

## DSS으로 유발된 생쥐의 대장점막손상에 대한 導滯湯의 효과

이주아, 공경환

세명대학교 한의과대학부속 충주병원 내과학교실

### Effects of *Doche-tang* on Colonic Mucosal Ulcer Induced by DSS in Mice

Ju-ah Lee, Kyung-hwan Kong

Department of internal Medicine, Oriental Medical Hospital of Semyung University

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study was carried out to investigate the effects of *Doche-tang* on colonic mucosal ulcer induced by dextran sulfate sodium(DSS).

**Method :** The group was divided into three. The normal group consisted of mice that were not inflammation-induced. The control group was composed of untreated colitis elicited mice. The sample group was administered *Doche-tang* after colitis elicitation. The effects on colonic mucosal ulcers were evaluated by the morphological change of colonic mucosa, the anti-oxidant effect, HSP 70, NF- $\kappa$ B, COX-1, COX-2 and iNOS.

**Results :** In terms of immunohistochemical findings, the distribution of COX-1 in mice treated with *Doche-tang* noticeably increased more than that in the control group. The distribution of HSP70, NF- $\kappa$ B, COX-2, iNOS in mice treated with *Doche-tang* decreased more than that in the control group. Regeneration of surface epithelial cell and goblet cell in mucosa was observed by transmission electron microscope.

**Conclusion :** According to the results, *Doche-tang* is practicable treatment for colonic mucosal ulcer.

**Key words :** *Doche-tang*, Colonic mucosal ulcer, COX-1, COX-2, NF- $\kappa$ B, Dextran sulfate sodium

## 1. 서론

염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 장에 만성적인 원인불명의 염증을 일으키는 질환으로 통상 궤양성 대장염과 크론병을 말한다. 원인과 병태생리가 확실히 밝혀진 바가 없어 근원적인 약물 요법은 없고 증상의 완화와 관해의 유지가 치료의 요점이 된다<sup>1</sup>. 서양에서는 흔한 질환이지만 국내에서는 매우 드문 질환으로 인식되어 왔

는데, 최근 국내에서도 그 발생 빈도가 점차 늘어나고 있는 추세이다<sup>2</sup>.

염증성 장질환은 한의학에서는 急性泄瀉, 痢疾, 腸風, 臟毒의 범주에 속하고 급성기의 원인은 濕熱이 大腸에 蘊結한 경우, 정신적으로 肝氣鬱結로 橫逆犯胃한 경우 또는 飲食所傷이며 만성화되는 이유는 주로 脾虛, 腎虛로 인한다고 볼 수 있다<sup>3</sup>. 본병의 급성기 또는 활동기에는 주로 大腸濕熱證이 나타나는데<sup>4</sup> 清熱利濕解毒의 처방을 사용한다<sup>5</sup>.

導滯湯은 『醫學入門』<sup>6</sup>에 처음 기록된 처방으로 膿血痢에 쓰이는 처방으로 알려져 있고 大腸濕熱의 증상인 下痢膿血 裏急後重 腹痛作渴 日夜無度を 치료한다.

· 교신저자: 공경환 충북 충주시 봉방동  
세명대학교 부속 충주 한방병원  
TEL: 043-841-1772 FAX: 043-856-1731  
E-mail: kong124@semyung.ac.kr

염증성 장질환에 대해 최<sup>7</sup>는 케양성 대장염을 赤痢의 범주로 보고 赤小豆當歸散으로 실험적 보고를 한 바 있고 이<sup>8</sup>는 地榆湯, 김<sup>9</sup>은 導赤地榆湯, 최<sup>10</sup>는 沙蔘麥門冬湯이 염증성 장질환의 치료에 효과가 있다는 실험적 보고를 한 바가 있으나 염증성 장질환을 大腸濕熱의 증상인 膿血痢로 보고 치료효과를 보고한 예는 아직 없었다.

이에 저자는 염증성 장질환의 급성기 및 활동기 치료의 한의학적 치료범주를 넓히고자 DSS으로 유발된 대장 점막 손상에 대한 導滯湯의 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 생쥐 대장 점막의 육안적 소견과 염증효소 유전자 발현 억제효과, 점막 방어 체계의 회복과 조직 손상 완화 등의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 본 론

### 1. 실험재료 및 방법

#### 1) 재 료

##### (1) 동 물

오리엔트(한국)에서 분양 받은 태령 6주된 Balb/C 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 정상군, DSS로 대장점막손상 유발군(DIC군), DSS와 導滯湯 추출물 동시 처리군(DCA군)으로 나누었으며, 각 군에 각 7마리씩 배정하였다.

##### (2) 약 재

본 실험에 사용한 한약재는 『東醫寶鑑』<sup>11</sup>에 수록된 導滯湯의 처방에 따른 구성약물로서 세명대 부속한방병원에서 구입하여 사용하였으며 1첨당 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Amount and Composition of *Doche-tang*

Herb	Scientific Name	Amount (g)
白芍藥	<i>Paeonia japonica</i>	8
當 歸	<i>Angelica gigas</i>	4
黃 蓮	<i>Coptis chinensis</i>	4
黃 芩	<i>Scutellaria baicalensis</i>	4
大 黃	<i>Rheum palmatum</i>	2.8
木 香	<i>Inula helenium</i>	1.2
檳 榔	<i>Areca catechu</i>	1.2
桂 心	<i>Cinnamomum cassia</i>	1.2
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	1.2
Total amount		27.6

### 2) 방 법

#### (1) 대장점막손상의 유발

대장점막손상을 유발하기 위해 7일 동안 5%(wt/vol) DSS(40,000 molecular weight, ICN, Aurora, OH)을 DIC군과 DCA군에 자유롭게 먹도록 하였다.

#### (2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank(KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Sigma)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

#### (3) 導滯湯의 제조, 투여 및 첨가

導滯湯(*Doche-tang*) 2침을 증류수 500ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50ml으로 감압·농축하여 DCA군에 DSS 처리 시작과 함께 7일 동안 2.5ml/kg/day 양으로 구강 투여하였다. *In vitro*에 사용되는 導滯湯의 추출은 감압·농축 후 동결 건조하여 사용하였고, MTS assay 결과 導滯湯 추출물 5mg/ml까지는 세포 생존율의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

(4) 항산화효과 측정

導滯湯의 항산화능력을 측정하기 위해 riboflavin을 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에 40mm buffer 2.6ml, nitrolime tetrasodium 100 $\mu$ l, EDITS/cyanide 200 $\mu$ l, riboflavin 100 $\mu$ l 그리고 농도별(1-10mg) 導滯湯 추출물 100 $\mu$ l을 넣고 3번 섞어주었다. ABS 560nm에서 auto zero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 계산하였다.

(5) NF- $\kappa$ B 활성 관련 염증효소 유전자 발현 억제 효과 조사(*in vitro*)

RAW 264.7 macrophages에서 導滯湯이 NF- $\kappa$ B 활성에 관여하는 IkB kinase(IKK), 염증효소인 induce Nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소 연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 1 $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS, Sigma)를 2시간 처리하여 NF- $\kappa$ B 활성을 유도한 후 導滯湯 추출물 0.5, 1.0, 1.5 그리고 2.0mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer(introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 IKK, iNOS, COX-2 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 2). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 통해 비교하였다(Table 2).

Table 2. Primer of IKK, COX-2, iNOS and  $\beta$ -actin mRNA

Primer	Primer sequences		Product (bp)	No. of cycles
IKK	sense	5'-CCACCCAGTTCCACAAGTCT-3'	380	35
	antisense	5'-CCTCCACTGCGAATAGCTTC-3'		
iNOS	sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense	5'-AGAACTGAGGGTACATGCTGGAGCC-3'		
COX-2	sense	5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	35
	antisense	5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'		
$\beta$ -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

(6) DSS로 유발된 생쥐의 대장점막손상에 대한 항염증효과 측정(*in vivo*)

가. 조직포본제작

DSS 처리 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류

고정(perfusion)을 실시하였다. 맹장에서 내림주름창자까지 적출하여 길이를 측정하고 내림주름창자만 따로 분리한 후 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다. 창자 점막의 일반적인 형태변화를

관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

나. 창자 점막 손상 완화 관찰

① 창자세포의 폐쇄이음 단백질 변화 관찰

Intestinal permeability는 폐쇄이음의 손실과 연관되는데, 폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin-1(ZO-1) 분포 변화 관찰을 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 $\mu$ g/ml)에 5분 동안 단백질 가수분해 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti ZO-1(1:20, Santa Cruz Biotech)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그렇게 한 후에 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:100, Santa Cruz Biotech)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 24시간 반응시킨 후, avidin biotin complex(ABC)kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색 하였다.

② 창자 점막 손상 스트레스 변화 관찰

점막 손상 스트레스를 조사하기 위해 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화를 rabbit anti mouse HSP70(1:100, Santa Cruz Biotech)을 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

③ 창자 점막 내 술잔세포의 변화 관찰

중성점액질(neutral mucin)을 분비하여 점액 방벽작용을 하는 술잔세포의 분포 변화를 조사하기 위해서 periodic acid-schiff reaction(PAS) 염색을 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그렇게 한 후 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 hematoxylin에서 1분 동안 대조염색 하였다.

④ 창자 점막고유막내 COX-1의 분포 변화 관찰

창자세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위해 rabbit anti-mouse COX-1(1:250, Chyman, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

다. NF- $\kappa$ B 활성 억제와 염증효소 생성 억제 관찰

① NF- $\kappa$ B 활성 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF- $\kappa$ B의 분포 변화를 조사하기 위해 NF- $\kappa$ B p65(1:250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

② 염증효소 생성 변화 관찰

염증 효소인 iNOS-2와 COX-2의 조직 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1:250, Santa Cruz Biotech)와 rabbit anti-mouse iNOS(1:250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

3) 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigmaplot 2000을 통한 Student T-test로 유의성을 검증하였으며 유의수준은 0.05로 하였다.

### III. 결 과

1. 항산화효과

導滯湯 추출물의 항산화 효율은 1 mg/ml에서 13 $\pm$ 1.0%, 2 mg/ml에서 17 $\pm$ 1.4%, 4 mg/ml에서 20 $\pm$ 1.0%, 6 mg/ml에서 37 $\pm$ 2.1%, 8 mg/ml에서 42 $\pm$ 1.9%, 10 mg/ml에서 48 $\pm$ 1.2%로 농도-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

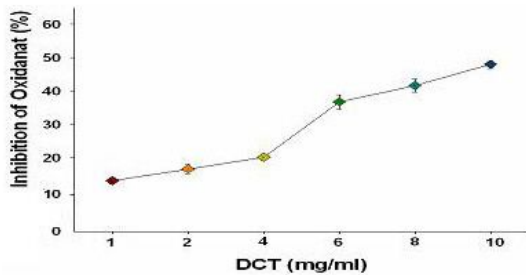


Fig. 1. Anti-oxidant effects of *Doche-tang*(DCT).

The SOD ability of DCT was dose-dependantly increased.

2. NF-κB 활성 관련 염증호소 유전자 발현 억제 효과(in vitro)

1) NF-κB 활성 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 IKK mRNA 발현은 증가하였는데, 導滯湯 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 導滯

湯 추출물 처리 후 IKK mRNA 발현량은 0.5 mg/ml에서 35%, 1 mg/ml에서 34%, 1.5 mg/ml에서 46%, 2mg/ml에서 59%가 감소하였다(Fig. 2).

2) 염증호소 iNOS 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 導滯湯 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 導滯湯 추출물 처리 후 iNOS mRNA 발현량은 0.5mg/ml에서 23%, 1 mg/ml에서 31%, 1.5mg/ml에서 46%, 2 mg/ml에서 55%가 감소하였다(Fig. 2).

3) 염증호소 COX-2 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 COX-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 導滯湯 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. COX-2 mRNA 발현량은 0.5mg/ml에서 11%, 1mg/ml에서 14%, 1.5mg/ml에서 19%, 2 mg/ml에서 39%가 감소하였다(Fig. 2).

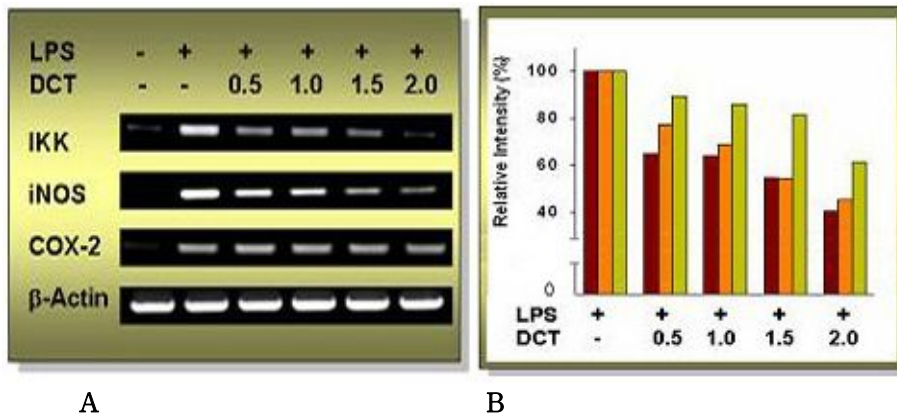


Fig. 2. *In vitro* test for anti-inflammation effects of DCT.

A. Inhibition of IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression. The RAW 264.7 macrophages were treated with LPS for 1 hours prior to the addition of indicated concentrations (0.5-2 mg/ml) of DCT, and the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced IKK, iNOS and COX-2 mRNA expression were dose-dependantly decreased in DCT treated RAW 264.7 macrophages.

B. Relative intensity for IKK (■), iNOS (■) and COX-2(■) mRNA expression.

LPS, lipopolysaccharide; DCT, *Doche-tang*; IKK; IκB kinase; iNOS, induce Nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2.

3. DSS로 유발된 생쥐의 대장점막염증에 대한 항염증효과(*in vivo*)

1) 큰창자 길이 변화

정상군의 맹장에서 내림주름창자까지의 길이는 119±2.5mm이었으나, DSS 처리로 대장점막손상이

유도된 DIC군에서는 정상군에 비해 35% 감소한 77±4.0mm로 측정되었다. 그러나 導滯湯을 동시 투여한 DCA군에서는 DIC군에 비해 21% 증가한 93±4.0mm로 측정되었다(Fig. 3).

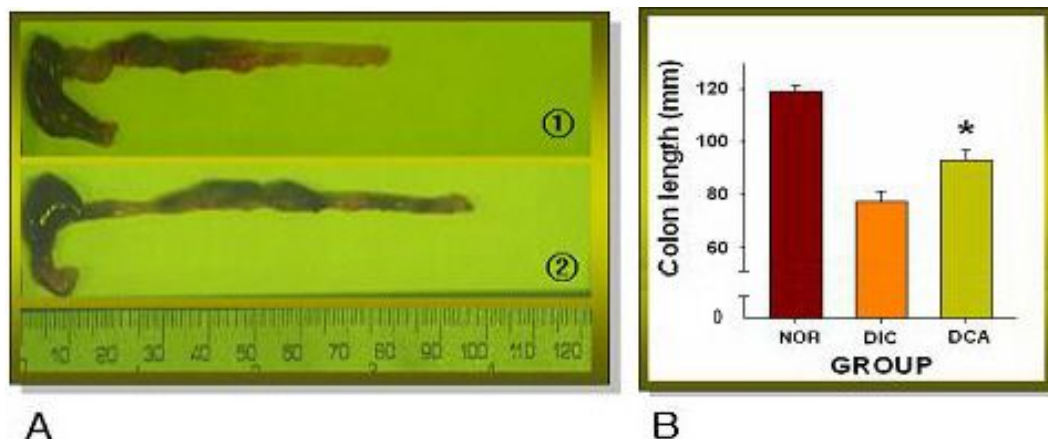


Fig. 3. Repair effects of colonic length by DCT.

A. Photograph of colon. The colonic length in DCA group(②) was more elongate than that in DIC group(①).  
 B. Graph for changes of colonic length.  
 DIC, DSS only treated mouse; DCA, DSS and DCT treated mouse;  
 \*,  $p < 0.05$  compared with DIC.

2) 창자 점막 손상 완화

(1) 일반적인 형태 변화

DIC군의 점막에서 창자세포와 술잔세포가 유실된 출혈성 침식(hemorrhagic erosion)이 관찰되었는데, 많은 수의 림프구, 섬유모세포, 과립백혈구 등 염증관여세포의 침윤이 점막고유층에서 관찰되었다(Fig. 4-A①). 일부 창자 점막에서 일어난 출혈성 침식이 점막근층을 지나 점막밑층 까지 확대된 것도 확인 할 수 있었다. 표면상피 상층부에 위치한 창자세포는 거의 손상된 형태로 나타났고, 술모양가장자리는 관찰되지 않았다. 한편 導滯湯을 투여한 DCA군에서는 DIC군에 비해서는 출혈성 침식이 완화된 것으로 나타났으며, 점막고유층에서 염증관여세포의 침식 감소가 확인되었다(Fig. 4-A

②). 일부 지역의 표면상피 상층부를 제외하고는 정상적인 창자세포의 배열을 확인할 수 있었으며, 창자세포에서 술모양가장자리도 관찰되었다.

(2) 창자세포의 폐쇄이음 단백질 변화

정상군에서 ZO-1 양성반응은 창자세포 이음복합체의 상층부인 폐쇄이음 부위 세포막에서 잘 관찰되었다. DSS 처리 후 ZO-1 양성반응은 감소하였는데, 창자세포 이음복합체가 심하게 손상 받은 DIC군에서는 ZO-1 양성반응이 정상군에 비해 76% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-B①). 한편 창자세포 이음복합체가 회복된 DCA군에서는 DIC군에 비해 ZO-1 양성반응이 181% 증가하였고, ZO-1 양성반응을 창자세포의 세포막 상층부에서 관찰할 수 있었다(Table 3, Fig. 4-B②).

(3) 창자 점막 손상 스트레스 변화

DSS 치료로 대장점막손상을 유발한 후 스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70의 양성반응세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응세포의 핵과 주변세포질에서 강하게 양성반응을 보

였다. DIC군은 정상군에 비해 양성반응세포의 분포가 354% 증가하였다(Table 3, Fig. 4-C①). 이에 반해 DCA군에서는 HSP70 양성반응세포의 분포가 DIC군에 비해 45% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-C②).

Table 3. The image analysis of ulcerative colitis evoked damages of mocosa

Objective	Group		
	NOR	DIC	DCA
ZO-1	2534±92	620±26	1741±83*
HSP70	559±14	2540±70	1397±19*
COX-1	4481±72	2031±93	3267±54*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)

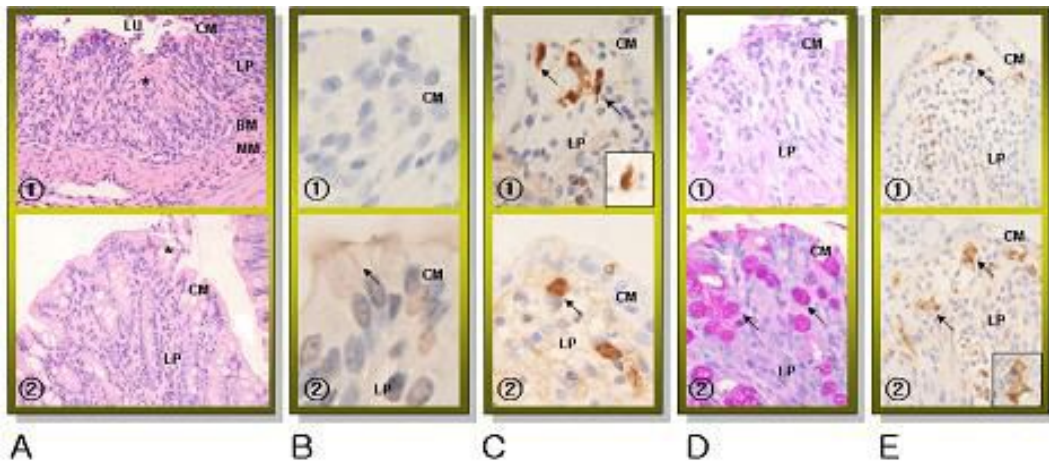


Fig. 4. Mitigative effects of DSS induced colonic mucosal ulcer by DCT (①, only DSS treated mouse; ②, DSS & DCT treated mouse).

A. The hemorrhagic erosion (asterisk) in mice treated with DCT noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (H&E, x200). B. The zonula occludin (ZO-1) positive reaction (arrow) in mice treated with DCT noticeably more increased than that of DSS only treated mouse (ZO-1 immunohistochemistry, x1000). C. The heat shock protein (HSP) 70 positive reaction (arrow) in mice treated with DCT noticeably more decreased than that of DSS only treated mouse (HSP70 immunohistochemistry, x400; lower square, enlargement of HSP70 positive reacted cell, x1000). D. The PAS positive reacted goblet cells (arrow) in mice treated with DCT noticeably more repaired than that of DSS only treated mouse (PAS, x400). E. The cyclooxygenase-1 (COX-1) positive reaction (arrow) in mice treated with DCT noticeably more increased than that of DSS only treated mouse (COX-1 immunohistochemistry, x400; lower square, enlargement of COX-1 positive reacted cell, x1000).

LU, lumen; CM, colonic mucosa; LP, lamina propria; BM, basement membrane; MM, muscularis mucosa.

(4) 창자 점막내 술잔세포의 변화

중성점액질을 분비하는 점막내 술잔세포의 변화를 조사하기 위해 PAS 염색을 실시하였다. 정상군에서 술잔세포는 검붉은색으로 염색되었고, 세포기저부에 더 많은 분비과립을 축적하고 있었다. DIC군의 출혈성 침식 주변 창자 점막에서 술잔세포의 분포가 정상군에 비해 줄어들었는데, 표면상피 상층부(apical surface)로 갈수록 숫자는 적었다(Fig. 4-D①). DCA군에서는 술잔세포의 분포가 DIC군에 비해 증가된 양상으로 관찰되었으며, 일부 표면상피 상층부에서 정상군과 유사한 정상적인 배열로 나타났다(Fig. 4-D②).

(5) 창자 점막고유막내 COX-1의 분포 변화

정상군에서 COX-1 양성반응세포는 주로 창자 세포 및 점막고유층에서 관찰되었으며, 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났다. 이러한 COX-1 양성반응은 DIC군에서 55% 감소하였다(Table 3, Fig. 4-E①). 이에 반해 DCA군은 COX-1 양성반응이 DIC군에 비해 61% 증가한 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 4-E②).

3) NF-κB 활성 억제와 염증효소 생성 억제 관찰

(1) NF-κB 활성 변화

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DCA군에서는 감소하였다. 이런 NF-κB

p65 양성반응세포는 창자 점막고유판 기저부에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 정상군에 비해 904% 증가하였고, DCA군은 DIC군에 비해 77% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-A).

(2) 염증효소 iNOS 분포 변화

염증 효소인 iNOS의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DCA군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 점막고유판 기저부에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 정상군에 비해 433% 증가하였고, DCA군은 DIC군에 비해 54% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-B).

(3) 염증효소 COX-2 분포 변화

염증 효소인 COX-2의 양성반응세포의 분포는 DIC군에서는 증가하는 반면 DCA군에서는 감소하였다. 이런 COX-2 양성반응세포는 점막고유판 기저부에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 DIC군은 정상군에 비해 252% 증가하였고, DCA군은 DIC군에 비해 49% 감소하였다(Table 4, Fig. 5-C).

Table 4. Image Analysis of Anti-inflammation by DCT

Objective	Group		
	NOR	DIC	DCA
NF-κB p65	477±12	4979±164	1132±45*
iNOS	533±16	2843±62	1322±33*
COX-2	849±19	2987±122	1538±23*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)

NF-κB p65, Nuclear factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2.

\*,  $p < 0.05$  compared with DIC.



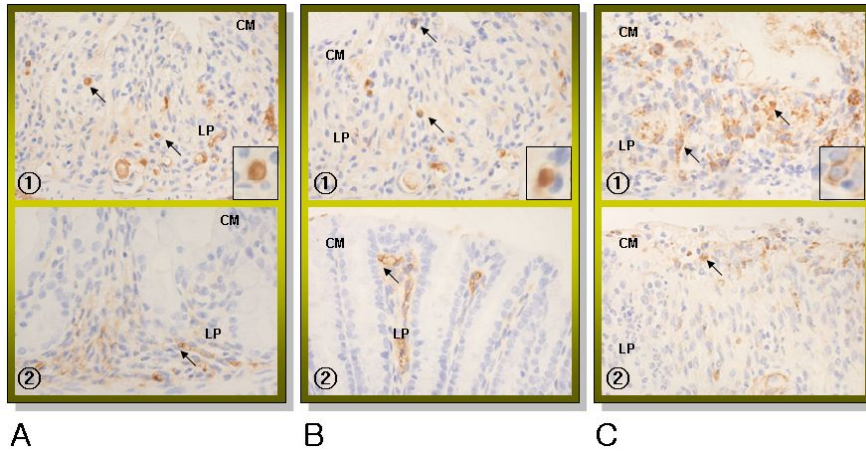


Fig. 5. Anti-inflammation of DCT through suppression of NF-κB activation (①, only DSS treated mouse; ②, DSS & DCT treated mouse).

A. The Nuclear factor-κB(NF-κB) p65 positive reaction (arrow) in mice treated with DICT noticeably more decreased than that of DSK only treated mice(BNF-κJp65 immunohistochemistry, x400; lower square, enlargement of BNF-κJp65 positive reacted cell, x1000). B. The inducible nitric oxide synthase(incus) positive reaction(arrow) in mice treated with DICT noticeably more decreased than that of DSK only treated mice(incus immunohistochemistry, x400; lower square, enlargement of incus positive reacted cell, x1000). C. The cyclooxygenase(COX-2) positive reaction(arrow) in mice treated with DCT noticeably more decreased than that of DSS only treated mice (COX-2 immunohistochemistry, x400; lower square, enlargement of COX-2 positive reacted cell, x1000).

#### IV. 고찰

염증성 장질환의 발생률은 지역에 따라 매우 다르며 미국, 영국, 노르웨이, 스웨덴과 같은 북부 지역에서 발생률이 매우 높지만<sup>12</sup> 우리나라의 경우 1970년대에는 증례보고를 할 정도로 드문 질환이었으나 1980년대부터 점차 증가하기 시작하여 1990년대 중반까지 계속하여 발생이 증가하고 있다고 보고된 바 있다<sup>13</sup>. 이러한 염증성 장질환 발병 기전에 관한 다양한 연구가 진행되고 있으며 특히, 전염증효소 (pro-inflammatory cytokine), 전사인자 (transcription factor), arachidonic acid metabolites, reactive oxygen and nitrogen species(RONS)등과 같은 염증반응 조절을 통한 치료법에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>14-6</sup>.

염증성 장질환의 대표적인 예인 크론병의 주된

임상 증상은 발열, 복통, 설사, 전신피로 등이며 체중감소가 동반될 수 있다. 대장을 침범한 경우 설사와 복통이 가장 흔한 증상이다. 궤양성 대장염의 주요 임상 증상은 혈성 설사, 복통이며 심한 경우에는 대개 발열과 체중감소를 동반한다<sup>17</sup>.

근원적인 치료방법은 없으나 급성기에는 스테로이드 치료를 위주로 하며 면역억제제, 5-aminosalicylate 계통의 항염증제가 치료제의 근간을 이루며, 치료 방침은 일단 관해를 이루도록 하고, 관해에 이르면 재발되지 않도록 유지요법을 써야한다<sup>1,12</sup>.

증상으로 미루어 볼 때 염증성 장질환은 임상양상에 따라 濕熱下注大腸證, 寒熱錯雜證, 肝旺脾虛證, 脾胃虛弱證, 脾腎虛弱證으로 변증할 수 있다. 임상에서 급성기에 가장 많이 볼 수 있는 형은 濕熱下注大腸證이다<sup>4</sup>. 급성기에 나타나는 大腸濕熱의 임상증상은 한의학적 범주 중에서도 痢疾의 양상

과 유사하다고 볼 수 있는데<sup>18</sup> 痢疾은 赤白粘液膿血을 下痢하고, 양이 적으며 불쾌하고 腹痛에 裏急後重이 수반하는 것을 주요 특징으로 하고, 대부분 여름과 가을에 발생하는 질환이다<sup>17-8</sup>. 導滯湯은 李梴의 『醫學入門』<sup>6</sup>에 기록된 처방으로 下痢膿血, 裏急後重, 腹痛作渴, 日夜無度的 증상을 치료하며 『東醫寶鑑』<sup>11</sup>에서는 膿血痢를 치료하는 처방으로 언급하고 있다. 導滯湯은 淸熱, 涼血, 燥濕, 理氣하는 특성을 가지고 있다. 이러한 효능은 粘性이 있는 적백색의 下痢, 裏急後重, 肛門灼熱, 小便短赤의 증상이 나타나는 大腸濕熱證<sup>19</sup>의 염증성 장질환에 치료효과가 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 생쥐를 아무런 처리를 하지 않은 정상군, DSS로 염증성 장질환 유발군(DIC군), DSS와 導滯湯 추출물 동시 처리군(DCA군)으로 나누고 창자길이의 변화, 항산화 효과, 염증호소 유전자 발현 억제 효과, 창자점막 손상 완화, 창자 점막 손상 스트레스 변화, 창자 점막 내 술잔세포의 변화, 점막고유막 내 COX-1의 분포 변화를 관찰하였다. 실험적 대장 점막의 염증상태 유발을 위해 DSS를 사용하였는데, Polyanionic compound인 DSS는 배속 대식세포에 탐식되어 장막(intestinal flora)의 구성 변화를 일으켜 점막내로 luminal antigen 유입을 자극하고 장내 염증반응을 유도한다. 항염증물질의 염증성 장질환에 대한 조절 연구에 사용되는 DSS 유도 염증성 장질환 동물모델에서는 실제 염증성 장질환과 유사한 병리학적 증상이 나타나는데, 설사, 혈변, 체중 감소, 점막 궤양 그리고 대장-직장 길이 감소 등이 일어난다<sup>20-1</sup>. 우선 導滯湯 추출물의 항산화 효율은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 RAW 264.7 macrophage에서의 NF-κB활성 관련 염증호소 유전자 발현 억제 효과가 확인되었다.

DSS로 염증성 장질환을 유발한 흰쥐의 대장의 길이는 정상군이 가장 길었고 DSS처리로 대장염이 유도된 DIC군에서 약 35% 감소한 길이가 측정되었다. 그러나 導滯湯을 동시 투여한 DCA군에서

는 DIC군에 비해 약 21% 증가하여 정상군, DCA군, DIC군의 순서를 보였다. 또한 DIC군의 점막에서 창자세포와 술잔세포가 유실된 출혈성 침식이 관찰되었는데, 많은 수의 림프구, 섬유모세포, 과립백혈구 등 염증관여세포의 침윤이 점막 고유층에서 관찰되었다. 한편 導滯湯을 투여한 DCA군에서는 DIC군에 비해서는 출혈성 침식이 완화된 것으로 나타났으며, 점막 고유층에서 염증관여세포의 침식감소가 확인되었다.

소화기 점막 상피는 다양한 자극에 대해 방어 장벽으로 작용하는데, DSS 처리는 폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin(ZO-1) 분포를 감소시켰다. 이는 점액상피세포사이에 있는 이음 복합체의 가장 꼭대기 부분에 존재하는 폐쇄띠(zonula occludens)의 손상에 의한 것이다. 폐쇄띠의 손상에 따른 intestinal permeability의 증가는 장내 염증반응을 유도하여 염증성 장질환을 일으킨다<sup>22-31</sup>. DSS처리 후 DIC군에서는 ZO-1양성반응이 정상군에 비해 76% 감소하였고 창자세포 이음복합체가 회복된 DCA군에서는 DIC군에 비해 ZO-1양성반응이 181% 증가한 것을 확인할 수 있었다.

NF-κB는 염증성 장질환에서 산화스트레스에 의한 염증과 발암과 관련된 유전자의 발현을 조절하는데 NF-κB 활성화에 의한 iNOS와 COX-2 생성 증가로 심각한 장내염증상황을 유발한다. iNOS는 ROS의 일종인 산화질소를 생성하는데, 산화질소(NO)는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고<sup>24</sup>, 이는 세포막지질을 peroxidation 시키며, thiorl, SH기를 oxidation하

여 세포독성을 유발한다<sup>25</sup>. 또한 단백질인 tyrosine 에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포 대사에 중요한 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다<sup>26</sup>. COX-2는 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 물질로 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관 이완과 혈관신생에도 관여 한다<sup>27-9</sup>. 최근에는 여러 가지 한약재에서 NF-κB 조절제를 찾으려는 많은 연구가 진행 중이다<sup>30-2</sup>. 또한 염증성 장질환에서는 점액보호장벽이 손상되어 중성점액을 분포하는 술잔세포의 손상과 COX-1 생성감소가 일어난다. House-keeping enzyme인 COX-1은 위장관 보호와 신장의 혈류조절 및 혈소판응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다<sup>33</sup>. 본 연구에서 COX-1의 반응은 DIC군에서 55% 감소하였다. 이에 반해 DCA군은 COX-1 양성반응이 DIC군에 비해 61% 증가한 것으로 관찰되어 導滯湯이 COX-1의 분비에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. COX-2의 반응 결과는 DIC군에서는 증가하는 반면, DCA군에서는 감소하였다. 이는 염증상태의 DIC군에서는 COX-2가 과반응의 형태로 발현하여 염증반응을 증가시키는데 비해 導滯湯은 COX-2의 과반응을 억제시키는 것을 알 수 있었다.

HSP70은 대부분의 생물체에서 발견되는 스트레스 저항 단백질로써 허혈, 열, 저혈당, 바이러스 감염, 경련, 중금속 오염 등 다양한 형태의 스트레스 상황에서 농도가 증가하는 것으로 세포내 변성된 단백질은 열성단백질 인자를 자극하여 HSP70 유전자의 전사를 유도하여 HSP70을 생성하며, HSP70은 세포상해에 저항이 있는 지역에서 주로 발견된다. 염증성 장질환에서는 점막 상피 손상이

일어나, 열 충격 단백질(HSP70)이 대량 합성되었다<sup>34-6</sup>. DIC군은 정상군에 비해 HSP70 양성반응세포의 분포가 354% 증가하였고 이에 반해 DCA군에서는 HSP70 양성반응세포의 분포가 DIC군에 비해 45% 감소하여 導滯湯이 HSP70의 과다발현을 억제하여 항염증 작용에 관여하므로 창자 점막의 손상을 완화하는 것을 알 수 있었다.

이러한 여러 연구내용을 살펴본 결과 본 실험에서는 DSS 동물모델에 導滯湯을 처리한 후 폐쇄이음 회복, 점막손상에 따른 스트레스 완화, 방어 장벽보호(술잔세포 유지, COX-1 증가)가 확인되었다. 또한 과도한 oxidative stress에 의한 염증에 대해 NF-κB p65 활성 억제를 통한 염증효소 iNOS와 COX-2 생성을 감소시키는 항염증작용도 일어났다. 또한 *in vitro* 실험을 통해서 導滯湯 추출물이 항산화효능과 iNOS mRNA와 COX-2 mRNA의 발현 억제능도 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 항산화 효능을 가진 導滯湯은 NF-κB 활성억제를 통해 과도한 염증작용을 조절함으로써 DSS로 유도된 대장점막손상의 점막 손상을 완화시키는 것으로 생각된다.

## V. 결론

본 연구는 대장점막손상에 대한 導滯湯의 치료효과를 조사하기 위해 생쥐에게 DSS를 음용시켜 대장점막의 염증상태를 유발한 후 導滯湯을 투여한 후 치료효과를 관찰하였다.

1. 導滯湯 추출물의 항산화 효과는 농도 의존적으로 증가하였다.
2. RAW 264.7 macrophage에서 NF-κB활성 억제, 염증효소 iNOS와 COX-2의 발현 억제가 확인되었다(*in vitro*).
3. 전체 대장의 길이는 導滯湯을 투여한 DCA군이 DSS를 단독 투여한 DIC군보다 정상치에 가까웠다.

4. DIC에 비해 DCA군에서는 출혈성 침식이 완화되었고 점막고유층에서 염증관여세포의 침식 및 HSP 양성반응세포의 감소가 확인된 반면, 술잔세포의 분포, COX-1 양성반응세포는 증가된 양상으로 관찰되어 창자 점막 손상의 완화가 확인되었다.
5. NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2 양성반응의 영상분석 결과 DIC군에 비해 감소하여 염증호소 생성 억제 를 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 보았을 때 導滯湯은 DSS로 유발된 생쥐의 염증성 장질환에서 점막손상의 회복과 염증의 감소에 효과를 보여, 導滯湯을 염증성 장질환의 급성기 임상치료에 적극적으로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. 김정룡편저. 소화기계 질환. 서울: 일조각; 2005, p. 277-80.
2. Kim CG, Kim JW, Kim HD, et al. Clinical features of Crohn's disease in Korea. Korean J Gastroenterol. 2002;40:173-80.
3. 류기원, 박동원, 류봉하, 윤상협, 문석재, 문구, 한규언, 임성우, 신현기, 김우환, 박호철, 최현, 백태현 편저. 脾胃內科學. 서울: 도서출판 한성기획; 2002, p. 285-7.
4. 원광대학교 한의과 대학 비계내과학교실 편저. 신비계내과학. 익산: 원광대학교출판국; 1996, p. 616.
5. 동서의학융합연구회 편저. 임상동서의학. 서울: 영림사; 1997, p. 348-9.
6. 李旻. 編註醫學入門. 서울: 대성문화사; 1989, p. 424.
7. 최은영. Indomethacan으로 유발된 생쥐의 대장 점막 손상에 대한 赤小豆當歸散의 치료효과. 대한한방내과학회지. 2005;26(2):341-52.
8. 이성환, 최흥민, 임성우. DSS으로 유발된 생쥐의 대장염에 미치는 地榆湯의 효과. 대한한의학회지. 2007;28(1):187-97.
9. 김승욱, 임성우. 導赤地榆湯이 케양성 대장염 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한 한의학회학지. 2002;23(3):200-10.
10. 최준혁, 임성우. 沙蔘麥門冬湯이 케양성 대장염 유발흰쥐에 미치는 영향. 대한한의학회학지. 2002;23(4):169-85.
11. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 1999, p. 447-52.
12. 헤리슨내과학편찬위원회. 헤리슨내과학. 서울: 도서출판MIP; 2006, p. 1937-50.
13. 김지원, 김찬규, 김현대, 김병관, 장동경, 김주성, 이동호, 정현재, 송인성. 케양성 대장염의 발생률, 단기적 치료 반응 및 재발률의 변화양상. 대한소화기학회지. 2003;41:15-25.
14. 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):7-17.
15. Fazio V. Current status of surgery for inflammatory bowel disease. Digestion. 1998;59(5):470-80.
16. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutat Res. 2001;1:480-1.
17. 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 동서의학임상총서. 서울: 정담; 2001, p. 565-76.
18. 이장훈 역. 동의임상내과학. 서울: 법인문화사; 1999, p. 341-61.
19. 박영배, 김태희. 변증진단학. 서울: 성보사; 1995, p. 381-2.
20. Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. Scand J Gastroenterol. 1992

- :27(7):529-37.
21. Björck S, Jennische E, Dahlström A. Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate-induced colitis in rats. *Ahlman Dig Dis Sci.* 1997;42(4):824-32.
  22. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):216-28.
  23. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2001-9.
  24. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994;9:1199-206.
  25. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;1:288(2):481-7.
  26. Villa LM, Salas E, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;20:91(26):12383-7.
  27. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 1993;17(2):38-40.
  28. Rothkötter HJ, Pabst P, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immunopath.* 1999;72:157-65.
  29. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93(5):705-16.
  30. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. Inhibitory effects of methanol extracts of *Cyrtus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophages cell line, RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:59-64.
  31. 이동연, 이재령, 김영우, 권영규, 변성희, 신상우, 서성일, 권택규, 변준석, 김상찬. 금은화 및 금은화전초가 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도된 NO의 생성, iNOS, COX-2 및 cytokine에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2005;19(2):481-9.
  32. 변성희, 양재하, 김상찬. 현삼메탄올 추출물이 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및 nitric oxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2005;20(2):7-16.
  33. Choitsu S. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology . *J Gastroenterol.* 1998;33:618-24.
  34. Gonzalez M. F., Shiraiishi K., Hisanaga K., Sagar S. M., Mandabach M. Sharp F. R. : Heat shock protein as markers of neuronal injury. *Mol. Brain Res.* 1989;6:93-100.
  35. Vass K., Beger M. L., Nowak T. S., Jr Lassmann H. : Induction of stress protein HSP70 in nerve cell after status epilepticus in the rat. *Neurosci Lett.* 1989;100:259-64.
  36. Bergstedt K., Hu B. R., Weiloch T. : Initiation of protein synthesis and heat shock protein-72 expression in the rat brain following severe insulin induced hypoglycemia. *Acta Neuropathol.* 1989;86:259-64.