

Original Article

## 해대(海帶) 추출물이 Dextran Sulfate Sodium로 유발된 대장염 동물모델에 미치는 치료 및 예방적 효과

전우현<sup>1</sup>, 고석재<sup>2</sup>, 류봉하<sup>1,2</sup>, 박재우<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 대학원 임상한의학과, <sup>2</sup>경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

### Therapeutic and Prophylactic Effects of *Zostera Marina* on Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis

Woo-Hyeon Jeon<sup>1</sup>, Seok-Jae Ko<sup>2</sup>, Bongha Ryu<sup>1,2</sup>, Jae-Woo Park<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

<sup>2</sup>Department of Gastroenterology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

**Objectives:** Inflammatory bowel disease (IBD) is chronic inflammatory disorders of the intestines. Due to limitation of conventional treatment including steroids, herbal medicines have emerged as possible therapeutic options for IBD. The purpose of the current study was to investigate the therapeutic and prophylactic effects and mechanisms of *Zostera Marina* water extract (ZME) on DSS-induced colitis.

**Methods:** Colitis was induced by DSS in Balb/c mice. In pre-treatment setting, ZME was administered 7 days before DSS treatment and in co-treatment setting, ZME was simultaneously administrated with DSS treatment. In both settings, ZME 100, 300 and 1000 mg/kg were orally administered twice a day, respectively. Mice weight and clinical findings were measured daily. Colon length, macroscopic findings and histological damages of colon mucosa were assessed at the end of experiments. The levels of cytokines including TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and IL-17 were measured by Biometric Multiplex Cytokine Profiling method.

**Results:** In a dose dependent manner, ZME significantly inhibited the colon shortening, and improved macroscopic score and histological score. However, there were insignificant changes on inhibition of weight loss and improvement of clinical score. There were no significant differences of effects between co-treatment and pre-treatment settings. ZME 300 and 1000 mg/kg groups significantly inhibited IFN- $\gamma$ . Only ZME 1000 mg/kg group significantly inhibited TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6.

**Conclusions:** The current results show the possibility of therapeutic use and its prophylactic application of ZME on inflammatory bowel diseases. Future studies for targeted mechanisms of ZME are needed.

**Key Words** : *Zostera Marina*, *Inflammatory bowel disease*, *Dextran sulfate sodium*, *Colitis*, *Cytokine*

### 서론

염증성 장질환(Inflammatory bowel disease)은 장에 만성적인 염증이 발생하여 관해와 재발을 반복하

는 질환으로, 크게 궤양성 대장염(Ulcerative colitis)과 크론병(Chron's disease)으로 나뉘어진다<sup>1</sup>. 궤양성 대장염은 혈변, 설사, 복통이 주 증상이고, 발병 부위가 대장에 국한되는 경향을 가지는 것에 비해,

• Received : 15 July 2016      • Revised : 6 September 2016      • Accepted : 6 September 2016

• 본 논문은 2013년도 경희대학교 대학원 박사학위논문임.

• Correspondence to : 박재우(Jae-Woo Park)

서울시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

Tel : +82-2-440-6219, Fax : +82-2-440-7143, E-mail : pjw2907@khu.ac.kr

크론병은 주 증상이 복통, 설사, 체중감소이며 발병 부위가 소장을 포함한 장의 모든 부위에 걸쳐 나타나는 특징을 보인다<sup>2,3</sup>.

염증성 장질환의 원인과 병태생리는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않으며, 장내 미생물에 대한, 선천적인 혹은 후천적인 면역반응의 조절곤란이 중요한 원인으로 제시되고 있다<sup>4,5</sup>. 염증성 장질환은 이전까지 주로 서구에서 흔한 질환이었으나 최근에는 우리나라를 비롯한 아시아 태평양지역에서도 발병률이 빠르게 증가하고 있고 염증성 장질환의 치료에 대한 관심이 점차 높아지고 있다<sup>1,6</sup>.

서양의학에서는 스테로이드 등 염증 및 면역 반응을 조절하는 치료법을 위주로 치료하고 있으나 그 발병 원인이 명확하지 않기 때문에 대증치료를 위주로 하고 있으며, 이러한 치료제제를 장기간 투여시 사용 알레르기, 소화 장애 등의 부작용과 림프종과 같은 발암 가능성이 문제시 되고 있는 현실이다<sup>2,7,8</sup>. 따라서 최근들어 한약재를 포함한 천연물의 염증성 장질환 치료 효능에 대한 관심이 많아지고 있다<sup>9</sup>.

최근 한의학에서도 염증성 장질환에 대한 새로운 치료제제 개발을 위한 연구가 많이 진행되고 있는데, 四味軟堅湯<sup>10</sup>, 補腸健脾湯<sup>11</sup>, 桂枝加芍藥湯<sup>9</sup>, 消炎整腸湯<sup>12</sup>, 四君子湯<sup>13</sup> 등의 복합처방과, 海藻<sup>14</sup>, 黃芩<sup>15</sup> 등, 단일 약재의 염증성 장질환에 미치는 효능에 대한 연구가 대장염 유발 동물모델을 이용하여 진행이 되어왔다.

본 연구에서는 김<sup>10</sup> 등에 의해 염증성 장질환에 대한 효능이 밝혀진 四味軟堅湯의 구성 약물 중, 이미<sup>14</sup> 등에 의해 그 효과가 입증된 海藻 외에, 항산화, 항바이러스 및 항균 효과와<sup>16-20</sup>, 위 보호 효과가 있는 것으로 알려진<sup>21</sup> 海帶(*Zostera Marina*)의 염증성 장질환에 대한 효능을 밝히고자, DSS로 대장염이 유발된 생쥐에게 海帶를 예방적 목적과 치료적 목적으로 투여한 후, 생쥐 체중의 변화, 장 길이의 변화, clinical score 변화, macroscopic score 변화, 조직학적 변화, 대장점막의 cytokine 변화를 관찰하여, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험 재료 및 방법

### 1. 시료 및 실험동물

#### 1) 시료 준비

실험에 사용된 海帶 (*Zostera Marina*, ZME)는 경희대학교 한방병원 약제실에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 검액의 조제

ZME 480.0g을 증류수 2L와 함께 플라스크에 넣고 100℃에서 90분간 1회 가열, 여과 후에 rotary vaccum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결 건조하여 사용하였다(수율 = 26.96%).

#### 3) 실험동물

실험동물은 대한 바이오링크사(Seoul, Korea)의 Balb/c계 평균체중 22±2g의 7주령 수컷 생쥐이며 20~22℃, 50±10%의 습도조건에서 1주일 실험실 환경에 적응시킨 후 본 연구에 사용되었다. 적응 및 실험기간동안 물과 사료(Samyang, Korea)는 충분히 공급하였다.

본 실험은 국제가이드라인 ‘Principles of Laboratory Animals Care’ (NIH publication no. 85-23 revised 1985 and Kyung Hee University 2006)을 따라 진행하였으며, Kyung Hee University Institutional Animal Care and Use Committee[KHUASP(SE)-09-036]의 규정을 따라 진행하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) Dextran Sulfate Sodium (DSS)에 의한 대장염 유발

Lee<sup>22</sup> 등이 제시한대로 정상군 외에 대조군, 양성 대조군 및 실험군에서 5% DSS (Molecular weight 36,000 - 50,000 kD, MP Biomedicals, USA) 수용액을 물대신 자유롭게 7일 동안 음용하게 하여 대장염을 유발하였다.

2) 군 (group) 배정 및 ZME의 투여

대장염에 대한 ZME의 예방적 효과(prophylactic effect)와 치료적 효과(therapeutic effect)를 규명하기 위하여, 예방적 효과 관찰군에서는 DSS를 투여하기 전 1주일동안 ZME를 각각 100mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg의 농도로 투여하였고, 치료적 효과 관찰군에서는 DSS 투여와 동시에 7일 동안 ZME를 각각 100mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg의 농도로 투여하였다. ZME의 투여는 모두 1일 2회로 경구 투여하였다.

정상군(Normal)은 물과 사료 투여 외에 다른 처치를 하지 않았으며, 대조군(control)은 DSS 음용 외에 증류수가 투여되었고, 양성대조군 (positive control)은 DSS 음용 외에 Sulfasalazine 30 mg/kg을 경구 투여하였다(총 9개군). DSS 투여 7일후 생쥐를 희생시켰다.

3) 체중 및 대장의 길이 측정

생쥐의 체중은 매일 오전 9시에 측정되었고, 대장의 길이는 생쥐를 희생시키고, 맹장에서 항문까지 vernier caliper (Mitutoyo, Japan)를 이용하여 측정하

였다.

4) Clinical score

clinical score는 박<sup>4</sup> 등의 방법에 따라 두 명의 관찰자에 의해 매일 오전 9시에 측정하였고, 각각 생쥐의 행동과 자세, 털의 상태, 항문주위 상태에 따라 각각 0점에서 4점사이로 평가되어 계산되었다 (Table 1).

5) Macroscopic score

Macroscopic score는 박<sup>4</sup> 등의 방법에 따라, 두 명의 관찰자가 대장의 부종상태와 대변의 상태를 측정하여 계산하였다(Table 2).

6) Histological score

적출된 대장 조직을 10% buffered formalin에 고정하여 파라핀 fixation 후 hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색하였고, 두 명의 관찰자가 Kitajima<sup>23</sup> 등의 방법을 수정하여 박<sup>4</sup> 등이 사용한 Modified histological scoring을 사용하여 대장점막의 손상 정도를 평가하였다. 즉, 염증세포의 침윤상태에 따라

Table 1. Clinical score

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. Macroscopic score

Score	Macroscopic score	
	Thickness of colon edema	Overall health state
0	+++ , >0.35 mm	Fecal bleeding[+++] with tar stool[++]
1	++ , 0.3-0.35 mm	Fecal bleeding[++] with tar stool[+]
2	+ , 0.25-0.3 mm	Fecal bleeding[+] with pasty and semiformed stool
3	± , 0.2-0.25 mm	No bleeding with semiformed stool
4	0.1-0.2 mm	No bleeding with normal stool

서 0-3점 (0=none; 1=mild; 2=moderate; 3=severe)으로, 궤양의 정도에 따라서 0-4점 (0=none; 1=mild and focal surface; 2=mucosal layer; 3=submucosal layer; 4=transmural layer)으로 평가하여 계산하였다.

### 7) Biometric Multiplex Cytokine Profiling

적출된 대장은 -70℃에서 냉동저장 된 후, 대장의 근층(muscle layer)에서 점막조직을 채취하였다. 이후 점막 조직의 무게를 측정하고, 10 mg의 점막조직을 삼중세척완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.1% sodium deoxycholate and 1mM phenylmethsulfonyl fluoride)에 용해시켜서 균질화하였다. 이후 biometric Multiplex (Millipore, MA, USA)를 이용하여 6개의 cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and IL-17)을 정량하였다.

## 3. 통계처리

모든 데이터는 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였다. 통계유의성 평가는 one-way ANOVA로 하였으며, 사후처리는 Dunnett's test로 하였다.  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의성 있는 결과로 판정하였다.

## 결 과

### 1. ZME의 예방적 투여 효과

#### 1) 체중과 대장 길이의 변화

체중은 실험 전 평균 23g이었고, DSS투여 5일째부터 DSS를 투여한 모든 군의 체중이 감소하는 경향을 보였으며, 예방적 목적으로 미리 투여된 ZME는 대조군(control)에 비해 체중감소를 억제하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 1a).

한편 대장의 길이에서는, 정상군의 경우 평균 8.8 $\pm$ 0.2cm, 양성대조군 평균 7.2 $\pm$ 0.3cm, 대조군 평균 6.0 $\pm$ 0.1cm이었고, ZME 100mg/kg 투여군 평균 6.9 $\pm$ 0.2cm, 300mg/kg 투여군 평균 7.1 $\pm$ 0.2cm, 1000mg/kg 투여군 평균 7.3 $\pm$ 0.1cm으로, ZME 투여군에서 통계적으로 유의하게 농도 의존적인 대장의

길이 단축 억제 경향을 보였다(Fig. 1b).

#### 2) Clinical score

DSS 투여 3일후, 모든 군에서 clinical score가 감소하기 시작했으며, ZME 예방적 투여군에서 대조군에 비해 clinical score가 상대적으로 적게 감소되는 경향성을 보였지만 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 1c).

#### 3) Macroscopic score

대장점막 부종과 대변 성상을 고려한 macroscopic score는 정상군의 경우 평균 4.0점, 대조군 평균 1.0 $\pm$ 0.3점, 양성대조군 평균 3.0 $\pm$ 0.3점이었고 ZME 100mg/kg 투여군 평균 2.4 $\pm$ 0.3점, 300mg/kg 투여군 평균 2.6 $\pm$ 0.4점, 1000mg/kg 투여군 평균 2.9 $\pm$ 0.4점으로 ZME 투여군 모두에서, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 농도 의존적 결과를 보였다(Fig. 1d).

#### 4) Histological score

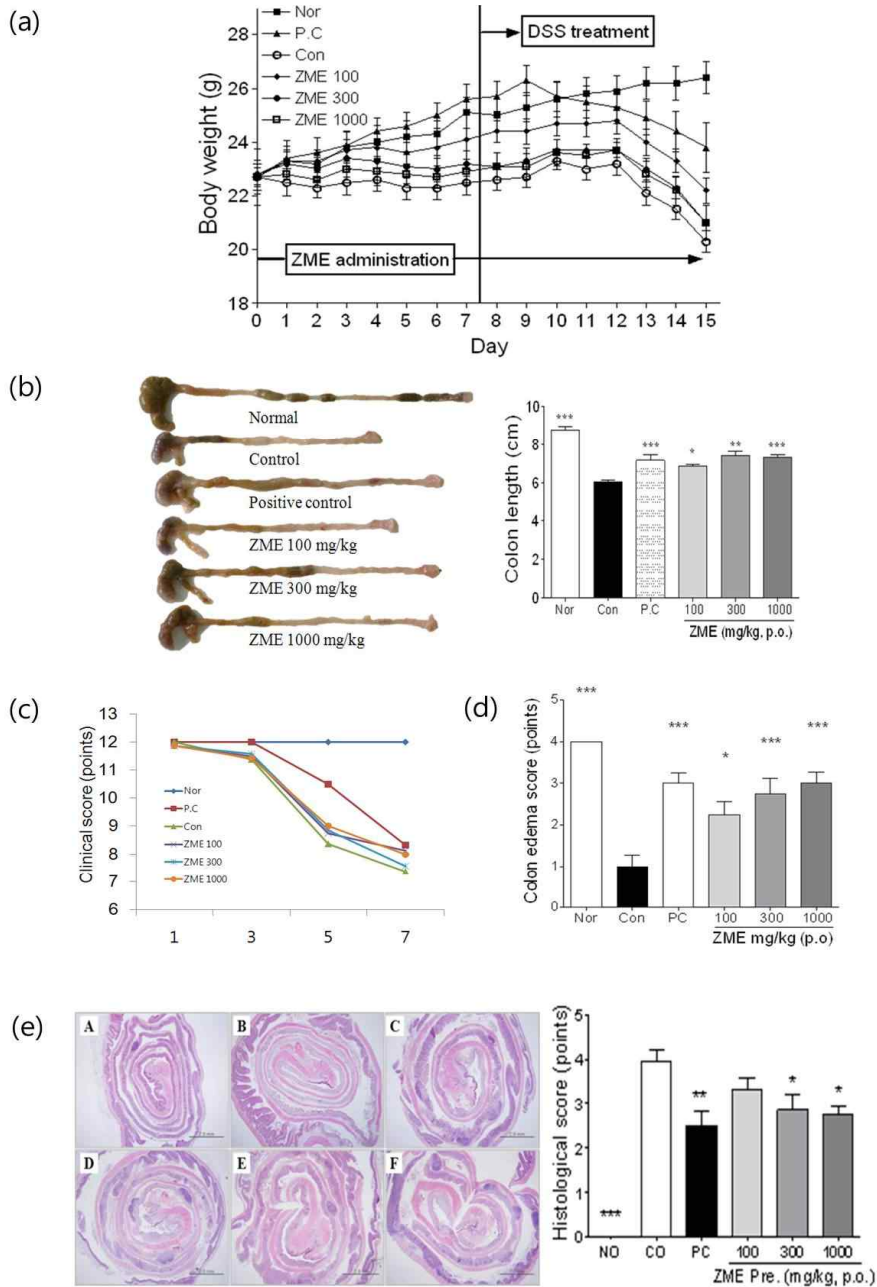
염증세포의 침윤정도와 궤양의 정도를 평가한 결과, 정상군의 경우 평균 0점, 대조군 평균 3.9 $\pm$ 0.3점, 양성대조군 평균 2.5 $\pm$ 0.4점이었고, ZME 100mg/kg 투여군 평균 2.4 $\pm$ 0.3점, 300mg/kg 투여군 평균 2.9 $\pm$ 0.4점, 1000mg/kg 투여군 평균 2.8 $\pm$ 0.2점으로 ZME 300mg/kg 및 1000mg/kg 투여군에서, 통계적으로 유의하게 대조군에 비해 점수가 낮았다(Fig. 1e).

### 2. ZME의 치료적 투여 효과

#### 1) 체중과 대장 길이의 변화

체중은 실험 전 평균 23g이었고, 역시 DSS투여 5일째부터 DSS를 투여한 모든 군의 체중이 감소하는 경향을 보였으며 DSS와 동시 투여된 ZME는 대조군에 비해 체중감소 억제 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2a).

한편 대장의 길이는, 정상군의 경우 평균 8.8 $\pm$ 0.2cm, 양성대조군 평균 7.2 $\pm$ 0.3cm, 대조군 평균 6.0 $\pm$ 0.1cm이었고, ZME 100mg/kg 투여군 평균



**Fig. 1.** The Prophylactic Effects of ZME on DSS-induced Colitis

(a) Body weight, (b) Colon length, (c) Clinical score, (d) Colon edema score and (e) Histological findings and scores (A, normal; B, control; C, positive control [Sulfasalazine 30 mg/kg]; D, E and F are ZME-treated groups. The whole colon tissue was stained by H&E. Center was distal part and boundary was proximal part of colon [x100]).

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=8). Nor: normal group, Con: control group, P.C: positive control group (Sulfasalazine 30 mg/kg), ZME: *Zostera Marina* water Extract

\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs. control group by one-way ANOVA with Dunnett's posthoc test.

6.8±0.1cm, 300mg/kg 투여군 평균 7.4±0.2cm, 1000mg/kg 투여군 평균 7.3±0.1cm으로, ZME가 투여된 모든 군에서 통계적으로 유의한 농도 의존적 대장길이 감소 억제 경향을 보였다(Fig. 2b).

#### 2) Clinical score

DSS 투여 3일 후 모든 군에서 clinical score가 감소하기 시작했으며, ZME 투여군에서 대조군에 비해 clinical score가 상대적으로 적게 감소되는 경향성을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2c).

#### 3) Macroscopic score

대장점막 부종과 대변성상을 고려한 macroscopic score는 정상군의 경우 평균 4.0점, 대조군 평균 1.0±0.3점, 양성대조군 평균 3.0±0.3점이었고, ZME 100mg/kg 투여군 평균 2.3±0.3점, 300mg/kg 투여군 평균 2.8±0.4점, 1000mg/kg 투여군 평균 3.0±0.3점으로 ZME 투여군에서 대조군에 비해 점수가 통계적으로 유의하게 농도 의존적으로 높은 점수를 보였다(Fig. 2d).

#### 4) Histological score

염증세포의 침윤 정도와 궤양의 정도를 판단한 결과, 정상군의 경우 평균 0점, 대조군 평균 3.9±0.3점, 양성대조군 평균 2.5±0.4점이었고, ZME 100mg/kg 투여군 평균 2.6±0.3점, 300mg/kg 투여군 평균 2.6±0.3점, 1000mg/kg 투여군 평균 2.9±0.2점으로, ZME 투여군 모두에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 점수를 보였다(Fig. 2e).

### 3. Cytokine levels on colon mucosa

DSS와 ZME가 동시 투여된 실험군 및 정상군, 대조군에서 추출된 대장점막조직의 cytokine 중 염증유발 매개물인 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17과 염증억제 매개물인 IL-10을 측정된 결과.

#### 1) IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$ 는 정상군 평균 21.1±6.77 pg/ml, 대조군 평균 101.8±35.68 pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균 44.2±18.00 pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균 34.0±11.27 pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균 29.9±15.71 pg/ml으로, ZME 300mg/kg, 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다(Fig. 3a).

#### 2) TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$ 는 정상군 평균 10.3±1.59 pg/ml, 대조군 평균 50.6±5.49 pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균 37.4±4.34 pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균 37.1±3.86 pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균 27.1±7.81 pg/ml으로, ZME 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다(Fig. 3b).

#### 3) IL-1 $\beta$

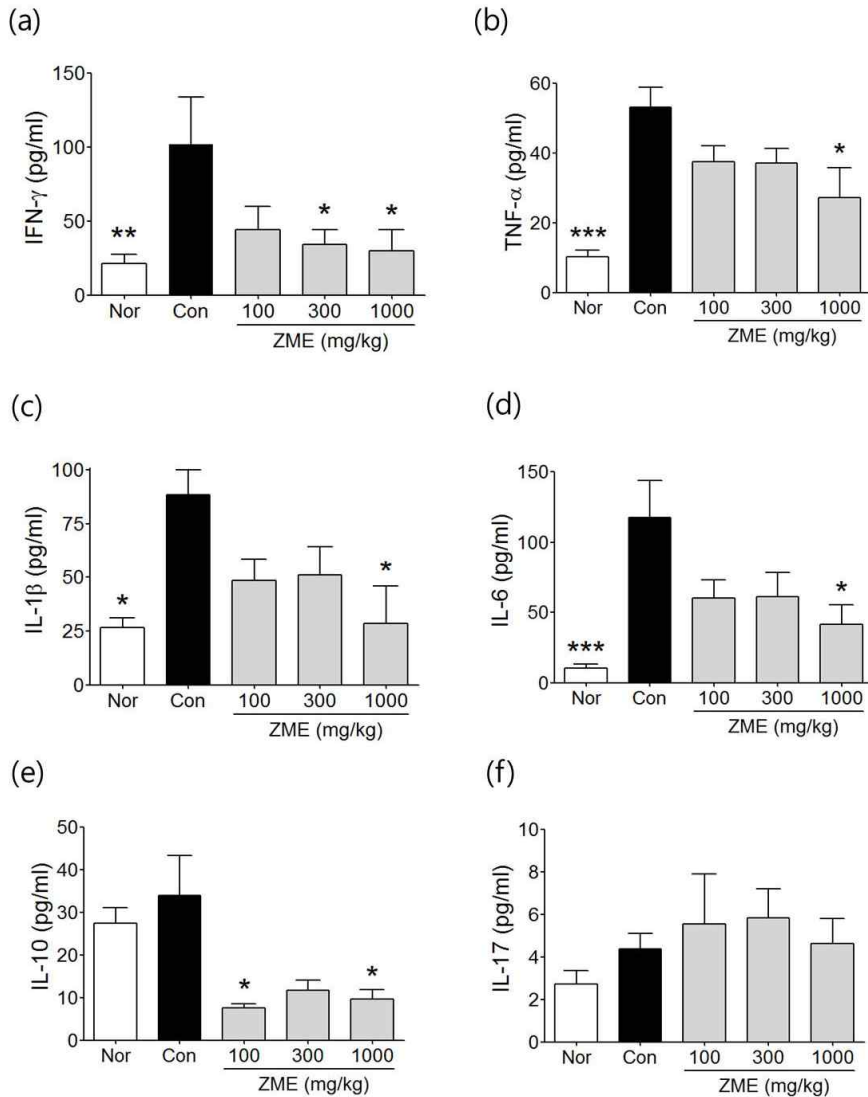
IL-1 $\beta$ 는 정상군 평균 26.6±4.99 pg/ml, 대조군 평균 88.3±12.39 pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균 48.3±11.08 pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균 51.0±14.28 pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균 28.4±20.19 pg/ml으로, ZME 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다(Fig. 3c).

#### 4) IL-6

IL-6은 정상군 평균 10.2±3.17 pg/ml, 대조군 평균 117.4±27.46 pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균 59.9±14.01 pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균 61.0±17.72 pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균 41.2±14.91 pg/ml으로, ZME 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다(Fig. 3d).

#### 5) IL-10

IL-10은 정상군 평균 27.5±3.96 pg/ml, 대조군 평균 34.0±9.51 pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균 7.6±0.87 pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균 11.8±2.44 pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균 9.7±2.28 pg/ml으로, ZME 100mg/kg, 1000mg/kg 투여군에서 대조군에



**Fig. 2.** The Therapeutic Effects of ZME on DSS-induced Colitis

(a) Body weight, (b) Colon length, (c) Clinical score, (d) Colon edema score and (e) Histological findings and scores (A, normal; B, control; C, positive control [Sulfasalazine 30 mg/kg]; D, E and F are ZME-treated groups. The whole colon tissue was stained by H&E. Center was distal part and boundary was proximal part of colon [x100]).

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M (n=8), Nor: normal group, Con: control group, P,C: positive control group (Sulfasalazine 30 mg/kg), ZME: *Zostera Marina* water Extract

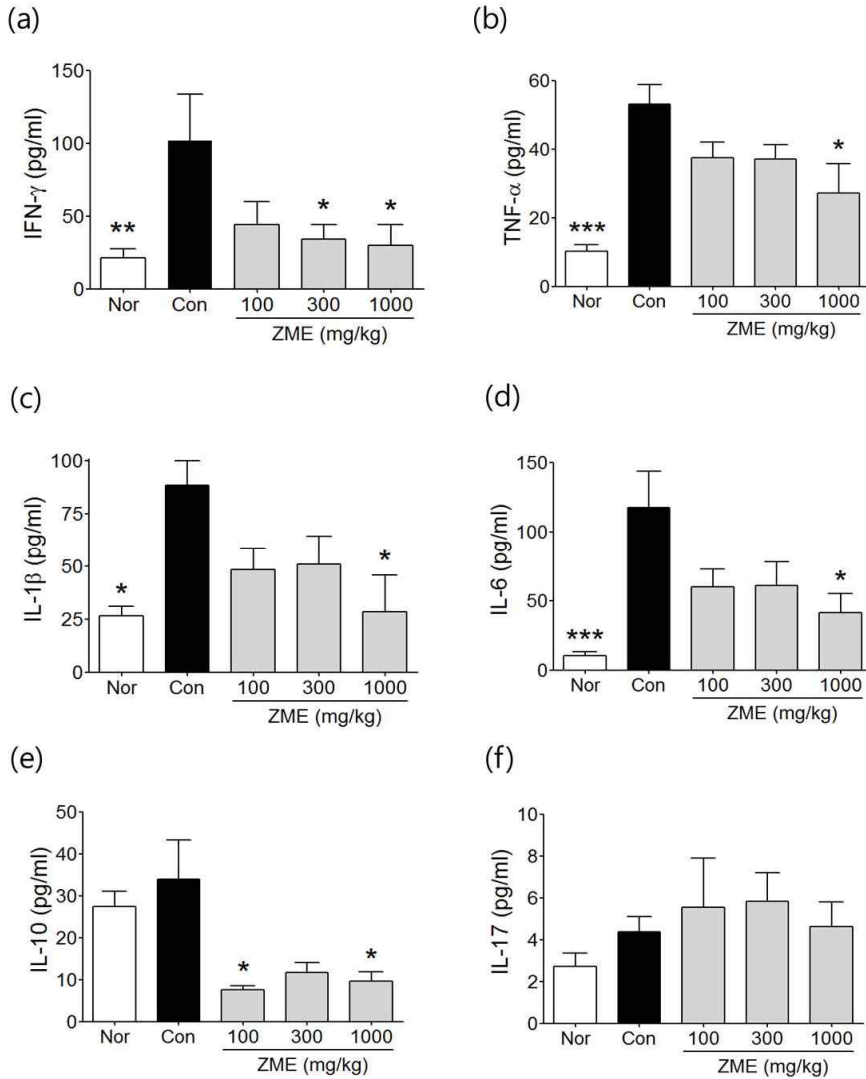
\*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 vs. control group by one-way ANOVA with Dunnett's posthoc test.

비해 통계적으로 유의하게 낮았다(Fig. 3e).

6) IL-17

IL-17은 정상군 평균  $3.0 \pm 0.75$  pg/ml, 대조군 평

균  $5.0 \pm 1.32$  pg/ml, ZME 100mg/kg 투여군 평균  $5.6 \pm 2.47$  pg/ml, 300mg/kg 투여군 평균  $5.8 \pm 1.43$  pg/ml, 1000mg/kg 투여군 평균  $4.6 \pm 1.25$  pg/ml으로, ZME 투여군과 대조군 간 통계적으로 유의한 차이



**Fig. 3.** Cytokine Levels of Colon Mucosa

(a) IFN- $\gamma$ , (b) TNF- $\alpha$ , (c) IL-1 $\beta$ , (d) IL-6, (e) IL-10 and (f) IL-17

Nor: normal group, Con: control group, ZME: *Zostera Marina* water Extract.

\*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 vs. control group by one-way ANOVA with Dunnett's posthoc test.

가 없었다(Fig. 3f).

### 고 찰

최근 들어 염증성 장질환에 대한 한의학적 관심이 높아지고, 그에 따라 연구가 많이 진행되고 있는

데, 실험적으로 四味軟堅湯<sup>10</sup>, 補腸健脾湯<sup>11</sup>, 消炎整腸湯<sup>12</sup>, 四君子湯<sup>13</sup> 등 한약제제의 유효성에 대한 연구, 鍼灸치료로 曲池穴<sup>24</sup>, 大腸俞穴<sup>25</sup>, 天樞穴<sup>26</sup> 등에 대한 연구, 海藻<sup>14</sup>, 黃芩<sup>15</sup> 등 개별 한약재 연구 등이 보고되었으며, 임상적으로는 염증성 장질환에 대해 예후가 양호했던 임상사례 발표<sup>27,28</sup>가 늘어가는 등



다양한 분야의 연구가 진행되고 있다.

본 연구에 사용된 본초 해대는 大葉藻科 식물 大葉藻(*Zostera marina* L.)의 全草이며, 바다 속에서 자라는 다년생 草本 식물이다. 봄, 여름, 가을에 채취하여 불순물을 제거하고 淡水로 씻어 그늘에 말린 후 藥材로 사용한다. 주성분은 zosterin으로 galacturonic acid, galactose, arabinose, xylose, apiose를 함유한다. 그 밖에 tannin, vitamin B<sub>1</sub>과 함께 단백질, 지방, pentosan 등을 함유한다. 性味를 살펴보면, 鹹味와 寒性을 가진 약재로 補心, 下氣, 行水, 消痰, 軟堅의 효능을 가지고 있어서 脚氣水腫과 癭瘤結核을 치료하며 海藻, 昆布와 그 효과가 비슷하다고 알려져 왔다<sup>29</sup>. 해대는 선행 연구를 통해 항산화 및 항균 효과가 입증되었고<sup>16-20</sup>, 해대에서 추출한 펙틴의 위 보호 효과에 대한 효능이 동물실험에 의해 입증된 바 있다<sup>21</sup>. 특히 염증성 장질환에 대한 치료효능이 입증된<sup>10</sup> 四味軟堅湯의 구성 약재 중의 하나로 이미 그 효능이 입증된<sup>14</sup> 海藻와 함께 염증성 장질환의 치료효능에 중요한 역할을 할 것으로 추정되었다. 따라서 본 연구에서는 염증성 장질환의 치료제로서 해대의 가능성을 살펴보고자, DSS를 투여하여 대장염을 유발한 동물모델에게 해대 물추출물을 예방적, 치료적 목적으로 투여하여 그 결과를 관찰하였다.

한편, 염증성 장질환을 연구하기 위한 동물 모델은 1961년 처음으로 Kirsner 등이 immune complex colitis model을 제시한 후<sup>30</sup> 지금까지 약 60여개의 동물 모델들이 제시되었다. 염증성 장질환의 동물실험 연구모델에는 dextran sulfate sodium(DSS)<sup>31</sup>, 초산(acetic acid)<sup>32</sup>, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)<sup>33</sup>를 활용한 다양한 종류가 있으며 그 중 DSS 유발 장염 모델은 대표적으로 많이 사용되는 동물 모델로, 유발된 장염의 형태가 인간의 염증성 장질환과 유사하다고 알려져 있다<sup>34</sup>.

DSS 유발 장염 동물모델은, DSS 시약으로 2~5%의 희석액을 만들어 물과 함께 음용시키는데, 투여 후 7일 정도가 지나면, 투여된 DSS는 장 상피에 손상을 주고 점막층의 상태에 영향을 주어 급성 장염을 동물에게 유발한다. 특히 궤양성 대장염과 유

사하게, 체중감소, 대장 길이의 단축, 설사, 혈변, 장 점막 궤양 등의 증상이 발생한다<sup>19,35</sup>. 장기 투여 시 발암단계의 변화가 발생되며, 재현성이 높은 모델로서 염증성 장질환, 특히 궤양성 대장염의 새로운 약제 효능 평가에 많이 사용되는 오래되고 안정적인 실험 모델중의 하나다<sup>36,37</sup>. 본 연구에서도 정상군의 생쥐 체중은 지속적으로 증가한 반면, DSS를 투여한 군의 생쥐들은 투여 5일째부터 체중이 급속도로 감소하였으며, 대장 길이 역시 정상군에 비해 대조군에서 통계적으로 의미 있게 단축되었다. 따라서 DSS에 의해 대장염이 효과적으로 발생하였다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 ZME의 효과를 예방적 효과와 치료적 효과로 나누어 알아보기 위해, 실험군을 크게 두 그룹으로 나누었다.

예방적 효과를 알아보기 위한 그룹은, DSS를 생쥐에게 투여하기 전, 미리 일주일간 ZME 100mg/kg, 300mg/kg, 1000mg/kg을 투여하였고, 치료적 효과를 알아보기 위한 그룹은 DSS를 투여할 때 함께 ZME를 같은 용량으로 투여하였다. 투여 용량은 박<sup>4</sup> 등의 연구를 참고하였다. 또한 양성 대조군으로서 궤양성 대장염의 치료에 서양의학에서 자주 쓰이는 sulfasalazine<sup>38</sup>을 30mg/kg 투여하였다.

그 결과, ZME가 예방적, 치료적 목적으로 투여된 모든 군에서 대장 길이의 단축을 통계적으로 유의하게 억제하였다. 특히 ZME 1000 mg/kg 투여군이 가장 효과적으로 대장 길이의 단축을 막았으며 농도 의존적인 결과를 보여주었다(Fig. 1b and 2b).

또한 본 연구에서는 염증성 장질환의 상태를 반영하는 것으로 알려져 있는<sup>39</sup> clinical score의 변화를 살펴보았는데, 각 항목은 박<sup>4</sup> 등의 연구를 참고하였고, 생쥐의 행동과 자세, 털의 상태, 그리고 항문 주위 상태에 따라 점수를 매겼다(Table 1). 그 결과 ZME가 투여된 군에서 대조군과 비교하여 clinical score 감소의 억제 경향성을 보이긴 했지만 통계적으로는 유의하지 않았다(Fig 1c and 2c). 체중감소 지표 역시 ZME가 투여된 군이 보호 효과 경향을 관찰할 수 있었으나 통계적으로는 유의하지 않았다

(Fig 1a and 2a).

대장의 육안적 손상을 확인하기 위해, 박<sup>4</sup> 등의 연구를 참고하여 대장의 부종 정도와 대변상태를 점수화(Table 2)하여 비교한 결과, ZME가 투여된 모든 군에서 통계적으로 유의한 효과를 보여주었다. 아울러 ZME 1000mg/kg 투여군이 가장 효과적으로 나타나 농도 의존적인 결과를 알 수 있었다(Fig. 1c and 2c).

DSS유발 장염 동물모델의 대장조직에서는 장구조의 파괴, 광범위한 염증세포침윤, 궤양 과 근육비대 등의 특징적인 조직학적 소견을 보이는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. 본 연구에서 두 명의 숙련자가 Kitajima<sup>27</sup> 등의 방법을 수정한 Modified histological scoring<sup>4</sup>을 사용하여 대장점막의 손상정도를 평가한 결과, 예방적 목적의 ZME 300mg/kg, 1000mg/kg 투여군과, 치료적 목적의 ZME 투여군 모두에서 조직 손상 점수가 대조군에 비해 통계적으로 유의한 감소를 보여 ZME의 대장점막 조직 염증 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 1d and 2d).

결과적으로 ZME에 대해 예방적 목적과, 치료적 목적으로 투여된 경우간 통계적으로 유의한 대장염 억제 효과를 보였지만 두 그룹에서 유의한 차이점을 발견할 수 없었으므로, ZME는 염증성 장질환에 대한 예방적 및 치료적 효과를 모두 가지고 있을 가능성을 추론해 볼 수 있다.

한편, 염증성 장질환은 유전적인 소인을 가지고 있는 사람에게서 장관 내 세균에 대한 부적절한 면역반응을 보이는 경우에 발생 한다는 설이 가장 유력한 가설이다<sup>4,5,30</sup>. 따라서 최근 들어 TNF- $\alpha$  와 IL-10 등, 염증 반응에 중요한 역할을 하는 cytokine 들이 염증성 장질환의 병태생리에 있어서 중요시 되고 있다<sup>6</sup>.

cytokine은 활성화된 림프구와 대식세포에 의해 분비되는 물질로 주로 세포성 면역반응에 관여하는 다른 세포들의 기능을 조절하며 염증반응에도 중요한 역할을 한다<sup>40</sup>. 그들은 고유면역계(innate immune system)와 적응면역계(adaptive immune system)에서 중요한 생물학적인 세포기능을 조절하고 면역세포

의 확산과 분화를 조정한다<sup>41</sup>. 염증성 장질환에 있어서 cytokine에 대한 연구는 병태생리학적 면역조절 장애과정을 이해할 수 있다는 점에서 중요한 역할을 한다<sup>42</sup>.

본 연구에서는 Biometric Multiplex Cytokine Profiling으로 DSS와 ZME를 함께 투여한 생쥐의 대장점막 조직 내 대표적인 염증 및 항염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 및 IL-17을 정량화하여 그 변화를 관찰하였다.

TNF- $\alpha$ 는 면역반응의 발현과 조절에 있어 중요한 역할을 담당하는 친 염증성 cytokine으로 크론병 환자의 점막에서 TNF- $\alpha$  생산이 증가되어 있으며<sup>43</sup>, TNF- $\alpha$  에 대한 단클론항체가 크론병의 치료에 사용되고 있다<sup>44</sup>.

인터페론(IFN)은 항바이러스 작용을 보이는 단백질이며,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 세 종류가 있고 면역담당세포에 작용하는 cytokine으로서의 작용을 지니고 있다. 즉 활성화된 B세포에 작용하여 항체생성세포로 분화하는 단계를 촉진한다. 또 T killer cell, natural killer cell의 활성을 증가시킨다. 이중 IFN- $\gamma$ 는 T세포와 natural killer cell에서 분비되며 대식세포를 활성화시키고 살균작용, 종양상해작용을 높여 대식세포 활성화인자로서도 작용한다. 또한 Major Histocompatibility Complex(MHC) I, II 단계 발현을 증가시킨다. 이것은 림프구가 MHC를 쉽게 인식하게 하여 면역반응에 영향을 미치게 된다<sup>45</sup>.

IL-1 $\beta$ 는 활성화된 단핵식균세포, 상피세포, 혈관 내피세포 등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 cytokine으로 급성 및 만성 대장염의 시초와 지속관계에서 염증을 유발시키는 인자로 작용한다<sup>45</sup>.

IL-6은 활성화된 T세포에서 생성되며 B세포가 항체 생산세포로 분화하는 최종 단계를 유도하는 물질로서 알려졌다. 표면에 IgD를 소실하여 IgM만을 지닌 성숙 B세포에 작용한다. 항원과 반응한 T세포에도 작용하며, IL-2 수용체를 표출시켜 IL-2를 생성시켜서 증식을 초래한다. T killer 세포의 발현도 보조한다. 신경교세포에서 유리되는 IL-6는 신경교세포의 성장인자로서 작용하며 거핵세포를 증식시

켜 혈소판의 성장을 높이는 작용도 있다<sup>46</sup>.

IL-10은 cytokine 저해인자로도 알려져 있으며, IFN- $\gamma$ 와 IL-2의 생산을 억제함으로써 염증 작용을 조절하는 cytokine으로, IFN의 생성이나 항원 표출을 억제하고 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 를 만드는 대식세포의 생성을 억제한다. 그리고 활동성 염증성 장질환에서 상대적으로 감소되어 있으며 활동성 크론병 환자에게 IL-10을 투여하면 임상 증상 및 내시경적 호전을 보인다<sup>45,47,48</sup>.

IL-17은 궤양성 대장염 환자의 장점막에서 발현이 증가되어 있는<sup>49</sup> cytokine으로 IL-23에 의해 TH<sub>17</sub> 세포에서 IL-17 발현이 증가하여 염증이 발생한다고 알려져 있다<sup>5</sup>.

본 연구에서 사용된 Multiplex는 Bioplex protein array system(Bio-Rad)을 이용한 면역분석법이다. Multiplex에는 Bio-Plex array reader가 있는데 이것은 100종 이상의 color-coded polystyrene beads 분석하고 유효한 cytokine을 연속적으로 정량하여 실시간으로 디지털신호를 보내줄 수 있는 flow-based dual laser detector를 가지고 있다. 그러므로 Multiplex Cytokine Profiling은 어떤 질병에 있어서 유효한 cytokine을 정량하여 면역반응에 기초한 그 질병의 정도와 질병발생과정의 시작과 지속상태에서 면역반응과 염증반응의 비율을 특징지을 수 있는 병태를 조사하는데 유용하다.

본 연구에서 Biometric Multiplex Cytokine Profiling으로 DSS와 ZME를 함께 투여한 생쥐의 대장조직 내, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 및 IL-17 수치를 측정된 결과, IFN- $\gamma$ 는 ZME 300mg/kg, 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 수치 감소를 보였으며, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6는 ZME 1000mg/kg 투여군에서, 대조군에 비해 유의한 수치 감소를 보였다. IL-10은 ZME 100mg/kg, 1000mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 수치 감소를 보였으며 IL-17의 경우는 별다른 변화가 없었다(Fig. 3).

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 수치의 감소는 염증 매개 cytokine의 수치를 감소시킨 것이기에 ZME의 항염증 효과를 설명할 수 있는 결과이다. 그러나

이번 연구에서 염증 감소 cytokine인 IL-10의 수치가 증가하지 않고 감소한 것은 아쉬운 결과라고 할 수 있다.

한편 본 연구에서 통계적으로 의미 있는 효과가 나타난 항목의 경우 대부분 농도 의존적인 결과를 나타냈으며, 따라서 가장 좋은 효과를 나타낸 실험군은 ZME가 1000mg/kg(1일 2회 투여) 투여된 군이었다. 이는 박<sup>4</sup> 등의 연구에서 대장염에 대한 楡皮의 효과가 가장 좋았던 경우와 동일하며, 60kg의 체중을 가진 일반 성인에게 하루에 회당 60g을 2회 투여하는 용량이다. 따라서 ZME를 예방 및 치료 목적으로 투여 할 경우는 대량으로 투여하는 것이 좀 더 좋은 효과가 있을 것으로 추정된다. 전통적으로 ZME는 주로 하루 6-12g 정도 투여되는 용량이 일반적이었고, 이 경우는 癭瘤結核, 脚氣水腫을 주로 치료하는 목적으로 투여되었다<sup>33</sup>. 따라서 본 연구에 따라 추론해보면, ZME를 염증성 장질환을 치료하는 목적으로 투여할 때는, 전통적으로 사용되는 용량에 비해 더 큰 용량으로 투여를 하는 것이 효과가 더 좋을 것이라 추정할 수 있다. 그러나 하루에 한 약제 120g정도 용량의 투여는 일반적인 한의학 처방을 구성하는 다른 약제에 비해 많은 편이므로, 향후 대량 투여로 인한 부작용 발생 가능성에 대한 후속 연구와 약제의 성분에 대한 분획(fraction) 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결론

본 연구를 통해 예방적, 치료적 목적으로 투여된 ZME가 DSS로 유발된 대장염 모델에 대한 유의한 대장염 억제 효과를 보여주어, 향후 海帶는 염증성 장질환의 치료 및 예방에 응용할 수 있는 한약재가 될 수 있을 것으로 보인다. 아울러, 이와 같은 한약재를 통해 염증성 장질환에 대한 새로운 치료제 개발의 가능성을 제시하여 준다고 할 수 있다.

참고문헌

1. Yang SK. Current Status and Clinical Characteristics of Inflammatory Bowel Disease in Korea. *Korean J Gastroenterol.* 2002;40: 1-14.
2. Department of Internal Medicine, Medical School, Seoul National University. Guideline of Internal Medicine. 1<sup>st</sup> ed. Seoul: Korea Medicine Publication. 2002:51-3.
3. Kim JY. Gastrointestinal Disorders. 1<sup>st</sup> ed. Seoul: Iljogak. 2000:258-76.
4. Park JW, Bu Y, Bae J, Lee B, Ko S, Kim J, et al. Protective effects of *Ulmus macrocarpa* on experimental colitis mice models. *Orient Pharm Exp Med.* 2011;11:107-12.
5. Seo GS, Choi SC. Special Review-Ulcerative colitis: Pathophysiology of ulcerative colitis – Relationship with genetics and immunity-. *Korean J Med.* 2009;76(7):643-8.
6. Kim TH, Kim BG, Sin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, et al. Alimentary Tract: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 Gen Polymorphisms in Korean Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Korean J Gastroenterol.* 2003;42:377-86.
7. Korean Association of Gastroenterology. Inflammatory Bowel Diseases. 1<sup>st</sup> ed. Seoul: Gunja Publication. 1999:61.
8. Siegal CA. Review article: explaining risks of inflammatory bowel disease therapy to patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:23-32.
9. Lee JY, Kang HS, Park BE, Moon HJ, Sim SS, Kim CJ. Inhibitory effects of Geijigajakyak-Tang on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Ethnopharmacol.* 2009;126:244-51.
10. Kim SY, Ryu B, Park JW. Effects of *Samiunkyungtang* on inflammation and fecal enzymes in ulcerative colitis animal model. *J Korean Med.* 2008;29(3):56-62.
11. Ryu B, Ro W, Park JW, Bu Y, Lee BJ, Lim S, et al. *Bojanggal-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(2):582-5.
12. Song YG, Ryu B, Yoon SW. The Effects of *Soyunjang-tang* on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mouse. *Korean J Orient Int Med.* 2008;29(2):385-400.
13. Hong SS, Ryu B, Yoon SW, Kim JS. The effect of *Sagunja-tang* on TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease in Mouse. *Korean J Orient Int Med.* 2010;31(4):731-51.
14. Lee SW, Ryu B, Park JW. Effects of *Sagassum pallidum* on 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis in Mice. *Korean J Orient Int Med.* 2010;31(2):224-41.
15. Chung HL, Yue GGL, To KF, Su YL, Huang Y, Ko WH. Effect of *Scutellariae Radix* extract on experimental dextran-sulfate sodium-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol.* 2007;13(42):5605-11.
16. Choi HG, Lee JH, Park HH, Sayeghet FAQ. Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Zostera marina* L. Extract. *Algae.* 2009;24(3): 179-84.
17. Harrison PG. Control of microbial growth and of amphipod grazing by water-soluble compounds from leaves of *Zostera marina*. *Mar Biol.* 1982;67:225-30.
18. Harrison PG, Chan AT. Inhibition of the growth of micro-algae and bacteria by extracts of eelgrass(*Zostera marina*) leaves. *Mar Biol.* 1980;61:21-6.
19. Khasina EI, Kolenchenko EA, Sgrebneva MN,

- Kovalev VV, Khotimchenko YS. Antioxidant activities of a low etherfied pectin from the seagrass *Zostera marina*. *Russian J Mar Biol*. 2003;29:259-61.
20. Kolenchenko EA, Sonia LN, Khotimchenko YS. Comparative in vitro assessment of antioxidant activities of a low etherfied pectin from the eelgrass *Zostera marina*. and antioxidative medicines. *Russian J Mar Biol*. 2005;31:331-4.
21. Khasina EI, Tiupelev PA, Sgrebneva MN. Gastroprotective effect of zosterin, a pectin from seagrass *Zostera Marina* L. *Orient Pharm Exp Med*. 2004;4(4):253-60.
22. Lee IA, Bae EA, Hyun YJ, Kim DH. Dextran sulfate sodium and 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induce lipid peroxidation by the proliferation of intestinal gram-negative bacteria in mice. *J Inflamm*. (Lond). 2010;7:7.
23. 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.
24. Song MY, Park SY, Kim JH, Ahn SH, Kim KS, Sohn IC. Effects of Moxi-tar Herbal Acupuncture of LI11 on inflammatory bowel disease induced by TNBS in mice. *Korean J Acupunct*. 2008;25(3):147-66.
25. Baek DB, Kwon OS, Choi WJ, Kim JH, Jeon HY, Kim KS, et al. Moxi-tar Herbal Acupuncture of BL25 Acupoint Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Mice. *Korean J Acupunct*. 2007;24(3):149-64.
26. Kim YT, Ahn SH, Kim JH, Sohn IC. Effects of Moxi-tar Herbal Acupuncture at *Cheonchu* (ST25) on Crohn's Disease Induced by TNBS in Mices. *Korean J Acupunct*. 2008;25(2):159-77.
27. Kim SH, Kim HJ, Kim JE, Lee SH, Hong SH, Kim WI. Clinical Case of Symptoms Remaining after Western Medical Therapy in Ulcerative Colitis, with Herbal Medicine *Dansamboheol-tang gagam*, Acupuncture, and Moxibustion Treatment. *Korean J Orient Int Med*. 2007;28(4):911-8.
28. Hwang JW, Choi HJ, Baik YS, Jeong SH, Shin GC, Lee WC. A Case of *Pyungwijiyutang-gamibang* Diagnosed as Constipation due to Stagnation of *Eum* with Ulcerative Colitis. *Korean J Oriental Int Med*. 2007;28(4):972-7.
29. Kim CM, Shin MK, Ahn DG, Lee KS. The Great Dictionary of Chinese Herbs (Korean version). 1<sup>st</sup> ed. Seoul:Jungdam Publication. 1998:6036-7.
30. Kirsner JB. Experimental colitis with particular reference to hypersensitivity reactions in the colon. *Gastroenterology* 1961;40:317-22.
31. Okasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990;98:694-702.
32. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rat. *Digestion*. 1978;17:135-50.
33. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96:795-803.
34. StroberW, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495-549.
35. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Buchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate

- colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*. 2000;62:240-8.
36. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and change in intestinal microflora. *Jpn J Gastroenterol*. 1985;82:1327-36.
37. Kitajima S, Takoma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Animal*. 1999;48:137-43.
38. Kim SJ, Choi DH, Chung YT. Gliotoxin protects against TNBS-induced colitis via down-regulation of NF- $\kappa$ B activation. *Kor J Anat*. 2004;37(3):309-15.
39. Johswich K, Martin M, Bleich A, Kracht M, Dittrich-Breiholz O, Gessner JE, 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.
40. Ko E, Kim JG, Kim JR, Kim HJ, Hong SJ, Park JS, et al. Pathophysiology. 1<sup>st</sup> ed. Seoul: Korea Medicine Publication. 2006:42-3.
41. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008;28:477-87.
42. Pizarro TT, Cominelli F. Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. *Annu Rev Med*. 2007;58:433-44.
43. Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci*. 1997;42:1557-66.
44. Targan SR, Hanauer SB, Van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1997;337:1029-35.
45. Kwon HH, Kim EJ, Kim IT, Park KH, Yang MG, Eum YB, et al. Clinical Immunology. 1<sup>st</sup> ed. Seoul: Korean Medicine Publication. 2010:158-70.
46. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-71.
47. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2000; 119:1473-82.
48. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, et al. Safety and efficacy of recombinant human interleukin-10 in chronic active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2000;119:1461-72.
49. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52:65-70.