

작약, 감초 및 작약감초탕의 투여가 궤양성 대장염 동물 모델에 미치는 영향: 대사산물 변화를 포함하여

최선희¹ · 박은정^{2,*}

¹하늘제한의원, ²원광대학교 한의과대학 소아과학교실

Abstract

Effects of Paeoniae Radix, Glycyrrhiza Uralensis and Jakyakgamcho-tang Treatment on Ulcerative Colitis Animal Model: Including Changes in Metabolites

Choi Sun Hee¹ · Park Eun Jung^{2,*}

¹Haneulche Korean Medicine Clinic

²Department of Pediatric, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Objectives

To investigate the effect of Jakyakgamcho-tang (JGT) on Dextran sulfate sodium (DSS) induced ulcerative colitis.

Methods

Experimental animals were divided into six groups; group 1, normal group; group 2, DSS-induced colitis group; group 3, 5-aminosalicylic acid (5-ASA)-treated group; group 4, *Glycyrrhiza Uralensis* (Gamcho, GC)-treated group; group 5, *Paeoniae Radix* (Jakyak, JY)-treated group; group 6, JGT-treated group. Inflammatory cytokines and their metabolites were detected.

Result

In the JGT group, the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), prostaglandin E2 (PGE2) were significantly decreased, whereas that of Interleukin-10 (IL-10) were significantly increased. In addition, the metabolite profile changed in the JGT group with most metabolites increasing.

Conclusion

This study demonstrates that the therapeutic potential of JGT in ulcerative colitis. Further studies should be conducted to confirm our findings.

Key words: Jakyakgamcho-tang, ulcerative colitis, cytokines, metabolomics, metabolites

• Received: July 27, 2022 • Revised: August 22, 2022 • Accepted: August 29, 2022
*Corresponding Author: Park Eun Jung
Department of Pediatrics, Wonkwang University Jeonju Korean Medicine Hospital, 99
Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju, Jeollabuk-do, 54887, Republic of Korea
TEL: +82-63-270-1019 / FAX: +82-63-270-1199
E-mail: choisun719@hanmail.net

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

궤양성 대장염은 원인 미상의 만성 염증성 장질환으로 호전과 악화가 반복되는 혈성 설사와 대변절박 및 복통 등이 주증상이며, 크론병과는 다르게 대장의 점막 및 점막하층에 국한된 염증을 특징으로 한다¹⁾.

과거에는 궤양성 대장염을 비롯한 염증성 장질환이 서구 유럽 혈통에 흔히 발병하고, 동양인에는 드문 것으로 여겨졌다. 그러나 국내에서 1970년대부터 궤양성 대장염 증례가 보고된 이후 지속적으로 증가하고 있는 추세로, 소아에서도 염증성 장질환의 발생률이 2000년 이후 급증하고 있다^{1,2)}.

이에 따라 관련 연구도 증가하여 병인으로 흡연이나 식이와 같은 환경적 요인, 유전적 요인, 세균 감염, 장내 세균총의 변화 등이 제시되고 있다^{3,4)}. 치료 방법 역시 5-aminosalicylic acid (5-ASA), 스테로이드, 면역조절제, 생물학 제제 등 약물 치료와 영양 치료, 수술 치료 등으로 다양하게 발전하고 있으나 아직까지 만족스러운 치료법은 제시되지 못하고 있는 실정이다^{5,6)}.

한의학에서 궤양성 대장염은 腸澼, 便血, 腹痛, 積聚, 泄瀉, 痢疾 등의 범주에 속하며⁷⁾, 단방제제, 복합제제를 비롯한 다양한 한약제제의 궤양성 대장염 치료 효과에 대한 국내외 연구가 발표되었다⁸⁻¹²⁾.

작약감초탕은 작약과 감초로 구성된 처방으로, 상한론에 최초로 기록되어 腳攣急을 치료한다고 하였다¹³⁾. 이후 일체 복통 및 근육통을 치료하는 처방으로 널리 사용되고 있으며¹⁴⁾, 진통¹⁵⁾, 항염증¹⁶⁾, 항피로¹⁷⁾ 등 다양한 효과가 실험적으로 입증되었다. 궤양성 대장염과 관련하여 작약과 감초에 대한 효능 연구가 발표된 바 있으며^{8,9)}, 최근 작약감초탕에 대한 효능 연구도 발표되었으나^{18,19)} 작약, 감초의 단일 투여와 비교, 관찰한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 작약, 감초의 단일 투여와 배합 투여가 궤양성 대장염에 미치는 영향에 대해 실험적으로 관찰하고자 Sprague Dawley계의 수컷 흰쥐를 통해 염증성 사이토카인 (inflammatory cytokine) 함량 및 대사산물 변화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. 재료

1) 실험동물

6주령 된 Sprague Dawley계의 수컷 흰쥐 (약 170 ~ 180 g)를 Samtako Bio Korea (Osan, Korea)에서 구입하였으며, 실내 습도 40 ~ 60% 와 실내 온도 23 ± 1 °C로 항온항습이 유지되는 환경의 사육장 안에서 1주일 이상 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안 물과 사료 (Samtako, Korea)를 자유롭게 섭취하게 하였다. 본 연구는 동신대학교 동물윤리심의위원회의 승인을 받아 윤리요강에 따라 실시하였다 (승인번호: DSU-2020-04-02).

2) 약물 제조

실험에 사용된 작약감초탕은 (주)한풍제약에서 열수 추출법에 의하여 추출된 작약, 감초, 작약감초 (1: 1)과 우더를 제공받아 사용하였다 (Table 1). 작약, 감초, 그리고 작약과 감초를 1: 1 비율로 혼합한 시료에 10배량의 정제수를 넣어 100°C에서 3시간 추출하여 추출액을 여과한 후, 여액을 감압농축하고 동결건조하여 약 17.5%의 수율의 건조엑스를 얻었다.

Table 1. The Scientific Name and Prescription Name of the Herbal Material Used in this Study

Material Name	Scientific name
Gamcho	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Jakyak	<i>Paeoniae Radix</i>
Jakyakgamcho-Tang	-

3) 5-aminosalicylic acid (5-ASA)

양성대조를 위하여 5-aminosalicylic acid (5-ASA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 150 mg/kg 농도로 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 군 분리

흰쥐는 적응 기간 동안 체중을 통해 평균 무게를 맞추어 분리하였으며, 아무 처치를 하지 않은 정상군 (Normal, n = 6), Dextran sulfate sodium (DSS)로 대장염 유발 후 치료를 하지 않은 군 (DSS, n = 6), 대장염 유발 후

5-Amino salicylic acid를 투여한 군 (5-ASA, n = 6), 대장염 유발 후 감초를 투여한 군 (Gamcho (GC), n = 6), 대장염 유발 후 작약을 투여한 군 (Jakyak (JY), n = 6), 대장염 유발 후 작약감초탕을 투여한 군 (Jakyakgamcho-tang (JGT), n = 6)으로 분리하였다.

2) Dextran sulfate sodium 유도 궤양성 대장염 유발²⁰⁾

궤양성 대장염은 대장염 유도 물질인 Dextran sulfate sodium (Sigma, USA)를 이용하였다. 흰쥐를 1주일간 적응 후 체중에 따라 군을 분리하였으며, 염증성 장질환인 대장염 유발을 위해 3.5%로 제조된 DSS를 음용하는 방법을 사용하였다. 7일 동안 3.5% DSS를 공급하였다.

3) 약물 투여 및 용량

7일 동안 3.5% DSS를 공급한 후 disease activity index (DAI) score를 통해 대장염 유발을 확인하고, 10일간 약물을 공급하였다. 5-ASA군은 5-ASA를 150 mg/kg/day 농도로, JY군은 작약 파우더를 300 mg/kg/day 농도로, GC군은 감초 파우더를 300 mg/kg/day 농도로, JGT군은 작약감초탕 파우더를 300 mg/kg/day 농도로 음용수에 희석하여 공급하였다.

4) 염증성 사이토카인 측정

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 키트를 사용하였으며, 모든 염증성 사이토카인 측정을 위한 시료는 혈청을 사용하였다. 혈청은 실험이 끝난 뒤 Isoflurane (Hana Pharm, Korea) 2.5%와 80% O₂로 혼합된 흡입 마취를 유도한 상태에서 Rat의 복부를 절개하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 centrifuge (VS-6000CFI, Korea)에서 3,500 rpm으로 20분간 시행하여 혈청을 분리하였다. 각 키트의 방법대로 반응이 끝난 시료는 Microplate reader (EZ Read 400, Biochrom, UK)를 사용하여 450 nm 파장에서 optical density (OD)를 측정하였으며, 시료의 양은 표준 곡선을 만들어 분석하였다.

① Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

Invitrogen사의 BMS607-3 키트를 사용했다. 표준 혈청 시료를 각 well에 100 μ l씩 넣고, 그 위에 1X Biotinylated anti-TNF- α 를 50 μ l씩 한 번 더 넣어준 다

음 상온에서 3시간 동안 배양한다. 1X wash buffer를 300 μ l씩 사용하여 plate를 3번 세척 후 각 well에 1X Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) solution을 50 μ l씩 한 번 더 넣어준 다음 상온에서 1시간 동안 배양한다. 1X wash buffer를 300 μ l씩 사용하여 plate를 3번 세척 후 각 well에 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 100 μ l씩 넣고 암전 상태의 상온에서 10~20분 동안 배양한다. Stop Solution을 100 μ l씩 넣어 발색을 중지시켰다.

② Interleukin-6 (IL-6)

BioMatik사의 EKF57855 키트를 사용했다. 표준 혈청 시료를 각 well에 100 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하고 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 plate를 2번 세척한다. 그 위에 Biotin-labeled antibody를 100 μ l씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 3번 세척한다. 그 다음 HRP-Streptavidin conjugate (SABC)를 100 μ l씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 5번 세척한다. TMB Substrate를 90 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양한다. Stop Solution을 50 μ l씩 넣어 발색을 중지시키고 plate를 1분 동안 혼합하였다.

③ Interleukin-1beta (IL-1 β)

BioMatik사의 EKF57855 키트를 사용했다. 표준 혈청 시료를 각 well에 100 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양하고 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 plate를 2번 세척한다. 그 위에 Biotin-labeled antibody를 100 μ l씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 3번 세척한다. 그 다음 HRP-Streptavidin conjugate (SABC)를 100 μ l씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μ l씩 사용하여 5번 세척한다. TMB Substrate를 90 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양한다. Stop Solution을 50 μ l씩 넣어 발색을 중지시키고 plate를 1분 동안 혼합하였다.

④ Interleukin-10 (IL-10)

Invitrogen사의 BMS629TWO 키트를 사용했다. 표준 혈청 시료를 각 well에 100 μ l씩 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서 90분 동안 배양한다. plate의 용액을 제거하되 세척은 하지 않은 상태에서 각 well에 Biotinylated detection

Antibody working solution을 100 μl 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 배양한다. 1X wash buffer를 사용하여 plate를 3번 세척 후 각 well에 HRP conjugate working solution을 100 μl 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 배양한다. 1X wash buffer를 사용하여 plate를 5번 세척 후 각 well에 substrate reagent을 90 μl 씩 넣고 암전 상태의 상온에서 15분 동안 배양한다. Stop Solution을 50 μl 씩 넣어 발색을 중지시켰다.

⑤ Prostaglandin E2 (PGE2)

BioMatik사의 EKV06858 키트를 사용했다. 표준 혈청 시료를 각 well에 100 μl 씩 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90분간 배양하고 1X wash buffer를 400 μl 씩 사용하여 plate를 2번 세척한다. 그 위에 Biotin-labeled antibody를 100 μl 씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μl 씩 사용하여 3번 세척한다. 그 다음 HRP-Streptavidin conjugate (SABC)를 100 μl 씩 넣어준 다음 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양한 후 1X wash buffer를 400 μl 씩 사용하여 5번 세척한다. TMB Substrate를 90 μl 씩 넣고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 배양한다. Stop Solution을 50 μl 씩 넣어 발색을 중지시키고 plate를 1분 동안 혼합하였다.

5) 대사산물 분석

① 시료 전처리

대장염 유발 및 치료에 따른 대사산물 변화를 확인하기 위해 혈청을 분석에 사용하였으며, 혈청의 gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) 분석에 앞서 시료 전처리를 위해 Mastrangelo 등의 연구방법²¹⁾을 참고하였다. 간단히 말해, 300 μl 의 cold methanol을 100 μl 의 혈청 시료에 첨가한 후, 원심분리 (14,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min)하여 상등액을 실험에 사용하였고, 혈청의 상등액 (100 μl)은 methoxymation과 trimethylsilylation 과정을 거쳐 GC/MS에 주입되었으며, GC/MS 분석 중 발생하는 실험오차를 최소화하기 위해 무작위 순서로 분석을 진행하였다.

② GC/MS 분석

GC/MS 분석을 위해 Shimadzu QP2020 GC/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 활용하였으며, RTX-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm ID, J&W Scientific, CA)을 장착하여 분석을 진행하였다. 주입된 시료는

600 μl 였으며, GC oven은 초기 60 $^{\circ}\text{C}$ 로 1분간 유지하였다가 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 300 $^{\circ}\text{C}$ 까지 증가시킨 후 10분간 유지하였으며, 질량 분석기의 조건은 50-600 m/z의 범위에서 full scan mode로 설정되었다. 주입기, 이온화 소스 및 열 전달 통로의 온도는 각각 250 $^{\circ}\text{C}$, 230 $^{\circ}\text{C}$, 280 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지되었으며, 전자 충격 이온화 모드는 70 eV로 설정되었다.

③ GC/MS 데이터 처리 및 분석

GC/MS 분석 후 생성된 데이터의 1차 전처리 (노이즈 제거, 기준선 보정 및 정렬)를 진행하기 위해 XCMS web software (<https://xcmsonline.scripps.edu>)를 활용하였다. 그 후 Microsoft Excel software를 활용하여 2차 데이터 전처리 (내부 표준 데이터 보정)를 수행하였고, 실험 그룹 간 차이에 기여하는 대사산물을 확인하기 위해 SIMCA-P (ver. 15.0) software package (Umetrics, Umea, Sweden)를 활용하여 다변량 통계분석을 실시한 후, VIP > 1.0의 조건에 해당하는 특징 (feature)을 추출하였다. 추출된 특징은 SPSS software package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 활용하여 p-value < 0.5로 filtration 되었으며, 해당 특징을 GC/MS library (NIST 14.0, Gaithersburg, MD, USA)의 질량 스펙트럼과 비교하여 유사도 80% 이상 일치하는 대사산물을 잠재적 바이오마커로 확정하였다.

3. 통계 분석

실험에서 생성된 모든 결과의 통계 분석은 Graph Pad Prism (Ver. 6.01 for Window, USA)을 사용하여 평균과 표준오차 (mean \pm standard error)로 표시하여 평균 비교를 실시하였다. 각 실험의 평균차이에 대한 통계적 유의성 검증은 Tukey's multiple comparisons test를 사용하여 95% 수준에서 각 그룹간의 유의적인 차이를 검증하였다.

III. Results

1. 염증성 사이토카인 변화에 미치는 영향

1) TNF- α 변화

TNF- α 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 (1.62 \pm 0.07 pg/ml)에 비하여 DSS군 (2.95 \pm 0.41

pg/ml)은 유의한 증가를 나타내었다. DSS군에 비하여 5-ASA군 (1.49 ± 0.06 pg/ml)과 JGT군 (1.85 ± 0.18 pg/ml)은 유의한 감소를 나타내었고, GC군 (2.09 ± 0.16 pg/ml)과 JY군 (1.97 ± 0.25 pg/ml)은 감소의 경향을 나타내었다 (Fig. 1).

2) IL-6 변화

IL-6 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 (3.46 ± 0.27 pg/ml)에 비하여 DSS군 (5.77 ± 1.02 pg/ml)은 유의한 증가를 나타내었다. DSS군에 비하여

5-ASA군 (3.40 ± 0.29 pg/ml)은 유의한 감소를 나타내었고, GC군 (5.17 ± 0.29 pg/ml), JY군 (4.93 ± 0.58 pg/ml), JGT군 (4.54 ± 0.33 pg/ml)은 감소의 경향을 나타내었다 (Fig. 2).

3) IL-1 β 변화

IL-1 β 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 (14.5 ± 1.48 pg/ml)에 비하여 DSS군 (48.8 ± 11.83 pg/ml)은 유의한 증가를 나타내었고, DSS군에 비하여 5-ASA군 (18.3 ± 2.18 pg/ml)은 유의한 감소를 나타내

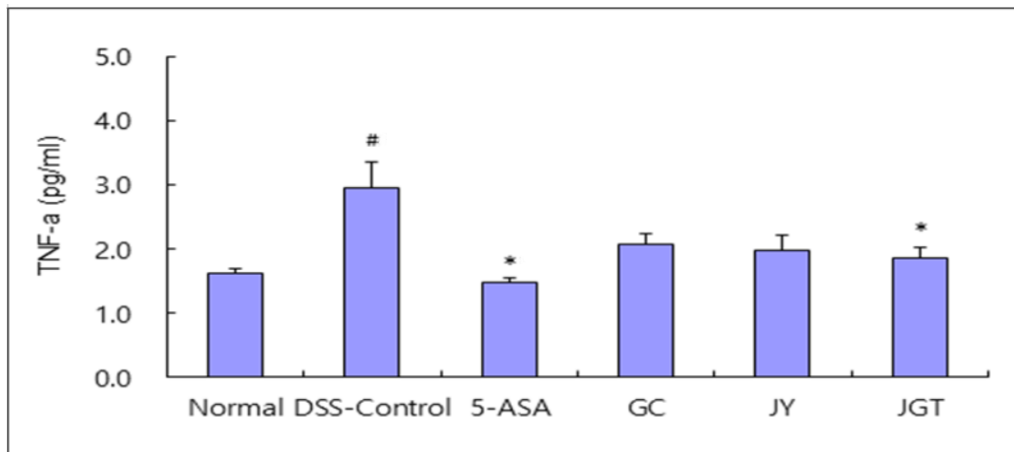


Fig. 1. Changes on cytokine TNF- α after GC, JY and JGT administrations in colitis rats induced by DSS.

Values are expressed Mean \pm SE; TNF- α , Tumor necrosis factor alpha; DSS, Dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC, Gamcho; JY, Jakyak; JGT, Jakyakgamcho-tang; DSS-Control and experimental groups orally administered in this study respectively. * P < 0.01 compared with normal ; # P < 0.05 compared with DSS-Control.

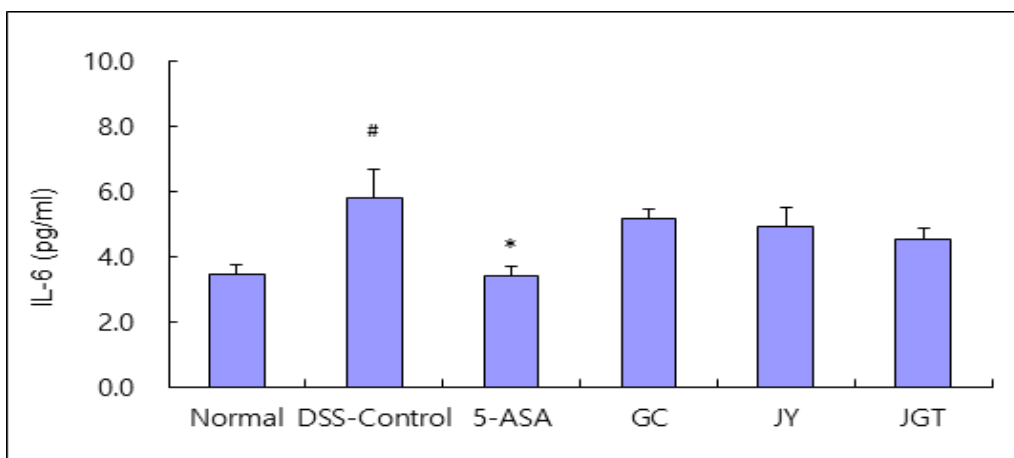


Fig. 2. Changes on cytokine IL-6 after GC, JY and JGT administrations in colitis rats induced by DSS.

Values are expressed Mean \pm SE; IL-6, Interleukin-6; DSS, Dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC, Gamcho; JY, Jakyak; JGT, Jakyakgamcho-tang; DSS-Control and experimental groups orally administered in this study respectively. * P < 0.01 compared with normal ; # P < 0.05 compared with DSS-Control.

었다. GC군 (30.6 ± 2.62 pg/ml), JY군 (29.5 ± 4.25 pg/ml), JGT군 (31.5 ± 3.34 pg/ml) 모두 감소의 경향을 나타내었다 (Fig. 3).

4) IL-10 변화

IL-10 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 (68.2 ± 6.55 pg/ml)에 비하여 DSS군 (51.4 ± 1.44 pg/ml)은 유의한 감소를 나타내었고, DSS군에 비하여 GC군 (66.1 ± 4.14 pg/ml), JY군 (59.1 ± 3.46 pg/ml), JGT군 (60.8 ± 2.26 pg/ml)은 유의한 증가를 나타내었 으며, 5-ASA군 (57.1 ± 2.32 pg/ml)은 증가의 경향을

나타내었다 (Fig. 4).

5) PGE2 변화

PGE2 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 (102.9 ± 13.1 pg/ml)에 비하여 DSS군 (194.7 ± 6.6 pg/ml)은 유의한 증가를 나타내었고, DSS군에 비하여 JGT군 (130.8 ± 19.2 pg/ml)은 유의한 감소를 나타내었 으며, 5-ASA군 (171.8 ± 20.1), GC군 (164.5 ± 7.6 pg/ml), JY군 (167.0 ± 12.8 pg/ml)은 감소의 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

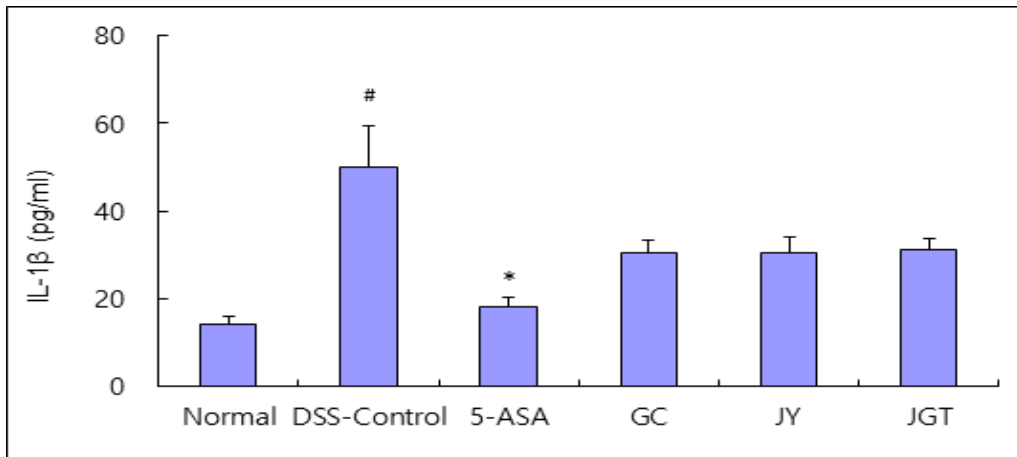


Fig. 3. Changes on cytokine IL-1β after GC, JY and JGT administrations in colitis rats induced by DSS.

Values are expressed Mean ± SE; IL-1β, Interleukin-1beta; DSS, Dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC, Gamcho; JY, Jakyak; JGT, Jakyakgamchotang; DSS-Control and experimental groups orally administered in this study respectively. * P < 0.01 compared with normal ; # P < 0.05 compared with DSS-Control.

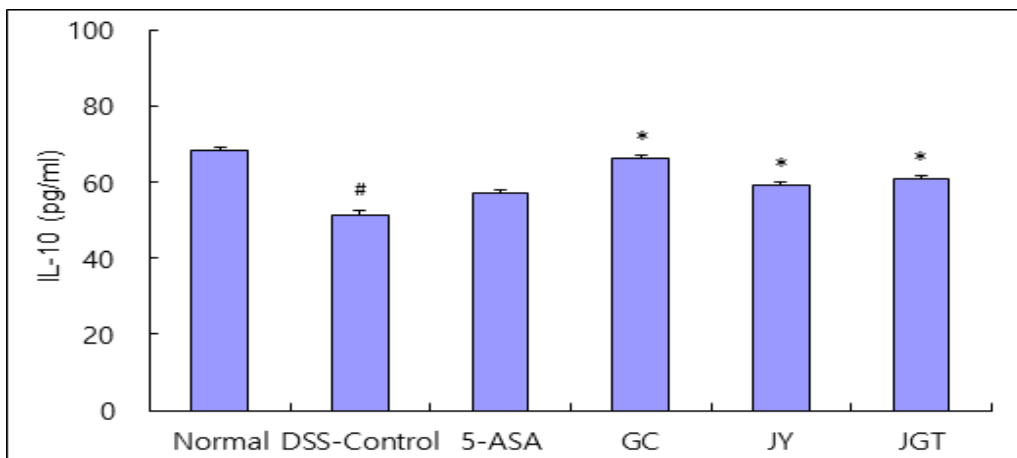


Fig. 4. Changes on cytokine IL-10 after GC, JY and JGT administrations in colitis rats induced by DSS.

Values are expressed Mean ± SE; IL-10, Interleukin-10; DSS, Dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC, Gamcho; JY, Jakyak; JGT, Jakyakgamchotang; DSS-Control and experimental groups orally administered in this study respectively. * P < 0.01 compared with normal ; # P < 0.05 compared with DSS-Control.

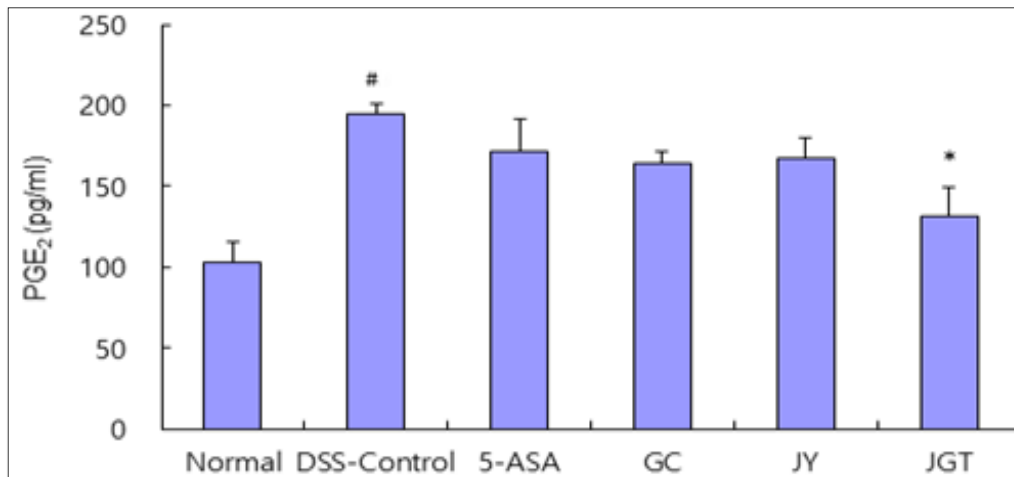


Fig. 5. Changes on cytokine PGE2 after GC, JY and JGT administrations in colitis rats induced by DSS.

Values are expressed Mean ± SE; PGE2, Prostaglandin2; DSS, Dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC, Gamcho; JY, Jakyak; JGT, Jakyakgamchotang; DSS-Control and experimental groups orally administered in this study respectively. * P < 0.01 compared with normal ; # P < 0.05 compared with DSS-Control.

2. 대사산물에 미치는 영향

1) 대장염 유발 및 치료에 따른 혈청 대사체 식별

대장염 유발, 5-ASA, 감초 (GC), 작약 (JY) 및 작약감초탕 (JGT)의 투여에 따른 혈청 대사산물의 차이를 확인하기 위해, 혈청 시료를 유도체화하여 GC/MS로 분석하였다. Unknown 대사산물을 포함한 총 411개의 peak가 확인되었으며, 그 중 74개의 대사산물을 동정하였다 (Table 2).

2) 대장염 유발 및 약물 투여에 따른 혈청 대사체 변화

대사산물 프로파일의 상대적인 차이를 시각적으로 관찰하기 위해 다변량 분석(multivariate analysis)을 시행하였으며, 대장염 유발 및 약물 투여에 따른 대사체 패턴 변화를 partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) 모델을 활용하여 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다 (R2X = 0.397, Q2 = 0.243).

Table 2. Identified Metabolites in Serum Samples

No	RT (min)*	Metabolites	T ⁺	HMDB [†]	PubChem [‡]	KEGG [§]
1	4.345	Propylene glycol	117	HMDB0001881	1030	C02912
2	4.660	Lactic acid	147	HMDB0000190	61503	C00186
3	5.150	Glycolic acid	147	HMDB0000115	757	C03547
4	5.420	2-HydroxyButyrate	131	HMDB0000008	11266	C05984
5	5.780	Oxalate	147	HMDB0002329	971	C00209
6	5.915	2-Aminoisobutyrate	130	HMDB0001906	6119	C03665
7	6.385	Valine	144	HMDB0000883	6287	C00183
8	6.555	Malonic acid	147	HMDB0000691	867	C04025
9	6.710	Benzoic acid	179	HMDB0001870	243	C00539
10	6.900	2-Aminoethanol	174	HMDB0000149	700	C00189
11	6.950	Leucine	158	HMDB0000687	6106	C00123
12	6.970	Glycerol	147	HMDB0000131	753	C00116
13	6.990	Phosphate	299	HMDB0001429	57424078	C00009
14	7.170	Isoleucine	158	HMDB0000172	6306	C00407
15	7.180	Threonine	117	HMDB0000167	6288	C00188
16	7.220	Proline	142	HMDB0000162	145742	C00148
17	7.305	Glycine	174	HMDB0000123	750	C00037
18	7.320	Ethylmalonate	147	HMDB0000622	11756	-
19	7.425	Catechol	254	-	3390	C00090

No	RT (min)*	Metabolites	T ⁺	HMDB [†]	PubChem [‡]	KEGG [§]
20	7.500	Maleic acid	147	HMDB0000176	444972	C01384
21	7.615	Uracil	241	HMDB0000300	1174	C00106
22	7.810	Serine	204	HMDB0000187	5951	C00065
23	7.820	Glyceric acid	147	HMDB0000139	439194	C00258
24	7.825	Alanine	188	HMDB0000161	5950	C00041
25	7.870	Pipecolic acid	156	HMDB0000070	849	C00408
26	8.160	Glutaric acid	147	HMDB0000661	743	C00489
27	8.200	Thymine	255	HMDB0000262	1135	C00178
28	8.330	Hydrocinnamate	104	HMDB0000764	107	C05629
29	8.410	b-Alanine	174	HMDB0000056	239	C00099
30	8.610	homoserine	218	HMDB0000719	12647	C00263
31	9.145	Threitol	217	HMDB00004136	222285	C16884
32	9.215	Aspartic acid	232	HMDB0000191	5960	C00049
33	9.220	Methionine	176	HMDB0000696	6137	C00073
34	9.270	Pyroglutamic acid	156	HMDB0000267	7405	C01879
35	9.275	trans-4-Hydroxy-L-proline	230	HMDB0000725	5810	C01157
36	9.280	Malic acid	147	HMDB0000744	525	C03668
37	10.005	Glutamic acid	246	HMDB0000148	33032	C00025
38	10.080	5-Aminovaleric acid	174	HMDB0000355	138	C00431
39	10.085	Hypotaurine	100	HMDB0000965	107812	C00519
40	10.115	Phenylalanine	218	HMDB0000159	6140	C00079
41	10.200	Lauric acid	257	HMDB0000638	3893	C02679
42	10.420	Arabinose	103	HMDB0000646	439195	C02479
43	10.535	Ribose	103	HMDB0000283	5779	C00121
44	10.765	Xylitol	217	HMDB00002917	6912	C00379
45	10.945	Putrescine	174	HMDB00001414	1045	C00134
46	11.025	Fucose	117	HMDB0000174	25310	C01019
47	11.200	2,3-Dihydroxybenzoate	355	HMDB0000397	19	C00196
48	11.460	Hypoxanthine	265	HMDB0000157	790	C00262
49	11.515	Ornithine	142	HMDB0000214	6262	C00077
50	11.545	Glycyl-Glycine	174	HMDB0011733	11163	C02037
51	11.620	Shikimic acid	204	HMDB00003070	8742	C00493
52	11.735	Cadaverine	174	HMDB00002322	273	C01672
53	11.905	Adenine	264	HMDB0000034	190	C00147
54	11.970	Fructose	103	HMDB0000660	439709	C02336
55	12.155	Mannose	319	HMDB0000169	18950	C00936
56	12.210	Lysine	174	HMDB0000182	5962	C00047
57	12.280	Galactitol	217	HMDB0000107	11850	C01697
58	12.285	Glucose	319	HMDB0000122	5793	C00221
59	12.350	Tyrosine	218	HMDB0000158	6057	C00082
60	12.375	Sorbitol	147	HMDB0000247	5780	C00794
61	12.480	Galacturonic acid	333	HMDB00002545	84740	C08348
62	12.500	Gallic acid	281	HMDB00005807	370	C01424
63	12.820	Palmitoleate	117	HMDB00003229	5312427	C08362
64	13.125	N-Acetylmethionine	174	HMDB00003357	439232	C00437
65	13.420	Inositol	217	HMDB0000211	-	C00137
66	13.540	Heptadecanoate	117	HMDB00002259	10465	-
67	13.985	Elaidic acid	117	HMDB00000573	637517	C01712
68	14.075	5-Hydroxyindoleacetate	290	HMDB0000763	1826	C05635
69	14.120	Octadecanoate	117	HMDB00000827	5281	C01530
70	15.610	5-Hydroxy-L-tryptophan	218	HMDB0000472	144	C00643
71	15.755	Uridine	217	HMDB0000296	6029	C00299
72	17.040	Trehalose	361	HMDB00000975	7427	C01083
73	17.180	Maltose	361	HMDB0000163	10991489	C00208
74	21.215	Panose	204	HMDB0029937	4120027	C00713

* RT, retention time; + T, targetion; † HMDB, Human metabolome database. HMDB is a comprehensive, high-quality, freely accessible, online database of small molecule metabolites found in the human body; ‡ PubChem, PubChem is a database of chemical molecules and their activities against biological assays. The system is maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), a component of the National Library of Medicine, which is part of the United States National Institutes of Health (NIH); § KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. KEGG is a collection of databases dealing with genomes, biological pathways, diseases, drugs, and chemical substances.

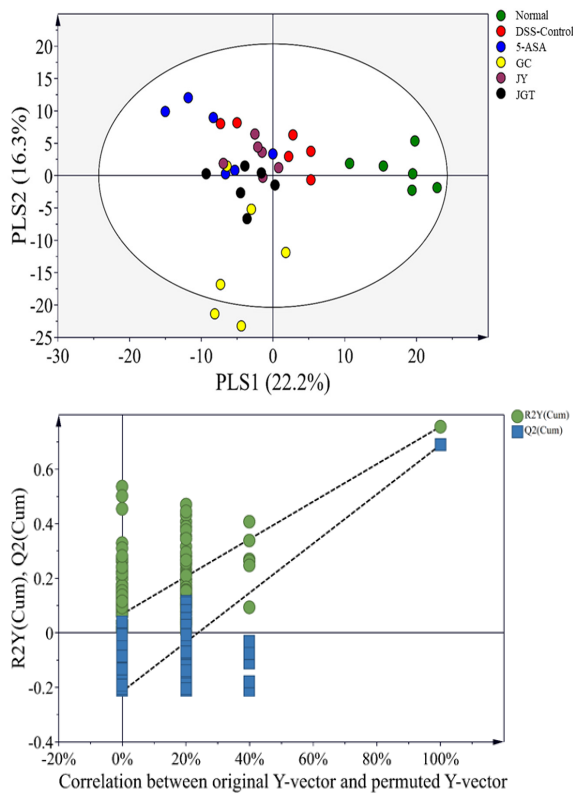


Fig. 6. PLS-DA score plot for normal, DSS-induced colitis, 5-ASA, JY, GC and JGT treated groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test (n = 200).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; JY, Jakyak (*Paeoniae Radix*); GC, Gancho (*Glycyrrhiza Uralensis*); JGT, Jakykgamcho-tang.

(1) 대장염 유발에 따른 혈청 대사체 변화

대장염 유발에 따른 대사체 패턴 변화를 PLS-DA 모델을 활용하여 분석한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 분석 결과, 정상군과 DSS군 간의 대사산물 프로파일의 차이가 명확하게 확인되었다 (R2X = 0.481, R2Y = 0.952, Q2 = 0.749). PLS-DA 모델에 대한 순열 검정을 통해 모델이 over-fit 되지 않은 것을 확인하였다.

두 그룹간의 차이에 기여하는 잠재적인 바이오 마커는 variable importance in projection score (VIP score) 값을 활용하여, VIP > 1.0, p-value < 0.05에 해당하는 대사산물로 확정하였다. DSS로 대장염을 유발했을 때, 차이에 기여하는 대사산물은 fucose, arabinose, xylitol, maleic acid, 5-hydroxyindoleacetate, galactitol, glucose, lysine, elaidic acid, maltose로 총 9종이었다. 각각의 대사산물의 경향을 보면 5-hydroxyindoleacetate와 elaidic

acid는 대장염 유발에 따라 증가하였고 fucose, arabinose, xylitol, maleic acid, galactitol, glucose, lysine 및 maltose는 감소하는 경향을 보였다.

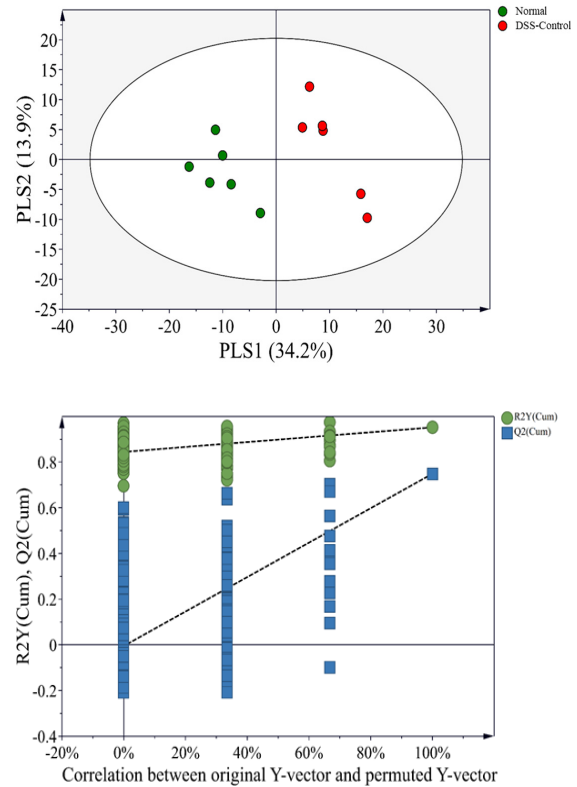


Fig. 7. PLS-DA score plot for normal and DSS-induced colitis groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test (n = 200).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; GC/MS, gas chromatography mass spectrometry.

(2) 약물 투여에 따른 혈청 대사체 변화

① 5-ASA 투여에 따른 혈청 대사체 변화

DSS군과 5-ASA군 간의 혈청 대사산물의 변화를 확인하기 위해 다변량 통계 분석을 진행하였다. 각각의 시료에 그룹을 지정해준 후 모델을 구성하는 PLS-DA 모델에서 DSS군과 5-ASA군 간의 명확한 차이를 확인할 수 있었으며 (Fig. 8), 200번의 교차검증을 통한 순열 검정에서도 모델의 신뢰성을 확인하였다 (R2X = 0.368, R2Y = 0.952, Q2 = 0.749).

DSS군과 5-ASA군 간 PLS-DA 모델 차이에 기여한 잠재적인 바이오마커를 확인하기 위해 VIP score 분석 및 t-test를 진행하였다. 분석 결과 phosphate, proline, uracil, 2,3-dihydroxybenzoate, 5-hydroxyindoleacetate 및

adenine의 총 6종 대사산물이 DSS군과 5-ASA군 간의 차이에 기여하는 대사산물로 확인되었다 (VIP > 1.0, $p < 0.05$). 이 6개의 대사산물은 5-ASA 투여 후 모두 증가하는 패턴을 보였다.

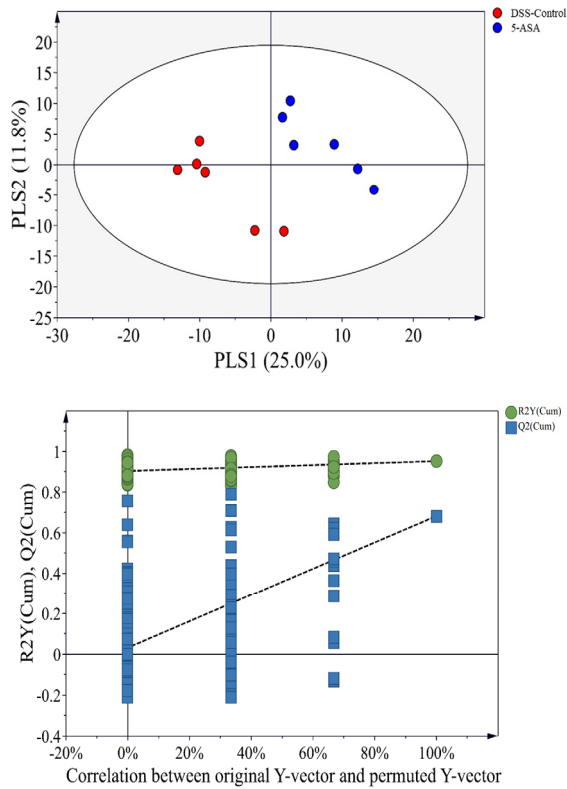


Fig. 8. PLS-DA score plot for DSS-induced colitis, and 5-ASA treatment groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test ($n = 200$).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; GC/MS, gas chromatography mass spectrometry.

② 감초 투여에 따른 혈청 대사체 변화

Fig. 9는 PLS-DA와 그에 대한 순열 검정을 진행한 결과로 나타내었다 ($R^2X = 0.392$, $R^2Y = 0.977$, $Q^2 = 0.478$). 분석 결과, 명확한 그룹 간 차이를 보였으며, 200번의 교차검증을 통한 순열 검정에서도 모델의 신뢰성이 확인되었다.

DSS군과 GC군 간 차이에 기여하는 대사산물을 확인하기 위해 VIP score 분석 및 t-test를 진행하였다. 그 결과, glycolic acid, oxalate, malonic acid, threonine, serine, glyceric acid, homoserine, threitol, trans-4-hydroxy-L-proline, benzoic acid, 2-aminoethanol, phosphate,

alanine, glutaric acid, xylitol, putrescine, ornithine, shikimic acid, cadaverine, allose, lysine, galactitol, uridine 총 23종 대사산물이 두 그룹 간 차이에 기여하는 대사산물로 확인되었다 (VIP > 1.0, $p < 0.05$). 24개의 대사산물 모두 DSS군 대비 GC군에서 증가하는 패턴을 보였다.

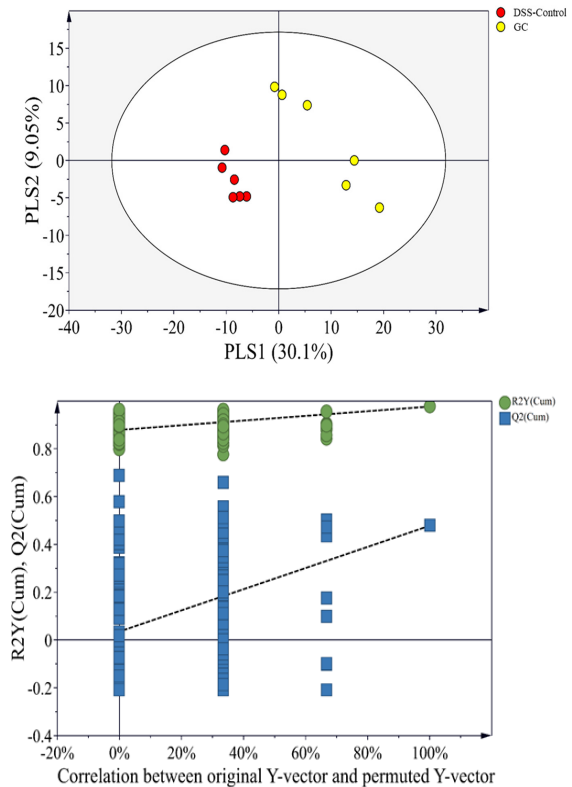


Fig. 9. PLS-DA score plot for DSS-induced colitis and GC treatment groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test ($n = 200$).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; GC/MS, gas chromatography mass spectrometry; GC, Gamcho (*Glycyrrhiza Uralensis*).

③ 작약 투여에 따른 혈청 대사체 변화

그룹 간 차이를 극대화하기 위해 PLS-DA 모델을 생성한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 두 그룹 간의 대사산물 프로파일의 명확한 차이를 확인할 수 있었으며 ($R^2X = 0.374$, $R^2Y = 0.944$, $Q^2 = 0.501$), 순열 검정 ($n = 200$) 결과에서도 PLS-DA 모델에 대한 신뢰성을 확인할 수 있었다.

DSS군과 JY군 간의 차이에 기여하는 대사산물을 나타냈을 때, benzoic acid, phosphate, threonine, ornithine,

cadaverine, lysine, maleic acid, alanine, glutaric acid 및 glucose 총 10개의 대사산물이 두 그룹 간 차이에 기여하는 것으로 확인되었다 (VIP > 1.0, $p < 0.05$). 해당하는 대사산물들을 모두 JY군에서 증가하는 패턴을 보였는데, 이는 감초를 투여했을 때와 유사한 패턴이었다.

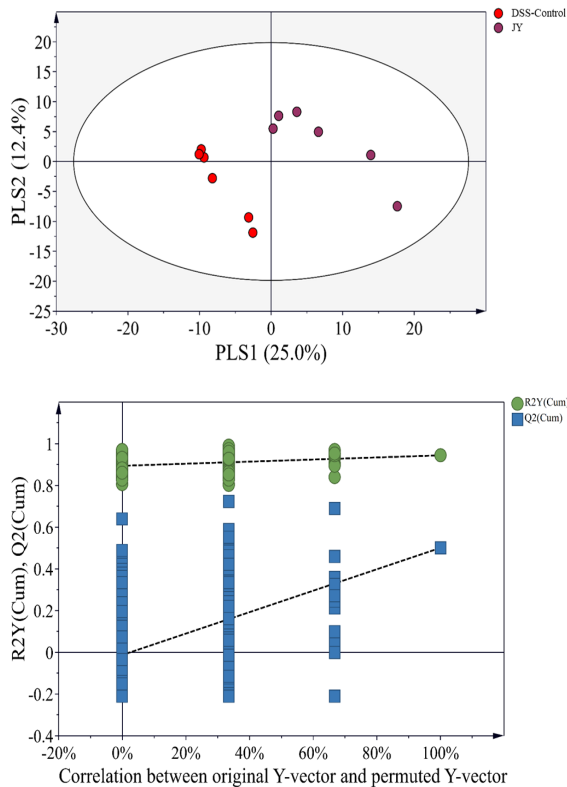


Fig. 10. PLS-DA score plot for DSS-induced colitis and JY treatment groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test ($n = 200$).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; JY, Jakyak (*Paeoniae Radix*); GC/MS, gas chromatography mass spectrometry.

④ 작약감초탕 투여에 따른 혈청 대사체 변화

DSS군과 JGT군에서 PLS-DA 모델의 결과는 Fig. 11에 나타내었는데, 두 그룹 간의 혈청 대사산물 프로파일이 명확하게 구분되었다.

Benzoic acid, threonine, glutaric acid 및 ribose가 그룹 간 차이에 기여하는 대사산물로 확인되었으며 (VIP > 1.0, $p < 0.05$), 각각의 대사산물 모두 JGT군이 DSS군보다 높은 것으로 확인되었다.

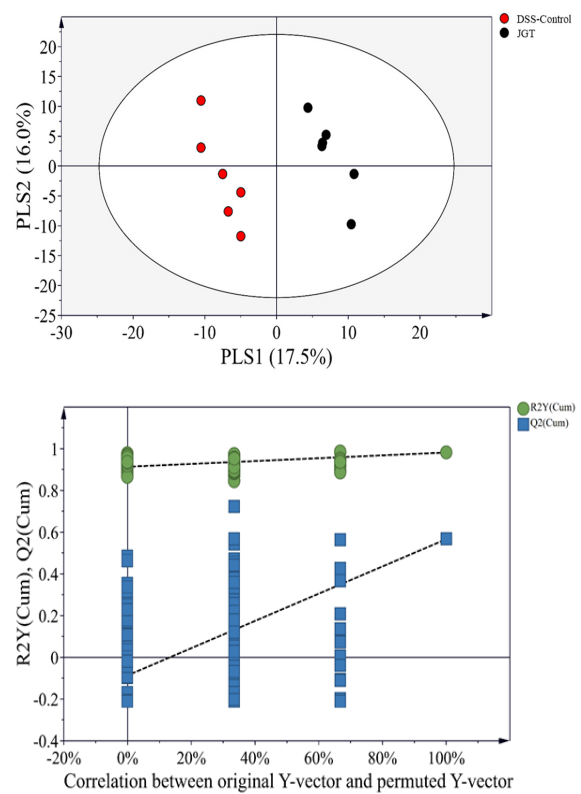


Fig. 11. PLS-DA score plot for DSS-induced colitis and JGT treatment groups derived from GC/MS data of serum samples. These PLS-DA models were validated by a permutation test ($n = 200$).

Abbreviations. PLS-DA, partial least squares discriminant analysis; DSS, dextrane sulfate sodium; JGT, Jakyakgamcho-tang; GC/MS, gas chromatography mass spectrometry.

IV. Discussion

궤양성 대장염은 크론병과 함께 염증성 장질환의 대표적인 질환으로 꼽힌다¹⁾. 국내 궤양성 대장염의 연도별 환자수를 살펴보면, 서론에서 밝힌 바와 같이 2010년 28,162명에서 2015년 35,623명, 2019년 46,681명으로 지속적으로 증가 추세에 있다²⁾. 소아에서 염증성 장질환의 발생률 역시 증가 추세에 있는데, 소아 염증성 장질환 환자는 중증인 경우가 많고, 병변의 침범 부위가 넓으며 성장 지연이나 사춘기 지연을 경험할 수 있어 이에 대한 관심도 증가하고 있다³⁻²⁵⁾.

궤양성 대장염의 병인은 명확하게 규명되지 않았으나, 환경적 인자, 미생물학적 인자 등 다양한 인자가 복합적으로 작용하는 것으로 이해된다⁴⁾. 환경적 인자로 서구적인 식습관, 청결과 높은 위생 상태, 흡연 등이

이 질환의 발병과 상관성이 있다고 보고되었으며^{2,26)}, 가족 간 일치율, 일란성 쌍생아에서 질환의 일치율이 높다는 점을 미루어보아 유전학적 인자 역시 중요하다고 할 수 있다³⁾.

치료에 있어 질병의 진행을 막고 합병증을 예방하기 위한 치료 목표 설정의 필요성이 제기되었고, 최근에는 증상의 소실과 함께 점막 병변의 치유를 통해 구조적인 장 손상이나 신체 장애를 예방하는 것을 목표로 한다^{1,27)}.

표준적인 약물치료로 5-ASA 제제, 스테로이드, 면역조절약물 제제 등이 있으나 궤양성 대장염 환자의 20 ~ 40%는 통상적인 약물치료에 실패하거나 부작용을 겪는다고 알려져 있다. 그러므로 부작용이 적고, 장기적으로 효능이 입증된 이상적인 새로운 치료법 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 새로운 제형의 개발, 생물학적 제제, 백혈구성분채집술 (leukocytapheresis) 등 새로운 치료제의 개발이 가속화되면서 천연물, 한약재의 활용이 주목받고 있다⁵⁾.

이에 저자는 작약, 감초의 단일 투여와 작약감초탕으로써의 배합 투여가 궤양성 대장염에 미치는 효과를 실험적으로 관찰하고자 하였다. 실험 동물로 흰쥐를 사용하였는데, 증상과 조직의 변화가 사람과 비슷하고, 유도기간이 짧은 등의 장점 때문에 궤양성 대장염의 동물모델로 많이 쓰이고 있다²⁰⁾. 효과 측정 방법으로 ELISA 키트를 활용하여 염증성 사이토카인의 농도를 측정하고, 대사체학을 접목하여 GC/MS 방법으로 혈청 대사산물을 비교하였다.

사이토카인 (cytokine)이란 인체 내 핵을 가진 모든 세포 형에서 생산될 수 있는 조절 단백 물질로, 숙주 방어와 손상 치유 과정에 관여하는 세포들과 조혈 세포에 작용하여 면역 반응과 조혈 작용을 조절하는 인자들을 말하며²⁸⁾, 보조 T 림프구의 분화에 가장 중요한 신호로 작용한다²⁹⁾. 보조 T 림프구는 크게 세포성 면역 반응을 유도하는 Th1, 항체 생산을 촉진하는 Th2로 분류할 수 있다고 알려져 있는데, 최근에는 Th17의 실체가 밝혀지며 그 기능과 역할에 대한 관심도 높아지고 있으며³⁰⁾, 궤양성 대장염은 Th2 반응으로 유발되는 것으로 이해되고 있다. TNF- α , IL-6, IL-1 β 는 대표적인 친염증성 사이토카인으로 염증성 장질환에서 대체로 증가하는 것으로 알려져 있고, 사이토카인 저해인자로도 알려진 IL-10은 염증성 장질환에서 상대적으로 감소되어 있는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 또한, PGE2는 혈관 확장, 부종, 발열, 동통 등을 매개하는 사이토카인으로

Th2 면역반응을 촉진한다고 알려져 있으며, 만성 대장염 환자에서 PGE2 합성 증가는 질병 활성 정도와 관련성이 높다고 보고되었다³²⁾.

이에 본 연구에서는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, PGE2의 변화를 관찰하였다. 실험 결과, 정상군에 비해 DSS군에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2의 농도는 유의하게 증가하였고, IL-10의 농도는 유의하게 감소하였다. 투약 후 TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2의 농도는 DSS군에 비하여 투약군에서 모두 감소하였으나 TNF- α 는 5-ASA 군과 JGT군, IL-6와 IL-1 β 는 5-ASA군, PGE2는 JGT군에서만 유의한 변화를 나타냈다. 반면에, IL-10의 농도는 DSS군에 비하여 투약군에서 모두 증가하였으나 GC군, JY군, JGT군에서 유의한 증가를 나타내었다. 이를 통해 DSS로 유도된 궤양성 대장염 모델에서 염증성 사이토카인으로 알려진 TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2의 농도는 증가하고 IL-10의 농도는 감소하는 것을 확인하였으며, 투약군에서 이를 억제하는 경향성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 선행 연구에서 확인한^{8,9,18,19,31)} 사이토카인 변화와 대체로 일치하는 결과였다. 특히 IL-6 변화에 있어, 선행연구와 비교한 바, 작약감초탕 투여에 있어 100 mg/kg의 농도에서 유의하였으나¹⁸⁾ 150 mg/kg 농도¹⁹⁾와 본 연구의 300 mg/kg 농도에서는 경향성만 나타난 것으로 미루어보아 작약감초탕의 과발현된 항체 억제 효과가 저농도에서 더 우수하다는 이¹⁹⁾의 연구 결과를 다시 한 번 확인할 수 있었다. 또한, 명⁸⁾의 연구에서 작약을 100 mg/kg으로 투여했을 때 IL-6 농도가 유의하게 감소하였으나 본 연구에서 300 mg/kg으로 투여했을 때 감소 경향만을 나타냈다. 그러나 여러 선행 연구에서 한약물의 투여가 농도의 존적으로 궤양성 대장염에 효과적이라는 결과를 제시하기도 했기에^{8,9)} 적절한 약물의 농도에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

대사체학 (metabolomics)은 대사물질을 총체적으로 분석하고 이를 대사회로와 연계하여 해석을 진행하는 연구방법이다. 대사체학은 세포, 혈액, 소변, 대변 등의 생물시료뿐만 아니라 미생물 배양액 및 기타 추출물에서 가능한 모든 대사산물을 추출하여 해석하기 때문에 진단법을 개발하고, 그 기능을 규명하여 병인을 밝혀 나갈 수 있다. 그러므로 진단 분야, 신약 개발 및 신규 작용점 도출 분야, 약물의 평가 등의 다양한 분야에서 활용이 가능하다³³⁾. 특히, 인체를 유기적 관계로 인식하는 한의학 분야에서 변증시차와 한방 진단의 객관화, 한방 개별 처방의 예측 및 객관화, 한약재의 품질 및

품종 평가, 한약과 한약처방의 효과 및 독성 평가 등을 위해 활용되어 한의학 치료법의 진단 및 치료 효과의 객관화에 근거를 제시할 수 있다³⁴⁾.

대사체학은 가변적이고 복잡한 데이터에서 의미 있는 결과를 도출하기 위해 강력한 분석툴을 필요로 한다. 다변량 분석 (multivariate analysis)은 두 개 이상의 다양한 변수들의 관계를 동시에 분석하는 기법으로, 시료간 대사산물 프로파일의 상대적인 차이를 시각적으로 보여주는 분석방법이다. 본 연구에서 활용된 다변량 분석은 PLS-DA로 그룹화를 통해 집합이라는 중속변수를 부여하여 판별에 기여하는 각 데이터의 시각화를 극대화하고 실험군 간 차이가 있는 대사산물을 찾을 수 있게 도와주는 통계기법으로서, 예측모델의 확립과 판별에 기여하는 변수 탐색에 적합한 방법이다^{35,36)}.

본 연구에서는 선행 연구^{18,19)}와의 결과 비교를 위해 GC/MS 방법을 이용하여 혈청 대사산물을 분석했으며, 대사체들의 혼합물을 분리하는 과정은 GC에서, 분리된 대사체들을 정량하는 과정은 MS에서 이루어졌다. GS/MS는 경제적이고, 매우 신속하며, 지속적인 데이터 업데이트를 통해 많은 종류의 화합물을 표준 시약 없이 동정할 수 있어 타겟이 정해지지 않은 대사체 프로파일 분석에 적합한 방법이다¹⁸⁾.

혈청 대사체 프로파일 분석결과, 정상군과 DSS군의 혈청 대사산물은 차이가 명확하게 드러났는데 이는 DSS 투여에 따라 혈청 대사산물이 다른 프로파일로 변화한다는 것을 의미한다. DSS군에서 증가한 대사산물은 serotonin (5-Hydroxytryptamine, 5-HT)의 대사산물인 5-hydroxyindoleacetate (5-HIAA)와 트랜스 지방산인 elaidic acid 두 가지였다. 5-HIAA와 관련하여 궤양성 대장염과 과민성 장 증후군에서 혈청 5-HT와 5-HIAA의 레벨이 증가했다는 연구³⁷⁾와 elaidic acid와 관련하여 트랜스 지방산이 궤양성 대장염을 악화시킨다는 연구³⁸⁾를 찾아볼 수 있었으며, 이는 본 연구의 결과와 대체로 일치하였다. DSS군에서 감소한 대사산물은 8종 중 6종이 당류에 해당되었다. 특히, Fermentable, Oligo-, Di-, Mono-saccharides and Polyols (FODMAPs)에 해당하는 것으로, 이들은 장관내 수분 증가와 장내 가스 발생 증가 등의 증상을 유발하여 염증성 장질환을 비롯한 장관 질환에서 저FODMAP 식이가 유익하다는 주장이 최근 제기되고 있다³⁹⁾. 그러나 본 연구에서는 DSS 유도 대장염 모델에서 감소한 대사산물로 검출, 이러한 주장과는 상충되는 결과를 나타냈다.

DSS군과 투약군 간에서 역시 대사산물 프로파일이 명확한 차이를 보였다. 흥미롭게도 치료 약물을 투여했을 때 혈청 대사산물의 패턴이 정상군 그룹으로 이동하지 않고 정상군과 다른 패턴을 나타냈는데, 이는 약물 투여를 통해 대장염을 개선하더라도 혈청 대사산물은 대장염 유발 전의 프로파일로 돌아가지 않고 새로운 패턴을 형성한다는 것을 의미한다. 또한, 투약 후 그룹 간의 프로파일 차이에 기여하는 대사산물은 모두 증가하는 패턴을 보였다. 5-ASA군, GC군, JY군, JGT군에서 증가한 대사산물은 아미노산이 많은 비중을 차지했다. 5-ASA군에서 증가한 6종의 대사산물 중 3종의 대사산물이 아미노산 대사와 관련되었으며, GC군에서 증가한 대사산물 24종 중 13종이, JY군에서 증가한 대사산물 10종 중 7종이, JGT군에서 증가한 대사산물 4종 중 3종이 아미노산 대사와 관련되었다. 염증성 장질환에서 혈중 아미노산의 농도가 대체로 감소한다는 연구 결과⁴⁰⁾와 관련되었을 때, 약물 투여에 따른 대사 회복을 통한 치료 효과로 해석할 수 있으리라 생각된다. 특히 DSS군과 JGT군 간의 차이에 기여하는 대사산물은 benzoic acid, threonine, glutaric acid, ribose 4종으로, 이 중 benzoic acid, threonine, glutaric acid 3종은 DSS군과 GC군, JY군 간의 차이에 기여하는 대사산물로 나타나기도 했다. Benzoic acid는 선행 연구를 통해 작약 및 작약감초탕에 포함된 생리 활성 물질로 밝혀지기도 했으며^{17,41)}, threonine은 필수 아미노산으로, rat 대상의 연구에서 threonine의 보충이 mucin 합성을 증가시켜 DSS 유도 대장염에서 조직학적 변화를 향상시킨다고 하였다⁴²⁾. Glutaric acid는 lysine, tryptophan 등의 아미노산 대사과정에서 생성되는 대사산물로 장질환과 직접적으로 관련된 연구는 찾아보기 어려우나 염증성 장질환에서 tryptophan의 대사가 장벽의 면역과 염증을 조절하는 데 영향을 미친다는 연구가 있으며⁴³⁾, 선행 연구에서 작약감초탕 투여에 따른 tryptophan의 증가를 확인한 바 있다^{18,19)}. 선행 연구들을 참고했을 때, 이러한 대사산물이 직·간접적으로 궤양성 대장염의 치료에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다고 해석할 수 있다. 다만, 선행 연구들과 비교하였을 때 유의미한 대사산물이 각 연구마다 상이하게 나타났다는 점^{18,19)}에서 특정 산물의 대사 기전으로 이해하기엔 어려움이 따를 것으로 보인다.

본 연구를 통해 작약, 감초 및 작약감초탕이 DSS로 유도된 궤양성 대장염에 미치는 영향에 대해 실험적으로 살펴본 결과, 작약감초탕은 DSS군과 비교했을 때

유의미한 TNF- α , PGE2 감소, IL-10 증가, 혈청 대사산물 프로파일의 변화를 나타내었다. 작약 및 감초의 단일 투여군과 비교하였을 때 작약감초탕 투여군이 더 우수한 효과를 나타냈다는 결과를 통해 처방으로서 작약감초탕의 효과를 확인할 수 있었다. 이는 작약감초탕의 궤양성 대장염 치료제로서의 활용에 대한 근거로 제시될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 약물의 적정 농도에 대한 연구를 통해 더욱 효과적인 약물 투여에 대한 내용을 제시하고, 대사산물과 그 대사 경로에 대한 깊이 있는 연구를 통해 명확한 기전을 제시하는 후속 연구가 필요할 것이다.

V. Conclusion

작약, 감초 및 작약감초탕의 투여가 DSS로 유발된 궤양성 대장염에 미치는 효과를 관찰하고자 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, PGE2의 농도 변화 및 대사산물 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) TNF- α 농도 변화에서 DSS군에 비하여 5-ASA군과 JGT군은 유의한 감소를 나타내었다.
- 2) IL-10 농도 변화에서 DSS군에 비하여 GC군, JY군, JGT군은 유의한 증가를 나타내었다.
- 3) PGE2 농도 변화에서 DSS군에 비하여 JGT군은 유의한 감소를 나타내었다.
- 4) 대사산물 변화에서 DSS군에 비하여 GC군, JY군, JGT군은 대사산물 프로파일의 차이를 나타내었으며, 특히 대부분의 대사산물의 함량이 DSS군에 비하여 GC군, JY군, JGT군에서 유의하게 증가하는 패턴을 보였다.

요약: 작약감초탕은 DSS군과 비교했을 때 유의미한 TNF- α , PGE2 감소, IL-10 증가 및 혈청 대사산물 프로파일의 변화를 나타내었으며, 이 때 대사산물의 함량은 DSS군에 비하여 유의하게 증가하는 패턴을 보였다.

VI. Acknowledgement

본 연구는 2021학년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행됨.

VII. References

1. Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. Inflammatory bowel disease. 1st ed. Seoul: Daehan Medical Science Book Co. 2016;2-5, 41-8.
2. Yang DH, Yang SK. Trends in the incidence of ulcerative colitis in Korea. Korean J Med. 2009;76(6):637-42.
3. Seo GS, Choi SC. Pathophysiology of ulcerative colitis - Relationship with genetics and immunity. Korean J Med. 2009;76(6):643-8.
4. Kim JM. Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. Korean J Gastroenterol. 2010;55:4-18.
5. Jeon YT, Kim JH. Advances in ulcerative colitis therapy. Korean J Med. 2009;76(6):654-60.
6. Kye BH. Nutritional supports in patients with inflammatory bowel disease. J Clin Nutr. 2016;8(1):11-8.
7. Jeonguk-hanigwadaehak-Bigyenaegwahak-gyosil. Bigyenaegwahak. 1st ed. Paju: Koonja publishing Co. 2015:366-74.
8. Myung NY. The improving effect of *Paeoniae Radix* on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Korean J Plant Res. 2018;31(4):275-82.
9. Lee KH, Rhee KH. Anti-inflammatory effects of *Glycyrrhiza Globra Linne* extract in a Dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model. Korean J Food & Nutr. 2010;23(4):435-9.
10. Kang Amy, Lim SW. Therapeutic effects of Gaejigayonggolmoryo-tang on dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in mice. J Int Korean Med. 2017;38(6):1021-34.
11. Yang BM, Ahn SH, Kim KB. The anti-inflammatory effect of Duchi extract on ulcerative colitis. J Pediatr Korean Med. 2021;35(1):30-9.
12. Nam HI, Baik TH. Inhibitory effects of *Angelica gigas Nakai* on ulcerative colitis in DSS-induced ICR mice.

- J Physiol & Pathol Korean Med. 2016;30(6):439-46.
13. Moon JJ, Ahn GY, Kim SH, Park WS, Song MD, Park JH, Kim DH, Kim SW, Choi DY, Sun ML, Ji KH, Shin SW, Ha GT, Lee SG, Kim JB, Lee GK, Kim YM. Sanghanronjeonghae. 3rd ed. Yonjin: Hanimunhwasa. 2014:104,107.
 14. Yoon YG. Donguibangjewacheobanghaeseol. 3rd ed. Seoul: Uisungdang Publishing Co. 2011:55-64.
 15. Lee KO, Kuk YB, Yun YG. Effects of Jakyakgamchotang extract on the analgesic effect in mice. Herbal Formula Science. 2003;11(1):161-70.
 16. Kim BW. Anti-inflammatory of Jakyakgamcho-tang. J Int Korean Med. 2010;31(2):365-71.
 17. Sung YY, Yuk HJ, Kim DS. Comparison of ingredient quantities and anti-fatigue effects of Jakyakgamcho-tang according to extraction solvent. Kor J Herbol. 2020; 35(2):31-8.
 18. Seo SH. Effect of Jakyakgamcho-tang on inflammatory bowel disease using GC/MS-based metabolic profiling analysis [Dotorate]. [Na-ju (Jeollanam-do)]: Dongshin University; 2019. 83p.
 19. Lee YM. Effects of Jakyakgamcho-tang and acupuncture combination treatment on immune-mediated inflammatory bowel diseases [Dotorate]. [Na-ju (Jeollanam-do)]: Dongshin University; 2020. 52p.
 20. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 2014;104:1-14.
 21. Mastrangelo A, Ferrarini A, Rey-Stolle F, García A, Barbas C. From sample treatment to biomarker discovery: a tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. Analytica Chimica Acta. 2015;900:21-35.
 22. Healthcare Bigdata Hub. Statistics of classification of disease (3-stage of disease codes) [Internet] Health Insurance Review & Assessment Service; 2022 May [cited 2022 July 5th]. Available from: <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olap3thDsInfo.do#none>
 23. Choe YH, Lee JH. Diagnosis of inflammatory bowel disease in children. Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;11(2):67-71.
 24. Kim KM. The treatment of pediatric inflammatory bowel. Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008;11(2): 72-9.
 25. Seo JK. Pediatric inflammatory bowel disease (IBD): phenotypic, genetic and therapeutic differences between early-onset and adult-onset IBD. Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011;14(1):1-25.
 26. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Mayo Clin Proc. 2006;81:1462-72.
 27. Na SY, Moon W. Evolving therapeutic strategies in the inflammatory bowel disease. Korean J Gastroenterol. 2018;71(2):61-8.
 28. Kim HS. The cytokines: an overview. Yeungnam Univ J of Med. 2010;27(1):1-7.
 29. Mo JH. T Cell differentiation and Th17. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg. 2008;51:688-93.
 30. Kim JI, Choe JS. Introduction to autoimmune disease. J Korean Med Assoc. 2009;52(7):638-44.
 31. Jeon WH, Ko SJ, Ryu BH, Park JW. Therapeutic and prophylactic effects of *Zostera Marina* on dextran sulfate Sodium-induced colitis. J Korean Med. 2016;37(3): 13-26.
 32. Park YS. COX-2 inhibitors in inflammatory bowel disease: friends or foes? Korean J Gastroenterol. 2007;50: 350-5.
 33. Chung BC. Metabolomics in disease research. Mol Cell Biol News. 2006;18(1):17-27.
 34. Jung JY, Hwang GS, Sohn IC. The study of metabolomics for the scientific research of Korean medicine: review. Korean J Acupunct. 2008;25(4):147-66.
 35. Hong YS. Nutritional metabolomic. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2014;43(2):179-86.
 36. Leem JY. Discrimination model of cultivation area of *Alismatis Rhizoma* using a GC-MS-based metabolomics approach. Yakhak Hoeji. 2016;60(1):29-35.
 37. Yu FY, Huang SG, Zhang HY, Ye H, Chi HG, Zou Y, Lv RX, Zheng XB. Comparison of 5-hydroxytryptophan signaling pathway characteristics in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2016;22(1):3451-9.
 38. Okada Y, Tsuzuki Y, Sato H, Narimatsu K, Hokari R, Kurihara C, Watanabe C, Tomita K, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S. Trans fatty acids exacerbate dextran sodium sulphate-induced colitis by promoting the up-regulation of macrophage-derived proin-

- flammatory cytokines involved in T helper 17 cell polarization. *Clin Exp Immunol.* 2013;174(3):459-71.
39. Barbalho SM, Goulart RA, Aranao ALC, de Oliveira PGC. Inflammatory bowel diseases and fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides, and polyols: an overview. *J Med Food.* 2018;21(7):633-40.
40. Lee EH, Lim MS, Kim SC, Ko JS, Seo JK. Plasma levels of amino acids including citrulline and disease severity in pediatric inflammatory bowel disease. Paper presented at: The 61st autumn conference of the Korean pediatric society; 2011 Oct 22; Seoul, Korea.
41. Wu HK, Sheu SJ. Capillary electrophoretic determination of the constituents of *Paeoniae radix*. *J Chromatogr A.* 1996;753(1):139-46.
42. RC Sprong, AJ Schonewille, RV Meer. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: role of mucin and microbiota. *J Dairy Sci.* 2010;93:1364-71.
43. Sugihara K, Morhardt TL, kamada N. The role of dietary nutrients in inflammatory bowel disease. *Front Immunol.* 2019;9:1-16.