

## 새로운 플라보노이드 유도체인 DA-6034의 TNBS 유발성 염증성대장염 모델에서의 치료효과

손미원\* · 고준일 · 김희기 · 장동경\* · 유무희 · 김원배 · 이강춘\*\* · 송인성\*

동아제약 (주) 연구소, \*서울대학교 의과대학, \*\*성균관대학교 약학대학

(Received February 2, 1998)

### Effect of DA-6034, a New Flavonoid Derivative, on TNBS-Induced Colitis in the Rat

Miwon Son\*, Jun Il Ko, Hee Kee Kim, Dong Kyung Jang\*, Moohi Yoo,  
Won Bae Kim, Kang Chun Lee\*\* and In Sung Song\*

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co. Ltd., Kyunggi 449-900, Korea

\*Department of Internal Medicine, Liver Research,

College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

\*\*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Kyunggi 440-746, Korea

**Abstract**—The efficacy of DA-6034, a new flavonoid derivative, was investigated in comparison with sulfasalazine in a trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced rat colitis. Under light anaesthesia with ether, rats were subjected to intracolonic administration of 30 mg TNBS in 50% ethanol (0.5 ml) and were then sacrificed at 7 or 21 days after colitis induction. The TNBS control group (the saline treated colitic rat) exhibited ulceration and inflammation of the distal colon with formation of granuloma and pathologic connections. Moreover, an increase in colonic myeloperoxidase (MPO) activity (investigated as an index of leukocyte adhesion and accumulation) and an elevated colonic leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) level were observed. The colitic rats received DA-6034 (0.3~30 mg/kg) or sulfasalazine (50~100 mg/kg), prednisolone (0.3~3 mg/kg) after the induction of colitis until they were sacrificed. Oral treatment with DA-6034 resulted in significant reductions of macroscopic colonic damage, colonic inflammation. DA-6034 had a more potent effect than sulfasalazine and prednisolone on macroscopic colonic damage, while it has similar effect with prednisolone on the reduction of colonic LTB<sub>4</sub> synthesis and MPO activity. This study show, therefore, that DA-6034 is effective in attenuating the colonic lesion in an TNBS-induced colitis model. Furthermore, the results suggest that the effect of DA-6034 is partially related to its action on LTB<sub>4</sub> synthesis and MPO inhibition.

**Keywords** □ DA-6034, trinitrobenzene sulfonic acid, colitis, myeloperoxidase, leukotriene B<sub>4</sub>.

만성 염증성대장염 질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 궤양성 대장염(Ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)으로 분류되며<sup>1-3)</sup> 지난 수십년간 전세계적으로 많은 연구자들에 의해 연구되어 오고 있으나 이러한 노력에도 불구하고 이 질환의 병인과 병태생리 및 효과적인 치료는 여전히 불분명한 상태이다. 증상

의 악화와 회복단계를 반복하는 특징을 지닌 만성질환으로 장기간 치료를 요하는 IBD 질환은 만족할 만한 치료법이 없는 상태이며 최근 우리 나라에서도 발생 빈도가 높아지고 있는 추세이므로<sup>4)</sup> 임상분야에서 관심이 고조되고 있다.

Flavonoids는 저분자량을 갖는 polyphenolic 화합물로서 모든 유관속 식물에 2차 대사산물로서 알려져 있다. 야채를 섭취하는 모든 동물(사람을 포함하는)들은 과일, 꽃, 씨, 커피, 와인과 같은 식이성 flavonoids 들을

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0331-280-1387 (팩스) 0331-282-8564

섭취하고 있으며 실제로 서양인들은 하루에 평균 2 g 정도씩을 섭취하는 것으로 보고되고 있다.<sup>5)</sup> 이런 flavonoids에 대해서 여러 생화학적, 약리적 활성이 보고되었는데, 항염증 및 항알러지작용, 항산화작용등이 널리 알려져 있으며,<sup>6-8)</sup> 그 작용기전이 활발히 연구되고 있다. 염증작용의 중요한 역할을 하는 아라키돈산 대사작용에 관여하는 효소들(lipoxygenase, phospholipase A2, protein kinase등)을 억제하는 것으로 알려져 있으며,<sup>9)</sup> 또한 면역체계와 염증반응을 구성하는 세포계에서 항상성을 유지하며 입과구와 호중구의 기능을 하향적으로 조절하고 myeloperoxidase(MPO)의 활성을 억제하는 것 등이 알려져 있다.<sup>10-15)</sup> Flavonoid 유도체인 DA-6034는 염증성대장염 치료제 후보물질로 동아제약(주) 연구소에서 개발중이다. DA-6034는 항염활성과 5-lipoxygenase 억제활성이 확인되었으며(미발표) 천연에 많이 존재하는 flavonoids 유도체이므로 독성이 적은 매우 안전한 화합물로 예상되고 있다.

IBD의 동물모델로는 여러 가지가 알려져 있으며,<sup>16)</sup> 특히 trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)를 이용한 염증성대장염 랫드모델<sup>17)</sup>은 사람의 IBD와 병태생리가 유사하고 만성염증을 유발할 수 있어 치료제의 효력 연구 및 기전 연구에 많이 이용되고 있다.

본 실험에서는 DA-6034의 염증성장질환 치료제로서의 가능성을 검토하고자, TNBS를 이용한 급·만성 염증성 장질환 랫드모델을 이용하여 DA-6034의 효력을 평가하였다.

## 실험방법

### 재료 및 방법

**시험물질** - DA-6034는 동아제약(주) 합성연구실에서 공급받았으며 주사용 생리식염수에 용해하여 사용하였다. 시험에 사용된 picrylsulfonic acid sodium salt (trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)는 東京化成工業(Tokyo, Japan)에서, 대조약물로 사용한 sulfasalazine과 prednisolone은 Sigma사 (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

**시험동물** - 7주령의 SPF Sprague-Dawley계 랫드 수컷을 Charles River사(Kanagawa, Japan)로부터 구입하여 일반사육실에서 검역 및 순화사육한 후에 시험에 사용하였다. 검역·순화사육기간 및 시험기간중 사육환경은 온도 23±2°C, 습도 55±15%, 환기횟수

15~20회/시간, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12시간 (07:00~19:00)의 조건을 유지하였으며, 동물은 랫드용 PC 사육상자를 사용하여 케이지당 4~5마리씩 각각 분리하여 수용하였다. 사료는 마우스·랫드용 고형사료(2.0M rad 방사선멸균품, 제일사료)를, 음수는 일반 수도수를 자유섭취시켰다.

### 시험방법

**TNBS-Induced IBD model** - Shibata 등의 방법<sup>18)</sup>을 응용하여 몸무게가 240~280 g 사이의 24시간 절식시킨 7주령의 흰쥐를 ether로 가볍게 마취시키고, 길이 8 cm의 polyethylene tube(직경 3.0 mm)를 항문으로 밀어 넣은 후 TNBS용액을 주입하여 대장염을 유발하였다. TNBS는 50%(w/v) ethanol에 섞어 30 mg/0.5 ml의 농도를 만들어서 1마리당 30 mg의 용량을 주입하였으며, 음성대조군의 동물들에는 동일한 방법으로 하되 TNBS 대신에 saline 0.5 ml를 결장내 주입하였다. TNBS주입 후 24시간 후부터 1주 및 3주까지 각 약물을 1일 1회씩 랫드용 존데를 이용하여 경구로 투여하였다. 양성대조군에는 생리식염수를, 비교약물군의 동물들에는 대조약물로서 5-ASA인 sulfasalazine과 대표적인 스테로이드제제인 prednisolone을 사용하였다. 마지막 약물투여 후 24시간후인 2일, 7일, 21일째에 각군의 동물들을 에테르마취하에 부검을 실시하고 대장을 적출하였으며 대장의 유착정도 및 확장정도를 관찰하여 등급을 기록하였다. 적출된 대장을 종축으로 절개하고 병변이 주로 생긴 부분을 위주로하여 10 cm를 잘라내어 무게를 재었으며, 정상군은 TNBS처치군에서 병변이 생긴 부분과 같은 부분을 선택하여 10 cm를 잘라내었다. 무게를 측정 한 후 케양 및 병변의 면적과 염증상태 등의 육안병변을 Wallace의 기준(Table I)에 의하여 점수화한 직후에 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub>등의 효소의 활성도측정을 위하여 결장 병변 부위의 점막을 채취하고 -70°C에 얼려 보관하였다.

**장점막 손상 평가** - 연일 임상증상과 동물의 폐사여부를 관찰하고 시험 개시일과 24시간 후 및 2~3일마다 동물의 체중을 측정하였다. 무게가 가장 떨어지는 때(유발 후 3일째)와 7일째를 기준으로 1주와 3주의 무게 변화를 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{무게변화(g/day)} = \frac{Dx_2 - Dx_1}{X_2 - X_1}$$

(Dx : x일째의 쥐의 무게)

**Table I** — Grading criteria for macroscopic damage score of large intestine

Grade	Gross lesion
0	No damage
1	Hyperemia
2	Hyperemia with thickening of the bowel wall
3	Linear ulceration without hyperemia or thickening
4	Two or more sites of ulceration and/or inflammation
5	Two or more major site of inflammation and ulceration or inflammation extending >1 cm along the length of the colon
6~10	If ulceration is more than 2 cm along the length of the colon, the score is increased by 1 for each additional cm of involvement (i.e., if ulceration is 3 cm along the length of the colon, the score would be 7).

실사 발생율은 2일에 1번씩 약물을 줄 때 관찰하였으며 7일 및 21일째의 발병률은 TNBS유발 다음날 부터 2일째 까지의 발생율(%)을 평균한 값, 3일째 부터 7일째 까지의 발생율(%)을 평균한 값 및 8일째 부터 21일째까지의 발생율(%)을 평균한 값으로 각각 나타내었다. 대장의 장기중량은 시험개시 7일째와 21일째 생존 개체 모두를 부검하여 대장을 분리하고 길이 방향으로 절개하여 강내 내용물을 생리식염수로 잘 세척한 후 병변이 심화된 곳을 기준으로 10 cm를 잘라 무게를 측정하였다. 대장의 육안적 손상정도는 Wallace의 방법<sup>20)</sup>을 응용하여 절개된 대장의 발적, 궤양유무 그리고 궤양의 크기에 따라 0에서 10까지 정하였으며, 그 기준은 Table I과 같다. 대장의 유착정도는 Kim 등의 방법<sup>19)</sup>과 같이 아래와 같은 기준에 의하여 대장의 유착정도를 점수화하였다. 즉, Grade 0은 유착이 전혀없는 상태, Grade 1은 유착이 있으나 장간긴 손으로 쉽게 박리가능한 정도, Grade 2는 Grade 1보다는 심한 유착으로 박리를 위하여 가위를 사용하여 용이하게 박리 가능한 정도, Grade 3은 가위를 사용하여도 유착이 심하여 천공의 위험으로 박리가 어려울 정도로 기준을 정하였다. 대장의 비후정도 및 확장정도는 Kim 등의 방법<sup>19)</sup>과 같이 Grade 0(normal)에서 3(severe)까지 점수화하였다.

**대장점막에서의 MPO 활성 측정<sup>21-22)</sup>** - 대장의 병변이 있는 부위를 중심으로 200 mg을 취하여 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide(200 mg of tissue/ml)을 가한 뒤 teflon pestle 균질기를 이용하여 균질화하였다. 얼리고 녹이는 과정을 3번 반복하고 뒤에 40,000×g로 15분간 원심분리한 후에 상등액을 취하였다. MPO 활성 측정은 0.0005% 과산화수소와 O-dianisidine을 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0)용액 일정량에 조제된 효소액을

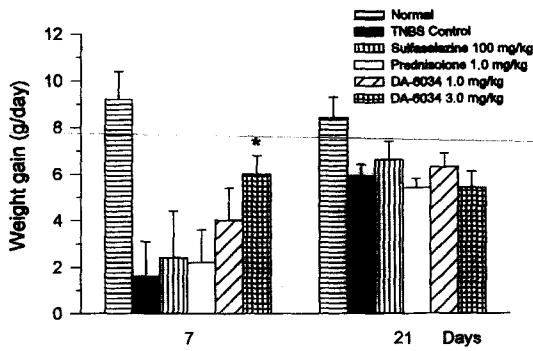
적량 가하여 25°C에서 일정 시간동안 반응시킨 다음 460 nm에서 흡광도의 변화를 읽어 효소의 활성도를 산정하였고, 단백질의 정량은 Lowry법으로 측정하였다.

**대장점막의 PGE<sub>2</sub>와 LTB<sub>4</sub> 측정<sup>23)</sup>** - -70°C에 보관하였던 대장 점막 중 200~300 mg을 취하여 polypropylene 시험관에 넣고 100 mM NaCl과 1 mM CaCl<sub>2</sub> 및 1 mg/ml의 glucose가 섞인 pH 7.4의 50 mM Tris-HCl buffer 1 ml를 넣었다. 이들을 polytron 균질기(Brinkmann Homogenizer)에서 20초 동안 균질화 시킨 후 9000×g에서 10초동안 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 상등액에서 PGE<sub>2</sub> 와 LTB<sub>4</sub>를 방사성 면역측정법(radioimmunoassay)을 이용하여 정량하였고, 단백질의 정량은 Lowry법으로 측정하였다.

**통계** - 각군의 측정값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 실험결과는 Wilcoxon rank-sum test 또는 Student's t-test를 이용하여 p<0.05인 것을 유의성있는 결과로 판정하였다.

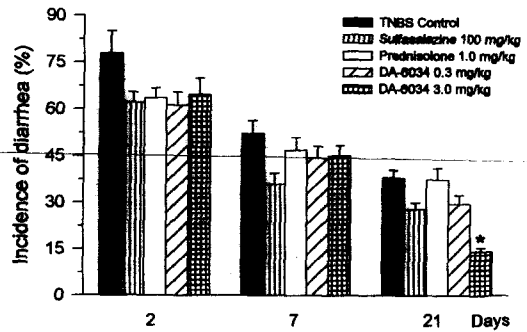
**실험결과**

**장점막 손상 평가** - TNBS의 단회 투여는 설사와 체중감소, 심각한 장손상과 같은 염증성대장염 증상을 나타내었다. 체중감소는 TNBS 투여 다음날부터 3일째 까지 나타났으며 4일째 부터 다시 체중증가를 나타내어 21일 후에는 정상치의 80~90%의 증가를 보였다. 체중변화율(g/day)에 대해서 생리식염수를 6일간 투여한 양성대조군에서는 체중증가가 현저히 감소되어 정상치의 약 20%까지 감소된 반면, DA-6034를 투여한 랫드들에서는 일일 체중증가의 감소가 유의적으로 완화된 채 정상치의 65%정도의 증가율을 나타내었고 대조약물로 사용한 prednisolone군과 sulfasalazine군에서는 양



**Fig. 1**—Effect of DA-6034 treatment on body weight changes in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally once a day from 24 h after induction of colitis until the animals sacrificed, Data are expressed as mean±S.E. \*represents p<0.05 vs. TNBS control.

성대조군에 비해 10%이내의 미약한 증가를 나타내었다. 21일째는 체중증가율에 대한 감소가 거의 회복되었으며 양성대조군과 약물투여군간의 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 1). 대장염유발에 의한 설사발생율은 TNBS주입 후 2일째에 모든군에서 60%이상의 증상을 보였으며 1주 후부터 점차 감소되어 자연적인 치유를 나타내었다. 7일째에는 sulfasalazine 투여군에서 억제하는 경향을 보이거나 유의성을 나타내지 못하였고 그 외 모든군에서 별다른 차이를 보이지 않았다. 21일째에는 설사발생율이 점차 감소되어 생리식염수를 투여한 양성대조군은 38%를 나타내었고 3.0 mg/



**Fig. 2**—Effect of DA-6034 treatment on incidence of diarrhea in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally once a day from 24 h after induction of colitis until the animals sacrificed, Data are expressed as mean±S.E. \*represents p<0.05 vs. TNBS control.

kg의 DA-6034투여군에서 14.3%로 유의적으로 억제하였으며, sulfasalazine 투여군에서는 미약하게 억제하였다(Fig. 2).

TNBS의 투여 다음날부터 장점막의 혈변성 손상 및 괴사가 유발되어 7일까지 심각하게 지속되었고 그후로 점차 치유되는 과정을 보였으나, 점막 궤양, 발적 및 비후는 21일까지 유지되었다. 7일째 궤양성 대장의 길이는 3~7 cm 였고, 장손상 수치는 9정도였다. 장벽은 심각한 비후를 나타내어 대장의 길이가 짧아졌고, 장무게가 정상 장무게 보다 약 3배 증가되었다. 90% 이상의 대조군에서 대장의 근처장기(소장, 위)등에 심한 유착

**Table II**—Effect of DA-6034 on the colonic lesion score, dialtion, adhesion and colon weight in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally 24 h after induction of colitis for 7 days. TNBS control received saline orally

Treatment (mg/kg)	No. of animals	Lesion score (Score, 0-10)	Dilation (Score, 0-3)	Adhesion (Score, 0-3)	Colon Weight (10 cm)
Control	7	9.0±0.4	2.4±0.3	2.1±0.3	2.00±0.30
DA6034 (0.3)	8	7.5±1.0	1.5±0.4	1.4±0.3	1.70±0.26
DA6034 (1.0)	6	6.8±1.6	1.7±0.5	1.6±0.5	1.92±0.47
DA6034 (3.0)	7	5.9±1.2*	1.4±0.5*	1.0±0.6*	1.72±0.45
DA6034 (10)	9	7.2±0.7	1.4±0.3*	1.3±0.3	1.48±0.21
DA6034 (30)	7	6.7±0.9	1.4±0.3*	1.4±0.4	1.52±0.35
Prednisolone (0.3)	6	8.5±0.5	1.9±0.3	1.7±0.2	1.58±0.18
Prednisolone (1.0)	7	7.9±1.1	2.1±0.4	2.0±0.5	1.93±0.38
Prednisolone (3.0)	9	6.8±1.1	1.6±0.4	1.6±0.4	1.69±0.32
Sulfasalazine (50)	7	7.1±1.0	1.7±0.4	1.6±0.5	1.50±0.22
Sulfasalazine (100)	9	7.7±0.7	2.2±0.2	1.9±0.4	1.82±0.27

Data are expressed as mean±S.E.

\*p<0.05 vs. TNBS control

이 나타났고, 치사율은 1% 미만이었다.

DA-6034의 투여는 0.3~3 mg/kg까지 용량의존적 반응성을 나타내며 장손상수치를 억제하여 3 mg/kg에서 최대효과를 나타내었으며 그후 30 mg/kg 까지 유지되었다. 현재, 치료제로 사용중인 prednisolone 과 sulfasalazine은 3.0 mg/kg과 50 mg/kg에서 최대효과를 나타내었다. 대장의 비후와 유착, 장무계에 있어서도 DA-6034는 용량의존적으로 억제하여 장점막 손상 수치와의 연관성을 나타내었으며, 대조약물인 prednisolone과 sulfasalazine도 유사하게 억제활성을 나타내었다(Table II).

3주 후의 장점막의 손상수치는 6정도를 나타내었고 2~3 cm정도의 손상부위를 나타내어 만성적인 염증의 지속을 관찰하였다. 주위의 장기들과의 장유착도 지속되었으나 1주 후와 같은 grade 3의 심각한 유착은 나타나지 않았고 3주 후의 치사율은 9%이었다. 1주 투여에서 최대효과를 나타내는 DA-6034 3 mg/kg의 3주간 투여는 장손상을 유의적으로 50%정도 억제하였으며 장의 비후와 유착, 장무계의 증가도 억제하여 항염증 치료효과를 나타내었다(Table III).

**장점막에서의 MPO 활성 및 eicosanoids 농도측정** - 장염증에 대한 지표로서 염증세포의 침윤정도를 장점막에서의 MPO 활성으로 측정하였다. TNBS에 의해 유도된 염증성 장점막의 MPO 활성은 정상점막보다 4.5배 증가하여 호중구와 같은 염증세포의 침윤이 증가하였고, 7일 및 21일 후에는 점차 감소하였다. 2일 및 7일 때에는 약물투여군에서 MPO 활성을 억제하는 경향을 보이나 유의성은 나타나지 않았다. 21일째에 DA-6034는 최대효과를 나타내는 3 mg/kg 농도에서 생리 식염수를 투여한 양성대조군에 비해 유의적으로 억제하

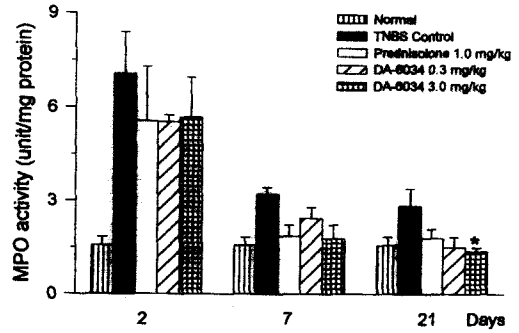


Fig. 3— Effect of DA-6034 treatment on colonic MPO activity in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally once a day for 2, 7, or 21 days, and the animals were sacrificed. Data are expressed as mean±S.E. \*represents p<0.05 vs. TNBS control

였으며 정상화되었다(Fig. 3).

TNBS 주입 후 장점막의 LTB<sub>4</sub> 농도는 시간이 지남에 따라 점점 증가하여 21일째에는 정상 점막에 비해 6.4배 증가를 나타내었다. 약물투여군은 7일째부터 이를 유의적으로 억제하였으며 21일째에는 prednisolone 및 DA-6034투여군에서 50~60%정도 유의적으로 억제하였다(Fig. 4).

염증성 장점막의 PGE<sub>2</sub> 농도는 2일째에 정상 점막에 비해 2.7배 증가하였다가 점차 감소하여 21일째에는 거의 정상화되었다. 2일째에 prednisolone 투여군은 74%, DA-6034 3 mg/kg투여군은 76%의 유의적인 억제효과를 나타냈으며, 7일째에 DA-6034 3 mg/kg 투여군은 유의적으로 억제하여 PGE<sub>2</sub> 농도가 정상화되었으나 약물투여군간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

Table III— Effect of DA-6034 treatment on colonic lesion score, diation and adhesion score, and colon weight in TNBS-induced chronic colitic rats. Drugs were administered orally daily. The number of group was 7~10

Treatment (mg/kg)	Lesion score (Score, 0-10)		Dilation (score, 0-3)		Adhesion (score, 0-3)		Colon weight (g/10 cm of colon)	
	1 week	3 weeks	1 week	3 weeks	1 week	3 weeks	1 week	3 weeks
Control	9.0±0.4	6.1±0.7	2.4±0.3	1.8±0.5	2.1±0.3	1.7±0.5	2.00±0.30	1.66±0.15
Prednisone (1.0)	7.9±1.1	6.1±0.8	2.1±0.4	2.3±0.3	2.0±0.5	2.2±0.4	1.93±0.38	1.68±0.20
Sulfasalazine (100)	7.7±0.7	6.2±1.0	2.2±0.2	2.0±0.4	1.9±0.4	2.0±0.4	1.82±0.27	1.92±0.40
DA-6034 (1.0)	6.8±1.6	5.4±0.6	1.7±0.5	1.5±0.4	1.6±0.5	1.3±0.4	1.92±0.47	1.62±0.24
DA-6034 (3.0)	5.9±1.2*	3.0±0.8**	1.4±0.5*	0.7±0.2*	1.0±0.6*	0.8±0.2*	1.72±0.45	1.11±0.14

Data are expressed as mean±S.E.

\* p<0.05 vs. TNBS control

\*\*p<0.01 vs. TNBS control

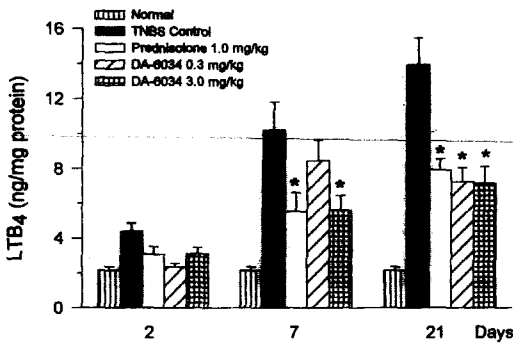


Fig. 4 — Effect of DA-6034 treatment on colonic LTB<sub>4</sub> level in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally once a day for 2, 7, or 21 days, and the animals were sacrificed. Data are expressed as mean±S.E. \*represents p<0.05 vs. TNBS control.

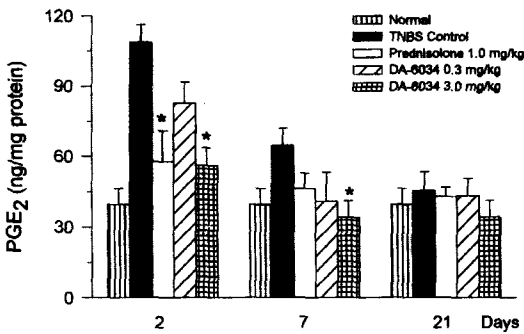


Fig. 5 — Effect of DA-6034 treatment on colonic PGE<sub>2</sub> level in TNBS-induced colitic rats. Drugs were administered orally once a day for 2, 7, or 21 days, and the animals were sacrificed. Data are expressed as mean±S.E. \*represents p<0.05 vs. TNBS control.

고 찰

Flavonoids는 항염증제로서 대식세포와 호중구 또는 비만세포와 같은 면역세포들의 활성화에 대한 억제 효과와 염증반응을 개시하거나 증폭시키는 효소들의 억제 활성이 알려져 있다.<sup>11-15)</sup> 동아제약(주) 연구소에서 합성한 flavonoid 유도체인 DA-6034는 5-lipoxygenase의 억제활성이 확인되었으며(미발표) 위장관 점막보호활성이 있다. 본 실험에서는 TNBS에 의한 급·만성 염증성 대장염 모델에서의 DA-6034의 치료효과를 알아보고자 실행하였다.

TNBS에 의한 염증성대장염 모델은 궤양성 대장염보

다는 Crohn씨 대장염에 가까운 모델이다.<sup>17)</sup> 그 유발기전은 먼저 ethanol에 의한 급성적인 점막손상이 나타나고 후에 hapten의 일종인 TNBS에 의해 면역반응이 유도되어 만성염증이 지속되는 것이므로 사람의 염증성대장염과 유사한 유발기전과 병태생리를 나타낸다.<sup>17-20)</sup> TNBS/ethanol의 직장내 투여는 체중감소와 설사를 유발하였고, 심한 혈성변 및 장두께 증가를 동반한 장점막 궤양과 염증이 관찰되었다. 염증활성은 TNBS 투여 2일후에 육안적 소견과 생화학적 검사에서 최대치를 나타내어 급성대장염의 임상소견을 보였다.

DA-6034는 0.3~30 mg/kg 농도에서 항염증 효과를 나타내었으며 3 mg/kg에서 육안적 임상소견 및 대장의 비후와 유착, 대장의 무게, MPO활성 등의 염증활성 지표에서 최대효과를 나타내었다. 대조약물로 사용한 prednisolone과 sulfasalazine도 항염증효과를 나타내었으나, DA-6034가 이들 대조약물에 비해, 보다 좋은 효과(efficacy)를 나타내는 것으로 평가되었다.

TNBS에 의한 염증성대장염 모델의 장점막에서의 생화학적 결과들은 인체의 대장염 점막에서의 매우 유사하다.<sup>24)</sup> TNBS에 의한 염증세포들의 침윤과 염증전구매개체의 생성이 사람의 염증성대장염과 유사한데, 염증성 점막에서 호중구의 침윤증가를 관찰할 수 있고, cytokines 및 leukotriene에 의해 활성화된 세포들에 의해 cytokine과 platelet activating factor, arachidonic acid 대사산물들, oxygen free radical들이 분비되어 염증성 대장염의 유발 및 지속에 관여한다.<sup>25)</sup> MPO는 호중구의 과립에서 주로 발견되는 효소로서 호중구 침윤에 대한 지표가 되며<sup>22)</sup> 이는 염증활성의 지표로서 염증성 대장염에 의한 장손상수치와 상관성을 갖는다.<sup>26)</sup> TNBS/ethanol을 직장으로 주입한 후에 장점막에서의 MPO활성은 2일째 정상점막의 4.5배로 증가하였고 7일, 21일에는 점차 감소하는 것으로 미루어 MPO 활성은 ethanol에 의한 장점막의 손상에 의한 급성염증에 관여하는 것으로 보인다. DA-6034는 TNBS에 의해 유도된 장점막의 MPO 활성증가를 억제하였다. 이러한 DA-6034의 MPO 활성 억제효과가 호중구의 억제제로서의 역할에서 기인되었는지 또는 호중구의 주성을 유발하는 chemokine의 억제제로서 작용에 기인하는 것인지는 불분명하나 DA-6034의 염증활성 억제가 염증성대장염의 개선에 부분적인 역할을 한 것으로 사료된다.

LTB<sub>4</sub>는 염증성대장염에 있어서 중요한 염증전구매

개체로서 증성구에서 주로 생성된다.<sup>27-28)</sup> TNBS 모델을 포함한 여러 동물모델의 대장점막에서 LTB<sub>4</sub>의 농도가 증가되어 있고 LTB<sub>4</sub> 생성억제제 또는 LTB<sub>4</sub> 수용체 길항제들이 염증성 대장염 동물모델의 대장점막에서 LTB<sub>4</sub>의 활성감소와 함께 치료효력을 나타내고 있으며 LTB<sub>4</sub>의 직접적인 투여는 대장염증을 악화시킨다.<sup>29-32)</sup> TNBS를 주입하고 2일, 1주, 3주후까지의 대장점막에서 LTB<sub>4</sub>를 측정시, 2일후에는 대조군의 2배로, 1주후에는 4.7배로 증가했다가 3주후에는 6.4배 증가를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 LTB<sub>4</sub>가 급성염증보다는 만성염증에서 주된 염증매개자로 작용한다는 것을 보여준다. 염증성대장염에서의 LTB<sub>4</sub>는 주로 호중구에 대한 화학유인물질(chemoattractant)내지 탈과립 자극으로 작용하여, 리소솜(lysozyme)효소유리와 oxygen radical의 발생을 유도하여 대장염증을 증가시키고<sup>33-38)</sup> 점막부종과 설사를 유발함으로써 염증성대장염을 유발시킨다.<sup>39-40)</sup> DA-6034의 확실한 기전은 밝혀지지 않았지만 *in vitro*에서 LTB<sub>4</sub> 생성효소인 5-lipoxygenase를 억제하며(미발표자료) TNBS에 의해 유도된 염증성 장점막에서 LTB<sub>4</sub>의 생성을 억제하였으므로 DA-6034의 염증성대장염에 대한 치료효과는 부분적으로 5-lipoxygenase 억제활성에 기인되는 것으로 사료된다

PGE<sub>2</sub>는 궤양성 대장염 환자의 대장점막이나 투석물(dialysate)<sup>41-42)</sup>에서 증가되어 있고 여러 동물모델에서도 확인되었으므로<sup>43-44)</sup> 이러한 eicosanoid 농도의 증가는 대장염증과 궤양에 관계있는 것으로 보인다. 본 실험에서는 TNBS를 주입한 후 PGE<sub>2</sub>농도는 48시간에서 최대치를 보였으며, 2주와 3주후에는 감소되었다. 이처럼 TNBS의 영향도 크지만 ethanol에 의한 급성염증이 주로 일어나는 48시간에서 최대치를 나타냄으로서, PGE<sub>2</sub>가 ethanol에 의한 급성염증단계에서 작용할 것이 시사된다. 그러나, PGE<sub>2</sub>의 생성을 방해하는 indomethacin이 염증성 대장염을 악화시킬 수 있음과 지속성 prostaglandin 유사물질(analogue)의 투여가 오히려 대장점막을 보호하는 효과를 나타냈다는 보고도 있어,<sup>45-46)</sup> 그 역할에 대해서는 보다 많은 연구가 필요하다. 또한 5-lipoxygenase 억제제들의 투여는 동일한 모델에서 LTB<sub>4</sub>양의 감소와 함께 prostaglandin도 감소시켰으며 이러한 prostaglandin의 생성감소는 질병치유를 반영하는 결과로서 보고되고 있다.<sup>32)</sup> DA-6034의 TNBS로 유도된 대장염의 점막에서의 PGE<sub>2</sub> 억제효과

는 cyclooxygenase 또는 prostaglandin synthetase와 같은 생성효소의 억제에 기인되기 보다는 대장염의 치유에 의한 이차적인 결과로 사료된다.

이상의 결과로서 DA-6034는 TNBS로 유도된 염증성 대장염에서 우수한 치유효과와 항염증활성을 나타냄으로써 염증성대장염의 치료에 유용할 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1997년도 경기의약센터의 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) Andrews, J. and Goulston, K. : Inflammatory bowel disease-its history, current status and outlook. *Med. J. Aus.* **160**, 219 (1994).
- 2) Elson, C. O. : The basis of current and future therapy for inflammatory bowel disease. *Am. J. Med.* **100**, 656 (1996).
- 3) Israel, E. J. and Kleinman R. E. : Inflammatory bowel disease: diagnosis and treatment. *Semin. Gastrointest. Dis.* **5**, 95 (1994).
- 4) 최규완 : 한국인의 염증성 장질환, 대한내과학회 추계 학술대회지 p1 (1996).
- 5) Kuhnau, J. : The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Rev. Nutri. Diet.* **24**, 117 (1976).
- 6) Middleton, E. and Kandaswami, C. : The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The flavonoids: Advances in research*, Harbone, J. B.(Eds.), Chapman & Hall, London, p619 (1994).
- 7) Harborne, J. B. : Flavonoids in the environment: Structure-activity relationship. In: *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties*, Cody, V., Middleton, E., Harbone, J. B., Beretz, A.(Eds.), Alan R. Liss, New York, p17 (1988).
- 8) Pignol, B., Etienne, A., Crastes de Paulet, A., Deby, C., Mencia-Huerta, J. M. and Braquet, P. : Role of flavonoids in the oxygen-free radical modulation of the immune response. *Prog. Clin.*

- Biol. Res.* **280**, 173 (1988).
- 9) Welton, A. F., Hurley, J. and Will, P. : Flavonoids and arachidonic acid metabolism. In: *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties*, Cody, V., Middleton, E., Harbone, J. B., Beretz, A. (Eds.), Alan R. Liss, New York, p301 (1988).
  - 10) Berg, P. A. and Daniel P. T. : Effect of flavonoid compounds on the immune response. In *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular and medicinal properties*, Cody, V., Middleton, E., Harbone, J. B., Beretz, A. (Eds.) Alan R. Liss, New York, p157 (1988).
  - 11) Damon, B. M., Flandre, O., Michel, F., Perdrix, L., Labrid, C. and Crastes de Paulet A. : Effect of chronic treatment with a purified flavonoids fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneim. Forsch.* **37**(II), 1149 (1987).
  - 12) Elliott, M. J. and Chithan, K. : Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **43**(6), 1167 (1992).
  - 13) Fermin, L. H., Julio, G., Jose, A. R. and Antonio, Z. : Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. pharmacol. Exp. Ther.* **278**, 771 (1996).
  - 14) Gerritsen, M. E., Carley, W. W., Ranges, G. E., Shen, C. P., Phan, S. A., Ligon, G. F. and Pery, C. A. : Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* **147**(2), 278 (1995).
  - 15) Li, S. Y., The, B. S., Seow, W. K., Liu, Y. L., and Thong, Y. H. : In vitro immunopharmacological profile of the plant Flavonoids baohuoside-1. *Int. J. Immunopharmac.* **13**, 129 (1991).
  - 16) Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S. and Riddell, R. H. : Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **109**, 1344 (1995).
  - 17) Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, W., Szewczuk, M. R. and Wallace, J. L. : Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* **96**, 759 (1989).
  - 18) Shibata, Y., Ashida, T., Ayabe, T., Tarushi, M., Yokota, Okuyama, S., Saitoh, Y., Okamura, K. and Namiki, M. : Endoscopic scoring system for experimental colitis with trinitrobenzene-sulfonic acid in rats. *Dig. Endosc.* **5**, 13 (1983).
  - 19) 김나영, 김재준, 송인성, 김정룡, 김우호 : 흰쥐에서 TNBS로 유발된 염증성대장염의 병태생리에 관한 연구. *대한내과학회지* **47**, 20 (1994).
  - 20) Wallace, J. L. : Release of platelet-activating factor (PAF) and accelerated healing induced by a PAF antagonist in an animal model of chronic colitis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **66**, 422 (1987).
  - 21) Bradley, P. P., Priebat, D. A., Christensen, R. D. and Rothstein, G. : Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **78**, 206 (1982).
  - 22) Krawisz, J. E., Sharon, P. and Stenson, W. F. : Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* **87**, 1344 (1984).
  - 23) Boughton-Smith, N. K., Wallace, J. L., Morris, G. P. and Whittle, B. J. R. : The effect of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **94**, 65 (1988).
  - 24) Wallace, J. L. : Eicosanoids. In: *Inflammatory bowel disease from bench to bedside*, Williams & Wilkins, Baltimore, p123 (1994).
  - 25) Podolsky, D. K. : Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* **325**, 928 (1991).
  - 26) Yamada, T., Marshall, S., Specian, R. D. and Grisham, M. B. : A comparative study of two models of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* **102**, 1524 (1992).
  - 27) Sharon, P. and Stenson, W. F. : Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **86**, 453 (1984).
  - 28) Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P. and Beck, P. L. : Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **96**, 29 (1989).
  - 29) Allgayer, H., Eisenberg, J., and Paumgartner, G. : Soybean lipoxygenase inhibition studies with



- sulphasalazine metabolites N-acetylaminosalicylic acid, 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine. *Eur Clin Pharmacol* **26**, 449 (1984).
- 30) Bell, R. L., Bouska, J., Young, P. R., Lanni, C., Machinist, J., Malo, P. E., Summers, J. B., Brooks, D. W. and Carter, G. W. : The properties of A-69412 A small hydrophilic 5-lipoxygenase inhibitor. *Agents Actions* **38**, 178 (1993).
- 31) Safayhi, H., Tiegs, G. and Wendel, A. : A novel biologically active seleno organic compound-V: Inhibition by Ebselen (PZ51) of rat peritoneal neutrophil lipoxygenase. *Biochem. Pharmacol* **34**, 2691 (1985).
- 32) Zingarelli, B., Squadrito, F., Graziani, P., Camerini, R., and Caputi, A. P. : Effects of zileuton, a new 5-lipoxygenase inhibitor in experimentally induced colitis in rats. *Agents Actions* **39**, 150 (1993).
- 33) Plamblad, J., Malmsten, C., Uden, A., Radmak, O., Engstrot, L. and Samuelsson, B. : Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* **58**, 658 (1981).
- 34) Redl, H., Flynn, P., Lamche, H., Schiesser, A., Schlag, G. and Hammerschmidt, D. : Aggregation, chemotaxis and chemiluminescence of canine granulocytes. *Inflammation* **7**, 67 (1983).
- 35) Ford-Hutchison, A. W., Bray, M., Doig, M., Shireley, M. and Smith, M. : Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature Lond* **286**, 264 (1980).
- 36) Hoover, R., Karnovsky, M., Austin, K F., Corey, E. and Lewis, R. : Leukotiene B<sub>4</sub> action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2191 (1984).
- 37) Lobos, E. A., Sharon, P. and Stenson, W. F. : Chemotactic activity in inflammatory bowel disease, Role of leukotriene B<sub>4</sub>. *Dig Dis Sci* **32**, 1380 (1987).
- 38) Ford-Hutchison, A. W. and Evans, J. F. : Leukotriene B<sub>4</sub> Biological properties and regulation of biosynthesis, In Piper PJ eds. The leukotrienes, their biological significance. *New York, Raven Press* p141 (1986).
- 39) Bjork, J., Hedqvist, P. and Arfors, K. E. : Increase in vascular permeability induced by leukotriene B<sub>4</sub> and the role of polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* **6**, 189 (1982).
- 40) MacPherson, B. and Pfeiffer, C. J. : Experimental colitis. *Digestion* **14**, 424 (1976).
- 41) Sharon, P., Ligumsky, M., Rachmilewitz, D. and Zor, U. : Role of prostaglandins in ulcerative colitis: Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* **75**, 638 (1978).
- 42) Lauritsen, K., Laursen, L. S., Bukhave, K. and Rask-Madsen, J. : Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* **91**, 837 (1986).
- 43) Boughton-Smith, N. K., Wallace, J. L., Morris, G. P. and Whittle, B. J. R. : The effect of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **94**, 65 (1988).
- 44) Zifroni, A., Treves, A. J., Sachar, D. B. and Rachmilewitz, D. : Prostanoid synthesis by cultured intestinal epithelial and mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gut* **24**, 659 (1983).
- 45) Whittle, B. J. R. : Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition measured as prostacyclin biosynthesis and gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* **80**, 94 (1981).
- 46) Fedorak, R. N., Empey, L. R., MacArthur, C. and Jewell, L. D. : Misoprostol provides a colonic mucosal effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* **98**, 615 (1990).