

LPS로 유발한 장염증 모델에 대한 주초황금의 항산화 조절 및 장염증 개선 효과

신성호^{1#}, 신유옥¹, 이주영¹, 이아름¹, 김민영¹, 박찬흠², 서부일¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구가톨릭대학교 약학대학 생약학실험실

Ethanol-Heated Processed Scutellariae Radix Improve Inflammatory Response through an Inhibitory Effect against Oxidative Stress in Mice with the Lipopolysaccharide-induced Intestine Injury of Mice

SungHo Shin^{1#}, YuOck Shin¹, JooYoung Lee¹, AhReum Lee¹,
MinYeong Kim¹, ChanHum Park², Bull Seo¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea

2 : College of Pharmacy, Daegu Catholic university, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The aim of present study was to evaluate the beneficial effect of Scutellariae Radix (SR) and Scutellariae Radix EtOH-heated at 200°C (SR200) using lipopolysaccharide (LPS) treated intestine of mice.

Methods : Extract of SR and SR200 were orally administrated. Their effects were compared with vehicle-treated LPS and normal groups. Subsequently, we measured reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide in the serum and western blotting in the intestine.

Results : The average weight in LPS treated (Vehicle) group was lowered significantly compare to that in non-treated normal group and this weight loss in the vehicle group was effectively prevented by the administration of SR and SR200 respectively. The increased oxidative stress biomarker levels such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in the serum was markedly decreased by treated with SR200. The decreased levels of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) induced by LPS injection were significantly restored by both SR and SR200 treatment. Moreover, increased inflammatory mediators and cytokines such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the LPS treated vehicle mice were significantly decreased through down-regulation c-JUN through reduction of oxidative stress.

Conclusions : SR and SR200 could have benefit effect through down-regulation of abnormal oxidative stress in LPS induced intestine injury mice. Moreover, The anti-inflammatory activity of SR200 extract was better than SR extract in the LPS induced intestine injury mice.

Key words : Scutellariae Radix, ROS, Oxidative stress, Inflammatory transcription factor

서론

장염은 장에 염증이 생기는 모든 질병을 일컫는 광범위한 용어로, 어느 연령에서든지 흔히 올 수 있다. 소장이 가장 잘 침범되나 대장까지 염증이 파급할 수 있으며 역으로 십이지장

과 위까지 확산될 수 있다. 임상 증상은 장내강 수분 소실로 인한 설사와 구토 발생되나 심한 경우 쇼크에 빠질 수 있고 전해질 손실로 인한 경우에 부정맥이 나타날 수 있으며 경련도 오기도 하며, 치유과정에서 일시적인 용모 위축과 기능의 손실로 경미한 일시적인 흡수 불량도 나타날 수 있다. 장염의

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea
· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : SungHo Shin, College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ikarus121@hanmail.net

· Received : 22 June 2015 · Revised : 27 July 2015 · Accepted : 27 July 2015

원인은 매우 다양하나 일반적으로 성인과 소아에서 불량 음식으로 인한 경미한 장염이 생기거나 비소와 수은 같은 중독이 심한 장염의 원인이 되기도 하며, 유아에서 유행성으로 심한 장염이 발생할 수 있으며 종종 치명적이다. 대개 virus 분체 및 대장균이 검출되기도 발견되기도 한다¹⁾.

장염의 치료는 일반적으로 시간이 지나면 특별한 치료를 하지 않아도 저절로 낫게 되며, 규칙적이고 자극성이 적은 식사요법을 권장하고 안정 및 수액보충에 의한 탈수의 치료 등이 행해지고, 감염성인 경우에는 각각의 균에 감수성이 있는 항생제를 투여하나²⁾, 항생물질에 대한 내성으로 인한 문제로 인해 권장하지 않는다^{3,4)}.

Lipopolysaccharide(LPS)는 병원균 내독소로서 그람 음성 세균의 막구조를 형성하고 있으며 다당류, 인지질과 소량의 단백질로 구성되어 있다. 또한 여러 종류의 염증세포와 조직을 구성하는 세포들이 생산하는 cytokine들의 생산을 촉진하고⁵⁾, cytokine의 분비는 신호전달경로에서 JUN N-terminal kinase (JNK)와 같은 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 와 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 등의 전사 인자에 의해 조절된다고 알려져 있다⁶⁾. LPS의 과도한 자극은 macrophage에서 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β 및 IL-6와 같은 전 염증성 매개물질을 분비시킬 뿐만 아니라 superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)과 hydroxyl radicals와 같은 reactive oxygen species (ROS) 생성을 촉진하고 nitric oxide (NO)를 과도하게 활성화가 되어 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 염증을 유발시켜 조직의 손상을 초래한다^{7,8)}. 따라서 LPS는 염증 반응을 연구하는 실험 모델로 많이 사용되고⁹⁾, 장염을 유도하여 여러 동물에게 실험이 진행되어지고 있다^{10,11)}. 또, 항산화와 항염증 효과가 있는 약물 투여로 과도한 ROS에 의한 위염 손상이 감소됨이 보고되고 있다¹²⁾.

황금(Scutellariae Radix)은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 多年生 本草인 황금(Scutellaria baicalensis Georgi)의 주피(周皮)를 벗긴 뿌리로 가을에 채취하여 수근(鬚根)과 周皮를 제거하고 쉼(曬乾)한 것이며, 한의학에서는 황금을 청열조습(淸熱燥濕)의 효능을 가진 약물로 분류되어 폐열해수(肺熱咳嗽), 습열사리(濕熱瀉利), 황달(黃疸), 열림(熱淋), 토독(吐衄), 붕루(崩漏), 태동불안(胎動不安), 옹종(癰腫), 정창(疔瘡), 목적종통(目赤腫痛), 장열변갈(壯熱煩渴) 등을 치료하여 급만성 호흡기질환, 폐렴, 비염, 인후염, 감모 등에 응용될 수 있는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁶⁾. 황금의 성분으로는 flavonoid계 화합물로서 30여 종이 분리되어 있는데, baicalein, biacalin, chrysin, oroxylin-A, oroxylin- α -7-O-glucuronide, wogomin, wogonoside, skullcapflavone, dihydrobaicalin 등이 있다¹⁷⁾. 황금의 약리작용으로는 항천식작용¹⁸⁾, 항암작용¹⁹⁾, 항균작용²⁰⁾, 항산화활성²¹⁾, 항고지혈효과²²⁾, 생체보호작용²³⁾, 면역조절기능²⁴⁾ 등이 보고되었다. 한의학에서는 약물의 독성 저하 및 제거뿐만 아니라 약효효과를 증가시키기 위해서 주초(酒炒)를 한다. 전통 약초는 생물학적 활성 성분의 복합체로 구성되어 있고 일부 치료 효과를 향상시키기 위해서 열처리를 하였다²⁵⁾. 이러한 처리 방법은 화학적 변화를 통해 flavonoid 계를 포함한 polyphenol 화합물을 증가시켜 생물학적인 변화가 개선된다^{26,27)}. 황금 또한 열처리로 인해 flavonoid계를 포

함한 polyphenol 화합물을 증가시켜 생물학적 활성물질 변화를 야기한다^{28,29)}. 이와 같이 황금의 항산화 및 항염증에 대해 연구가 되어 있음에도 불구하고 황금과 주초(酒炒)한 황금에 대한 연구는 미흡하다.

이에 본 연구에서는 황금과 에탄올 주초(酒炒)한 황금 추출물을 이용하여 LPS 유도된 급성 장염 모델을 쥐에서 항산화와 항염증에 대한 효과를 연구한 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험에 사용된 동물은 ICR 생쥐 6주령 수컷으로 샘타코(오산, 한국)에서 구입하여 일주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고휘사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다. 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(DHU 2015-014)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

2) 시료

본 실험에 사용한 황금은 Ominherb (주) (영천, 한국)에서 구입한 것으로 생약규격집에 맞춰 관능검사하여 약전규격에 합격한 것만을 선정하여 사용하였고, 관능검사는 대구한의대학교 한의과대학 노성수 교수에 의해서 실시되어졌다.

3) 시약

LPS from *Escherichia coli* (serotype O127:B8, purity over 99.9%; L3137), Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), superoxide dimutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx), Histone, β -actin 과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. c-JUN은 cell signaling에서 구입하였다. Protease inhibitor mixture DMSO, solutionethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 황금의 시료 준비

건조된 황금 절편을 roasting machine (Genesis Co., Ltd., Kyungki-do, Korea) 기기를 이용하여 200°C에서 7분간 에탄올 30% 사용해 주초(酒炒)를 하였다. 70% 에탄올에 시료를 담아 상온에서 60-Hz 초음파로 3시간 동안 분쇄하고 추출해 이어서 농축 및 동결건조를 실시하여 36.8% 수율로 추출되었다. 그리고 건조된 생황금 절편 또한 같은 방법으로 분쇄하여 22.8% 수율로 추출하였다.

2) 급성 장염 모델 및 약물 투여

ICR mouse (6주령, 수컷)로부터 실험군을 총 4개의 군으로 정상군 (Normal) 5마리, 급성 장염을 유발하고 종류수 처리한 대조군 (Vehicle) 5마리, 급성 장염을 유발하고 황금 추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (SR) 5마리, 200°C 주초(酒炒)한 황금 추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (SR200) 5마리로 나누어 황금 및 주초(酒炒)한 황금 추출물을 3일간 100 mg/kg/body weight의 농도로 각 1회 경구 투여를 하였다. 마지막 약물 투여 1시간 후 LPS 20mg/kg 체중의 농도로 복강주사를 실시하였다. LPS 투여 24시간 후, 심장천자 방법으로 혈액을 채취하여 즉시 원심분리기를 이용해 혈청을 분리하였고 그 후에, saline (0.9% NaCl, pH 7.4) 관류하여 장기를 채취해 분석 전까지 빠르게 -80°C 보관하였다.

3) 혈청 산화적 스트레스 바이오마커 측정

심장에서 채취한 혈액을 4,000 rpm 10분 원심 분리하여 혈청을 얻었고 장 조직은 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 분쇄하였다. 혈청 내의 ROS를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다²⁹⁾. 혈청 NO 측정을 측정하기 위하여 Misko *et al.*,³⁰⁾의 방법을 시행하여 측정하였다.

4) Western blot

장의 세포질단백질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, and 1.5 M sucrose, and then 0.1 M DTT and protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질단백질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵단백질을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μl의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 voltex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵단백질을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 장 조직의 세포질단백질의 SOD, CAT, GPx,

iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, β-actin 및 핵단백질 NF-κB p65, c-JUN, Histone, 단백질의 발현을 측정하기 위해 10 μg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBST로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBST로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBST로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 GE Healthcare (Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

5) 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준오차 (Mean ± S.E)로 표시하였으며, SPSS (18.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 유의수준 p -value < 0.05에서 검정하였다.

결 과

1. 무게 변화 측정

실험 기간 동안 체중 변화를 측정하였다. 정상군(2.0 ± 0.2 ($p < 0.001$)), LPS 유도된 급성 장염 생쥐인 대조군(-4.7 ± 0.3), 생황금 투여군(SR; -3.5 ± 0.1 ($p < 0.05$))과 주초(酒炒)한 황금 투여군(SR200; -3.2 ± 0.1 ($p < 0.01$)) 체중 감소를 대조군에 비해 유의성 있게 방지하였다(Fig. 1).

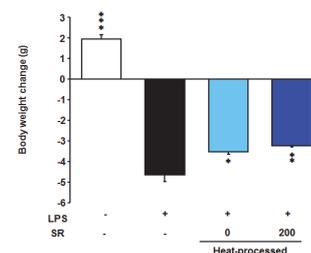


Fig. 1. Body weight change.

Body weight change N : Normal, Veh : vehicle-administered and LPS-treated mice, SR : Non heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice, SR200 : Heat heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice. Data are the mean SEM. Significance : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus vehicle-administered and LPS-treated mice.

2. 혈액의 산화적 스트레스 바이오마커 측정

부검 시 심장에서 채취한 혈액을 원심 분리 후 혈청을 분리 하였다. 분리된 혈청을 이용하여 산화적 스트레스의 마커인 ROS와 NO를 측정하였다. ROS에서 대조군은(708 ± 15 fluorescence/min/ml) 정상군(456 ± 20 fluorescence/min

/ml ($p < 0.001$)에 비해 수치가 증가하였고, 생황금 투여군에서 (660 ± 24 fluorescence/min/ml) 감소한 경향이 있었으며, 주초(酒炒)한 황금 투여군에서 (549 ± 35 fluorescence/min/ml($p < 0.01$)) 생쥐에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. NO 측정에서 대조군은 (1.72 ± 0.22 mmol/mL) 정상군 (0.11 ± 0.05 mmol/mL ($p < 0.001$))에 비해 수치가 증가하였고, 생황금 투여군에서 (1.12 ± 0.48 mmol/mL) 감소한 경향이 있고, 주초(酒炒)한 황금 투여군에서 (0.62 ± 0.17 mmol/mL ($p < 0.01$)) 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 1).

Table 1. Hematological analyses.

Group	ROS (fluorescence/min/mL)	NO (mmol/mL)
Nor	$456 \pm 20^{**}$	$0.11 \pm 0.05^{***}$
LPS-treated mice		
Veh	708 ± 15	1.72 ± 0.22
SR	660 ± 24	1.12 ± 0.48
SR200	$549 \pm 35^*$	$0.62 \pm 0.17^*$

Oxidative stress biomarker in serum. Nor : Normal, Veh : vehicle-administered and LPS-treated mice, SR : Non heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice, SR200 : Heat heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice. Date are the mean SEM. Significance : * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ versus vehicle-administered and LPS-treated mice.

3. 장 조직의 항산화 단백질 SOD, CAT, GPx 측정

장 조직에서 western bolt을 실시하여 항산화 효소인 SOD, CAT, GPx를 측정 하였다. 그 결과 SOD의 발현은 대조군(0.82 ± 0.04)은 정상군(1.00 ± 0.06 ($p < 0.05$))에 비해 유의하게 감소하였고, 생황금 투여군(0.81 ± 0.06)과 주초(酒炒)한 황금 투여군에서 (0.91 ± 0.17) 증가하는 경향을 확인할 수 있었다. CAT의 발현 역시 대조군(0.53 ± 0.03)이 정상군(1.00 ± 0.07 ($p < 0.001$))에 비해 유의하게 감소하였으나 황금 투여군에서(0.77 ± 0.07 ($p < 0.01$))에서 증가하는 경향이 있었고, 주초(酒炒)한 황금 투여군에서(1.13 ± 0.02 ($p < 0.001$)) 유의성 있게 증가 하였다. GPx의 발현 또한 대조군은(0.55 ± 0.10) 정상군(1.00 ± 0.01 ($p < 0.01$))에 비해 유의하게 감소하였고 황금 투여군에서(0.99 ± 0.06 ($p < 0.01$))과 주초(酒炒)한 황금 투여군에서(1.40 ± 0.09 ($p < 0.001$)) 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

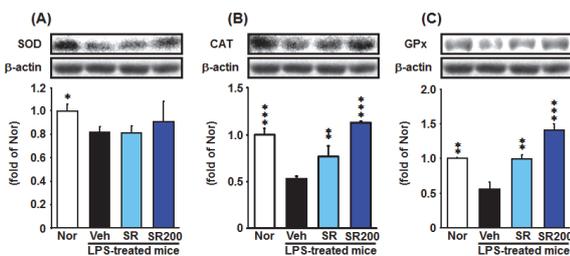


Fig. 2. Expression of anti-oxidant enzyme in Intestine. Expression of anti-oxidant enzyme in Intestine. Nor : Normal, Veh : vehicle-administered and LPS-treated mice, SR : Non heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice, SR200 : Heat heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice. Date are the mean SEM. Significance : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus vehicle-administered and LPS-treated mice.

4. 장 조직의 염증성 사이토카인 및 매개인자 측정

장 조직에서 western bolt을 실시하여 염증의 매개인자인 NF- κ B p65와 c-JUN을 측정하였다. 그 결과 NF- κ B p65의 발현은 대조군(1.18 ± 0.16)은 정상군(1.00 ± 0.11)에 비해 증가하는 경향이 있었고, 생황금 투여군(1.09 ± 0.15)과 주초(酒炒)한 황금 투여군에서는(0.90 ± 0.10) 감소하는 경향이 있었다. 또, c-JUN의 발현은 대조군(1.77 ± 0.11)에서 정상군(1.00 ± 0.10 ($p < 0.001$))에 비해 증가 하였지만 황금 투여군(1.48 ± 0.10)에서는 감소하는 경향이 있었고 주초(酒炒)한 황금 투여군에서는(1.02 ± 0.09 ($p < 0.001$)) 정상군 가까이 감소하였다(Fig. 3). 또한 대조군의 장조직에서 COX-2, iNOS와 TNF- α , IL-6의 발현을 확인한 결과, 대조군에서의 COX-2(1.63 ± 0.16)의 발현은 정상군(1.00 ± 0.10 ($p < 0.01$))에 비해 크게 증가하였으나 생황금 투여군(1.52 ± 0.17)에서는 감소하는 경향이 있었고, 주초(酒炒)한 황금 투여군(1.20 ± 0.10 ($p < 0.05$)) 유의하게 감소하였다. iNOS의 발현은 정상군(1.00 ± 0.11 ($p < 0.01$))에 비해 대조군(1.83 ± 0.22)에서 크게 증가하였고 생황금 투여군(1.60 ± 0.11)에서는 감소하는 경향이 있었고, 주초(酒炒)한 황금 투여군(0.98 ± 0.20 ($p < 0.05$))에서는 유의성 있게 감소하였다. TNF- α 의 발현은 대조군(1.47 ± 0.15)이 정상군(1.00 ± 0.06 ($p < 0.05$))에 비해 유의하게 증가하였으나 생황금 투여군(1.28 ± 0.07)에서 감소하는 경향이 있었고 주초(酒炒)한 황금 투여군(0.96 ± 0.05 ($p < 0.01$))에서는 유의성 있게 감소하였다. IL-6의 경우, 대조군(1.80 ± 0.18)에서는 정상군(1.00 ± 0.07 ($p < 0.01$))에 비해 유의성 있게 증가하였으나 생황금 투여군(1.71 ± 0.09)과 주초(酒炒)한 황금 투여군(1.33 ± 0.11) 감소하는 경향만 보였다(Fig. 4).

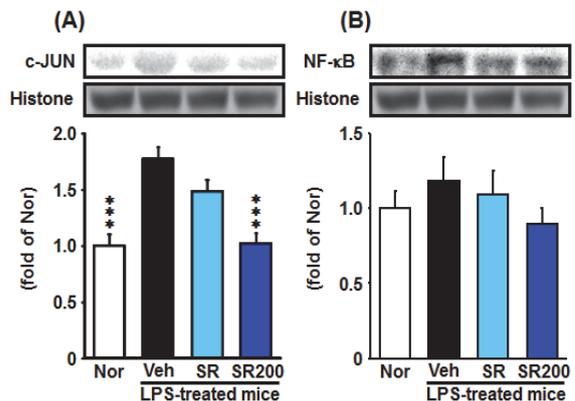


Fig. 3. Expression of inflammation-related proteins in Intestine. inflammation-related proteins c-JUN (A), nuclear factor-kappa B (NF- κ B);(B) expression levels in the Intestine. Nor : Normal, Veh : vehicle-administered and LPS-treated mice, SR : Non heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice, SR200 : Heat heat processed Scutellariae Radix-administered and LPS-treated mice. Date are the mean SEM. Significance : * $p < 0.001$ versus vehicle-administered and LPS-treated mice.

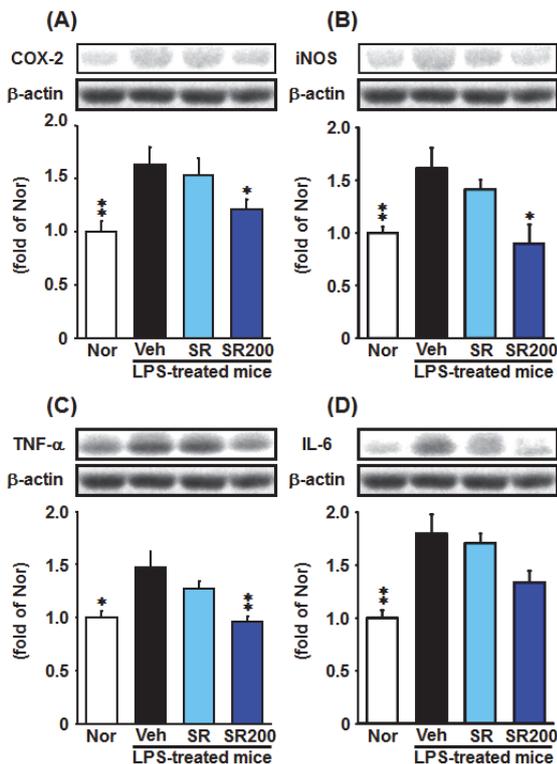


Fig. 4. Expression of inflammation-related proteins in Intestine. inflammation-related proteins cyclooxygenase-2 (COX-2);(A), inducible nitric oxide synthase (iNOS);(B), Tumor necrosis factor α (TNF α); (C), Interleukin-6 (IL-6). Significance : * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. vehicle-treated RE rat values.

고찰

장염은 균에 의한 감염과 폭식, 폭음, 식중독, 약물, 음식물에 의한 비감염성으로 나누어지고, 원인 물질에 따라 잠복기와 증상의 정도가 다르게 나타나며, 일반적으로 음식물 섭취 후 72시간 이내에 구토, 설사, 복통, 발열, 자통, 탈수 등의 증상을 나타낸다. 장염의 발병 원인으로 균에 의한 감염이 가장 큰 원인이다³¹⁾. 그러므로 병원성 대장균 등과 같은 침투성 병원균이 직접 장관 점막층의 상피세포를 침투하여 다양한 증상을 일으킨다³²⁾. 염증은 세포 손상의 원인이 되고, 최근 연구에 의하면 산화적 스트레스가 주요한 원인이 된다고 알려졌다³³⁾. ROS 생성에 의해 발생한 산화적 스트레스가 세포 손상을 야기하고, 이러한 ROS 감소는 세포 손상이 감소된다고 보고되어지고 있다³⁴⁾.

한방약은 오래전부터 다양한 질병을 치료하기 위해서 사용되어져 왔다. 황금은 임상적으로 생으로 사용하는 것과 열처리를 하는 두 가지 방법으로 사용됐고, 기존의 연구에 따르면 해열제, 간보호제, 항고혈압, 이노제, 항생제로 보고되고 있다³⁵⁾. 또한, 몇몇의 보고에 따르면 황금으로 분리된 flavonoid계 화합물인 baicalin, baicalein과 wogonin이 있다. flavonoid계는 의학적 및 임상적으로 항균작용, 항알러지작용, 항바이러스작용, 항암작용, 항산화작용과 항염증작용 보고되었다^{36,37)}. 본 연구에서는 황금이 LPS로 유도된 급성 장염 생쥐 모델에서 생황금과 주초(酒炒)한 황금 추출물을 이용하여 항산화 및 항염증 효과를 측정하였다.

LPS는 병원균의 내독소로서 호중구의 침윤 및 전 염증성 사이토카인과 매개자를 방출하여 염증과 면역반응을 야기한다. 본 연구에서는 염증의 전형적인 증상을 확인하기 위해 체중 변화 측정을 측정하였다. 생황금 추출물과 주초(酒炒)한 황금 추출물에서 체중 감소를 대조군에 비해 유의하게 방지한 것을 확인할 수 있었다.

산화적 스트레스는 LPS로 유도된 급성 장염에 중요한 역할을 하고 ROS의 과도한 생성은 항산화 시스템 불균형을 초래하고 결국 세포 손상을 야기한다. 또한 LPS는 과도한 NO 생성하여 iNOS 발현의 자극제로서 알려져 있다³⁹⁾. 과도한 NO 생성으로 유도된 iNOS는 직접적인 조직 기능 장애와 ONOO⁻ 생성에 중요한 역할을 한다⁴⁰⁾. 따라서 ROS와, NO 억제제는 조직 손상 개선에 주요한 요인이다. 본 연구에서는 혈액 내에서 산화적 스트레스의 바이오 마커인 ROS 및 NO 수치가 생황금 추출물에서는 유의성 없이 감소하는 경향이 있었지만 주초(酒炒)한 황금 추출물에서는 유의하게 감소하였다.

ROS 소거에 관련된 항산화 활성은 항산화 효소 단백질로 알려진 SOD, CAT와 GPx에 의해서 조절되어진다. 이 항산화 효소 단백질들은 스트레스로 때문에 ROS 축적으로 세포 손상과 테미지를 저항하기 위해 자극된다⁴¹⁾. SOD와 CAT는 자유 라디칼의 노출에 우선적으로 보호하는 것으로 고려된다. 세포 내의 과도한 ROS 축적에 의해 O₂⁻를 포함한 자유라디칼이 증가하는데 SOD로 인해서 O₂⁻ 수거된다. 이 반응은 H₂O₂를 생산하지만, CAT와 GPx는 H₂O₂를 H₂O로 중화한다⁴²⁾. 본 실험에서는 장 조직에서 항산화 효소 단백질을 측정하기 위해 western blot를 실시하였다. 생황금 추출물에서는 SOD, CAT와 GPx 모두 유의성 없이 감소하는 경향만 있었고, 주초(酒炒)한 황금에서는 SOD를 제외한 CAT와 GPx는 정상군처럼 유의하게 증가하였다. 이를 통하여 생황금 추출물 보다는 주초(酒炒)한 황금 추출물이 효과적으로 CAT와 GPx 발현 증가로 인해서 조직 손상을 억제하는 것으로 보여준다.

게다가, 증가된 ROS는 NF- κ B p65와 AP-1의 한 부분인 c-JUN 전사인자와 같은 스트레스에 민감한 세포내 신호기전의 활성으로 염증관련 단백질과 염증관련 사이토카인으로 인해 직접적인 세포 손상을 야기한다⁴³⁾. 본 실험에서는 대조군에 비해 NF- κ B p65에서 추출물마다 유의한 차이를 얻진 못하였으나, c-JUN에서는 주초(酒炒)한 군에서 정상군에 가까운 유의한 차이를 얻을 수 있었다. NF- κ B p65와 c-JUN과 같은 전사인자들은 iNOS와 COX-2와 같은 염증 효소를 조절하고, TNF- α 나 IL-6와 같은 염증성 사이토카인을 조절한다⁴⁴⁾. COX-2는 PEF2의 활성으로 염증반응을 활성화되고⁴⁴⁾, iNOS는 NO의 과잉 생성으로 인해 유도되어 세포내의 염증 관련 단백질로 작용한다⁴⁵⁾. TNF- α 는 패혈성 쇼크, 염증 및 세포 독성을 포함한 생리적인 영향을 준다. 또한 발열 및 암액질과 박테리아 패혈증, 류마티스 관절염과 크론병에 해로운 효과에 원인이 된다는 사실로 카렉틴으로 알려져 있고, 독소의 유해 효과의 주요 매개자인 LPS를 포함한 다양한 자극에 의해 단핵백혈구와 대식세포이 반응하여 분비된다고 발표된 바 있다⁴⁶⁾. IL-6는 T세포 분화를 자극하고, 세포성장, 생존 그리고 분화에 주요 조절자이면서 면역반응, 염증, 조절 및 종양 형성과 같은 다양한 생물학적 반응을 관계되어 있다⁴⁷⁾. 본 실험에서는 western blot를 통해 NF- κ B p65와

AP-1 관련 염증 단백질과 염증 사이토카인의 발현을 측정 한 결과 대조군에 비해서 생황금 추출물에서는 모두 감소하는 경향을 보였고, 주초(酒炒)한 황금 추출물은 유의성 있게 감소하였다. 하지만 IL-6의 발현은 감소하는 경향만 확인하였다. 그러므로 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여는 생황금보다 급성 장염에 대해 보호하는 효과가 보여진다.

급성 장염 모델 생쥐에서 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여한 결과 항산화 관련 효소인 SOD, CAT와 GPx의 발현 증가를 통해 c-JUN의 발현은 뚜렷하게 감소되었고 그로 인하여 발현되었던 iNOS⁽⁴⁸⁾, COX-2⁽⁴⁹⁾, TNF- α ⁽⁴⁸⁾와 IL-6⁽⁵⁰⁾의 발현을 유의하게 감소시켰으므로 급성 장염의 보호효과가 있다는 것을 의미한다(Fig. 5).

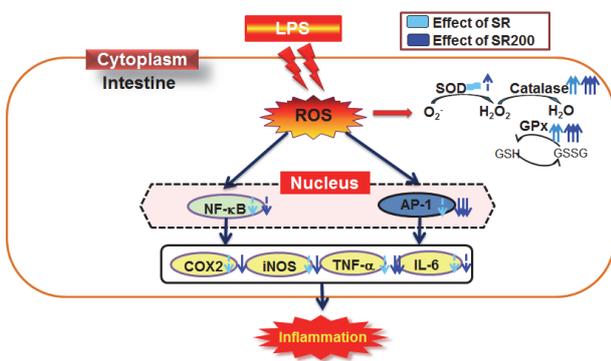


Fig. 5. Possible mechanism for the effects of SR and SR200 on intestinal damage.

결론

급성 장염을 유발시킨 생쥐에 생황금(SR)과 200℃ 주초(酒炒)한 황금(SR200) 추출물의 투여가 항산화 효과를 통한 장 조직의 손상 및 항염증작용 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 황금 추출물 투여군과 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여군은 LPS에 의하여 유도된 급성 장염 모델 생쥐에 비해 체중 감소를 유의하게 방지하였다.
2. 황금 추출물 투여군은 LPS에 의하여 증가한 혈액 내의 ROS와 NO를 감소하는 경향을 확인하였고, 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여군은 모두 유의성있게 감소하였다.
3. LPS에 의하여 급성 장염 모델 생쥐의 장 조직 내에서 감소한 항산화 효소 단백질인 SOD는 황금 추출물 투여군에서 증가하는 경향을 확인했고 CAT와 GPx는 유의하게 증가하였다. 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여군은 SOD에서 증가하는 경향을 확인하였고, CAT와 GPx는 정상 수준으로 회복시켰다.
4. LPS에 의하여 급성 장염 모델 생쥐의 장 조직 내에서 증가한 전사인자인 c-JUN과 NF- κ B p65은 황금 추출물 투여군은 감소되는 경향을 확인할 수 있었고,

200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여군은 NF- κ B p65의 발현이 감소되는 경향과 c-JUN에서 정상 수준으로 회복시켰다.

5. LPS에 의하여 급성 장염 모델 생쥐의 장 조직 내에서 증가한 COX-2, iNOS, TNF- α 와 IL-6의 발현은 황금 추출물 투여군에서 감소되는 경향을 확인할 수 있었고, 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여군은 COX-2, iNOS와 TNF- α 의 발현이 정상 수준으로 회복시켰지만 IL-6에서는 감소되는 경향만 확인되었다.

그러므로 황금 추출물 투여보다는 200℃ 주초(酒炒)한 황금 추출물 투여가 급성 장염 모델에 보호하는 효과가 있다고 사료된다.

References

1. Govan ADT, Macfarlane PS, Callander R. Pathology Illustrated, Korea Medical Publishing Co., 1990 : 410.
2. Kim BC, Yang HR, Jeong SJ, Lee KH, Kim JE, Ko JS, Kim EC, Seo JK. Clostridium Difficile Colitis in Childhood: Associated Antibiotics. J Korean Pediatr Gastroenterol Nutr 2002 ; 5 : 143-9.
3. Larson E. Community factors in the development of antibiotic resistance. Annu Rev Public Health, 2007 ; 28 : 435-47.
4. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 2008 ; 62 (Suppl 1) : 1-9.
5. Marriot JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF-alpha production. J Immunol. 1998 ; 161 : 4236-43.
6. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. Int J Biochem Cell Biol. 1997 ; 29(6) : 867-70.
7. Lin CH, Yeh CH, Lin LJ, Wang SD, Wang JS, Kao ST. Immunomodulatory effect of chinese herbal medicine formula sheng-fei-yu-chuan-tang in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice. Evid Based Complement Alternat Med. 2013 ; 2013 : 976342.
8. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide : physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest. 1991 ; 21(4) : 361-74.
9. Mathiak G, Grass G, Herzmann T, Luebke T, Zetina CC, Boehm SA, Bohlen H, Neville LF, Hoelscher AH. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. Br J Pharmacol. 2000 ; 131(3) : 383-6.
10. Jiang J, Shi D, Zhou XQ, Hu Y, Feng L, Liu Y,

- Jiang WD, Zhao Y. In vitro and in vivo protective effect of arginine against lipopolysaccharide induced inflammatory response in the intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Fish Shellfish Immunol*. 2015 ; 42(2) : 457-64.
11. Hsiang CY, Hseu YC, Chang YC, Kumar KJ, Ho TY, Yang HL. Toona sinensis and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by in vivo bioluminescence imaging. *Food Chem*. 2013 ; 136(2) : 426-34.
 12. Ciacci C, Russo I, Bucci C, Iovino P, Pellegrini L, Giangrieco I, Tamburrini M, Ciardiello MA. The kiwi fruit peptide kissper displays anti-inflammatory and anti-oxidant effects in *in-vitro* and *ex-vivo* human intestinal models. *Clin Exp Immunol*. 2014 ; 175(3) : 476-84.
 13. Yang HJ, Han HS, Lee YJ. Effect of Fermented *Scutellariae Radix* Extract on Production of Inflammatory Mediator in LPS-stimulated Mouse Macrophages. *Kor J Herbol*. 2013 ; 28(5) : 45-52.
 14. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of *Scutellariae Radix* Extract on the Proinflammatory Mediators in Raw 264,7 Cells Induced by LPS. *Kor J Herbol*. 2011 ; 26(2) : 75-81.
 15. Kim HS, Han HS, Lee YJ. A Study on a Morphological Identification of *Scutellariae Radix*. *Kor J Herbol*. 2008 ; 23(2) : 33-40.
 16. Park WS. The Effect of Bacillus-Fermented *Scutellariae Radix* Acupuncture Solution on Interleukin Production in Mouse Macrophage Stimulated by Lipopolysaccharide. *Soc Mer Acu*. 2010 ; 27(2) : 95-105.
 17. Kim HC. *Hanyakyakri-Hak*. Seoul : Jipmoondang. 2001 : 129-33.
 18. Hwang DY, Lee SC, Shin DH, Shin MK, Kim JH, Jeong JG, Song HJ. Original Articles : The effect of *Radix Scutellariae* Water Extract on the asthma induced by Ovalbumin. *Kor J Herbol*. 2004 ; 19(4) : 117-25.
 19. Seo WG, Jeong JC. Effects of *Trichosanthes kirilowii* Maxim and *Scutellaria baicalensis* Georgi on IL-1 β -induced GnT-III and V in Melanoma B-16. *J Kor Orient Oncol*. 1999 ; 5(1) : 103-18.
 20. Lee CK, Seo JJ. Antimicrobial Activity of Whangkumtang Extract and *Scutellariae Radix* Extract on the Food-Borne Pathogens. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 2005 ; 34(10) : 1606-10.
 21. Kim YH, Park YS. Effect of *Scutellaria baicalensis* Water Extract on Antioxidative Activity and Epidermal Thickness in DNCB-induced Allergic Contact Dermatitis Animal Model. *J Kor Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(5) : 543-8.
 22. Ro HS, Ko WK, Kim OJ, Park KK, Cho YW, Park HS. Antihyperlipidemic Activity of *Scutellaria baicalensis* Georg., *Coptidis japonica* Makino and *Rhei koreanum* Nakai on Experimental Hyperlipidemia in Rats. *J Pharm Invest*. 1996 ; 26(3) : 36-48.
 23. Park SN, Hong JH, Park MK. Biological Protective Effect of Component from *Scutellaria baicalensis* Georgi against Active Oxygen Induced-Tissue Damage. *Seoul Nat Univ Sci Technol Res Bull*. 1997 ; 45 : 35-49.
 24. Lee SH, Lim BO, Choue RW. Immunoregulatory Effects of Water Extracts of *Scutellariae Radix* in DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease Animal Model. *Korean J Nutr*. 2004 ; 37(6) : 431-9.
 25. Yoo HH, Park JH, Kwon SW. In vitro cytotoxic activity of some Korean medicinal plants on human cancer cell lines: enhancement in cytotoxicity by heat processing. *Phytother Res*. 2007 ; 21(9) : 900-3.
 26. Wang CZ, Aung HH, Zhang B, Sun S, Li XL, He H, Xie JT, He TC, Du W, Yuan CS. Chemopreventive effects of heat-processed *Panax quinquefolius* root on human breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2008 ; 28(5A) : 2545-51.
 27. Kang KS, Ham J, Kim YJ, Park JH, Cho EJ, Yamabe N. Heat-processed *Panax ginseng* and diabetic renal damage: active components and action mechanism. *J Ginseng Res*. 2013 ; 37(4) : 379-88.
 28. Shin YO, Park CH, Lee GH, Yokozawa T, Roh SS, Rhee MH. Heat-Processed *Scutellariae Radix* Enhances Anti-Inflammatory Effect against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice via NF- κ B Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015 ; 2015 : 456846.
 29. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992 ; 13 : 637-48.
 30. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*. 1993 ; 214(1) : 11-6.
 31. MedlinePlus. Enteritis. Retrieved June, 19, 2015, from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001149.htm>
 32. Feng AW, Yu C, Mao Q, Li N, Li QR, Li JS. Berberine hydrochloride attenuates cyclooxygenase-2 expression in rat small intestinal mucosa during acute endotoxemia. *Fitoterapia*. 2011 ; 82(7) : 976-82.
 33. Thomson A, Hemphill D, Jeejeebhoy KN. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Dig Dis*. 1998 ; 16(3) : 152-8.
 34. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial

- cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 ; 280(4) : C719-41.
35. Muluye RA, Bian Y, Alemu PN. Anti-inflammatory and Antimicrobial Effects of Heat-Clearing Chinese Herbs: A Current Review. *J Tradit Complement Med*. 2014 ; 4(2) : 93-8.
36. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta*. 1999 ; 1472(3) : 643-50.
37. Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev*. 2009 ; 35(1) : 57-68.
38. Li HM, Wang YY, Wang HD, Cao WJ, Yu XH, Lu DX, Qi RB, Hu CF, Yan YX. Berberine protects against lipopolysaccharide-induced intestinal injury in mice via alpha 2 adrenoceptor-independent mechanisms. *Acta Pharmacol Sin*. 2011 ; 32(11) : 1364-72.
39. Speyer CL, Neff TA, Warner RL, Guo RF, Sarma JV, Riedemann NC, Murphy ME, Murphy HS, Ward PA. Regulatory effects of iNOS on acute lung inflammatory responses in mice. *Am J Pathol*. 2003 ; 163(6) : 2319-28.
40. Pall ML. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO⁻ cycle. *Med Hypotheses*. 2007 ; 69(4) : 821-5.
41. Wu W, Wan X, Shah F, Fahad S, Huang J. The role of antioxidant enzymes in adaptive responses to sheath blight infestation under different fertilization rates and hill densities. *ScientificWorldJournal*. 2014 ; 2014 : 502134.
42. Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, Gjorgoski I, Jankulovski N. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidation in senescent rat erythrocytes. *Physiol Res*. 2015. [Epub ahead of print].
43. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol*. 2000 ; 164(12) : 6509-19.
44. Lee S, Shin S, Kim H, Han S, Kim K, Kwon J, Kwak JH, Lee CK, Ha NJ, Yim D, Kim K. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-kappa B pathways. *J Inflamm (Lond)*. 2011 ; 8(1) : 16
45. Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC, Grimm EA. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res*. 2000 ; 6(12) : 4768-75.
46. Jia L, Liu J, Song Z, Pan X, Chen L, Cui X, Wang M. Berberine suppresses amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia by inhibiting nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *J Pharm Pharmacol*. 2012 ; 64(10) : 1510-21.
47. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol*. 2013 ; 2013 : 678159.
48. Yoon YD, Kang JS, Han SB, Park SK, Lee HS, Kang JS, Kim HM. Activation of mitogen-activated protein kinases and AP-1 by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* in RAW 264.7 cells. *Int Immunopharmacol*. 2004 ; 4(12) : 1477-87.
49. Macián F, López-Rodríguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*. 2001 ; 20(19) : 2476-89.
50. Jang S, Kelley KW, Johnson RW. Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27 ; 105(21) : 7534-9.