

四君子湯이 TNBS로 誘發된 생쥐의 炎症性 腸疾患에 미치는 影響

홍상선, 류봉하, 윤성우, 김진성
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실

The effect of *Sagunja-tang* on TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease in Mouse

Sang-sun Hong, Bong-ha Ryu, Seong-woo Yoon, Jin-sung Kim
3rd Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

ABSTRACT

Objectives : The present study aimed to find out the effect of *Sagunja-tang* on the prevention and treatment of inflammatory bowel disease using mice with TNBS-induced inflammatory bowel disease.

Methods : Mice with TNBS-induced inflammatory bowel disease were medicated with *Sagunja-tang*, and the weight changes, colon length, lipid peroxidation, and myeloperoxidase activity were observed. Levels of the inflammatory markers interleukin (IL)-1 β and cyclooxygenase-2 (COX-2), its transcription factor activation, phospho-NF- κ B (pp65), in the colon by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis were also measured. Finally, the activation of fecal bacterial enzyme, β -glucuronidase and degradation activation of fecal glycosaminoglycan (GAG) and hyaluronic acid were observed.

Results : We found that oral administration of *Sagunja-tang* inhibited TNBS-induced colon shortening and also inhibited myeloperoxidase activity in the colon of mice as well as IL-1 β and COX-2 expression. *Sagunja-tang* also inhibited TNBS-induced lipid peroxidation and pp65 activation in the colon of mice. In addition, *Sagunja-tang* inhibited β -glucuronidase activation and fecal hyaluronic acid degradation activation.

Conclusions : It is supposed that *Sagunja-tang* has a potential therapeutic effect on inflammatory bowel disease through the inhibition of both NF- κ B activation and lipid peroxidation, and the improvement of intestinal conditions.

Key words : *Sagunja-tang*, Inflammatory Bowel Disease, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)

1. 서론

염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)이란 장에 만성적인 원인불명의 염증을 일으키는 질환으로 궤양성 대장염과 크론병을 지칭한다¹. 이 가운데 궤양성 대장염은 대장 점막 표면을 침범하는 특발성 염증성 병변으로 미란과 출혈을 야기하는 염증 또는 궤양이 직장에서 시작하여 연속적으

로 근위부로 진행하여 잦은 점액혈성 설사, 복통, 발열, 빈혈 등을 주증상으로 나타낸다². 지금까지 궤양성 대장염은 육식을 주로 하는 서구에서 많이 발생하는 질환으로 알려져 왔는데, 최근에 우리나라에서도 생활양식이 서구화되기 시작하면서 발생 빈도가 꾸준히 증가하고 있다³.

궤양성 대장염의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으며, 다만 유전적 소인, 환경적 요인, 장의 면역기능 이상, 장내 미생물의 감염, 정신적 요인 등이 추정되고 있다. 하지만 최근의 여러 연구에서 유전적으로 발병하기 쉬운 개체에서 환경적인 인자들이 장내 정상세균총을 변화시킴으로써 장점막

· 교신저자: 류봉하 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방3내과
TEL: 02-958-9137 FAX: 02-958-9136
E-mail: rbongh@khu.ac.kr

면역계가 장내 유해미생물에 대한 내성을 상실하고 비정상적으로 활성화됨으로써 장점막 조직에 염증반응을 발생시키게 된다고 보고되었다⁴.

현대의학에서는 염증 및 면역 반응을 전반적으로 억제하는 치료법이 사용되고 있으나 아직 원인이 밝혀지지 않아 근본적인 치료는 이루어지지 못하고 있으며 장기간 사용에 의한 부작용, 빈번한 재발, 발암화가 문제시 되고 있다². 따라서 궤양성 대장염을 치료하는데 있어서 부작용을 낮추고 효과적인 치료법을 찾기 위해 biological agents, leukocytapheresis(LCAP), 기생충의 면역반응 억제력, probiotics 등의 다양한 치료방법에 대해 연구하고 있으며³, 최근에는 장에 유익한 유산균이라고 할 수 있는 probiotics가 유망한 치료제로 부상하고 있다.

한의학계에서도 궤양성 대장염에 대한 많은 연구가 이루어져 임상연구로는 芍藥湯加味方⁶, 托裏消毒飲⁷, 補腸健脾湯加減方⁸의 증례보고가 발표된 바 있으며, 실험적 보고로는 黃連解毒湯⁹, 導赤地榆湯¹⁰, 茵陳五苓散¹¹, 赤小豆當歸散¹² 등의 祛邪法 위주 처방의 연구가 보고되었다. 그러나 최근 현대의학의 여러 연구에서 주목하고 있는 장관내 면역기능은 한의학에서 衛氣의 작용과 관련성이 있으며, 이는 한의학의 치료법 중 扶正法에 가깝다 할 수 있다. 이러한 扶正治法에 대응되는 補氣劑의 대표방으로 人蔘, 白朮, 白茯苓, 甘草로 구성된 四君子湯을 들 수 있다. 현재까지 四君子湯과 면역과의 상관성을 연구한 보고가 있었으나¹³ 궤양성 대장염에 대하여 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 四君子湯이 궤양성 대장염의 예방이나 치료에도 효과가 있을 것으로 사료되어, 그 효능을 밝히기 위하여 생쥐를 이용해 TNBS로 염증성 장질환을 유발하여 四君子湯을 투여하여 생쥐의 체중변화, 대장점막의 육안형태변화, 대장길이, 조직학적 염색소견, 장점막 호소활성, immunoblot을 이용한 생화학적 지표, enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용한 생화학적 지표 및 분변 중 세균성 호소활성 및 glycosaminoglycan(GAG)

분해활성에 대한 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 시 료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), tetramethyl benzidine, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS), hexadecyl trimethyl ammonium bromide, p-nitrophenyl-β-D-glucuronide, hyaluronic acid, L-α-phosphatidylcholine, radio-immunoprecipitation assay(RIPA) lysis 완충액은 Sigma Co.(St Louis, MO, USA)로부터 구입했다. Microtomb을 사용한 Cryo-section 및 Hematoxyline-Eosin staining에 쓰인 Cryout Microtome-CM1850은 Leica Microsystems(Nussloch GmbH, Germany)에서 구입했고, Optimal Cutting Temperature(OCT) compound는 Sakura Finetek(CA 90501, U.S.A)에서 구입했다.

Protease inhibitor cocktail은 Roche Applied Science(Mannheim, Germany)로부터 구입했다. Enzyme-linked immunosorbent assay(=ELISA) kit은 Pierce Biotechnology Inc.(Rockford, IL, USA)로부터 구입했다. 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입했다. Enhanced chemiluminescence(=ECL) immunoblot system은 Pierce Co.(Rockford, IL, USA)로부터 구입했다.

2) 동 물

5주령 ICR계 수컷 생쥐(24-28g)는 Orient Experimental Animal Breeding Center에서 공급되었다. 20-22℃, 50±10% 습도 조건에서 표준 실험실 먹이(삼양사, 서울, 한국)와 물을 임의로 먹도록 하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후에 사용하였다.

모든 과정에서 동물과 동물의 사육과 관련된 절차는 국제 가이드라인 'Principles of Laboratory Animals Care'(NIH publication no. 85-23 revised 1985)에 따랐다.

3) 약재

이 실험에 사용한 약재는 경희의료원 한방병원 약제과에서 구입 정선한 후 사용하였고, 四君子湯의 내용과 분량은 陳¹⁴의 太平惠民和劑局方에 준하였으며, 구성약재와 1첩의 분량은 다음과 같다(Table 1).

처방 500g을 2.5L의 물에 넣어 水浴 상에서 2시간 환류추출한 후 여과하였다. 그 여액을 rotatory evaporator를 이용하여 감압농축한 후 동결건조하여 얻은 실험재료를 냉장보관하였다가 생쥐에게 경구투여하기 직전에 생리식염수에 용해시켜 검액으로 사용하였다. 얻어진 추출물의 수율은 20.1%이었다.

Table 1. Prescription of *Sagunja-tang*

Herbal name	Scientific name	Amount(g)
Ginseng Radix	<i>Panax Ginseng C. A. Meyer</i>	5.00
Attractylodis Macrocephalae Rhizoma	<i>Attractylodes macrocephala Koidzumi</i>	5.00
Hoelen	<i>Poria cocos Wolff</i>	5.00
Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer et. De Candolle</i>	5.00
Total amount		20.00

2. 방법

1) 동물모형 제작 및 검액투여

생쥐에 대장염을 유발하기 위해 에테르로 가법

게 마취된 생쥐에 존대를 항문으로 3.5-4cm 삽입하여 2.5%(w/v) TNBS 함유 50% 에탄올 용액을 0.1 ml 주입하였으며, 주입후 30초간 꼬리를 위로 들어서 주입된 약물이 항문을 통해 흘러나오지 않도록 하여 최대한 직장내로 약물이 흡수되도록 하였다. 생쥐의 95%는 TNBS 관장을 유지했으나 혼합액이 흘러나온 경우는 실험에서 제외시켰다.

정상군은 멸균식염수만 주었고, 대장염 유발 대조군은 3일째에 TNBS로 대장염을 유발시켰다. 대장염 유발 2일전부터 유발후 2일까지 총 5일간 四君子湯을 투여하여 예방효과와 치료효과를 관찰한 실험군으로 四君子湯 20mg/kg를 투여한 실험군(以下 SGJ20×5)과 50mg/kg를 투여한 실험군(以下 SGJ50×5)과 대장염 유발한 후 3일간 四君子湯을 투여하여 치료효과를 관찰한 실험군으로 四君子湯 20mg/kg를 투여한 실험군(以下 SGJ20×3)과 50mg/kg를 투여한 실험군(以下 SGJ50×3)으로 나누었다. 양약 대조군으로 sulfasalazine 50mg/kg를 대장염 유발 2일전부터 유발후 2일까지 총 5일간 투약한 군(以下 Ss50×5)의 7개 그룹으로 나누었고, 생쥐는 무작위로 선정했으며, 각 그룹은 5마리의 생쥐로 구성하였다. 검액의 투여는 매일 오전 10시에 1회 투여하였다. 체중 측정은 실험 시작일, 3일, 5일째에 시행하였다.

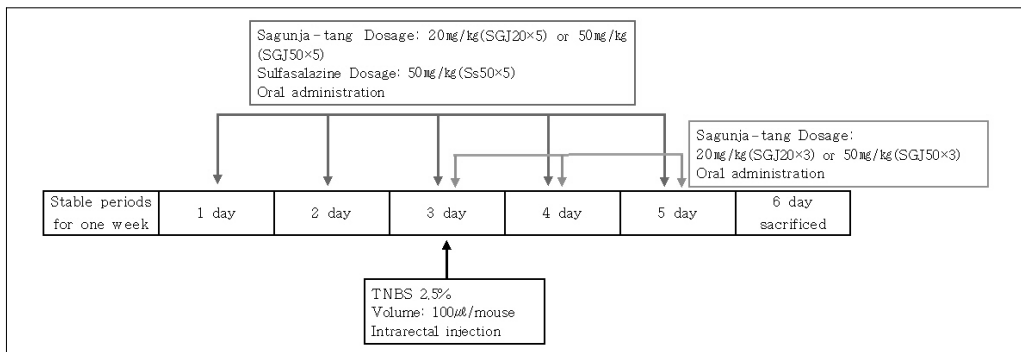


Fig. 1. The schematic schedule of the experimental protocol showing.

TNBS-induced colitis and *Sagunja-tang* treatments.

2) 부검후 육안적 형태변화 소견 및 대장의 길이 측정

에테르 마취하에 동물을 희생하여 복부를 정중 절개하고, 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장으로부터 대장 끝까지 길이를 측정하고, 장을 가른 후 장 내용물을 제거하고 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하여 직장에서부터 맹장까지 궤양과 미란 등의 병변이 있는지 두 명의 실험자가 관찰한 후 대장병변의 정도를 Table 2의 기준대로 분류하였다¹⁵.

Table 2. Grading Criteria for Macroscopic Damage Score of Intestine

Grade	Description
0	no ulcer, no inflammation
1	no ulcer, local hyperemia
2	ulceration without hyperemia
3	ulceration and inflammation at one site only
4	two or more sites of ulceration and inflammation
5	ulceration extending more than 2cm

일부는 장점막을 분리하여 myeloperoxidase(MPO) 효소활성, 염증관련효소와 인자, cytokine들의 발현량을 측정하는데 사용하였다. 일부는 조직검사를 위해 10% 완충된 포르말린으로 고정하였다.

3) 조직학적 염색소견에 대한 관찰

조직을 4% PFA(para-formaldehyde)에 담귀 고정시킨다. 다음날 PBS로 3번(1hr/each time) 씻어내고 15% sucrose에 2번(1hr/each time) 씻어서 30% sucrose에 8시간동안 담귀 탈수시킨다. 3일째 되는 날 블록틀에 넣고 -25℃에서 OCT compound로 section용 block을 만들어 5μm로 조직 section을 한다. 슬라이드 글라스에 5μm 절편을 붙이고 슬라이드에 붙어있는 OCT compound를 PBS로 2분간 씻어낸다. HE(hematoxylin-eosin)염색은 hematoxylin에 30-45초, PBS로 30-45초 씻어낸 후에 eosin에 3분, 90% EtOH에 2분, 99% EtOH에 2분, xylene에 2분간 담근 뒤에 커버글라스로 마운팅 후 현미경으로 관찰하였다.

4) 장점막의 효소활성 측정

(1) 장점막 처리

대장을 해부하여 장내 내용물을 제거하고 생리 식염수로 세척하여 장점막을 분리한 후 장관을 ice-cold 관류 용액(0.15M KCl, 2mM EDTA, pH 7.4)으로 관류하고 50mM 트리스 염산 완충액(Tris-HCl buffer, pH 7.4)에서 homogenation해서 균질화했다. 4℃, 10000×g로 30분동안 원심분리한 후 상층액은 산화방지제 방어체계의 측정에 사용하였다.

(2) Myeloperoxidase(MPO) 활성 측정

Mullane 등¹⁶에 따라 50μl의 대장 상층액에 1.6mM의 tetramethyl benzidine과 0.1mM의 H₂O₂를 가해서 37℃로 유지하여 650nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다. MPO 활성은 37℃에서 1μmol/ml의 peroxide를 저하시키는 효소의 수량으로 규정하고 단백질 mg당 MPO unit(U)로 표시하였다. 단백질량은 bradford 방법에 의해 분석하였다¹⁷.

(3) Lipid peroxidation(LPO) 활성 측정

지질과산화는 Ohkawa 등¹⁸에 의해 기술된 것처럼 대장의 균등액에서 측정하였다. 50mM 트리스 염산 완충액(Tris-HCl buffer, pH 7.4), 500μM tert-butyl hydroperoxide(BHP) 에탄올 용액과 1mM 염화제일철을 포함하는 반응혼합물을 37℃에서 90분간 배양하였다. 0.2ml 8% sodium dodecyl sulfate(SDS)와 1.5ml 20% acetic acid(pH 3.5)를 넣어 반응을 정지시켰다. Malondialdehyde(MDA)의 양은 1.5% thiobarbituric acid(TBA)를 추가하고 95℃에서 45분간 가열해서 평가하였다. 냉각한 후 샘플은 원심분리기로 분리하여 상층액의 TBA 반응 물질(TBA reactive substances = TBARS)은 532nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다. 지질과산화의 정도는 단백질 mg당 90분간 반응시켜 생성된 TBARS nmol로 표시하였다.

(4) Reduced Glutathione 정량

조직 혼탁액의 환원형 glutathione 양은 Pagalia와 Valentine의 방법¹⁹에 따라 측정하였다. 대장조직상층액 0.2ml에 25% trichloroacetic acid 0.5 ml을 넣고 10,000rpm에서 20분동안 원심분리하고 상

층액 300ul을 취하고 1mM DTNB 2.7ml을 넣은 후 상온에서 20분동안 방치한 후 412nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다.

(5) Liposome 준비와 지질과산화 억제 활동 분석

Liposome 준비를 위해 0.1g의 L- α -phosphatidylcholine (type IV-S; Form soybean)을 10ml의 디에틸에테르에 용해하고 0.6ml 증류수를 추가하였다.

혼합물은 ultrasonic disrupter(Eyler Co., Tokyo, 日本)로 초음파 처리하여 동결건조하였다. 추출물은 30ml 0.1M N-(2-acetamido)-imidodiacetic acid (ADA) 나트륨 완충액(pH 6.7)에 부유시켜 15분간 초음파 처리하고 4°C에서 1500×g로 10분간 원심분리하였다. 상층액은 리포솜 현탁액으로 이용되었다.

지질과산화 억제 활성을 분석하기 위해 리포솜 현탁액(100 μ l)은 berberine이나 장내세균이 있고 없는 상태에서 37°C에 1시간동안 1.5ml 50mM 나트륨 인산염 완충액, 100 μ l 2mM 염화제일철(ferrous chloride), 100 μ l 4mM ascorbic acid에서 배양되었다.

반응 혼합물의 지질과산화물은 이전에 보고된 것처럼 TBARS로 측정하였다²⁰.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용한 생화학적 분석

Interleukin-1 β (IL-1 β)의 ELISA를 위해 대장 조직을 1% protease inhibitor cocktail과 1% phosphatase inhibitor cocktail이 포함된 ice-cold RIPA 용해 완충액 1ml를 넣어 균질화하였다. 용해물은 4°C 15000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 96-well ELISA plates에 옮겼다. IL-1 β 농도는 상업용 ELISA kits(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

6) Immunoblot을 이용한 생화학적 분석

Cyclooxygenase-2(COX-2), phospho-nuclear factor- κ B(phospho-NF- κ B, pp65), β -actin의 immunoblot 분석을 위해, 현탁된 생존 세포를 획득하기 위해 대장조직으로부터 얻어진 점막을 1% protease inhibitor cocktail과 1% phosphatase inhibitor cocktail이 포함된 RIPA 용해 완충액 1ml내에 주의깊게 균질화

시켰다. 원심분리 후에 상층액은 immunoblot 분석에 사용되었다. 모든 세포 단백질은 8-10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 위에서 전기영동을 해서 니트로셀룰로스막으로 옮겼다. COX-2, pp65, β -actin의 레벨은 이전에 기술한 것처럼 분석되었다²¹. 면역검출은 enhanced chemiluminescence detection kit(Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)을 이용하여 수행했다.

7) 분변 중 세균성 효소활성 및 glycosaminoglycan 분해활성 측정

(1) 분변처리 및 장내총균 조효소액의 제조

TNBS를 투여한 후 생쥐의 신선한 분변(또는 장내용물)을 무작위적으로 모아서 약 1g을 20ml의 멸균 cold 생리식염수에 현탁하여 500rpm에서 5분간 원심분리한 후 침유질과 기타 불순물을 제거한 상정액을 800rpm에서 30분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 침전물을 10배의 20mM phosphate 완충액에 현탁하여 조효소액으로 사용하였다.

(2) β -Glucuronidase 활성 측정

분변 침전물로 조제한 조효소액 100 μ l, 0.1M potassium phosphate 완충액(pH 7.0) 380 μ l, 기질(10mM p-nitrophenyl- β -glucuronide) 20 μ l를 60분간 37°C에서 반응시킨 후 반응 정지액으로 0.5N NaOH 500 μ l를 가한 후 3000rpm에서 원심분리하여 405nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다¹⁵.

(3) Hyaluronic acid 분해활성 측정

0.2ml hyaluronic acid(1.0mg/ml)와 0.6ml 분변 조효소액을 37°C에서 1시간동안 배양하여 4°C에서 3000rpm로 원심분리하였다. 500 μ l의 상정액에 0.1ml 0.4M NaOH과 0.1ml 0.4M 칼륨 붕산염을 넣어 5분간 끓여서 실온으로 냉각하여 3ml 67mM p-dimethylaminobenzaldehyde를 추가하여 585nm에서 흡광도를 비색법으로 측정하였다.

3. 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 통계 유의성 평가는 student t-test로 했으며, 각 실험

험군 간의 비교 평가는 one-way ANOVA로 했다. 정상군과의 비교시 유의성은 $p < 0.05$ 는 #, $p < 0.01$ 은 ##, $p < 0.001$ 은 ###으로 표시하였으며, 대조군과 비교시 유의성은 $p < 0.05$ 는 *, $p < 0.01$ 은 **, $p < 0.001$ 은 ***으로 표시했다.

III. 결 과

1. 체중의 변화

실험 3일째에 TNBS를 직장내에 주입하여 야기된 대장염과 관련하여 실험동물의 체중변화를 관찰하였다. 모든 군에서 대장염을 유발한 후에도 체중은 증가하였다. 다만 정상군과 SGJ20×3군, SGJ50×3군은 체중증가정도가 대장염 유도 전후에 비슷하였으나 나머지 다른 군에서는 증가정도가 감소하였다(Fig. 2).

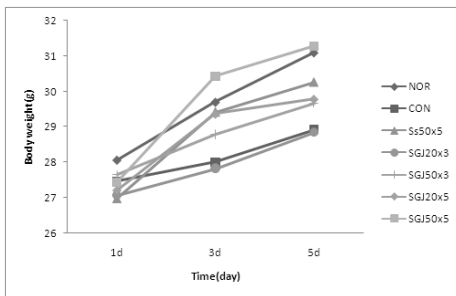


Fig. 2. Body weight changes during 5 days.

NOR : Normal group without any treatment.
 CON : Control group provided with only TNBS treatment.
 Ss50×5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ20×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ50×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ20×5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ50×5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

2. 육안적 형태변화 소견 및 대장 길이에 대한 효과

1) 대장 길이에 대한 효과

생쥐를 희생한 후 대장을 적출하여 外形을 살펴 보았을 때 대조군의 대장 길이가 단축되고 약간의 충혈도 관찰되었다. 맹장부터 대장 끝까지의 길이를 측정한 결과, 정상군의 7.14 ± 0.15 cm에 비해 대조군은 6.7 ± 0.19 cm로 단축되어 염증성 장질환 동물모형을 확립하는데 유효함을 확인할 수 있었다($p < 0.01$).

양약 대조군으로 설정한 Ss50×5군은 7.04 ± 0.23 cm로 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 단축을 억제하였다($p < 0.05$). 그리고, SGJ50×5군은 7.12 ± 0.26 cm로 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 대장 길이 단축을 억제하였다($p < 0.05$). 그러나 나머지 四君子湯 투여군의 대장 길이는 대조군에 비하여 길었으나 통계적 유의성은 없었다.

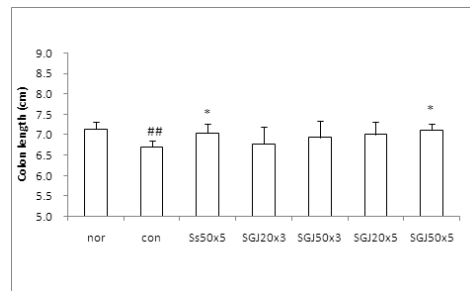


Fig. 3. The effects of *Sagunja-tang* on colon length in colitic mice induced by TNBS.

The colon lengths were measured on 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of colon lengths indicate the mean \pm S.D. (n=5)

Significantly different from normal group (## $p < 0.01$).

* Significantly different from control group (* $p < 0.05$).

NOR : Normal group without any treatment.
 CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50×5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ20×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ50×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ20×5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ50×5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

2) 대장 육안 형태 변화에 대한 효과

대장의 육안적 손상 정도를 객관화하여 수치로 나타내기 위해 Hollenbach의 기준¹⁵(Table 2)을 이용하여 대장 손상의 정도를 분석하였다.

대조군의 대장 손상 정도는 3±0.7로 정상군의 0.4±0.55에 비해 통계적으로 유의성있게 높았다(p<0.001).

대조군의 대장 손상 점수에 비해 Ss50×5群은 1.4±0.89로 통계적으로 유의성있게 낮게 나왔다(p<0.05). SGJ50×3群은 1.2±0.45(p<0.01), SGJ50×5群은 0.8±0.45(p<0.01)로 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 낮게 나왔고, 양약 대조군보다 육안적 형태 손상 점수가 낮았다.

SGJ20×3群은 1.8±1.30, SGJ20×5群은 1.6±1.14로 대조군에 비해서 수치는 낮았으나 통계적 유의성은 없었다.

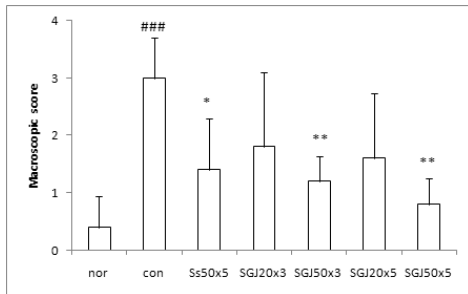


Fig. 4. Macroscopic scores in the experimental groups, control group, and normal group.

Values of macroscopic scores indicate the mean ±S.D.(n=5).

Significantly different from normal group (### p<0.001).

* Significantly different from control group(* p<0.05, ** p<0.01).

NOR : Normal group without any treatment.

CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50×5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ20×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ50×3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ20×5 : Test group provided with TNBS and

Sagunja-tang(20mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ50×5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

3. 조직학적 염색 소견에 대한 효과

적출한 대장을 고정 한 후 hematoxylin-eosin으로 염색한 조직을 현미경으로 관찰한 결과 정상군은 腺窩, 상피세포, 점액세포가 잘 발달되어 있으며 검푸른색으로 염색된 중성점액질을 분비하는 술잔세포와 적보라색으로 염색된 산성점액질을 분비하는 술잔세포를 확인할 수 있었다.

대조군에서는 표면 상피세포가 탈락되고 腺窩가 짓물러진 모습과 점막층에 많은 염증세포들이 모이고 두 종류의 술잔세포 모두 정상군에 비해 줄어들었고 점막하층의 부종현상을 관찰할 수 있었다.

Ss50×5群은 대조군에 비하여 상피의 재생현상을 관찰할 수 있었고 재생된 腺窩의 표면에 점액질을 함유한 술잔 세포의 재생을 관찰할 수 있었다. 점막하층의 부종과 염증세포들도 적게 관찰되었다.

SGJ50×3群, SGJ50×5群도 대조군에 비하여 상피의 재생이 관찰되었고 점막하층의 부종과 염증세포도 적게 관찰되었다. SGJ20×3群, SGJ20×5群은 SGJ50×3群, SGJ50×5群에 비해서는 상피의 재생 및 점막하층의 염증반응 회복이 미흡하였다(Fig. 5).

4. 장점막의 염증성 지표 측정

1) Myeloperoxidase 활성화에 대한 억제 효과

대장 조직의 염증정도를 확인하기 위해 호중구의 침윤을 반영하는 MPO 활성화 정도를 측정하였다.

대조군에서 MPO 활성화수치는 정상군에 비해 통계적으로 유의성있게 증가하였다(p<0.01).

그러나 Ss50×5(p<0.05)群과 四君子湯을 투여한 모든 실험군(SGJ20×3群(p<0.001), SGJ50×3群(p<0.001), SGJ20×5群(p<0.01), SGJ50×5群(p<0.01))에서 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그리고 SGJ50×3群(ab)은 양약 대조군(c)보다 MPO 활성을 통계적으로 유의성있게 더욱 억제하였다(Fig. 6).

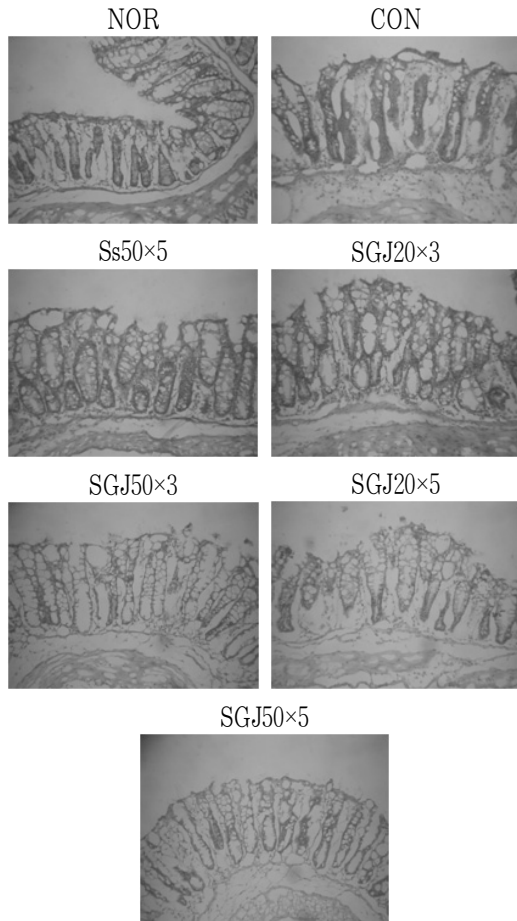


Fig. 5. The histological microphotograph of experimental group mice, normal mice(NOR), TNBS induced colitis in mice(CON).

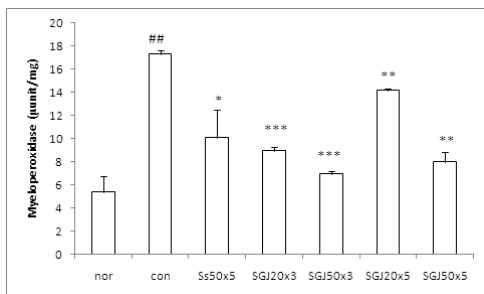


Fig. 6. The Effects of *Sagunja-tang* on colonic myeloperoxidase activities in colitis mice induced by TNBS.

The enzyme activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of enzyme activities indicate the mean±S.D.(n=3).

Significantly different from normal group (## p<0.01).

* Significantly different from control group(* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

NOR : Normal group without any treatment.

CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

2) Immunoblot을 이용한 생화학적 지표에 대한 효과

Phospho-NF-κB(pp65), COX-2의 단백질 발현을 immunoblot으로 측정된 결과, pp65, COX-2에서 정상군에 비해 대조군에서 항원항체반응이 높게 나타났으며, pp65에서는 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었고, SGJ50x5群과 Ss50x5群에서 더욱 두드러지게 억제되었다. COX-2에서는 SGJ20x5群과 Ss50x5群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었다.

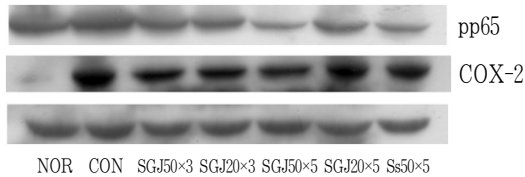


Fig. 7. The Effects of *Sagunja-tang* on protein expression of pp65, COX-2 in mice colons stimulated by TNBS.

NOR : Normal group without any treatment.
 CON : Control group provided with only TNBS treatment.
 Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.
 SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.
 SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

3) ELISA를 이용한 생화학적 지표에 대한 효과
 Proinflammatory cytokine들 중 IL-1 β 의 발현량을 ELISA 방법으로 정량측정한 결과 대조군에서 정상군에 비해 통계적으로 유의성있게 증가했다(p<0.01). 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 감소하였다(p<0.01).

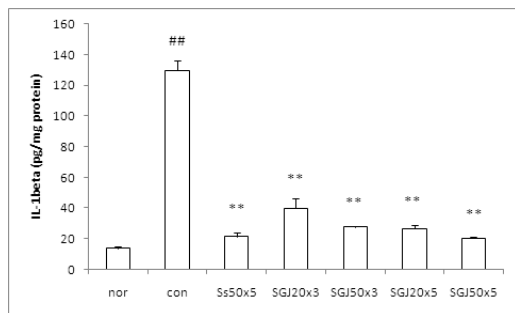


Fig. 8. The Effects of *Sagunja-tang* on protein expression of inflammatory cytokines IL-1 β in TNBS-induced colitis in mice.

The enzyme activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the

rectum of mice. Values of cytokine production indicate the mean \pm S.D.(n=2).

Significantly different from normal group (## p<0.01).

* Significantly different from control group(** p<0.01).

NOR : Normal group without any treatment.
 CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

5. 장점막의 지질과산화 측정

1) Malondialdehyde 활성에 대한 억제 효과

지질과산화의 마지막 분해산물인 MDA는 대조군에서 2.5 \pm 0.7 μ mol/mg으로 정상군에 비해 통계적으로 유의성있게 높게 나왔다(p<0.05).

대조군과 비교해서 SGJ50x5群을 제외한 모든 실험군에서 통계적으로 유의성있게 MDA 수치가 낮게 나와 지질과산화가 감소했음을 알 수 있었다(p<0.05, p<0.01).

SGJ50x5群은 대조군과 비교해서 MDA 수치가 낮게 나왔으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 9).

2) Glutathione 회복에 대한 효과

산화적 스트레스와 염증반응 시 세포내의 glutathione 함량이 낮아져 세포 손상과 독성에 대한 민감도가 높아진다.

대조군에서 정상군에 비해 glutathione 함량이 통계적으로 유의성있게 감소했다(p<0.05). 모든 실험군에서는 대조군에 비해서 glutathione 함량이 통계적으로 유의성있게 회복되었다(p<0.05, p<0.01). 그리고 SGJ50x3群에서 양약 대조군보다 더욱 회복되었다(Fig. 10).

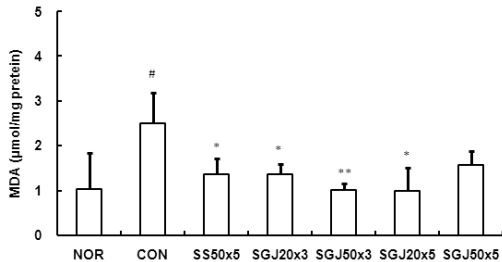


Fig. 9. The Effects of *Sagunja-tang* on colonic malondialdehyde activities in TNBS-induced colitis in mice.

The enzyme activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of enzyme activities indicate the mean±S.D.(n=4).

Significantly different from normal group(# p<0.05).

* Significantly different from control group(* p<0.05, ** p<0.01).

NOR : Normal group without any treatment.
CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

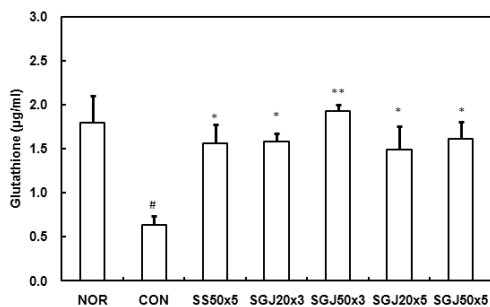


Fig. 10. The Effect of *Sagunja-tang* on colonic glutathione activities in TNBS-induced colitis in mice.

The enzyme activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of enzyme activities

indicate the mean±S.D.(n=4).

Significantly different from normal group (# p<0.05).

* Significantly different from control group(* p<0.05, ** p<0.01).

NOR : Normal group without any treatment.
CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.

SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.

SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

3) 지질항산화효과

四君子湯의 지질항산화 효과를 알아보기 위하여 대표적인 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT) 30μg/ml 투여군과 비교하였다. 四君子湯 투여군은 농도의존적으로 지질항산화 효과를 나타냈는데, 四君子湯 300μg/ml 농도에서 butylated hydroxytoluene(BHT) 30μg/ml의 절반가량의 지질항산화 효과를 나타냈다.

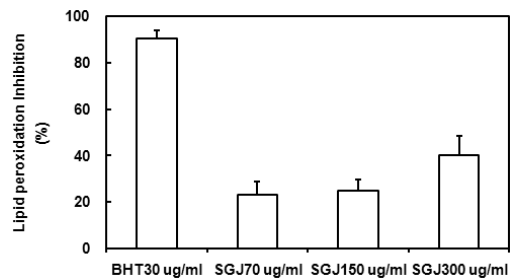


Fig. 11. The comparison of the lipid peroxidation inhibition of the *Sagunja-tang* and BHT.

BHT 30μg/ml : Test group provided with butylated hydroxytoluene(BHT) 30μg/ml treatment.

SGJ 70μg/ml : Test group provided with *Sagunja-tang* 70μg/ml treatment.

SGJ 150μg/ml : Test group provided with *Sagunja-tang* 150μg/ml treatment.

SGJ 300μg/ml : Test group provided with *Sagunja-tang* 300μg/ml treatment.

6. 분변 中 세균성 효소 활성 및 Glycosaminoglycan 분해활성에 대한 효과

1) β -glucuronidase 활성 변화

사람의 장내미생물로부터 분리한 유해세균인 *E. coli* HGU-3 균주가 생산하는 유해효소인 β -glucuronidase 효소활성은 대조군에서 정상군에 비해 통계적으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.01$).

모든 실험군에서 β -glucuronidase 효소활성이 대조군에 비해 통계적인 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$).

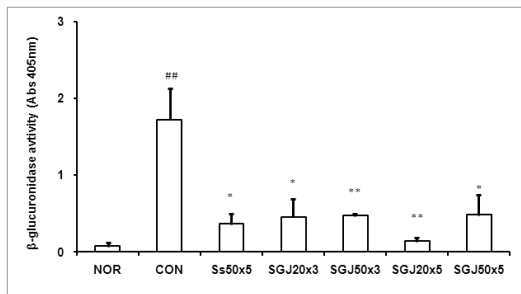


Fig. 12. The Effects of *Sagunja-tang* on fecal β -glucuronidase activities in TNBS-induced colitis mice.

The enzyme activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of enzyme activities indicate the mean \pm S.D.(n=4).

Significantly different from normal group (## $p < 0.01$).

* Significantly different from control group($p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

NOR : Normal group without any treatment.
CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.
SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.
SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.
SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.
SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

2) hyaluronic acid 분해활성 변화

Hyaluronic acid 분해활성은 대조군에서 정상군에 비해 통계적으로 유의성있게 높아졌으며($p < 0.001$), SGJ50x3군을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 낮아졌다($p < 0.01$).

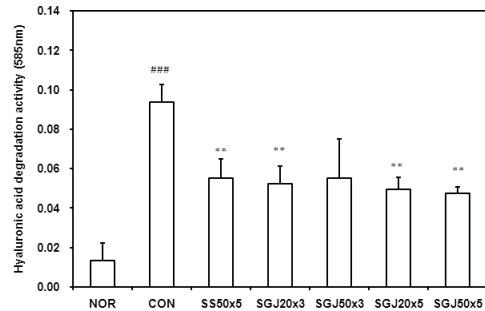


Fig. 13. The Effects of *Sagunja-tang* on fecal hyaluronic acid degradation activities in TNBS-induced colitis mice.

Hyaluronic acid degradation activities were measured on the 3th day after the TNBS injection into the rectum of mice. Values of hyaluronic acid degradation activities indicate the mean \pm S.D.(n=4).

Significantly different from normal group (### $p < 0.001$).

* Significantly different from control group (** $p < 0.01$).

NOR : Normal group without any treatment.
CON : Control group provided with only TNBS treatment.

Ss50x5 : Test group provided with TNBS and sulfasalazine(50mg/kg) treatment for 5 days.
SGJ20x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 3 days.
SGJ50x3 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 3 days.
SGJ20x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(20mg/kg) treatment for 5 days.
SGJ50x5 : Test group provided with TNBS and *Sagunja-tang*(50mg/kg) treatment for 5 days.

IV. 고찰

염증성 장질환이란 넓은 의미에서 세균성 장염,

아메바성 이질이나 결핵성 장염, 베체트 장염, 허혈성 장염, 방사선 조사 후 장염 등이 모두 장에 발생하는 염증성 질환이며 감별진단의 대상으로 이들을 고려해야겠지만 일반적 의미에서 염증성 장질환이라 할 때는 통상 궤양성 대장염과 크론병을 말한다¹. 이 가운데 궤양성 대장염은 원인불명의 만성 염증성 장질환으로서 대장의 점막에 국한된 염증을 특징으로 하며⁴, 泄瀉와 血便이 대표적인 임상증상이며, 그밖에 粘液便, 後重, 排便緊急, 便失禁, 腹痛 등이 동반되기도 하고, 전신적인 증상으로서 食慾不振, 惡心, 嘔吐, 疲勞感, 體重減少, 發熱 등이 나타나기도 한다²³.

궤양성 대장염은 서구에서 흔한 질환으로 알려져 있으나 1980년대 후반부터 우리나라에서도 식생활이 서구화되는 등 사회환경이 변하면서 발생 빈도가 꾸준히 증가하고 있다^{1,3}. 여러 원인 중에서 음식물 섭취양상도 염증성 장질환의 발생과 밀접한 관련이 있다. 동물성 단백질과 지방의 함량이 높은 식사를 하는 서양인이 야채섭취가 많은 동양인보다 염증성 장질환 발생율이 높은 이유는 장내 세균의 역할로 인한 것으로 보고되고 있다²⁴. 음식물의 차이로 인해 대장내 세균총의 구성이 변화하는데, 섬유소의 섭취가 적고 육류섭취가 많아지면 유익균에 비해 유해균이 많아지게 되고 유해균이 분비하는 유해효소나 독성물질이 궤양성 대장염의 발생에 영향을 미치게 된다²⁵. 이외에도 섬유소를 많이 섭취하게 되면 음식물이 장을 통과하는 시간과 양을 증가시킴으로써 장내의 여러 구성요소를 희석하며 대변으로의 담즙산 배설을 증가시키고 장내의 pH를 낮추는 등 장내환경을 변화시킴으로써 염증성 장질환 발생을 억제하는 효과가 있다²⁶.

현재 궤양성 대장염에 대한 원인과 병태생리는 아직 정확히 모르는 상태로 정체를 모르는 항원에 의한 조직반응과 손상이 만성적으로 지속되는 것이 궤양성 대장염의 병태생리로 이해되고 있다¹. 따라서 궤양성 대장염에 대한 근본적인 치료는 불가능한 실정으로 관해를 유발시키고 그 관해를 유

지시키는 데에 목표를 두고 있다²⁷.

궤양성 대장염의 약물요법중에서 경미하거나 중등도의 염증성 장질환의 관해 및 관해 유지를 위해 가장 흔히 사용되는 약제는 Sulfasalazine이다²⁸. Sulfasalazine은 염증성 장질환의 염증매개체인 prostaglandin의 생성을 억제함으로써 치료효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 처음에는 류마티스 관절염의 치료제로 개발된 약이나 염증성 장질환에서 효능이 입증되어 현재 이 질환의 치료에 대표적인 약물이 되었다¹.

그러나 이러한 항생제의 사용은 질병을 약하게 하였고, 특히 급성기 염증에 효과적이었지만 장기간의 치료 성적은 만족스럽지 않고 여러 가지 부작용을 유발하여 문제가 되고 있다². Sulfasalazine의 부작용으로 消化不良, 惡心, 食慾不振, 頭痛, 알레르기 반응, 肺炎, 肝炎, 膾臟炎, 神經病 등의 다양한 과민반응과 溶血, 好中球 減少症, 無顆粒球症 등의 혈액학적 부작용, 남성에서 可逆的 不妊, 葉酸吸收 障礙 등이 나타날 수 있다²⁹.

앞서 언급한 염증성 장질환의 여러 원인들 중에서 장내세균은 오래전부터 만성 염증성 장질환에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되어졌고, 또한 최근의 무균상태의 생쥐에서는 만성 염증이 생기지 않는다는 것³⁰, 장에 염증을 지닌 환자에서 점막 내 세균 수가 정상 대조군에 비해 매우 높았고, 점막 세균의 농도는 염증의 정도에 비례한다는 것³¹, 항생제나 probiotics, prebiotics에 의한 염증성 장질환의 치료효과에 대한 보고³² 등의 논문들을 통하여서도 장내세균과 궤양성 대장염의 상호연관성을 알 수 있다.

장내세균은 크게 숙주에게 유익한 작용을 하는 균과 유해한 작용을 하는 균으로 나눌 수 있다. 유익균은 젖산, 초산과 같은 유기산을 생성하여 장내 pH를 낮추거나 有用 항생물질을 생성하므로써 유해균의 성장을 억제한다. 또한 숙주의 면역체계를 자극하거나 면역반응의 보조인자로 작용하여 감염에 대한 저항성을 강화시켜주는 것으로 알려져 있

다. 한편 유해균은 단백질, 담즙산, 콜레스테롤로부터 발암성 대사산물을 생성하거나 장내 유해효소들을 생성하여 독성물질이나 돌연변이원 등을 생성한다³³.

장내의 유익균으로서 건강에 도움이 되는 probiotics의 대표적인 것으로 유산균을 들 수 있다. 장내에서 유산균의 먹이를 제공하면 유산균이 증가하게 되고 이것들이 대부분의 세균성 염증의 원인이 되는 G(-) 균주를 자라지 못하게 한다.

그래서 장내세균과 연관된 질환에서 유해균을 억제할 때 모든 균을 다 죽이는 항균력을 가진 항생제를 사용하는 것보다 유산균을 사용하는 것이 더 큰 장점을 가지고 있다. 이러한 유산균을 대체할 수 있는 prebiotics는 만성적인 경과를 가지는 궤양성 대장염의 치료에 있어서 약물의 부작용을 억제하면서 염증을 치료하는 치료법이 될 수 있다.

이러한 장내 세균과 연관된 면역은 한의학에서 氣의 범주에서 설명할 수 있다. 氣란 일반적으로 인체의 각 계통의 생리적 기능을 뜻하며 氣虛란 이러한 기능의 저하를 의미한다. 氣의 종류 중에서 외부에서 들어오는 여러 병인에 대하여 저항력을 형성하는 것이 衛氣이며 이러한 衛氣의 작용은 체외로부터 침입하는 미생물, 동종의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 산물 등을 非自己的인 항원으로 인식하여 이를 제거함으로써 그 개체의 항상성을 유지하는 면역이론³⁴과 밀접한 관련이 있으며 이때 扶正祛邪시켜 인체의 저항력을 높이고 질병이 자연히 제거되게 하는 補氣劑가 필요하다.

補氣劑의 대표적인 처방으로 四君子湯을 들 수 있는데, 이는 宋代의 陳¹⁴에 의해 편찬된 太平惠民和劑局方에 처음으로 수록된 처방으로 人蔘 白朮 白茯苓 甘草로 구성되어 氣虛證을 치료하는 대표적인 補氣劑로 응용되어 왔으며, 특히 위장관 질환에 많이 응용되어 왔다. 또한 만성적인 질환으로 正氣가 虛해진 경우에 四君子湯은 補氣 즉, 扶正祛邪시킴으로써 질병을 예방하고 치료하는 면에서 현대의 면역이론과 밀접한 상관성이 있으며, 궤양

성 대장염에 있어서도 활동기의 염증을 억제시키고 동시에 장내세균에 영향을 미쳐 유산균과 같은 유익균은 성장을 촉진시키고 유해균은 억제시켜 장내환경을 개선시킴으로써 궤양성 대장염의 증상 호전에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다^{13,35}.

현재까지 四君子湯에 대한 실험적 연구로는 柳²⁷가 대장암 동물모델에서 四君子湯 合 四味軟堅湯의 뛰어난 항암효과 및 장내세균 유해효소 억제효과 등을 보고하였으나, 아직까지 궤양성 대장염에 대하여 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 四君子湯이 궤양성 대장염의 예방이나 치료에 효과가 있을 것으로 생각되어 이 연구를 시행하였다.

본 실험에서 궤양성 대장염의 동물모형을 만드는 데는 Dextran sodium sulfate(DSS)를 음용시키거나, 초산(acetic acid)을 관장시키거나, TNBS(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid)를 복강내주사하는 등 여러 가지 방법이 있는데, 이 중에서 TNBS와 DSS가 많이 사용되어 진다. DSS는 음용수대신 2-5%의 희석액을 만들어 물과 함께 먹이는 방법을 사용하며 투여후 5일에서 1주일 정도 경과하면 대장염이 유발되고 보통 10일이면 쥐가 죽게 된다. 반면에 TNBS는 대장으로 막바로 투여해 동물모형을 만드는데 바로 대장염이 유발되어 치료효과를 바로 측정할 수 있는 장점이 있다. 이 외에도 에탄올에 의한 급성적인 점막 손상이 나타나고 hapten의 일종인 TNBS에 의해 면역반응이 유도되어 만성 염증이 지속되는데, 이것은 사람에서의 염증성 대장염과 유사한 유발기전과 병태생리를 나타내므로 TNBS는 염증성 장질환의 동물모형으로 많이 이용되고 있다³⁶.

이에 저자는 四君子湯의 효능을 동물실험으로 객관적으로 규명하기 위하여 사람에서의 염증성 장질환과 유사한 유발기전과 병태생리를 나타내는 TNBS로 유도한 염증성 장질환 동물모형을 이용하여, 육안적 형태변화 소견, 체중의 변화, 대장점막의 조직학적 염색소견, 장점막 효소활성, immunoblot

을 이용한 생화학적 지표, ELISA를 이용한 생화학적 지표 및 분변 中 세균성 효소활성에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

본 실험에서 궤양성 대장염의 유발 및 치료효과를 알아보기 위하여 육안조직학적 소견으로써 체중의 변화, 대장 길이의 변화, 육안적 형태변화 소견, 조직학적 염색소견에 대하여 알아보았다.

실험 3일째에 TNBS를 직장내에 주입하여 야기된 대장염과 관련하여 실험동물의 체중을 실험 시작일, 3일, 5일째에 측정된 결과(Fig. 2), 모든 群에서 대장염을 유발한 후에도 체중은 증가하였다. 이는 궤양성 대장염의 病程에 있어서 체중감소는 악화기에 나타나며 또한 실험기간이 짧은 것과 성장기에 있어서 체중이 상승하는 것이 한 요인으로 작용하였다고 생각된다.

육안조직학적 소견중에서 대장 길이의 변화는 가장 객관적이고 손쉬운 지표로서 다른 지표보다 더욱 중요하다고 할 수 있다. 대장 길이 변화를 보면, 정상군에 비해서 대조군의 길이가 통계적으로 유의하게 짧아져서 대장염 유발을 확인할 수 있었다($p < 0.01$).

양약 대조군으로 설정한 Ss50×5群은 7.04 ± 0.23 cm로, SGJ50×5群은 7.12 ± 0.26 cm로 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 단축을 억제하였다($p < 0.05$). 그러나 나머지 四君子湯 투여군의 대장 길이는 대조군에 비하여 길었으나 통계적 유의성은 없었다.

그리고 四君子湯을 5일간 투여한 群(SGJ20×5群(7.00 ± 0.25 cm), SGJ50×5群(7.12 ± 0.26 cm))에서 四君子湯을 3일간 투여한 群(SGJ20×3群(6.78 ± 0.32 cm), SGJ50×3群(6.94 ± 0.15 cm))보다 대장의 길이가 더 길었다. 그리고 四君子湯 50mg/kg을 투여한 群(SGJ50×3群(6.94 ± 0.15 cm), SGJ50×5群(7.12 ± 0.26 cm))에서 四君子湯 20mg/kg을 투여한 群(SGJ20×3群(6.78 ± 0.32 cm), SGJ20×5群(7.00 ± 0.25 cm))보다 대장의 길이가 더 길었다(Fig. 3).

육안적 형태 손상에 대한 점수는 대조군이 정상군에 비해 통계적으로 유의하게 상승하여 대장의

염증 유발을 확인할 수 있었다($p < 0.001$). 대조군에 비해 수치가 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 나타난 四君子湯이나 약물 투여군은 Ss50×5群($p < 0.05$), SGJ50×3群($p < 0.01$), SGJ50×5群($p < 0.01$)이었다. 그리고 SGJ20×3群과 SGJ20×5群도 대조군에 비해 육안적 형태 손상 점수가 낮았으나 통계적 유의성은 없었다.

그리고 四君子湯 50mg/kg을 투여한 群(SGJ50×3群, SGJ50×5群)에서 四君子湯 20mg/kg을 투여한 群(SGJ20×3群, SGJ20×5群)보다 육안적 형태 손상 점수가 낮았다(Fig. 4).

위장관의 점막은 산이나 효소, 세균 그리고 독소와 같은 잠재적인 장관내 위해물질에 대한 防壁의 역할을 한다. 이러한 障壁의 파괴는 염증성 장질환이나 소화성 궤양과 같은 질환을 일으키게 된다. 위 장관내에는 여러 가지 일반적 혹은 특수한 방어요소들이 존재하여 障壁의 기능을 유지시키는 것으로 생각된다. 그 중에서도 술잔세포는 소장이나 대장의 표면 상피세포에 널리 분포하고 있으며, 점막방어에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다³⁷.

조직학적 염색소견을 보면 대조군에서 상피세포의 탈락, 짓물러진 腺窩, 염증세포, 술잔세포의 감소, 점막하층의 부종현상을 관찰할 수 있었다. 이에 반해 Ss50×5群은 대조군에 비하여 상피세포와 술잔세포의 재생 및 염증세포와 점막하층 부종의 감소로써 궤양성 대장염의 치료를 확인할 수 있었다. 그리고 四君子湯 투여군에 있어서 고용량군에서 상피의 재생이 더욱 관찰되었고, 점막하층의 부종과 염증세포도 고용량군에서 더 적게 관찰되었다(Fig. 5).

본 실험에서 궤양성 대장염의 유발 및 치료효과를 알아보기 위하여 장점막의 염증성 지표로서 MPO 활성, Immunoblot을 이용한 생화학적 지표, ELISA를 이용한 생화학적 지표를 측정하였다.

MPO는 호중구의 과립에서 주로 발견되는 효소로서 호중구 침윤에 대한 지표가 되며 이는 염증활성의 지표로서 궤양성 대장염의 장손상과 상관

관계를 갖는다. 즉 장점막의 MPO 활성 증가는 염증반응으로 인한 granulocytes의 유입을 뜻한다. 염증과정중에서 자극된 호중구는 세포 손상을 야기할 수 있는 superoxide 및 반응성이 높은 다른 oxygen product를 생산한다³⁸. 자극된 호중구는 또한 세포 손상을 야기하는 lysosome 효소를 함유하는 과립의 유리도 야기한다.

본 연구에서 MPO 활성을 측정한 결과(Fig. 6), 정상군에 비해 대조군의 수치가 통계적으로 유의하게 상승해 대장염 유발을 확인할 수 있었다($p<0.01$). 그리고 Ss50×5群($p<0.05$)과 四君子湯을 투여한 모든 실험군(SGJ20×3($p<0.001$), SGJ50×3($p<0.01$), SGJ20×5($p<0.01$), SGJ50×5($p<0.01$))에서 대조군과 비교했을 때 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그리고 SGJ50×3群(ab)은 양약 대조군(c)보다 MPO 활성을 통계적으로 유의성있게 더욱 억제하였다.

퀘양성 대장염 환자의 장관 점막에는 무수한 임파구가 활성화되어 대식세포와 공동으로 IL-1 β , IL-2R, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 그리고 TNF- α , colony stimulating factor(GM-CSF), interferon- γ , MIP-1 등을 장관 점막 내에 과잉으로 생산하며, 이렇게 과잉 생산된 cytokine은 다른 염증세포, 혈관내피세포, 섬유아세포 등을 활성화시키고 염증을 촉진한다³⁹. 즉, TNF- α 와 IL-1 β 는 염증반응을 매개하는 cytokine으로, 급성 및 만성 대장염의 시초와 지속단계에서 염증을 유발시키는 인자로 작용한다⁴⁰.

이외에 염증지표로 대표적인 것이 cyclooxygenase (COX)이 있는데, 이 COX가 생산하는 Prostaglandin (PG)은 다양한 생리활성을 갖는 불포화지방산으로 炎症 및 痛症 傳達, 血管擴張, 子宮收縮, 體溫調節, 催眠, 胃液分泌 促進 등 우리 몸에서 국소적 호르몬 또는 세포 기능 조절인자로 작용한다. PG의 생합성에 관여하는 중요한 효소인 cyclooxygenase (COX)는 2가지 형태로 존재하는데, COX-1은 정상 세포의 생리기능 유지에 중요한 house-keeping 효소임에 反해, COX-2는 염증을 유발할 수 있는

외부 자극에 의해 일시적으로 발현되는 유도성 효소이다⁴¹.

이와 같이 COX-2는 염증 자극, 성장 인자, 종양괴사인자 및 여러 cytokine에 의해 유도되는데, 이러한 과정에 NF- κ B가 전사조절인자로서 관여한다⁴².

이러한 기전들이 반복되어 만성염증을 나타내고 이 기전의 단계중에서 NF- κ B의 활성을 억제하는 sulfasalazine, mesalazine, corticosteroids 등의 약들이 염증성 장질환을 치료하는데 사용되고 있다⁴³.

본 연구에서 Immunoblot을 이용하여 Phospho-NF- κ B(pp65), COX-2의 단백질 발현을 측정한 결과, pp65, COX-2에서 정상군에 비해 대조군에서 항원항체반응이 높게 나타났다. pp65에서는 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었고, SGJ50×5群과 Ss50×5群에서 더욱 두드러지게 억제되었다. COX-2에서는 SGJ20×5群과 Ss50×5群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었다.

대장염에서 염증반응을 매개하는 cytokine으로 TNF- α , IL-1 β 가 있는데, 대장염이 발생하였을 때 TNF- α 가 3배정도 증가하는 반면 IL-1 β 는 5-10배정도 증가한다. 즉, IL-1 β 가 대장염을 만들었을 때의 유도율이 높아 본 실험에서는 proinflammatory cytokine들 중 IL-1 β 의 발현량을 ELISA 방법으로 정량측정하였다.

IL-1 β 의 발현량 결과를 보면, IL-1 β 가 정상군에 비해 대조군에서 통계적으로 유의하게 상승하여 염증반응이 유도되었음을 알 수 있다($p<0.05$). 그리고 모든 四君子湯이나 약물 투여군에서 IL-1 β 의 수치가 대조군에 비해서 통계적으로 유의성있게 감소했음을 알 수 있다(Fig. 7).

이상의 결과를 종합하면, 四君子湯이 염증관련 전사 조절 인자와 cytokine의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다. 특히, NF- κ B와 관련된 경로를 억제하여 염증성 장질환을 억제하는 것으로 추정된다. 그리고, 모든 염증성 지표 결과에서 四君子湯이 퀘양성 대장염에 대하여 통계적으로 유의성있

게 효과를 나타냄을 확인할 수 있었고, 또한 MPO 활성 결과중에서 SGJ50×3群은 통계적으로 유의하게 양약 대조군인 sulfasalazine보다 좋은 효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

본 실험에서 장점막의 지질과산화 효과를 측정하기 위하여 MDA 수치와 Glutathione 수치, 합성 항산화제인 BHT와의 비교수치를 알아보았다.

우리 몸을 이루고 있는 세포는 산패되기 쉬운 불포화지방산을 필수성분으로 함유하는 막조직으로 구성되어 있어 대장염이 발생하면 지질과산화가 일어난다. 즉, 염증세포가 모이면 radical을 생산하게 되고 지방 및 세포막에 산패를 일으켜 세포의 막조직이 손상된다. 이 과정에서 free radical이 생성될 때 지질과산화에 의해서 세포막 속의 불포화지방산을 공격하고, 지방산이 파괴되면 hydrocarbon gas(ethane & pentane)와 aldehyde가 생성된다⁴⁴. MDA는 지질과산화의 마지막 분해산물로⁸⁰ free radical이 증가하면 MDA가 과량생산되게 된다.

이처럼 지질과산화는 궤양성 대장염의 주요요인 중의 하나로 인식되어 본 실험에서 궤양성 대장염의 치료정도를 알아보기 위하여 지질과산화를 측정하였다.

보통 항산화효과를 측정시 radical을 얼마나 소거하였는지를 측정한다. 그런데 free radical은 짧은 존재기간으로 측정이 어려운 반면, MDA는 free radical에 비해 안정적이어서 산화적 스트레스의 표지자로 알려져 있으며, 염증성 장질환에서 하나의 지표가 된다⁴⁵. 이에 따라 본 실험에서는 장간막에서의 지질과산화 평가를 위해 MDA 양을 측정하였다.

MDA 양의 측정 결과 정상군에 비해 대조군의 수치가 통계적으로 유의하게 상승하여 지질과산화가 이루어진 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 또한, 대조군과 비교해서 SGJ50×5群을 제외한 모든 실험군에서 통계적으로 유의성있게 MDA 수치가 낮게 나와 지질과산화가 억제되었음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 9).

에너지 생성을 위해 산소를 필요로 하는 호기성 생물에서는 산소 대사과정 중에 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 및 singlet oxygen 등의 독성물질이 생성될 수 있다. 흰쥐 대장점막에 TNBS를 넣었을 때 superoxide와 O₂ 생성이 의미있게 증가하는데, 생체내의 ascorbate와 환원된 glutathione 등의 물질과 TNBS가 작용하는 중에 생성되는 reactive oxygen metabolite가 TNBS의 병변 유발 기전의 하나로 작용하리라 추측되고 있다³⁶. 본 실험에서는 superoxide radical을 측정하지 않고 대신 oxygen radical을 제거시켜 생물체를 보호하는 효소인 glutathione을 측정했다. 이 glutathione은 산화적 스트레스와 염증 반응 시 세포내의 함량이 낮아져, 세포 손상과 독성에 대한 민감도가 높아진다.

glutathione 수치 측정 결과 정상군에 비해 대조군의 glutathione 수치가 통계적으로 유의하게 감소해 반응성 산소 대사물이 증가했음을 알 수 있다 ($p < 0.05$). 그리고 모든 四君子湯이나 약물 투여군에서 대조군에 비해 통계적 유의성 있는 glutathione 회복이 관찰되었다($p < 0.05$, $p < 0.01$)(Fig. 10).

산화방지에 쓰이는 물질은 천연 유래의 것과 천연물의 화학구조와 유사한 것을 화학적으로 합성한 산화방지제가 사용되고 있다. 합성 항산화제로서 널리 쓰이고 있는 것은 butylated hydroxy anisol (BHA)과 butylated hydroxy toluene(BHT)이며, 천연의 항산화제는 tocopherol과 ascorbic acid이다.

본 실험에 쓰인 四君子湯 熱水抽出物の 경우 Fig. 11.에서와 같이 10배 농도로 쓸 경우 합성 항산화제인 BHT의 절반정도의 항산화효과를 나타내는 것으로 나타났다.

이상에서와 같이 지질과산화작용이 염증성 장질환의 주요요인 중 하나로 보이며, 四君子湯의 지질과산화작용이 대장염을 억제하는데 일정부분 관여하는 것으로 추정된다.

본 실험에서 궤양성 대장염의 유발 및 치료효과를 알아보기 위하여 β -glucuronidase 효소활성교

hyaluronic acid 분해활성을 측정하였다.

퀘양성 대장염은 일반적으로 국소적이지만 병변의 범위가 넓고 오랜 기간 이환된 경우 진단 후 8-10년 정도 경과하면 대장암 발생 위험성이 증가하기 시작하여 연간 발병률이 0.5-1%에 이르게 된다³. β -Glucuronidase는 발암유도효소로서 대장암이 유발될 경우 효소활성이 증가한다. β -Glucuronidase는 glucuronic acid에서 β 형태의 1번 탄소에 붙은 末端 glucuronide unit의 가수분해반응을 촉매하는 효소로서 미생물, 식물은 물론 포유동물의 肝, 血液, 胎盤 등에 널리 분포되어 있다⁴⁶. 체내에서 유해한 물질로부터 스스로를 보호하는 방법으로 독성물질을 glucuronic acid conjugates로 포함시켜 무독화시킨 후 뇨로 배설시키거나 또는 대장으로 배설함으로써 detoxification하는 과정을 지니고 있다. 그러나 장관이나 뇨로 서식하는 장내미생물이 분비하는 β -glucuronidase의 작용을 받게 되면 포함체가 가수분해되어 다시 독성을 나타내게 된다⁴⁷. 최근의 실험에서 DSS 유발 대장염 모델군에서 β -glucuronidase 수치가 상승한 것을 보아 β -glucuronidase의 증가와 β -glucuronidase 생산균주가 대장염을 악화시키는 요인으로 작용할 것으로 추정된다³⁵.

이번 실험에서도 Fig. 12의 결과처럼 사람의 장내미생물로부터 분리한 유해세균인 E. coli HGU-3 균주가 생산하는 유해효소인 β -glucuronidase 효소활성은 정상군에 비해 대조군에서 통계적으로 유의성있게 증가한 것을 알 수 있다($p < 0.01$). 모든 四君子湯이나 약물 투여군에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었음을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, $p < 0.01$). 이 결과로부터 四君子湯은 prebiotics로 작용하여 사람의 장내세균총 중 산의 생산이 많은 유산균과 같은 유익균은 성장을 촉진시키고 유해균은 억제시켜 장내환경을 개선하는 것으로 생각된다.

장점막의 세포외간질인 glycosaminoglycan(GAG)은 화학적, 생화학적, 면역조직화학적으로 염증성

장질환과 연관되어지는데, 퀘양성 대장염에서 분해된 GAG이 증가하고 GAG의 생합성도 증가하게 된다. 장점막의 불완전한 GAG는 방어벽의 능력을 상실하여 내독성물질, 해로운 효소를 생산하는 장의 微細機構, 병원균을 막기는 어려워진다. Chondroitin sulfates와 hyaluronic acid는 대장에서 발견되는 가장 흔한 형식의 GAG로 장내균총의 chondroitinase나 hyaluronidase라는 분해효소에 의해 單量體로 분해된다. 이러한 二糖類는 β -glucuronidase와 acetylase에 의해 iuronic acid, D-uronic acid나 D-glucuronic acid나 D-galactosamine 또는 D-glucosamine으로 분해된다. D-galactosamine, D-glucosamine은 in vitro 실험에서 장세포에 대한 세포 독성과 TNBS에 의한 세포 독성을 증가시키는 것으로 나타나서 장내균총이 생산하는 GAG 대사산물이 장손상을 유발하고 장염을 악화시키는 것으로 추정된다. GAG 분해 세균이 장염을 악화시키므로 이러한 세균 성장을 억제하면 질병의 진행을 늦출 수 있을 것으로 보고 있다⁴⁸.

이번 실험에서는 분변 中の 대표적 GAG인 hyaluronic acid 분해활성을 측정하여 이를 소화시키는 장내세균 및 대사산물의 생성을 추정하였다. Fig. 13을 보면 정상군에 비해 대조군에서 hyaluronic acid 분해활성이 통계적으로 유의성 있게 높아졌음을 확인하였다($p < 0.001$). hyaluronic acid 분해활성이 SGJ50 \times 3群을 제외한 모든 四君子湯이나 약물 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮아졌음을 확인하였다. 이로써 hyaluronic acid 분해 세균 성장이 억제되고 분해 산물의 생성도 억제되어 장염을 억제하는 것으로 추정된다.

이상에서와 같이, 장내세균에 의해 생산되는 독성효소 및 세균효소에 의해 독성물질로 전환될 수 있는 물질을 四君子湯의 prebiotics 작용과 장점막 면역불균형 개선작용을 통해 조절하여 염증성 장질환을 개선시키는 것으로 추정된다.

결론적으로 TNBS로 생쥐에서 대장염을 유발하면 泄瀉, 便血이 유발되며 체중증가율이 감소하고

대장의 길이가 짧아지고 대장점막은 조직손상이 일어난다. 염증 생성시 생화학적 지표인 MPO의 활성이 증가하고 염증을 촉진시키는 인자들인 IL-1 β , COX-2, NF- κ B의 발현도 증가한다. 지질산화 최종산물인 MDA수치는 증가하고 산화를 억제하는 glutathione 수치는 감소한다. 장내 환경과 관련해서 장점막의 세포외간질인 glycosaminoglycan(GAG)의 일종인 hyaluronic acid의 장내 분포는 증가하고 대장암 유발을 촉진하는 장내세균 효소인 β -glucuronidase의 수치도 증가한다.

이에 반해 四君子湯은 NF- κ B가 연계된 염증 경로를 억제하여 염증관련 cytokine의 발현을 막고 COX-2를 억제하여 염증을 억제하는 것으로 보인다. 또한, 四君子湯의 지질항산화 작용도 염증을 억제하는 중요 요인으로 생각되며, 四君子湯이 prebiotics의 효과를 가져 장내환경개선을 통해 장점막 면역계의 균형 회복을 돕는 작용도 염증 억제에 관여하는 것으로 생각된다. 이로써 四君子湯이 궤양성 대장염에 대하여 유효한 치료효과를 가지고 있을 것으로 생각된다.

그리고 四君子湯의 예방적 치료효과를 알아본 실험에서 四君子湯을 5일 투여한 群에서 3일 투여한 群보다 대장 길이 측정, 육안적 형태 변화, IL-1 β 의 발현량, hyaluronic acid 분해활성의 성적에 있어서 더 좋은 수치를 보였다. 또한 용량의존적 치료효과를 알아본 실험에서 四君子湯을 50mg/kg 투여한 群에서 20mg/kg 투여한 群보다 대장 길이, 대장 육안 형태 변화, 조직학적 염색 소견, MPO 효소 활성, Immunoblot을 이용한 생화학적 지표중 pp65와 COX-2의 단백질 발현, IL-1 β 의 발현량, glutathione 회복 실험에서 더 좋은 수치를 보였다.

양약 대조약물인 sulfasalazine 투여군과 비교하였을 때 대장 육안 형태 변화와 MPO 효소 활성, Malondialdehyde 활성, glutathione 회복, β -glucuronidase 활성 실험에서 四君子湯이 더 좋은 수치를 보였으나, MPO 활성 결과중에서 SGJ50 \times 3 群만이 통계적으로 유의하게 양약 대조군보다 좋

은 효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다.

그리고 四君子湯이 궤양성 대장염의 치료에 유효한 효과가 실험적으로 인정되어 실제 임상에 사용하여도 좋은 효과가 있을 것으로 기대되며, 추후에 四君子湯을 구성하고 있는 개별 약재 별로 실험하여 그 효능을 연구할 필요성이 있다고 사료되며, 또한 검액 추출도 물 뿐만 아니라 다른 용매로 추출하여 실험할 필요성이 있다고 사료된다.

V. 결 론

궤양성 대장염에 대한 四君子湯의 효능을 연구하기 위하여 생쥐에 2.5% TNBS 함유 50% 에탄올 용액을 관장하여 대장염을 유발시키고 검액을 투여한 후 생쥐의 체중변화, 대장길이, 대장점막의 육안형태변화, 조직학적 염색소견, 장점막 효소활성, immunoblot을 이용한 생화학적 지표, ELISA를 이용한 생화학적 지표 및 분변 中 세균성 효소활성 및 GAG 분해활성에 대한 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대장염을 유발한 後에 모든 四君子湯 투여군의 체중은 증가하였다. 다만 정상군과 SGJ20 \times 3 群, SGJ50 \times 3 群은 체중증가정도가 대장염 유도전후에 비슷하였으나 나머지 다른 群에서는 증가정도가 감소하였다.
2. 대장의 길이는 SGJ20 \times 3 群을 제외한 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 단축이 억제되었다.
3. 대장의 육안적 형태손상 지수는 SGJ20 \times 3 群과 SGJ20 \times 5 群을 제외한 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 감소했다.
4. 조직학적 관찰 결과, SGJ50 \times 5 群과 SGJ50 \times 3 群들에서 대조군에 비해 명확하게 상피세포의 재생, 腺窩의 재생이 일어나고 염증세포의 침착 및 부종이 억제되었음을 알 수 있었다.
5. 대장점막에서 MPO 활성정도를 측정된 결과, 모

- 든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다. 그리고 SGJ50×3群은 양약 대조군보다 MPO 활성을 통계적으로 유의성있게 더욱 억제하였다.
6. Immunoblot으로 pp65, COX-2의 단백질 발현을 비교한 결과, pp65에서는 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었고, COX-2에서는 SGJ20×5群을 제외한 모든 실험군에서 대조군에 비해 단백질 발현이 억제되어 효과적이었다.
 7. ELISA로 IL-1β의 발현량을 정량측정한 결과, 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소되었다.
 8. 대장점막에서 MDA, glutathione 수치를 측정한 결과, 지질대사산물인 MDA는 SGJ50×5群을 제외한 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 억제되었다.
 9. 항산화물질인 glutathione 수치는 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의성있게 회복되었다.
 10. 분변 中 장내세균 유해효소 中 β-glucuronidase는 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 활성이 억제되었다.
 11. 분변 中의 대표적인 GAG인 hyaluronic acid 분해활성은 SGJ50×3群을 제외한 모든 四君子湯 투여군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮아졌다.

위의 실험 결과로 볼 때, 四君子湯은 염증성 장 질환에 유효한 치료효과를 가지고 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김정룡. 소화기계질환. 서울: 일조각; 2000, p. 258-76.
2. 대한소화기학회. 염증성장질환. 서울: 군자출판사; 1999, p. 1, 26-7, 49-61, 141-4, 261.
3. 양석균. 한국인의 염증성 장질환의 현황과 임상적 특징. 대한소화기학회지. 2002;40:1-14.
4. 대한장연구학회. 潰瘍性大腸炎. 서울: 군자출판사; 2003, p. 8.
5. 김동현. 발효식품이 만드는 유산균이 내 몸을 살린다. 서울: 현언; 2007, p. 95-8.
6. 서철훈, 이형호, 최기숙, 임동석, 유형천, 이영수, 최창원, 김희철. 濕熱痢로 변증한 潰瘍性大腸炎 환자의 芍藥湯加味方 치험 2례. 대한한방내과학회지. 2006;27(4):984-90.
7. 차준환. 潰瘍性大腸炎과 托裏消毒飲의 協能. 대한한의학회지. 1972;12:148-57.
8. 윤상협. 補腸健脾湯加減方으로 교원성 대장염의 15년 설사를 호전시켰던 치험 1례. 대한성인병학회지. 2001;7(1):78-81.
9. 안중환, 최은영, 이성환, 박인식, 임성우. 黃連解毒湯이 DSS로 유발된 흰쥐의 潰瘍性大腸炎에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006;27(2):182-95.
10. 김승욱, 임성우. 導赤地榆湯이 潰瘍性大腸炎 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(3):200-10.
11. 황태현. 茵陳五苓散이 DSS로 유발된 흰쥐의 潰瘍性大腸炎에 미치는 영향. 東國大學校 大醫院 博士學位論文. 2006.
12. 최은영. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 大腸粘膜炎 손상에 대한 赤小豆當歸散의 치료효과. 東國大學校 大醫院 碩士學位論文. 2004.
13. Yoo BH, Lee BH, Kim JS, Kim NJ, Kim SH, Ryu KW. Effects of Shikunshito-Kamiho on Fecal Enzymes and Formation of Aberrant Crypt Foci Induced by 1,2-Dimethylhydrazine. Biol Pharm Bull. 2001;24(6):638-42.
14. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 서울: 경희대학교 한의과대학; 1974, p. 115, 242.
15. Hollenbach E, Vieth M, Rosessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of

- RICK/Nuclear factor- κ B and p38 signalling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn Disease. *J Biol Chem.* 2005;280:14981-8.
16. Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 1985;14(3):157-67.
 17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
 18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biol Chem.* 1978;95(2):351-8.
 19. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidases. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-69.
 20. Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. Antioxidative effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overload mice. *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4456-60.
 21. Kruis W. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(suppl.4):75-8.
 22. Murai KJ, Hismitsu KI, Imamura L and Kobachi K. Effect of oral administration to rats of various undigestible saccharides on fecal pH, water content and enzyme activity. *Bifidobacteria Microflora.* 1994;13:91-8.
 23. 김태일, 정혜원, 박영수, 김원호, 최창환, 이재훈, 이현웅, 박정엽. 潰瘍性 大腸炎의 임상 경과. 대한소화기학회지. 2001;38(3):169-76.
 24. G. N. Stemmermann. Pattern of disease among Japanese living in Hawaii. *Arch. Environ. Health.* 1970;20:266-73.
 25. Yoshiyuki Morishita, Taro Tsukada. Changes in the intestinal microflora in association with colon tumorigenesis in rats treated with 1,2-dimethylhydrazines hydrochloride. *Microbiol. Immunol.* 1983;27(6):485-93.
 26. 황은희. 食餌 纖維素 攝取常態와 便 膽汁酸 造成과의 관계. 韓國營養學會誌. 1996;29(1):41-9.
 27. 전정열, 이철호, 이광열, 유정준, 박세영, 임석원, 김현식, 이종균, 이중달. 염증성 장질환에서 cyclosporine의 치료효과. 대한외과학회지. 1997;53(1):62-78.
 28. Hanauer SB. Medical therapy of ulcerative colitis. *Lancet.* 1993;342(8868):412-7.
 29. Hanauer SB. Inflammatory bowel disease. *N Eng J Med.* 1996;334(13):841-8.
 30. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel disease role in pathogenesis and clinical implications. In: Sartor RB, Sandborn WJ, ed. *Kirsner's Inflammatory Bowel Disease*, 6th ed. New York: Saunders; 2004, p. 138-62.
 31. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2002;122:44-54.
 32. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology.* 2004;126:1620-33.
 33. 강어진, 이상선, 양차범, 신현경. 主要食餌纖維質原이 添加된 食餌가 노화 흰쥐의 腸內酵素 및 有害產物에 미치는 影響. 韓國營養學會誌. 1998;11(5):488-92.
 34. 이종훈. 病原微生物學. 서울: 壽文社; 1973, p. 133-83.
 35. 김소연, 류봉하, 박재우. 靑양성 대장염 동물모델에서 사미연건탕의 항염증 및 장내세균 호소활성 억제효과. 대한한의학회지. 2008;29(3):50-62.

36. 김나영, 김재준, 송인성, 김정룡, 김우호. 흰쥐에서 TNBS로 유발된 염증성 대장염의 병태생리에 관한 연구. 대한내과학회지. 1994;47(1):20-35.
37. Park IS. Histological study of experimental colitis induced by dextran sulfate sodium. The Korean J Anat. 2006;39(1):27-33.
38. Verspaget HW, Mulder TPJ and Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis: a disturbed balance between damage and protection. A selective review. Scand J Gastroenterol. 1991;26(suppl.188):44-51.
39. Sartor RB. Cytokine in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. Gastroenterology. 1994;106:533-9.
40. Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D and Targan SR. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. J Immunol. 1997;159(12):6276-6282.
41. 서영준. 선택적 COX-2 저해약물의 화학 암 예방 효과 및 작용기전 연구. 신약개발지원사업 최종보고서. 02-PJ2-PG3-20802-0003. 2003. p. 1.
42. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. Mutation Research. 2001; Sep 1:480-1, 243-68.
43. Kim SJ, Choi DH, Chung YT. Gliotoxin protects against TNBS-induced colitis via down-regulation of NF- κ B activation. The Korean J Anat. 2004;37(3):309-15.
44. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. Toxicol. 2003; 189(1-2):41-54.
45. Kurutas EB, Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B. Effects of antioxidant therapy on leukocyte myeloperoxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase and plasma malondialdehyde levels in experimental colitis. Mediators inflamm. 2005;2005(6):390-4.
46. N. Nalini, K. Sabitha, P. Viswanathan, V.P. Menon. Influence of spices on the bacterial enzyme activity in experimental colon cancer. J. of Ethnopharmacology. 1998;62(1):15-24.
47. B. Goldin, S.L. Gorbach. Alteration in fecal microflora enzymes related to diet, age, Lactobacillus supplements, and DMH. Cancer. 1977;40:2421-6.
48. Lee HS, Han SY, Ryu KY and Kim DH. The degradation of glycosaminoglycans by intestinal microflora deteriorates colitis in mice. Inflammation. 2009;32(1):27-36.