

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.3.317

JCCT 2019-8-40

열처리된 무 추출물의 궤양성 대장염증 예방 효과에 미치는 영향

The Effects of Heated Radish Extract on the Prevention of Ulcerative Colitis Inflammation

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 본 연구는 인체에 유익한 효과가 있고 부작용 없이 장기간 안전하게 사용할 수 있으며 표준치료제인 설파살라진과 비교하여 열처리된 무 추출물의 궤양성 대장염증의 예방에 탁월한 효과가 있는지 알아보았다. 쥐에 텍스트란나트륨설페이트(DSS)로 유도된 UC에 대한 설파살라진 투여군과 열처리된 무추출물 투여군에 대해 약리효능의 비교 평가를 알아보았다. Balb/c 마우스는 7일동안 식수에 5 % DSS를 투여하여 대장염을 유도하였다. DSS+ sulfasalazine(30 mg/kg), IV-DSS + sulfasalazine(60 mg/kg), 5-DSS + , V-DSS + 설파살라진(30 mg/kg) + 무우 엑기스 혼합물(30 mg /kg) (SRE). DSS 처리된 마우스는 심한 피의 설사 및 체중 감소와 같은 인간 UC와 유사한 증상을 보였다. 설파살라진 뿐만 아니라 SRE보충은 결장길이와 점막염증 침투를 억제하였다. 또한 SRE 치료는 MAPK와 nuclear factor-kappa B(NF-κB) 신호전달 경로를 억제함으로써 전염증 신호분자의 발현을 현저히 감소 시켰으며 결장의 세포 사멸을 예방하였다. 또한, SRE 투여는 SOD 및 카탈라아제를 포함한 항산화 효소의 상향 조절을 의미있게 만들었다. 이번 연구 결과는 열처리된 무추출물과 설파살라진의 병용 투여가 sulfasalazin 표준과 매우 유사한 염증과 세포사멸의 억제. 열처리된 무추출물은 궤양성 대장염 유발에 의한 대장의 길이 감소와 조직학적 변화에 의한 대장 길이의 감소나 조직학적 변화를 효과적으로 억제 하였다.

주요어 : 양배추, 간보호, 항염증, 간질환, 사이토카인

Abstract The present study aimed to investigate the comparative evaluation of pharmacological efficacy between sulfasalazine alone and combination with herbal medicine on dextran sodium sulfate (DSS)-induced UC in mice. Balb/c mice received 5% DSS in drinking water for 7 days to induce colitis. Animals were divided into five groups (n = 9): group I-normal group, group II-DSS control group, group III-DSS + sulfasalazine (30 mg/kg), group IV-DSS + sulfasalazine (60 mg/kg), group V-DSS + sulfasalazine (30 mg/kg) + Radish Extract mixture (30 mg /kg) (SRE). DSS-treated mice developed symptoms similar to those of human UC, such as severe bloody diarrhea and weight loss. SRE supplementation, as well as sulfasalazine, suppressed colonic length and mucosal inflammatory infiltration. In addition, SRE treatment significantly reduced the expression of pro-inflammatory signaling molecules through suppression both MAPK) and nuclear factor-kappa B (NF-κB) signaling pathways, and prevented the apoptosis of colon. Moreover, SRE administration significantly led to the up-regulation of anti-oxidant enzyme including SOD and Catalase. This is the first report that Radish extract mixture combined with sulfasalazine protects against experimental UC via the inhibition of both inflammation and apoptosis, very similar to the standard-of-care sulfasalazin.

Key words : Heated radish extract, Dextran sulfate sodium, Ulcerative colitis, Apoptosis, Sulfasalazine

*정회원, 서원대학교 식품공학과
접수일: 2019년 4월 18일, 수정완료일: 2019년 5월 15일
게재확정일: 2019년 6월 8일

Received: April 18, 2019 / Revised: May 15, 2019

Accepted: June 8, 2019

*Corresponding Author: Kimhk4@sewon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

I. 서 론

무(Radish, *Raphanus sativus* L.)는 십자화과(Cruciferae) 채소로 휘발성 합황 성분을 가지고 있어 독특한 매운 맛을 지니고 있다. 무의 독특한 매운 맛은 무에 함유된 티오글루코사이드가 잘리거나 세포가 파괴되었을 때 자체 내에 있는 글루코사이다아제라는 효소에 의하여 티오시아네이트와 이소티오시아네이트로 분리되는 것에 의한다. 무에는 다른 채소에 비해 유리 아미노산, 당, 칼슘 및 인 등이 많이 함유되어 있다. 뿌리에 함유된 당분은 주로 포도당, 과당이고 이외에 쿠마르산, 카페인산(caffeic acid), 페룰린산(ferulic acid), 페닐피루빈산(phenylpyruvic acid), 젠티딘산(gentidin acid), 히드록시 안식향산 및 다종의 아미노산이 함유되어 있다. 특히, 비타민 C의 함량이 20~25mg이나 함유되어 예로부터 겨울철 비타민 공급원으로 중요한 역할을 해왔다. 무 뿌리인 나복(蘿蔔)은 가래, 기침해소, 이질 등에 효과가 있고, 어패류 또는 면류의 중독을 해소하는데도 효과가 있다고 고전에 기록되어 있다[2, 3]. 무에 함유된 디아스타제(diastase)는 소화촉진, 식중독, 숙취해소에 효과가 있으며 라핀(rapine)은 세균, 곰팡이, 기생충 등에 대한 항균 작용이 있는 성분으로 알려져 있다[1-6].

궤양성 대장염은 대장 점막에 염증 또는 궤양이 생기는 만성 재발성 질환으로, 원인은 아직 정확히 알려지지 않았으나 환경적 요인, 유전적 요인과 함께 장내에 정상적으로 존재하는 세균에 대한 우리 몸의 과도한 면역반응 등이 중요한 발병 요인으로 여겨지고 있다. 궤양성 대장염을 완치할 수 있는 수술 방법은 워낙 복잡하고 수술로 인한 후유증이 크기 때문에 가능한 수술을 하지 않고 약물요법만으로 치료하는 것을 원칙으로 한다. 궤양성 대장염을 완치할 수 있는 약물 치료법은 아직 없으며, 설파살라진(sulfasalazine), 메살라민(mesalamine)과 같은 항염증제, 부신피질 호르몬제 등의 치료제가 가장 흔하게 사용되며, 환자의 상태에 따라 면역억제제, 항생제 등의 약물을 적절히 선택하여 사용한다. 이 중 설파살라진은 수십년간 궤양성 대장염의 표준적인 치료방법으로 사용되어 왔으나 고용량 및 장기 복용에 의해 산화 스트레스를 유발하고 구역질, 속쓰림, 두통, 어지러움, 빈혈, 피부발진 등의 부작용을 일으킬 수 있으며, 드물게는 이들 약물로 인해 간염, 췌장염, 폐렴 등이 유발되

기도 한다. 더구나 직장에만 병적인 변화가 나타나는 궤양성 대장염은 일시적인 약물치료만으로도 완치될 수 있으나, 직장 이상의 부위에서 병적인 변화가 발생한 궤양성 대장염은 재발 빈도가 높으며 장천공, 독성 거대결장과 같은 합병증이나 대장암으로 진행되기도 한다. 이에 궤양성 대장염의 치료를 위한 안전하고 효과 높은 새로운 치료방법의 개발이 요구된다. 이에 인삼 또는 인삼의 유산균 발효물과 같이 궤양성 대장염 예방 또는 치료에 효과가 있으며 안전하게 사용할 수 있는 천연물 유래 조성물에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 특히 우리나라 대표 채소류인 무 추출물을 이용하여 제조되는 건강식품들은 많은 효소와 생리활성 물질들을 함유하고 있으므로 새로운 생리조절 기능과 신진대사 기능의 촉진 및 각종 질병에 대한 예방 효과가 커서 근래에 수요가 급증하고 있고, 국내의 시장규모도 확대되고 있다[7,8].

따라서 본 연구에서는 오랫동안 식품으로 이용되어 천연물 소재로서 인체에 무해하고 우리나라 대표 채소류인 무 추출물을 이용하여 궤양성 대장염에 우수한 효능을 나타낼 수 있음을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 열처리된 무 추출물(SRE)의 제조

본 실험에 사용한 무는 농수산물 시장에서 구입하여 세척한 후 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 정도의 크기로 절단하여 동결건조 하였다. 동결건조된 시료를 10 kg/cm² 이상의 압력에서도 견딜수 있도록 고안, 제작된 열처리장치(Jisco, Seoul, Korea)의 내부 구획 용기에 넣고, 외부 구획의 용기에는 물을 넣어 140~150℃에서 6시간 열처리 하였다. 열처리된 시료를 냉각한 후, 분쇄기를 사용하여 마쇄하고 10배(v/v) 증류수를 가하여 60℃에서 2시간 추출하였다. 추출액은 여과한 후 동결건조하여 사용하였다.

2. 실험동물의 준비 및 궤양성 대장염의 유발

세포동물실험은 동물실험 안내 지침에 따랐으며, 대구한의대학교 윤리위원회의 승인을 받았다. 22~24g의 8주령 수컷 Balb/c 마우스를 오리엔트(경기도, 대한민국) 으로부터 구입하여, 온도 (24±2℃)와 습도 (60%) 및 12시간의 명암주기가 유지되는 조건에서

1주일간 순응시켰다. 이후 5.0%(w/v)의 DSS(Dextran Sulfate Sodium, mw 36,000~50,000 Daltons, MP biologicals)가 용해된 음용수를 7일간 경구투여 하여 만성 대장염을 유발하였다. 정상대조군에는 전 실험기간동안 DSS가 함유되지 않은 음용수를 공급하였으며, 대장염이 유발된 36마리의 마우스는 임의로 9마리씩 30sulfa, 60sulfa, 실험군 및 음성대조군의 4개의 군으로 나누었다. 양성대조군에는 설파살라진(Sigma-Aldrich)을 30 또는 60 mg/kg/day의 용량으로(30sulfa, 60sulfa), 실험군에는 열처리한 무 추출물을 10 mg/kg/day의 용량으로 10일 동안 1일 1회 경구투여 하였다[9, 10].

3. 케양성 대장염 및 항염증 효능 평가

약물 투여가 실험동물의 체중에 미치는 영향을 파악하기 위하여 투여기간 중 실험동물의 몸무게를 측정하였다. 투여 10일 후 동물들을 희생시킨 후 전체 대장을 즉시 추출하고 총 점막 손상을 시험하였다[11]. 대장 조직을 10% 포르말린용액에 고정화하고 파라핀에 임베딩한 후 2 mm 두께로 슬라이스 하여 H/E 염색을 실시하였다[11, 12].

4. 혈청 내 활성산소종(ROS) 및 NADPH 산화효소의 발현 측정

혈액시료는 마우스의 희생과정에서 마취된 마우스로부터 심장천자에 의해 채취하였다. 혈청은 분석을 위하여 -80℃에 보관하며 사용하였다. 혈청 내 ROS 수준은 Ali 등의 방법을 이용하여 측정하였다[12]. 간략하게는 25 mM DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular Probes)를 혈청에 가하여 30분간 배양한 후, 여기 파장 486 nm, 발광 파장 530 nm의 조건에서 형광값의 변화로 ROS 수준을 측정하였다. NADPH 산화효소의 발현 수준 평가를 위하여, Komatsu 등의 방법에 의해 대장 조직으로부터 단백질을 추출하였다. 사이토졸 분획을 위한 대장 조직은 10 mM HEPES(pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1 mM PMSF(phenyl-methylsulfonyl fluoride, Sigma-Aldrich) 및 1,250 μl protease inhibitor 혼합 용액(Wako Pure Chemical Industries)을 함유하는 차가운 lysis buffer A 205 ml로 균질화 하였다. 균질물은 4℃에서 20분간 배양하고,

10% NP-40을 가한 후 혼합하였다. 4 °C에서 Eppendorf 5415R(Hamburg, Germany)를 사용하여 13,400×g로 2 분간 원심분리하고 상등액(사이토졸 분획)을 분리하였다. 잔사를 완충액 A로 2회 세척한 잔사를 완충액 A로 2회 세척한 후 50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1% (v/v) glycerol 및 100 μL protease inhibitor 혼합 용액을 함유하는 lysis 완충액 C 20 ml에 현탁시키고 4 °C에서 30분간 배양하였다. 13,400×g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 분리하여 핵 분획을 제조하였다. 사이토졸 분획과 핵 분획은 모두 -80 °C에서 보관하며 사용하였다. anti-NOX4(LifeSpan BioSciences), anti-p47^{phox}(1:1,000, SC-14015, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 및 anti-Rac(1:1,000, SC-217, Santa Cruz Biotechnology, Inc.)을 사용하여 사이토졸 분획으로부터 면역블랏팅에 의해 NADPH 산화효소의 발현을 평가하였다[13,14].

5. 전염증 사이토카인의 발현 평가

혈청중 iNOS, COX-2와 같은 전염증 매개자 및 IL-1, TNF-α와 같은 전염증 사이토카인의 발현 수준을 면역 블랏팅에 의해 측정하였다[14,15].

6. 아포토시스에 대한 영향 평가

아포토시스는 조직 내에서 기능이 없는 세포의 과다 축적을 방해하는 것으로 알려져 있다. 염증 조건에서 장 점막이 ROS에 지속적으로 노출되면 상피세포의 아포토시스가 증가하여, 장 장벽의 무결성을 변화시키고 장 손상을 야기한다. Bcl-2는 항 아포토시스 분자로 간주되며, Bax는 Bcl-2와 결합하고 길항(antagonize)하여 항 아포토시스 작용을 나타낸다. 카스카제-3 활성화는 세포사에 중요한 역할을 한다. 이에 혈청 내 아포토시스 관련 단백질을 면역블랏팅으로 분석하였다[16,17].

III. 실험결과

3.1. 대장염이 유발된 실험동물에서 열처리된 무추출물이 체중 및 대장조직에 미치는 영향

약물 투여가 실험동물의 체중에 미치는 영향을 파악하기 위하여 투여기간 중 실험동물의 몸무게를 측정하

었다. 투여 10일 후 동물들을 희생시킨 후 전체 대장을 즉시 추출하고 총 점막 손상을 시험하였다. Figure 1은 그 결과를 보여주는 것으로 (a)는 각 군별로 실험기간 중 체중 변화를 보여주는 그래프이며, (b)는 각 군별 대표적인 전체 대장의 사진이고, (c)는 군별 대장의 길이를 도시한 그래프이며, (d)는 H/E 염색한 대장의 40배율 사진이다. 대장 조직은 액체질소로 즉시 냉동시켜 보관하며 사용하였다.

저히 감소되었다.

3.2. 열처리된 무추출물이 혈청 내 ROS 및 NADPH 산화 효소의 발현에 미치는 영향

종래 보고된 연구 결과에 의하면 대장염 환자에서 ROS가 증가하여, 산화적 세포 손상을 야기하고 암을 유발한다. ROS의 주된 생성자는 NOX4, p47^{phox}, Rac를 포함한 NADPH 산화 효소이다.

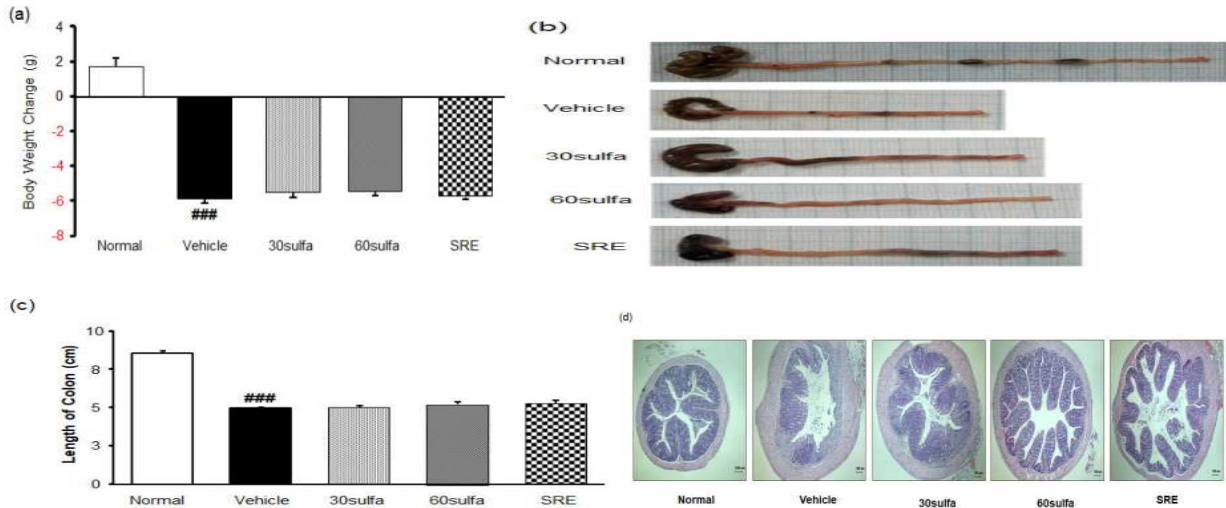


그림 1. 대장염이 유발된 실험동물에서 무추출물이 체중 및 대장 조직에 미치는 영향

Figure 1. SRE alleviated dextran sodium sulfate-induced experimental colitis.

(a) Body weight changes after induction of colitis by dextran sodium sulfate (DSS); (b) Macroscopic appearance; and (c) Length of colon (d) H/E staining of colon magnification×40. Data are mean ± S.E.M. (n=7). Significance: ###P<0.001versusnormalrats.

Figure 1에서 확인할 수 있듯이, DSS에 의해 유발된 대장염은 정상대조군에 비해 체중과 대장의 길이를 현저하게 감소시켰다. 대장의 길이는 대장염의 정도를 반영하는 것으로 알려져 있다. 설파살라진과 무추출물은 체중 및 대장 길이의 감소를 완화시킴을 확인할 수 있었다. 궤양성 대장염은 대장 점막 조직을 파괴하고, 궤양을 형성하여 염증성 단핵구나 대식세포와 같은 염증성 세포를 침윤시키며 점막고유층(lamia propria)를 두껍게 만든다. 이러한 변화를 관측하기 위하여 대장 조직을 10% 포르말린용액에 고정화하고 파라핀에 임베딩한 후 2 mm 두께로 슬라이스 하여 H/E 염색을 실시하였다. 염색된 조직의 광학현미경 이미지를 보여주는 Figure 1의 (d)에서, 정상대조군은 정상적인 선와(crypt) 형상을 나타내었으며, 배상세포(goblet cell)가 풍부하고 점막이 두꺼워지는 현상이나 궤양 역시 전혀 관측되지 않았다. 이에 반해 음성대조군에서는 다양한 손상이 관측되었으며, 이러한 손상은 설파살라진이나 무추출물에 의해 현

이에 대장염 동물 모델의 혈청에서의 ROS와 관련 NADPH 산화효소의 발현을 평가하였다. Figure 2는 ROS 및 NADPH 산화효소의 발현수준 평가 결과를 보여주는 결과로, 궤양성 대장염의 유발에 따라 혈청내 ROS 수준이 크게 증가하였으나, 설파살라진 또는 열처리된 무추출물에 의해 정상 대조군보다도 낮은 수준으로 감소하였다. 대장염의 유발군에서는 NADPH 산화효소의 발현 역시 크게 증가시켰다. 음성대조군에 비해 NADPH 산화효소 중 NOX4와 p47^{phox}는 설파살라진에 의해서는 유의적으로 발현이 감소하지 않았으나, 무추출물은 발현을 유의적으로 감소시켰다. 반면 Rac1의 발현은 30sulfa 군에서만 유의적으로 감소하였다. 결과로, 궤양성 대장염의 유발에 따라 혈청내 ROS 수준이 크게 증가하였으나, 설파살라진 또는 무추출물에 의해 정상대조군보다도 낮은 수준으로 감소하였다. 대장염의 유발군에서는 NADPH 산화효소의 발현 역시 크게 증가시켰다. 음성대조군에 비해 NADPH 산화효소 중 NOX4와

p47^{phox}는 설파살라진에 의해서는 유의적으로 발현이 감소하지 않았으나, 무 추출물은 발현을 유의적으로 감소시켰다.

현수준을 면역블랏팅에 의해 측정하고 그 결과를 Figure 3에 나타 내었다.

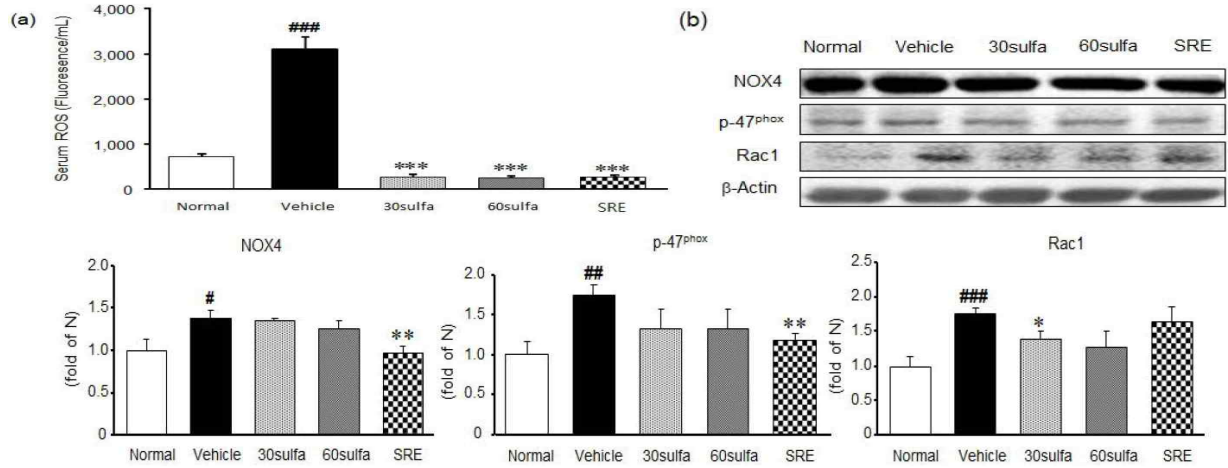


그림 2. 무 추출물이 혈청 내 ROS 및 NADPH 산화효소의 발현에 미치는 영향

Figure 2. SRE decreased serum ROS and NADPH oxidase activity in colon. (a) serum ROS (b) NOX4, p47^{phox}, and Rac1 protein expressions. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa; sulfasalazine 30mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60mg/kg-treated mice. Data are mean ± S.E.M. (n=7) Significance: #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 versus normal mice and **P<0.01, ***P<0.001 versus DSS control mice.

3.3. 무추출물이 혈청내 내인성 항산화 효소의 발현에 미치는 영향

Rac1의 발현은 30sulfa 군에서만 유의적으로 감소하였다. 일반적으로 ROS는 내인성 항산화효소에 의해 중화되었다. 즉, SOD는 O²를 H₂O₂로 변환시키며, H₂O₂는 이어 카탈라아제 및 GPx-1/2에 의해 물로 중화되었다.

Figure 3에서 확인할 수 있듯이, 내인성 항산화효소인 SOD, 카탈라아제 및 GPx-1/2와 같은 효소성 항산화제의 활성은 정상대조군에 비해 음성대조군에서 감소되었다. 무추출물은 설파살라진에 비해 SOD와 카탈라아제의 활성을 현저하게 증가시켰으며, GPx-1/2의 발현에 대해서는 무추출물과 설파살라진 모두 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

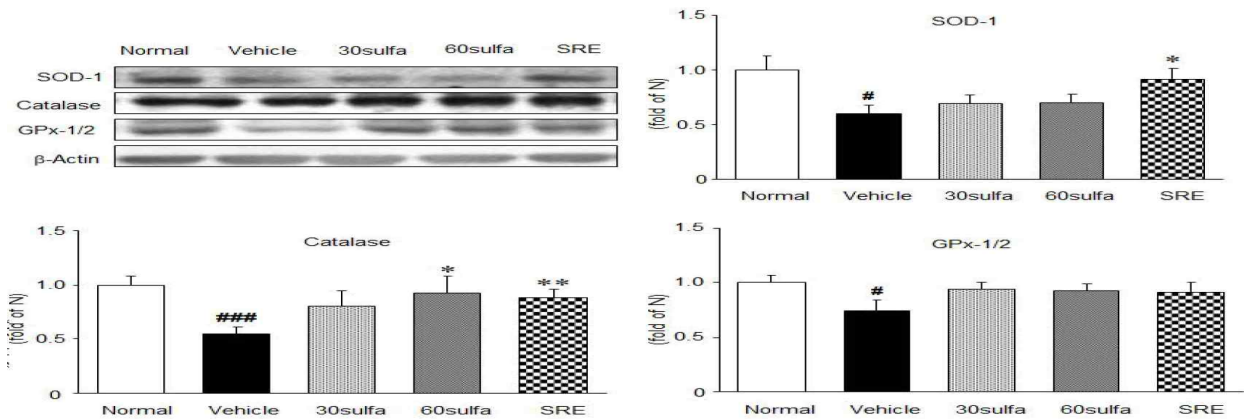


그림 3. 무추출물이 혈청내 내인성 항산화 효소의 발현에 미치는 영향

Figure 3. Effect of SRE on anti-oxidant proteins in DSS-induced colitis mice. SOD, Catalase, GPx-1/2 protein expressions. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa; sulfasalazine 30 mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60mg/kg-treated mice. Data are mean ± S.E.M. (n=7) Significance: ###P<0.01, ####P<0.001 versus normal mice and *P<0.05, **P<0.01 versus DSS control mice.

이에 혈청의 사이토졸 분획 중 내인성 항산화효소의 발

이와 같은 결과는 무추출물의 투여가 항산화효능에 의

해 장 손상을 감소시킴을 알 수 있었다.

3.4. 무추출물이 혈청 내 MAPK 활성화에 미치는 영향

ROS 과발현은 p38, ERK1/2를 포함하는 MAPK를 활성화시킨다. p38과 ERK1/2에 대한 MAPK 캐스케이드는 질병, 아포토시스 및 외부자극에 대한 세포 반응을 포함하는 많은 부분에서 유전자 또는 단백질의 발현과 세포내 대사의 조절에 주요한 역할을 한다. 이에 사이토솔 분획으로부터 c-Fos, Histone, p-38, p-ERK의 발현 수준을 면역블랏팅에 의해 평가하였다. Figure 4는 그 결과를 보여주는 도면으로 대장염 유발에 의해 c-Fos, p-p38 및 p-ERK의 발현 수준이 크게 증가하였다. 설파살라진과 무추출물은 c-Fos 단백질의 발현을 억제하여 p-p38 및 ERK의 발현을 크게 억제하였다. 무추출물의 경우 p-p38에 비해 p-ERK의 발현에 대한 억제 효과가 더욱 현저하였다.

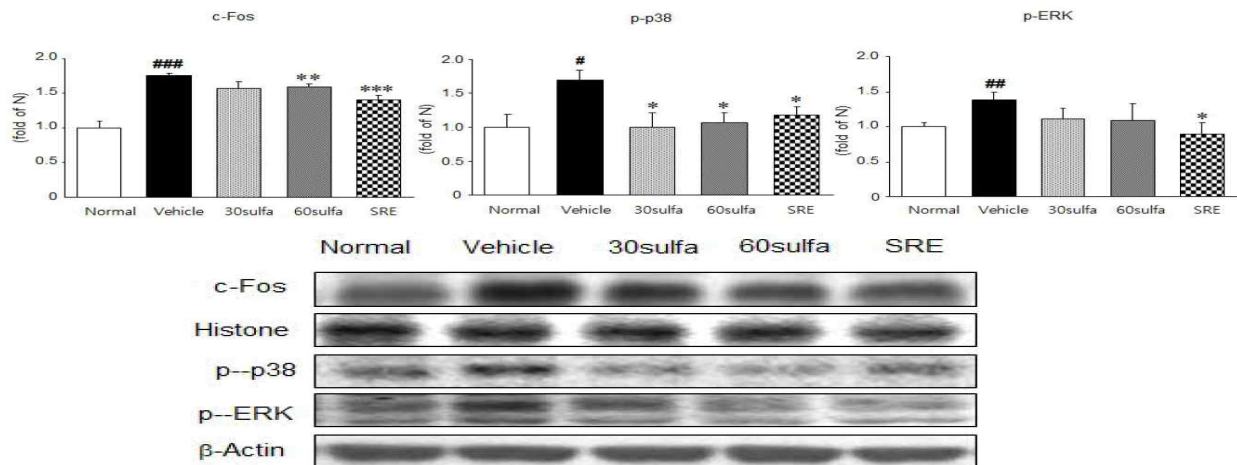


그림 4. 무추출물이 혈청 내 MAPK 활성화에 미치는 영향

Figure 4. c-Fos, p-p38, and p-ERK protein expressions in DSS-induced colitis. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa, sulfasalazine 30 mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60 mg/kg-treated mice. Data are mean \pm S.E.M. (n=7) Significance: #P<0.05,###P<0.001 versus normal mice and *P<0.05,***P<0.001 versus DSS control mice.

3.5. 무추출물이 혈청 내 전사 요소의 활성화에 미치는 영향

핵전사 요소 NF- κ B는 면역이나 염증 반응과 같은 많은 중요한 병리학적 과정을 제어한다. 활성화에 앞서, NF- κ B는 세포질내에서 NF- κ B를 불활성 상태로 유지시키는 저해성 단백질인 I κ Ba와 복합체를 형성한다. 다양한 자극에 의해 I κ Ba가 인산화되고, 유비퀴틴화되고 분해되면서 NF- κ B가 분비되면서 세포질에서 핵으로 이동한다. NF- κ B 경로를 억제하는 물질을 사용하여

점막 염증을 제어하기 위한 시도들이 마우스 동물 모델에서 일부 성과를 거두었다. 이에 무추출물의 투여에 의해 I κ Ba의 인산화를 억제하여 NF- κ B의 활성화를 저해하지 면역블랏팅으로 확인하였다. Figure 5에서 정상대조군에 비해 음성대조군은 p-I κ Ba이 크게 증가하였으며, 무추출물의 투여는 I κ Ba의 인산화를 현저히 감소시킴을 확인할 수 있다. 이에 따라, 무추출물은 NF- κ B의 발현 역시 감소시켰다. 또한 무추출물은 설파살라진에 비해 현저한 효과를 나타내었다.

3.6. 무추출물이 혈청 내 전염증 매개자 또는 전염증 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 보여주는 이미지 및 그래프

혈청 중 iNOS, COX-2와 같은 전염증 매개자 및 IL-1, TNF- α 와 같은 전염증 사이토카인의 발현 수준을

면역블랏팅에 의해 측정하고 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 대장염 유발군은 정상대조군에 비해 전염증 매개자 및 전염증 사이토카인의 발현이 증가하였다. 무추출물은 대장염 유발에 의해 증가된 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β 및 MCP-1의 발현을 유의적으로 억제하였다. 또한 MCP-1을 제외하고는 상기 발현에 대한 억제효과가 설파살라진에 비해 우수하였다.

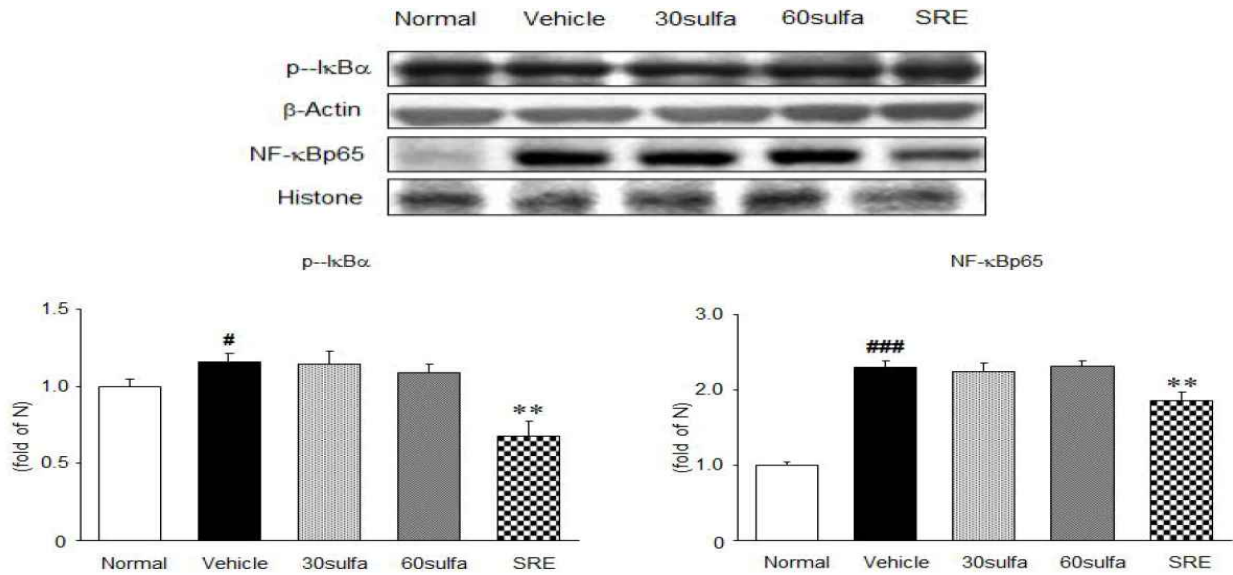


그림 5. 무추출물이 혈청내 핵전사 요소의 활성화에 미치는 영향

Figure 5. p-IκBα and NF-κBp65 protein expressions in DSS-induced colitis. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa; sulfasalazine 30 mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60 mg/kg-treated mice. Data are mean ± S.E.M. (n=7) Significance: #P<0.05, ###P<0.001 versus normal mice and **P<0.01 versus DSS control mice.

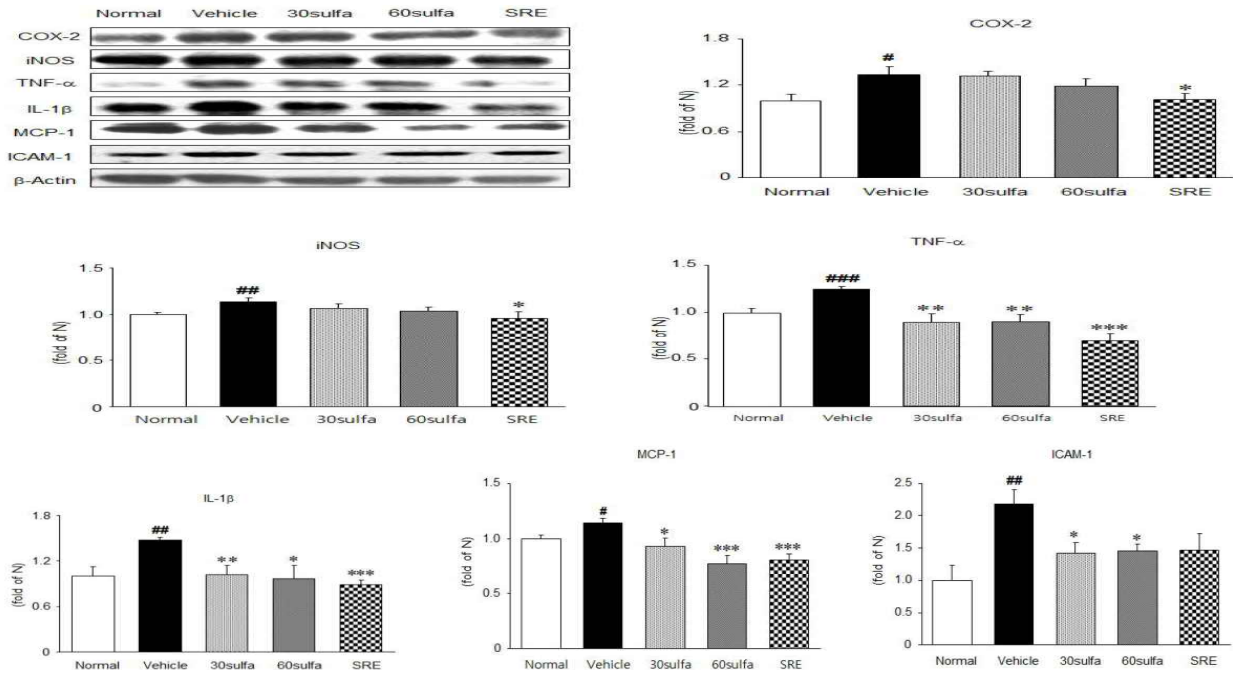


그림 6. 무추출물이 혈청내 전염증 매개자 또는 전염증 사이토카인의 발현에 미치는 영향

Figure 6. COX-2, iNOS, MCP-1, ICAM-1, TNF-α, and IL-1β protein expressions in DSS-induced colitis. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa; sulfasalazine 30 mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60mg/kg-treated mice. Data are mean ± S.E.M. (n=7) Significance: ##P <0.01, ###P <0.001 versus normal mice and *P <0.05, ***P <0.001 versus DSS control mice.

3.7. 무추출물이 아포토시스에 미치는 영향

아포토시스는 조직 내에서 기능이 없는 세포의 과다 축적을 방해하는 것으로 알려져 있다. 염증 조건에서 장 점막이 ROS에 지속적으로 노출되면 상피세포의 아포토시스가 증가하여, 장 장벽의 무결성을 변화시키고 장 손상을 야기한다. Bcl-2는 항 아포토시스 분자로 간주되며, Bax는 Bcl-2와 결합하고 길항(antagonize)하여 항 아포토시스 작용을 나타낸다. 카스파제-3 활성화는 세포사에 중요한 역할을 한다. 이에 혈청 내 아포토시스 관련 단백질을 면역블랏팅으로 분석하고 그 결과를 Figure 7에 나타내었다. Figure 7에서 확인할 수 있듯이 Bcl-2의 발현을 유의적으로 증가시키지는 못했으나, Bax 단백질과 카스파제-3의 발현을 유의적으로 억제하였다.

바 없어 독성에 대한 우려없이 안전하게 사용할 수 있으며, 유용성분을 다량 함유하나 부산물로서 폐기되는 자원을 활용한 것으로 매우 경제적으로 제조할 수 있으므로 저가로 공급이 가능하다. 무 추출물은 궤양성 대장염의 예방 및 치료용 약학 조성물은 궤양성 대장염 유발에 의한 대장의 길이 감소와 조직학적 변화에 의한 대장 길이의 감소나 조직학적 변화를 효과적으로 억제하였다. 또한 전염증 매개자 및 전염증 사이토카인의 발현을 현저하게 억제하였으며, 항아포토시스 효과를 나타내었다. Sulfasalazine 또는 SRE 투여는 체중 감소 및 결장 길이의 단축을 감소시키는 것을 포함하는 항염증 효과를 유도하는 반면, DSS- 처리 그룹중 체중 변화 및 결장 길

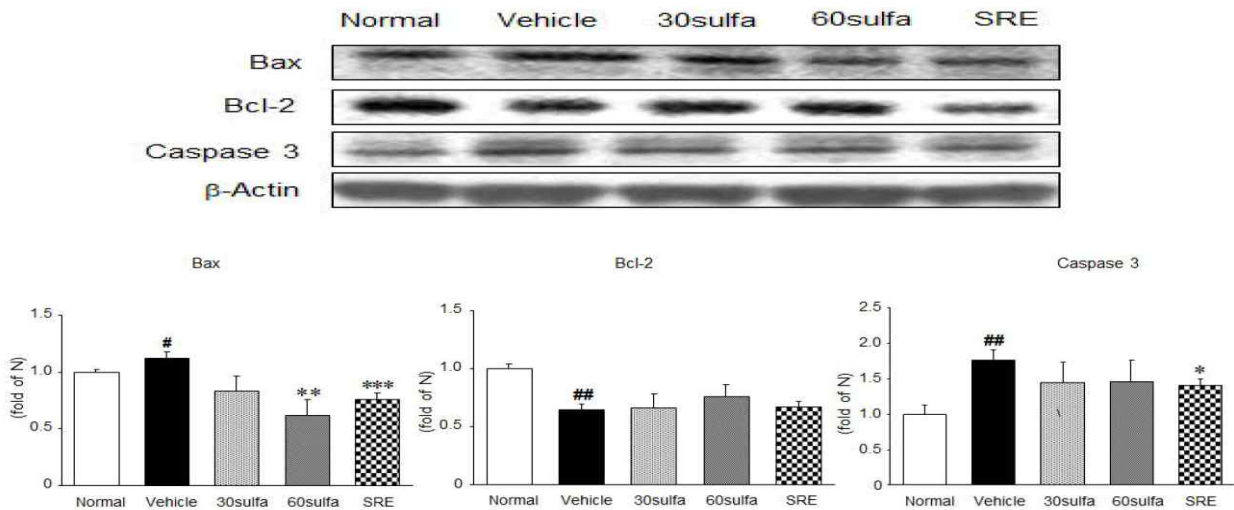


그림 7. 무 추출물이 아포토시스에 미치는 영향

Figure 7. Bax, Bcl-2, and Caspase 3 protein expressions in DSS-induced colitis. Normal, normal mice; Vehicle, DSS control mice; 30sulfa; sulfasalazine 30 mg/kg-treated mice; 60sulfa, sulfasalazine 60mg/kg-treated mice. Data are mean \pm S.E.M. (n=7) Significance: #P<0.05,##P<0.01 versus normal mice and *P<0.05,***P<0.001 versus DSS control mice.

V. 결론

본 연구는 무껍질과 무청은 무우의 먹을 부분이지만 무를 먹기 전에 제거되고 질기고 거친 질감 때문에 부산물이나 동물 사료로 사용된다. 따라서 본 연구는 무의 이러한 생리 활성을 증가시킬 수 있는 실험을 진행하였다. 그 결과 부산물을 포함하는 무를 추출하는 동안 열처리 조건에 따라 무 추출물을 유효성분으로 함유하는 궤양성 대장염의 예방 및 치료용 약학 조성물은 오랫동안 식용으로 섭취해왔음에도 불구하고 독성이 보고된

이에서 유의성은 거의 없었다. 대장 염증은 결장 점막 및 궤양의 장치의 붕괴를 포함하여 염증성 단핵구 및 대식 세포와 같은 염증 세포의 침윤 및 고유 점막의 농후화를 초래한다. 정상군의 결장은 정상적인 담낭 형태, 풍부한 양의 세포, 점막 비후의 징후가 없었으며 궤양이 완전히 없었다. 반대로, 미량 손상은 SRE 또는 설파살라진 군에서 DSS 대조군보다 현저히 낮았다. DSS 손상은 정상군에 비해 현저하게 높았으며 혈청 ROS의 증가

는 정상군과 SRE군과 sulfasalazine군에서 유의하게 감소하였다. 대장에서 NOX4와 p47phox의 NADPH 산화효소 활성의 지표인 단백질 발현이 DSS 대조군에서 증가하였다. 그러나 SRE 처리군은 NADPH 산화효소를 유의하게 낮추었으며, 설과살라진 투여군은 의미있게 감소하지 않았다. 그렇지 않으면, Rac 1 발현은 감소하는 경향을 보였다. 일반적으로 ROS는 내인성 항산화 효소에 의해 중화되는 것으로 알려져 있다. SOD는 O₂⁻를 H₂O₂로 전환 시키며, H₂O₂는 이후 Catalase 및 GPx-1/2에 의해 물로 중화된다. SOD, Catalase, GPx-1/2와 같은 효소적 항산화제의 활성은 DSS 유도 군에서 감소하였다. 여기에서, SRE 투여는 GPx-1/2 (유의성 없음)를 제외하고는 SOD 및 카탈라아제의 활성을 유의적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 대장염의 SRE 치료가 항산화 효과에 의한 결장 손상의 정도를 감소시킬수 있음을 나타내었다. 특히 SRE 보충은 설과살라진 단독 요법보다 우수하였다. NF-κB의 활성화는 산화제/항산화제 균형을 붕괴시킨다. TNF-α는 손상된 조직의 부위와 UC의 발병 기원에서 면역 세포를 모집하는 데 중요하다. TNF-α와 IL-1β뿐만 아니라 COX-2와 iNOS는 DSS 대조군에서 두드러지게 증폭되었다. 이상의 결과는 또한 SRE가 COX-2 및 iNOS 발현의 유도 및 TNF-α 및 IL-1β와 같은 전염증성 사이토카인의 생성을 유의하게 억제한다는 것을 나타내었다. 이 단백질 수준은 거의 정상 수준으로 하향조정 되었다. MCP-1은 염증 조직으로의 단핵구 침윤을 촉진하고 MCP-1의 상승된 수준은 IBD 환자의 장점막에서 발견될 수 있었다. 따라서, SRE 처리에 의해 감소된 MCP-1은 염증 세포의 장내로의 끌림을 감소시켜 염증 반응을 감소시킬수 있었다. TNF-α가 내피 투과성을 증가시키고 부분적으로 세포내 부착 분자 (ICAM)의 합성을 자극하여 장에 대한 호중구 모집을 유도한다는 몇몇 연구가 있다[18-20]. ICAM-1은 염증 부위에서 상향 조절됩니다. 이 연구와 유사하게, DSS 대조군은 정상 군에 비해 유의하게 증가한 반면, SRE 치료는 감소 경향을 보였다. SRE는 Bax와 Caspase 3 같은 pro-apoptotic 유전자에 대한 실질적인 down-regulation을 보였다. 한편, UC 동안의 Bcl-2 단백질 발현은 경미한 증가만으로 현저한 차이를 보이지 않았다.

결론적으로, 본 연구 결과는 열처리된 무 추출물은 DSS로 유발된 대장염의 효과적인 억제제임을 시사한

다. DSS로 처리한 생쥐에 대한 열처리된 무 추출물 투여는 결장에서 급성 염증 및 세포 사멸을 약화시켰다. 무엇보다도 SRE는 설과살라진 단독으로도 유사한 보호 효과를 나타낼 수 있다. 따라서 열처리된 무 추출물은 케양성 대장염의 치료에서 설과살라진과 결합된 유망한 물질 소재로서도 제품 적용화 및 활용도가 높은 기술로 사료된다.

References

- [1] Kim HY, "The effects of fruit and vegetable bark extract on learning ability and memory improvement," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(3), pp. 261-267, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.261>.
- [2] Kim DB, Ahn EY and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [3] Kim HK, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [4] Jung JS, Kwon J, Jung SH, Lee MW, Mariappan V and Cha JS, "Impact of SV40 T antigen on two multiple fission microalgae species *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris*," *International Journal of Advanced Smart Convergence(IJASC)*, Vol. 6, No.1, pp.82-88, March 2017.
- [5] Jeon HJ, Hafeez J, Hamacher A, Lee S and Kwon SC, "A study on the quality of photometric scanning under variable illumination conditions," *International Journal of advanced smart convergence(IJASC)*, Vol. 6, No. 4, pp. 88-95, June 2017.
- [6] Kim K, "Physiological functionalities and anti-oxidant activity of heated radish extract", *International Journal of advanced smart convergence(IJASC)*, Vol. 7, No. 2, pp. 38-46, June 2018.
- [7] Shailubhai K, Palejwala V, Arjunan KP, et al., "Plecanatide and dolcanatide, novel guanlylate

- cyclase-C agonists, ameliorate gastrointestinal inflammation in experimental models of murine colitis," *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, Vol. 6, No. 4, pp. 213-222, November 2015.
- [8] Kaser A, Zeissig S and Blumberg RS, "Inflammatory bowel disease," *Annual review of immunology*, Vol. No. 28, pp. 573-621, January 2010.
- [9] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC and Sandborn WJ, "Ulcerative colitis," *The Lancet*, Vol. 380, No. 9853, pp.1606-1619, November 2012.
- [10] Ross AS, and Cohen RD, "Medical therapy for ulcerative colitis: the state of the art and beyond," *Current gastroenterology reports*, Vol. 6, No. 6, pp. 488-495, December 2004.
- [11] Xiao HT, Peng J, Hu DD, et al., "Qing-dai powder promotes recovery of colitis by inhibiting inflammatory responses of colonic macrophages in dextran sulfate sodium-treated mice," *Chinese medicine*, Vol. 13, No. 10, pp. 29, October 2015.
- [12] V.W. Wong, M.Y. Law, A.Y. Hui et al., "A hospital clinic-based survey on traditional Chinese medicine usage among chronic hepatitis B patients," *Complementary therapies in medicine*, Vol. 13, No. 3, pp. 175-182, September 2005.
- [13] Hattori T, Nagamatsu T, Ito M and Suzuki Y, "Studies on antinephritic effect of TJ-8014, a new Japanese herbal medicine, and its mechanisms (1): Effects on original-type anti-GBM nephritis in rats and platelet aggregation," *Japanese journal of pharmacology*, vol. 52, no. 1, pp. 477-485, September 1990.
- [14] Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A and Yamamoto-Furusho JK, "Role of cytokines in inflammatory bowel disease," *World journal of gastroenterology*, Vol. 14, No. 27, pp. 4280-4288, July 2008.
- [15] B.R. Jin, K.S. Chung, S.Y. Cheon et al., "Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF- κ B and STAT3 activation," *Scientific reports*, Vol. 7, pp. 46252, April 2017.
- [16] Rogler G, "Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD," *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, Vol. 24, No. 2, pp. 157-165, April 2010.
- [17] Buchheister S, Buettner M, Basic M, et al., "CD14 Plays a Protective Role in Experimental Inflammatory Bowel Disease by Enhancing Intestinal Barrier Function," *The American journal of pathology*, Vol. 187, No. 5, pp. 1106-1120, January 2017.
- [18] Pandurangan AK, Ismail S, Saadatdoust Z, Esa NM, "Allicin Alleviates Dextran Sodium Sulfate-(DSS-) Induced Ulcerative Colitis in BALB/c Mice," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2015, pp. 605208, April 2015.
- [19] Wei DD, Lin XH, Wang HC, et al., "Apocynin relieves inflammation in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis mice: the role of NOXs-ROS-p38MAPK pathway," *Sheng Li Xue Bao*, vol. 67, no. 1, pp. 74-82, February 2015.
- [20] Islam MS, Murata T, Fujisawa M, et al., "Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice," *British Journal of Pharmacology*, Vol. 154, No. 4, pp. 812-824, June 2008.