해죽순 물 추출물의 급성 췌장염 억제 효과

배기상[1,2,3*]

1 : 원광대학교 한의과대학 약리학교실, 2 : 원광대학교 한방심신증후군연구센터, 3 : 한국전통의학연구소

Protective Effect of *Nypa fruticans* Wurmb. Water Extract on Acute Pancreatitis

Gi-Sang Bae[1,2,3*]

1 : Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, 2 : Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, 3 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Nypa fruticans Wurmb. (NF) has been used as a folk remedy to treat inflammatory diseases in Asia. In this study, we aimed to investigate the protective effect of NF water extract on cerulein-induced acute pancreatitis (AP). To measure the protective effects of NF on AP, AP was induced via intraperitoneal injection of cerulein (50 μg/kg) hourly for 6 h in mice. NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) or saline was administrated to intraperitoneal injection 1 h before the first injection of cerulein. The mice were sacrificed at 6 h after the final injection of the cerulein. Pancreas, and blood sample were taken for further analysis. Administration of NF water extract inhibited the pancreatic injury, the elevation of pancreatic weight/ body weight ratio, and the elevation of serum digestive enzymes such as amylase and lipase during cerulein-induced AP in mice. Also, pancreas MPO activity, which represents neutrophil infiltration, was inhibited by administration of NF water extract. Taken together, administration of NF water extract reduces the severity of cerulein-induced AP, which suggests a clinical basis that NF could be a potential agent to prevent AP.

keywords : Acute pancreatitis, Cerulein, Digestive enzymes, *Nypa fruticans* Wurmb. (NF)

서 론

췌장은 아밀라아제, 리파아제, 트립신 등의 소화효소를 분비하는 외분비 기능을 담당하는 선방세포, 췌관세포와 인슐린, 글루카곤을 분비하여 혈당을 조절하는 내분비 기능을 담당하는 랑게르한스섬으로 이루어져 있다[1]. 이 중 췌장의 외분비 기능에 문제가 발생하면 췌장염이 발병하게 되는데, 그 주요 원인으로는 음주, 담석으로서 전체 병인의 약 80%를 차지하며 그 외로 약물독성, 감염, 고칼슘혈증 등의 요인이 있다[2]. 다양한 원인으로 인하여 소화효소가 과활성되면 췌장이 자가 소화됨으로써 염증반응이 발생하며, 염증반응은 췌장에서만 발생하는 경미한 증상에서부터 간과 폐 기능 실조 및 순환장애 등의 합병증을 동반하는 다발성 장기부전까지 다양한 증상이 나타날 수 있다[3]. 10만 명 중 약 30명 정도의 비율로 췌장염이 발병하고 복부 초음파, CT, MRI, 혈중 소화효소 측정을 통한 진단방법이 사용되며, 발병 시에는 5-10%의 사망률을 보인다[4,5]. 정맥 내 수액공급, 진통제 및 항생제 투여를 통해 일시적으로 증상을 완화하는 처치방법만이 있을 뿐 명확한 치료방법이 없으며, 이를 해결하기 위해 많은 연구가 진행되고 있지만 정확한 치료법 및 발병기전이 아직 밝혀지지 않고 있다[6].

해죽순은 '바다에서 나는 죽순'이라는 뜻으로 바다에서 자라는 새순의 모양이 우리나라의 죽순과 비슷하여 붙여진 이름이다. 해죽순은 천남성과에 속하는 식물로서 인도, 말레이시아, 인도네시아, 필리핀 및 미얀마 지역의 부드러운 갯벌, 느린 유속의 강에서 자생한다[7]. 동남아시아 지역에서는 전통적으로 천식, 결핵, 인후염, 간질환 및 진통제로써 사용되고 있으며 다량의 polyphenol, flavonoid, 비타민 E, 칼슘 외에도 chlorogenic acid, protocatechuic acid, kaempferol 등을 함유하고 있어 항산화, 항염증에 대한 효능이 보고되어 있다[8-12]. 이처럼 염증 질환에서 해죽순의 항염증 효과에 관한 연구 결과가 보고되고 있지만, 아직 급성 췌장염에 관한 연구는 이루어지지 않고 있으며 다양한 선행 연구 결과들을 참고하여 보았을 때 급성 췌장염에서도 유의한 효과를 나타낼 것으로 생각되어 연구를 진행하게 되었다.

이에 본 연구에서는 cerulein으로 유도한 생쥐의 급성췌장염 모델에서 해죽순 물 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위하여, 해

* Corresponding author

Gi-Sang Bae, Department of Pharmacology, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, 54538 Jeonbuk, South Korea

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

·Received : 2020/09/17 ·Revised : 2020/10/27 ·Accepted : 2020/11/24

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.12.34.6.334

Available online at https://kmpath.jams.or.kr & http://jppkm.org

죽순 물 추출물을 전처리한 후 급성 췌장염을 유발한 생쥐에서 췌장의 조직학적 변화, 생쥐 몸무게에 대한 췌장 무게 비율, 췌장 소화효소인 Amylase와 Lipase 수치, 호중구 침윤도를 측정하였고, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 해죽순 (NF, *Nypa fruticans* Wurmb.)은 토디팜코리아 (서울, 대한민국)에서 구매하여 사용하였다. 해죽순 물 추출물은 증류수 1 ℓ에 해죽순 100 g을 넣고 2시간 30분 동안 전탕한 액을 여과한 후, 여과액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후 사용하였다. 동결 건조시킨 후 최종적으로 분말가루 17.1 g (수득율 17.1%)을 얻었다.

2) 시약

Cerulein, Formaldehyde, Xylene, Hematoxylin, Eosin, Chloroform, Hexadecyltrimetyl ammonium bromide (HTAB), O-dianisidine, Hydrogenperoxide는 Sigma (Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하였다. EnzyChrom™ α-Amylase Assay Kit, QuantiChrom™ Lipase Assay Kit는 BioAssay Systems (Hayward, Canada, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

3) 실험동물

모든 실험은 원광대학교 동물윤리위원회의 허가를 받고 정해놓은 동물 관리 규정에 따라 수행되었다. 본 실험에 사용한 암컷 C57BL/6 생쥐 (체중 15-20 g)는 오리엔트 바이오 (성남, 경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 실험동물은 원광대학교 한의과대학 동물 사육실에서 일정한 조건 (온도: 21±2℃, 습도: 50~60%, 명암: 12시간 주기)하에서 일반 고형사료 (오리엔트 바이오, 성남, 경기도, 대한민국)와 물을 충분히 공급하면서 일주일 동안 사육실 환경에 적응시킨 후 실험하였다.

2. 방법

1) 급성 췌장염 유발

췌장염을 유발하기 위해 생쥐를 16시간 동안 금식시킨 후, cerulein (50 μg/kg)을 1시간 주기로 총 6번 복강 주사하여 급성 췌장염을 유발하였다. 해죽순 물 추출물 (100, 250, or 500 mg/kg)은 첫 번째 cerulein을 주사하기 1시간 전 복강 주사하였고, 정상 그룹은 생리식염수를 복강 주사하였다. Cerulein을 마지막으로 주사한 후 6시간 뒤에 마우스를 희생시켰다.

2) 췌장 중량/ 체중 비율 측정

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

3) 조직학적 관찰 및 분석

췌장과 폐 조직을 적출하고 4% formaldehyde용액을 사용하여 고정한 다음 일반적인 조직표본 제작 방법으로 Hematoxylin & Eosin (H&E)염색을 시행하였다. 광학현미경 (Olympus BX51, Japan)으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다. 각 그룹의 췌장 조직에서 부종 및 염증 수치는 0-3 (0은 정상적인 외관에 상응하고 3은 질병의 중증에 상응함)의 등급으로 채점하였다[13]. 구체적으로 표현하면, 부종과 염증성 세포가 없는 경우 0점, 부분적 부종과 10개 이하의 염증성 세포가 있는 경우 1점, lobule사이의 다발적인 부종과 20개 이하의 염증성 세포가 있는 경우 2점, 선방세포 사이의 다발적인 부종과 20개 이상의 염증성 세포가 있는 경우 3점으로 채점하였다.

4) 혈청 소화효소 측정

Cerulein 마지막 투여 6시간 후에 혈액을 채취하였으며, 5,000 rpm에서 4℃로 5분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청으로 Amylase 및 Lipase kit를 사용해 혈청 소화효소 수치를 측정하였다.

5) 면역 형광 염색법 (Immuno-Fluorescence)

10 μm의 동결 췌장 조직 절편에 0.1 % Triton X-100이 포함된 phosphate buffer saline (PBS)를 상온에서 10분간 처리하였다. 이후 비특이적 항체 결합 방지를 위해 blocking buffer (5 % goat serum, 3 % BSA 를 포함한 PBS)를 상온에서 2시간 처리하였다. anti-neutrophil 항체를 1:500으로 blocking buffer에 희석하여 4℃에서 overnight으로 반응시켰다. 마지막으로 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody를 blocking buffer에 1:2,000으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 세포핵 염색은 DAPI로 진행하였으며 상온에서 5분간 반응시켰다. 면역형광 이미지는 confocal laser microscope (Olympus, Japan)으로 관찰 및 분석하였다.

6) Myeloperoxidase (MPO) assay

췌장에서의 호중구 침윤 (Neutrophils infiltration)은 조직의 MPO 활성도 측정을 통하여 검사하였다. 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)와 HTAB 용액에 조직을 담가 0℃에서 45초간 분쇄한 후 10,000 rpm, 4℃로 20분간 원심분리하였다. 96 well에 세포 상층액, 0.5% HTAB, O-dianisidine (0.68 mg/ml), 0.003% hydrogenperoxide를 각 50 μl씩 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

췌장을 적출한 후, Easy Blue (intron biotechnology, USA) 용액 1 ml에 넣어서 분쇄한 후 100 μl의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취한다. 그 후 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조시켰다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 100 μl씩 넣어 RNA를 용해시키고 정량하였다. mRNA의 발현을 정량적으로 표현하기 위해 정량 중합 효소 반응을 측정하였다. 합성된 cDNA 1 μl, Real time PCR master mix 4 μl, primer 및 probe를 넣고 PCR 조건으로 반응 시켰다. 정량 중합 효소반응에 쓰인 custom taqman probe 및 TaqMan master mix는 Applied Biosystems (CA, USA)에서 구입하였다.

8) 통계처리

모든 실험결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean±S.E.M.로 나타내었다. 실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 분석프로그램 (v22.0)의 one way ANOVA에 준하였고, Duncan method로 사후검증을 하였다. P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 해죽순 물 추출물이 췌장 중량/ 체중 비율 (P.W./ B.W. Ratio) 변화에 미치는 효과

급성 췌장염의 대표 증상인 구토, 탈수는 체중 감소를 초래시키고, 췌장은 부종이 발생하여 조직 무게가 증가하기 때문에 P.W./ B.W. 비율은 췌장염의 주요 지표로써 활용된다. 본 실험에서는 해죽순 물 추출물 (100, 250, or 500 mg/kg)을 cerulein을 투여하기 1시간 전 복강 주사하였고, cerulein은 1시간 간격으로 총 6번 복강 투여하여 생쥐의 급성 췌장염을 유발하였다. 해죽순 추출물의 투여 농도는 선행 논문 연구를 참고하여 설정하였다[15]. 그 결과 정상 그룹과 비교해 급성 췌장염 유발그룹에서는 P.W./ B.W. 비율이 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 해죽순 물 추출물을 전처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 P.W./ B.W. 비율이 개선됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

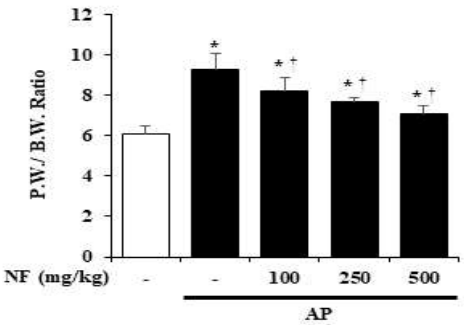

Fig. 1. Effect of *Nypa fruticans* Wurmb. (NF) water extract on pancreatic weight/ body weight ratio during cerulein-induced acute pancreatitis (AP). Mice were pre-treated with NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. 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.

2. 해죽순 물 추출물이 췌장 조직에 미치는 효과

급성 췌장염으로 인한 췌장 조직의 손상과 염증 정도를 관찰하기 위해 췌장 조직을 이용하여 H&E 염색법을 시행하였다. 그 결과, 정상 그룹에서는 전형적인 췌장의 조직 구조를 관찰할 수 있었지만, 급성 췌장염을 유발한 그룹의 췌장 조직에서는 염증성 세포의 침윤 및 부종으로 인해 조직 사이의 간격이 증가함을 관찰할 수 있었다. 하지만 해죽순 물 추출물을 전처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 염증성 세포의 침윤과 조직의 부종이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

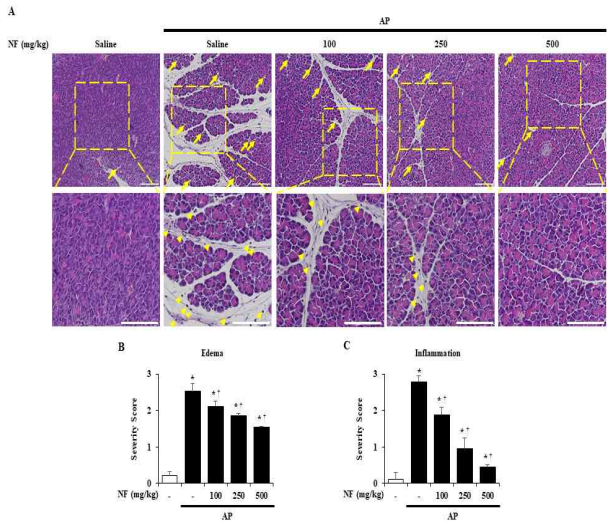

Fig. 2. Effect of NF water extract on pancreas histology during cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. (A) Representative hematoxylin & eosin (H&E)-stained sections of the pancreas. Histological scores for (B) edema (arrow on H&E staining) and (C) inflammation (arrowhead on H&E staining). 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. Scale bar: 100 μm.

3. 해죽순 물 추출물이 소화효소 활성에 미치는 효과

급성 췌장염의 증후인 췌장 소화효소 과분비는 급성 췌장염의 진단 및 염증의 중증도를 확인할 수 있는 지표로서 실제 임상에서도 흔히 확인하는 생화학적 수치이다. 생쥐의 혈청에서 췌장 소화효소인 Amylase와 Lipase 수치를 측정한 결과 정상 그룹에 비해서 급성 췌장염을 유발한 그룹에서 두 가지 수치 모두 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 해죽순 물 추출물을 전처리한 그룹에서는 혈청 Amylase와 Lipase 수치 모두 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

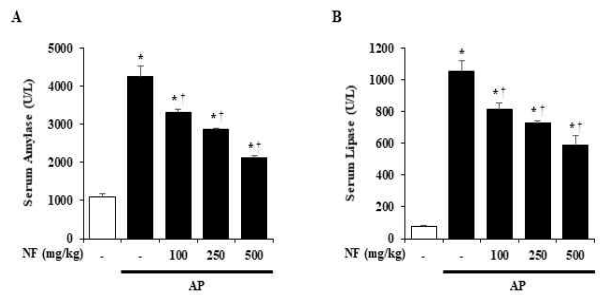

Fig. 3. Effect of NF water extract on the production of serum digestive enzymes during cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. Serum (A) amylase and (B) lipase activities were measured 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.

4. 해죽순 물 추출물이 MPO 활성에 미치는 효과

MPO는 호중구에 존재하는 효소로써, 호중구의 침윤 정도를 확인하는 방법으로 MPO 활성을 측정하는 방법이 있다. 급성 췌장염 시에는 췌장 조직 내로 호중구의 침윤이 증가함으로 MPO 활성 측정을 통해 이를 판단할 수 있다[14]. 측정 결과, 정상 그룹과 비교해서 급성 췌장염을 유발한 그룹에서 호중구 침윤 (Fig. 4A)과 MPO 활성(Fig. 4B)이 증가하였지만, 해죽순 물 추출물은 전처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 호중구 침윤과 MPO 활성이 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

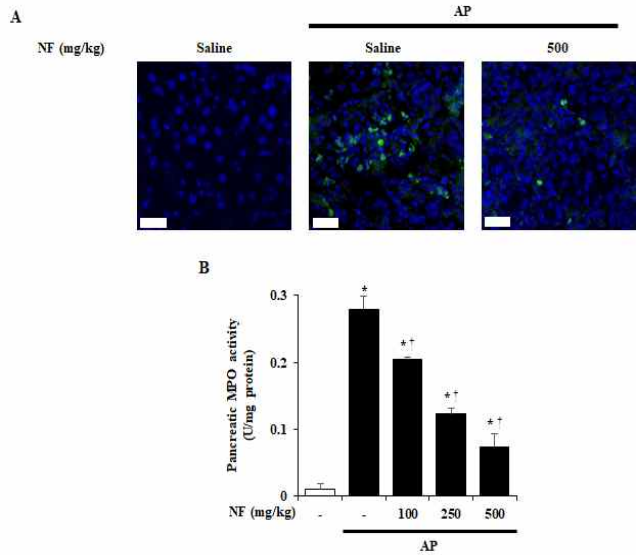

Fig. 4. Effect of NF water extract on the MPO activity during cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. (A) Representative immuno-fluorescence sections of the pancreas for neutrophils (green fluorescence). (B) MPO activity was measured in the pancreas 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. Scale bar: 20 μm.

5. 해죽순 물 추출물이 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 효과

급성 췌장염으로 인한 염증 정도를 관찰하기 위해 췌장 조직을 이용하여 전염증성 사이토카인의 발현을 확인하였다. 그 결과, 정상 그룹에 비해 급성 췌장염이 유발된 그룹에서는 전염증성 사이토카인인 interleukine (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α의 mRNA가 유의성 있게 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 하지만 해죽순 물 추출물을 전처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 IL-1β, IL-6, TNF-α의 mRNA가 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

6. 해죽순 물 추출물이 췌장염으로 인한 폐 손상에 미치는 효과

급성 췌장염의 유발로 인한 폐 조직의 손상도와 염증의 정도를 관찰하기 위해 H&E 염색 방법으로 폐의 조직학적 구조 및 염증 정도를 관찰하였다. 분석 결과, 정상 그룹에서는 폐의 전형적인 조직 구조를 나타내었지만, cerulein를 투여한 급성 췌장염 그룹에서는 조직 사이의 염증성 세포들의 침윤과 출혈이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 해죽순 물 추출물을 전처리한 그룹에서는 염증성 세포의 침윤과 출혈이 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

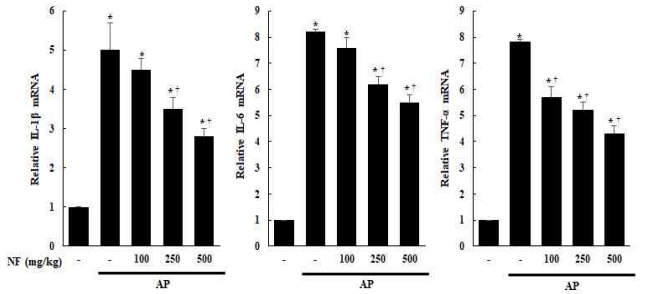

Fig. 5. Effect of NF water extract on the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines during cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with NF water extract (100, 250, or 500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. The pro-inflammatory cytokines were measured 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.

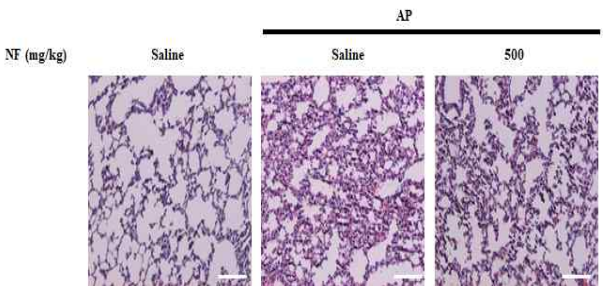

Fig. 6. Effect of NF water extract on lung histology during cerulein-induced AP. Mice were pre-treated with NF water extract (500 mg/kg) intraperitoneally at 1 h before the first cerulein (50 μg/kg) injection. Mice were injected with cerulein hourly for 6 h and sacrificed at 6 h after the last cerulein injection. Representative hematoxylin & eosin (H&E)-stained sections of the lung. Results are representative of three experiments. Scale bar: 100 μm.

고 찰

해죽순은 대니, 니파팜, 니파야자라고도 불리며 수액은 설탕을 만드는 원료로 쓰일 뿐만 아니라 감미료, 식초, 음료, 알코올 제조에도 사용된다. 해죽순 열매는 탄수화물, 섬유소, 무기질 및 비타민 A가 풍부하여 원주민들에게 해죽순 수액과 열매는 식용으로 널리 이용되고 있다[16-18]. 최근 국내에도 수입되어 일부 방송 매체를 통해 소개되면서 관심이 증가하고 있으며, 다양한 염증 질환에서 유효한 효능이 입증되고 있다[15,19-23]. 해죽순에 다량 함유되어있는 Chlorogenic acid, Protocatechuic acid, Kaempferol 등의 성분들은 항염증, 항산화, 콜레스테롤 억제 효과가 뛰어난 특징을 지니고 있다[10]. 해죽순을 직접적으로 응용한 선행연구들을 살펴보게 되면 랫트의 당뇨 모델에서 해죽순 물 추출물의 고혈당 억제[19], 인슐

린 분비 촉진 및 간 보호 효과[20]를 가지며, 랫트의 좌골신경 손상 모델에서 TRPV1 억제를 통한 진통 및 항염증 효과[15]가 보고되어 있다. 생쥐의 고혈당 모델에서도 해죽순 메탄올 추출물이 혈당 억제 및 진통 효과[21]를 가지며 그 외에도 항암효과[22]에 관한 선행연구도 보고되어있다. 이러한 연구들은 대부분 용매가 물이 아니고 메탄올, 에탄올, 혹은 식초로서 해죽순 물 추출물을 이용한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 소재의 추출법이나 용매에 따라 포함되는 유효 성분이 달라질 수 있기 때문에 용매를 다르게 하여도 항염 효과가 유지되는지 연구하는 것도 중요하다. 최근 본 연구팀은 해죽순 물 추출물을 이용한 선행연구로서 lipopolysaccharide (LPS)로 유도한 생쥐의 대식 세포주 염증반응에서 해죽순 물 추출물의 항염증 효과[23] 및 TNF-α로 유도한 사람 각질 형성 세포주의 염증반응에서 해죽순 물 추출물의 항염증 효과[12]를 입증하였고, 이제 해죽순 물 추출물에서도 유효한 항염증 효과가 있을 것으로 판단하였다. 따라서 해죽순의 탁월한 항염증 효과를 바탕으로 해죽순 물 추출물이 급성 췌장염에도 유의한 효과를 가질 것으로 판단되어 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서 생쥐의 급성췌장염을 유도하기 위해 사용한 cerulein은 cholecystokinin (CCK) 유사 물질로써, CCK는 십이지장이 지방과 단백질 등에 반응하여 장내 분비세포에서 생성·배출되는 폴리펩타이드 호르몬이다[24]. CCK는 Amylase, Lipase와 같은 소화효소 분비기능을 가진 췌장 선방세포를 자극하여 소화효소의 분비를 촉진하는데, CCK 유사물질인 cerulein 고용량을 지속해서 투여하게 되면 과분비 된 소화효소에 의해 췌장이 자가 소화되어 췌장염이 유발되는 모델이다[25]. 이러한 모델은 병리 조직학적 소견에 대한 재현성이 뛰어나 설치류 급성 췌장염을 유발하는 데 있어 가장 많이 사용되는 실험동물 모델이며, 이에 본 연구에서도 cerulein을 이용하여 급성 췌장염을 유발하였다[26]. Cerulein으로 급성 췌장염을 유발하면 부종이 발생하여 췌장 조직 내에 체액의 과잉공급·정체가 일어나고, 이에 따라서 몸무게 대비 췌장 무게의 비율이 증가하게 된다[27]. 본 연구에서도 Cerulein 투여로 생쥐의 급성 췌장염을 유발한 결과 몸무게 대비 췌장 무게의 비율이 증가함을 확인할 수 있었으며, 해죽순 물 추출물이 이를 유의하게 감소시키는 결과를 얻었다 (Fig. 1 and 2). 이는 해죽순 물 추출 투여가 급성 췌장염으로 인한 췌장 조직의 부종을 억제할 수 있음을 의미한다.

급성 췌장염의 초기 단계인 췌장 소화효소의 과분비는 선방세포의 손상을 초래하고 이로 인해 염증반응이 시작된다. 따라서 소화효소의 수치는 급성 췌장염의 지표로써 흔히 사용하며 정상 수치보다 혈청 amylase는 약 3배, 혈청 lipase는 약 5배 이상 증가하였을 경우 급성 췌장염으로 판단한다. 혈청 amylase 수치는 급성 췌장염의 초기에 빠르게 증가하는 반면, 혈청 lipase는 급성 췌장염의 후기 단계에 증가하는 특징으로 일반적으로 급성 췌장염을 진단할 때에는 두 가지 소화효소 모두 측정한다[28,29]. 본 실험에서도 생쥐에 급성 췌장염을 유발하였을 때 혈청 amylase와 lipase 수치가 모두 증가하였으며, 해죽순 물 추출물은 증가한 혈청 amylase와 lipase 수치를 모두 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 3). 이는 해죽순물 추출물 투여가 소화효소의 과분비를 억제함으로써 급성췌장염을 억제할 수 있음을 보여준다.

호중구는 염증이 발생한 부위로 가장 먼저 이동하는 면역 세포로써, 급성 췌장염의 초기 단계에서도 췌장 조직 내로 유입하여 염증반응 및 조직손상을 일으킨다. 급성 췌장염시 과다 유입된 호중구가 활성산소종과 가수분해효소를 분비하게 되고 이는 조직손상을 더욱 증가시키게 된다. 따라서 호중구의 유입을 조절하는 것이 염증을 억제하는 데 중요하며, 선행연구에서도 호중구를 억제하면 급성 췌장염이 완화된다는 보고들이 있다[30-32]. 본 연구에서도 생쥐에 급성 췌장염 유발 시, 췌장 조직내로 호중구의 유입이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 해죽순 물 추출물은 췌장의 호중구 유입을 유의하게 억제할 수 있었다 (Fig. 4). 이를 통해 해죽순 물 추출물이 급성 췌장염 시 증가하는 호중구의 유입을 억제함으로써 염증을 조절한다는 것을 보여준다.

급성 췌장염의 경우 다양한 합병증을 동반하게 되는데 대부분이 폐와 관련된 병변인 급성호흡부전이나 급성 폐기능 부전 등이다[33]. 급성 췌장염에 동반된 폐 손상은 초기에 폐로 모이는 호중구가 폐포 내피세포를 공격하고, 그에 따라 혈관 투과성이 증가되어 출혈이 증가하는 것으로 알려져 있다[34]. 따라서, 본 연구에서 췌장과 더불어 폐 조직에서도 조직학적 관찰을 통해 폐의 손상을 확인하였다. 급성 췌장염을 유발한 그룹에서는 기존의 보고와 마찬가지로 염증성 세포 침윤 및 출혈이 관찰되었다 (Fig. 6). 그러나 해죽순 물 추출물을 투여한 그룹에서는 이러한 폐 조직의 손상이 억제됨을 볼 수 있었고, 이는 해죽순 물 추출물이 급성 췌장염 시 발생되는 폐 합병증 억제에도 효과가 있음을 보여준다.

이상의 결과를 종합해 보았을 때, 해죽순 물 추출물은 cerulein으로 유발한 생쥐의 급성 췌장염에서 부종, 소화효소 분비 및 호중구의 유입을 억제함으로써 염증 및 조직손상을 억제하였다고 판단된다. 현재 췌장염 치료제 연구는 단백 분해효소를 위주로 이루어지고 있으나, 아직 효율성이 현격이 떨어져서 치료제 개발이 시급하다. 본 연구에서 보고한 해죽순 물 추출물의 췌장염 억제 효과는 단백 분해효소를 조절할 뿐만 아니라, 뛰어난 항염증 효과를 통해서 이루어 진 것으로 판단된다. 본 연구 결과를 바탕으로 추후 만성 췌장염 및 췌장암과 같은 질환 연구에서도 해죽순을 응용해 볼 가치가 있다고 생각한다.

결 론

본 실험은 cerulein을 이용하여 생쥐에 급성 췌장염을 유발하였을 때, 해죽순 물 추출물의 췌장염 억제 효과 및 항염증 효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

해죽순 물 추출물은 몸무게 대비 췌장 무게 비율을 유의하게 억제하였다.

해죽순 물 추출물은 췌장의 부종과 췌장 내 염증성 세포 침윤을 억제하였다.

해죽순 물 추출물은 혈청 amylase와 lipase 활성을 억제하였다.

해죽순 물 추출물은 췌장으로의 호중구 유입을 억제하였다.

해죽순 물 추출물은 췌장 내 전염증성 사이토카인의 발현 증가를 억제하였다.

해죽순 물 추출물은 췌장염으로 인한 폐 손상을 억제하였다.

이상의 결과로 해죽순 물 추출물이 급성 췌장염에 대한 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 해죽순은 추후 만성 췌장염을 비롯한 다양한 소화기 질환에 응용될 수 있다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2019년도 원광대학교 교비지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration. Nat. 2018;557(7705):351-8.
2. Kota SK, Krishna SV, Lakhtakia S, Modi KD. Metabolic pancreatitis: Etiopathogenesis and management. Indian J Endocrinol Metab. 2013;17(5):799-805.
3. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute pancreatitis: bench to the bedside. Gastroenterol. 2007;132(3):1127-51.
4. Zhou MT, Chen CS, Chen BC, Zhang QY, Andersson R. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. World J Gastroenterol. 2010;16(17):2094-9.
5. Krenzer ME. Understanding acute pancreatitis. Nursing. 2016;46(8):34-40.
6. Kimura W, Mössner J. Role of hypertriglyceridemia in the pathogenesis of experimental acute pancreatitis in rats. Int J Pancreatol. 1996;20(3):177-84.
7. Tamunaidu P, Saka S. Chemical characterization of various parts of nipa palm (Nypa fruticans). Ind Crop Prod. 2011;34(3):1423-28.
8. Rahmatullah M, Sadeak SMI, Bachar SC, Hossain MT, Mamun A, Montaha, et al. Brine Shrimp Toxicity Study of Different Bangladeshi Medicinal Plants. Adv Nat App Sci. 2010;4(2):163-73.
9. Bandaranayake WM. Traditional and medicinal uses of mangroves. Mangroves and Salt Marshes. 1998;2:133-48.
10. Prasad N, Yang B, Kong KW, Khoo HE, Sun J, Azlan A, et al. Phytochemicals and Antioxidant Capacity From Nypa Fruticans Wurmb. Fruit. Evid-Based Compl Alt Med. 2013;2013:154606.
11. Lee YH, Kim WK, Jung HA, Oh WK. Analysis of nutritional components and antioxidant activity of nipa palm (Nypa fruticans Wurmb) Flower stalk. Kor J Food Nutr. 2017;30(5):1080-6.
12. Bae GS, Park SJ. Anti-inflammatory Effect of Nypa fruticans Wurmb. on tumor necrosis factor (TNF)-α -induced Inflammatory response in HaCaT cells. Kor J Herbology. 2019;34(1):51-7.
13. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Wang S, Song HJ, Park SJ. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathway. Mol Immunol. 2016;74:27-38.
14. Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regner S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. J Leukoc Biol. 2011;90:975-82.
15. Kang MS, Hyun KY. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Nypa fruticans Wurmb by Suppressing TRPV1 in the Sciatic Neuropathies. Nutrients. 2020;12(1):135.
16. Kong C, Yehye WA, Abd Rahman N, Tan MW, Nathan S. Discovery of potential anti-infectives against Staphylococcus aureus using a Caenorhabditis elegans infection model. BMC Complement Altern Med. 2014;14:4.
17. Tang SY, Hara S, Melling L, Goh K.J, Hashidoko Y. Burkholderia vietnamiensis isolated from root tissues of nipa palm (Nypa fruticans) in Sarawak, Malaysia, proved to be its major endophytic nitrogen-fixing bacterium. Biosci Biotech and Biochem. 2010;74(9):1972-5.
18. Osabor VN, Egbung GE, Okafor PC. Chemical profile of Nypa fruiticans from Cross River Estuary, south eastern Nigeria. Pakist J Nutrition. 2008; 7(1):146-50.
19. Yusoff NA, Ahmad M, Al-Hindi B, Widyawati T, Yam MF, Mahmud R, et al. Aqueous Extract of Nypa Fruticans Wurmb. Vinegar Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Normoglycemic Rats. Nutrients. 2015;7(8):7012-26.
20. Yusoff NA, Lim V, Al-Hindi B, Abdul Razak KN, Widyawati T, Anggraini DR, et al. Nypa Fruticans Wurmb. Vinegar's Aqueous Extract Stimulates Insulin Secretion and Exerts Hepatoprotective Effect on STZ-Induced Diabetic Rats. Nutrients. 2017;9(9):925.
21. Reza H, Haq WM, Das AK, Rahman S, Jahan R, Rahmatullah M. Anti-hyperglycemic and Antinociceptive Activity of Methanol Leaf and Stem Extract of Nypa Fruticans Wurmb. Pak J Pharm Sci. 2011;24(4):485-8.
22. Sari DP, Basyuni M, Hasibuan PA, Sumardi S, Nuryawan A, Wati R. Cytotoxic and Antiproliferative Activity of Polyisoprenoids in Seventeen Mangroves Species Against WiDr Colon Cancer Cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(12):3393-400.
23. Bae GS, Park SJ. The Anti-inflammatory Effect of Nypa fruticans Wurmb. Fruit on Lipopolysaccharide-induced

Inflammatory response on RAW 264.7 cells. Kor. J. Herbology. 2016;31(5):79-84.
24. Johnson LR. Gastrointestinal Hormones and Their Functions. Annu Rev Physiol. 1977;39:135-58.
25. Cope O, Culver PJ, Mixter CG Jr, Nardi GL. Pancreatitis, a diagnostic clue to hyperparathyroidism. Ann Surg. 1957;145:857-63.
26. Lee HS. Experimental models of pancreatitis. Clin Endosc. 2014;47(3):212-6.
27. Panteghini M, Pagani F, bonora R. Clinical and analytical evaluation of a continuous enzymatic methods for measuring pancreatic lipase activity. Clin chem. 1993;39(2):304-8.
28. Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J, Sandoval J, Viña J, et al. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. Curr Med Chem. 2006;13(23):2775-87.
29. Tietz NW, Shuey DF. Lipase in serum--the elusive enzyme: an overview. Clin Chem. 1993;39:746-56.
30. Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regnér S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. J Leukoc Biol. 2011;90(5):975-82.
31. Chen G, Xu F, Li J, Lu S. Depletion of Neutrophils Protects Against L-arginine-induced Acute Pancreatitis in Mice. Cell Physiol biochem. 2015;35(6):2111-20.
32. Bae GS, Kim DG, Jo IJ, Choi SB, Kim MJ, Shin JY, et al. Heme oxygenase-1 Induced by desoxo-narchinol-A Attenuated the Severity of Acute Pancreatitis via Blockade of Neutrophil Infiltration. Int Immunopharmacol. 2019;69:225-34.
33. Gori E, Pierini A, Ceccherini G, Citi S, Mannucci T, Lippi I, et al. Pulmonary complications in dogs with acute presentation of pancreatitis. BMC Vet Res. 2020;16(1):209.
34. Ge P, Luo Y, Okoye CS, Chen H, Liu J, Zhang G, et al. Intestinal barrier damage, systemic inflammatory response syndrome, and acute lung injury: A troublesome trio for acute pancreatitis. Biomed Pharmacother. 2020;132:11077