

해동피를 포함한 한약제제 HPL-01의 Dextran sodium sulfate 유도 궤양성 대장염 완화 효과

조형권 · 김대성 · 조성완¹ · 신나래² · 박영미² · 이학용² · 신동엽^{2*}

(유)한풍제약, 1: 건양대학교 제약생명공학과, 2: 주식회사 인비보

Anti-Colitic Effects of Herbal Medicine HPL-01 on Dextran Sulfate Sodium Induced Ulcerative Colitis in Rat

Hyoung-Kwon Jo, Dae-Sung Kim, Seong-Wan Cho¹, Na-Rae Shin², Young Mi Park²,
Hak Yong Lee², Dong-Yeop Shin^{2*}

Central Research and Development, Hanpoong Pharm & Foods,
1: Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University,
2: INVIVO Co. Ltd.

This study aimed to investigate the anti-inflammatory effects of herbal complex HPL-01 on dextran sodium sulfate(DSS) induced ulcerative colitis in rat. Adult male Sprague-Dawley rats were randomized and divided into six groups. Five groups, excluding the normal group, were orally administered orally HPL-01(50, 100, or 200 mg/kg) for 21 days, and acute colitis was induced during the last 7 days by 4% DSS in the drinking water. The HPL-01 administered DSS-treated rats exhibited significantly reduced colon macroscopic damage index and increased body weight and colonic length 7 days after DSS treatment. Additionally, these rats showed lower serum levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 than those treated only with DSS. HPL-01(100 or 200 mg/kg) also attenuated the DSS-induced increase in the number of white blood cells, granulocytes, and mid cells and improved intestinal damage. Taken together, these results suggest that HPL-01 is a promising anti-inflammatory agent that may be in the treatment of colitis.

keywords : Herbal complex HPL-01, Ulcerative colitis, Dextran sulfate sodium, Colon length, TNF- α , IL-6

서 론

염증성 장 질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 세포 침윤과 염증 매개체와 관련된 장 점막 손상을 특징으로 하는 만성 염증질환으로서, 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)이나 크론병(Crohn' disease, CD) 등을 유발하는 만성 재발성 장질환을 말한다¹⁾. 염증성 장질환 환자는 만성 염증, 장 점막 파괴 및 설사, 발열, 복통과 경련, 체중감소, 소화 장애 등의 증상을 공통적으로 보이는 다인성 장 질환을 보이며, 증세가 심할 경우에는 혈변, 탈수와 함께 대장의 위축 현상이 발생한다²⁾.

염증성 장 질환의 요인으로는 일반적으로 장내 세균 항원에 대한 점막 면역 반응의 규제 완화, 전 염증성 사이토카인 생성 증가, 면역 세포 활성화 등의 자가 면역 질환과 유전적 요인 및 환경적 노출로 알려져 있다³⁾.

Dextran sulfate sodium(DSS)로 유발시킨 염증성 장 질환 동물모델은 주로 hamster, mouse, rat을 사용하고 있는데, 이 중 rat DSS 모델은 사람의 염증성 장 질환 초기에 나타나는 체중 감소, 설사, 혈변, 점막궤양, 대장의 위축 등의 증상과 대장의 상피세포에 손상에 관한 염증성 장 질환과 가장 유사하다고 알려져 있다⁴⁾.

염증성 장 질환의 치료는 외과적 수술법과 약물 치료를 사용하고 있는데, 염증성 장 질환의 치료 약물은 설파살라진(sulfasalazine), 메살라민(mesalamine), steroid, anti-biotic, aminosaliclyate으로 병세의 유지와 호전을 위해 사용되고 있으나 현재까지 완치할 수 있는 약물 치료법은 아직 없다⁵⁾. 이 중 설파살라진은 5-ASA (5-acetylsalicylic acid)와 sulfapyridine을 결합한 약물로, 장의 염증을 가라앉혀 증상 완화를 위한 초기 치료 및 병의 재발을 방지하는 유지 요법으로 염증성 장 질환에 치료약물로

* Corresponding author

Dong-Yeop Shin, 101, 121, Dehak-ro, Nonsan-si, Chungnam, Republic of Korea

E-mail : sdy1325@hanmail.net Tel : +82-41-733-1258

Received : 2020/12/29 Revised : 2021/02/22 Accepted : 2021/04/13

© 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.2021.02.35.2.64

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

사용되어 왔으나 장기간 복용시 구역질, 두통, 탈모, 피부 발진, 빈혈, 식욕감퇴 및 간염, 췌장염, 폐렴 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 따라서 기존 약물들의 단점을 보완하기 위해 보다 안전성이 뛰어난 천연물을 활용한 치료제 및 건강기능성 식품 개발연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 항염, 진통, 면역 기능 조절에 효능이 보고된 해동피, 모과, 나복자, 창출, 정제부자를 이용하여 궤양성 대장염 치료 효과를 기대할 수 있는 새로운 생약 조성물을 조합하였다. 이중 두릅나무과 음나무(*Kalopanax pictus*)의 껍질인 해동피(*Kalopanax pictum* Nakai)는 소염, 진통에 대표적인 약재로 사용되었고 사포닌인 kalopanaxsaponin과 lignans 등이 포함되어 있어⁷⁾ 항염증 및 류마티스 관절염에 효과가 있다고 알려진 생약제이다⁸⁾. 또한 인후염, 기침 및 천식 등에 사용되는 모과(*Pseudocyclonia sinensis*)는 대표적인 기관지염이나 감기에 많이 사용되며, 주요성분으로는 triterpenes, β -sitosterol, polyphenols, pectic polysaccharides, ascorbic acid 등이 알려져 있다⁹⁾. 십자화과(Cruciferae)의 나복자(*Raphanus sativus* Linne)는 항염증, 항산화 및 신경보호작용이 있는 alkaloid와 항암 및 항균효과가 있는 isothiocyanates를 함유되어 있으며^{10,11)}, 창출(*Atractylodes japonica*)은 국화과(Asteraceae)에 속한 다년생 삼주의 근경으로 소염작용, 진통 및 해열 작용과 같이 염증성 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 항부정맥, 혈관 확장 및 진통 및 진정, 항염 작용에 효과가 알려져 있는 미나리아재비과(*Ranunculaceae*) 오두(*Aconitum carmichaeli* Debeaux)의 자근을 가공한 부자(*Aconitum carmichaeli* Debx)는 aconitine, mesaconitin 등을 함유하고 있으며¹³⁾, 본 연구에서는 독성 성분을 완화시키기 위해 정제한 정제부자(*Pulvis Aconiti Tuberos Purificatum*)를 사용하였다.

따라서 본 연구에서는 항염증에 효과가 있는 상기 5가지 생약을 일정 비율로 혼합한 HPL-01의 궤양성 대장염 억제 효과를 알아보고자, Dextran sulfate sodium(DSS)로 유발된 궤양성 대장염 동물모델에 HPL-01을 투여하여 체중, 대장길이, CMDI(Colon macroscopic damage index), 염증성 사이토카인 및 대장 조직의 조직학적 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 추출물 제조 및 실험물질의 제조

해동피, 모과, 정제부자를 각각 10 kg, 10 kg, 2.5 kg(4:4:1)을 넣어 10배량(225L)의 50%에탄올(v/v)을 넣어 90 °C에서 3시간 2회 반복 추출한 뒤 여과하였으며, 60 °C 이하에서 감압농축 및 진공건조 하여 건조분말 약 5.37 kg(수율 23.9%)을 얻었다(HPL01 A). 나복자, 창출을 각각 2 kg, 1 kg(2:1)을 넣고 10배량의 물을 넣어 100 °C에서 3시간씩 2회 반복 추출한 뒤 60 °C이하에서 감압농축 및 진공건조 하여 건조분말 약 697.2 g(수율 23.2%)을 얻었다(HPL01 A). 여과하였으며, 감압 농축 후 건조하여 추출물 HPL01 B를 얻었다(HPL01 B). 상기 HPL01 A 건조분말 2.285 kg와 HPL01 B 건조분말 1 kg을 균질하게 혼합하여 HPL-01을 제조하

였으며 분석시료는 (유)한풍제약(Jeonju, Korea)으로부터 공급받아 시험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육관리

실험동물은 5주령의 Sprague-Dawley rat을 주식회사 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동물 입수시 모든 동물의 건강상태 검역을 실시하였으며, 일주일간의 순화 기간을 거쳤다. 실험동물의 사육환경은 온도 23±1°C, 습도 50±5 %, 소음 60분 이하, 조명 시간 및 명암 주기는 08:00~20:00(일 12시간), 조도는 150~300 Lux, 환기는 10~12회/hour로 유지하였다. 사육기간 중의 식이는 일반 고형 사료(Samtako, Osan, Korea)를 공급하였으며 음수는 여과된 음용수를 매일 교체하였다. 실험동물 사육관리는 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC, 동물실험윤리위원회)의 승인 하에 진행되었다(승인번호 IV-RB-13-2004-14).

3. 실험군 구성 및 궤양성 대장염 유도

순화 기간이 끝난 실험동물은 체중을 측정된 뒤 난괴법을 사용하여 균간 체중의 평균값이 균일하도록 각 군당 7마리씩 총 6군으로 분리하였다. 실험군은 정상군(Normal), 대조군(Control), HPL-01 저농도 투여군(HPL-01 50 mg/kg, HPL 50), HPL-01 중농도 투여군(HPL-01 100 mg/kg, HPL 100), HPL-01 고농도 투여군(HPL-01 200 mg/kg, HPL 200), 양성 대조군(Sulfasalazine 100 mg/kg, SUL 100)으로 나누었다.

궤양성 대장염 유도는 HPL-01 투여군 및 양성 대조군의 경우 각 시료를 종류수로 용해하여 매일 일정시간에 21일간 경구 투여하였고, 정상군을 제외한 실험군은 시료 투여 후 14일째부터 음수에 녹인 4% Dextran sulfate sodium(DSS, Sigma, USA)를 7일간 자유 섭취하도록 하였다(Fig. 1)

Normal	Water	Water
Control	Water	4% DSS
HPL 50	50 mg/kg HPL-01	50 mg/kg HPL-01+4% DSS
HPL 100	100 mg/kg HPL-01	100 mg/kg HPL-01+4% DSS
HPL 200	200 mg/kg HPL-01	200 mg/kg HPL-01+4% DSS
SUL 100	100 mg/kg SUL	100 mg/kg SUL+4% DSS
	Pretreatment	Intervention
	Day 0	Day 14 Day 21

Fig. 1. Animal model experimental procedure. HPL-01 (50, 100, 200 mg/kg), Sulfasalazine (100 mg/kg) were administered for whole period. From 14 to day 19, 4% DSS was added to drinking water to induce Ulcerative colitis.

4. 주간 체중량 측정 및 부검

DSS를 음수로 공급하는 기간 동안은 매일 오전 10시에 체중

을 측정하였으며, DSS 공급 후 7일째에 흡입 마취하에 실험동물
을 부검하여 경정맥에서 채혈 후 대장 조직을 적출하였다. 적출한
대장은 길이를 측정 후 조직 분석에 사용하였다.

5. CMDI (Colon macroscopic damage index)

CMDI 평가는 부검시 적출한 대장에서 결장 부위의 손상을
Wallace의 macroscopic scoring system¹⁴⁾을 기준으로 하여 육
안 관찰 및 평가하였으며, 조직의 변화는 염증의 정도와 범위, 충
혈의 정도를 0점에서 6점으로 점수화한 후 평균값으로 계산하였다
(Table 1)

Table 1. Criteria for macroscopic scoring of colonic damage

Appearance	Score
Normal	0
Focal hyperemia, no ulcers	1
Ulceration without hyperemia or bowel wall thickening	2
Ulceration with inflammation at 1 site	3
2 or more site of Inflammation and ulceration	4
Major sites of damage extending > 1 cm along length of colon	5
When an area of damage extended > 2 cm along length of colon, score is increased by 1 for each additional cm of involvement	6

6. 일반 혈액학적 분석 및 혈중 사이토카인 함량 분석

혈액학적 분석 중 일반 혈액학적 검사(Complete blood count
analysis)는 혈액을 EDTA tube(BD Microtainer, USA)에 담아
Roll mixer에 약 30분 회전시킨 후 Auto Hematology
Analyzer(BC-2800vet, Mindray, China)를 이용하여 WBC(white
blood cell), Granulocytes, Lymphocyte, Mid cells를 측정하였
다. 반면 사이토카인 분석은 혈액을 상온에서 30분 응고 시킨 후
원심분리기에 3000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈청을 회수하
였다. 회수한 혈청은 R&D system(Minneapolis, MN, USA)에서
구입한 ELISA kit를 이용하여 TNF- α (tumor necrosis factor- α),
IL-6(interleukin-6)를 분석하였다.

7. 조직학적 분석

적출한 대장 조직은 10% formalin을 사용하여 고정시킨 검체
를 절취하여 재고정시킨 후 파라핀에 포매하여 microtome으로 4
 μ m 간격으로 잘라서 슬라이드 위에 놓은 다음 Hematoxylin-
eosin 염색을 하였다. Hematoxylin-
eosin 염색은 xylene에서 파라핀을
제거하고 탈수 과정을 거친 후 hematoxylin에 4분, eosin에 2분
동안 염색을 실시하였다. 이 후 봉입하여 광학현미경(Olympus
BX50 F4, Japan)를 이용하여 관찰 및 촬영하였다.

8. 통계분석

모든 실험 결과는 평균값과 표준오차(mean \pm S.E.)로 표시하였
고, 통계처리는 SPSS (version 21, SPSS Inc, Chicago, IL,
USA)를 이용하였으며, ANOVA(one-way analysis of variance
test) Duncan 사후검정 비교를 실시하여 전체 실험의 평균값에 대
한 통계적인 유의성은 신뢰구간 P<0.05 수준으로 검정하였다.

결 과

1. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 체중변화에 미치 는 영향

궤양성 대장염 동물 모델의 초기 증상으로는 체중 감소와 대장
길이가 축소된다고 알려져 있다¹⁵⁾. HPL-01의 투여가 궤양성 대장
염 동물 모델의 초기 주요 증상을 완화 시키는지 알아보기 위해
4% DSS가 함유된 음용수를 7일간 섭취하게 하여 체중변화를 측정
하였다(Fig. 2). 궤양성 대장염 유도 7일째 대조군(Control)은
272.2 \pm 10.3 g으로 정상군(Normal)의 304.7 \pm 5.3 g보다 유의하게
체중이 감소되었고, 양성 대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL
100)은 292.4 \pm 2.37 g으로 대조군에 비해 체중이 유의하게(P<0.05)
높은 것으로 나타났다. 반면 HPL-01의 농도별 투여가 궤양성 대장
염 동물 모델의 체중 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, HPL-01
저농도 투여군(HPL 50)은 281.3 \pm 2.5 g, 중농도 투여군(HPL 100)
은 279.1 \pm 6.6 g, 고농도 투여군(HPL 200)은 278.8 \pm 4.9 g으로 대
조군과 비교하여 HPL-01을 투여한 실험군의 체중이 높은 경향을
보였다.

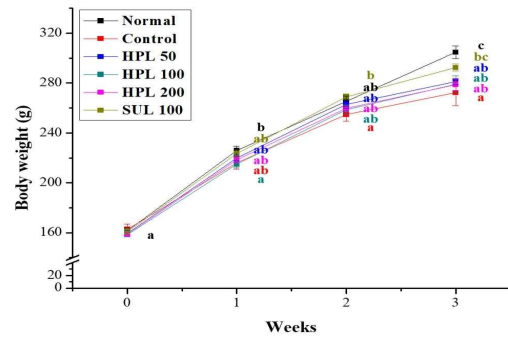


Fig. 2. Effect of HPL-01 on the changes of body weight in
DSS-treated in Rats. The weekly body weight was checked weights.
Ulcerative colitis in rats were induced by 5% DSS dissolved in the drinking
water for 7 days. Rats were administered 4% DSS in drinking water for 7
days with or without HPL-01 (50, 100, 200 mg/kg/day up to 21 days).
Sulfasalazine (100 mg/kg/day up to 21 days) was used as a positive control.
The values in the same row with different superscript letters are
significantly different, P<0.05. Values are represented mean \pm SEM (n=7).

2. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 대장 길이에 미 치는 영향

HPL-01이 DSS로 유도한 궤양성 대장염 동물모델에서 대장
길이에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대장을 적출하여 길이를 측
정하였다(Fig. 3A). 실험 결과 정상군(Normal)은 12.54 \pm 0.53 cm,
대조군(Control)은 9.91 \pm 0.12 cm로 나타나 궤양성 대장염을 유도
함에 따라 대장의 길이가 유의하게(P<0.05) 감소하는 것으로 확인
되었다. 양성 대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)의 대장의
길이는 10.86 \pm 0.34 cm로 나타나 대조군과 비교하여 대장 길이가
증가하는 경향을 보였다. 반면 HPL-01을 투여한 실험군에서는 저
농도 투여군(HPL 50)이 10.49 \pm 0.29 cm, HPL-01 중농도 투여군
(HPL 100)이 10.73 \pm 0.32 cm로 나타나 대조군보다 높은 경향을
보였는데, 고농도 투여군(HPL 200)의 경우 11.09 \pm 0.24 cm로 나타

나 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)보다 높은 경향을 보였으며, 대조군에 비해 유의하게($P < 0.05$) 높은 것으로 조사되었다(Fig. 3B).

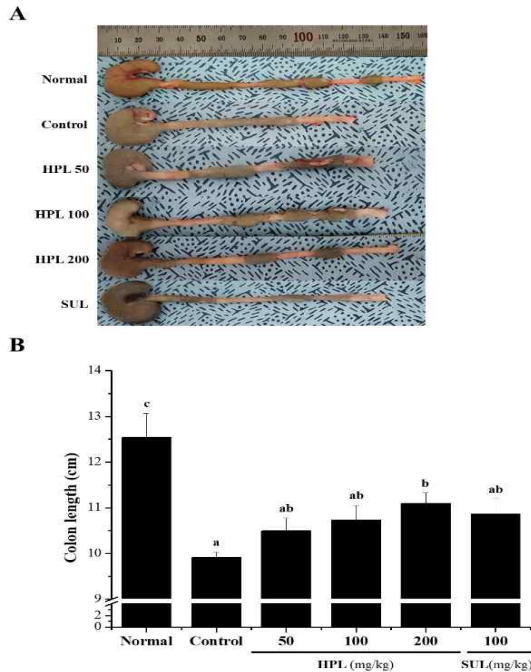


Fig. 3. Effect of HPL-01 on colon length in DSS-treated in Rats. Colons were obtained 7 days after commencement of DSS administration. (A) Macroscopic features of the colons. (B) Colon lengths were measured. Normal group (without DSS), 4% DSS administration group (Control), and 4% DSS with HPL-01 at 50, 100, 200 mg/kg up to 21 days. 4% DSS with Sulfasalazine (Positive control) at 100 mg/kg up to 21 days. a-c Means with the different letters on the bars are significantly different, $P < 0.05$. Data shown are represented mean \pm SEM ($n = 7$).

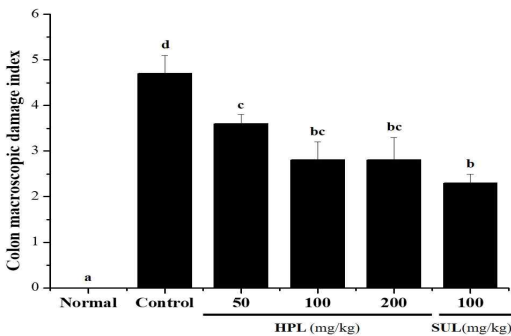


Fig. 4. Effects of HPL-01 on macroscopic score in DSS-induced colitis at day 7 after induction. Colons were obtained 7 days after commencement of DSS administration, and macroscopic score of mice colons were measured. a-d Means with the different letters on the bars are significantly different, $P < 0.05$. Data shown are represented mean \pm SEM ($n = 7$).

3. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 CMDI(Colon macroscopic damage index)에 미치는 영향

DSS로 유도한 대장염 동물모델에서 HPL-01이 CMDI(Colon macroscopic damage index)에 미치는 영향을 알아보기 위해 궤양성 대장염 유도 7일째 대장을 적출 후 대장의 궤양, 염증 및 충

혈을 관찰하여 CMDI를 측정하였다(Fig. 4). 정상군(Normal)에 비해 궤양성 대장염을 유도한 대조군(Control)은 CMDI가 유의하게 ($P < 0.05$) 증가하였으며, 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 대조군에 비해 유의하게 낮았다. 반면 HPL-01 저농도 투여군(HPL 50), HPL-01 중농도 투여군(HPL 100) 및 HPL-01 고농도 투여군(HPL 200)은 대조군과 비교하여 대장의 궤양, 염증 및 충혈이 감소하여 CMDI가 유의하게($P < 0.05$) 낮은 것으로 조사되었다.

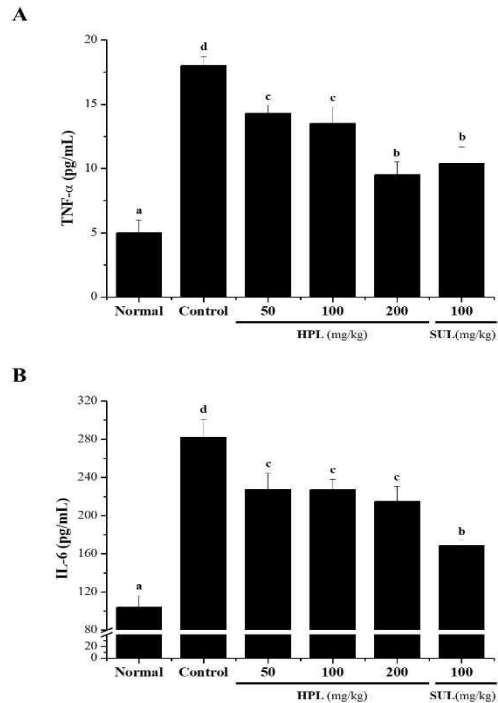


Fig. 5. Effect of HPL-01 on DSS-induced TNF- α and IL-6 production. Level of (A) TNF- α , (B) IL-6 were significantly decreased to compare with the control group. a-d Means with the different letters on the bars are significantly different, $P < 0.05$. Data shown are represented mean \pm SEM ($n = 7$).

4. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 혈중 사이토카인 함량에 미치는 영향

궤양성 대장염 환자에서 조직의 손상을 유도하며 각종 염증질환을 일으키는 전 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6) 생성량이 증가한다고 알려져 있다¹⁶⁾. DSS로 유도한 대장염 동물모델의 혈청에서 전 염증성 사이토카인의 생성량에 대한 HPL-01의 궤양성 대장염 억제효과를 확인하기 위해 혈중 TNF- α 및 IL-6의 함량을 측정하였다. DSS로 유도한 대장염 동물모델인 대조군(Control)에서 TNF- α 는 18.0 ± 0.7 pg/ml로 나타나 정상군(Normal)의 5.0 ± 1.0 pg/ml과 비교하여 유의하게 증가하였으나, 양성 대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 10.4 ± 1.3 pg/ml로 유의하게 낮았다. 반면 HPL-01을 투여한 실험군에서는 저농도 투여군(HPL 50)이 14.3 ± 0.6 pg/ml, HPL-01 중농도 투여군(HPL 100)이 13.5 ± 1.3 pg/ml, 고농도 투여군(HPL 200)이 9.5 ± 1.0 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 모두 유의하게 낮은 것으로 확인되었고 이중 고농도 투여군의 경우 궤양성 대장염을 유도한 실험군 중 혈중 TNF- α 의 함량이 가장 낮은 것으로 조사되었다(Fig. 5A).

혈중 IL-6의 함량은 정상군(Normal)이 103.7 ± 12.6 pg/ml, 대조군(Control)이 282.0 ± 18.6 pg/ml로 나타나 유의한 차이를 보였으나 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 168.7 ± 5.3 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 유의하게($P < 0.05$) 낮았다. HPL-01을 투여한 실험군의 경우 저농도 투여군(HPL 50)은 227.5 ± 16.8 pg/ml, 중농도 투여군(HPL 100)은 226.9 ± 11.0 pg/ml, 고농도 투여군(HPL 200)은 214.6 ± 16.4 pg/ml로 나타나 대조군과 비교하여 모두 유의하게($P < 0.05$) 낮은 것으로 조사되었다(Fig. 5B).

5. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 혈중 면역세포 함량에 미치는 영향

DSS로 인한 궤양성 대장염 치료에 대한 HPL-01의 효과를 확인하기 위해 궤양성 대장염 유도 7일째에 채혈하여 혈중 백혈구(white blood cell), 과립구(granulocytes) 림프구(lymphocyte), 및 중간구(mid cells)의 함량을 측정하였다(Fig. 6).

혈액 내 면역세포인 백혈구 생성량을 측정한 결과, 궤양성 대장염을 유도한 대조군(Control)은 $10.1 \pm 0.6 \times 10^9$ cells/L로 정상군 $5.8 \pm 0.8 \times 10^9$ cells/L보다 유의하게($P < 0.05$) 높았으며, 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 $8.4 \pm 0.6 \times 10^9$ cells/L로 대조군에 비해 유의하게 낮았다. 반면 HPL-01 저농도 투여군(HPL 50)은 $10.0 \pm 0.4 \times 10^9$ cells/L로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 HPL-01 중농도 투여군(HPL 100)과 고농도 투여군(HPL 200)은 각각 $8.7 \pm 0.7 \times 10^9$ cells/L, $9.8 \pm 0.3 \times 10^9$ cells/L로 나타나 대조군에 비해 혈중 백혈구 수치가 낮은 경향을 보였다(Fig. 6A).

모든 염증반응의 초기대응을 수행하는 과립구(granulocyte)의 혈중 함량은 대조군(Control)이 $2.3 \pm 0.21 \times 10^9$ cells/L로 정상군(Normal)의 $1.2 \pm 0.19 \times 10^9$ cells/L보다 유의하게 높았으며, 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 $1.5 \pm 0.13 \times 10^9$ cells/L로 유의하게 낮아 정상군과 유사한 수준을 보였다. 이에 반해 HPL-01을 농도별로 투여한 실험군의 경우 HPL-01 저농도 투여군(HPL 50)은 $1.9 \pm 0.16 \times 10^9$ cells/L로 대조군에 비해 낮은 경향을 보였으며 HPL-01 중농도 투여군(HPL 100)의 $1.8 \pm 0.14 \times 10^9$ cells/L 및 HPL-01 고농도 투여군(HPL 200)의 $1.9 \pm 0.07 \times 10^9$ cells/L은 대조군에 비해 유의하게($P < 0.05$) 낮은 것으로 조사되었다(Fig. 6B).

그러나 염증유발 물질을 제거하고 체액면역을 담당하는 림프구(lymphocyte)는 정상군(Normal)과 대조군(Control)간에는 유의한 차이를 보였으나 대조군과 실험군간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 6C).

식균작용 및 염증반응에 의해 증가되는 단핵구(monocyte), 호산구(eosinophil), 호염기구(basophil)를 포함하는 중간구(mid cells)를 측정한 결과, 대조군(Control)이 $0.28 \pm 0.021 \times 10^9$ cells/L로 정상군(Normal)의 $0.16 \pm 0.024 \times 10^9$ cells/L보다 유의하게($P < 0.05$) 증가하였다. 반면 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)은 $0.17 \pm 0.021 \times 10^9$ cells/L로 대조군에 비해 유의하게($P < 0.05$) 감소하여 정상군과 유사한 수준을 보였다. 반면 HPL-01 저농도 투여군(HPL 50)은 $0.23 \pm 0.013 \times 10^9$ cells/L로 대조군보다 낮은 경향을, HPL-01 중농도 투여군(HPL 100)은 0.20 ± 0.015

$\times 10^9$ cells/L로 대조군과는 유의하게($P < 0.05$) 낮은 것으로 조사되었는데 HPL-01 고농도 투여군(HPL 200)의 경우 $0.22 \pm 0.016 \times 10^9$ cells/L로 나타나 대조군보다 낮은 경향을 보였다(Fig. 6D).

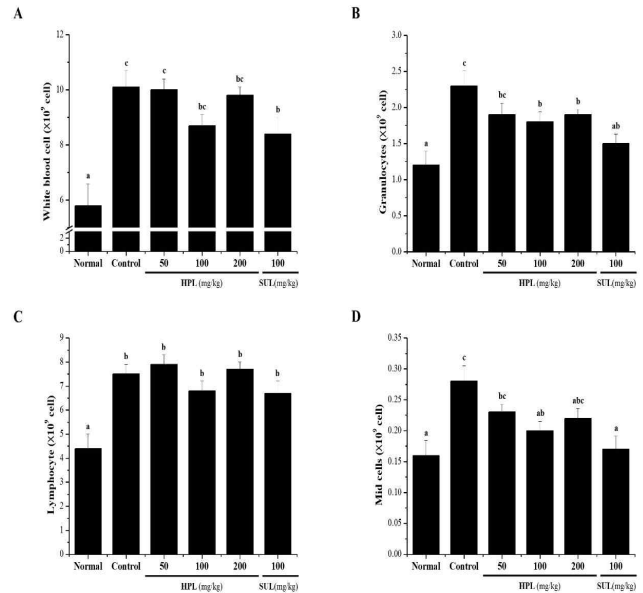


Fig. 6. Changes on the complete blood count after HPL-01 treatments in DSS induced colitis in rats. (A) WBC, (B) Granulocytes, (C) Lymphocyte and (D) Mid cells. Compared with the control group. a-c Means with the different letters on the bars are significantly different, $P < 0.05$. Data shown are represented mean \pm SEM ($n = 7$).

6. DSS로 유도한 대장염 실험동물에서 HPL-01이 장 조직에 미치는 영향

DSS로 인한 궤양성 대장염 동물모델에서 HPL-01이 대장 회복에 미치는 영향을 확인하기 위해 각 실험군별 대장조직을 H&E 염색을 통해 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 정상군(Normal)과 비교하여 대조군(Control)은 부식성 선상 궤양이 나타나고 점막의 술잔세포(goblet cell)와 선와(crypt)가 손실되어 상피조직(epithelial barrier)이 붕괴되어 있었으며, 점막하조직에 염증세포가 과침윤되고 이로 인한 점막하층 부종이 매우 심각한 것으로 관찰되었다(Fig. 7A, B). 실험군 중 HPL-01 저농도 투여군(HPL 50)의 경우 점막하조직의 부종과 염증세포의 침윤은 대조군과 유사하게 나타나 대조군(Control)과의 큰 차이는 없었으나(Fig. 7C), HPL-01 중농도 투여군(HPL 100)은 대조군(Control)에서 확인되던 선와의 손실과 상피조직의 붕괴가 양호한 수준으로 회복되어 조직의 손상이 완화된 것으로 확인되었다(Fig. 7D). HPL-01 고농도 투여군(HPL 200)의 경우 전반적으로는 점막하조직의 부종이, 국소적으로는 술잔세포의 손실과 점막하조직 부종이 있었으나 대조군에서 확인되던 부식성 선상 궤양과 상피조직의 붕괴는 감소하였고 점막 내 심한 괴사와 침식이 완화되어 비교적 양호한 조직 상태를 보였다(Fig. 7E). 양성대조군인 Sulfasalazine 투여군(SUL 100)의 경우 국소적으로 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 전반적으로 조직 손상이 매우 경미하였으며 HPL 200 실험군과 유사한 수준으로 확인되었다(Fig. 7C).

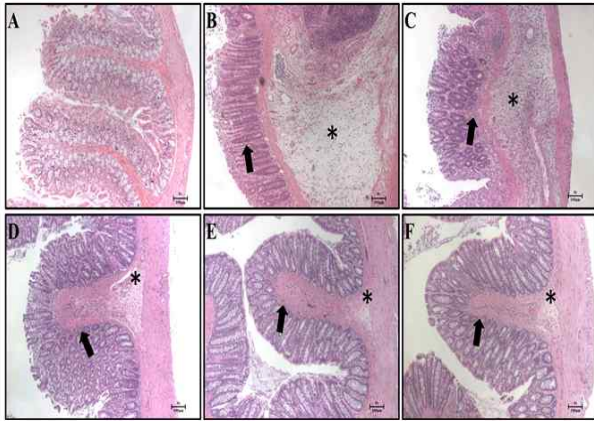


Fig. 7. Effect of HPL-01 on colorectal histology in rat with DSS-induced colitis ($\times 40$). (A) Normal, (B) Control, (C) HPL-01 50 mg/kg, (D) HPL-01 100 mg/kg, (E) HPL-01 200 mg/kg and (F) Positive control (Sulfasalazine 100 mg/kg). Arrow, area of goblet cells depletion and loss of crypt structure; sterisk(*), edema in loose connective tissue. Scale bar=100 μ m.

고찰

궤양성 대장염은 염증, 점막 궤양 및 많은 염증성 사이토카인 생산을 일으키는 만성 염증성 장 질환으로, 이를 치료하기 위하여 다양한 면역 억제제와 항염증제를 사용하고 있으나 많은 부작용이 따른다^{17,18}). 따라서 부작용을 최소화하거나 점막 염증을 효과적으로 약화시키는 치료 요법으로 식물 기반의 전통적인 치료법이 요구되고 있는 실정이다. 약용 식물 기반 전통의학은 한국, 중국, 일본 등에서 오랫동안 만성 염증성 질환에 대해 의학 치료 효과를 제공해왔으나 효과가 미비하거나 지속력이 떨어지는 등의 문제가 남아 있다. 최근 연구에 따르면 대장염 치료제로 알려진 약용 식물의 약리 활성은 항산화 및 항염증 활성을 가지는 것으로 나타났다¹⁹). 따라서, 본 연구에서는 DSS로 유도한 대장염 실험동물 모델에서 항산화 및 항염증활성을 가진다고 알려진 해동피, 모과, 나복자, 창출, 정제부자를 포함한 한약제제(HPL-01)의 대장염 개선 효과를 확인하기 위하여 주간 체중, 결장 길이, CMDI, 혈중 사이토카인, 일반 혈액학적 분석 및 조직학적 분석을 수행하였다.

염증성 장 질환으로 알려진 궤양성 대장염은 대장의 점막 및 점막하층의 염증으로 인해 복통, 설사, 혈변 등이 관찰되며, 심할 경우 체중 감소, 빈혈, 탈수증상 및 대장의 위축이 일어나 길이가 짧아지고 형태적인 상실이 일어난다²⁰). 실험에 사용된 DSS로 유도한 대장염 동물모델은 염증성 대장염의 가장 대표적인 동물 모델이다. DSS 궤양성 대장염 모델은 동물의 만성 장염증을 유발하여 대장 상피세포의 직접적인 손상 및 장내 세균의 산물에 의한 염증을 발생시키고 혈변, 묽은 변, 비장의 비대, 체중의 감소, 대장 길이의 감소와 같은 궤양성 대장염 질환을 가진 환자가 보이는 증세를 상응하게 보여준다²¹). 이러한 사실은 본 실험에서도 동일하게 관찰되어 정상군(Normal)에 비해 DSS를 섭취한 대조군(Control)에서 체중의 감소와 CMDI의 증가가 관찰되었다. 그러나 HPL-01을 14일간 전처리하고 DSS 섭취시 HPL-01을 동시 투여한 실험군은 대조군에 비해 DSS에 의한 체중 감소가 약화되었으며 대장 조직의 길

이 및 CMDI가 개선된 것으로 확인되었다. 이는 HPL-01이 궤양성 대장염의 초기 증상으로 확인되는 체중의 감소와 배변 장애를 개선시키는 데 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각되었다.

궤양성 대장염 질환의 과도한 염증증세는 사이토카인의 과생성과 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다. DSS를 반복적으로 투여하면 궤양성 대장염에서 염증 반응이 증폭되어 TNF- α 와 IL-6이 과생성되고, 이는 대장염의 중증도와 증상을 초래하여 대장의 손상에 관여한다²²). TNF- α 는 주요 염증성 사이토카인이자 궤양성 대장염(UC) 및 대장 크론병(CD)이 있는 소아의 대변에서 농도가 증가하는 것으로 나타났으며²³, IL-6는 궤양성 대장염에서의 대표적으로 과생성되는 전 염증 사이토카인이다²⁴). 본 실험에서는 궤양성 대장염에서 과생성되는 대표적인 전 염증 사이토카인 TNF- α 및 IL-6을 분석하였다. 분석 결과 DSS로 유도한 대장염 실험동물 모델은 정상군에 비해 전 염증 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 혈중 함량이 유의하게 증가된 것으로 나타났으나 HPL-01을 투여한 실험군에서는 전 염증 사이토카인의 생성을 유의하게 감소시켜 궤양성 대장염의 생성 또는 생성된 대장 내 염증 반응을 완화하는 데 효과가 있을 것으로 유추되었다.

더불어 일반 혈액학적 변화에서 DSS에 의한 궤양성 대장염으로 인하여 증가된 혈중 백혈구와 과립구 및 중간구의 함량은 HPL-01의 투여로 인해 감소되는 경향을 보이거나 유의하게 감소하였다. 이는 HPL-01이 과도한 염증 반응으로 인한 혈중 면역세포의 함량에 영향을 미쳐 체내 염증반응을 감소시킴으로써 나타난 결과로 생각된다.

조직학적 검사에서 DSS로 유도한 대장염 실험동물 모델 장 조직은 염증 세포의 침윤 및 상피세포의 손실, 장벽의 비대 등의 특징을 보인다²⁵). DSS로 유도된 대장염 동물모델의 장 조직을 조직학적 분석한 결과, 정상군(Normal)과 달리 DSS를 섭취한 대조군(Control)에서 장 조직은 상피세포층에 있는 선와 및 술잔세포의 손실과 염증 세포의 침윤으로 인한 점막하층 부종이 관찰되었다. 그러나 HPL-01을 투여한 대장염 동물 모델의 장 조직에서는 조직학적 손상이 회복되는 것으로 확인할 수 있었다. 이는 HPL-01이 전 염증성 사이토카인 등의 생성을 조절함으로써 장 조직의 염증 세포의 침윤, 상피세포의 손실, 장벽의 비대를 억제하여 대장의 길이를 회복에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

결론

본 연구는 HPL-01의 항대장염 효과를 조사하기 위해 DSS로 유발한 궤양성 대장염 동물모델에서 체중, 대장 길이, CMDI, 사이토카인, 일반 혈액학적 분석 및 조직학적 검사를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DSS처리 대조군에 HPL-01을 공급하였을 때, 궤양성 대장염에 의한 저하된 체중 증가량과 감소된 대장 조직 길이가 회복되었다. 또한 HPL-01 50 mg/kg, 100 mg/kg와 200 mg/kg 군에서 모두 궤양성 대장염에서 증가된 CMDI와 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6 생성량을 유의적으로 억제하였으며, 일반 혈액학적 분석에서 HPL-01 100 mg/kg와 200 mg/kg 군에서 궤양성 대장염에

의한 증가된 백혈구와 과립구를 감소시키는 것으로 나타났다.

HPL-01 100 mg/kg와 200 mg/kg 군에서 궤양성 대장염에 따른 조직 손상 및 염증 세포의 침윤, 상피세포의 손실 및 장벽의 비대가 회복되는 것을 확인하였다.

이상의 실험 결과를 토대로 HPL-01은 궤양성 대장염에 대한 예방과 치료 효과를 나타내는 의약품으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 중소벤처기업부와 한국산업기술진흥원의 “국가융합 단지 연계 상용화(R&D, P0009978)”사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Sands, Bruce E. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastro*. 2004;126:1518-32.
- on ulcerative colitis in DSS-induced ICR Mice. *J Physiol & Pathol Korean Med* 2016;30:439-46.
- Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*. 1999;11:648-56.
- Jimenez JA, Uwiera TC, Inglis GD, Uwiera RR. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog*. 2015;7:29.
- Klotz U. Colonic targeting of aminosalicylates for the treatment of ulcerative colitis. *Dig Liver Dis*. 2005;37:381-8.
- Hanauer SB, Sparrow M. Therapy of ulcerative colitis. *Curr Opin Gastro*. 2004;20:345-50.
- Hyun TK, Kim JS. The pharmacology and clinical properties of *Kalopanax pictus*. *J Med Plants Res*. 2009;3:613-20.
- Choi J, Huh K, Kim SH, Lee KT, Park HJ, Han YN. Antinociceptive and anti-rheumatoidal effects of *Kalopanax pictus* extract and its saponin components in experimental animals. *J Ethnopharmacol*. 2002;79:199-204.
- Hamauzu Y, Kishida H, Yamazaki N. Gastroprotective property of *Pseudocyonia sinensis* fruit jelly on the ethanol-induced gastric lesions in rats. *J Functional Foods*. 2018;48:275-82.
- Sham TT, Yuen ACY, Ng YF, Chan CO, Mok DKW, Chan SW. A review of the phytochemistry and pharmacological activities of raphani semen. *Evid.-Based Complementary Altern. Med*. 2013;636194.
- Kim CM, Lee YC, Lee JC. The effects of sinapis semen, raphani semen, and mixture decoction on the asthmatic mouse model. *Korea J Herb* 2013;28:15-23.
- Hur IH, Sim SY, Kim KJ. Anti-inflammatory effect of various solvent extract from *Atractylodes japonica* on lipopolysaccharide-induced inflammation in BV2 cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2007;20:36-46.
- Lim DJ, Choi YH, Hwang WD. Induction of apoptotic cell death by ethanolic extract of aconiti tuber in human hepatocarcinoma cells. *Cancer Prevent Res*. 13.2 2008;13:142-52.
- McCafferty DM, Sharkey KA, Wallace JL. Beneficial effects of local or systemic lidocaine in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1994;266:G560-7.
- Akiyama S, Nesumi A, Maeda-Yamamoto M, Uehara M, Murakami A. Effects of anthocyanin-rich tea “Sunrouge” on dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Biofactors*. 2012;38:226-33.
- Marocchi M, Sartini A, Roda E. Cytokine Networks in Ulcerative Colitis. *Ulcers*. 2011:391787-5.
- Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y. Adverse effects of sulfasalazine and treatment of ulcerative colitis with mesalazine. *J Gastroenterol*. 1995;30:115-7.
- Schroeder KW. Is mesalamine safe?. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2007;3:878-9.
- Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. *J Gastroenterol*. 2007;42:16-25.
- Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007;369:1627-40.
- Kim HS, Berstad A. Experimental colitis in animal models. *Scand J gastroenterol*. 1992;27:529-37.
- Ardizzone S, Porro GB. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2005;65:2253-86.
- Adegbola SO, Sahnun K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn’s Disease. *IJMS*. 2018;19:2244.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterol*. 1998;115:182-205.
- Melgar S, Engström K, Jägervall Å, Martinez V. Psychological stress reactivates dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice. *Stress*. 2008;11:348-62.