, C, E).

MAC387 발현에서도 Wright 염색 결과와 유사

하게 나타났으며(Fig. 8B, D, F), 이것을 영상분석한 결과 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)이 각각 6.2 ± 0.09 , 7.4 ± 0.03 , 7.0 ± 0.09 로 측정되어 각 군 간에 모두 유의성이 있었고($p < 0.01$), CSE 처리로 인해 macrophage 감소 현상이 있었다(Fig. 8G).

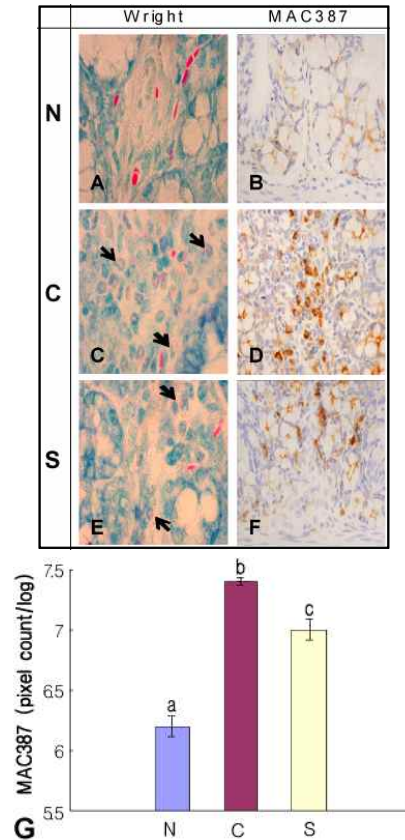


Fig. 8. Infiltration of leukocytes (A, C, E) into mucosa and MAC387 expression (B, D, F)

arrow : leukocytes, magnification (A, C, E : 1000x; B, D, F : 400x)

G : image analysis of MAC387 expression. Differences were observed between the groups. ($p < 0.01$) means \pm S.E.

N : normal group, S : sample group, C : control group

(2) Cyclooxygenase-2(COX-2) 발현

염증 진행에 관여하는 물질로 알려진 COX-2 발현을 관찰한 결과, 전체적으로 약한 반응을 나타낸

정상군(N)에 비해 대조군(C)은 강한 양성 반응을 보였고 특히, 염증세포들에서 뚜렷한 발현을 관찰할 수 있었으나, 실험군(S)에서는 대조군(C)에 비해 발현이 감소되었다(Fig. 9A, B, C). 영상분석에서도 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)이 각각 6.4 ± 0.31 , 7.8 ± 0.12 , 7.2 ± 0.18 로 측정되어 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 COX-2 발현이 감소되었으나 유의성은 없었다($p > 0.05$).

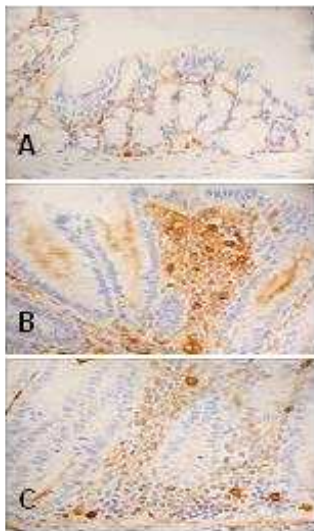


Fig. 9. The expression of COX-2 in colon.

A : N, B : C, C : S (magnification 200x)
 N : normal group, S : sample group, C : control group

5) 신경전달물질 Serotonin의 발현

장의 상피조직에서 많이 발현되고 있는 신경전달물질이며, 혈액이 응고할 때 혈소판으로부터 방출되어 혈관수축작용을 하는 물질인 serotonin을 확인한 결과, 정상군(N)에서는 Fig. 10A에서처럼 많은 발현을 관찰할 수 있었으나, 대조군(C)에서는 감소되었으며 발현을 거의 확인할 수 없는 부분도 많았던 반면, 실험군(S)에서는 대조군(C)에 비해 증가되었으나 정상군(N)에 비해 여전히 뚜렷한 발현 감소를 나타내었다(Fig. 10C, E). 영상분

석에서도 정상군(N), 대조군(C), 실험군(S)에서 각각 6.1 ± 0.06 , 5.6 ± 0.13 , 5.7 ± 0.06 으로 측정되어 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 발현이 증가되었으나 유의성은 없었다($p > 0.05$).

점막고유층(lamina propria mucosae)에서 serotonin 발현 양상은 상피조직에서의 발현과 명확하게 다른 양상을 보였다. 정상군(N)에서는 거의 발현되지 않았으나 대조군(C)에서는 증가되었고 실험군(S)에서는 대조군(C)에 비해 감소되었다(Fig. 10B, D, F).

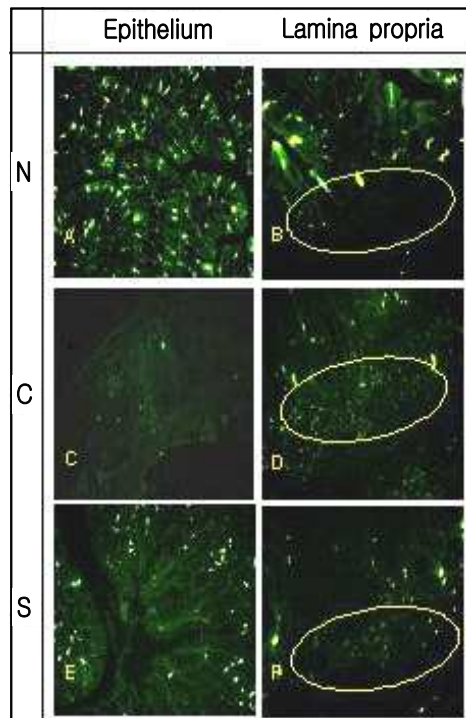


Fig. 10. The expression of serotonin in epithelium and lamina propria of colon.

In normal group, serotonin positive cells were observed in epithelial cell (A). However C and S were decreased as compared to N (D, E). Control group showed the increased expression in lamina propria when compared with normal group (D). magnification 100x (A, C, E), 200x (B, D, F).

N : normal group, S : sample group, C : control group

6) 세포자연사

대장 상피의 세포자연사(apoptosis)를 확인하기 위해 TUNEL 염색한 결과, 정상군(N)은 3.5 ± 0.5 개로 측정되었으며, 대조군(C)과 실험군(S)은 각각 20.7 ± 3.8 , 8.3 ± 3.2 개로 측정되었다. 대장염 유발로 인해 apoptosis가 증가되었음을 알 수 있으며, 또한 CSE 처리로 인해 apoptosis가 유의성 있게 감소되어($p < 0.01$), CSE가 대장염으로 유발되는 apoptosis를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다(Fig. 11).

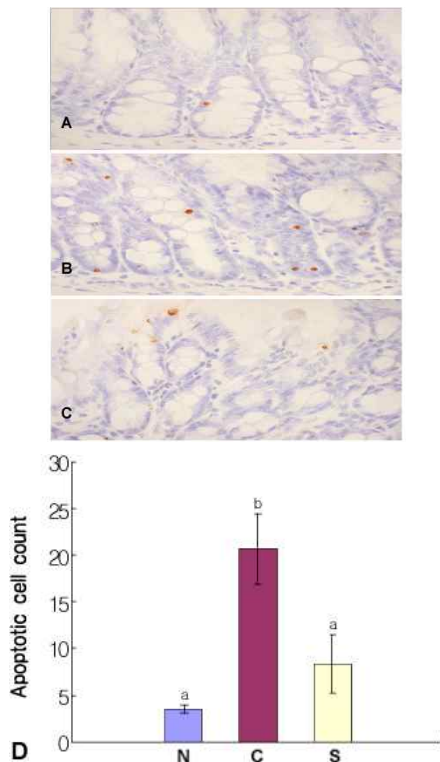


Fig. 11. Apoptosis of epithelium in colon.

A : N, B : C, C : S, D : apoptotic cell counts, differences were observed for C and S ($p < 0.01$) (magnification 400x)

N : normal group, S : sample group, C : control group

7) 세포재생 효과

Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) 발현을

통해 세포재생 효과를 확인한 결과, 정상군(N)의 crypt 바닥 쪽과 약 2/3 지점에서 양성 반응을 나타내었다(Fig. 12A). 그러나 대조군(C)의 crypt에서 양성 반응은 정상군(N)에 비해 약한 반면 lamina propria와 submucosa 부분에서 침윤한 염증세포와 섬유모세포들에서 강한 양성 반응을 보여 이들 세포의 증식이 활발함을 알 수 있었다(Fig. 12B). 실험군(S)에서는 PCNA 양성 반응이 정상군(N)에 비해 증가되고 대부분의 세포에서 그 반응이 나타났으나 lamina propria와 submucosa 부분에서의 반응은 대조군(C)에 비해 감소되어, 염증세포 증식이 억제되고 있음을 확인하였다(Fig. 12C).

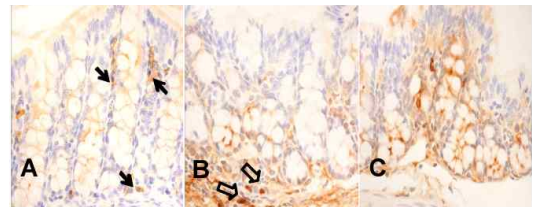


Fig. 12. The expression of PCNA in the colon of mice.

A : N: PCNA-positive cells were observed near the base of the crypt and 2/3 area from the base (arrow), B : C: The expression was increased in lamina propria and submucosa (arrow), C : S: The expression was increased in mucosa as compared to C. (magnification 400x)

N : normal group, S : sample group, C : control group, PCNA : proliferating cell nuclear antigen

IV. 고찰

퀘양성 대장염의 가장 흔한 증상은 혈변이며, 90% 이상의 환자가 호소한다²⁶. 그리고 무른변이 6주 이상 지속되는 경우에는 감염에 의한 설사보다는 퀘양성 대장염을 시사한다²⁷. 그 외 중증의 경우에는 식욕부진, 오심, 구역, 구토, 발열, 부종, 전신 쇠약감 등까지 발생할 수 있다¹. 점진적으로 대개

수 주일에서 수 개월 동안 증상을 보이며, 환자 중 약 70% 정도는 전형적인 만성, 반복성 재연의 경과를 밟는다²⁸.

궤양성 대장염은 유전, 환경 요인과 함께 면역염증반응, 장내세균 등의 복합적인 작용으로 발생하며², 전 세계적으로 분포하지만 북미와 북유럽에서 호발하며 유병률이 인구 10만 명당 70-150명으로 추정된다. 하지만 최근에는 남유럽과 우리나라를 포함하는 아시아 국가, 그리고 다른 개발도상국에서도 발병률이 증가하고 있다³.

최근에는 우리나라와 일본 등의 동양에서도 궤양성 대장염이 급격하게 증가하고 있는데 이는 점차 서구화되어 가는 생활습관, 진단기술의 발달 등이 기여하리라 생각된다. 따라서 이제 우리나라에서도 궤양성 대장염은 만성적인 혈성 설사를 보이는 환자에서 일차적으로 감별해야 할 질환 중 하나이다¹.

궤양성 대장염의 표준화된 진단 방법은 없으며, 병력과 임상 양상, 혈액 및 대변검사, 내시경검사, 그리고 조직검사 소견을 종합하여 이루어진다. 감염 대장염을 배제해야 하며, 궤양성 대장염 진단이 불확실한 경우에는 간격을 두고 내시경검사 및 조직검사를 다시 시행하여 확인한다¹.

궤양성 대장염은 한의학적으로 해석해보면 便血, 腸風, 火泄, 泄瀉, 腸澼, 赤痢, 膿血痢, 痢疾의 범주이다^{4,29}. 泄瀉에서 火泄, 痢疾에서 赤痢와 膿血痢, 便血에서는 腸風과 유사하고, 腸澼은 痢疾과 같은 범주로 볼 수 있다²⁹.

火泄은 實火로서 口乾喜冷, 痛一陣, 瀉一陣, 肛門焦通, 其來暴速으로 腸胃에 熱迫하여 瀉下赤色粘稠, 後重如滯, 小便赤澀, 脈數하다. 痢疾은 赤白粘液膿血을 下痢하고, 량이 적으며 불쾌하고 腹痛에 裏急後重을 수반하는 것이 주요특징이다⁴. 朱震亨³⁰은 “瀉痢之病 水穀或化 或不化并無 努責惟覺 困倦若滯 下則不然 或膿或血 或膿血相雜 或無糟粕 或糟粕相混 雖有痛不痛 大痛之異 然皆裏急後重 逼迫惱人”이라 하였고, 赤痢는 濕熱이 腸迫하여 糞色如

血, 身熱, 腹痛, 裏急後重하고, 膿血痢는 大腸에 積熱蘊結하여 血化爲膿하고 粘稠膿血을 泄하고 裏急後重한다 하였다. 腸風은 “自外感得, 隨感隨見所以色鮮, 自大腸氣分來也”라 하여 外感의 鮮明하게 붉은색으로 大便 前에 나오는 것이라 하였다^{4,33}. 下血을 나타내는 結陰, 腸風, 臟毒 등 모두 便血에 속한다. 便血은 遠血과 近血로 구분하고³¹, 遠血은 先便後血하고 色黑 或 紫暗色이며 近血은 先血後便하고 血色이 鮮紅하다³¹. 이러한 증상들이 궤양성 대장염에서 발생할 수 있는 혈성설사, 대변절박증, 복통, 점액변 등의 증후와 유사하다.

薏苡仁(Coicis Semen)은 성질이 涼하고, 味는 甘淡 無毒하여 脾胃 肺經으로 들어가 健脾滲濕과 除痺止瀉 및 清熱排膿의 효능이 있다¹⁹.

薏苡仁과 관련하여 김 등²⁰과 Yu 등^{22,23}과 Woo 등³²의 세포성 및 체액성 면역을 증강시켜 감염성 질환이나 종양 및 기타 면역기능²⁵ 이상으로 인한 질환 치료에 활용에 대한 보고, 윤 등²¹의 면역과 염증에 관련된 cytokine에 유효한 연구, 박 등^{24,25}의 항산화작용에 대한 연구 등을 토대로 薏苡仁이 염증 회복에 효과가 있으리라 판단되어 본 연구에서 DSS로 대장염이 유발된 생쥐에 薏苡仁 추출물을 투여한 결과, 실험동물의 대장 길이 변화에서 대조군(C)과 실험군(S) 간에 차이가 있었으며, 이것은 염증 부위가 회복되고 있음을 알 수 있다.

염증성 장 질환의 면역학적 요인으로 선천적 면역성, cytokine의 생성, CD4+T cell의 활성화 등이 있으며, 최근에는 cytokine의 염증 및 면역반응 조절기능에 관한 연구가 활발하다. 조직학적으로는 대장에 존재하는 술잔세포가 대장 내 점액을 생산하는 주세포로서, 생산된 점액은 점막을 보호하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 DSS로 대장염이 유발되어 창자샘의 많은 부분이 침식되어 없어지면서 그 벽을 이루던 술잔세포를 비롯한 여러 세포가 없어졌으며, CSE 투여로 대장염 회복 효과를 확인할 수 있었다.

RAW264.7 세포를 이용한 세포실험을 통해서

iNOS와 COX-2 mRNA 발현이 감소된 것으로 보아 CSE가 항염증 물질로 효과적이었다. 동물실험에서도 실험군(S)의 침윤된 염증세포들에서 COX-2 발현이 대조군에 비해 감소하였지만, 명확한 차이가 나타나지 않았고 유의성도 없었다. NO는 단핵구와 큰포식세포 등 면역세포를 비롯한 다양한 세포로부터 L-arginine의 guanidine group으로 합성되며 NO 합성효소(nitric oxide synthase: NOS)는 endothelial NOS(eNOS), neuronal NOS(nNOS), inducible NOS(iNOS)가 있다. 그 중 염증이 있는 경우 내피세포와 다양한 염증세포로부터 iNOS가 합성되어 다량의 NO를 생산하며, 궤양성 대장염의 NO 생산과 NOS의 활성도가 증가된다. 또한 cyclooxygenase(COX) enzyme은 COX-1, COX-2 두 개의 isoenzyme이 존재하며, prostaglandins(PGs)의 합성을 조절한다. 내인성 PGs(PGE₂, PGI₂)는 위액의 분비조절, 점막의 혈류량과 점액의 알칼리 분비 촉진, 점막 연속성을 유지하며, 이로 인해 위장관이 보호된다. 또한 염증반응시 면역세포인 큰포식세포는 interleukin-1 β (IL-1 β)나 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine류 또는 NO나 PGs 등의 다른 염증 매개체를 생산함으로써 반응 진행에서 중요한 역할을 한다. 큰포식세포에 의한 이런 매개체의 생산은 많은 염증성 조직에서 발견된다³³.

본 연구 중 큰포식세포에 특이적인 면역 반응이 일어나는 항체인 MAC387의 면역반응에서는 CSE 처리시 대조군(C)에 비해 감소하였다. 이것은 COX-2가 염증자극, cytokine(IL-1), growth factor 등의 자극에 의하여 염증조직, 큰포식세포 등에서 발현되어 염증세포에서의 COX-2 발현 증가가 큰포식세포의 증가와 관계하며, CSE에 의한 이 세포의 침투와 증식 억제는 염증 억제에 효과적이라 할 수 있다.

세포보호 효과는 우선 alcian blue 염색과 MUC2 발현을 통해 대장의 상피 보호를 확인하였다. 대장에서 상피세포와 점막층은 대장 내강과 하부 조직에 존재하는 잠재적 독소와 유해 물질 사이에 물리적 장벽을 형성한다. 사람, 흰쥐(mouse), 생쥐

(rat)의 대장 상피는 분비하는 mucin 중 많은 양의 MUC2를 발현하는데, 이것은 술잔세포의 bulky apical granule로 저장되어 술잔세포 형태를 확정하는 중요한 요인이며 상피보호에 중요한 역할을 한다. 술잔세포에서 분비되는 점액다당류에서는 실험군(S)이 대조군(C)보다 증가되었으나 통계적으로는 유의성이 없었다. 그 중 MUC2 발현에서는 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 유의적으로 증가되어 CSE가 MUC2 발현에 효과적임이 증명되었다.

본 연구에서 점막층에서의 Hsp70 발현이 실험군(S)에서 대조군(C)에 비해 증가되어 CSE에 의해 상피의 보호기능이 증가된 것이라 할 수 있다. 세포보호 효과로 관찰한 Hsp70은 살아있는 거의 모든 세포에서 발견되는 가장 대표적인 유도성 Hsp(heat shock protein)이다. Heat-shock-factor proteins(HSFs)으로부터 분리되기 시작하여, HSFs로부터 Hsp90이 분리되면 HSFs가 활성화되고, 활성화된 HSFs는 Hsp70 gene의 전사를 촉진하여 스트레스를 받은 세포 내에는 Hsp70 단백질과 mRNA 수준이 급격히 증가하게 된다. 스트레스 상태에서 세포의 생존에 Hsp가 중요하며, 생체 내에서 보호 기능을 가진다.

본 연구에서 염증이 진행된 단계였으므로 상피 조직에서의 세로토닌(5-hydroxytryptamine: 5-HT) 발현은 감소된 반면, 고유판에 침윤, 증식된 면역세포에서 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이것은 대장염 진행에 5-HT가 염증성 물질로 관여하고 있음을 알 수 있으며, 통계적으로는 유의성이 나타나지는 않았으나 CSE에 의해 억제되는 경향을 보여준다. 5-HT는 monoamine neurotransmitter이며 감정, 체온, 수면, 성욕, 식욕, 대사기능에 중요한 역할을 하고, 그 중 장에서 분비되는 5-HT는 대부분 창자크롬친화(enterochromaffin, EC) 세포에서 분비된다. 그리고 5-HT는 연동운동과 분비를 증가시키므로 장으로부터 유기물을 신속히 제거하여 감염으로부터 보호하는 역할을 한다. 내강의 염증성 자극은 EC 세포 비후를 일으키고, EC 세포

의 활성화는 5-HT 방출을 증가시킨다. 상당량의 5-HT가 특정 5-HT 수용체에 결합함으로써 큰포식세포, 가지세포, 림프구, 외인성 신경과 같은 고유관에 존재하는 세포뿐만 아니라 상피세포 내에서도 그 활성을 순환시키며, 이 결합은 NF- κ B system의 활성을 일으키고 다른 염증성 신호경로는 IL-1 β , IL-6 같은 염증성 cytokine과 chemokine의 전사를 일으킨다. DSS와 같은 화학자극에 반응하는 5-HT 신호에서의 변화가 면역세포의 침윤과 활성화에 영향을 주고, 또한 염증매개 물질의 생성을 증가시켜 장에서 염증 진행에 영향을 줄 수 있다.

본 연구 결과에서 DSS로 유도된 대장염의 대조군(C)에서 정상군(N)에 비해 apoptosis 증가를 보였으나 CSE 투여로 인해 감소 현상을 나타내어, CSE가 상피 손상을 억제하고 있음을 나타낸다. 광학현미경 하에서의 apoptosis 특징은 세포수축, 세포질과 염색질의 응축, 세포표면의 수포현상, 그리고 자연살해된 세포의 파편 등으로, apoptotic bodies는 주변세포에 염증 손상 없이 가까이 있는 식세포의 인지로 제거된다. Apoptosis 기전의 결함이나 apoptosis 신호 전달이 부적절하게 일어나 apoptosis 조절에 이상이 생기면 세포가 비정상적으로 증식하여 암이 초래될 수 있다.

마지막으로, 염증유발로 인한 점막층의 손상으로 대조군(C)에서는 샘상피의 세포분열이 잘 일어나지 않는 반면, CSE 처리에 의해 샘상피의 세포분열은 활발하게 일어나고 있는 것을 알 수 있다. 이것은 대장염으로 인한 상피 손상이 CSE에 의해 회복되고 있음을 나타낸다. 세포분열을 확인하는 방법으로 널리 이용되고 있는 면역 반응인 PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)는 내인성 단백질로서, DNA polymerase delta의 cofactor로 작용한다. 정상군(N)에서는 주로 창자샘의 바닥부와 약 2/3 부위에서 양성 반응이 나타났고, 샘의 바닥부분에는 미분화세포가 존재하고 있으며 이들이 성숙부위로 이동하며, 여기에서 구조적, 효소적 성숙이 일어나 기능하는 세포로 분화하며 상피 쪽으로 이동하게

된다.

그러므로 薏苡仁 추출물(CSE)은 DSS로 유도된 대장염에 효과적인 것으로 보이나, 염증매개 물질로 알려진 COX-2와 세로토닌의 발현에서 실험군(S)이 대조군(C)보다 감소하였지만 두 군 간에 유의성이 없어, 큰 억제효과를 나타내지는 않았다.

대신 세포보호물질인 MUC2와 Hsp70 그리고 상피세포 손상 억제를 나타내는 apoptosis 세포수 감소 등에서 대조군(C)에 비해 상대적으로 우수한 효과를 보이는 것으로 보이고 모두 유의성이 있었다. 그러므로 대장염의 치료보다는 예방에 더 큰 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

薏苡仁 추출물(CSE)이 dextran sodium sulfate(DSS)로 유발된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향을 실험적으로 규명하기 위해 CSE를 투여한 후 NO 생성 억제 효과, 염증호소 유전자 발현 억제 효과, 육안적 변화, 조직화학적 변화, 면역조직화학적 변화, 세포자연사, 영상분석 및 통계처리를 이용하여 측정하였다.

1. in vitro에서 iNOS와 COX-2 발현이 감소되어 CSE가 항염증에 효과적인 것으로 판명되었다. 그러나 in vivo에서는 pro-inflammation에 관여하는 것으로 알려진 COX-2와 세로토닌의 발현은 실험군(S)이 대조군(C)보다 감소된 경향을 보였지만, 두 군 간의 유의성은 없었다.
2. 보호물질로 알려진 MUC2와 Hsp70의 발현은 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 증가를 보였으며, 모두 유의성이 있었다.
3. 세포자연사(Apoptosis)와 세포증식에 있어서도 실험군(S)이 대조군(C)에 비해 상피세포의 손상은 낮았으며 세포증식을 보였다.

이상의 결과로 DSS로 유도된 생쥐의 궤양성 대

장염에서 CSE가 염증을 진행시키는 물질에는 큰 억제 효과를 나타내지 못하였으나, 세포보호 효과는 우수하여 염증진행을 완화시키는 것으로 판명되었다. 이에 대장염 치료 효과보다 예방 효과가 기대되며, CSE의 예방 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Choi CH, Jung SA, Lee BI, Lee KM, Kim JS, Han DS, et al. Diagnostic Guideline of Ulcerative Colitis. *Korean J Gastroenterol* 2009;53:145-60.
2. Satoshi M, Nami W, Yoshio O, Yoshinori U. Enteric bacteria and their roles in inflammatory bowel disease. *Bioscience Microflora* 1999;18(1):1-9.
3. Yang SK. Current Status and Clinical Characteristics of Inflammatory Bowel Disease in Korea. *Inflamm Bowel Dis* 2002;40:1-14.
4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 2003, p. 515-66, 898-920, 1502.
5. 윤상협. 補腸健脾湯加減方으로 교원성 대장염의 15년 설사를 호전시켰던 치험 1례. *大韓韓方成人病學會誌* 2001;7(1):78-81.
6. 손덕칭, 장혜진, 선중기. 淸心蓮子湯으로 치료하여 호전된 강직성 척추염을 동반한 중증 궤양성 대장염 1례. *大韓韓方內科學會誌* 2005;26(3):685-91.
7. 서철훈, 이형호, 최기숙, 임동석, 유형천, 이영수 등. 濕熱痢로 변증한 궤양성 대장염 환자의 芍藥湯加味方 치험 2례. *大韓韓方內科學會誌* 2006;27(4):984-90.
8. 임동석, 김남옥, 이형호, 이영수, 홍석, 김희철 등. 加減惜紅煎으로 호전된 潰瘍性大腸炎患者 治驗 1例. *大韓韓醫學方劑學會誌* 2007;15(1):229-37.
9. 김상현, 김호진, 김정은, 이상희, 홍수현, 김원일. 丹蔘補血湯加減과 침구치료를 통한 궤양성 대장염의 후유증에 대한 치험례 1례. *大韓韓方內科*

- 學會誌 2007;28(4):911-8.
10. 황주원, 최효재, 백운선, 정승현, 신길조, 이원철. 陰結로 변증한 궤양성 대장염 환자의 平胃地榆湯加味方 치험 1례. *大韓韓方內科學會誌* 2007;28(4):972-77.
11. 김승욱, 임성우. 導赤地榆湯이 潰瘍性大腸炎 誘發 흰쥐에 미치는 影響. *大韓韓醫學會誌* 2002;23(3):200-10.
12. 최준혁, 임성우. 沙蔘麥門冬湯이 Indomethacin으로 誘發된 mouse의 大腸粘膜損傷에 미치는 影響. *大韓韓醫學會誌* 2002;23(4):169-85.
13. 최은영, 황태현, 안중환, 이성환, 임성우. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 대장점막 손상에 대한 赤小豆當歸散의 치료효과. *大韓韓方內科學會誌* 2005;26(2):341-52.
14. 안중환, 최은영, 이성환, 박인식, 임성우. 黃蓮解毒湯이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. *大韓韓醫學會誌* 2006;27(2):182-95.
15. 이성환, 최흥민, 임성우. Dextran sulfate sodium으로 유발된 생쥐의 대장염에 미치는 地榆湯의 효과. *大韓韓醫學會誌* 2007;28(1):187-97.
16. 송영근, 류봉하, 윤성우. 消炎整腸湯이 DSS로 誘發된 생쥐의 潰瘍性大腸炎에 미치는 影響. *大韓韓方內科學會誌* 2008;29(2):385-400.
17. 이주아, 공경환. DSS으로 유발된 생쥐의 대장점막손상에 대한 導滯湯의 효과. *大韓韓方內科學會誌* 2008;29(3):752-64.
18. 배광호, 공경환. 槐花散이 Dextran Sulfate Sodium으로 유도된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. *大韓韓方內科學會誌* 2010;31(3):513-25.
19. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울: 永林社; 2000, p. 306-8.
20. 김진성, 류봉하, 박동원, 류기원. 薏苡仁의 투여가 마우스의 細胞性 및 體液性 면역기능에 미치는 영향. *韓國傳統醫學誌* 1998;8(21):9-15.
21. 윤혜진, 이유진, 강미선, 백정환. 薏苡仁의 염증성 사이토카인 발현 및 조절에 관한 연구. *大韓*

- 韓方小兒科學會誌 2009;23(1):159-71.
22. Yu F, Gao J, Zeng Y, Liu CX. Inhibition of Coix seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity. *J Ethnopharmacol* 2008;119(2):252-8.
 23. Yu YL, Lu Y, Tang X, Cui FD. Formulation, preparation and evaluation of an intravenous emulsion containing Brucea javanica oil and Coix Seed oil for anti-tumor application. *Biol Pharm Bull* 2008;31(4):673-80.
 24. 박용기, 강병수. 薏苡仁과 苦蔘의 抗酸化作用에 관한 연구. 大韓本草學會誌 2000;15(2):57-67.
 25. 박진영, 양미자, 전혜승, 이진희, 배희경, 박태선. 현미 및 울무 함유 생식이 영양불균형이 유도된 흰쥐의 체내 지질농도, 항산화체계 및 면역기능에 미치는 영향. 韓國食品營養科學會誌 2003;32(2):197-206.
 26. Kim YM, Park SH, Yang SK. Clinical characteristics and long-term course of ulcerative colitis in Korea. *Intest Res* 2006;4(1):12-21.
 27. Fine KD, Schiller LR. AGA technical review on the evaluation and management of chronic diarrhea. *Gastroenterology* 1999;116:1464-86.
 28. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641-57.
 29. 강태희, 원진희. 潰瘍性大腸炎 치료의 한의학적 접근방식에 관한 연구. 韓方成人病學會誌 1999;5(1):137-62.
 30. 朱震亨. 丹溪心法附餘(方廣編註上卷). 서울: 大星文化社: 2004, p. 267-84.
 31. 이장훈 譯. 東醫臨床內科學I. 서울: 법민출판사: 1999, p. 329-30, 341-42, 347, 743-6.
 32. Woo JH, Li D, Wilsbach K, Orita H, Coulter J, Tully E, et al. Coix seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NFkappaB and protein kinase C signaling. *Cancer Biol Ther* 2007;6(12):2005-11.
 33. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-43.