

唐木香이 DSS(Dextran sulfate sodium)로 유발된 염증성 장질환 동물모델에 미치는 영향

김소연, 박재우*, 류봉하*

부산대학교 한의학전문대학원 한의과학과, *경희대학교 한의과대학 비계내과 교실

Effects of *Aucklandia Lappa* on Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis

So-yeon Kim, Jae-woo Park*, Bong-ha Ryu*

Dept. of Korean Medical Science, School of Korean Medicine, Pusan National University
*3rd Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : *Aucklandia Lappa* (ALE) is one of the herbs used frequently to treat abdominal pain and diarrhea and reported anti-inflammatory activity by suppressing proinflammatory cytokines. This study was designed to investigate whether ALE could show protective activities on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) models.

Methods : Colitis was induced by DSS in Balb/c mice. ALE 10, 30, 100 and 300 mg/kg were orally administered twice a day for 7 days in DSS model. Mice weight was measured daily. Scoring of clinical findings was measured every other day. Colon length, edema, fecal blood and histological damages were assessed at day 7 in DSS model. In histological analysis, we checked cryptal glands, surface epithelium, submucosa, transmural, stroma and scored degree of inflammatory cell damage by modified histological scoring. We also calculated cytokines concentrations including IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-10 and TGF- β 1 by Biometric Multiplex Cytokine Profiling method.

Results : ALE showed the protective effects on DSS-induced experimental colitis. ALE inhibited shortening of colon length and histological damages of colon does-dependently, but it did not inhibit weight loss. ALE also inhibited IFN- γ and IL-6 expression, and upregulated cytokines (IL-10, TGF- β 1) related to regulatory T cell differentiation and proliferation.

Conclusions : The current results demonstrate the clinical utility of ALE in traditional medicine and indicate the possibility of potent drug development of inflammatory bowel diseases from natural products. Further investigations for exact mechanisms will be needed.

Key words : *Aucklandia Lappa*, inflammatory bowel disease, dextran sulfate sodium, multiplex immunoassay

1. 서론

염증성 장질환은 크론병과 궤양성 대장염의 두

가지 형태로 분류되는데 이들은 만성적으로 호전 악화가 반복되거나 진행되는 염증이 위장관 전체와 장점막에 영향을 미치며 대장암 발병 위험율을 높이는 것을 특징으로 한다¹. 최근 국내에서도 발병률이 급격히 증가하고 있다는 보고가 있어 중요성이 높아지고 있으며, 그 중에서도 궤양성 대장염은 1980년대 이전까지는 국내에서 매우 드문 질환이었으나 20년 사이에 약 9배의 발병률 증가가 관

· 교신저자: 류봉하 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희대학교 한의과대학 한방병원 3(비계)내과
TEL: 02-958-9140
E-mail: rbongh@khu.ac.kr

· 이 논문은 2012년도 경희대학교 대학원 임상한의학 박사학위 논문임.

찰되어 2005년 말 연간 발병률이 10만 명 당 30.87 명에 이르렀다². 궤양성 대장염의 표준적인 약물 치료로 5-aminosalicylic acid(5-ASA) 제제, 스테로이드, 면역조절약물이 사용되고 있으나 환자의 20~40%는 통상적인 약물치료를 실패하거나 부작용으로 대장절제술을 받게 되어³, 최근에는 부작용이 적으면서도 대장염에 효과적인 후보 약제를 한약을 포함한 천연물질에서 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있다.

한의학에서 염증성 장질환은 만성적인 혈변과 복통, 설사가 주증상이라는 점에서 腸滯, 便血, 腸風, 腸毒, 腹痛, 積聚, 休息痢, 久痢, 久瀉 등의 범주에 해당한다고 볼 수 있다⁴. 국내에서 염증성 장질환에 대한 淸心蓮子湯⁵, 芍藥湯加味方⁶ 등 한약 처방의 치험례 및 DSS로 유발된 대장염 동물모델에 대한 地榆湯⁷, 黃連解毒湯⁸, 四味軟堅湯⁹, 消炎整腸湯¹⁰, 四君子湯¹¹, 補腸建脾湯¹² 등의 실험적 효과가 발표된 바 있으나 이에 대한 기전 연구가 뒷받침되지 못하여 치료제 개발로는 이어지지 못하고 있다.

당목향(*AucklandiaLappa*)은 脾胃의 氣滯를 通行시켜 복통, 설사에 주로 사용되는 약제로 기존에 장내 유해세균에 대한 항균작용¹³, 항산화 및 항암 활성화¹⁴, 대장암 세포 증식 억제¹⁵, 항염증 효과^{16,17}가 연구되어 왔으며, 이에 근거하여 만성 복통, 설사를 주된 증상으로 하는 염증성 장질환에 효과가 있을 것으로 생각되나 아직까지 실험적 대장염 동물 모델에서 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 당목향 물 추출물을 염증성 장질환 동물모델에 투여하여 효과를 확인하고 cytokine 분석을 통해 그 기전을 밝히고자 하였다. Cytokine의 분석은 최신 기법인 Biometric multiplex cytokine profiling을 적용하여 interferon(IFN)- γ , interleukin(IL)-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, transforming growth factor (TGF)- β 1, tumor necrosis factor(TNF)- α 를 분석하였다.

본 연구에서는 DSS유발 대장염 동물모델에 당

목향 물추출물을 투여하여 임상증상의 개선 및 면역학적으로 유의한 조절효과를 보여 이에 보고하는 바이다.

II. 재료와 방법

1. 약재 및 동물

1) 약재

본 실험에 사용된 약재인 당목향(*Aucklandia Radix*)은 경희한약에서 소분된 중국산을 경희의료원 부속한방병원 약제실에서 구입하여, 390 g을 100 °C에서 2시간 동안 물추출한 후 동결건조하여 사용하였다(수율=14.07%).

2) 동물

대한 바이오 링크(서울, 대한민국)에서 구입한 Balb/c mouse 수컷 8주령(22~24 g)을 실험실 환경(온도 20~22 °C, 습도 50±10%)에서 1주간 사료와 물을 충분히 공급하여 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험 과정은 국제 가이드라인인 'Principles of laboratory animals care'(NIH publication no. 85-23 revised 1985 and Kyung Hee University 2006)을 따라 진행하였다.

2. 방법

1) Dextran sodium sulfate 대장염 유발 및 군배정
대장염을 유발하기 위해 Dextran sulfate sodium (MW 36000-50000 kD, MP biomedical, Cat NO 16110, 이하 DSS)가 사용되었다. DSS는 포도당 분자에 따라 최고 3개의 황산기를 포함하는 헤파린과 비슷한 다당류로서, 구강 투여하면 흰쥐에서 급성, 만성 대장염이 유발된다¹⁸.

군배정은 정상군(n=5)과 대조군(n=11), 4개의 실험군(각 n=11)으로 하였다.

정상군(실험기간 동안 사료와 물만 준 군)을 제외한 대조군과 4개의 실험군에는 5% DSS 수용액을 1주일간 물대신 수시로 음용하도록 하였다.

실험 기간 동안 실험군에게는 feeding tube를 통

해 당목향 추출물(투여군에 따라 각각 10, 30, 100, 300 mg/kg) 수용액 0.1 ml을 오전 10시 및 오후 5시에 1일 2회 경구투여 하였으며, 정상군과 대조군에는 동일 용량의 증류수를 투여하였다. 실험 7일째 모든 동물들을 희생하여 대장을 적출하였다.

2) 대장 길이 측정

대장의 길이는 7일째 마우스를 희생한 후 대장을 적출하여, 충수돌기와 대장접합부부터 직장상부까지의 길이를 측정하였다.

3) 체중 측정

실험 기간 동안 매일 아침 9시에 모든 그룹에서 체중을 측정하였다.

4) 임상 지표 측정(clinical scoring)

임상 지표는 이전에 보고된 방법을 변형하여 실험 1, 3, 5, 7일에 측정하였다¹⁹. Mouse의 활동성, 외피 상태, 항문주위 청결도의 3가지 항목을 평가하여 점수화한 후, 최종 점수는 3가지 항목 점수를 합산하여 사용하였다(Table 1).

5) 대장 부종 및 대장내 혈변 정도 측정

대장 부종은 대장 길이 측정 직후 대변이 차있지 않은 대장 중앙부위의 직경(mm)을 측정하여 부종의 정도를 평가하였다. 대장내 혈변 정도는 마찬가지로 7일째 대장 적출 후 대장 내에 혈변 혹은 흑변으로 관찰되는 정도를 측정하였다(Table 2).

Table 1. Scoring of Clinical Findings.

Score	Spontaneous behavior and posture	Coat and piloerection	Cleaning of perianal region
0	moving [-] with hunching	yellowish [light brown] and piloerection [+++]	herniation with blood [+++]
1	moving [±] with hunching	dirty and yellowish [+++] and piloerection [++]	with stool [+++] and blood [++] trace
2	moving [+] with hunching	yellowish [++] with piloerection [+]	with stool [++] and blood [+] trace
3	moving [++] without hunching	clean and yellowish [+] without piloerection	with stool [+] trace
4	moving [+++] without hunching	normal state	normal state

Table 2. Scoring of Colon Edema and Fecal Blood.

Score	Scoring of Colon edema by colon thickness	Scoring of fecal blood
0	>0.35 mm (edema +++)	Fecal blood [+++] with tar stool [++]
1	0.30-0.35 mm (edema ++)	Fecal blood [++] with tar stool [++]
2	0.25-0.30 mm (edema +)	Fecal blood [+] with pasty and semiformal stool
3	0.20-0.25 mm (edema ±)	No bleeding with semiformal stool
4	0.1-0.2 mm (normal)	No bleeding with normal stool

6) 대장 점막의 조직학적 소견 관찰 및 histological scoring

대장 조직은 다음과 같이 준비되었다. 적출된 대장을 Swill Roll 기법으로 말아서 4% para-formaldehyde에 담가 48시간 고정시킨 후 PBS에 세척하였다.

Alcohol 탈수 및 paraffin 포매 후 paraffin section을 5 µm의 두께로 연속 절편한 다음 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였다.

조직에서 대장점막의 손상 정도는 Kitajima²⁰ 등의 방법을 수정한 modified histological scoring을

사용하여 평가하였으며, 염증 세포의 침윤정도 (infiltration)와 대장 점막조직의 궤양범위(ulceration)

로 나누어 평가한 후 최종 조직학적 손상 정도는 두 category의 총합으로 하였다(Table 3).

Table 3. Modified Histological Scoring.

		Scoring
Location		
Inflammatory cell infiltration	Surface epithelium	0-none
	Cryptal glands	1-mild
	Stroma	2-moderate
	Submucosa	3-severe
	Transmural	
Ulceration		
		0-no
		1-mild surface, focal
		2-mucosal
		3-submucosal
		4-transmural
Total Score		(Min 0-Max 19)

7) Biometric multiplex cytokine profiling

Multiplex는 Bioplex protein array system(Bio-Rad)을 이용한 면역분석법²¹으로 8개의 target cytokine (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β 1)을 정량하였다.

8가지 타겟 cytokine에 대한 monoclonal antibody 와 형광 라벨이 부착된 microsphere가 조직 샘플과 incubation되었으며, cytokine 양을 고민감도로 측정하기 위해 1.95-32.000 pg/mL 범위의 광대역 민감도를 가진 standards(Invitrogen, Carlsbad, CA)가 이용되었다. 부착된 분자들은 Bio-Plex array reader를 사용하여 측정되었으며, flow-based dual laser detector와 realtime digital signal processing과 함께 Luminex fluorescent-bead-based technology (Luminex, Austin, TX)를 사용하였다.

3. 통계

모든 데이터는 평균±표준오차(mean±standard error of the mean, SEM)로 표시하였으며, 통계 유의성 평가는 one-way ANOVA로 하였다. 사후분석

은 Dunnett's test로 하였으며, $p<0.05$ 를 통계적으로 유의성 있는 결과로 판정하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 4.0을 사용하였다.

III. 결 과

1. 대장 길이의 변화

실험 7일째 적출된 대장의 길이는 정상군(9.94±0.261 cm)에 비해 대조군(5.99±0.179 cm)이 약 60%로 단축되어 대장염이 잘 유발되었음을 확인할 수 있었다. 모든 농도의 당목향 투여군에서 대장 길이 감소가 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 전반적으로 농도 의존적 경향을 보여 당목향 300 mg/kg 투여군(6.85±0.22 cm)에서 17.5%의 단축 억제 효과를 확인할 수 있었다($p<0.01$)(Fig. 1).

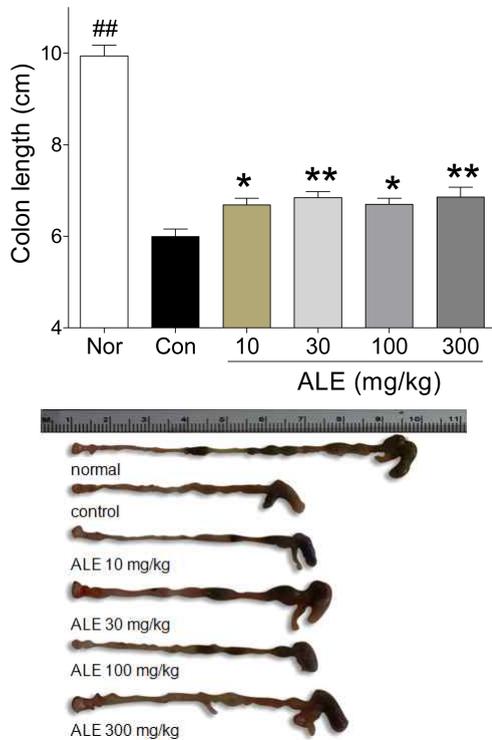


Fig. 1. Colon length and photographs of mice colon at 7 days on DSS-induced colitis.

* : statistically significant ($p < 0.05$).
 ** , ## : statistically significant ($p < 0.01$).
 Nor : Normal group without any treatment.
 Con : Control group provided with only 5% DSS treatment.
 ALE 10 mg/kg : ALE 10 mg/kg oral administration for 7 days.
 ALE 30 mg/kg : ALE 30 mg/kg oral administration for 7 days.
 ALE 100 mg/kg : ALE 100 mg/kg oral administration for 7 days.
 ALE 300 mg/kg : ALE 300 mg/kg oral administration for 7 days.
 ALE : *Aucklandia Lappa* Extracts.
 DSS : Dextran sodium sulfate.
 ALE was administrated 2 times a day (10 AM and 5 PM).

2. Mouse 체중의 변화

모든 mouse의 체중은 실험 직전 24~25 g이었고 정상군은 실험기간 동안 체중이 지속적으로 증가

하여 4일째 6%, 7일째 9%의 체중증가를 보였다. 대조군은 4일째까지 체중증가를 보였으나 증가율은 1.2%에 불과하였으며, 5일째부터 체중이 감소하기 시작하여 7일째 12%의 체중감소를 보였다.

당목향 투여군도 4일째까지 경미한 체중증가를 보이다가 5일째부터 체중이 감소하기 시작하였으며, 7일째 체중감소율은 당목향 10 mg/kg 투여군 9%, 30 mg/kg 투여군 10%, 100 mg/kg 투여군 7%, 300 mg/kg 투여군 7%로 나타나 대조군에 비해 체중감소가 억제되는 경향은 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

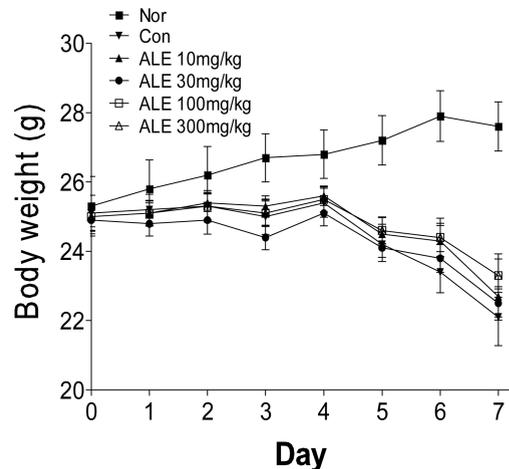


Fig. 2. Changes of mice weight on DSS-induced colitis.

3. 임상 지표 경과 관찰

임상 지표는 정상군의 경우 지속적으로 건강한 상태를 보였으며, 대조군에서는 시간이 경과함에 따라 점수가 낮아져 대장염이 잘 유발되고 있음을 확인할 수 있었고 1일째 7.5%, 7일째 28%의 악화를 보였다. 당목향 투여군에서도 마찬가지로 시간이 경과함에 따라 임상 지표 점수가 낮아졌으나, 대조군과 비교했을 때 당목향 10 mg/kg 투여군에서 1일째 55%, 300 mg/kg 투여군에서 7일째 24%로 상대적으로 유의한 임상지표 호전율을 보였다

($p < 0.05$) (Fig. 3).

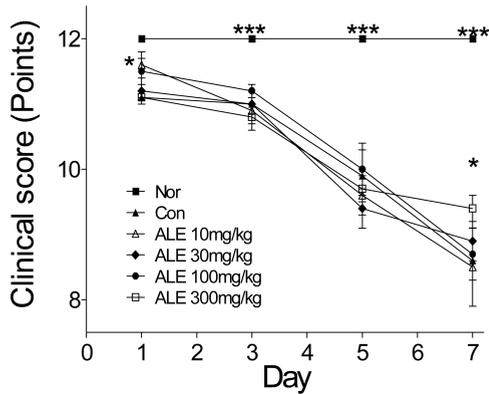


Fig. 3. Clinical scores by assessment of anal cleaning, piloerection and behavioral changes.

4. 대장 부종 및 대장내 혈변 정도

7일째 대장적출 후 측정된 대장 부종 정도는 대조군에 비해 당목향 투여군은 농도의존적으로 유의한 부종의 감소가 보였다($p < 0.01$) (Fig. 4).

대장내 혈변의 경우 당목향 30 및 300 mg/kg 투여군에서만 대조군에 비해 유의하게 낮은 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 5).

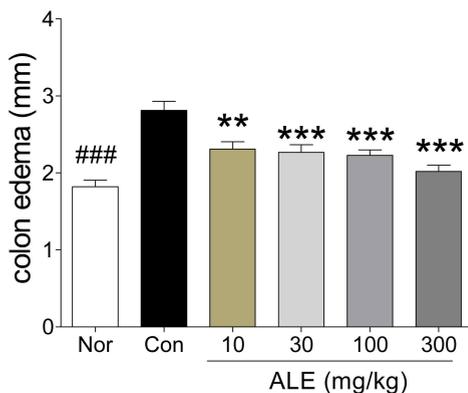


Fig. 4. Colon edema at day 7.

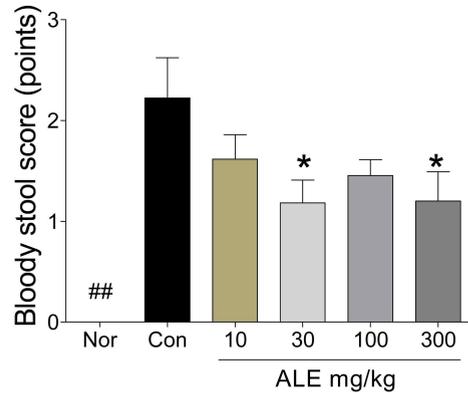


Fig. 5. Bloody stool scores in colon at day 7.

5. 대장 점막의 조직학적 소견 및 histological scoring

정상군에서는 surface epithelium, mucosal layer, submucosa, cryptal gland가 정상적인 형태를 유지하고 있었으나, 대조군에서는 조직의 심각한 손상이 관찰되어 cryptal gland의 감소 및 surface epithelium 손상이 관찰되었고 대장점막에 전반적으로 염증세포가 침윤되어 있었다. 당목향 300 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교했을 때 일부 손상되지 않은 cryptal gland와 정상 surface epithelium의 구조물이 관찰되고 염증세포 침윤도 심하지 않아 대장점막조직이 보호되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

조직의 손상 정도를 modified histologic scoring에 따라 평가한 결과 대장점막 조직 손상이 대조군(3.32 ± 0.60 points)에 비해 농도의존적인 경향으로 당목향의 투여로 감소되었고, 특히 당목향 300 mg/kg 투여군(4.8 ± 0.29 points)에서 통계적으로 유의한 32.1%의 점막손상 보호 효과를 확인할 수 있었다($p < 0.05$) (Fig. 6).

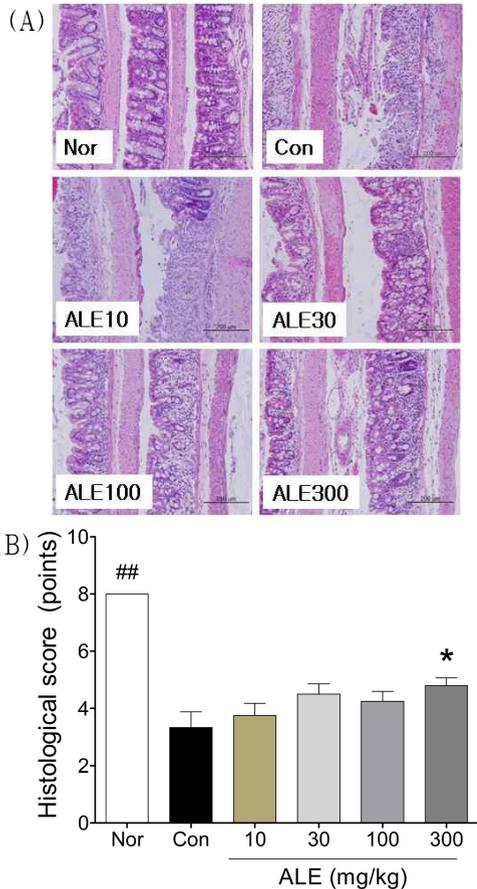


Fig. 6. Representative Histological Photos(A) and Scores(B) of Mice Colon.

H & E Staining($\times 100$).

6. Biometric multiplex cytokine profiling

7일째 적출된 대장점막조직에서 Multiplex를 이용하여 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β 1의 농도를 측정하였다(Fig. 7).

1) IFN- γ 의 측정

IFN- γ 농도가 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 상승되어 있어 대장 염증 상태를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 모든 농도의 당목향 투여군에서 IFN- γ 농도가 유의하게 낮아 염증 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 특히 당목향 30 mg/kg 투여군에서 가장 높은 효과가 나타났다($p < 0.01$)

2) TNF- α 의 측정

TNF- α 농도가 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 당목향 투여군이 대조군보다 낮은 농도를 보이기는 했으나 모두 유의성은 없었다.

3) IL-6의 측정

IL-6 농도는 정상군에 비해 대조군이 유의하게 높았다($p < 0.01$). 모든 당목향 투여군에서 대조군에 비해 낮은 농도를 보였지만, 당목향 300 mg/kg 투여군에서만 유의성 있는 감소를 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

4) IL-1 β 의 측정

IL-1 β 농도는 정상군보다 대조군이 높았으나 유의성은 없었으며, 당목향 투여군이 대조군보다 낮은 농도를 보이기는 했지만 모두 유의성은 없었다.

5) IL-17의 측정

IL-17은 정상군에 비해 대조군에서 농도가 증가되어 있었으나 유의성은 없었으며, 당목향 투여군에서 농도의존적인 감소경향이 있었으나 유의성은 없었다.

6) IL-23의 측정

IL-23 농도가 정상군에 비해 대조군에서 증가되어 있었으나 유의성은 없었으며, 당목향 투여군에서 오히려 IL-23 농도가 증가하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다.

7) IL-10의 측정

IL-10의 농도가 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 낮아 항염증 기능이 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$). 반면에 모든 당목향 투여군에서는 대조군에 비해 높은 농도를 보였으며, 당목향 300 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 상승을 확인할 수 있었다($p < 0.05$).

8) TGF- β 1의 측정

TGF- β 1은 정상군에 비해서 대조군에서 농도가 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 당목향 투여군의 경우 가장 낮은 농도인 당목향 10 mg/kg 투여군을 제외하고 모두 유의성 있는 상승을 보였다($p < 0.05$).

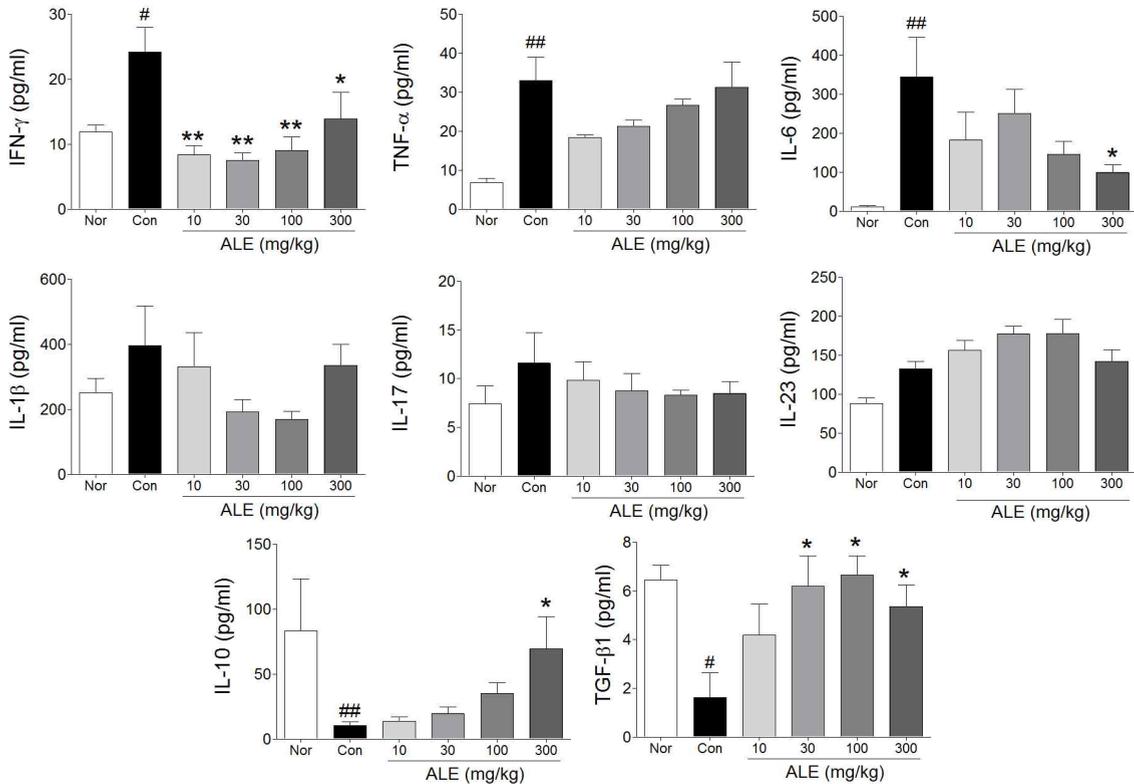


Fig. 7. Quantification of cytokines on mice colon tissue.

IV. 고찰

본 연구는 먼저 DSS를 이용한 염증성 장질환 동물모델에서 당목향의 염증억제 및 치료효과를 확인하기 위해 대장 길이, 체중, 임상 지표, 대장 부종 및 대장내 혈변 정도를 관찰하였으며, 그 결과 체중을 제외한 나머지 항목에서 유의한 염증 억제 및 증상 개선 효과를 확인할 수 있었다. 대장 조직을 살펴본 결과에서도 당목향 투여군의 조직 손상 정도가 경미하여 유의한 염증 억제 효과를 확인할 수 있었다.

당목향은 *Aucklandia lappa Dence*의 뿌리로 性은 溫하고 味는 辛苦하며 行氣止痛, 溫中和胃 효능이 있어 腹痛, 泄瀉, 下痢裡急後重을 치료하는데 주로 사용되며²². 성분으로 정유가 0.3~3%를 차지하고

aplotaxene, costene, lactone 등이 함유되어 있다²³.

염증성 장질환의 주요 증상은 복통, 설사, 혈변이며 전신 증상으로 피로, 체중감소, 영양결핍, 발열 등을 동반할 수 있고, mouse에 5% DSS를 경구 섭취시키면 대장염으로 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 등이 발생하여 사람과 유사한 증상을 나타낸다²⁴. 따라서 대장길이 및 체중, 임상 증상 등이 대장 보호효과 판정을 위한 주요 지표로 사용되고 있으며, 본 연구에서도 이를 관찰하였다.

실험 결과 대조군의 대장 길이가 정상군의 약 60%로 단축되어 대장염이 잘 유발되었음을 확인할 수 있었으며, 당목향 투여가 농도 의존적으로 대장 길이 단축을 억제하여 300 mg/kg 투여시 가장 큰 억제 효과를 보였다(Fig. 1). 300 mg/kg은 50 kg 성인 기준으로 환산시 15 g/day에 해당하며

당목향이 한약 처방에 1첨당 2~4 g 들어가는 것을 고려했을 때 약 2배 정도의 용량으로 임상적인 활용이 충분히 가능할 것으로 보인다.

체중의 경우 당목향이 유의한 효과를 보이지 못했으나 체중 감소 억제 효과가 없음에도 유효한 염증 억제 효과를 보인 유사한 연구가 보고된 바 있고, 이는 mouse strain이나 DSS 농도에 따라 유발된 염증 정도가 달라 결과에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있다¹²(Fig. 2).

임상지표로 평가된 mouse의 활동성, 외피 상태, 항문주위 청결도는 Johswich 등¹⁹에 의해 사용된 방법으로 환자에서 염증성 장질환에 의해 나타나는 증상을 반영한다고 볼 수 있다. 실험기간 동안 2일마다 측정된 결과 대조군에서 시간이 지남에 따라 지표가 악화되어 대장염이 진행되는 것을 확인할 수 있었으며, 당목향 300 mg/kg 투여군에서 임상 지표 악화가 유의하게 억제되었다(Fig. 3). 이는 당목향이 염증성 장질환에서 나타나는 증상을 개선시킬 수 있다는 것을 의미한다.

본 연구에서는 대장염 동물모델 평가 지표로 흔히 사용되는 대장 길이 외에도 대장 부종과 대장 내 혈변 정도를 살펴보았는데, 이는 염증으로 대장 단축과 함께 흔히 부종과 출혈로 인한 혈변이 동반되므로 이를 반영하기 위해 Hyun 등²⁵의 방법을 참고하여 적용한 것이다. 그 결과 당목향 투여로 대장 길이 단축과 대장 부종이 농도 의존적으로 유의하게 억제되었으며(Fig. 4), 대장내 혈변의 경우 당목향 30 mg/kg 투여군과 300 mg/kg 투여군에서만 유의한 억제 효과를 나타냈다(Fig. 5). 따라서 당목향이 염증으로 인한 대장손상을 방지하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

DSS로 유발된 장염의 대장조직은 심각한 구조의 파괴, 광범위한 감염세포 침윤, 궤양 및 근육비대 등을 특징으로 하는 조직학적 소견을 나타내는 것으로 알려져 있으며²⁶, 본 실험에서도 대조군에서 전반적으로 조직이 심각하게 손상되어 있었다. 반면에, 당목향 300 mg/kg 투여군의 경우 대조군과

비교했을 때 일부 손상되지 않은 cryptal gland와 surface epithelium의 구조물이 관찰되고 염증세포 침윤도 심하지 않아 대장 점막 보호 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 조직학적 관찰 소견을 정량화하기 위해 Kitajima 등²⁰의 방법을 수정한 Modified histological scoring 을 사용하여 평가한 결과에서도 당목향 300 mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의한 점막손상 보호 효과를 확인할 수 있었다.

따라서 체중을 제외하고는 전반적으로 당목향 투여가 300 mg/kg 농도에서 가장 좋은 염증 억제 효과를 나타냈으며, 이러한 효과에 대한 기전을 밝히기 위해 cytokine 분석을 시행하였다. 특히 최근에 염증성 장질환의 면역학적인 기전을 밝히기 위한 연구가 진행되고 있으며, 이를 통해 치료 효과를 보이는 생물학 제제들이 개발되고 있다. 그러나 일부 제제들은 효과가 없거나 오히려 염증을 악화시키는 것으로 밝혀지면서²⁷, 단일 기전의 차단보다 면역 불균형 상태를 조절할 수 있는 치료제 개발이 요구되고 있다. 이런 점에서 특히 한약과 같은 천연물이 주목받고 있으며, 면역학적 기전을 밝힌 염증성 장질환 모델에 대한 실험결과로 대장의 증상 개선효과 및 macrophage의 역할²⁸, 항기의 cytokine 조절을 통한 장염 보호 효과²⁹, 방기의 NF- κ B 억제를 통한 효과³⁰, 황금의 면역조절 효과³¹ 등이 보고된 바 있다. 당목향은 염증성 장질환과 관련된 기존 연구가 없으나, 항염 작용 및 macrophage cell에서 cytokine 작용을 통한 염증억제 효과가 확인된 바 있어 면역학적인 기전을 통한 대장염 치료 효과가 기대되었다^{16,17}. 또한 기존 연구의 경우 적은 수의 일부 cytokine만을 측정된 경우가 많았으나 복잡한 cytokine 네트워크의 영향과 다양한 요소의 상호작용을 연구하기 위해서는 여러 cytokine들의 동시 측정이 필요하므로 본 실험에서는 이를 위해 최신 기법인 Biometric multiplex cytokine profiling 을 적용하였다²¹.

일반적으로 DSS는 상피세포에 직접적인 독성 효과를 나타내고 macrophage와 T cell의 활성화를

통해, Th1과 Th2 cytokine과 다른 염증 매개체들을 모두 증가시켜 심한 장염을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁸. 실험 결과 proinflammatory cytokine에 해당하는 IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β 중 IL-1 β 를 제외하고는 모두 정상군에 비해 대조군에서 농도가 유의하게 높아 기존 보고와 마찬가지로 DSS로 유발된 대장염 동물모델에서 염증 매개체들이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

IFN- γ 는 Th1 cell에 의해 주로 분비되어 항원제시세포 발현을 증가시키고, macrophage cell을 활성화시키는 것으로 알려져 있다³². 본 연구 결과 당목향 투여군에서 IFN- γ 농도가 유의하게 낮아, Th1과 관련된 면역 억제 기전과의 연관성을 고려해봐야 한다. 그러나 진술하였듯이 임상지표와 대장 및 조직 상태에서 당목향 300 mg/kg 투여군이 가장 좋은 염증 억제 효과를 보인 것과 달리 IFN- γ 는 오히려 당목향 30 mg/kg 투여군에서 생성 억제 효과가 가장 좋았다. 대장 내 혈변의 경우에도 30, 300 mg/kg 투여군에서만 유의한 억제 효과를 나타내어 30 mg/kg에서의 혈변 및 IFN- γ 에 대한 억제 효과는 300 mg/kg에서의 직접적인 점막보호효과와는 다른 기전으로 나타난 것으로 보인다. 기존에 수행된 당목향의 세포 실험을 통한 염증 억제의 경우 모두 농도 의존적인 효과를 보였다^{16,17}. 따라서 본 연구가 동물 실험임을 고려했을 때 저농도에서의 효과는 당목향의 장관운동 축진이 미친 영향일 수 있으며 이를 확인하기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 보인다. 당목향의 물추출물은 흰쥐의 적출 소장을 경미하게 흥분시키나 대용량 투여시 장관운동이 완전히 억제되어 농도에 따라 다른 효과를 보이는 것으로 알려져 있다²³.

IL-6는 면역조절, 염증, 조혈작용에 중심적인 역할을 하는 cytokine으로 Th2 cell에 의해 분비되거나 Th1, Th17 관련 반응과도 관계되어 있는 것으로 알려져 있다³³. IL-6의 경우 당목향 300 mg/kg 투여군에서 유의한 억제를 확인할 수 있었는데, 기존 실험에서도 목향이 macrophage cell에서 IL-6 생성

억제 효과¹⁶를 보였으며 주요 성분인 costunolide, dehydrocostus lactone의 IL-6 및 signal transducer and activator of transcription 3(SATA3) 억제 효과에 대한 기전이 밝혀진 바 있다³⁴.

그러나 TNF- α 와 IL-1 β 의 경우 당목향이 유의하게 억제하지 못했으며 상기 결과를 종합해봤을 때 당목향의 대장 보호효과가 IFN- γ , TNF- α , IL-1 β 및 이와 관련된 Th1 pathway를 통해 나타났을 가능성은 적은 것으로 생각된다.

염증성 장질환에서 Th1이외에 추가적으로 Th17 세포와 관계된 염증기전이 존재하기 때문에 Th1과 Th17을 동시에 억제할 수 있는 치료제가 요구되고 있어²⁷. 본 실험에서도 Th17과의 연관성을 살펴보기 위해 관련된 cytokine인 IL-17과 IL-23을 살펴보았으나 정상군에 비해 대조군과 당목향 투여군 모두 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 따라서 Th17 pathway는 DSS 유발 장염의 발생 및 당목향의 대장 보호 기전과의 연관성이 낮은 것으로 보인다.

또한 최근 Treg이 염증성 장질환의 중요한 발병 기전으로 생각되고 있는데, 많은 실험적 장염 모델이 Treg의 결핍으로 발생했고 질환 유발 후에 Treg을 주입하자 발생한 장염을 치료하는 효과가 있었기 때문이다³⁵. 장의 염증을 조절하는 Treg의 능력은 IL-10과 TGF- β 의 존재에 의존적이고, IL-10을 생산하는 1형 조절 T세포(Tr1) 또한 장에서 면역을 조절하는 중요한 역할을 담당하며 억제효과를 내기 위해서는 IL-10과 TGF- β 의 생성이 요구된다³⁵.

특히 TGF- β 는 면역 homeostasis와 염증반응의 주요 조절자로 알려진 억제 cytokine인데, 감소된 TGF- β 활동이 염증성 장질환을 포함하는 여러 자가면역질환 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다³⁶. IL-10은 항원제시세포 활성화와 Th1, Th2 세포 반응을 억제하고 Treg의 분화를 촉진하는 역할을 하며, IL-1a, IL-6, TNF- α 의 생산을 억제함으로써 급성 염증 반응을 하향조절한다³³. IL-10이 결핍된 mouse는 박테리아에 의해 장염이 쉽게

유발되고 일부 심한 염증성 장질환 환자에서 IL-10R 유전자 germ-line mutation이 보고되어, IL-10 활성 결핍이 염증성 장질환과 관련된 병리학적 반응을 유지하는데 중요한 역할을 할 것으로 보인다²⁷. 본 연구에서도 IL-10과 TGF- β 1 농도가 모두 정상군에 비해서 실험군에서 유의하게 낮게 나타났으며, 이는 DSS 유발 장염에서도 이들이 주요 병리기전으로 작용할 수 있음을 의미한다.

IL-10은 당목향 300 mg/kg 투여군에서 농도가 유의성있게 높았고, TGF- β 1의 경우 가장 낮은 농도인 10 mg/kg 투여군을 제외하고 모두 유의성 있는 상승을 보였다. 따라서 당목향이 IL-10과 TGF- β 1 농도 상승을 통해 Treg의 면역억제 기능을 활성화시킴으로써 염증억제 효과를 보인 것으로 생각된다.

본 연구의 한계점으로는 DSS 동물모델을 사용한 결과로 실제 인간의 궤양성 대장염에 미치는 영향으로 확대 해석할 수 없고, 병리 기전에 있어서도 Th2나 B cell과 관련되어 작용할 가능성이 있으나 이에 대한 확인이 이루어지지 못한 점을 들 수 있다.

결론적으로 본 연구에서 당목향 추출물 300 mg/kg 투여가 DSS 대장염 동물모델에서 유의한 대장염 억제 효과를 보였으며, IL-6, IL-10, TGF- β 1의 경우에도 300 mg/kg에서 가장 높은 항염증 및 면역 조절 효과를 보였다. 따라서 항염증 효과를 나타낸 주요 기전은 Treg에 의한 면역 조절 작용으로 생각되며, 이에 대한 확인을 위해서는 면역세포 분획을 살펴보는 등의 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

당목향의 염증성 장질환에 대한 효능을 연구하기 위하여 DSS를 이용한 대장염 동물모델에서 당목향 물추출물을 10, 30, 100, 300 mg/kg의 용량으로 투여하여 체중, 임상지표, 대장 길이, 대장 부종,

대장 내 혈변을 측정하고, 대장 점막에 대한 조직학적 소견을 관찰하였으며, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-10, TGF- β 1 농도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. mouse의 대장 길이 변화로 DSS 유발 대장염 모델에서 대장 길이가 단축되고, 모든 당목향 투여군에서 농도의존적으로 유의한 단축 억제 효과를 확인할 수 있었다.
2. mouse의 체중은 DSS 유발 대장염 모델에서 감소했으며, 당목향 투여가 체중 감소를 유의하게 억제하지 못했다.
3. 활동성, 외피 상태, 항문주위 청결도로 평가된 임상지표의 악화를 통해 DSS 유발 대장염 모델에서 질병의 진행을 확인할 수 있었고, 1일째 당목향 10 mg/kg 투여군과 7일째 300 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 임상지표가 유의하게 개선되었다.
4. 대장두께를 통해 DSS 유발 대장염에서 대장 부종을 평가하였으며 모든 당목향 투여군에서 농도의존적으로 유의한 부종 억제 효과가 있었고, 대장내 혈변은 30 mg/kg, 300 mg/kg에서만 유의한 억제 효과를 보였다.
5. 당목향 300 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 점막 구조 손상 및 염증세포 침윤이 경미하였으며, modified histological score에 의한 평가에서도 300 mg/kg 투여군이 유의한 조직 손상 억제 효과를 보였다.
6. Biometric multiplex cytokine profiling을 실시한 결과 당목향 투여에 대하여 IFN- γ , IL-6는 통계적으로 유의한 발현 억제, IL-10, TGF- β 1에서는 유의한 발현 상승이 관찰되었으나 TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-23에서는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

이상과 같은 결과로 볼 때, 당목향은 염증매개물질 생성의 감소 및 대장 점막 조직손상의 억제를

통하여 대장염을 완화시키는 것이 실험적으로 입증되었으며, 본 실험을 바탕으로 염증성 장질환의 급성기에 응용할 수 있는 치료후보 한약이 될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010학년도 부산대학교 교내학술연구비(신임교수연구정착금)에 의한 연구임

참고문헌

1. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory Bowel Disease. *Annu Rev Immunol* 2010;28:573-621.
2. 양동훈, 양석균. 한국인에서 궤양성 대장염은 증가하는가? *대한내과학회지* 2009;76(6):637-24.
3. 진윤태, 김주형. 궤양성 대장염의 최신치료. *대한내과학회지* 2009;76(6):654-60.
4. 비계내과학교실 전. *비계내과학*. 서울: 군자출판사; 2008, p. 374-5.
5. 손덕칭, 장혜진, 선중기. 청심연자탕으로 치료하여 호전된 강직성 척추염을 동반한 중증 궤양성 대장염 1례. *대한한방내과학회지* 2005;26(3):685-91.
6. 서철훈, 이형호, 최기숙, 임동석, 유형천, 이영수, 등. 습열리로 변증한 궤양성 대장염 환자의 약탕가미방 치험2례. *대한한방내과학회지* 2006;27(4):984-90.
7. 이성환, 최흥민, 임성우. Dextran Sulfate Sodium 으로 유발된 생쥐의 대장염에 미치는 지유탕의 효과. *대한한의학회지* 2007;28(1):187-97.
8. 안중환, 최은영, 이성환, 박인식, 임성우. 황련해독탕이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. *대한한의학회지* 2006;27(2):182-95.
9. 김소연, 류봉하, 박재우. 궤양성 대장염 동물모델에서 사미연건탕(四味軟堅湯)의 항염증 및 장내 세균 효소활성 억제효과. *대한한의학회지* 2008;29(3):50-62.
10. 송영근, 류봉하, 윤성우. 消炎整腸湯이 DSS로誘發된 생쥐의 궤양성 대장염에 미치는 影響. *대한한방내과학회지* 2008;29(2):385-400.
11. 홍상선, 류봉하, 윤성우, 김진성. 四君子湯이 TNBS로誘發된 생쥐의 炎症性腸疾患에 미치는 影響. *대한한방내과학회지* 2010;31(4):731-51.
12. Ryu B, Ro W, Park JW, Bu Y, Lee BJ, Lim S, et al. Bojanggungbi-tang, a traditional Korean herbal prescription, ameliorates colonic inflammation induced by dextran sulfate sodium and 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid in mice. *J Ethnopharmacol* 2011;135:582-5.
13. 이갑상, 김성호, 김선숙, 박성수, 전주연, 신용서. 장내질환의 치료와 관련된 한약재의 장내 유해세균에 대한 항균 활성. *한국식품영양학회지* 1998;11(1):31-5.
14. 송진욱, 민경진, 차춘근. 목향 추출물의 항산화 및 항암활성. *한국환경보건학회지* 2008;34(1):55-61.
15. 김은지, 박희숙, 임순성, 김정상, 신현경, 윤정환. 목향 헥산추출물이 대장암세포인 HT-29세포의 증식에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 2008;40(2):207-14.
16. 최우연, 조미정, 김상찬, 정지윤. RQW 264.7 cell에서 목향의 염증성 매개물질 억제효과. *제한동의학술원논문집* 2009;7(1):1-12.
17. 이민석, 류도근, 권강범. 설치류 대식세포에서 목향 추출물의 항염증 효과. *동의생리병리학회지* 2011;25(2):275-9.
18. Kriebelstein CF, Cerwinka WH, Sprague AG, Laroux FS, Grisham MB, Kotliansky VE, et al. Collagen-binding integrin alphabeta1 regulates intestinal inflammation in experimental colitis. *J Clin Invest* 2002;110(12):1773-82.
19. Johswich K, Martin M, Bleich A, Kracht M,

- Dittrich-Breiholz O, Gessner J, et al. Role of the C5a receptor(C5aR) in acute and chronic dextran sulfate-induced models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:1812-23.
20. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium(DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci* 1999;61:67-70.
21. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Tian-E-Chen, Conklin LS, et al. Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-induced Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15(3):341-52.
22. 본초학교수 전. 본초학. 서울: 도서출판 행림사; 1991, p. 353-4.
23. 김호철. 한약리학. 서울: 집문당; 2001, p. 273-5.
24. 정현채. 염증성 장질환의 실험 동물모델. 대한 소화기학회지 2001;27:69-75.
25. Hyun E, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Vergnolle N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* 2008;57:1222-9.
26. Kitajima S, Takoma S, Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Animal* 2000;49:9-15.
27. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Emerging immunological targets in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Pharmacology* 2011; 11:1-6.
28. Liu L, Guo Z, Lv Z, Sun Y, Cao W, Zhang R, et al. The beneficial effect of Rheum tanguticum polysaccharide on protecting against diarrhea, colonic inflammation and ulceration in rats with TNBS-induced colitis: The role of macrophage mannose receptor in inflammation and immune response. *Int Immunopharmacol* 2008;8:1481-92.
29. Ko JK-S, Chik CW-S. The protective action of radix Astragalus membranaceus against hapten-induced colitis through modulation of cytokines. *Cytokine* 2009;47:85-90.
30. Zhang DK, Cheng LN, Huang XL, Shi W, Xiang JY, Gan HT. Tetrandrine ameliorates dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice through inhibition of nuclear factor - κ B activation. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:5-12.
31. 이순희, 임병우, 조여원. DSS로 유도된 염증성 장 질환 동물모델에서 황금 열수 추출물이 면역 조절 기능에 미치는 영향. 한국영양학회지 2004;37(6):431-9.
32. Bouguen G, Chevaux J-B, Peyrin-Biroulet L. Recent advances in cytokines : Therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17(5):547-56.
33. Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel disease. *Biologics* 2009;3:77-97.
34. Butturini E, Cavalieri E, de Prati AC, Darra E, Rigo A, Shoji K, et al. Two naturally occurring terpenes, dehydrocostuslactone and costunolide, decrease intracellular GSH content and inhibit STAT3 activation. *PLoS One* 2011;6(5):e20174.
35. Hardenberg G, Steiner TS, Levings MK. Environmental influences on T regulatory cells in inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 2011;23:130-8.
36. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(27):4280-8.