

白朮의 항산화 효과가 DSS 유발 궤양성 대장염 모델에 미치는 영향

박석만^{1#}, 이세희^{1#}, 정다운², 조수정², 신미래¹, 박해진³, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터
3 : 대구한의대학교 DHU 바이오융복합시험센터

Antioxidant Effect of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi in DSS-induced Ulcerative Colitis Model

Seok Man Park^{1#}, Se Hui Lee^{1#}, Da un Jeong², Su-Jung Cho², Mi-Rae Shin¹
Hae-Jin Park³, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University
3 : DHU Bio Convergence Testing Center, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Although the pharmacological effects of anti-inflammatory and antioxidant action of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract (AM) have been proven from many studies, reports on the antioxidant effect of AM on ulcerative colitis (UC) are scarce. Therefore, we aimed at evaluating the anti-oxidant effect of AM on the DSS-induced UC model.

Methods : To induce ulcerative colitis, 8-week-old male Balb/c mice received 5% DSS in drinking water for 1 week. After 1 week of adaptation, mice were divided into four groups (n=8 each) for use as normal (Normal), DSS Control (Control), DSS + AM 100 mg/kg (AM100)-treatment, DSS + AM 200 mg/kg (AM200)-treatment. After 1 week of the experiment, the animals were sacrificed, and the extracted colon tissue was analyzed for protein through western blot.

Results : As a result of confirming the macroscopic changes in colon tissues to confirm the therapeutic effects of AM, the decrease in colon length was suppressed in the AM treatment group compared to the control group. In addition, as a result of biochemical analysis, AM administration significantly reduced serum glutamic oxalacetic transaminase, glutamic pyruvate transaminase levels and tissue malondialdehyde levels. As a result of confirming the protein expression level through western blot, AM administration significantly decreased the expression of NADPH-related proteins such as NOX2, p22^{phox}, and iNOS, but significantly increased the expression of SOD, catalase, and GPx-1/2.

Conclusions : AM may improve DSS-induced UC in mice by modulating NADPH and antioxidant-related proteins. In conclusion, AM showed an antioxidant effect through the improvement of oxidative stress on UC.

Key words : oxidative stress, antioxidant, *Atractylodes macrocephala* Koidzumi, dextran sulfate sodium, ulcerative colitis

*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 : Seok Man Park, 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

Se Hui Lee, 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 : k18dw@naver.com

· Received : 21 October 2021 · Revised : 16 December 2021 · Accepted : 25 January 2022

I. 서론

염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease, IBD)은 여러 원인에 의한 염증 반응이 소장과 대장에 반복적으로 나타나는 만성 염증 상태를 일컫는 질환이며, 대표적으로 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)과 크론병 (Crohn's disease, CRD)이 있다¹⁾. 염증성 장 질환은 소화기관에 반복적인 염증 반응이 나타나는 공통된 특징을 가지지만, 크론병은 소화기관 전체적으로 염증이 나타나는 반면에 궤양성 대장염의 경우는 대장에만 선택적인 염증 반응이 나타난다^{2,3)}.

궤양성 대장염 환자의 치료를 위해 임상적으로 권장되는 치료제로는 mesalazine, sulfasalazine 등의 aminosalicylate 제제와 스테로이드 제제가 있으며, 이러한 치료제에 반응하지 않는 경우는 cyclosporine, azathioprine 등의 면역억제제 및 항생제도 사용되고 있다. 또한, 이러한 치료제의 장기적인 투여는 여러 가지 부작용을 야기하는데, 일반적으로 구토, 소화 불량, 두통, 구역 등의 가벼운 부작용을 비롯한 발열, 피부 발진, 골수 억제 및 간염 등의 심한 부작용까지 이르기기도 한다^{3,4)}. 따라서, 부작용을 최소화하면서 궤양성 대장염의 증상을 효과적으로 개선시킬 수 있는 새로운 치료제에 대한 대안이 무엇보다 필요한 실정이다.

한의학에서 궤양성 대장염은 腸癰, 便血, 泄瀉, 痢疾 및 痢疾 등의 범주에 속한다고 알려져 있는데, 腸癰 중에서도 痢疾, 便血중에선 腸風, 痢疾 중에서는 赤痢와 膿血痢와 밀접하다고 할 수 있으며, 泄瀉중에서 火泄과 같은 범주에 속한다고 볼 수 있다. 궤양성 대장염의 病因으로는 外邪로 인해서 脾胃를 상하거나 大腸에 濕鬱氣滯, 飲食不節로 인한 脾腎虛 등이 존재한다⁶⁾.

白朮 (Atractylodis Rhizoma Alba)은 국화과에 속하는 다년생 초본인 *Atractylodes macrocephala* Koidzumi의 根莖이다. 性味는 甘苦하고 微溫無毒하며, 止汗安胎, 固表止汗, 健脾益氣 및 燥濕利水와 같은 효능으로 腹脹泄瀉, 痰飲眩暈, 胎動不安, 水腫, 脾虛食少 및 自汗 등을 治療한다⁷⁾. 주요 성분으로는 atractylodinol, acetylactylodinol, atractylon, atractylenolide 등이 보고되어 있다⁸⁻¹²⁾. 白朮에 대한 기존 연구에 의하면, 항당뇨¹³⁾, 멜라닌 생성 억제¹⁴⁾, 항염증¹⁵⁻¹⁷⁾, 항암^{18,19)} 및 항균²⁰⁾ 등을 비롯한 다양한 약리 효능이 보고되어 있다. 궤양성 대장염에 관련하여 항산화 작용으로 인한 염증 개선에 대한 연구가 보고되어 있으나²¹⁾, 白朮에 대한 이전 연구들의 경우, 항암, 항염증 효과에 초점이 맞춰져 있으며 항산화 효능에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 저자는 dextran sodium sulfate (DSS)로 유발한 궤양성 대장염 동물 모델에서 白朮의 항산화 효과 및 그 기전을 평가하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에서 사용한 potassium acetate와 sodium carbonate는 DAEJUNG (Siheung, Korea)에서 구입하였으며, aluminium chloride와 L-ascorbic acid는 Thermo Fisher Scientific (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다. MP Biologicals (Santa Ana, CA, USA)에서 dextran sodium sulfate (DSS)를 구입하여 사용하였다. Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 diethylene glycol, potassium phosphate monobasic, sodium carbonate, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), quercetin, phenylmethylsulfonyl fluoride, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, dithiothreitol (DTT), potassium phosphate dibasic, sodium hydroxide, gallic acid, 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)를 구입하였다. Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 1차 항체 inducible nitric oxide synthase (iNOS), catalase, superoxide dismutase (SOD), p22^{phox}, β -actin, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2), (IL-6), glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2)를 구매하였으며, Gene Tex Inc. (Irvine, CA, USA)에서 2차 항체를 구매하여 사용하였다. Western blotting에 필요한 nitrocellulose membrane와 ECL Western Blotting Detection Reagents 시약은 GE Healthcare (Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. Protease inhibitor와 ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) 시약은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 또한, 단백질 정량에 사용되는 BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하였다.

2) 실험기기

본 실험에서 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan), 전자체중계 (CAS Co. Ltd., Yangju, Korea), 냉장고속원심분리기 (GYROZEN Co. Ltd., LaboGene 1730R, Gimpo, Korea), Homogenizer Stirrer (DAIHAN Scientific Co., Ltd., HS-30E, Wonju, Korea), Deep-freezer (Sanyo Co., Japan), 조직 분쇄기 (Bio Spec Products, Bartlesville, OK, USA), 열탕추출기 (Daewoong Bio, DWT-1800T, Hwaseong, Korea), water bath (DAIHAN Scientific Co., Ltd., WB-11, Wonju, Korea), 동결건조기 (LABCONCO, Kansas, MO, USA), vortex mixer (OHAUS, VXMNAL, Seoul, Korea), Microplate reader (Tecan, Infinite M200 pro, Männedorf, ZRH, Switzerland), Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Bucheon, Korea), 회전 감압농축기 (Buchi B-480, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하였다.

3) 시료 추출

본 실험에 사용된 白朮은 (주)옥천당 (Deagu, Korea)에서 구입하였다. 약재는 적절한 선별 과정을 거친 후 대한약전에

적합한 것만을 정선하여 실험에 사용하였다. 열탕 추출기를 이용하여 白朮 100 g에 증류수 1L를 가한 뒤 100℃에서 2시간 동안 추출하였다. 白朮 추출물을 여과한 후 감압 농축기로 50℃에서 감압 농축하였다. 그 다음 동결 건조기를 이용하여 白朮 파우더 (AM) 38 g을 얻었다 (수율 38%). 白朮 (*Atractylodes macrocephala* Koidzumi, AM)은 파우더 형태로 -80℃에서 냉동보관 하였으며, 실험 직전 증류수에 녹인 후 사용하였다.

4) 실험 동물

8주령 (22~25 g) 웅성 Balb/c mice를 DBL (Eumseong, Korea)에서 구입하여 물과 고형 사료 (Zeigler Bros, Inc., PA, USA)를 자유롭게 공급하였으며, 명암주기 (light: dark cycle) (12/12 시간), 온도 (22 ± 2℃) 및 습도 (55 ± 5%)가 적절히 조절되는 동물 사육 환경에서 1주 동안 적응시킨 다음 실험에 투입되었다. 본 실험은 OO대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호: DHU2021-065)을 얻어 실험을 진행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

白朮 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin Ciocalteu's의 방법을 이용하여 구하였다²²⁾. 7.5% sodium carbonate 400 μL, 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μL 및 시료 100 μL를 혼합하여 실온의 암소 환경에서 30분간 반응시킨 다음 Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland) (765 nm)로 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서 표준 물질로 사용한 gallic acid로 표준 검량선을 구했으며, 白朮 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다 (mg gallic acid equivalents (GAE)/g).

白朮 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride를 사용한 비색법을 사용하여 측정하였다²²⁾. 1 M potassium acetate solution 20 μL, methanol 300 μL, 증류수 560 μL, 10% aluminium chloride solution 20 μL 및 100 μL 시료를 혼합하여 실온의 암소 환경에서 30분간 반응시킨 다음 Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland) (415 nm)로 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서 표준 물질로 사용한 quercetin으로 표준 검량선을 구했으며, 白朮 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다 (mg quercetin equivalents (QE)/g).

2) DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 측정

白朮 열수 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH free radical 소거법을 활용하였다²³⁾. 100 μL의 60 μM DPPH 용액과 白朮 열수 추출물을 농도별로 희석한 용액 100 μL를 plate에 각각 분주하여 혼합시킨 다음 실온의 암소 환경에서

30분 동안 반응시킨 후 Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland) (540 nm)로 흡광도를 측정하였다. 양성대조물질로 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 측정된 흡광도 값을 아래의 식에 대입하여 산출된 radical 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 IC₅₀로 표기하여 나타냈다.

白朮 열수 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 ABTS radical 소거법을 활용하였다²⁴⁾. 7 mM ABTS 시약과 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암실 환경에서 약 16시간 동안 ABTS⁺을 형성시킨 후 Microplate reader (415 nm)로 흡광도를 측정하여 0.70±0.02의 값이 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석한 ABTS 용액 95 μL와 白朮 열수 추출물 5 μL를 각각 혼합한 후 15분간 반응시켰으며, Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland) (540 nm)로 흡광도를 측정하였다. 양성대조물질로 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 측정된 흡광도 값을 아래의 식에 대입하여 산출된 radical 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 IC₅₀로 표기하여 나타냈다.

DPPH and ABTS radical scavenging activity (%)

$$= \{(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}\} \times 100$$

OD_{control} : 시료가 들어가지 않은 경우 흡광도

OD_{sample} : 시료가 들어간 경우 흡광도

3) DSS를 이용한 궤양성 대장염 유발 및 약물투여

아무런 처치를 하지 않은 정상군 (Normal), 5% DSS 음수로 궤양성 대장염을 유발과 동시에 증류수를 투여한 대조군 (Control), 5% DSS 음수로 궤양성 대장염 유발과 동시에 白朮 열수 추출물을 100 mg/kg 경구 투여한 군 (AM100) 및 5% DSS 음수로 궤양성 대장염 유발과 동시에 白朮 열수 추출물을 200 mg/kg 경구 투여한 군 (AM200) 총 4군으로 군당 8마리씩 군 분리하였다. 약물은 7일간 매일 일정한 시간에 체중을 측정 후 경구 투여되었으며, Zonae를 이용하여 마우스의 경구를 통해 약물을 주입하여 경구투여를 진행하였다. 8일 째에 부검을 진행하였다. 전날 24시간 절식 후, isoflurane으로 흡입 마취하여 심장에서 혈액을 채취하고 대장 조직을 적출하였다. 채취한 혈액은 4,000 rpm으로 10분간 4℃에서 원심분리하여 혈청을 분리하고, 혈청과 대장 조직은 -80℃에서 냉동보관하였다⁶⁾.

4) 체중 변화량

동물의 체중은 1일 1회 일정한 조건에서 전자체중계를 이용하여 측정하였으며, 체중 변화량 (body weight change)은 실험 마지막 날 측정된 체중 값에서 실험 개시 전의 체중을 제하여 계산하였다.

5) 혈청과 조직 내 생화학 분석

혈청 내에서 간 독성 지표를 Glutamic oxaloacetic

transaminase (GOT) assay kit와 glutamic pyruvic transaminase (GPT) assay kit (Asanpharm Co., Ltd, Seoul, Korea)의 프로토콜에 따라 분석하였다.

대장 조직 내 malondialdehyde (MDA)는 Mihara 등²⁵⁾의 방법에 따라 측정하였으며, 1,1,3,3,-tetramethoxypropane를 표준물질로 사용하였다. 1% phosphoric acid와 측정하고자 하는 조직 샘플을 혼합한 다음 0.67% thiobarbituric acid를 첨가하여 95°C에서 45분 동안 가열시켰다. 그 다음 butanol을 혼합한 후 원심 분리 (3,000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액을 plate에 분주하여 Microplate reader (Infinite M200 pro; Tecan, Männedorf, Switzerland) (540 nm)로 흡광도를 측정하였다.

6) 대장 조직 내 단백질 발현 분석

대장 조직의 세포질을 얻기 위해 5 mM Tris-HCl (7.5 pH), 0.1 M DTT, 100 mM Tris-HCl (7.4 pH), 1.5 M sucrose, 15 mM CaCl₂, protease inhibitor와 2 mM MgCl₂를 첨가한 buffer A를 추가하여 조직 분쇄기로 분쇄한 후 Ice 위에서 30분간 방치하였다. 그 다음 10% NP-40를 첨가하여 원심 분리 (12,000 rpm, 4°C, 2분) 해주었으며, 세포질을 함유한 상층액을 분리하였다. 10% NP-40를 첨가한 buffer A (washing buffer)로 2회 세척하고, 100 µL의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 10% glycerol, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF)를 추가하여 다시 부유시킨 다음 vortex를 10분 간격으로 3회 실시하였다. 그런 다음 원심 분리 (12,000 rpm, 4°C, 10분) 해주었으며, 핵을 함유한 상층액을 분리하고 세포질과 핵은 -80°C에서 냉동 보관 하였다. 대장 조직의 세포질에서 NOX2, p22^{phox}, iNOS, β-actin, SOD, Catalase, GPx-1/2 단백질 발현을 분석하기 위해 8-12 µg의 단백질을 8-12% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 다음 membrane에 적절한 1차 항체 (PBS-T로 1:1,000 희석)를 사용하여 4°C에서 overnight 하였고, PBS-T로 6회 세척 (8분 간격)하고 membrane에 처리된 1차 항체에 적절한 2차 항체 (PBS-T로 1:3,000 희석)를 처리하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 다음, PBS-T로 5회 세척 (8분 간격)하였으며, membrane을 enhanced che-miluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 해당 band의 단백질 발현량을 확인하였다. ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 band를 정량하였으며, 해당 band의 단백질 수준은 정상군의 단백질 수준으로 나누어 다음 상대적 비로 나타내었다.

7) 조직병리학적 분석

대장 조직을 24시간 동안 10% 포르말린 용액에 고정한 다음 graded alcohol 탈수시켰으며, 파라핀으로 포매하여 표본을 제작하였다. Microtome (RM2255, Leica, Gannam-gu, Seoul)을 이용하여 5 µm 두께의 조직 절편을 제작하였으며,

hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색하였으며, xylene clearing을 거쳐 permount로 처리한 후 광학현미경 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)을 이용하여 해당 조직의 특이 병변 유무를 관찰하였다.

8) 통계분석

본 실험에서 *in vitro*의 수치는 평균과 표준오차로 (mean ± SEM), *in vivo*의 수치는 평균과 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. SPSS program for windows version 25 (SPSS Inc., Chicago, IL USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test 실시 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하였으며, 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 일 경우 유의성이 있다 판정하여 나타냈다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

AM 열수 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 총 폴리페놀 함량은 2.65 ± 0.53 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 2.25 ± 0.09 mg QE/g으로 측정되었다 (Figure 1).

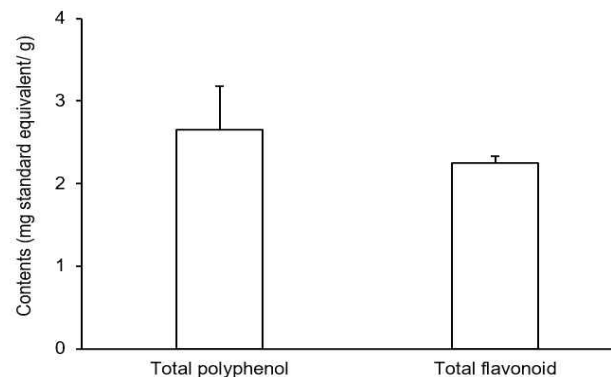


Figure 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of AM. All values are expressed as mean ± SEM of 3 replications. AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract.

2. DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 측정

AM의 DPPH free radical 소거 활성을 측정된 결과, 양성 대조물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.03 ± 0.004 µg/mL으로 나타났고, AM의 IC₅₀ 값은 211.30 ± 4.83 µg/mL으로 측정되었다.

AM의 ABTS radical 소거 활성을 측정된 결과, 양성대조 물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.70 ± 0.14 µg/mL으로

나타났고, AM의 IC₅₀ 값은 461.90±7.67 µg/mL로 측정되었다 (Figure 2).

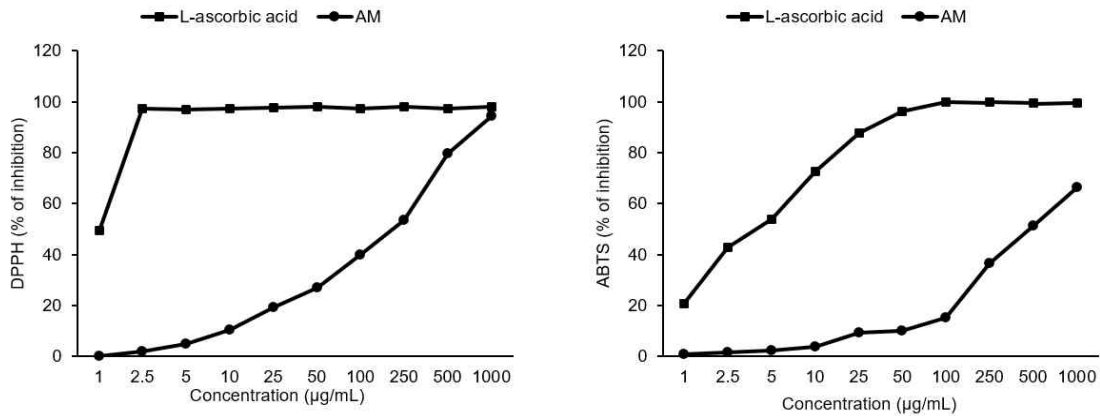


Figure. 2. Scavenging activity of AM on DPPH and ABTS radical. All values are expressed as mean±SEM of 3 replications. AM: *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract.

3. 체중 변화량

실험기간 동안의 체중 변화량 (g)은 정상군 대비 대조군 ($p < 0.01$)에서 DSS로 인한 체중이 약 6 g 가량 유의적으로 감소

하였으나, AM 처리로 인해 대조군 대비 AM100군과 AM200군 각각 18.2%, 20.0% 정도 체중 감소가 억제되었다 (Figure 3).

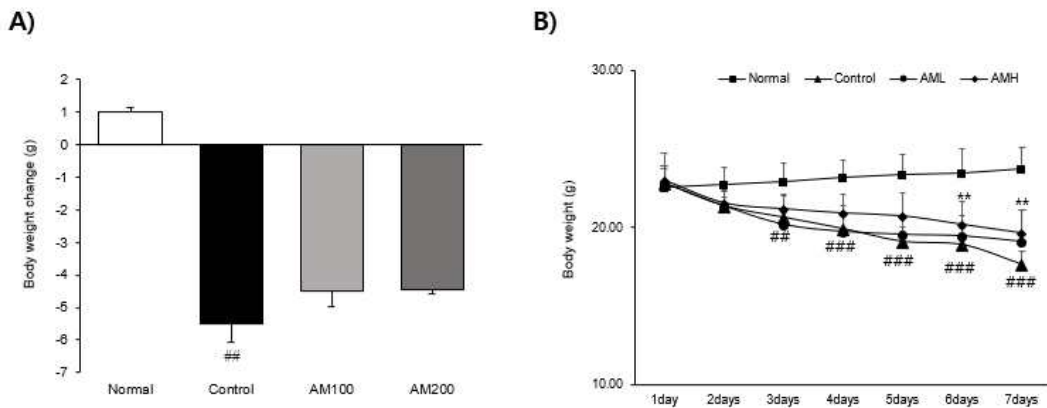


Figure. 3. Body weight change. All data are expressed mean±SD (n=8 per group). AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. Animals were divided into 4 groups: normal mice (Normal), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice (Control), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 100 mg/kg body weight mice (AM100), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight mice (AM200). Significance: ## $p < 0.01$ compared vs. Normal group.

4. 대장 조직의 육안적 길이 변화

각 실험군의 대장 조직의 육안적인 길이 (cm)를 분석한 결과, 정상군 대비 대조군 ($p < 0.001$)에서 대장 조직의 길이가 16.5% 가량 유의적으로 감소하였으나, 대조군 대비 AM투여군에서는 각각 4.5%, 12.1% 가량 대장 길이의 감소가 개선되었다 (Figure 4).

5. 혈청과 조직 내 생화학 분석

혈청 내에서 GOT와 GPT (IU/L) 측정하였다. GOT 측정 결과, 정상군에 비하여 대조군 ($p < 0.001$)은 127.2% 가량 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 AM100군 ($p < 0.05$)과 AM200군 ($p < 0.01$)은 31.1%, 36.4% 가량 유의적으로 감소하였다. GPT (IU/L) 측정 결과, 정상군 대비 대조군 ($p < 0.001$)은 9.3% 가량 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 약물투여군 ($p < 0.01$)은 각각 5.9%, 7.6% 가량 유의적으로 감소하였다.

조직 내에서 MDA 함량 측정 결과, 대장 조직에서 MDA (nM/mg protein) 측정 결과, 정상군 대비 대조군 ($p < 0.01$)은 29.3% 가량 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 약물투여군 ($p <$

0.01)은 모두 약 24% 가량 유의적으로 감소하여 정상군의 수준과 비슷하게 나타났다 (Table 1).

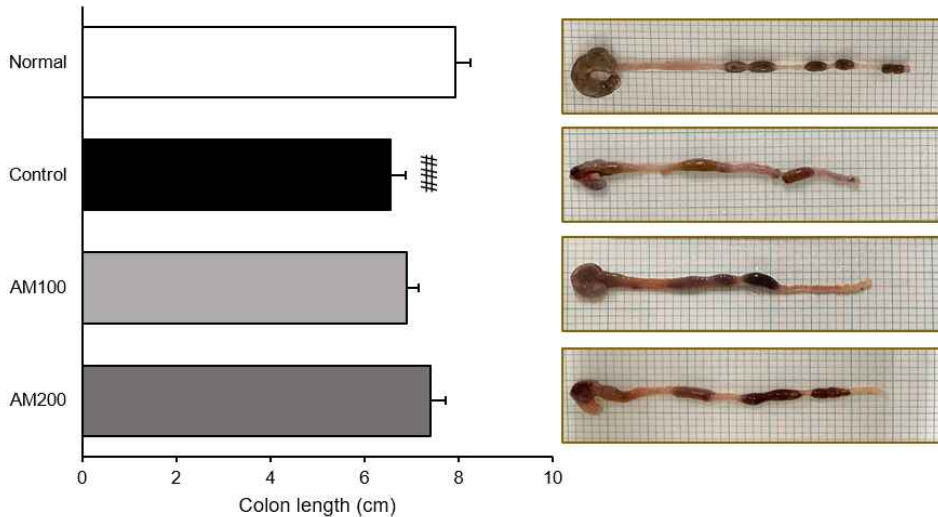


Figure. 4. Macroscopic length changes of colon. All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. Animals were divided into 4 groups: normal mice (Normal), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice (Control), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 100 mg/kg body weight mice (AM100), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight mice (AM200). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group.

Table 1. Indicators of biochemical analysis of serum and colon.

Sample		Normal	5% DSS		
			Control	AM100	AM200
Serum	GOT (IU/L)	12.15 \pm 0.66	27.61 \pm 1.85###	19.02 \pm 2.49*	17.55 \pm 12.90**
	GPT (IU/L)	5.92 \pm 0.14	6.47 \pm 0.06###	6.09 \pm 0.08**	5.98 \pm 0.09**
Colon	MDA (nM/mg protein)	12.81 \pm 0.59	16.56 \pm 1.34##	12.48 \pm 0.84**	12.30 \pm 0.58**

All data are expressed mean \pm SD (n=8 per group). AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. Animals were divided into 4 groups: normal mice (Normal), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice (Control), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 100 mg/kg body weight mice (AM100), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight mice (AM200). Significance: ### $p < 0.001$ compared vs. Normal group and * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$ vs. Control group.

6. 대장 조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질 발현 분석

대장 조직에서 NOX2, p22^{phox} 및 iNOS의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, NOX2에서 정상군 대비 대조군 ($p < 0.001$)은 54% 정도 유의하게 증가하였으나, 대조군 대비 AM200군 ($p < 0.01$)은 29.2% 가량 유의성 있게 감소하였고, AM100군은 감소하는 경향만을 나타냈다. p22^{phox}의 경우, 정상군 대비 대조군 ($p < 0.05$)의 경우 19% 가량 유의하게 증가하였으나, 대조군 대비 AM200군 ($p < 0.01$)은 26.1% 정도 유의적으로 감소하였고, AM100군은 감소하는 경향만을 나타냈다. iNOS는 정상군 대비 대조군 ($p < 0.05$)의 경우 26% 가량 유의하게 증가하였으나, 대조군 대비 AM200군 ($p < 0.05$)은 대조군 대비 21.4% 정도 유의하게 감소하였으며, AM100군은

감소하는 경향만 나타냈다 (Figure 5).

7. 대장 조직 내 항산화 관련 단백질 발현 분석

대장 조직에서 SOD, catalase 및 GPx-1/2의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, SOD에서 정상군 대비 대조군 ($p < 0.01$)의 경우 33% 가량 유의하게 감소하였으나, 대조군 대비 약물투여군 ($p < 0.01$)에서는 각각 47.8%, 46.3% 유의적으로 증가하였다. Catalase의 경우, 정상군 대비 대조군은 감소하는 경향만을 보였으나, 대조군 대비 약물투여군 ($p < 0.01$)은 모두 49.4% 가량 유의적으로 증가하였다. GPx-1/2는 정상군 대비 대조군 ($p < 0.05$)은 28% 유의하게 감소하였으나, 대조군 대비 AM200군 ($p < 0.05$)은 31.9% 정도 유의성 있게 증가하였으며, AM100군은 감소하는 경향만 나타냈다 (Figure 6).

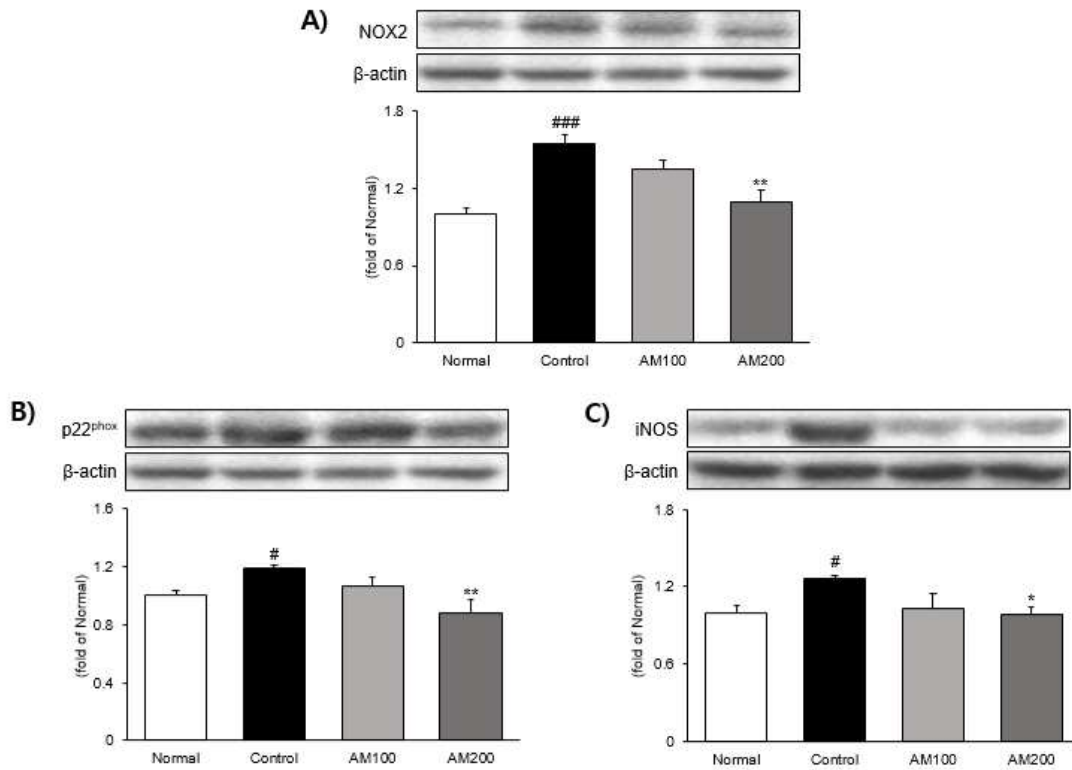


Figure 5. Expressions of NADPH-related proteins in colon, A) NADPH oxidase 2 (NOX2); B) P22phox, C) iNOS. All data are expressed mean±SD (n=8 per group). AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. Animals were divided into 4 groups: normal mice (Normal), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice (Control), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 100 mg/kg body weight mice (AM100), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight mice (AM200). Significance: #*p* < 0.05 compared vs. Normal group and **p* < 0.05, vs. Control group.

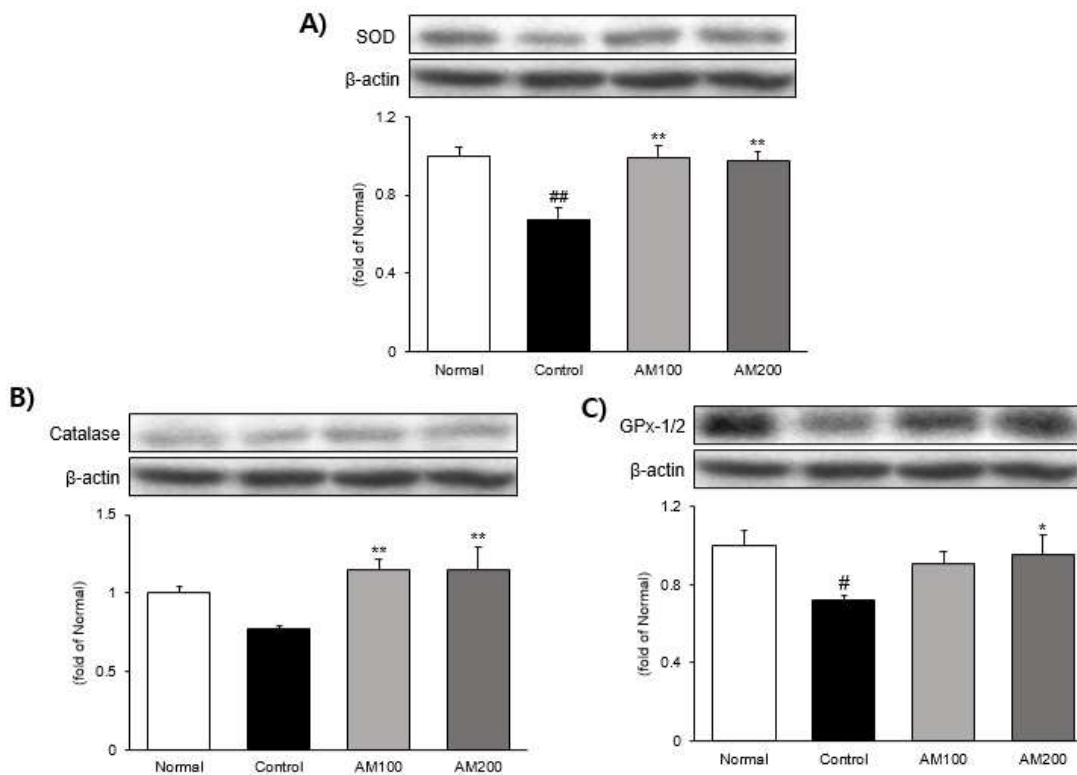


Figure 6. Expressions of antioxidant-related proteins in colon, A) SOD; B) Catalase; C) GPx-1/2. All data are expressed mean±SD (n=8 per group). AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. Animals were divided into 4 groups: normal mice (Normal), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice (Control), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 100 mg/kg body weight mice (AM100), 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight mice (AM200). Significance: #*p* < 0.05 compared vs. Normal group and **p* < 0.05 vs. Control group.

8. 조직병리학적 분석

Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 통해 대장 조직을 광학현미경으로 관찰하였다. Figure 7을 보면, 대조군의 blue arrows의 표시에서 확인할 수 있듯이 DSS 유발로 인한 대장

용모의 소실과 불규칙한 형태 및 염증 세포 침윤이 다량 관찰되었으나, AM을 처리함으로써 대장 용모의 소실과 염증 세포 침윤을 비롯한 염증성 병변이 현저히 개선되었음을 확인할 수 있었다 (Figure 7).

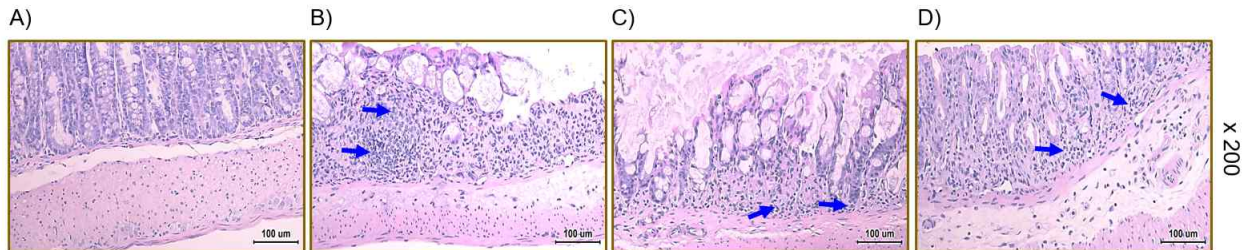


Figure 7. Histopathological analysis.

H&E staining of colon (magnification $\times 200$ / scale bar = $100 \mu\text{m}$).

Blue arrows were mean Inflammation cellular infiltration in large intestine tissue. AM; *Atractylodes macrocephala* Koidzumi water extract. A; Normal, normal mice, B; Control, 5% DSS-induced ulcerative colitis mice, C; AM100, 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM extract 100 mg/kg body weight, AM200; 5% DSS-induced ulcerative colitis mice treated with AM 200 mg/kg body weight.

IV. 고 찰

궤양성 대장염 (Ulcerative colitis, UC)은 장 점막의 만성적인 염증을 특징으로 하는 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease, IBD)의 한 유형으로 체중 감소, 혈변, 긴장성 설사, 복통 및 피로 등의 증상이 나타난다²⁶⁾. 현재 mesalazine, sulfasalazine 등의 aminosalicylate 제제와 스테로이드 제제가 주로 사용되고 있으나 높은 재발률과 부작용으로 인해 완치를 기대할 수 없는 실정이다²⁷⁾. 따라서, 최근 궤양성 대장염의 발병기전 및 치료에 관한 다양한 연구가 진행되고 있으며 전염증효소 (pro-inflammatory cytokine), 전사인자 (transcriptionfactor), arachidonic acid metabolites, reactive oxygen species (ROS) 등과 같은 염증반응 조절을 통한 치료법뿐만 아니라, 장기적인 투여에도 부작용을 최소화할 수 있는 새로운 천연 치료제의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다^{28,29)}.

白朮은 국화과에 속한 *Atractylodes* 종식물로 알려져 있으며, 대한 약전에는 삼주 (*Atractylodes japonica* Koidzumi) 또는 白朮 (*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)의 根莖으로서 周皮를 제거하거나, 제거하지 않은 온전한 상태를 기원으로 하고 있으며, 중국 약전에는 白朮 (*Atractylodes macrocephala* Kodiz)의 根莖을 기원으로 하고 있다³⁰⁾. 白朮에서 분리된 대표적인 성분으로는 atractylenolide I으로 알려져 있으나, 이 외에도 atractylenolide II, III 및 sesquiterpene glycoside 등이 있으며³¹⁾, 白朮의 약리 효능으로는 항산화, 항염증, 항암, 심혈관 작용, 당뇨, 간보호 작용, 위산운동작용 및 항알러지 등의 연구가 보고되어 있으며^{30,32,33)}, 이 외에도 白朮에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다.

이번 연구는 궤양성 대장염 증상 개선에 유효한 효과를 낼 수 있는 새로운 치료제 개발에 대한 연구로서 白朮 열수 추출물의

in vitro 항산화 활성을 측정하였으며, 그 결과를 토대로, *in vivo* 실험을 통해 白朮 열수 추출물의 항산화 효과에 의한 궤양성 대장염의 개선 효과를 알아보았다. 5% DSS를 음수로 궤양성 대장염을 유발한 후 7일간 白朮 열수 추출물을 경구 투여하여 육안적 길이 변화, 혈청과 조직 내 생화학적 분석, western blot을 통한 산화적 스트레스 관련 인자, 항산화 관련 단백질의 발현을 측정하였다.

식물의 폴리페놀계 물질 중 페놀 화합물인 플라보노이드는 항염, 항균, 항산화 및 항암 등의 다양한 효능과 더불어 천연 항산화제로 알려져 있으며, 항산화능 측정에 주로 사용되고 있다²³⁾. DPPH free radical 소거능은 지방 산화를 억제하며 라디칼에 전자를 공여하는 능력을 말하고, ABTS radical 소거능은 ABTS 용액을 peroxidase, H_2O_2 와 반응시켜 ABTS^+ 가 형성되면 추출물에 함유된 항산화 물질에 의해서 radical이 소거되는 정도로 항산화능을 확인할 수 있는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. AM의 항산화 활성을 측정하기 위해 *in vitro* 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS radical 소거 활성을 확인하였다. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 $2.53 \pm 1.13 \text{ mg GAE/g}$, 총 플라보노이드 함량은 $2.25 \pm 0.09 \text{ mg QE/g}$ 으로 측정되었다. 또한, DPPH free radical 소거 활성 측정 결과, IC_{50} 값은 $211.30 \pm 4.83 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, ABTS radical 소거 활성을 측정한 결과 IC_{50} 값은 $461.90 \pm 7.67 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 기존 白朮의 항산화능에 관한 연구에 의하면, 1.0 mg/mL에서 白朮의 항산화능을 측정하였으며, 동량에서 항산화능이 풍부하다고 알려진 비타민C와 비교하였을 시 활성산소 제거능이 유사하다고 보고하였다³⁵⁾. 이러한 결과로 白朮의 항산화 작용이 궤양성 대장염의 예방 및 치료에 응용될 수 있리라 판단된다 (Fig. 1, 2).

in vivo 실험을 통해 궤양성 대장염을 유발한 동물 모델에

白朮 열수 추출물을 7일간 투여한 후 체중 변화량과 대장 조직을 적출하여 육안적으로 길이 변화를 관찰한 결과, 정상군 대비 대조군에서는 궤양성 대장염 유발로 인한 체중 및 대장 길이의 감소가 유의하게 나타났으나, 약물투여군에서는 대조군에 비하여 농도의존적으로 체중 및 대장 길이의 감소가 개선되었다. 이러한 체중 감소와 대장 조직의 길이 감소는 AM 투여로 인해 억제됨을 확인할 수 있었으며, 위와 같은 결과는 AM이 궤양성 대장염을 개선시킬 수 있을 것이라 판단된다 (Fig. 3, 4).

Glutamic oxalacetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvate transaminase (GPT)는 인체 내 생화학 지표 분석으로 알려져 있으며, 간 기능 장애로 인해 혈액이 간 주위로 전환되면 높은 수치를 나타내는데, 이는 산화적 스트레스를 일으켜 다양한 합병증을 유발하게 된다³⁶⁾. 이에 본 연구에서 생화학 지표 분석인 GOT와 GPT의 수치를 확인하였으며, AM투여로 인해 GOT, GPT 수치 모두 농도의존적으로 유의성 있게 감소한 것으로 보아 DSS 유발로 손상된 간 기능을 개선시켜 산화적 스트레스 또한 억제할 것으로 사료된다 (Table. 1).

산화적 스트레스 (Oxidative stress, OS)는 활성산소 (Reactive oxygen species, ROS)의 생성과 분해의 균형이 깨지면서 과다하게 집적된 상태를 말한다. ROS는 산소를 중심으로 하는 유리기로서, 일반적인 산소와는 달리 인체의 세포에서 발생하며 강한 활성을 지닌 산소를 일컫는다. 체내에 ROS가 발생하게 되면 강한 반응성 때문에 인체의 세포를 구성하고 있는 지질, 단백질 및 DNA 등과 쉽게 반응하여 이들을 변형 및 기능 이상을 초래하게 되며 ROS가 세포막을 공격하게 되면 불포화지방산을 산화시켜 과산화지질을 형성하게 된다³⁷⁾. 이에 본 연구에서는 과산화지질의 지표로 이용하는 malondialdehyde (MDA) 분석을 조직 내에서 측정하였으며, AM 투여로 인해 농도의존적으로 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 AM 투여가 OS로 인한 조직 내 과산화지질 생성을 억제함으로써 궤양성 대장염을 완화한 것으로 판단된다 (Table. 1).

NADPH oxidase (NOX)는 원형질막과 세포질에서 주로 발견되며 성장과 세포사멸과 연관된 신호 전달의 매개체로 ROS를 생성을 담당하는 기능을 한다. ROS의 과도한 생성은 OS를 발생시키는데, OS는 조직 손상과 세포 사멸을 일으켜 다양한 질병을 유발하는 산화적 손상을 초래한다³⁸⁾. NOX 중 NOX2는 OS로 발생한 ROS의 대사산물인 H₂O₂를 생성하며, p22^{phox}와 같은 여러 필수 구성요소를 포함하는데, 이 효소 또한 ROS 생성에 관여하여 OS를 발생시키는 것으로 알려져 있다. Inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 대식세포 (macrophage)에서 생성되는 전염증 효소로서, 염증성 장 질환 발병 초기의 염증 반응 및 면역 반응 조절에 중요한 역할을 하며, iNOS에 의한 과도한 nitric oxide (NO)의 생산은 장내 항산화 방어 시스템의 불균형을 초래하여 염증성 장 질환에서 장내 OS에 의한 조직손상을 일으킨다고 알려져 있다³⁹⁾. 이에 본 연구에서는 western blot을 통한 NOX2, p22^{phox} 및 iNOS의 단백질 발현량을 측정하여, AM 투여로 인한 농도의존적인 유의한 감소를 확인하였다. 이러한 결과는 AM의 투여가 DSS로 인한 산화적 손상을 억제함으로써 궤양성 대장염을 개선시킬 것으로 사료된다 (Fig. 5).

체내에는 활성산소의 세포 손상 등을 비롯한 공격에 대응하기 위한 항산화 체계를 가지고 있다. 항산화 체계는 효소적·비효소적 방어기전으로 구분되는데, 효소적 방어기전인 항산화효소는 SOD, catalase 및 GPx-1/2 등이 존재한다. SOD는 O₂⁻를 H₂O₂로 전환하는 작용을 촉매하고, catalase는 H₂O₂를 물과 산소로 전환시키게 되며 GPx-1/2는 H₂O₂를 물로 환원시키는 작용을 하여 산화적 손상으로부터 세포를 보호하게 된다. 뿐만 아니라, 항산화 효소 수치의 장애가 염증성 장 질환 환자에서 주로 나타난다는 연구를 통해, 항산화 체계의 불균형으로 인한 OS 증가가 염증성 장 질환에 깊이 관여하는 것으로 판단된다⁴⁰⁾. 이에 본 연구에서 western blot을 통해 항산화 관련 효소인 SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 측정하였다. 그 결과, AM 투여로 인해 항산화 효소 모두 유의성 있게 증가하였다. 이러한 결과로, 궤양성 대장염 동물 모델에서 AM의 항산화 활성으로 인해 산화적 손상을 억제하여 궤양성 대장염을 완화시킬 것으로 판단된다 (Fig. 6).

이러한 결과는 白朮 열수 추출물을 100 mg/mL과 200 mg/mL의 용량으로 실험을 진행한 결과, DSS로 인한 궤양성 대장염 동물 모델에서 농도 의존적으로 산화적 스트레스 관련 단백질을 유의하게 억제하고, 항산화 단백질을 조절함으로써 염증을 완화하여 궤양성 대장염을 개선시켰음을 확인할 수 있었으며, 궤양성 대장염의 새로운 치료제 개발 가능성이 충분하다고 사료되어진다.

V. 결 론

본 연구에서는 궤양성 대장염 동물 모델에 白朮 열수 추출물을 7일간 투여한 후 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 白朮의 *in vitro*를 통한 항산화 활성을 확인한 결과, 총 폴리페놀 2.65 ± 0.53 mg GAE/g, 총 플라보노이드 (2.25 ± 0.09 mg QE/g)로 나타났으며, DPPH free radical 소거 활성 측정 결과, IC₅₀ 값은 211.30 ± 4.83 μg/mL로 나타났으며, ABTS radical 소거 활성을 측정한 결과 IC₅₀ 값은 461.90 ± 7.67 μg/mL로 나타났다.
2. 궤양성 대장염 동물 모델에서 나타나는 주된 증상인 체중 감소와 대장 조직의 길이 감소가 白朮의 투여로 인해 억제되었음을 확인할 수 있었다.
3. 생화학 지표 분석으로 혈청 내 GOT, GPT 측정 결과, 모든 수치를 유의적으로 감소시켰으며, 대장 조직 내의 MDA 함량 또한 유의적으로 감소시켜 DSS 유발로 인해 증가된 수치를 白朮의 투여로 인해 감소시켰음을 확인할 수 있었다.
4. 白朮의 투여는 대장 조직 내의 산화적 스트레스 관련 인

자인 NOX2, p22^{phox} 및 iNOS의 발현을 유의적으로 감소시켰다.

5. 白朮의 투여는 항산화 관련 인자인 SOD, catalase 및 GPx-1/2의 발현을 측정된 결과, DSS로 인해 감소된 인자들을 유의적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.
6. 白朮의 투여는 조직병리학적 분석을 통해 DSS 유발로 인한 대장 용모의 소실과 불규칙한 형태 및 염증 세포 침윤을 억제함을 확인할 수 있었다.

따라서 白朮 열수 추출물은 궤양성 대장염 동물 모델에서 체중 변화량, 육안적인 대장 조직의 길이, 혈청 내 간 기능 지표 분석인 GOT, GPT 분석, 대장 조직 내 산화적 스트레스 바이오마커인 MDA 분석, 대장 조직 내 산화적 스트레스 관련 인자와 항산화 관련 인자의 단백질 발현량을 분석한 결과를 통하여 白朮이 궤양성 대장염을 개선시키는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 한국보건산업진흥원(KHIDI, HI15C00255)을 통해 보건복지부가 지원한 한약 연구개발 프로그램의 지원을 받았으며, 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(No. 2018R1A5A2025272)을 받아 수행된 연구이다.

References

1. Snider AJ, Kawamori T, Bradshaw SG, Orr KA, Gilkeson GS, Hannun YA, Obeid LM. A role for sphingosine kinase 1 in dextran sulfate sodium-induced colitis. *FASEB J*. 2009;23:143-152.
2. Salaritabar A, Darvishi B, Hadjiakhoondi F, Manayi A, Sureda A, Nabavi SF, Fitzpatrick LR, Nabavi SM, Bishayee A. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2017;23:5097-5114.
3. Larussa T, Imeneo M, Luzzza F. Potential role of nutraceutical compounds in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23:2483-2492.
4. Stein RB, Hanauer SB. Medical therapy for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am*. 1999;28:297-322.
5. Das KM, Eastwood MA, McManus JP, Sircus W. Adverse reactions during salicylazosulphapyridine therapy and the relation with drug metabolism and acetylator phenotype. *N Engl J Med*. 1973;289:491-495.
6. Kim MJ, Shin MR, Lee JA, Park SA, Park HJ, Lee JH, Roh SS. Improvement effect of Sprout of *Coix lacryma-jobi* var. *mayuen* Stapf water extract on dss-induced ulcerative colitis in mice. *Kor. J. Herbol*. 2020;35(6):21-28.
7. Shin MG. *Clinical herbology*. Seoul:Younggrimsa. 1992:172-173.
8. Shou D, Dai S, Zhang J, Li H, Yu Z. [Simultaneous determination of atractylenolide III, atractylenolide I and atractylon in *Artactylodis macrocephala* using microbore liquid chromatography]. *Se Pu*. 2008;26:637-639.
9. Li W, Wen HM, Cui XB, Zhang KW. [Process mechanism of *Atractylodes macrocephala* and conversion of sesquiterpenes]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2006;31:1600-1603.
10. Lu SY, Qian JQ, Zou XM. [Study on the extraction of the active component in *Atractylode macrocephala* with ultrasonic wave technology optimized by the response surface method]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2006;31:549-552.
11. Yosioka I, Tani T, Hirose M, Kitagawa I. Letter: Diacetylratrylodiol, a new acetylenic compound from *Atractylodes japonica* Koidzumi. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1974;22:1943-1945.
12. Ye Y, Chou GX, Wang H, Chu JH, Fong WF, Yu ZL. Effects of Sesquiterpenes Isolated From Largehead *Atractylodes Rhizome* on Growth, Migration, and Differentiation of B16 Melanoma Cells. *Integr Cancer Ther*. 2011;10(1):92-100.
13. Han YK, Park YK. Effect of *Atractylodis Rhizoma Alba* water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Kor. J. Herbol*. 2011;26(4):23-30.
14. Chun HJ, Choi EY, Yoon SC, Nam HW, Baek SH, Woo WH. Inhibitory effects of ethanol extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *Yakhak hoeji*. 2001;45(3):269-275.
15. Jeong YH, Li W, Go Y, Oh YC. *Atractylodis Rhizoma Alba* attenuates Neuroinflammation in BV2 Microglia upon LPS stimulation by inducing HO-1 activity and inhibiting NF- κ B and MAPK. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16):4015.
16. Zhou Y, Tao H, Wang A, Zhong Z, Wu X, Wang M, Bian Z, Wang S, Wang Y. Chinese herb pair *Paeoniae Radix Alba* and *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting MAPK and NF- κ B pathway. *Chin Med*. 2019;14:2.
17. Kim SH, Park YK. Effects of *Atractylodis Rhizoma*

- Alba extract on collagen-induced arthritis in mice. *Kor. J. Herbol*, 2012;27(3):1-6.
18. Lee SO, Seo JH, Lee JW, Yoo MY, Kwon JW, Choi SU, Kang JS, Kwon DY, Kim YK, Kim YS, Yoo SY. Inhibitory effects of the rhizome extract of *Atractylodes japonica* on the proliferation of human tumor cell lines. *Kor. J. Pharmacogn*, 2005;36(3): 201-204.
 19. Shim AR, Dong GZ, Lee HJ, Ryu JH. Atractylolone is a repressor of Wnt/beta-Catenin signaling in colon cancer cells. *Biomol Ther*, 2015;23(1):26-30.
 20. Choi EY, Oh HJ, Park NK, Chun HJ, Ahn JW, Jeon BH, Han DS, Lee HO, Baek SH. Screening of cytotoxicity and antimicrobial effects of extracts from *Atractylodes macrocephala* Koidz, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 2002;16(2): 348-352.
 21. Cha, HY, Jeong AR, Cheon JH, Ahn SH, Park SY, Kim KB. The Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of *Lonicera Japonica* on Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in Mice. *J Pediatr Korean Med*, 2015;29(3):54-64.
 22. Rama P, Vignesh A, Lakshmanan G. In vitro antioxidant activity of *Achyranthes aspera* linn. *Int J Med Pharm*, 2013;(3):67-78.
 23. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958;181(4617): 1199-1200.
 24. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 1999;26(9-10): 1231-1237.
 25. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*, 1978;86(1):271-278.
 26. Lerebours E, Savoye G, Guedon C. [Epidemiology and natural history of chronic inflammatory bowel disease] *Gastroenterol Clin Biol*, 2003;27:S76-S80.
 27. Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Hasegawa M, Kadomatsu K, Ohmiya N, Niwa Y, Xavier R, Goto H. *Paeonolattenuates* TNBS-induced colitis by inhibiting NF- κ B and STAT1 transactivation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006;217(1):35-42.
 28. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004;287(1):G7-17, 19.
 29. Fazio V. Current status of surgery for inflammatory bowel disease. *Digestion*, 1998;59(5):470-480.
 30. Yun BR, Weon JB, Lee B, Lee J, Eom MR, Choong JM. Quantitative analysis of Atractylolones I and III in *Atractylodes japonica*. *Kor. J. Pharmacogn*, 2013;44(1):53-59.
 31. Park MH, Kim CJ, Lee JY, Keum CY, Kim IS, Jin CH, Ji JG, Kim SK. Anti-arthritis effect of radiation mutant *perilla frutescens* var. *crispa* and *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 2020;37(1):102-113.
 32. Han J H, Kim JH, Kim SG, Jung SH, Kim DH, Kim GE, Whang WK. Anti-oxidative compounds from the aerial parts of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi. *Yakhak hoeji*, 2007;(51)2:88-95.
 33. Lee SO, Seo JH, Lee JH, Yoo MY. Inhibitory effects of the rhizome extract of *Atractylodes japonica* on the proliferation of human tumor cell lines. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 2005;(36)3: 201-204.
 34. Choi SH. Pharmacological and Molecular studies of *Atractylodes japonica* Koidzumi on anti-oxidant activity. *Kyung Hee University Graduate School*, Seoul, 2011.
 35. Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park E, Park HR, Lee SC. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008;37(4):405-409.
 36. Heidari R, Jamshidzadeh A, Niknahad H, Mardani E, Ommati MM, Azarpira N, Khodaei F, Zarei A, Ayarzadeh M, Mousavi S, Abdoli N, Yeganeh BS, Saeedi A, Najibi A. Effect of taurine on chronic and acute liver injury: focus on blood and brain ammonia. *Toxicol Rep*, 2016;3:870-879.
 37. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biological & Medicine*, 1995;18(6):1079-1086.
 38. Kim JH. Protective effect of purple sweet potato hot water extract added to *Bacillus subtilis*-fermented soymilk against oxidative stress and cognition ability. *Pusan National University Graduate School*, Pusan, 2011.
 39. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 1994;9:1199-1206.
 40. Yeom Y, Kim Y. The sasa *quelpaertensis* leaf extract inhibits the dextran sulfate sodium-induced mouse colitis through modulation of antioxidant enzyme expression. *J. Cancer Prev*, 2015;20:136-146.