

# 흰쥐에서 acetic acid로 유발된 궤양성 대장염에 대한 만년환의 효과

공원호<sup>1</sup>, 김범회<sup>2</sup>, 김원일<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 한의과대학 비계내과학교실, <sup>2</sup>동의대학교 한의과대학 해부학교실

## The Effects of *Mannyeon-hwan* on Acetic Acid-induced Ulcerative Colitis in Rats

Won-ho Kong<sup>1</sup>, Bum-hoi Kim<sup>2</sup>, Won-ill Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Korean Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-eui University

<sup>2</sup>Dept. of Anatomy, College of Korean Medicine, Dong-eui University

### ABSTRACT

**Objectives:** This study was designed to verify the effects of *Mannyeon-hwan* (MNH) on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats.

**Methods:** Ulcerative colitis was induced in male Sprague-Dawley rats weighing approximately 250 g by injecting acetic acid through the anus. Rats were classified into four groups: normal group, control group (acetic-acid, AA), low concentration group (AA+MNH(L)), and high concentration group (AA+MNH(H)). Body weight, visual evaluation of the colonic mucosa, anatomical histological changes, and changes in the expression of proteins in colon tissue were compared and analyzed.

**Results:** Compared to the control group, the MNH groups showed significant recovery from weight loss and mucosal damage. The expression of inflammatory proteins such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, MPO, and COX-2 were significantly decreased in the MNH groups compared to those in the AA group. In the MNH groups, significant changes in proteins involved in apoptosis such as caspase-3, BAX, and Bcl-2 were observed compared to those in the AA group. Additionally, changes in the expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, BAX, and Bcl-2 were greater in the MNH(H) group than those in the MNH(L) group.

**Conclusion:** *Mannyeon-hwan* was found to be effective in suppressing inflammation of the colonic mucosa in ulcerative colitis, inhibiting the expression of inflammation-related proteins, and suppressing damage to the colonic mucosa by regulating the expression of apoptosis-related proteins.

**Key words:** *Mannyeon-hwan*, ulcerative colitis, acetic acid-induced, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, caspase-3, BAX, Bcl-2

## 1. 서론

전 세계적으로 궤양성 대장염을 포함하는 염증성

- 투고일: 2024.08.29, 심사일: 2024.10.13, 게재확정일: 2024.10.14
- 교신저자: 김원일 부산광역시 부산진구 양정로 52-57  
동의대학교 한의과대학  
TEL: 051-890-3328 FAX: 051-890-3333  
E-mail: omdstar@deu.ac.kr
- 이 논문은 2024학년도 동의대학교 일반대학원 한의학 박사학위 논문임.

장질환의 발생률과 유병률이 증가하고 있다. 과거에는 서양에서 호발하였지만, 최근에는 아시아 국가에서의 염증성 장질환 증가율이 서양보다 높아졌다<sup>1</sup>. 식습관의 서구화와 진단장비의 발달이 복합적으로 작용하여 진단율이 높아진 것으로 추정된다. 아시아에서 발생하는 염증성 장질환 환자와 서양에서 보고된 염증성 장질환 환자들의 임상적 특징, 자연경과, 유병률 통계 등 차이점이 보고되고 있다. 하지만 치료법은 서양에서와 마찬가지로 먼

억제제, 스테로이드제, 항TNF(tumor necrosis factor)제 등을 이용하여 급성기에는 증상을 완화시키고, 관해기에는 재발을 방지하는 것을 목표로 하고 있다<sup>2</sup>. 국내의 통계자료에서도 궤양성 대장염의 유병률과 진료비가 증가하는 추세이며<sup>3</sup>, 현재 궤양성 대장염의 치료제는 장기간 사용하였을 때 면역기능을 저하시켜 기회감염의 위험을 증가시킨다는 보고가 있어<sup>4</sup>, 아시아인에게 적합한 치료 전략 수립이 필요한 시점이다.

한약은 수천 년 전부터 아시아인에 대한 임상경험이 누적된 치료 약물로, 최근에는 그 효과와 안전성에 대한 과학적 접근을 시도하고 있다<sup>5</sup>. 국내에서 궤양성 대장염의 치료에 한약 단독 투여보다 한약과 양약을 병용할 때 임상적 관해 유도에 22%, 내시경적 관해 유도에 15% 더 효과가 있었으며, 부작용의 발생 빈도가 13% 더 낮다는 보고가 있었다<sup>6</sup>. 따라서, 궤양성 대장염의 치료에 임상적으로 효과가 있는 한약 처방에 대한 과학적 검증이 필요하다.

궤양성 대장염은 한의학에서 설사, 이질, 복통, 적취, 변혈, 장벽(腸滯), 장풍(腸風), 장독(腸毒), 구리(久痢), 구사(久瀉) 등의 범주에 속하며, 정허사변(正虛邪變), 본허표실(本虛標實), 한열착잡(寒熱錯雜)을 고려하여 종합적으로 판단해서 치료한다<sup>7</sup>. 지금까지 궤양성 대장염의 동물실험 연구를 통해 의이인, 당목향, 오매와 같은 단일제제부터<sup>8,9</sup>, 소염정장탕, 도체탕, 괴화산, 오매환, 자금정, 계지 가용골모려탕, 황금탕, 감초사심탕과 같은 복합제제까지<sup>10,11</sup> 다양한 본초 및 방제의 치료효과가 보고되었다. 또한 임상적으로 조중건비환, 괴화산, 전씨 백출산, 평위지유탕, 단삼보혈탕, 황련해독탕과 같은 처방에 대한 치험례가 보고되었다<sup>12,13</sup>.

만년환(萬年丸)은 소화기의 염증성 질환에 대응하는 ○○한의원의 경험방이다. 임상적으로 궤양성 대장염 환자의 치료에 처방되었고 급만성 장염에 대한 선행연구<sup>14</sup>가 있었으며, 만년환의 구성 약재 중 감초, 사인, 백출, 목향은 단일제제에 대한 염증성

장질환의 치료효과를 확인하는 동물실험 연구<sup>15-17</sup>가 진행되었다. 이에 저자는 만년환의 궤양성 대장염에 대한 치료효과를 객관적으로 검증하고, 임상에서 활용하는 근거를 마련하고자 acetic acid로 궤양성 대장염을 유발한 흰쥐에게 만년환을 투여한 뒤 체중 변화, 결장의 변화, 염증성 사이토카인 발현, 염증 활성화 효소, apoptosis에 대한 지표를 확인하는 연구를 수행하였다.

## II. 실험방법

### 1. 실험동물

본 연구의 모든 과정은 ○○대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2023-010). 실험동물은 (주)샘타코(경기도, 대한민국)에서 구입하였으며, 약 250 g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 32마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 23~24 °C, 습도 40~60%의 환경에서 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서, 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하였다. 실험에 앞서 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 만년환(Mannyeon-hwan, MNH)의 제조

본 실험에 사용한 만년환의 내용과 약물은 Table 1과 같다. 만년환은 ○○한의원 원내 조제실에서 직접 조제하였으며, 구성약재는 삼의제약, 씨케이, 허브팜에서 규격품으로 구입하여 정선하여 사용하였다. 만년환의 제조방법은 향부자, 인삼, 백출, 곽향, 백개자, 후박, 산사, 사인, 육두구, 건강, 목향, 감초, 빈랑 13가지 약재를 등분하여 600 g씩 사용하여 약재를 건조한 후 초미립자분쇄기(한국특허상품개발원, 한국)로 미세분말을 만든다. 여기에 밀가루 100 g, 찹쌀가루 100 g, 물 50 ml를 혼합 반죽하여 오자대의 환으로 만들어 사용하였다.

Table 1. The Amount and Composition of *Mannyeon-hwan* (MNH)

Herbal name	Amount (g)
Cyperi Rhizoma (香附子)	600
Ginseng Radix (人蔘)	600
Glycyrrhizae Radix (甘草)	600
Agastachis Herba (藿香)	600
Amomi Fuctus (砂仁)	600
Atractylodis Rhizoma Alba (白朮)	600
Magnoliae Cortex (厚朴)	600
Sinapis Semen (白芥子)	600
Myristicae Semen (肉豆蔻)	600
Zingiberis Rhizoma Siccus (乾薑)	600
Aucklandiae Radix (木香)	600
Arecae Semen (檳榔)	600
Crataegii Fructus (山査)	600

### 3. 케양성 대장염 유발

32마리의 흰쥐를 8마리씩 4개 군으로 나누었으며, 각각 일반군(Normal), 대조군(AA, acetic acid), 저농도군(MNH(L), low concentration of *Mannyeon-hwan*) 및 고농도군(MNH(H), high concentration of *Mannyeon-hwan*)으로 명명하였다. 본 연구에서는 흰쥐에 대장염을 유발하기 위해 acetic acid를 사용하였다. 흰쥐를 ether로 마취시킨 후, 외경 0.2 cm, 길이 8 cm의 polyethylene catheter를 흰쥐 항문으로 삽입(6~7 cm)하고 2 mL of 4%(v/v) acetic acid를 주입하여 대장염을 유발시켰다. 주입 후 약물이 흘러나오지 않도록 꼬리를 위로 들어 올린 자세를 1분간 유지시켰다. 대조군, 저농도군 및 고농도군에 acetic acid를 주입하였으며, 일반군에는 생리식염수를 동일한 방식으로 주입하였다.

### 4. 약물 투여

흰쥐에 대한 만년환의 투여는 임상에서 처방하는 성인의 1일 투여량을 기준으로, 흰쥐의 대사량과 대비하여 용량을 결정하였다. 저농도군 및 고농도군에 acetic acid 주입 2시간 후 각각 체중 100 g 당 만년환 105.0 mg, 210.0 mg의 농도로 제한된 상

태의 만년환을 0.1 ml의 음용수에 녹여 경구 투여하였다. 약물투여는 2주간 매일 1회씩 같은 시간에 시행하였으며, 일반군에는 동일량의 물을 투여하였다.

### 5. 체중 측정

실험동물의 체중은 acetic acid 주입하고 만년환 투여를 마친 후 측정하였으며, 실험기간 동안 2일간격으로 같은 시간에 측정하였다. 실험동물을 희생하기 직전에 최종적인 체중을 측정하였다.

### 6. 결장조직의 채취

과량의 ether를 이용하여 실험동물을 희생시킨 후 개복하여 장의 일반적인 변화를 육안으로 관찰하고, 전체의 직장과 결장을 채취하여 세로로 가르고 점막의 손상정도를 관찰하였다.

### 7. 결장 점막 손상의 평가

결장 점막 손상에 대한 평가는 0~4점으로 나누어 정하였는데, 정상 표면은 0점, 약한 손상(0~25%)은 1점, 중간 손상(25~50%)은 2점, 심각한 손상(50~75%)은 3점, 결장 조직두께의 전체적인 손상(75% 이상)은 4점으로 평가하였다. 조직학적 평가는 각 실험군에서 채취한 결장 원위부의 동일 부위에서 육안으로 시행하였다.

### 8. 결장점막의 해부조직학적 관찰

결장점막의 해부조직학적인 변화를 관찰하기 위해 hematoxylin and eosin(H&E) 염색이 사용되었다. 결장 조직을 neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정된 뒤에, 흐르는 물에 24시간 동안 세척하였다. 그 후 에탄올로 탈수된 조직을 파라핀으로 포매한 후, rotary microtome(5 µm, Leica Biosystems: Wetzlar, Germany)을 이용하여 절편하였으며, 염색된 조직은 광학현미경(light microscope, Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였으며 배율은 H&E는 X100, 면역염색은 X200입니다.

## 9. 면역조직화학염색

Primary antibody는 anti-TNF- $\alpha$ (ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; ABcam), anti-IL-6 (sc28343, 1:200 dilution, rabbit polyclonal, Santacruz), anti-IL-1 $\beta$ (SAB5700690, 1:200 dilution, rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich), anti-NF- $\kappa$ B/p65(ab16502, 1:200 dilution, rabbit polyclonal, ABcam), anti-COX-2 (SAB5600153, 1:200 dilution, rabbit monoclonal, Sigma-Aldrich), anti-MPO(ab208670, 1:200 dilution, rabbit monoclonal, ABcam), anti-Caspase-3(SAB5600063, 1:200 dilution, rabbit monoclonal, Sigma-Aldrich), anti-BAX(ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal, ABcam), anti-Bcl-2(sc783, 1:200 dilution, rabbit polyclonal, Santacruz)로 PBS(phosphate buffer saline)와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 °C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어 내고, abidin-biotin immunoperoxidase의 방법(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다. 면역반응의 결과를 정량화 하기 위해 현미경 하에서 동일한 일정면적(cells/120,000  $\mu$ m<sup>2</sup>) 내의 면역 양성반응 세포수를 Infinity Captureimaging software (ver.3, Lumenera, Canada)를 사용하여 측정하여 수치화 하였다.

## 10. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 Tukey's 사후검정과 함께 ANOVA(one-way analysis of variance) 분석을 통해 유의성 여부를 확인 후, student's t-test를 사용하여  $p < 0.05$  및  $p < 0.01$ 의 유의수준으로 검증하였다. 모든 값의 수치는 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표시하였다.

## III. 결 과

### 1. 체중의 변화

2주간의 실험기간 동안 acetic acid의 주입이나 만년환 투여로 인해 사망한 동물은 없었다. 각 실험군 별로 체중변화를 관찰한 결과, 아무런 처치도 가하지 않은 일반군에서는 시간이 지남에 따라 체중이 약간씩 증가하는 경향이 나타난 반면, 대조군, 저농도군 및 고농도군에서는 체중감소가 관찰되었다. 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 체중감소의 회복이 관찰되어 6일째 이후 유의성 있는 변화를 나타내었다(Fig. 1).

### 2. 결장의 병리적 변화

흰쥐의 결장을 채취하여 육안으로 관찰한 결과, acetic acid를 주입한 대조군의 경우 일반군과 비교하여 결장의 말단 조직에 출혈과 점막손상 및 부종이 확인되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 이러한 병리적 변화의 완화가 관찰되었다(Fig. 2).

### 3. 결장 점막 손상 지표

결장 점막을 육안으로 관찰하여 손상지표를 평가한 결과 정상군은 점막손상이 없었으나 acetic acid를 주입한 대조군의 경우는 결장 점막의 손상으로 인해 3.5 $\pm$ 0.5점인 반면, 저농도군과 고농도군에서는 손상된 점막의 치료 회복으로 인해 각각 2.8 $\pm$ 0.7점, 2.6 $\pm$ 0.7점으로 측정되었다. 저농도군과 고농도군 모두에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 3).

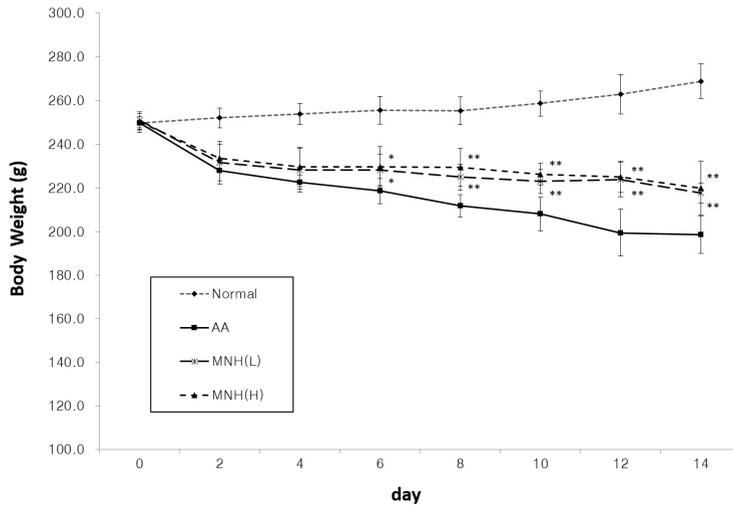


Fig. 1. Body weight changes of rat for 14 days.

Data represent the mean±S.D.

\*  $p < 0.05$  compared with AA group

\*\*  $p < 0.01$  compared with AA group

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

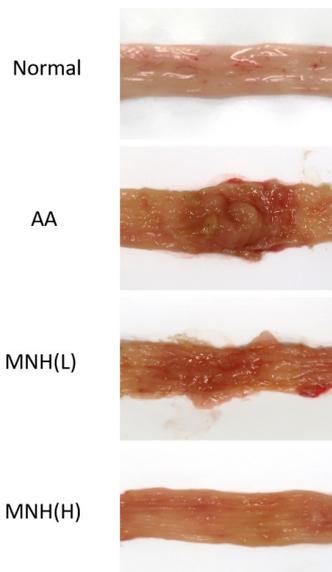


Fig. 2. Effect of MNH on macroscopic appearance of colons of acetic acid-induced colitis rats.

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

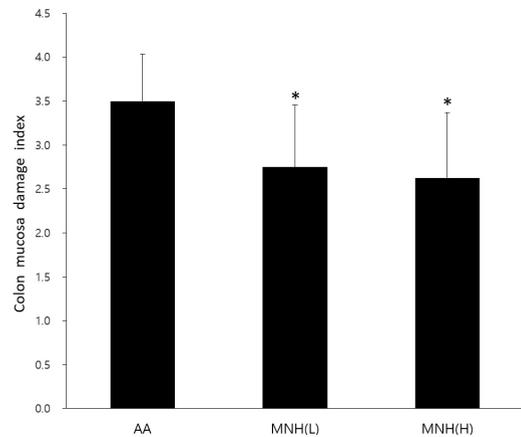


Fig. 3. Colon mucosa damage index (CMDI) of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups.

Normal group showed no damage to the colon mucosa.

Data represent the mean±S.D.

\*  $p < 0.05$  compared with AA group

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

#### 4. 결장점막의 해부조직학적 변화

각 실험군의 동일한 부위의 결장 조직을 채취하여 H&E 염색을 시행하여 조직학적 변화를 관찰한 결과, acetic acid를 투여한 대조군의 경우 점막(mucosa), 고유판(lamina propria), 점막하조직(submucosal tissue) 및 근육층(muscularis)까지 전체적인 염증세포의 침착이 발견되었다. 반면, 저농도군과 고농도군의 경우는 대조군에 비해 이러한 염증세포의 침착이 현저히 억제되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더 뚜렷한 경향이 있었다(Fig. 4).

#### 5. 결장 조직에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현변화

결장 조직에서의 TNF- $\alpha$ 의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

발현의 정도를 객관화하기 위해 일정 단위면적당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각 12.5 $\pm$ 2.1, 56.5 $\pm$ 8.5, 45.8 $\pm$ 5.8, 42.3 $\pm$ 6.0개(cells/120,000  $\mu$ m<sup>2</sup>)로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p$ <0.05)(Fig. 6).

#### 6. 결장 조직에서의 IL-6의 발현변화

결장 조직에서의 IL-6(interleukin-6)의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

발현의 정도를 객관화하기 위해 일정 단위면적당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조

군, 저농도군, 고농도군이 각각 12.0 $\pm$ 1.0, 62.7 $\pm$ 7.4, 53.9 $\pm$ 5.3, 48.8 $\pm$ 3.9개(cells/120,000  $\mu$ m<sup>2</sup>)로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p$ <0.05).

한편, 저농도군과 비교하여 고농도군에서 유의성 있는 발현 감소가 확인되었다( $p$ <0.05)(Fig. 6).

#### 7. 결장 조직에서의 IL-1 $\beta$ 의 발현변화

결장 조직에서의 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

발현의 정도를 객관화하기 위해 일정 단위면적당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각 9.7 $\pm$ 1.0, 53.0 $\pm$ 4.2, 49.2 $\pm$ 3.2, 42.1 $\pm$ 6.1개(cells/120,000  $\mu$ m<sup>2</sup>)로 측정되어, 고농도군에서 대조군과 비교하여 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p$ <0.01)(Fig. 6).

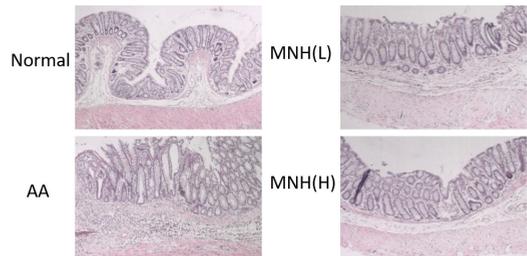


Fig. 4. H&E staining of colon in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups. (magnification, x100)

H&E : hematoxylin and eosin, AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

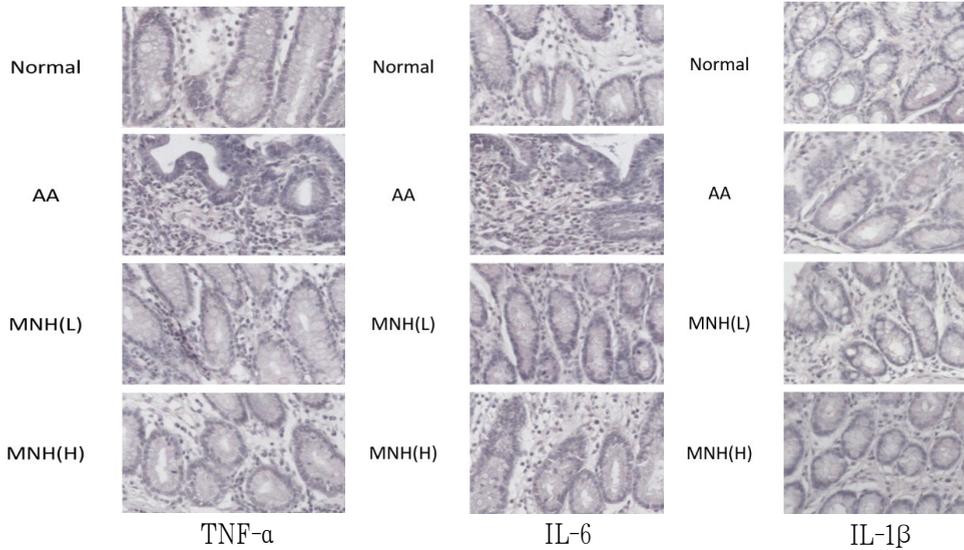
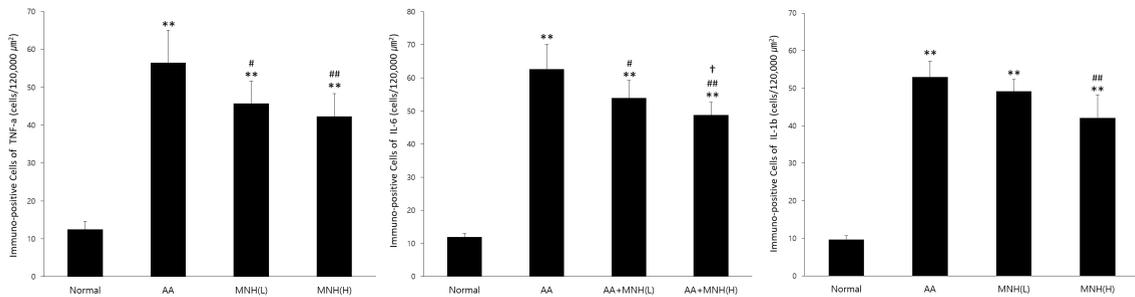


Fig. 5. Representative images of immunohistochemical expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups (magnification, x200).

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*



	Normal	AA	MNH (L)	MNH (H)
TNF- $\alpha$	12.5 $\pm$ 2.1	56.5 $\pm$ 8.5**	45.8 $\pm$ 5.8**#	42.3 $\pm$ 6.0**#
IL-6	12.0 $\pm$ 1.0	62.7 $\pm$ 7.4**	53.9 $\pm$ 5.3**#	48.8 $\pm$ 3.9**#†
IL-1 $\beta$	9.7 $\pm$ 1.0	53.0 $\pm$ 4.2**	49.2 $\pm$ 3.2**	42.1 $\pm$ 6.1**#

(cells/120,000  $\mu\text{m}^2$ )

Fig. 6. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  immunoactivities of colon in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups.

Data represent the mean $\pm$ S.D.

\*\*  $p < 0.01$  compared with normal group

#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  compared with AA group

†  $p < 0.05$  compared with MNH (L) group

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

8. 결장 조직에서의 NF-κB p65의 발현변화

결장 조직에서의 NF-κB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) p65의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 7).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각 10.2±0.7, 49.4±4.0, 40.8±3.8, 35.5±3.6개(cells/120,000 μm<sup>2</sup>)로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다(p<0.01).

한편, 저농도군과 비교하여 고농도군에서 유의성 있는 발현 감소가 확인되었다(p<0.05)(Fig. 8).

9. 결장 조직에서의 MPO의 발현변화

결장 조직에서의 MPO(myeloperoxidase)의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 9).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각 10.5±1.0, 54.3±3.8, 41.7±4.6, 39.8±5.0개(cells/120,000 μm<sup>2</sup>)로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다(p<0.01)(Fig. 10).

10. 결장 조직에서의 COX-2의 발현변화

결장 조직에서의 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 9).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에

서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각 10.4±1.6, 54.4±7.4, 45.7±4.4, 45.1±6.4개(cells/120,000 μm<sup>2</sup>)로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다(p<0.05)(Fig. 10).

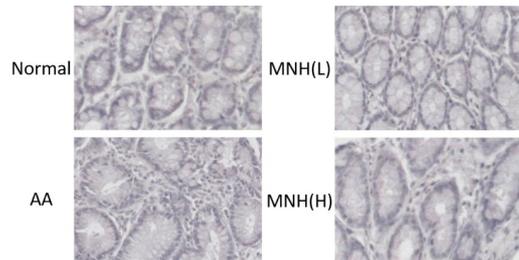
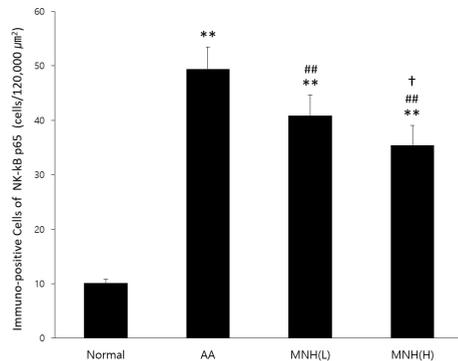


Fig. 7. Representative images of immunohistochemical expression of NF-κB in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups (magnification, x200).

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*



	Normal	AA	MNH (L)	MNH (H)
NF-κB	10.2±0.7	49.4±4.0**	40.8±3.8**##	35.5±3.6**##†

(cells/120,000 μm<sup>2</sup>)

Fig. 8. NF-κB immunopositivities of colon in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups.

Data represent the mean±S.D.  
 \*\* p<0.01 compared with normal group  
 ## p<0.01 compared with AA group  
 † p<0.05 compared with MNH (L) group  
 AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

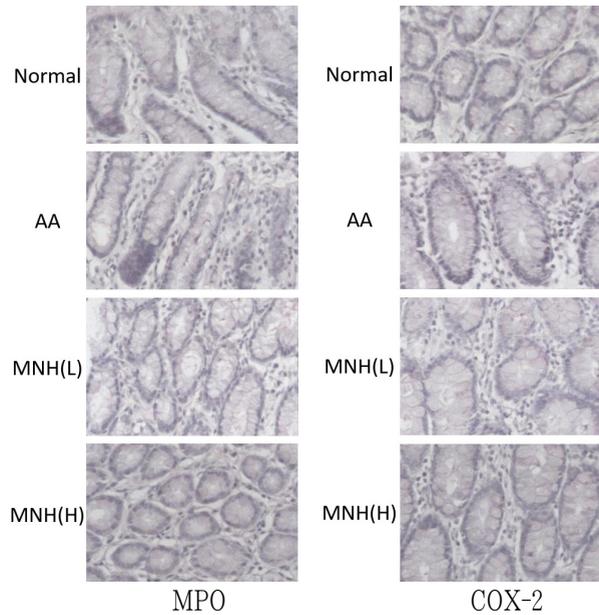


Fig. 9. Representative images of immunohistochemical expression of MPO, COX-2 in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups (magnification, x200).

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

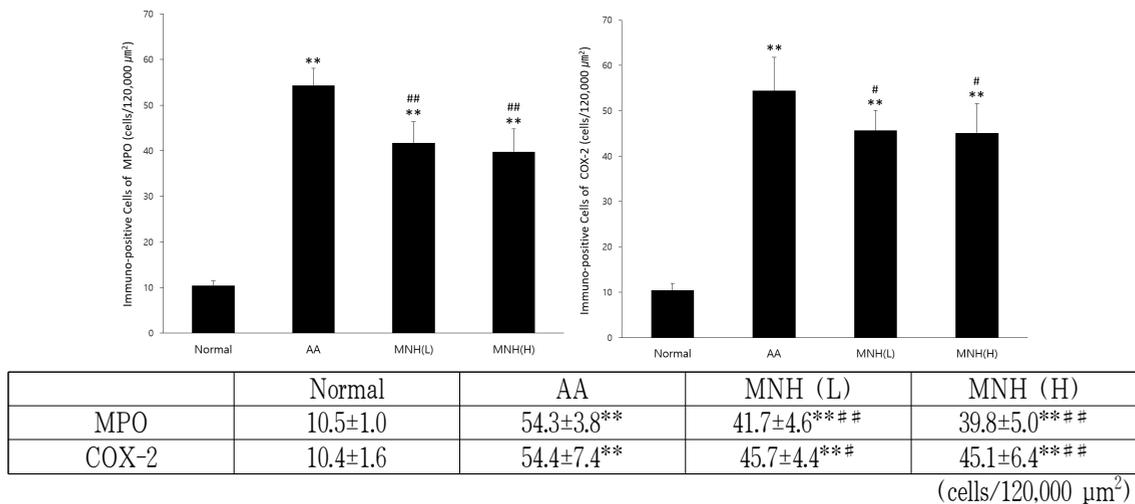


Fig. 10. MPO, COX-2 immunoactivities of colon in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups.

Data represent the mean±S.D.

\*\*  $p < 0.01$  compared with normal group

#  $p < 0.05$  compared with AA group

##  $p < 0.01$  compared with AA group

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

### 11. 결장 조직에서의 Caspase-3의 발현변화

결장 조직에서의 Caspase-3의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 11).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각  $9.5 \pm 0.9$ ,  $48.3 \pm 5.3$ ,  $37.6 \pm 6.6$ ,  $34.9 \pm 4.7$ 개(cells/120,000  $\mu\text{m}^2$ )로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.01$ )(Fig. 12).

### 12. 결장 조직에서의 BAX의 발현변화

결장 조직에서의 BAX(Bcl-2-associated X)의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 감소되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 11).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각  $11.1 \pm 0.8$ ,  $32.5 \pm 3.5$ ,  $29.5 \pm 2.7$ ,  $28.5 \pm 3.3$ 개(cells/120,000  $\mu\text{m}^2$ )로 측정되어, 고농도군에서 대조군과 비교하여 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 12).

### 13. 결장 조직에서의 Bcl-2의 발현변화

결장 조직에서의 Bcl-2(B-cell lymphoma 2)의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 증가되었는데, 저농도군에 비해 고농도군에서 더욱 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 11).

일정 단위면적 당 발현세포수를 비교한 수치에서도 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군이 각각  $9.7 \pm 1.2$ ,  $26.7 \pm 4.0$ ,  $30.8 \pm 2.8$ ,  $36.5 \pm 5.3$ 개(cells/120,000  $\mu\text{m}^2$ )로 측정되어, 저농도군, 고농도군 모두에서 대조군에 비해 발현이 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ).

한편, 저농도군과 비교하여 고농도군에서 유의성 있는 발현 감소가 확인되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 12).

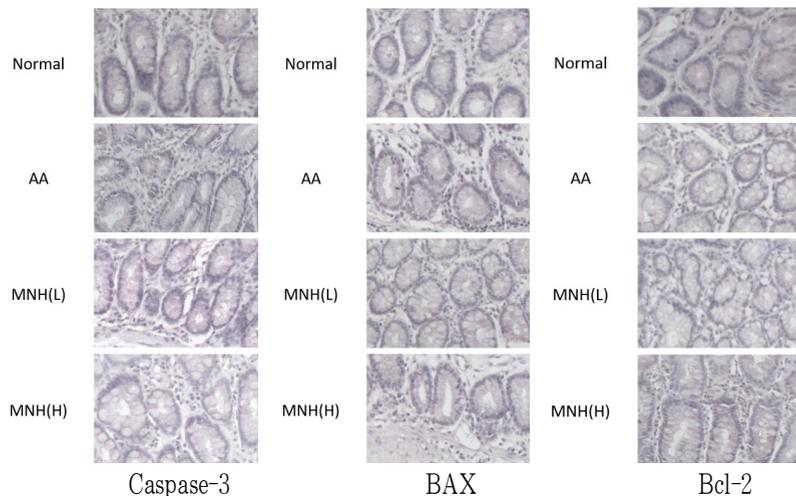
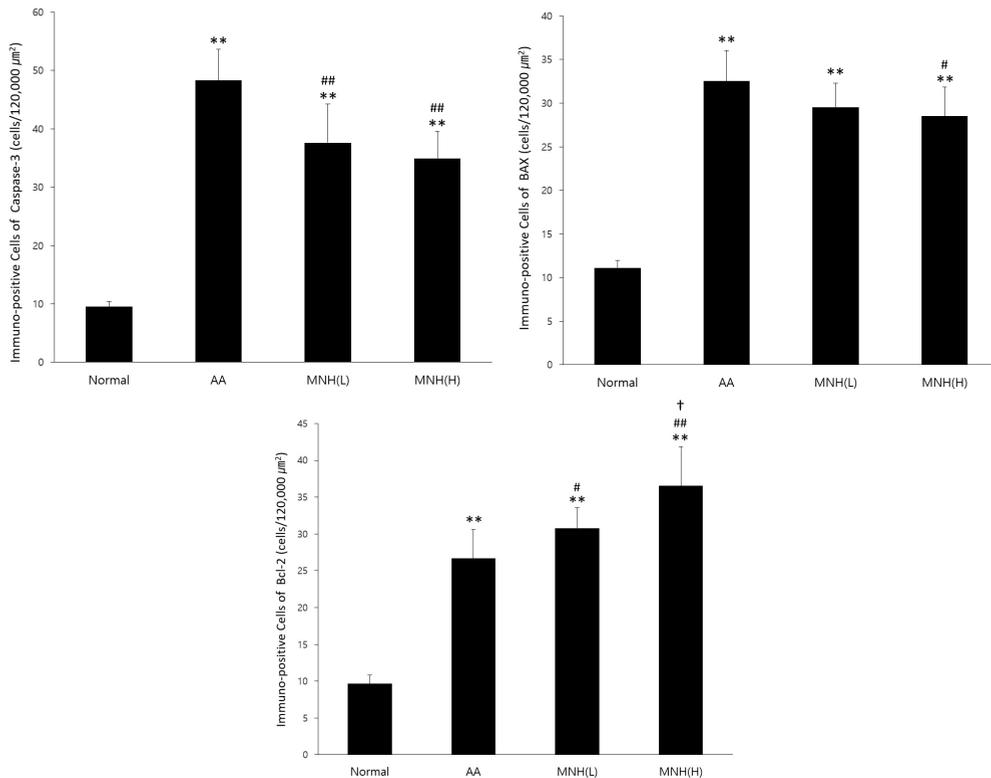


Fig. 11. Representative images of immunohistochemical expression of Caspase-3, BAX, Bcl-2 in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups (magnification, x200).

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*



	Normal	AA	MNH (L)	MNH (H)
Caspase-3	9.5±0.9	48.3±5.3**	37.6±6.6*##	34.9±4.7***#
BAX	11.1±0.8	32.5±3.5**	29.5±2.7**	28.5±3.3***
Bcl-2	9.7±1.2	26.7±4.0**	30.8±2.8***	36.5±5.3***#†

(cells/120,000 μm<sup>2</sup>)

Fig. 12. Caspase-3, BAX immunopositivities of colon in rats of normal, AA, MNH (L), and MNH (H) groups.

Data represent the mean±S.D.

\*\*  $p < 0.01$  compared with Normal group

#  $p < 0.05$  compared with AA group

##  $p < 0.01$  compared with AA group

AA : acetic acid. MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*. MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

#### 14. BAX/Bcl-2 비율 변화

BAX/Bcl-2 비율을 비교한 결과에서는 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군에서 각각 1.15, 1.22, 0.96, 0.78로 측정되어 저농도군, 고농도군에서 대조군에 비해 상대적으로 감소되는 것으로 확인되었다(Table 2).

Table 2. BAX/Bcl-2 Ratio

Normal	AA	MNH (L)	MNH (H)
1.15	1.22	0.96	0.78

AA : acetic acid, MNH (L) : low concentration of *Mannyeon-hwan*, MNH (H) : high concentration of *Mannyeon-hwan*

## IV. 고 찰

궤양성 대장염은 대장의 점막 또는 점막하층에 국한된 염증과 궤양을 특징으로 하는 원인불명의 만성 염증성 장질환이다. 설사, 직장 출혈, 후중증, 점액 배출 및 경련성 복통, 체중감소, 발열 등이 주 증상이다<sup>18</sup>. 궤양성 대장염 환자 중 약 70% 정도는 전형적인 만성, 반복성 재발의 경과를 밟으며, 25년 안에 다시 발생할 확률이 약 90% 정도이다<sup>19</sup>.

궤양성 대장염은 북미와 북유럽에서 유병률이 높은 질환이다. 하지만 최근에는 남유럽, 아시아 지역에서의 발병률도 증가하고 있는 추세이다. 아시아 국가에서의 발생률을 분석한 문헌 고찰 연구에 따르면 특히 우리나라에서 가장 높은 발생률을 보였다<sup>20</sup>. 국내 궤양성 대장염으로 진료를 받은 환자의 수는 2013년 약 31만명에서 2022년 약 55만명으로 증가하여 매년 평균 6.6%씩 증가하는 추이를 보였다. 2022년 기준 총 국내 궤양성 대장염 환자 중 남성과 여성의 비율은 약 6:4 정도로 보고되었다. 연령대로는 20대에서 가장 높은 유병률을 보였으며, 20-49세가 56.7%를 차지하였다<sup>3,36</sup>. 국내에서 궤양성 대장염을 진단받은 환자의 50% 이상이 약물 치료를 하고 있으며, 약물의 처방일수는 매년 평균 300일을 초과한다<sup>3</sup>. 궤양성 대장염 환자의 총 약품비도 2016년에는 약 9억 6천만원에서 2020년에는 21억 9천만원으로 5년간 2배 이상의 증가하였고, 연평균 증가율은 25.2%로 나타났다<sup>1</sup>. 이처럼 궤양성 대장염 환자의 지속적인 증가와 함께 고가의 새로운 약물이 개발되고, 사용량이 증가함에 따라 전체 환자들의 약품비가 증가하고 있으며, 이로 인해 궤양성 대장염에 관한 사회, 경제적인 부담이 커지고 있다.

궤양성 대장염의 진단은 대장내시경검사와 대장 점막조직의 생검을 통해 특징적인 소견을 확인한다. 대장내시경검사서 주로 직장 점막의 염증이 관찰되며, 염증이 연속적이고, 대칭적으로 나타나는 특징이 있다. 대장내시경검사나 대장조영검사를

통해 점막표면의 미만성 변화, 다발성 미란, 궤양, 가성용종증, 결장팽기의 소실이나 장관의 협착을 확인할 수도 있다. 대장점막조직 생검을 통해 활동기에는 염증소견을 확인할 수 있고, 관해기에는 대장선와의 구조적 변형을 확인할 수 있다<sup>18</sup>.

궤양성 대장염은 많은 연구에서 치료 방법이 제시되고 있으나 완치보다는 관해를 유지하여 환자의 삶의 질을 높이는 데 초점을 두고 있다<sup>18</sup>. 궤양성 대장염의 치료에는 면역조절제인 5-ASA(aminosalicylic acid) 투여를 기반으로 한 치료법을 우선적으로 선택하고, 광범위한 대장염 치료에는 코르티코스테로이드를 치료약물로 사용한다. 코르티코스테로이드의 효과가 없거나, 부작용이 나타날 때에는 항TNF제가 치료약으로 가장 선호된다. 조절되지 않는 출혈, 천공, 악성 종양, 내과적 치료에 반응이 없는 경우, 부작용으로 약제를 지속적으로 투여하기 어려운 경우 수술을 한다<sup>21</sup>. 다른 아시아 국가들보다 우리나라에서 수술적 치료를 시도하는 비율은 낮은 것으로 보고되었다<sup>2</sup>. 또한 이차적으로 대장암의 발생 위험이 높아 관해를 유지하여 질병의 재발을 막는 것이 중요하다<sup>21</sup>.

궤양성 대장염은 크론병과 감별이 필요하다. 크론병은 수양성 설사와 복통이 주된 증상이며, 발열과 같은 전신 증상이 동반되기도 한다. 내시경검사서 중추성 궤양이나 조약돌 점막상 궤양을 확인하여 크론병을 진단한다. 궤양성 대장염은 병변의 위치가 대장에 국한되지만, 크론병은 구강부터 항문까지 소화관의 모든 범위에서 병변이 일어날 수 있다. 조직검사를 통해 비천락성 유사상피세포 육아종을 확인하는 것도 크론병의 진단에 도움이 된다<sup>7</sup>.

만년환은 ○○한의원의 경험방으로, 《한방임상학》<sup>22</sup>에 수록된 쾌통환에 지사를 목적으로 육두구를 가미하고, 구성약재의 용량을 조절한 가감방이다. 《한방임상학》에서 쾌통환의 적응증은 급성 위염, 만성 위염, 위궤양, 위산과다증, 십이지장궤양증, 무산증, 위무력 및 위하수 등 급만성 위장질환이다. ○○한의원에서는 만년환을 위장뿐만 아니

라, 소장, 대장을 포함한 소화기의 염증성 질환에 광범위하게 처방하고 있다. 특히 임상에서 케양성 대장염이나 크론병과 같은 만성 염증성 장질환에 만년환이 유효한 치료효과를 보이고 있다.

만년환의 구성약재를 본초학적으로 해석하면, 방향화습약인 곽향, 후박, 사인, 이기약인 향부자, 목향, 소식약인 산사, 구충약인 빈랑, 보기약인 인삼, 백출, 감초, 온리약인 건강, 온화한담약인 백개자, 지사약인 육두구를 조합한 처방이다. 기본적으로 거습, 소도시키는 약재를 위주로 하여 급성 장염의 제반증상 완화에도 효과적이지만, 보기하고, 온보시키는 약재를 배합하여 위장관 기능을 개선시키고, 면역기능을 향상시켜 만성 장염의 증상 완화 및 관해에도 효과가 있다<sup>23</sup>.

만년환의 케양성 대장염에 대한 효과와 관련하여 각각 한약의 성분과 약리 작용에 대해 문헌적으로 고찰해보면 향부자는 장관 평활근에 대하여 papaverine과 유사한 억제활성을 가진다고 알려져 있다. 향부자가 배합된 처방이 염증성 대장염에 대조약물로 사용된 prednisolone과 유사할 정도의 활성을 가지고 있다고 보고되어 있다. 목향은 항균 작용, 항염증 작용, 혈관생성 억제 효능 등을 지니고 있으며 위암과 대장암의 세포증식을 억제할 수 있다. 특히 포도상구균, 연쇄상구균에 대한 항균작용이 강하여 세균성장질환에 항균작용을 하고 내장벽의 혈관을 확장하여 혈액순환을 촉진하는 것이 알려져 있다. 곽향의 정유성분은 위장점막으로부터 위즙분비를 촉진하고 소화를 돕는다. *Leptospira*를 사멸시키며, 곰팡이 및 세균의 성장을 억제한다. 특히 *pogostol*은 *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida albicans* 등에 유효하다. 백개자는 주로 *sinapine*과 *sinapic acid*가 주요 활성성분으로 항염증, 항종양, 소화분비계통에 일정한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 빈랑자는 항염증, 면역조절, 인지기능 개선, 항암 등에 대한 효과가 연구되고 있다. 육두구는 성분인 *malabaricone B*와 *C*는 모두 강한 항균작용을 갖고 있으며, *terpene*류도 항균효과가 있

고 *H. pylori*의 성장을 억제하며 용량 의존적으로 소염작용과 진통작용 그리고 항혈전작용을 나타내었다. 산사의 유기산과 플라보노이드 화합물은 소화 촉진, 항균, 황산화, 면역 촉진 등의 작용이 있다. 후박의 주성분인 *magnolol*은 위산분비와 위궤양을 억제했으며 히스타민으로 유도한 십이지장 경련도 억제하였다<sup>10,11,16,17,24</sup>. 만년환 구성약재의 대부분이 기본적인 항염증, 항균 작용과 소화기능을 촉진하는 효능을 가지고 있었다.

본 연구는 만년환의 케양성 대장염에 대한 치료 효과를 평가하고자, *acetic acid*로 케양성 대장염을 유발한 흰쥐의 체중 변화, 결장의 병리적 변화, 결장조직의 손상지표, 결장 점막의 해부조직학적 변화를 확인하였다. 또한 케양성 대장염의 발생기전은 염증성 사이토카인 생성의 증가와, 장 세포의 apoptosis 증가를 포함한다<sup>23</sup>. 따라서 염증성 사이토카인 발현을 평가할 수 있는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, 염증 활성화 효소인 MPO, COX-2, 장 세포의 apoptosis를 평가할 수 있는 *caspase-3*, BAX, Bcl-2을 평가 변수로 두고 실험을 진행하였다.

케양성 대장염과 크론병으로 대표되는 염증성 장 질환의 실험 모델은 아직 정형화되고 표준화된 모델이 없기 때문에 연구 목적에 부합하는 모델을 찾아 수행한다. 케양성 대장염은 *acetic acid*, *trinitrobenzene sulfonic acid* (TNBS), *Dextran sulfate sodium* (DSS), *Peptidoglycan-polysaccharide*, *Indomethacin*, *Oxazolone*, *Carrageenan*, *Lymphogranuloma venereum* 등의 용액을 동물의 장에 주입하여 유발할 수 있다. 약물에 따라 동물의 사망률, 비용, 수행 난이도, 염증 발생 위치 등의 차이를 보인다<sup>25</sup>. *Acetic acid*를 주입하는 실험모델은 *MacPherson*과 *Pfeiffer*에 가장 먼저 시행된 방법으로, 경제적이고 모델 제작이 간단하다는 장점이 있으며, 혈변, 체중 감소, 점막 궤양, 점액 분비의 변화, 비특이적 염증 반응 등 케양성 대장염 환자와 유사한 임상 양상을 발현시키기 때문에 본 연구에서 활용하게 되었다<sup>26</sup>.

본 연구에서는 *acetic acid*로 유발된 케양성 대장

염에 만년환의 효과를 검증하고, 나아가 만년환의 투여량에 따른 효과 차이를 비교하고자 흰쥐를 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군으로 나누어 실험하였다. 흰쥐의 항문으로 카테터를 이용해 acetic acid를 주입하여 대장염을 유발시켰다. 만년환은 흰쥐의 대사량을 반영하여 흰쥐 1마리당 저농도군에는 1회 262.5 mg, 고농도군에는 1회 525.0 mg을 매일 같은 시간 0.1 ml의 음용수에 녹여 경구 투여하였다.

체중감소는 궤양성 대장염 환자의 주 증상 중의 하나로, 영양 흡수 감소, 식욕 감소, 만성 염증으로 인한 에너지 소모 증가, 대장의 기능저하 등으로 인해 복합적으로 발생할 수 있다. 궤양성 대장염을 진단받은 환자 중 약 51%에서 BMI 상 5% 이상의 체중감소를 동반한다고 보고되었으며<sup>27</sup>, 이전에 발표된 궤양성 대장염 모델의 동물실험 연구에서도 체중이 감소하는 것으로 보고되었다<sup>9</sup>. 본 연구에서도 실험 기간 동안 체중이 약간씩 증가하던 일반군에 비해 대조군, 저농도군, 고농도군 모두 체중이 감소하였으나, 실험 6일 제부터 저농도군, 고농도군은 대조군에 비해 유의한 체중 회복을 나타내었다( $p<0.05$ ) (Fig. 1).

흰쥐를 해부하여 결장점막의 손상정도를 육안적으로 평가하였을 때 대조군의 경우 결장의 출혈, 점막 손상, 부종이 심하게 관찰되었으나, 저농도군과 고농도군에서는 육안적으로 병리적 변화의 완화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 결장점막 손상지표(CMDI)는 정상 점막을 0점으로, 손상 정도에 따라 최대 4점으로 점막의 손상 정도를 수치화 하여 평가하는 지표이다. 기존의 연구에서도 궤양성 대장염의 치료효과를 흰쥐의 결장점막 손상지표를 활용하여 비교하였다<sup>9</sup>. 본 연구에서도 결장점막 손상지표가 대조군의 경우는  $3.5\pm 0.5$ 점인 반면, 저농도군과 고농도군에서는 각각  $2.8\pm 0.7$ 점,  $2.6\pm 0.7$ 점으로 측정되었다. 저농도군과 고농도군 모두에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 관찰되었다( $p<0.05$ ) (Fig. 3).

각 실험군에서 동일한 부위의 결장조직을 채취

하여 H&E 염색 후 현미경으로 관찰하였을 때 대조군에서는 점막, 고유판, 점막하조직, 근육층까지 전체적으로 염증세포가 침착되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 저농도군과 고농도군에서는 염증세포의 침착이 현저히 억제되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 특히 저농도군에 비해 고농도군에서 뚜렷한 경향이 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 체중평가, 결장조직의 육안적 평가, 결장조직 손상지표의 비교, 결장점막의 해부조직학적 평가를 종합해 보았을 때, 만년환이 장내 염증 반응을 억제하여 장의 점막 손상을 회복하고, 감소된 체중을 회복하는 데 효과가 있을 것으로 유추할 수 있다.

TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 는 대식세포 매개 염증반응을 평가하기 위해 주로 활용되는 염증성 사이토카인으로, 궤양성 대장염의 염증 상태 유도 및 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>28</sup>. 이전의 동물실험 연구에서도 염증성 사이토카인의 변화를 통해 궤양성 대장염의 치료효과를 확인하였다<sup>9,28</sup>. 본 연구에서도 acetic acid를 처치한 군에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 가 현저하게 증가되는 것을 확인하였다( $p<0.01$ ). 또한 대조군과 비교하였을 때 TNF- $\alpha$ , IL-6는 저농도군( $p<0.05$ )과 고농도군( $p<0.01$ ) 모두에서 유의성 있게 감소되었고, IL-1 $\beta$ 는 고농도군에서만 유의성 있게 발현이 감소되었다( $p<0.01$ ) (Fig. 5, 6). 이를 통해 만년환이 궤양성 대장염과 밀접한 관계가 있는 염증 촉진 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 발현을 억제하여, 염증반응을 감소시키는 것으로 유추할 수 있다.

NF- $\kappa$ B p65는 염증반응의 주요 전사인자로 비활성화 상태에서는 세포질에 존재하며, 염증신호에 의해 활성화되면 핵 내로 전위하여 염증성 유전자의 전사를 촉진하여 염증성 사이토카인을 증가시키고, 세포 증식, apoptosis, 종양화에 역할을 하는 단백질이다. NF- $\kappa$ B p65가 적당히 활성화될 경우 장 점막 조직의 방어기능이 향상되지만 지나치게 활성화될 경우 장 점막 조직이 염증에 의해 손상

될 수 있으며, 궤양성 대장염 환자의 장 조직에서 NF- $\kappa$ B p65의 활성이 크게 증가되어 있다<sup>29</sup>. NF- $\kappa$ B의 활성을 억제함으로써 만성 염증성 장 질환을 현저히 억제할 수 있다는 연구들이 보고되고 있어, 궤양성 대장염 치료를 평가하는 중요한 지표로 사용되고 있다<sup>30</sup>. 이전의 동물실험 연구에서도 NF- $\kappa$ B의 변화를 통해 궤양성 대장염의 치료효과를 확인하였다<sup>10,11</sup>. 본 연구에서는 일반군에 비해 대조군, 저농도군, 고농도군에서 NF- $\kappa$ B p65의 발현이 증가하였으나( $p < 0.01$ ), 대조군에 비해 저농도군, 고농도군에서는 발현이 유의성 있게 적었다( $p < 0.01$ ). 또한 고농도군이 저농도군에 비해 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 7, 8). 이를 통해 만년환이 궤양성 대장염에서 대장 조직을 손상시키고, 염증을 지속시키는 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여, 염증반응을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

MPO는 호중구 매개 염증반응을 평가하기 위해 활용되는 지표이다. 정상 상태의 호중구는 혈관에 상주하지만, 염증 상태에서 호중구는 감염 부위로 유입하여 염증 반응을 일으키며, 탈과립에 의해 MPO가 주변에 분비된다. 따라서 MPO의 활성도를 측정하면 호중구의 침윤 정도 및 염증 반응의 세기를 확인할 수 있다<sup>31</sup>. 이전의 동물실험 연구에서도 MPO의 활성 변화를 통해 궤양성 대장염의 치료효과를 확인하였다<sup>11,28</sup>. 본 연구에서는 일반군에 비해 대조군, 저농도군, 고농도군에서 MPO의 발현이 증가하였으나( $p < 0.01$ ), 대조군에 비해 저농도군, 고농도군에서는 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.01$ ) (Fig. 9, 10). 이를 통해 만년환이 궤양성 대장염의 염증 활성화 지표인 MPO의 발현을 억제할 수 있다는 것을 확인하였다.

COX-2는 인체 염색체의 1번에 위치하여, 정상상태에서는 발현되지 않지만, 염증을 유발할 수 있는 외부 자극에 의해 일시적으로 발현되는 IEG(immediate early gene)으로 알려져 있다<sup>32</sup>. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS(inducible nitric oxide synthase), growth factors 등의 자극에 의해 유도되고, 염증조직에서

프로스타글란딘을 생성하여 설사, 염증, 통증을 유발하며, 이러한 기전들이 반복되어 만성 염증을 나타낸다<sup>27,32</sup>. 궤양성 대장염에 대한 이전의 동물실험 연구에서 정상적인 대장조직에 비해 대장 상피의 COX-2, PGE2(prostaglandin E2) 및 iNOS 단백질 발현이 증가되어 염증성 부종 및 과다혈류 등이 유발되는 것으로 보고되었으며<sup>32</sup>, COX-2의 활성 변화를 통해 궤양성 대장염의 치료효과를 확인하였다<sup>8,10,11</sup>. 본 연구에서 일반군에 비해 대조군, 저농도군, 고농도군에서 COX-2의 발현이 증가하였으나( $p < 0.01$ ), 대조군에 비해 저농도군, 고농도군에서는 발현이 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 9, 10). 이는 염증으로 인한 대장 점막의 급속한 손상 시 COX-2 분포가 증가하고, 만년환이 염증반응을 지속시키는 COX-2의 발현을 억제시켜 염증의 증가를 억제하고 점막을 보호하는 효과를 나타내는 것으로 해석할 수 있다.

대장에서의 염증반응은 대장점막 장벽의 기능을 약화시키고 apoptosis를 유발하므로, 궤양성 대장염 발생의 병리과정에 apoptosis가 관여하는 것으로 밝혀졌다<sup>33</sup>. apoptosis는 세포의 정상적인 발달과 분화에 관여할 뿐 아니라, 손상된 세포의 제거를 위한 중요한 수단이다. apoptosis에서 caspase는 중재자 역할을 하며, 그 중에서도 caspase-3는 가장 마지막에 활성화되어 세포를 사멸시키는 단백질이다<sup>34</sup>. 이전의 동물실험 연구에서도 caspase-3의 활성 감소를 통해 궤양성 대장염의 치료효과를 확인하였다<sup>28</sup>. 본 연구에서 결장 조직에서의 Caspase-3의 발현은 일반군에서는 미약하게 관찰되었으나, 대조군, 저농도군, 고농도군에서는 뚜렷한 발현 증가가 관찰되었다( $p < 0.01$ ). 반면, 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비해 상대적으로 발현이 유의성 있게 감소되었다( $p < 0.01$ ) (Fig. 11, 12).

Apoptosis는 세포의 필수적인 이화과정으로 장 환경의 안정성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 하지만 부적절한 apoptosis는 장상피의 소실, 장벽의 기능장애, 박테리아 전이를 촉진하여 만성 위장

장애를 유발하기 때문에 궤양성 대장염의 발병과 진행에 있어 필수적인 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>22</sup>. 그러므로 많은 연구에서 궤양성 대장염에 대한 치료 효과를 보고할 때 apoptosis를 억제하는 효과를 함께 보고하고 있다<sup>8,11</sup>. Apoptosis는 pro-apoptotic(BAX) 및 anti-apoptotic(Bcl-2) 메커니즘을 통해 조절된다. BAX는 apoptosis를 촉진하고, Bcl-2는 반대로 억제하는 역할을 하며, 궤양성 대장염에서도 apoptosis가 활성화되면서 BAX, Bcl-2의 발현이 증가하는 기전을 따른다<sup>35</sup>. 본 연구에서도 BAX, Bcl-2의 발현은 일반군에서는 미약하였으나, 대조군, 저농도군, 고농도군에서는 뚜렷한 증가가 관찰되었다( $p<0.01$ ). 대조군과 비교하여 BAX의 발현은 고농도군에서는 유의미한 감소가 나타났다( $p<0.05$ ). Bcl-2의 발현은 저농도군과 고농도군에서 유의미한 증가가 나타났으며, 저농도군( $p<0.05$ )보다 고농도군( $p<0.01$ )에서 유의성이 높았다. Bcl-2의 발현은 저농도군과 비교했을 때 고농도군에서 유의미한 증가를 확인하였다( $p<0.05$ ). 마지막으로, BAX/Bcl-2 비율을 비교해보면 일반군, 대조군, 저농도군, 고농도군에서 각각 1.15, 1.22, 0.96, 0.78로 측정되어 저농도군, 고농도군에서 대조군에 비해 상대적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11, 12).

Caspase-3와 BAX, Bcl-2 유전자의 발현을 통해 유추해 볼 때, 만년환은 apoptosis를 억제함으로써 상피 손상을 억제하고, 항염증효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

또한 만년환은 임상에서 성인 기준 1일 3회, 1회 20환씩 복용한다. 본 연구에서는 흰쥐의 대사량을 고려하여 성인의 1일 복용량을 기준으로 고농도군의 만년환 투여량을 결정하였고, 저농도군은 고농도군의 절반으로 설정하였다. 실험 결과에서 저농도군보다 고농도군에서 더 나은 치료효과가 나타났으며, 특히 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B p65, BAX, Bcl-2의 발현은 유의미한 차이가 나타났다. 이를 통해, 임상에서 사용하고 있는 만년환의 용량 적정성을 확인할 수 있었다.

이상의 실험을 통해 궤양성 대장염에 만년환이 장관 염증과 궤양의 손상을 예방하고 치료하는데 유의미한 효과가 있음을 객관적으로 확인할 수 있었다. 다만 본 연구는 흰쥐의 acetic acid로 유발된 궤양성 대장염 동물모델을 사용하여 얻은 결과로써, 실제 인체의 궤양성 대장염에 적용하기에는 한계가 있다. 따라서 잘 설계된 임상실험을 통하여 객관적 효과를 검증하는 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결론

Acetic acid로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염 모델에서 고농도와 저농도의 만년환을 2주간 투여하고 치료효과를 검증한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 만년환은 궤양성 대장염으로 인한 체중 감소를 유의성 있게 회복시켰다.
2. 만년환은 육안적인 점막의 병리적 변화를 완화시켰으며, 결장 점막 손상 지표를 유의성 있게 감소시켰다. 또한, 현미경 상에서의 점막에 대한 염증세포의 침착을 억제하였다.
3. 만년환은 염증유발 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 와, 염증반응의 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 발현을 감소시켰다. 특히 IL-6, NF- $\kappa$ B의 발현은 저농도군보다 고농도군에서 더 유의성 있게 감소하였다.
4. 만년환은 염증반응을 평가하는 지표인 MPO와 COX-2의 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
5. 만년환은 apoptosis에 관여하는 단백질인 Caspase-3의 발현을 유의성 있게 감소시켰다. Apoptosis를 촉진하는 BAX의 발현은 고농도군에서 유의성 있게 감소시켰고, apoptosis를 억제하는 Bcl-2의 발현은 저농도군과 고농도군 모두에서 유의성 있게 증가시켰다. BAX/Bcl-2 ratio는 대조군에 비해 상대적으로 감소하였다. 또한 Bcl-2의 발현

은 저농도군보다 고농도군에서 더 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 만년환은 궤양성 대장염에서의 결장 점막의 염증과 궤양을 억제하고 염증 관련 단백질들의 발현을 억제시킬 뿐만 아니라 apoptosis 관련 단백질의 발현을 조절함으로써 대장점막의 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 임상에서의 궤양성 대장염의 치료에 만년환을 활용하는 것에 대한 객관적 근거가 될 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. *Intest Res* 2016;14(2):111-9.
2. Song EM, Na SY, Hong SN, Ng SC, Hisamatsu T, Ye BD. Treatment of inflammatory bowel disease - Asian perspectives: the results of a multinational web-based survey in the 8th Asian Organization for Crohn's and Colitis meeting. *Intest Res* 2023;21(3):339-52.
3. Ha JE, Jang EJ, Im SG, Sohn HS. Medication Use and Drug Expenditure in Inflammatory Bowel Disease: based on Korean National Health Insurance Claims Data (2010-2014). *Korean J Clin Pharm* 2019;29(2):79-88.
4. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Acosta MB, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017;11(6):649-70.
5. Lee JH, Shin JS, Kim MR, Byun JH, Lee SY, Shin YS, et al. Liver enzyme abnormalities in taking traditional herbal medicine in Korea: A retrospective large sample cohort study of musculoskeletal disorder patients. *J Ethnopharmacol* 2015;169:407-12.
6. Lee BH. Herbal medicine for inflammatory bowel disease : systematic review and exploratory practice algorithm through case series. *Kyunghee University Graduate School* 2016.
7. Department of gastrointestinal medicine Korean medicine. *Gastrointestinal internal medicine*. Seoul: Gunja; 2008, p. 366-96.
8. Heo G, Jang MW, Lim SW. The Effects of Coicis Semen Extract (CSE) on Dextran Sulfate Sodium - Induced Colitis in Mice. *J Int Korean Med* 2012;33(4):520-32.
9. Kim ES, Shin MK, Kim TR, Shin MH, Lee YS. Effect of Ohmae-hwan and Mume Fructus on DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in a Mice Model System. *J Int Korean Med* 2015;36(3):284-96.
10. Bae KH, Kong KH. Effects of Gohwa-san on Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium in mice. *J Int Korean Med* 2010;31(3):513-25.
11. Choi JY, Ahn SH, Shih YH, Sa BS, Kim KB. Mitigating Effect of Jageum-jung on Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis through Anti-inflammatory Regulation. *J Int Korean Med* 2017;38(6):944-54.
12. Choi HJ, Kim YH, Baik YS, Ma MJ, Choi IY, Kim MK, et al. A Case of Ulcerative Colitis Diagnosed as Dual deficiency of the spleen-kidney Treated with Chojunggunbiwhan-gamibang. *J Int Korean Med* 2008;29(110):251-6.
13. Choi SW, Oh JS, Kim YS. A Case of Ulcerative

- Colitis Treated with Gohwasan and Gami-Jeonssibackchulsan. *J Int Korean Med* 2013; 34(104):157-63.
14. Kong WH, Kim BH, Kim WI. Effects of Mannyon-hwan on Acetic Acid-induced Colitis in Rats. *J Int Korean Med* 2023;44(6):1139-49.
  15. Choi SH, Park EJ. Effects of Paeoniae Radix, Glycyrrhiza Uralensis and Jakyakgamcho-tang Treatment on Ulcerative Colitis Animal Model: Including Changes in Metabolites. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine* 2022;36(3): 19-34.
  16. Chen Z, Ni W, Yang C, Zhang T, Lu S, Zhao R, et al. Therapeutic Effect of Amomum villosum on Inflammatory Bowel Disease in Rats. *Front Pharmacol* 2018;9:639.
  17. Park SM, Lee SH, Jung DU, Cho SJ, Shin MR, Park HJ, et al. Antioxidant Effect of Atractylodes macrocephala Koidzumi in DSS-induced Ulcerative Colitis Model. *The Korea Journal of Herbology* 2022;37(1):19-29.
  18. Yazaki Y, Asakura Internal medicine. Seoul: Woori Medical Books: 2020, p. 96-114.
  19. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 1994;107(1):3-11.
  20. Yang, SK, Yun S, Kim JH, Park JY, Kim HY, Kim YH, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14(4):542-9.
  21. Choi CH, Moon W, Kim YS, Kim ES, Lee BI, Jung YH, et al. Second Korean Guideline for the Management of Ulcerative Colitis. *Korean J Gastroenterol* 2017;69(1):1-28.
  22. Bae WS, Hanbangimsanghak. Seoul: Namsandang: 1976.
  23. Bonchohak co-editing committee. Bonchohak. Seoul: Younglimsa; 2020.
  24. Oriental Pharmacology Textbook Compilation Committee, Oriental Pharmacology. Seoul: Shinil Corporation: 2006.
  25. Jang BI. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. *Intest Res* 2008;6(1):8-18.
  26. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992;102(5): 1524-34.
  27. Bruner LP, White AM, Proksell S. Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care* 2023;50(3):411-27.
  28. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140(6):1756-67.
  29. Schottelius AJ, Dinter H. Cytokines, NF-kappaB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer. *Cancer Treat Res* 2006;130:67-87.
  30. Neurath MF. Pathogenesis of inflammatory bowel disease: transcription factors in the spotlight. *Gut* 1998;42(4):458-9.
  31. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018;640:47-52.
  32. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998;58(3):409-12.
  33. Becker C, Watson AJ, Neurath MF. Complex Roles of Caspases in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2013;144(2):283-93.
  34. Wan Y, Yang L, Jiang S, Qian D, Duan J. Excessive Apoptosis in Ulcerative Colitis: Crosstalk Between Apoptosis, ROS, ER Stress,

- and Intestinal Homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* 2022;28(4):639-48.
35. Wang Q, Zhang L, Yuan X, Ou Y, Zhu X, Cheng Z, et al. The Relationship between the Bcl-2/Bax Proteins and the Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway in the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells into Neurons. *PLoS One* 2016;11(10):e0163327.