

## 가자(訶子)의 급성 췌장염 보호 효과

권빛나<sup>1,2#</sup>, 김동욱<sup>1</sup>, 배기상<sup>1,2,3\*</sup>

1. 원광대학교 한의과대학 약리학교실
2. 원광대학교 한방심신증후군연구센터
3. 원광대학교 한국전통의학연구소

### Protective effects of *Terminalia chebula* Retzins (TC) water extract on acute pancreatitis

Bitna Kweon<sup>1,2#</sup>, Dong-Uk Kim<sup>1</sup>, Gi-Sang Bae<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>2</sup>Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University

<sup>3</sup>Research center of Traditional Korean medicine, Wonkwang University

**Objectives:** *Terminalia chebula* Retzins (TC) has been used as a traditional remedy to treat gastrointestinal infectious and inflammatory diseases. However, the protective effect of TC on acute pancreatitis (AP) has not been studied. In this study, we tried to investigate the protective effect of TC water extract on cerulein-induced AP.

**Methods:** To measure the protective effect of TC on AP, mice were injected with cerulein (50 µg/kg) hourly for 6 times. TC water extract (200 or 400 mg/kg) or saline was administered orally 1 h before the first injection of cerulein. The mice were sacrificed at 6 h after the last injection of cerulein. Pancreas tissues were taken for further analysis.

**Results:** The administration of TC water extract showed an inhibitory effect on the increase of pancreas weight/body weight ratio and mitigated pancreatic damage in mice. Also, mRNA level of pro-inflammatory cytokines was inhibited by administration of TC water extract.

**Conclusion:** Taken together, we found that administration of TC water extract ameliorates the severity of cerulein-induced AP, which suggests the potential to be an effective treatment on AP.

**Key words :** Terminalia chebula Retzins (TC), Acute pancreatitis (AP), Cerulein, cytokines,

\*Corresponding author: Gi-Sang Bae, Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

Tel : +82-63-850-6842 E-mail : baegs888@wku.ac.kr

# First author: Bitna Kweon, Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, Iksan, Jeollabuk-do, Republic of Korea.

Tel : +82-63-850-6842 ·E-mail : kbn306@naver.com

## 서론

급성 췌장염 (Acute Pancreatitis; AP)은 췌장 내 발생하는 급성 소화기 질환으로, 전체 인구의 100만 명 중 약 800여명이 환자가 있는 것으로 보고되고 있으며, 그 중 pancreatic necrosis를 동반한 중증 및 만성 환자의 대부분은 간 및 폐 기능 부전 등의 합병증으로 인해 고통받고, 사망하는 것으로 알려져 있는 염증성 질병이다<sup>1,2</sup>. 중증도가 약한 (mild) 급성 췌장염 사망률은 약 10% 정도로 대부분 합병증 없이 자가 치유되며, 중증도가 높은 괴사성 급성 췌장염의 사망률은 20~30% 정도이다<sup>3</sup>. 일반적으로 급성 췌장염의 치료는 진통제, 항생제의 투여 혹은 정맥 내 수액공급 같은 일시적인 증상완화 치료가 진행되고 있으며, 중증일 경우 수술을 통해 괴사된 췌장 조직을 제거하는 방법을 시행하고 있지만 예후가 좋지 않아서 알맞은 치료법 개발이 필요하다<sup>4,5</sup>.

가자 (訶子, Terminalia chebula Retzins, TC)는 사군자과 (Cambretaceae)에 속하는 성숙한 과실을 건조한 것을 사용한다. 가자는 『新修本草』에 처음 기재되었으며, 임상에서는 降火利咽, 瀉腸의 효능이 있어 久瀉, 脫肛, 便血, 崩漏, 帶下, 遺精, 尿頻數, 久咳失音의 증상을 치료하는데 사용된다<sup>6</sup>. 가자의 성분으로는 chebulic acid, chebulagic acid, gallic acid, tannin 등이 함유되어 있으며<sup>7</sup>, 항균 효과<sup>7</sup>, 항염 효과<sup>8</sup>, 항암 효과<sup>9</sup>가 보고되어 있다. 기존의 연구에서 가자의 항균<sup>7</sup>, 항염효과<sup>8</sup>를 미루어 유추해 보면 소화기 염증 보호에도 가자는 우수한 효과가 있을 것으로 판단되어, 이에 본 연구에서는 cerulein으로 유도한 급성 췌장염 동물 모델에서 가자 물 추출물의 급성 췌장염에서 보호 효과를 확인하였다. 급성 췌장염으로 인한 생쥐 몸무게 대비 췌장 무게 비율, 췌장의 염증성 사이토카인을 관찰하였고, 가자 물 추출물을 투여하여 급성 췌장염 조절에 있어서 유의미한 결과를 얻었기에 다음과 같이 보고하는 바이다.

## 실험방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 연구에 사용한 가자는 광명당 제약 (울산, 대한민국)에서 구입하여 정선 후 사용하였다. 가자 추출물은 가자 100 g에 증류수 1 L를 이용하여 100°C에서 150분 동안 열수 추출한 후 -80°C에서 하루동안 동결하였으며, 동결된 가자 추출물을 동결 건조기 (IIShinBioBase, Dongducheon, Korea)를 이용하여 -50°C에서 4mTorr 압력으로 7일 동안 동결 건조하였다. 동결 건조된 가자 추출물 파우더는 3차 증류수에 녹이고, 0.22  $\mu$ m filter를

이용하여 여과하여 사용하였다. 동결 건조 후 수득한 분말은 18.69 g으로 수율은 18.69%였다.

#### 2) 시약

Easy-Blue™ total RNA extraction kit는 iNtRON biotechnology (성남, 한국)에서 구입하였다. Cerulein은 Bachem AG Laboratories (Bubendorf, Switzerland)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

#### 3) 실험동물

본 실험에 사용한 C57BL/6 mouse (체중15-20 g, female)는 Samtako Biokorea Co.Ltd (오산, 경기도, 한국)에서 구입하였다. 실험동물은 원광대학교 한의과대학 동물사육실에서 일정한 조건 (온도: 23±2°C, 습도: 50~60%, 명암: 12시간 주기)하에서 일반 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 환경 적응을 위해 일주일 동안 적응시킨 후 실험하였다.

## 2. 방법

### 1) 급성 췌장염 유발

16시간 금식시킨 생쥐에 cerulein (50  $\mu$ g/kg)을 1시간 간격으로 총 6번 복강 주사하여 유발하였다. 가자 물 추출물 (200 or 400 mg/kg)은 첫 번째 주사하기 1시간 전 경구 투여하였고, 대조군은 증류수 (100  $\mu$ l)를 경구 투여하였다. 마지막으로 cerulein을 주사한 후 6시간 뒤에 개복하여 췌장을 적출하였다.

### 2) 췌장 중량/체중 비율 측정 (pancreas weight/body weight; P.W./B.W. ratio)

최초 cerulein 투여 11시간 후에 췌장을 적출한 후 췌장 중량/체중 (pancreas weight/body weight) 계산식을 통하여 체중에 대한 췌장의 중량 비율을 측정하였다.

### 3) RNA 추출 및 실시간 정량적 역전사 중합 효소 연쇄반응 (Real time RT-PCR)

췌장을 적출한 후, easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (Intron Biotechnology, Inc., Seongnam, Korea) 1 ml에 넣어서 homogenizer로 분쇄한 후 200  $\mu$ l의 chloroform용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 수거된 상층액과 2-propanol과 동일 비율로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물을 80% ethanol로 씻고 건조했다. 그리고 침전물에 nucleas-free water를 100  $\mu$ l씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다. 추출한 RNA는 ReverTra Ace™ qPCR RT Kit (TOYOBO, Tokyo, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, SYBR

Green Master Mix를 사용하여 Realtime reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 10분, 95°C에서 denaturation 15초, 60.1°C에서 annealing 1분으로 설정하였고 이를 총 60번 반복하였다. GAPDH를 동시에 측정하여 RNA양을 보정하였다. 각 Primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primer sequence of SYBR Green Real-time PCR

No	Name	Sequence
1	GAPDH	F 5' TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA 3' R 5' TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG 3'
2	IL-1 $\beta$	F 5' CCT CGT GCT GTC GGA CCC AT 3' R 5' CAG GCT TGT GCT CTG CTT GTG A 3'
3	IL-6	F 5' AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA 3' R 5' CAC TAG GTT TGC CGA GTA GA 3'

#### 4) 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean $\pm$ standard error of mean (S.E.M.)로 나타내었다. 실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램 (v22.0)의 one way ANOVA에 준하였고, Duncan method로 사후검증을 하였다. P-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과

### 1. 가자 물 추출물의 췌장 중량/체중 비율 (P.W./B.W. Ratio) 변화에 미치는 영향

일반적으로 급성 췌장염이 발병하게 되면 췌장에서 소화에 필요한 효소들의 분비가 원활하지 않아 영양실조, 설사, 구토 등이 발생하여 체중 감소가 나타나고 반면에 췌장의 무게는 부종으로 인해 증가한다<sup>2)</sup>. 때문에 P.W./B.W. 비율은 췌장염의 중요 지표로 여겨진다. 본 실험에서는 가자 물 추출물 (200 or 400 mg/kg)을 1시간 전 경구 투여한 후, cerulein을 6번 복강 투여하여 급성 췌장염을 유발하였다. 마지막 주사 뒤 6시간 후 P.W./B.W. 비율 변화를 측정하였다. 그 결과 정상군에 비해 cerulein을 투여한 군에서 P.W./B.W.의 비율이 유의성 있게 증가함에 따라 췌장염이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 가자 물 추출물을 전 처리한 그룹에서는 cerulein 단독 투여한 군보다 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 1).

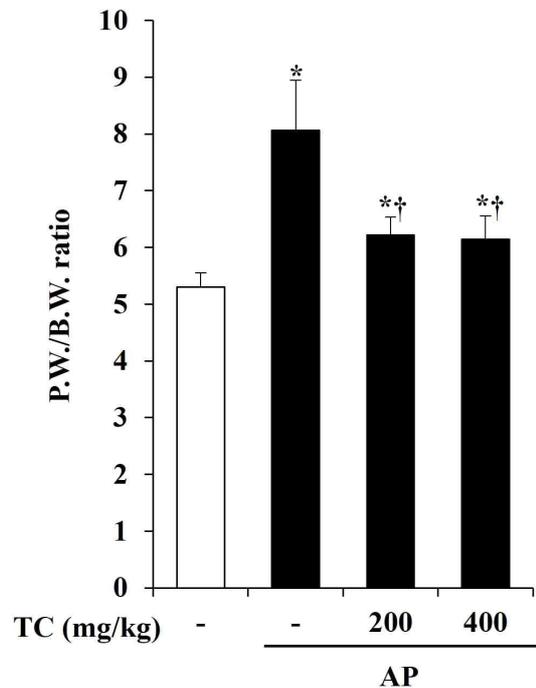


Fig. 1. Effect of Terminalia chebula Retzins (TC) water extract on pancreas weight/body weight ratio on cerulein-induced acute pancreatitis (AP). Mice were pretreated with TC water extract (200 or 400 mg/kg) orally at 1 h before the cerulein (50  $\mu$ g/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly 6 times and sacrificed at 6 h after the final cerulein injection. Data show the mean $\pm$ S.E.M. for 3 mice for each group. Results are representative of three experiments. \*P<0.05 vs. saline treatment alone, †P<0.05 vs. cerulein treatment alone.

### 2. 가자 물 추출물이 염증성 사이토카인 생산에 미치는 효과

사이토카인은 급성 췌장염의 주요 바이오마커로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 이에 본 연구에서는 염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6를 측정하였다. 측정결과, Cerulein을 투여한 군에서 정상군보다 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6가 유의성 있게 증가하였다. 이를 통해 췌장 염증이 발생한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 가자 물 추출물 전처리 군에서는 cerulein 단독 투여한 군보다 IL-1 $\beta$ , IL-6를 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

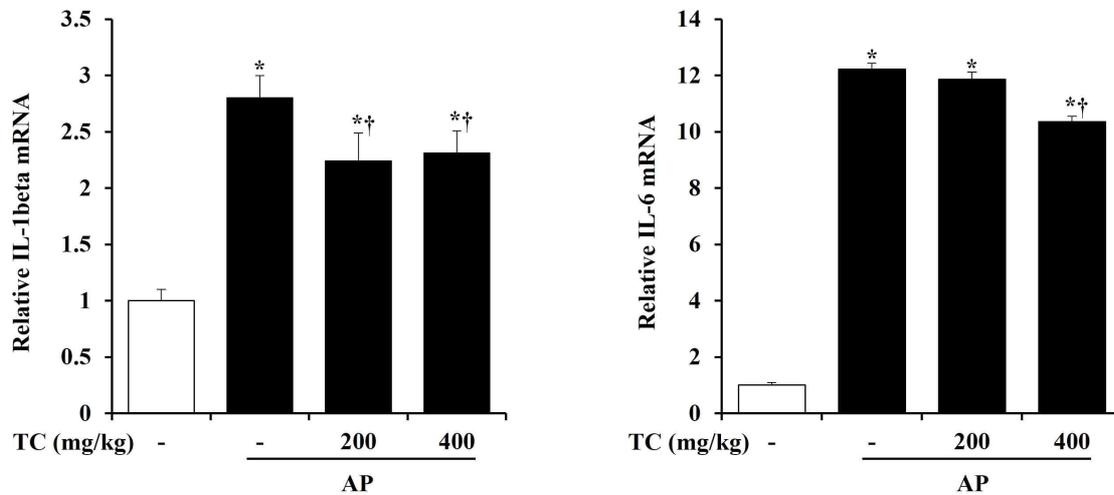


Fig. 2. Effect of TC water extract on the mRNA level of pro-inflammatory cytokines on cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with TC water extract (200 or 400 mg/kg) orally at 1 h before the first cerulein (50 µg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly 6 times and sacrificed at 6 h after the final cerulein injection. The pro-inflammatory cytokines were detected by realtime RT-PCR as described in materials and methods. Data show the mean±S.E.M. for 3 mice for each group. Results are representative of three experiments. \*P<0.05 vs. saline treatment alone, † P<0.05 vs. cerulein treatment alone.

### 고찰

급성 췌장염의 주된 병인은 술과 담석으로, 기타 다른 원인으로는 약물의 독성, 대사질환, 감염, 고지혈증 등이 있다<sup>11</sup>. 급성 췌장염의 대표적인 병리학적 변화는 췌장의 부종, 선방세포의 괴사, 호중구 침윤, 출혈, amylase와 lipase 등 소화효소의 활성화, 인터루킨과 종양 괴사인자 같은 전염증성 사이토카인 등이 있다<sup>12</sup>. 하지만 현재 사용되고 있는 급성 췌장염의 치료약물은 이러한 염증 조절제 보다는 단백질 분해 억제제인 gabexate mesilate를 주로 사용하고 있다<sup>13</sup>. 그러나 단백질 분해 억제제는 오직 소화효소만 억제할 뿐 염증과 병리학적 변화는 억제하지 못하는 한계가 있다. 따라서 염증을 조절할 수 있는 급성 췌장염 치료제 개발이 필요하다.

가자는 한의학에서 腸出血, 痔漏, 喉頭炎, 結核, 慈宮炎, 帶下, 痢疾 등의 치료에 쓰이고 있다<sup>6</sup>. 가자는 tannin 성분이 많아서 收斂, 止瀉작용이 있으며, 뛰어난 항균작용이 보고되어 있다<sup>14,15</sup>. 또한, 가자 과실의 메탄올 추출물은 유방암 세포주 포함한 여러 암세포주의 성장 억제 효과가 보고 되었으며<sup>16</sup>, 항산화 효과 및 당뇨병 마우스 모델의 혈당 수치의 감소 효과도 보고되었다<sup>17</sup>. 이 외에도 헬리코박터 파일로리균에 대한 항박테리아 효과<sup>18</sup>와 충치 예방효과<sup>19</sup> 등 다양한 생리활성 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있지만, 급성 췌장염 보호효과는 보고되어 있지 않았다. 각종 항염증 작용

및 收斂, 止瀉 작용을 바탕으로 급성 췌장염 치료에 유효할 것으로 판단되었고, 이에 가자 물추출물을 cerulein으로 유도된 급성 췌장염 모델에 적용하여 췌장염의 보호효과를 확인하기 위한 연구를 진행하였다.

본 연구에서 급성 췌장염을 유도하기 위해 사용한 cerulein은 cholecystokinin (CCK) 유사물질로써 췌장 선방세포의 손상 및 사이토카인 등의 분비를 촉진하여 급성 췌장염을 유도한다<sup>20</sup>. Cerulein으로 유도한 설치류의 급성 췌장염 모델은 사람의 경우와 비교하였을 때 해부학적 소견상 약간의 차이는 있지만, 병리조직학적 소견에 대한 유사성 및 재현성이 뛰어나므로 가장 널리 이용하는 모델이며 본 연구에서도 이러한 모델을 사용하여 급성 췌장염을 유발하였다<sup>21</sup>. Cerulein을 이용하여 급성 췌장염을 유발하면 췌장 조직에 염증, 부종, 괴사, 공포화가 나타남으로 인해 췌장에 손상을 초래하게 된다<sup>22</sup>. 특히, 췌장 부종으로 인해 마우스 몸무게에 대한 췌장 무게의 비율이 높아지게 된다. 따라서, 췌장 부종을 직접적으로 억제하는 지를 측정하면 cerulein으로 인한 췌장 손상을 조절할 수 있는 지를 알 수 있다. 본 연구에서 가자 물 추출물이 급성 췌장염 유발 시 몸무게에 대한 췌장 비율을 감소시켰고 (Fig. 1), 이는 급성 췌장염 시 발생하는 췌장 손상을 억제하는 효과가 있음을 의미한다.

췌장에 국소적인 손상이 가해지면 활성화된 췌장 선방세포 및 대식세포에서 염증성 사이토카인이 분비되고, 이는 혈관 투과성을 높여 백혈구의 부착과 유출을 증가

시켜 급성 췌장염의 합병증인 다발성 장기 부전의 발병에도 영향을 끼친다<sup>23)</sup>. 그 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6는 췌장염의 초기 진단을 예측할 수 있는 바이오마커로서, 실제로 임상에서도 다발성 장기부전이 나타난 췌장염 환자에게서 높은 수치가 측정된다는 보고가 있다<sup>24)</sup>. 이에 본 연구에서도 췌장에서 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 측정하였고, 가자 물 추출물 처리군에서 IL-1 $\beta$ , IL-6를 효과적으로 억제하는 것으로 보아 (Fig. 2), 가자 물 추출물이 급성 췌장염으로 인한 염증 및 합병증의 개선에 도움을 줄 것으로 예상된다.

이상의 결과를 종합해 보았을 때, 가자 물 추출물은 cerulein으로 유발한 급성 췌장염에서 췌장의 부종 억제, 염증성 사이토카인 억제를 통하여 췌장염 억제에 탁월한 효과가 있는 한의약 소재임을 확인하였다. 이를 통해 가자는 추후 급성 췌장염의 예방 및 치료제 개발에 있어 긍정적 역할을 할 것으로 판단된다.

## 결론

본 실험은 급성 췌장염에 대한 가자 물 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여 cerulein으로 유발한 급성 췌장염 모델에서 가자 물 추출물을 경구투여한 후 췌장의 중량 비율, 염증성 사이토카인을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 가자 물 추출물 투여군은 대조군에 비해 체중에 대한 췌장 무게 비율을 억제하였다.

2. 가자 물 추출물은 대조군에 비해 염증성 사이토카인 IL-1 $\beta$ , IL-6를 유의성 있게 억제하였다

이와 같은 결과로 보아 가자 물 추출물은 급성 췌장염에 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2021R1I1A2053285).

## 이해관계

The authors declare no conflict of interest.

## 참고문헌

1. Collaborators GBDC. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(3):245-66.
2. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, Phillips AR, Windsor JA. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology.* 2010;139(3):813-20.
3. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001 ; 2(4) : 496-501.
4. Kimura W, Mossner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol.* 1996 ; 20(3) : 177-84.
5. Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS, Franceschi S, Hamidi M, Marchie A, Jenkins AL, Axelsen M. Glycemic index : Overview of implications in health and disease. *Am J clin Nutr.* 2002 ; 76(1) : 266S-73S.
6. Kim IR KH, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY. *Boncho-Hak.* Seoul : Young-Lim Press. 2007 : 671-2.
7. Lee KS, Kim SH, Sim KC, Park CS, Shin YS. Antimicrobial activity of Terminalia chebula Retz. extract of against intestinal pathogens. *Korean J Food & Nutr* 1997;10: 559-563.
8. Bag A, Kumar Bhattacharyya S, Kumar Pal N, Ranjan Chattopadhyay R. Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of hydroalcoholic extract of Terminalia chebula fruits. *Pharm Biol.* 2013;51(12):1515-1520.
9. Achari C, Reddy GV, Reddy TC, Reddanna P. Chebulagic acid synergizes the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma through COX-2 dependant modulation of MDR-1. *Med Chem.* 2011;7:432-442.
10. Weiss FU, Laemmerhirt F, Lerch MM. Etiology and Risk Factors of Acute and Chronic Pancreatitis. *Visc Med.* 2019;35(2):73-81.
11. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol.* 2005 ; 5 : 132-144.
12. Regner S, Manjer J, Appelros S, Hjalmarsson C, Sadic J, Borgstrom A. Protease activation, pancreatic

leakage, and inflammation in acute pancreatitis: differences between mild and severe cases and changes over the first three days. *Pancreatology*. 2008 ; 8 : 600-607.

13. Kim SC, Yang HR. Clinical efficacy of gabexate mesilate for acute pancreatitis in children. *Eur J Pediatr*. 2013 ; 172(11) : 1483-90.

14. Kesharwani A, Polachira SK, Nair R, Agarwal A, Mishra NN, Gupta SK. Anti-HSV-2 activity of *Terminalia chebula* Retz extract and its constituents, chebulagic and chebulinic acids. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):110.

15. Patil VS, Harish DR, Vetrivel U, Roy S, Deshpande SH, Hegde HV. Hepatitis C Virus NS3/4A Inhibition and Host Immunomodulation by Tannins from *Terminalia chebula*: A Structural Perspective. *Molecules*. 2022;27(3):1076

16. Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. fruit. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:327-336.

17. Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol*. 2002;81: 155-160.

18. Malekzadeh F, Ehsanifar H, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz) against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Ag*. 2001;18:85-88.

19. Jagtap AG, Karkera SG. Potential aqueous extract of *Terminalia Chebula* as an anticaries agent. *J Ethnopharmacol*. 1999;68:299-306.

20. Bae Gs, Kim MS, Park KC, Koo BS, Jo IJ, Choi SB, Lee DS, Kim YC, Kim TH, Seo SW, Shin YK, Song HJ, Park SJ. Effect of biologically active fraction of *Nardostachys jatamansi* on cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 ; 18(25) : 3223-34.

21. Lee HS. Experimental animal models of pancreatic disease. *Kor J Gastroenterol seminar*. 2002 : 144-51.

22. Granger J, Remick D. Acute pancreatitis : models, markers, nad mediators. *Shock*. 2005 ; 24(1) : 45-51.

23. Osman MO, Jensen SL. Acute pancreatitis: the pathophysiological role of cytokines and integrins. New trends for treatment? *Dig Surg*. 1999;16(5):347-62.

24. Rao SA, Kunte AR. Interleukin-6: An Early Predictive Marker for Severity of Acute Pancreatitis. *Indian J Crit Care Med*. 2017;21(7):424-8.