

DSS로 궤양성 대장염 유발된 동물모델에서 薏苡芽 열수 추출물의 개선 효과

김민주^{1#}, 신미래^{1#}, 이진아¹, 박순애², 박해진³, 이정훈⁴, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 한방식품조리영양학부
3 : DHU 바이오융복합시험센터, 4 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Improvement Effect of Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf Water Extract on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice.

Min Ju Kim^{1#}, Mi-Rae Shin^{1#}, Jin A Lee¹, Soon-Ae Park²
Hae-Jin Park³, Jeong Hoon Lee⁴, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University,
2 : Department of Herbal Food Cuisine & Nutrition, Daegu Haany University,
3 : DHU Bio Convergence Testing Center, 4 : Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA

ABSTRACT

Objectives : The objective of this study was to investigate the improvement effect of Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract (SC) on the dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis mice.

Methods : The antioxidant activity of SC was measured through total polyphenol and total flavonoid content in vitro. The experiment was conducted with seven-week-old male Balb/c mice. After 1 week adaptation, acute colitis was induced by oral administration of 5% DSS dissolved in drinking water, for 7 days. And normal mice received drinking water without DSS throughout the entire experimental period. For each experiment, the mice were divided into 4 groups and 24 colitis mice were arbitrarily allocated into 3 groups (n = 8/group); Normal group, Control group, SC 100 mg/kg treated group (SCL), SC 200 mg/kg treated group (SCH). Serum and colon tissues were collected after one weeks of drug administration.

Results : ROS levels, ONOO⁻ levels, AST, and ALT in serum were decreased in SC treated groups compared to the control group. Western blotting measurements of Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2, IL-4, IL-10, and Bcl2 showed that the SC treated groups was increased compared to the Control group. Also, western blot measurements of NF-κBp65, p-IκBα, COX-2, iNOS, TNF-α, IL-1β, Bax, and Caspase-3 showed that the SC treated groups was reduced compared to the Control group.

Conclusion : Taken together, these results suggest that SC treatment can attenuate the DSS-induced colitis though inhibiting NF-κB pathway and enhancing Nrf2 pathway. Therefore, SC was the potential to be used as a natural therapeutic drug.

Key words : Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf, Colitis, Dextran sulfate sodium (DSS), Anti-oxidant, Inflammation, Anti-inflammation, Necrosis

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Min Ju Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

Mi-Rae Shin, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea,

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : with750@naver.com

· Received : 12 Oct, 2020 · Revised : 10 Nov, 2020 · Accepted : 25 Nov, 2020

I. 서론

염증성 장질환 (inflammatory bowel disease, IBD)은 소장 또는 대장에서 반복적으로 비정상적인 염증반응이 발생하는 질환을 말한다¹⁾. 이러한 IBD는 심한 만성 설사와 혈변 및 복통 등을 유발할 수 있다고 알려져 있다²⁾. IBD는 정확하게 밝혀진 원인은 없으나 환경적 요인, 유전, 면역 및 염증반응에 장내 세균 등이 관련되어져 있는 것으로 알려져 있다³⁾. 대표적으로는 크론병 (Crohn's disease, CD)과 궤양성 대장염 (ulcerative colitis, UC)이 있다⁴⁾. 그 중 UC는 직장과 결장에서 증상이 나타나는 질환으로 정상적인 대장 조직은 점막, 점막하조직, 근육층 및 장막으로 나누어지는데, UC의 발생에 따라 점막 및 점막하조직에서 병리학적으로 변화가 나타나게 된다⁵⁾. 주로 미국 또는 유럽과 같은 육식을 즐겨하는 나라에서 나타나며, 최근에는 우리나라에서도 유병률이 증가하는 추세를 보이고 있다⁶⁾.

한의학에서는痢疾,泄瀉,便血,痢疾,腸癖의 범주에 속하며, 구체적으로痢疾 중에서는赤痢와膿血痢와 밀접하다고 보며,泄瀉 중에서는火泄,便血 중에서는腸風과 밀접하다고 할 수 있으며,腸癖은痢疾과 같은 범주로 본다³⁾. 병의 원인으로서는飲食不節로脾腎虛,大腸濕鬱氣滯,脾胃損傷,肝氣鬱結로橫逆犯胃 등이 있다고 한다⁷⁾.

울무 (*Coix lacryma-jobi* var. *mayeun* Stapf)는 벼과에 속하는 초본 식물로 원산지는 중국과 일본 등 동남아시아이며 현재에는 다른 나라에서도 널리 재배되어지고 있다⁸⁾. 우리나라에서는 종자를 사용하여 통증완화와 이뇨, 염증 등에 사용되어져 왔으며, 또한 식욕을 억제하는 효능이 있어 현재에는 비만 치료제로도 널리 사용되어지고 있다⁹⁾.

한의학에서는 울무의 종자를 薏苡仁이라고 부르며, 그 性味는 涼하고 甘淡하여 健脾滲濕, 清熱排膿 및 除痺止瀉 등과 같은 효능이 있어 脚氣, 脾虛泄瀉, 水腫, 腸癰 등의 병증을 치료한다고 알려져 있다¹⁰⁾.

현재 薏苡仁에 대한 연구들은 많이 진행되어져 왔지만 薏苡仁에서 싹이 트는 동안 얻어낸 薏苡芽 (Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayeun* Stapf)에 대한 연구들은 아직 미비하기에 본 연구에서는 dextran sulfate sodium (DSS)로 유발된 대장염 동물 모델에서 薏苡芽 열수 추출물의 약리학적 효과를 연구하였고, 유의성 있는 결과를 나타내었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

본 실험에서 사용한 薏苡芽 (Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayeun* Stapf)은 조현울무 품종을 사용하여 생산하였으며, 2일간 종자소독, 침중하여 7일 상자재배 (온도 25℃, 습도 90%) 후 수확하여 58℃에서 3일 건조하였으며 (건조 수율 7%) 농촌진흥청 (Rural Development Administration, RDA)에서 공급받았다. 薏苡葉 100 g에 증류수 1 L를 가하여 100℃에서 2시간동안 끓여서 추출하였다. 추출물을 여과한

후 농축하여 파우더 형태로 만들었으며, 이를 SC라 명하였다 (수율 20%, 수분함량 4.615%). SC는 실험에 사용하기 직전까지 -80℃에서 보관되었다.

2. 시약

본 실험에서 사용된 Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, sodium carbonate, diethylene glycol, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, naringin, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dextran sodium sulfate (DSS)는 MP Biologicals (Santa Ana, CA, USA)에서 구입하였다. 1차 항체인 phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65 (NF-κBp65), inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (IκBα), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (p-IκBα), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukin-1 beta (IL-1β), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), super oxide dismutase (SOD), Catalase, B-cell lymphoma 2 (Bcl2), Bcl-2-associated X (Bax), cysteine aspartyl-specific proteases-3 (caspase-3), histone, β-actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Protease inhibitor mixture, DMSO, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였으며, 2', 7' Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였으며, 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3. 항산화 성분 분석

1) Total polyphenol 함량 측정

SC의 total polyphenol 함량을 측정하기 위해 Folin-Denis 방법¹¹⁾을 사용하였다. 증류수 790 μl에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μl와 SC 10 μl를 넣고 잘 혼합한 후, sodium carbonate solution (20% (v/v)) 150 μl 넣고 2시간 동안 실온에서 반응시킨다. 반응시킨 후, 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다.

2) Total flavonoid 함량 측정

SC의 total flavonoid 함량을 측정하기 위해 Lister¹²⁾에 기술된 방법을 사용하였다. 1 ml의 diethylene glycol에 1 N sodium hydroxide solution 10 μ l와 SC 100 μ l를 넣고 잘 혼합한 후, 1시간 동안 37°C에서 반응시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 사용하였다.

4. 궤양성 대장염 유발 및 효능 평가

1) 궤양성 대장염 유발 및 약물투여

7주령의 Balb/c 마우스 (22 ~ 25 g)를 대한바이오링크(음성, 한국)에서 구매하여, 물과 고형사료를 충분히 공급하며 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 명암주기는 12시간 주기, 온도 22 ± 2°C, 습도 50 ± 5%로 조절하였다. 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2020-042)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. 실험군은 정상군 (Normal), 대조군 (Control), 芽 열수 추출물 100 mg/kg/day로 경구 투여한 군 (SCL), 薏苡芽 열수 추출물 200 mg/kg/day로 경구 투여한 군 (SCH)으로 각 군당 8마리씩 4개의 그룹으로 나눈 뒤 일주일간 적응시킨 후, 실험을 진행하였다. 정상군을 제외한 나머지군은 일주일간 5% (w/v) DSS를 식수로 공급하여 궤양성 대장염을 유발하였다. 유발 8일째에 부검을 진행하였다. 부검 전날 24시간 절식 후, isoflurane을 사용해 흡입 마취하여 혈액을 심장에서 채취하였으며, 채취한 혈액은 10분간 4000 rpm로 원심분리기를 사용하여 혈청을 분리하였다. 그 후, 대장을 적출하여 길이를 측정하였으며, 혈청과 대장은 -80°C에서 보관하였다.

2) 산화적 스트레스 바이오마커 측정

심장에서 채혈한 혈액을 원심분리기를 이용하여 4000 rpm에서 10분간 혈청을 분리하였다. 혈청 내의 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 emission 530 nm와 excitation 485 nm에서 5분씩 간격을 두어 0분부터 30분간 측정된 값을 통해 산출하였다¹³⁾. 그리고 ONOO⁻를 측정하기 위하여, Kooy 등의 방법을 시행하여 측정하였다¹⁴⁾. 각 샘플을 pH 7.4의 rhodamine buffer와 5mM DHR123과 섞은 후 5분간 37°C에서 흔들어 준 후 5분 간격으로 emission 535 nm와 excitation 480 nm를 이용하여 0분부터 30분간 측정하여 나온 값을 통해 산출하였다.

3) 간 독성 지표 AST 및 ALT 측정

심장에서 채혈한 혈액을 원심분리기를 이용하여 4000 rpm에서 10분간 혈청을 분리하였다. 혈청 내에서 간독성 지표를 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

4) Western blotting

Western blotting 분석을 위하여 대장조직에 100 mM Tris-

HCl (pH 7.4), 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail, 0.1 M DTT, 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 첨가시킨 buffer A를 넣은 후, tissue grinder (Bio Spec Product, USA)를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄 후, 10% NP-40 용액을 첨가하여 20분간 ice 위에서 정치시킨 후, 12,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 세포질을 포함한 상층액을 분리시켰다. 상층액을 따고 남은 물질에 10% NP-40가 포함된 buffer A에 두 번 헹구고 100 μ l의 buffer C (0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 다음에 vortex를 10분간격으로 3번 하였다. 그 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 핵을 분리하였다. 세포질과 핵은 분리 후 -80°C에서 냉동 보관하였다. 세포질과 핵내의 단백질 발현을 측정하기 위해 8~10 μ g의 단백질을 10~12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 다음, membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T를 사용하여 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석 후 사용)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 다음, Sensi-Q2000 Chemidoc으로 단백질 발현을 확인한 후, ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 해당 band를 정량하여 실험군간에 발현량을 비교하였다 (represented as 1).

5. 통계분석

*In vitro*의 수치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, *in vivo* 수치는 평균과 표준편차로 표시하였다. SPSS (Version 25.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후검정을 실시하여 유의수준을 p -value < 0.05에서 검증하였다.

III. 결 과

1. Total polyphenol 및 flavonoid 함량 측정

SC의 항산화 성분 분석을 위하여 total polyphenol 및 flavonoid 함량을 측정하였다. SC의 total polyphenol 함량은 74.35 ± 0.18 mg/g으로 측정되었고, total flavonoid 함량은 17.31 ± 0.04 mg/g으로 측정되었다 (Table 1).

Table 1. Total Polyphenol, Total Flavonoid Contents of SC

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
SC	74.35 ± 0.18	17.31 ± 0.04

SC is Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract. All data are expressed mean ± SEM.

2. 체중 및 음수량

실험기간 동안 체중의 변화량은 Normal군 0.63 ± 0.22 g에 비하여 Control군은 -3.29 ± 0.13 g ($p < 0.001$)으로 유의하게 감소하였으며, Control군에 비하여 SCL군은 -2.65

± 0.25 g ($p < 0.05$), SCH군은 -1.98 ± 0.27 g ($p < 0.001$)으로 유의하게 증가하였다. 실험기간 동안 음수량은 하루 평균 Normal군 3.25 ± 0.26 ml/day, Control군 3.28 ± 0.16 ml/day, SCL군 3.21 ± 0.11 ml/day, SCH군 3.31 ± 0.19 ml/day으로 각 군간 유의성은 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. Body Weight and 5% DSS Intake

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	5% DSS intake (ml/day)
Normal	23.18 \pm 1.35	23.61 \pm 1.48	0.63 \pm 0.22	3.25 \pm 0.26
Control	23.09 \pm 1.03	19.64 \pm 1.12 ^{###}	-3.29 \pm 0.13 ^{###}	3.28 \pm 0.16
SCL	23.07 \pm 1.28	20.39 \pm 0.77*	-2.65 \pm 0.25*	3.21 \pm 0.11
SCH	23.16 \pm 1.04	21.25 \pm 1.66 ^{**}	-1.98 \pm 0.27 ^{***}	3.31 \pm 0.19

Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ^{###}p < 0.001 compared vs. Normal group and *p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs. Control group by student LSD test.

3. 육안적으로 보이는 손상에 대한 SC의 효과

적출한 대장의 길이를 측정된 결과, Normal군에 비하여 Control군에서 대장 길이가 32.90% 감소하였으며, Control군에 비하여 SCL군과 SCH군이 각각 6.69%, 13.33% 증가함이 나타났다 (Fig. 1).

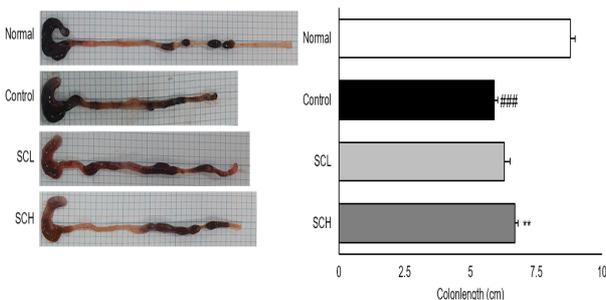


Fig. 1. Macroscopic changes of colons and colon length. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ^{###}p < 0.001 compared vs. Normal group and ^{**}p < 0.01 vs. Control group by student LSD test.

4. 산화적 스트레스 바이오마커 측정 결과

혈청 내 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS, ONOO⁻를 측정하였다. ROS는 Normal군에 비하여 Control군에서 123.50% 증가하였으며 ($p < 0.01$), Control군과 비교하여 SCL군, SCH군은 유의하게 각각 42.79% ($p < 0.05$), 49.92% ($p < 0.01$) 감소하였고, ONOO⁻는 Normal군에 비하여 Control군에서 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), Control군에 비하여 감소율이 SCL군, SCH군에서 각각 15.89%, 20.30%로 유의하게 감소하였다 (Table. 3).

5. 간 독성 지표 AST 및 ALT 측정 결과

혈청 내에서 간 독성 지표인 AST와 ALT를 측정하였으며, 그 결과 AST는 Normal군에 비하여 Control군에서 20.74% 증가하였으며, Control 대비 SCL군은 11.51%, SCH군은 9.81% 감소함이 나타났고, ALT는 Normal군에 비하여 Control군에서 14.43% 증가하였으며, Control군에 비하여 SCL군은 7.16%, SCH군은 9.32% 감소하였다 (Table. 3).

Table 3. Serum ROS, ONOO⁻, AST, and ALT Levels in DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mice.

Group	ROS (Fluorescence/min/ml)	ONOO ⁻ (Fluorescence/mL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Normal	581 \pm 98	1515 \pm 140	33.99 \pm 1.91	3.83 \pm 0.29
Control	1299 \pm 240 ^{###}	1892 \pm 430 ^{###}	41.04 \pm 2.63	4.38 \pm 0.68
SCL	743 \pm 88*	1591 \pm 139 ^{**}	36.31 \pm 3.96	4.07 \pm 0.26
SCH	650 \pm 113 ^{**}	1508 \pm 105 ^{**}	37.01 \pm 3.08	3.97 \pm 0.46

Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ^{###}p < 0.01 compared vs. Normal group and p < 0.05, and ^{**}p < 0.01 vs. Control group by student LSD test.

6. 대장조직 내 항산화 관련 인자 발현량 분석

대장조직 내 항산화 관련 인자인 Nrf2, HO-1, SOD, Catalase, GPx-1/2의 발현량을 측정된 결과, Normal군에 비하여 Control군에서 유의하게 감소하였으며 ($p < 0.001$), Control군에 비하여 SC 투여군에서 발현량이 증가하였다. 특히 Nrf2, Catalase, GPx-1/2는 SCH군에서 Control군에 비하여 27.19%, 25.70%, 44.52%로 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였다 (Fig. 2).

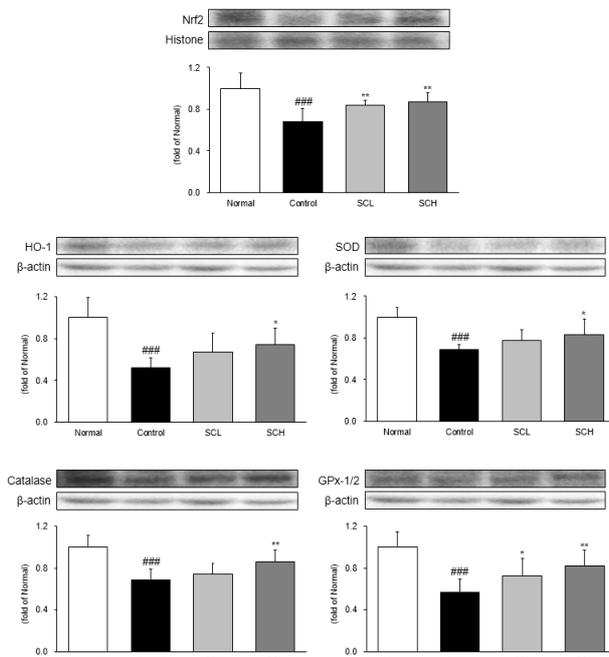


Fig. 2. Expressions of anti-oxidation factors. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control group by student LSD test.

7. 대장조직 내 염증 관련 인자 발현량 분석

1) NF- κ Bp65 및 p-I κ B α 발현량 분석

염증성 매개인자인 NF- κ Bp65와 p-I κ B α 측정하였다. 핵에서 NF- κ Bp65의 발현량을 측정된 결과, Normal군과 비교하여 Control군에서 30.11% 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, Control군에 비하여 SCL군, SCH군에서 각각 13.44%, 21.60% 유의하게 ($p < 0.01$, $p < 0.001$) 감소하였다. 세포질에서 p-I κ B α 의 발현량을 측정된 결과, Normal군 대비 Control군에서 31.87% 유의하게 ($p < 0.001$) 증가하였으며, SCL군과 SCH군은 Control군에 비하여 각각 14.85%, 18.83% 유의하게 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 감소하였다 (Fig. 3).

2) COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β 발현량 분석

세포질에서 염증 관련 인자인 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β 의 발현량을 측정된 결과, Normal군에 비하여 Control

군에서 발현량이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, Control군 대비 SC 투여군에서 모두 유의하게 감소하였다. 그 중 COX-2와 iNOS는 SCH군에서 Control군에 비하여 감소율이 각각 31.15%, 68.43%로 Normal군 수준까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

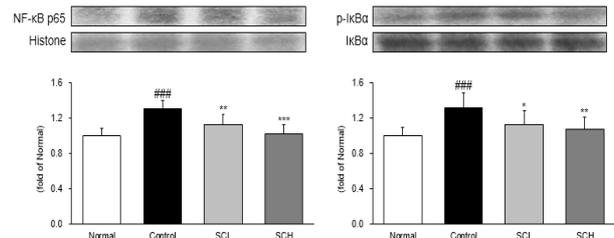


Fig. 3. Expressions of inflammatory factors. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control group by student LSD test.

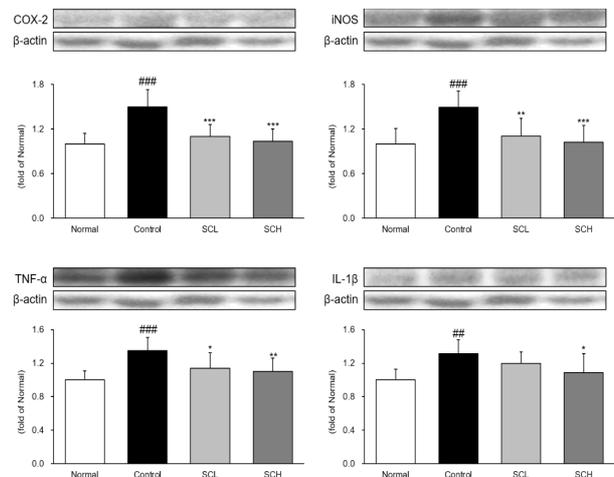


Fig. 4. Expressions of inflammatory enzymes and cytokines. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. Control group by student LSD test.

8. 대장조직 내 항염증 관련 인자 발현량 측정

대장조직 세포질 내 항염증 관련 인자인 IL-4와 IL-10의 발현량을 측정된 결과, Normal군과 비교해 Control군에서 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였으며, Control군에 비하여 SC 투여군에서 유의하게 증가하였다. 그 중 SCH군은 Control군에 비하여 IL-4와 IL-10이 각각 80.85%, 80.17%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

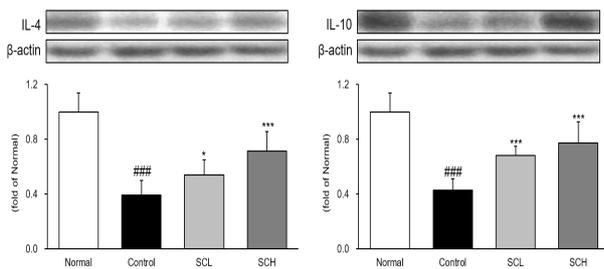


Fig. 5. Expressions of anti-inflammatory cytokines. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ###p < 0.001 compared vs. Normal group and *p < 0.05, ***p < 0.001 vs. Control group by student LSD test.

9. 대장조직 내 세포사멸 관련 인자 발현량 측정

세포질에서 세포사멸 관련 인자인 Bcl2, Bax, Caspase-3의 발현량을 측정하였다. Bcl2의 발현량을 측정한 결과, Normal군과 비교해 Control군에서 37.32% 유의하게 ($p < 0.001$) 감소하였으며, Control군에 비하여 SCL군, SCH군에서 각각 22.88%, 48.13% 유의하게 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) 증가하였다. Bax와 Caspase-3의 발현량 측정 결과, Control군에 비하여 SCH군에서 Bax와 Caspase-3의 감소율이 각각 32.51%, 23.88%으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

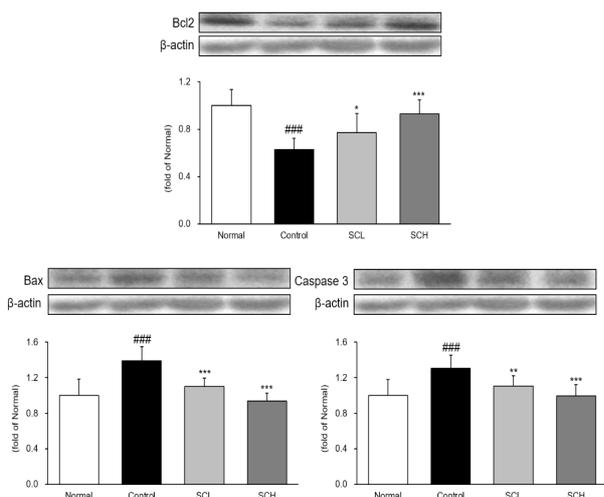


Fig. 6. Expressions of apoptosis factors. Normal ; normal mice, Control ; 5% DSS-induced colitis mice, SCL ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 100 mg/kg body weight, SCH ; 5% DSS-induced colitis mice treated with Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract 200 mg/kg body weight. All data are expressed means \pm SD, n=8 mice per group. Significance: ###p < 0.001 compared vs. Normal group and *p < 0.05, ***p < 0.001 vs. Control group by student LSD test.

IV. 고찰

울무 (*Coix lacryma-jobi* var. *ma-yeun* Stapf)는 벼과에

속해있는 식물로 동남아시아가 원산지 알려져 있다⁸⁾. 울무에는 phenolic acids, lignan, benzoxazinoid, phenolic amides 등의 성분들이 있으며, 이러한 성분들은 항암, 항염증, 항알레르기 및 미백효과 등의 효과가 있다고 알려져 있다¹⁵⁾. 이러한 울무는 부위별로 많은 곳에 사용되고 있다. 종자는 한약재 또는 식품으로 사용되는데, 씨에서 종피를 제거한 薏苡仁은 항암, 관절염과 같은 병증에 사용하며, 뿌리는 황달 및 신경통에 사용하며, 줄기와 잎은 가축들의 사료로 많이 이용한다고 알려져 있다^{16,17)}.

대장염이란 직장에서부터 대장의 근위부로 침범하여 들어오는 점막의 염증 또는 점막하층의 염증으로, 복통과 혈성설사 등과 같은 증상이 나타나며, 유전 및 면역역증반응 등과 같은 복합적인 작용으로 발생하지만 아직까지 주된 원인이 밝혀지지 않고 있다^{18,19)}. 대장염을 한의학적인 관점으로 바라보면 火泄, 便血, 腸澼, 腸風, 泄瀉, 膿血痢, 赤痢, 痢疾의 범주로 볼 수 있으며²⁰⁾, 임상학적 연구로는 惜紅煎加味方, 補腸健脾湯加減方, 平胃地榆湯加味方 등이 있으며, 실험학적 연구로는 導赤地榆湯, 赤小豆當歸散, 消炎整腸湯, 槐花散 등이 있다³⁾.

薏苡芽 (Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf)은 薏苡仁의 잎부위를 건조한 것으로 현재 薏苡仁에 대한 연구는 많으나 薏苡芽에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 薏苡芽 열수 추출물이 DSS로 대장염이 유발된 동물 모델에서 ROS, ONOO⁻, AST, ALT 및 대장조직 내 항산화, 염증, 항염증, 세포사멸 관련 단백질의 발현의 분석으로 대장염에 대하여 개선효과가 있는지에 대하여 알아보았다.

실험 종료 후 얻은 혈청을 통해 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS 및 ONOO⁻와 간 독성 지표인 AST 및 ALT를 측정하였다. 체내에서 ROS가 정상적으로 소거되지 않고 축적된다면 세포를 산화적 스트레스의 상태로 만들며, ONOO⁻는 이러한 산화적 스트레스 상태에서 염증과 같은 여러 가지의 만성질환들을 발생시키는 원인이 된다²¹⁾. 이러한 ROS와 ONOO⁻를 측정된 결과, Control군과 비교하여 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 간독성 지표인 AST와 ALT를 측정된 결과, Control군과 비교하여 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 유의하지는 않으나 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

실험 종료 후 얻은 대장 조직 내 항산화, 염증, 항염증 및 세포사멸 관련 단백질의 발현량을 western blot 이용하여 측정하였다. 산화적 스트레스를 조절하는 전사인자로 알려진 Nrf2는 항산화 반응 요소 (antioxidant response element, ARE)와 결합하여 중요한 항산화 효소들을 활성화 시킨다. 이렇게 활성화된 항산화 효소들은 활성산소의 생성을 억제한다²²⁾. Nrf2와 항산화 효소인 HO-1, SOD, Catalase, GPx-1/2의 단백질 발현량을 측정된 결과, Control군과 비교하여 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

여러 가지 염증성 cytokine에 의하여 활성화되는 전사 조절인자인 NF- κ Bp65, p-I κ B α 와 염증성 cytokine과 매개인자인 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β 와 항염증 관련 단백질인 IL-4, IL-10의 발현량을 분석하였다. 비활성화된 NF- κ B는 cytoplasm와 inhibitor I κ B에 존재하고 있다. 이러한 NF- κ B는 inhibitor I κ B가 여러 가지 cytokine들에 의해

자극받아 활성화되어 인산화 과정을 통해 분해될 때 핵으로 이동하게 되어 target 유전자들의 전사를 일으키게 된다²³⁻²⁶. 이러한 염증 관련 단백질들의 발현량을 측정된 결과, 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 Control군에 비해 발현량을 감소시켰으며, 특히 COX-2와 iNOS는 Normal군 수준까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 항염증 관련 단백질인 IL-4와 IL-10의 발현량 측정 결과, 대장염이 유발된 동물 모델인 Control군 대비 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 Normal군 수준까지 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

궤양성 대장염은 염증으로 인한 발암을 일으키는 대표적인 질환으로, 대장염 증상이 없이 일어나는 집단보다 대장암의 발생률이 5.7배 정도 높은 것으로 알려져 있다^{27,28}. 염증이 일어난 상태의 장 점막이 ROS에 과도하게 노출되면 상피세포의 세포자멸이 증가하게 되며, 이는 장 손상을 일으키게 된다²⁹. 그렇기에 대장조직에서 세포자멸과 관련된 인자인 Bcl2, Bax, Caspase-3의 발현량을 측정된 결과, Control군에 비해서 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 Bcl2의 발현량이 증가하였으며, Bax와 Caspase-3의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이 결과를 통해 薏苡芽 열수 추출물이 DSS로 유발된 대장염 동물모델에 개선효과가 있음을 확인할 수 있었다.

V. 결 론

본 연구에서는 DSS 대장염 유발 동물모델에서 薏苡芽 열수 추출물을 경구 투여하여 대장염 개선 효과를 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 실험기간 동안 몸무게 변화량을 측정된 결과, Control군에 비해 薏苡芽 열수 추출물이 몸무게를 유의성 있게 증가시키는 것을 확인하였다.
2. 대장염을 유발한 동물모델의 혈청 내에서 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS와 ONOO⁻를 측정된 결과, 薏苡芽 열수 추출물 고농도 투여군에서 Control군에 비해 감소율이 ROS 49.92%, ONOO⁻ 20.30%로 Normal군 수준까지 감소한 것을 확인할 수 있었다.
3. 혈청 내에서 간 독성 지표인 AST와 ALT를 측정된 결과, 薏苡芽 열수 추출물을 투여한 군이 Control군에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
4. 대장조직 내에서 Nrf2와 항산화 효소인 HO-1, SOD, Catalase, GPx-1/2의 단백질 발현량을 측정된 결과, Control군에 비하여 薏苡芽 열수 추출물 고농도 투여군에서 유의하게 증가시켰다.
5. 대장조직 내에서 염증 관련 인자의 발현량을 측정된 결과, 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 Control군에 비해 IkB α 의 phosphorylation이 감소함으로써 NF- κ Bp65의

발현을 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-1 β 의 발현량이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

6. 대장조직 내 항염증 관련 인자의 발현을 측정된 결과, 薏苡芽 열수 추출물 투여로 인하여 대장염 유발 동물모델에서 IL-4와 IL-10의 단백질 발현량을 유의하게 증가시켰다.
7. 세포사멸 관련 인자인 Bcl2, Bax, Caspase-3의 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, 薏苡芽 열수 추출물 투여군에서 Bcl2를 유의하게 증가시켰으며, Bax와 Caspase-3의 발현량은 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

따라서 DSS 대장염 유발 동물모델에서 몸무게 체중 변화량과 항산화 관련 인자, 염증 관련 인자, 항염증 관련 인자, 세포사멸 관련 인자의 단백질 발현량을 측정된 결과를 통해 薏苡芽 열수 추출물이 대장염 개선 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호: PJ01425 1022020)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

References

1. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*. 2019 ; 50(4) : 992-1006.
2. Papadakis KA. Chemokines in inflammatory bowel disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 ; 4(1) : 83-9.
3. Song YG, Ryu BH, Yoon SW. The Effects of Soyumjungjang-tang on DSS-Induced Ulcerative Colitis in Mouse. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2008; 29(2) : 385-400.
4. Myung NY. The improving effect of *Zizyphus jujube* on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Kor J herb*. 2015 ; 30(3) : 35-40.
5. Jung HK, Jung WS, Ahn BK, Kang BM, Yeo JH, Cha SW, Park CG, Cho JH, Cho HW. *Peucedanum japonicum* Thunberg Leaf Alleviates the Symptoms of Dextran Sulfate Sodium Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Korean J. Plant Res*. 2014 ; 27(5) : 421-8.
6. Chang DK, Kim YH, Byeon JS, Yang SK, Chung YW, Han DS, Kim SG, Kim TI, Kim WH, Jeon YT, Eun CS, Choi H, Choi KY, Song IS. The Current Status of Ulcerative Colitis-associated Colorectal Cancer in

- Korea: A KASID Study. Korean J Gastroenterol. 2005 ; 46(4) : 276–82
7. Lee SH, Choi HM, Lim SW. Effects of Jiyutang on DSS-induced Colitis of the Mouse. J Korean Oriental Med 2007 ; 28(1) : 187–97.
 8. Son ES, Kim SH, Kim YO, Lee YE, Kyung SY, Jeong SH, Kim YJ, Park JW. *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf sprout extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical carcinoma cells. BMC Complement Altern Med. 2019 ; 19(1) : 312.
 9. Chung CP, Hsia SM, Lee MY, Chen HJ, Cheng F, Chan LC, Kuo YH, Lin YL, Chiang W. Gastroprotective Activities of Adlay (*Coix Lacryma-Jobi* L. Var. *Ma-Yuen* Stapf) on the Growth of the Stomach Cancer AGS Cell Line and Indomethacin-Induced Gastric Ulcers. J Agric Food Chem. 2011 ; 59(11) : 6025–33.
 10. Cho SI, Kim HW, Kim JS. Effect of Coicis Semen Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats. Kor J herb. 2006 ; 21(3) : 75–81.
 11. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. J Biol Chem. 1912 ; 12 : 239–43.
 12. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. J Sci Food Agric. 1994 ; 64(2) : 155–61.
 13. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology. 1992 ; 13(3) : 637–48.
 14. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrohodamine 123. Free Radic Biol Med. 1994 ; 16(2) : 149–56.
 15. Kwon JG, Seo C, Choi YH, Choi CW, Kim JK, Jeong W, Lee JE, O KH, Hong SS. Validation of Method Determining Coixol in *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Roots Extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2017 ; 46(8) : 952–6.
 16. Kim JD. Literature on the quality and effect of Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. *mayuen* S.). Korean J Ag-ricultural History. 2012 ; 11(1) : 89–122.
 17. Song MY, Jung HW, Park YK. Antiobesity effect of water extract of *Coix lacrymajobi* var. *mayuen* in high fat fed C5BL/6 mice. J Korean Med Obes Res. 2017 ; 22(1) : 1–9.
 18. Choi CH, Jung SA, Lee BI, Lee KM, Kim JS, Han DS. Diagnostic Guideline of Ulcerative Colitis. Korean J Gastroenter. 2009 ; 53(3) : 145–60.
 19. Satoshi M, Nami W, Yoshio O, Yoshinori U. Enteric bacteria and their roles in inflammatory bowel disease. Bioscience Microflora. 1999 ; 18(1) : 1–9.
 20. Kang TH, Won JH. Study on the Treatment of Ulcerative Colitis in Oriental medicine. J. of. Oriental. Chr. Dis. 1999 ; 5(1) : 137–62.
 21. Kim MJ, Lee JA, Shin MR, Park HJ, Roh SS. Improvement Effect of Corni Fructus 30% Ethanol Extract by MIA-Induced Osteoarthritis Animal Model. Kor J herb. 2020 ; 35(1) : 35–44.
 22. Lee JA, Park HJ, Kim SH, Kim MJ, Kim KJ, Shin MR, Roh SS. Evaluation of Evodiae Fructus Extract on the Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats. Kor J herb. 2019 ; 34(2) : 15–23.
 23. Baldwin AS, Azizkhan JC, Jensen DE, Beg AA, Coodly LR. Induction of NF- κ B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. Molecular and Cellular Biology. 1991 ; 11(10) : 4943–51.
 24. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: Ten Years After. Cell. 1996 ; 87(1) : 13–20.
 25. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B A Pivotal — Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. The New England Journal of Medicine. 1997 ; 336 : 1066–71.
 26. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol - induced hepatic fibrosis in the rat: role of tge amount of dietaty fat. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 1986 ; 10(suppl6) : 13S–9S.
 27. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. Am J Patho. 1995 ; 146(1) : 3–15.
 28. Kim KJ, Shin MR, Kim SH, Kim SJ, Lee AR, Kwon OJ, Kil KJ, Roh SS. Anti-inflammatory and apoptosis improving effects of sulfasalazine and Cinnamomi cortex and Bupleuri radix mixture in TNBS-induced colitis mouse model. J Appl Biol Chem. 2017 ; 60(3) : 227–34.
 29. Shin MR, Kim KJ, Kim SH, Kim SJ, Seo BI, An HJ, Roh SS. Comparative Evaluation between Sulfasalazine Alone and in Combination with Herbal Medicine on DSS-Induced Ulcerative Colitis Mice. Biomed Res Int. 2017 ; 2017 : doi: 10.1155/2017/6742652.