당귀 추출물의 궤양성 대장염 억제 효과에 대한 연구

남해인 · 백태현*

상지대학교 한의과대학 내과학교실

Inhibitory Effects of *Angelica gigas* Nakai on Ulcerative Colitis in DSS-induced ICR Mice

Hae In Nam, Tae Hyun Baik*

Department of internal Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University

The purpose of this study was to examine the effects of *Angelica gigas* Nakai on ulcerative colitis. Mice were divided into 5 groups: Control group, DSS group, 5-ASA group, 50mg/kg *Angelica gigas* Nakai group, 100mg/kg *Angelica gigas* Nakai group. Four groups, excluding the control group, were fed a 5% solution of dextran sulfate sodium(DSS) in water for 7days to induce ulcerative colitis. Each water extract was administrated orally for 7 days in 5-ASA group, 50mg/kg *Angelica gigas* Nakai group and 100mg/kg *Angelica gigas* Nakai group. 5 groups were evaluated by weight, length of intestine, weight of spleen, disease activity index(DAI), amount of cytokine IL-6 production, thickness of bowel wall and degree of inflammatory cell infiltration and intestinal tissue damage. Comparing to DSS group, 100 mg/kg *Angelica gigas* Nakai group showed significant suppressive effect of weight loss until 4th day of experiment while 50 mg/kg *Angelica gigas* Nakai group showed no significant effect of suppression. Decrease of intestinal length, enlargement of spleen, intestinal tissue damage and thickening of bowel wall were significantly suppressed in both 50 mg/kg and 100mg/kg *Angelica gigas* Nakai group. Also disease activity and cytokine IL-6 production were inhibited significantly. Based on this result, Angelica gigas Nakai seemed to have anti-inflammatory effect and also seemed to suppress histological changes and aggravation of ulcerative colitis.

keywords : *Angelica gigas* Nakai, Ulcerative colitis, DSS(Dxtran Sulfate Sodium), Cytokine

서 론

염증성 장질환 (Inflammatory bowel disease, IBD)은 장에 발생하는 만성 염증을 말한다. 염증성 장질환의 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나 자가 면역성, 감염성, 환경적, 유전적 요인 등으로 추정되고 있으며, 염증성 장질환은 크게 궤양성 대장염 (ulcerative colitis, UC)과 크론병(crohn's disease, CD)으로 나뉜다[1].

염증성 장질환은 설사, 발열, 체중감소의 증상을 공통적으로 보이는데, 그 중 궤양성 대장염은 혈액성 설사, 복통이 주된 증상을 보인다. 심할 경우 수차례의 출혈을 동반한 변, 체중감소, 빈혈, 탈수증상을 보이게 된다. 또한 오랜 기간이 경과하게 되면, 염증성 궤양이 생기고 대장의 위축이 일어나 그 길이가 짧아지고 형태적 상실이 일어난다[2].

궤양성 대장염은 명확한 원인, 병태생리, 치료방법이 밝혀지지 않았기 때문에, 근본적 약물요법을 통한 치료가 어려운 상태이므로, 현재 대증요법을 사용한 치료방법, 보조적 약물의 사용, 면역억제제의 사용으로 그 치료를 대신하고 있다. 현재 주로 사용되는 약물은 5-aminosalicylate(5-ASA), sulfasalazine으로 병세의 유지, 호전을 목적으로 사용하고 있다[3,4].

이러한 궤양성 대장염은 한의학에서는 주로 腸澼, 便血, 休息痢, 久痢, 泄瀉, 久瀉 등의 범주로 보고 치료한다[5]. 당귀는 산형과에 속한 다년생 방향성 초본으로 높이 1~2m에 전체에 자줏빛이 도는 참당귀(*Angelica gigias* Nakai)의 뿌리를 건조시킨 것으로, 「東醫寶鑑」草部門에서 '여라 가지 나쁜 瘡瘍과 쇠붙이에 다쳐서 어혈이 속에 뭉친 것을 낫게 하고 이질로 배가 아픈 것을 멎게 하며 五臟을 보하여 肌肉이 살아나게 한다... 어혈을 제거하고자 할 때는 머리를 쓰고 출혈을 멈추게 할때는 꼬리를 사용하며 전체를 사용하면 한편으로는 어혈을 제거하면서 한편으로는 지혈하니 곧 피를 고르게(和血)하게 된다.'라 하여 補血 및 和血의 要藥이 된다 하였다[7].

이러한 당귀의 효능을 바탕으로 많은 연구가 진행된 바 있는데, 대표적으로 당귀의 적혈구 응집 억제[8], 동맥경화 억제[9]에 대한

* Corresponding author

Tae Hyun Baik, Korean Medicine Hospital of Sangji University, 80, Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do, Republic of Korea

·E-mail : White@sangji.ac.kr ·Tel : +82-33-732-2111

·Received : 2016/09/26 ·Revised : 2016/11/04 ·Accepted : 2016/11/18

ⓒ The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.12.30.6.439

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

연구가 진행 된 바 있으며 당귀의 진통, 항염증 효과와 관련해서는 carrageenin로 유도한 부종을 당귀의 성분 중 하나인 ferulic acid가 억제함을 확인 할 수 있었고, actic acid로 유도한 모세혈관 투과성의 증대 역시 당귀에 의해 억제됨을 확인하였으며[10], 염증매개물질에 대한 당귀 에탄올 추출물의 억제 효과에 관한 연구에서도 유의한 효과를 나타내었다[11].

이러한 연구를 토대로 본 저자는 당귀가 궤양성 대장염에 효과가 있을 것으로 사료되어, ICR mice에 Dextran Sulfate Sodium (DSS)를 사용하여 유도한 염증성 대장 질환 모델에서 당귀추출물을 투여한 후 대장염 유도 마우스의 체중 및 대장 길이 변화, 비장비대, 대장염에 대한 질병활성도(Disease activity index, DAI), 사이토카인, 대장조직의 손상 및 염증 정도를 측정함으로써 당귀 추출물의 항대장염 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

대장염 유도 약물인 Dextran Sulfate Sodium (DSS)는 MPbio (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA)에서 구입하였다. 5-ASA (5-Aminosalicylate)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. mouse IL-6 ELISA Set는 BD OptEIA™ (BD Sciences, New Jersey, USA)에서 구입하였다. 사료는 Research Diets (New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였다.

2. 당귀 추출물

당귀는 참당귀를 경북 봉화군 춘양에서 재배한 것을 온누리생약 (Seoul, Repulic of Korea)을 통해 구매하였다. 3000㏄ 용량의 물에 당귀 80g을 넣고 약탕기에 2시간 20분 동안 탕전하여 960㏄의 용량으로 추출하였다. 당귀 추출물은 Rotary vaccum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)을 사용하여 농축하였다. 농축시료는 Freeze Dryer FDU-1200 (EYELA, Tokyo, Japan)을 사용하여 동결 건조하였고, 실험에 사용하기 전까지 -80℃의 deep freezer에 보관하였다.

3. 실험 동물

6주령 ICR 수컷 마우스를 ㈜ 라온 바이오 링크 (Yonginsi, Republic of Korea)에서 분양받았다. 동물사육실의 환경은 20 ± 5℃, 상대습도 55 ± 10%, 명암 12시간 주기로 유지하였다. 사육하는 기간 동안 물, 사료는 자유식으로 공급되었고, 한주간의 순화기간 뒤 마우스를 각 처리군당 10마리씩 5군 (일반, 대장염 유발군, 5-ASA 투여군, 당귀추출물 50㎎/㎏, 100㎎/㎏를 투여한 군)으로 무작위로 나누었다. 당귀추출물은 증류수에 녹여 제조한 후 7일 동안 매일 대장염 유도 마우스에 경구투여 하였다. DSS 섭취량은 하루에 한 마리의 마우스 당 5ml 섭취량을 기준으로 하여 급수하였다. 실험이 끝나는 마지막 전날 마우스를 절식시키고, 다음날 마취시킨 뒤 대장을 분리하여 즉시 길이를 측정한 다음 급속 냉동하여 -80℃의 냉동실에 보관하였다. 비장 역시 즉시 채취하여 무게 측정을 진행하였다. 본 동물실험은 실험동물 윤리 위원회의 가이드라인과 상지대학교 동물실험 지침서에 따라 진행되었다.

4. 질병활성도 측정 (Disease activity index, DAI)

각 군별 마우스의 체중 변화, 혈변의 정도, 변의 묽기를 매일 측정하였다. 질병 활성도 (Disease activity index, DAI)는 (1) 체중의 감소, (2) 혈변, (3) 묽은 변의 정도를 각각 수치화하고 이를 합산하여 나타내었다[12]. 수치화는 아래 Table 1을 기준으로 적용하였다.

Table 1. Evaluation of Disease activity index

DAI score	Weight loss(%)	Stool consistency	Gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5		
2	5-10	Loose stools	Hemoccult posive
3	10-20		
4	>20	Diarrhea	Gross bleeding

5. 사이토카인 측정

마우스의 대장 조직을 분리하여 그 일부를 잘라 PBS로 세척 후, 10% FBS가 들어간 DMEM 배지에 넣고 24시간 배양한 후 조직을 제외한 상층액을 채취하여 즉시 -80℃의 냉동실에 보관하였다. 염증성 매개인자인 IL-6 사이토카인을 측정하기 위해, 효소면역분석법 (EIA, Enzyme immunoasssay)을 진행하였고, 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 파장 값 540㎚에서 각 샘플의 파장값을 측정한 후 IL-6 사이토카인 생성량을 측정하였다.

6. 조직학적 분석

마우스의 대장조직을 10% formalin을 사용하여 보존하고, “Swiss rolled” 방법을 사용하여 5μM parafin으로 고정 및 박편하였다. 박편한 조직을 슬라이드에 옮긴 후 Hematoxylin and eosin(H&E) staining법으로 염색하여 조직의 세포질과 핵을 구별하였고, 이를 SZX10 현미경 (올림푸스, 서울, 대한민국)을 사용하여 장조직의 염증세포 분포와 상피세포를 조직학적 관찰, 촬영 하였다.

7. 대장염 수치화 분석

각 군의 장 조직에 발생한 염증을 수치화하여 분석하기 위하여 기준 점수표를 적용하였다. 점막에서 정상상피세포는 0점, 늘어진 상피세포는 1점, 세포 장벽의 붕괴는 2점, 궤양의 발생과 동시에 30%<장벽의 붕괴정도<60%일 때는 3점, 궤양의 발생과 동시에 장벽의 붕괴가 60%이상 관찰 될 때에는 4점을 적용하였고, 점막 염증세포에서 침윤의 정도가 보통일 때 1점, 중간정도의 수치일 때 2점, 심할 때 3점을 적용하였다. 점막하 조직에서 역시 염증세포에서 침윤의 정도가 보통일 때 1, 중간정도의 수치일 때 2, 심할 때 3점을 적용하여 전체 점수를 합산하여 통계 처리하였다.

8. 통계방법

실험에서 얻은 모든 결과는 one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett’s test를 사용하여 통계 처리하였고, mean ±S.E.로 나타내었다. 분석 결과 간 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 GraphPad Prism (version 5)을 사용하여 검정하였다.

결 과

1. DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 체중변화에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스의 체중의 변화를 측정하여 (Fig. 1A) 체중 변화율을 그래프로 나타내었다(Fig. 1B). Control군은 첫 날 대비 6일 째 3.99%의 체중 증가율을 보였다. 대장염유도 6일째 DSS군은 첫날 대비 4.68%의 체중 감소율을 보이는데 반해, 양성 대조군인 5-ASA 투여군은 첫날 대비 6일 째, 2.33%의 체중 감소율을 보이며, 유의성 있는 결과로 약물 투여에 의해 체중 감소가 억제됨을 나타내었다. 당귀 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군은 첫 날 대비 6일째 2.83%의 체중 감소율을 보였으나 유의성 있는 체중 감소의 억제효과를 보이지는 못했다. 당귀 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군은 대장염 유도 4일까지 유의성 있는 체중 감소의 억제를 보였으나, 대장염 유도 6일째에는 DSS군과 비슷한 체중 감소의 경향을 보였고, 첫 날 대비 5.06%의 체중 감소율을 보였다.

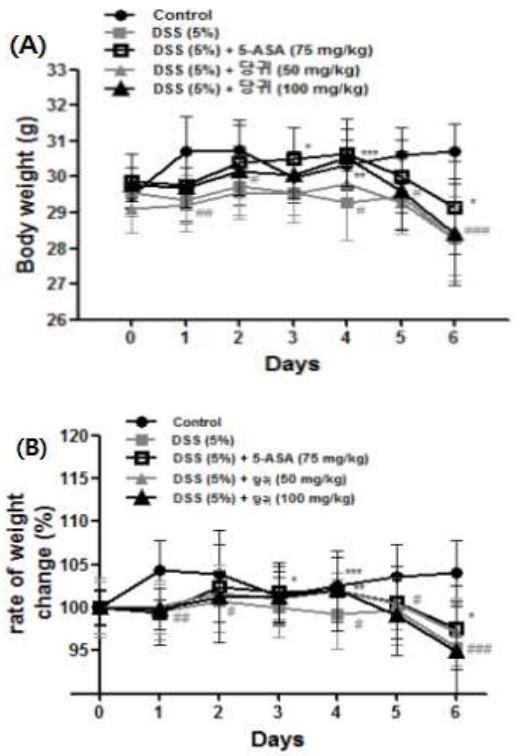

Fig. 1. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on body weight in DSS-induced mice. (A) Body weight was checked every days. (B) Rate of weight change was estimated. Mice were administered 5% DSS in drinking water (ad libitum) for 7 days with or without *Angelica gigas* Nakai extract (50, 100 ㎎/㎏/day p.o. up to 7 days). 5-ASA (75 ㎎/㎏/day p.o. up to 7days) was used as a positive control. The values are represented as mean ± SEM (n = 10). # : P < 0.05, ##: P < 0.01, ###: P < 0.001 compared to Control; *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001 compared to DSS.

2. DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 대장의 길이변화에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 대장의 길이 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스를 희생시킨 직후 대장 조직을 분리하여 장의 길이를 측정한 후 각 군별로 비교하였다 (Fig. 2). 대장염을 유도한 DSS군의 장의 길이는 4.84 cm으로 Control군의 장의 길이 8.04 cm에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며, 59.62%의 감소율을 나타내었다. 5-ASA군의 대장의 길이는 5.8 cm로 대장염 발생에 따른 길이의 감소가 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다. 당귀 추출물 50 ㎎/㎏ 투여군의 대장 길이는 6.05 cm, 당귀 추출물 100 ㎎/㎏ 투여군의 대장 길이는 5.82 cm로 DSS군 대비 대장 길이의 감소가 각 각 25.09%, 20.38% 억제됨으로써, 당귀 추출물의 투여에 의해 대장 길이의 감소가 유의성 있게 억제됨을 확인할 수 있었다.

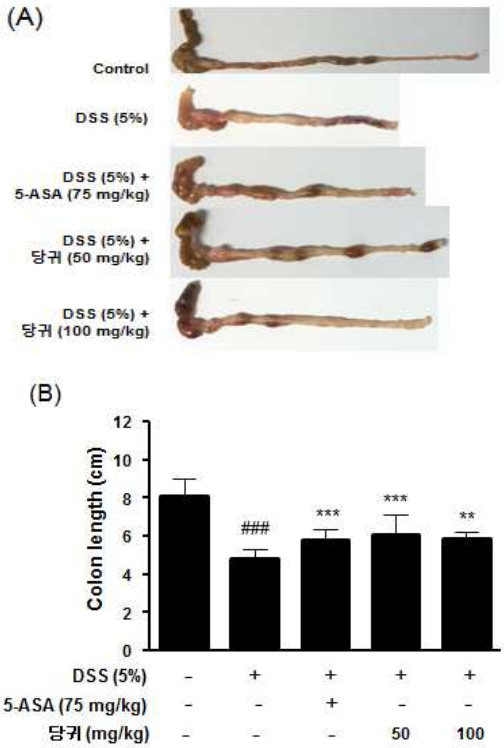

Fig. 2. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on colon length in DSS-induced mice. (A) Colons were obtained after 7 days of DSS administration. An overview of representative results is provided. (B) Colon lengths were measured. The values are represented as mean ± SEM (n = 10). ###: P < 0.001 compared to Control; **: P < 0.01, ***: P < 0.001 compared to DSS.

3. 당귀 추출물이 DSS로 유도한 대장염 마우스의 비장 비대에 미치는 영향

대장 염증 질환에서 비장의 무게는 장기에 일어난 염증을 판단하는 주요 마커가 되기 때문에 DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 비장의 무게변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 비장 조직을 분리한 후 비장 무게를 측정하여 그 무게를 비교하였다(Fig. 3). 대장염을 유도한 DSS 군의 비장 무게는 0.13 g으로 Control 군의 비장 무게 0.10 g에 비해 유의적으로 비장 무게가 증가함을 나타냈으며, 29.82%의 증가율을 나타내었다. 5-ASA군의 비장 무게는 0.10 g으로 DSS군 대비 비장의 비대가 유의성 있게

억제됨을 확인하였고, 21.14%의 억제율을 나타내었다. 당귀추출물 50 ㎎/㎏ 투여군의 비장의 무게는 0.10 g, 당귀추출물 100 ㎎/㎏ 투여군의 비장의 무게는 0.104 g으로 각 각 20.47%, 17.36%의 억제율을 보이며 유의성 있는 결과를 나타내었다.

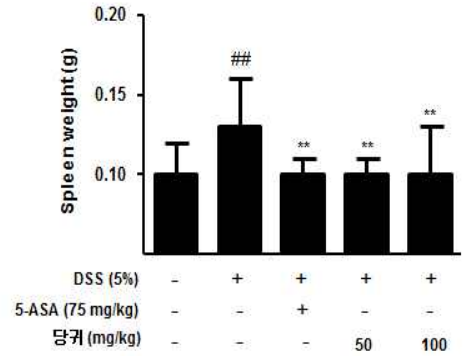

Fig. 3. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on spleen weight in DSS-induced mice. Sacrificed mice spleens were measured and recorded. Mice were administered 5% DSS in drinking water (ad libitum) for 7 days with or without (50, 100 ㎎/㎏/day p.o. up to 7 days). 5-ASA (75 ㎎/㎏ /day p.o. up to 7 days) was used as a positive control. On day 7, mice were Values are the mean ± S.D. of three independent experiments. ##: P < 0.01 compared to control group; **: P < 0.01 compared to the DSS-induced colitis group; significances between treated groups were determined using ANOVA and Dunnett's post hoc test.

4. DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 질병활성도 (Disease activity index)에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 질병활성도 (Disease activity index, DAI)에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 매일 대변의 묽기, 혈변의 관찰 및 체중의 증감을 측정하여 질병활성도의 경향을 측정하였다(Fig. 4). Control에 비해 대장염을 유도한 DSS군에서 시간경과에 따른 질병활성도가 유의적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 양성대조군인 5-ASA군은 DSS군에 비해 유의적으로 낮은 질병활성도를 나타내었고, 당귀 추출물당귀추출물 50 ㎎/㎏ 투여군과 당귀 추출물 100㎎/㎏ 투여군은 농도 의존적으로 DSS군에 비해 유의적으로 낮은 질병활성도를 나타내는 것으로 확인되었다.

5. DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 사이토카인 IL-6 생성에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스의 대장 조직에서 사이토카인의 생성량에 대한 당귀추출물의 억제효과를 확인하기 위하여, 효소면역분석법(Enzyme immunoassay, EIA)을 이용하여 IL-6 사이토카인 생성량을 측정하였다. DSS군의 IL-6 사이토카인의 생성량은 1,043.02 pg/ml로 Control군의 IL-6 사이토카인 생성량인 173.55 pg/ml 대비 6.01배의 유의성 있는 증가율을 보였다. 5-ASA군의 IL-6 사이토카인 생성량은 857.5 pg/ml으로 DSS군 대비 17.78%의 억제율을 보였다. 당귀추출물 50 ㎎/㎏ 투여군의 IL-6 사이토카인 생성량은 563.23 pg/ml, 당귀추출물 100 ㎎/㎏ 투여군의 IL-6 사이토카인 생성량은 509.55 pg/ml으로 각각 45.99%, 51.14%의 유의성 있는 억제율을 보였다.

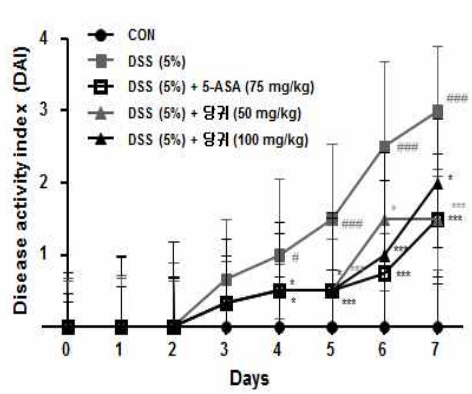

Fig. 4. Evaluation of disease activity index (DAI) in DSS-induced mice. Changes in disease activity index were evaluated daily throughout the 7-day experimental period. Values are the mean ± S.D. of three independent experiments. #: P < 0.05, ###: P < 0.001 compared to the control group; *: P < 0.05, ***: P < 0.001 compared to the DSS-induced colitis group; significances between treated groups were determined using ANOVA and Dunnett's post hoc test.

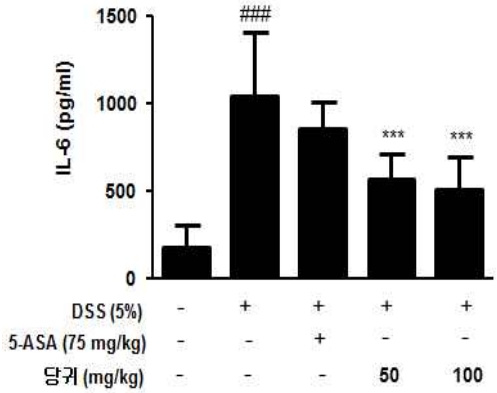

Fig. 5. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on DSS-induced IL-6 prod-uction. The productions of IL-6 were determined using EIA kits. Control values were obtained in the absence of DSS. The data presented are the means ± S.D. of three independent experiments. ###: P < 0.05 compared to control group; *: P < 0.05, ***: P < 0.001 compared to the DSS-induced colitis group; significances between treated groups were determined using ANOVA and Dunnett's post hoc test.

6. DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 손상된 대장조직에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스에서 당귀 추출물이 대장조직 회복에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대장조직을 H&E 염색하여 현미경을 사용하여 X20, X40, X100 배율로 관찰한 후 조직의 병변에 대하여 분석하였다(Fig. 6A). 육안상 DSS 군에서 Control군 대비 장벽 근육층의 두께가 확연히 두꺼워짐을 확인할 수 있었고, 5-ASA군에서는 장벽 근육층의 두께가 다시 얇아짐을 확인 할 수 있었다. 이를 수치화하기 위하여 각 군의 조직에서 다섯 부분을 임의 추출하여 장벽 근육층의 두께를 측정하였고, 그 수치를 통계 처리하였다(Fig. 6B). DSS군의 장벽 근육층의 두께는 Control군에 비해 1.57배 유의적으로 증가하였고, 증가된 장벽 근육층의 두께는 5-ASA 투여에 의해 유의적으로 감소하였다. 당귀추출물 역시 5-ASA와 마찬가지로 DSS에 의해 유도된 장벽 근육층의 두께 증가를 Control군 수준으로 회복시키는 것으로 확인되었다.

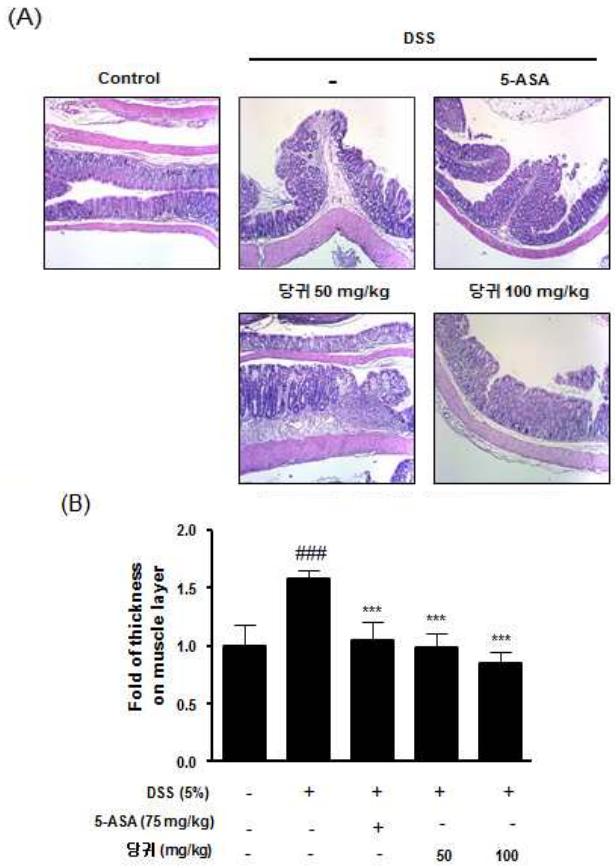

Fig. 6. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on colorectal histology in mice with DSS-induced colitis. (A) Representative portion of colon tissues from mice administered 5% DSS in drinking water for 7 days with or without *Angelica gigas* Nakai extract (50, 100 ㎎/kg/day p.o.). (B) Muscle thicknesses of colon sections from control , DSS-treated mice, and 5-ASA, *Angelica gigas* Nakai extract mice were evaluated. tissues by staining H&E is examined by microscope. Magnification x 100 inset.

7. DSS로 유도한 대장염 마우스의 염증 분석에 당귀 추출물이 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 마우스의 염증 분석에 당귀 추출물이 미치는 영향을 측정하기 위하여, 마우스 대장 조직을 H&E 염색한 후, 조직에 나타난 염증을 기준 점수표를 이용하여 측정하였다 (Fig. 7). Control군은 정상 상피세포로 구성되어있고 부분적으로 염증세포에서 약간의 침윤을 관찰 할 수 있었으나(total score 3), DSS군은 점막 조직과 점막하 조직에서 전반적으로 염증세포의 심한 침윤을 볼 수 있었고, 점막 조직의 상피세포에서 주로 장벽의 붕괴와 궤양이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(total score 8). 이에 반해 양성대조군인 5-ASA 투여군은 점막 조직에서 상피세포막의 붕괴가 회복되고, 염증 세포의 침윤이 줄어드는 것을 관찰할 수 있었고, 점막하 조직 역시 염증 세포의 침윤이 억제됨을 확인할 수 있었으나 유의한 억제 효과가 나타나지는 않았다(total score 7). 당귀 추출물 투여군 (50, 100 ㎎/㎏) 역시 5-ASA 투여군과 마찬가지로 점막 및 점막하 조직 상피세포 막의 붕괴가 회복되었고, 염증세포의 침윤이 유의적으로 감소된 것을 확인함으로써 (total score 5, 6), 당귀 추출물에 의해 대장내 염증의 생성이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다.

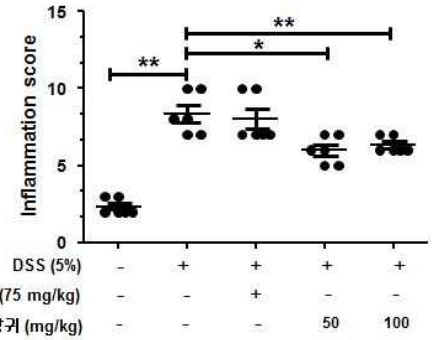

Fig. 7. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on Inflammation score in DSS-induced chronic inflammatory tissues. Grading scale used to evaluate Inflammation score. Inflammation was scored using a scale of 0 (normal epithelial cell), +1 (Prolonged epithelial cell) +2 (Destruction of barrier), +3 (Ulcer plus 30%< barrier loss <60%), and +4 (Ulcer plus barrier loss > 60%) in epithelial cell, +1 (mild Infiltration), +2 (moderate Infiltration), +3 (severe Infiltration) in Immune cell.

고 찰

궤양성 대장염은 대표적 염증성 대장 질환으로 장, 대장 점막 조직의 손상에 따른 만성 위장관 질환이다. 이러한 점막 조직의 손상은 세포와 호르몬상에서의 면역반응의 이상, 그에 따른 장 점막 박테리아에 대한 비정상적 반응에 따른 것이라 추정된다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 이어 점막하 조직까지 염증성 궤양이 생겨, 병변은 주로 직장에 생기나 대장과 소장의 접합부인 회장에도 발생한다. 병변이 소화관 전벽에 발생하는 크론병과 비교해 궤양성 대장염은 특이적으로 소화관 중 대장에만 국한되어 그 영향을 미친다. 궤양성 대장염은 여태껏 서구사회에서 빈번하게 발생되던 질병으로 아시아, 아프리카 등지에서는 드물게 발생되어 왔다. 그러나 우리나라도 식습관이 서구화됨에 따라 염증성 대장염 발병률이 증가하는 추세를 보이고 있다[13,14].

최근, 염증성 대장염에 대한 치료제로 5-ASA, Corticosteroid, 6-mercaptopurine과 같은 면역억제제가 가장 많이 사용되고 있다. 5-ASA는 Mesalazine, Mesalamine이라고도 불리는데, 경구 투여로 섭취되어지며 현재 많은 제네릭 의약품으로도 판매되는 상태이다. 그러나 5-ASA는 주로 위장관 장애, 두통을 일으키는 부작용을 가지고 있다. 이러한 약물의 장기적 부작용은 삶의 질 저하와 직접적인 관련이 있기 때문에, 염증성 대장염을 치료할 수 있는, 최적의 치료법이 필요한 실정이다[13].

염증성 대장염의 주 증상은 복통, 묽은 변, 혈변으로 더 나아가 체중 감소, 빈혈, 탈수증상을 보이게 된다. 또한 직장에서부터 대장까지의 염증의 파급으로 궤양의 생성, 점막의 출혈, 부종이 나타난다. 염증이 있는 상태로 오랜 기간이 경과하게 되면, 염증성 궤양이 생기고 그와 더불어 대장의 위축이 일어나 그 길이가 짧아지고 형태적 상실이 일어난다[13]. 이들 질환의 병리학적 원인은 불분명한데, 환경적, 유전적, 면역관련 인자들 사이의 불균형이 주원인이라 생각된다. 그 중에서도 TNF-alpha, IL-6, IL-1, IFN-γ 와 같은 사이토카인, 활성 산소 대사체, 프로스타글란딘의 불균형이 면역의 항상성을 저해하는 중요 역할을 한다고 밝혀진바 있다. 염

증성 사이토카인은 염증을 유도하는 단백질로써 면역 관련 세포를 염증 부위로 모여들게 하는 역할을 한다. 염증성 사이토카인으로 Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), interleukine (IL)-6, IL-1β 등의 인자들을 들 수 있는데, 특히 TNF-α, IL-6의 경우 염증 반응 관련 실험에서 대표적 발현인자로써 사용되고 있다[6].

궤양성 대장염은 한의학에서는 주로 腸澼, 便血, 休息痢, 久痢, 泄瀉, 久瀉등의 범주로 보고 치료하는데, 病程이 길며 임상적으로 本虛標實인 경우가 대부분이다. 초기에는 氣滯腹痛이 발생하며 대장점막의 손상으로 瀑熱과 瘀血이 생성되지만, 病程이 길어지면 후기에는 血이 소모되고 泄瀉가 지속되어 빈혈, 탈수 등의 虛證 상태가 동반되는 경우가 많다[5].

당귀는 性은 溫하고 味는 甘辛하며 溫性은 通氣하게 하여 行氣止痛 하며, 血을 藏하는 肝, 血을 主하는 心, 血을 統攝하는 脾, 즉 心肝脾 三經에 작용하여, 補血 및 和血 의 要藥이 된다. 이와 같은 효능으로 당귀는 氣滯, 血瘀, 血虛를 막론하고 모두 활용이 가능한 본초로 破血, 止血하는 중에 補血하여 血을 조화롭게 해 血病의 主藥이 된다[14]. 당귀의 이러한 효능으로「東醫寶鑑」의 腸澼이나 痢疾등의 질환에서 당귀가 다용된 것을 볼 수 있는데,「東醫寶鑑」後陰門에서 腸澼에 치료에 사용되는 黃連湯, 凉血地黃湯, 當歸和血散등의 처방에 당귀가 사용되어 腸澼으로 인한 熱毒便血 증상에 활용되었고[17], 「東醫寶鑑」大便門에서도 痢疾의 裏急後重에 '기가 돌고 혈이 조화로와 積이 작아졌는데 그저 앉아서 힘만 주게 되는 것은 혈이 허탈(亡血)되어 생기는 증후이니 이런 때에는 당귀와 당귀의 잔뿌리를 배로하고 … 혈이 허하면 배속이 당기니 당귀를 쓴다'라 하여 당귀의 和血효능이 활용된 것을 볼 수 있다[18].

DSS로 유도한 대장염 동물모델은 염증성 대장염의 가장 대표적인 동물 모델로 혈변, 묽은 변, 비장의 비대, 체중의 감소, 대장 길이의 감소와 같은 궤양성 대장염 질환을 가진 환자가 보이는 증세를 상응하게 보여준다[20,21]. DSS에 의해 염증반응이 발생하고 지속되는 기전은 아직까지 불분명하지만, DSS로 유도한 대장염에 대한 예상 가능 기전 몇 가지가 제시되고 있다. 첫 번째로, 대장 상피세포의 직접적 손상, 두 번째로 장내 세균의 변화에 따른 간접적 손상, 세 번째로 장 상피 세포에 대한 림프구의 부착이 과도하게 진행된 경우, 네 번째로 T 세포와 대식세포의 활성화를 들 수 있다[22-24]. 이러한 가능성을 토대로 DSS 유도 모델의 질병 개시 단계는 대장의 상피세포에서 일어난다고 제시할 수 있는데, 이들은 염증성 대장염 환자에게도 볼 수 있는 단계로, 이는 DSS에 의한 대장염 유발 실험의 타당성을 뒷받침하는 부분이다.

본 실험에서는 24시간동안 DSS를 자유 급식하며 대장염을 유도하는 동안, 당귀 추출물을 하루에 한 번 경구 투여하는 방식으로 약물 투여를 진행하였고, 실험이 진행되는 일주일에 거쳐 매일 DSS에 의한 대장염의 유발 및 당귀 추출물에 의한 개선 증세를 보기 위하여 체중 측정, 변의 묽기, 혈변의 유무를 측정하였고, 실험종료 후 마우스의 대장조직을 분리하여 장의 길이, 장조직의 형태학적인 변화, 장조직의 염증화 및 사이토카인 생성량을 측정하였다.

DSS로 유도한 대장염 마우스의 체중의 변화를 측정한 결과 (Fig. 1) DSS군은 Control에 비해 유의적인 체중의 감소를 보였고, 양성대조군인 5-ASA 투여에 따라 체중 감소의 억제를 확인 할 수 있었다. 또한 당귀 추출물의 경우 당귀 추출물 50㎎/㎏ 투여군에서는 체중 감소율에 억제효과가 있었지만 유의한 결과 값을 얻을 수 없었고, 100㎎/㎏ 투여군에서 실험기간 4일째까지는 유의한 체중 감소의 억제 효과를 관찰 할 수 있었으나, 실험 6일째에는 DSS군과 비슷한 체중 감소 경향을 보였다. DSS로 유도한 대장염 마우스의 대장 길이와 비장 무게변화를 측정한 결과, 당귀 추출물 투여군은 5-ASA 투여군과 마찬가지로 대장 길이가 유의성 있게 증가하였고(Fig. 2), DSS투여로 유도된 비장의 비대가 유의적으로 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 또한 DSS로 유도한 대장염 마우스의 혈변의 정도와 변의 묽기 정도를 합산하여 질병활성도를 수치화한 결과, DSS군에서는 시간에 따라 질병활성도가 증가하여 병변의 악화를 관찰할 수 있었고, 5-ASA 투여군과 당귀 추출물 투여군에서 질병활성도가 DSS군에 유의적으로 낮아지는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 이러한 결과를 토대로, DSS 투여시간에 따른 체중의 감소, 묽은 변, 혈변, 장 길이의 감소 및 비장의 비대 증상이 당귀 추출물에 의해 완화됨을 제시할 수 있다.

과도한 염증증세는 사이토카인의 과생성과도 상관관계를 이루는 것으로 흔히 알려져 있는데, 이들 사이토카인 중 TNF-α, IL-6, IFN-γ 인자는 궤양성 대장염 질환의 진행과정에서 대장의 손상에 관여한다고 밝혀진 바 있다. 더불어 이들 염증 관련 사이토카인의 생성량 증가는 궤양성 대장염을 앓고 있는 환자뿐만 아니라, DSS로 유도한 대장염 mice에서도 확인 할 수 있다[20]. 본 실험에서는 궤양성 대장염에서의 대표적으로 과 생성되는 전 염증 사이토카인인 IL-6을 효소면역측정법 (Enzyme Immunoassay)을 이용해 측정하였다. DSS투여군은 Control군에 비해 사이토카인 IL-6 생성량이 유의적으로 증가하였다. 그러나 당귀추출물 투여군은 증가된 IL-6 생성을 유의적으로 감소시켰고, 이는 양성 대조군인 5-ASA 투여군이 감소시킨 IL-6 생성량보다 유의성이 더 큰 것으로 나타났다(Fig. 5).

궤양성 대장염은 염증 혹은 궤양이 직장에서 시작하여 연속적으로 근위부로 진행하는 병변을 보인다. 또한 대장염이 유발된 장조직을 조직학적 분석으로 살펴보면, 직장 부위에서 염증 세포의 활성화, 침윤, 상피세포에서의 궤양생성 및 장벽의 비대를 확인할 수 있다. 본 연구에서 DSS로 유도된 대장염 동물모델의 장조직을 조직학적 분석한 결과, Control군과 비교하여 DSS군은 장벽 근육층의 두께가 확연히 두꺼워지고 직장부위에서 궤양성 염증의 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나 당귀 추출물 투여군은 장벽 근육층의 두께가 회복될 뿐만 아니라, 상피세포의 침윤, 염증세포의 궤양화 및 막의 붕괴가 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 그러므로 본 실험에서 DSS로 유도한 대장염 동물모델의 대장염 병변의 관찰, 염증성 사이토카인 생성량의 측정 및 염증성 대장의 조직학적 분석 결과를 취합한 결과, 당귀 추출물은 현재 임상에서 사용 중인 항염증 약제인 5-ASA와 마찬가지로 대장염의 완화 혹은 대장염 생성 억제 효과를 나타내는 것으로 확인할 수 있었다.

이는 당귀 추출물이 염증매개 물질인 사이토카인 등의 생성을 억제하면서 대장조직 및 점막상피의 손상을 최소화하여 대장의 길이 변화 및 장벽 근육층의 확대, 비장의 비대 등을 억제한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 당귀 추출물의 항염증 및 대장조직의 보호작용이 궤양성 대장염의 치료 물질로의 가능성이 있음을 확인할 수 있었고, 향후 당귀 추출물의 항대장염 기전에 관한 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 DSS로 대장염을 유도한 마우스 모델에 당귀 추출물을 투여한 후 당귀의 항대장염 효과를 확인한 결과이다.

당귀 추출물 50㎎/㎏ 군에서는 유의미한 체중 감소 억제효과가 없었으며, 당귀 추출물 100㎎/㎏ 군에서는 4일째까지 유의미한 체중 감소 억제효과를 관찰할 수 있었다.

당귀 추출물 50㎎/㎏ 군과 100㎎/㎏ 군에서 모두 대장 길이의 감소와 비장의 비대를 유의적으로 억제시켰다.

당귀 추출물 50㎎/㎏ 군과 100㎎/㎏ 군에서 모두 대장염에 의해 나타나는 혈변, 묽은 변 및 체중 감소를 수치화한 질병활성도(DAI)를 감소시켰다.

당귀 추출물 50㎎/㎏ 군과 100㎎/㎏ 군에서 모두 대장염을 유도한 마우스 모델에서 증가된 염증성 사이토카인인 IL-6의 생성량을 유의적으로 억제시켰으며, 5-ASA 군에서는 사이토카인 IL-6 생성량에 유의성 있는 억제효과가 관찰되지 않았다.

당귀 추출물 50㎎/㎏ 군과 100㎎/㎏ 군에서 모두 대장염 유발에 의해 나타나는 장벽의 비대, 염증세포의 침윤, 정상 상피세포 장벽의 붕괴 및 궤양의 생성을 유의하게 억제시켰다.

이상의 실험 결과를 통해 당귀 추출물이 궤양성 대장염에 있어 항염증효과가 있으며, 염증에 의한 대장의 조직학적 변화에 대해 억제효과를 갖는 것을 확인하였다.

References

1. Owczarek, D., Cibor, D., Szczepanek, M., Mach, T. Biological therapy of inflammatory bowel disease. Pol Arch Med Wewn 119(1-2):84-88, 2009.
2. Akiyama, S., Nesumi, A., Maeda-Yamamoto, M., Uehara, M., Murakami, A. Effects of anthocyanin-rich tea ''Sunrouge'' on dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. Biofactors 38(3):226-233, 2012.
3. Hanauer, S.B. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 334(13):841-848, 1996.
4. Xu, C.T., Meng, S.Y., Pan, B.R. Drug therapy for ulcerative colitis. World J Gastroenterol 10(16):2311-2317, 2004.
5. College of Oriental medicine, department of internal medicine. The internal medicine. koonja publisher; pp 374-375, 2012.
6. Ardizzone, S., Bianchi Porro, G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. Drugs 65(16):2253-2286, 2005.
7. Heo jun. Donguibogam. Donguibogam publisher; pp 2169-2170, 2010.
8. Wang, X., Wei, L., Ouyang, J.P., Muller, S., Gentils, M., Cauchois, G., Stoltz, J.F. Effects of an angelica extract on human erythrocyte aggregation, deformation and osmotic fragility. Clin Hemorheol Microcirc 24(3):201-205, 2001.
9. Zhui, Y., Jing-Ping, O.Y., Yongming, L., Lei, W., Shuzheng, T., Hailu, Y., Hanqiao, Z., Xiaohong, Y. Experimental study of the antiatherogenesis effect of Chinese medicine angelica and its mechanisms. Clin Hemorheol Microcirc 22(4):305-310, 2000.
10. Chawla, A.S., Singh, M., Murthy, M.S., Gupta, M. Anti-inflammatory action of ferulic acid and its esters in carrageenan induced rat paw oedema model. Indian J Exp Biol 25(3):187-189, 1987.
11. Jang, S.I., Kim, K.M., Pae, H.O., Yun, Y.G., Chung, H.T., Kim, Y.C. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of Angelica uchiyamana in Activated Murine RAW 264.7 macrophages. Herbal formula science 10(2):189-197, 2002.
12. Shin, J.S., Yun, K.J., Chung, K.S., Seo, K.H., Park, H.J., Cho, Y.W., Baek, N.I., Jand, D. Monotropein isolated from the roots of Morinda officinalis ameliorates proinflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF-kB inactivation. Food Chem Toxicol 53(3):263-271, 2013.
13. Peyrin-Biroulet, L., Desreumaux, P., Sandborn, W.J., Colombel, J.F. Crohn's disease: beyond antagonists of tumour necrosis factor. Lancet 372(9632):67-81, 2008.
14. Brown, W.A., Farmer, K.C., Skinner, S.A., Malcontenti-Wilson, C., Misajon, A., O'Brien, P.E. 5-Aminosalicyclic acid and olsalazine inhibit tumor growth in a rodent model of colorectal cancer. Digestive Diseases and Sciences 45(8):1578-1584, 2000.
15. Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 115(1):182-205, 1998.
16. College of Oriental medicine Department of Herbology. The Herbology. Yeongnimsa; pp 578-579, 2008.
17. Heo jun. Donguibogam. Donguibogam publisher, pp 854-855, 2010.
18. Heo jun. Donguibogam. Donguibogam publisher, pp 414-415, 2010.
19. Wirtz, S., Neurath, M.F. Mouse models of inflammatory bowel disease. Adv Drug Delivery Rev 59(11):1073-1083, 2007.
20. Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R. A novel method in the induction

of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology 98(3):694-702, 1990.

21. Cooper, H.S., Murthy, S.N., Shah, R.S., Sedergran, D.J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab. Invest 69(2):238-249, 1993.
22. Ni, J., Chen, S.F., Hollander, D. Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. Gut 39(2):234-241, 1996.
23. Takizawa, H., Asakura, H., Sasakawa, T., Bannai, H., Nomoto, M. Immunological studies of the mucosa in colitis induced by sodium dextran sulfate in rats. Adv Exp Med Biol 371B: 1383-1387, 1995.
24. Takizawa, H., Shintani, N., Natsui, M., Sasakawa, T., Nakakubo, H., Nakajima, T., Asakura, H. Activated immunocompetent cells in rat colitis mucosa induced by dextran sulfate sodium and not complete but partial suppression of colitis by FK506. Digestion 56(3):259-264, 1995.
25. Dieleman, L.A., Palmen, M.J., Akol, H., Bloemena, E., Pena, A.S., Meuwissen, S.G., Van Rees, E.P. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clin Exp Immunol 114(3):385-391, 1998.