

궤양성 대장염 유발 생쥐에서 두시추출물의 항염증 효과

양병목¹ · 안상현² · 김기봉^{1,3,*}

¹부산대학교 한의학전문대학원, ²세명대학교 한의과대학 해부학교실, ³부산대학교한방병원 한방소아과

Abstract

The Anti-Inflammatory Effect of Duchi extract on Ulcerative Colitis

Yang Byeng Mok¹ · Ahn Sang Hyun² · Kim Ki Bong^{1,3,*}

¹School of Korean Medicine, Pusan National University

²Dept. of anatomy, college of Korean Medicine, Semyung University

³Dept. of Korean Pediatrics, Korean Medicine Hospital, Pusan National University

Objective

The purpose of this study is to learn the anti-inflammatory effect of Douchi on ulcerative colitis (UC).

Methods

Three-month-old mice were divided into 4 groups as follows: control group (Ctrl), UC induced group (UCEG), Pentasa treated group after inducing UC (OPTG), and Douchi treated group after inducing UC (FGTG). NF-κB, p-IκB, iNOS, COX-2 were observed by immunohistochemistry and Masson trichrome, PAS, and Phloxine-tartrazine staining were used to observe histochemical changes.

Results

Inflammation indicators of the large intestine were significantly lower in FGTG than in the UCEG and OPTG. Also, indicators involved in pulmonary alveolar formation were significantly higher in the FGTG than in the UCEG and OPTG.

Conclusions

The result of this study suggests that Douchi extract was effective in ulcerative colitis and helped in the formation of alveolar. This result suggests that the lungs and colon are correlated.

Key words: Douchi, Ulcerative colitis, Inflammation, Large intestine

Received: December 04, 2020 • Revised: February 15, 2021 • Accepted: February 22, 2021

*Corresponding Author: Kibong Kim

Department of Korean Pediatrics, Pusan National University Korean Medicine Hospital, Geumo-ro 20, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, 50612, Republic of Korea
Tel: +82-55-360-5952, Fax: +82-55-360-5952, E-mail: kkb@pusan.ac.kr

© The Association of Pediatrics of Korean Medicine. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I. Introduction

퀘양성 대장염 (Ulcerative colitis, UC)은 원인이 불분명한 대장의 염증성 질환으로 병변이 불연속적인 크론병 (Crohn's disease)와는 다르게 병변이 직장에서 시작되어 연속적으로 발생한다. 현재까지도 발병의 기전이 특정되지 않았으며, 면역학적 이상, 유전적 요인, 식습관, 스트레스, 약물 등의 기전들이 복합적으로 작용하였을 것이라 추정된다^{1,2}. 과거 UC는 미국, 유럽에서 주로 발병하는 병으로 여겨졌으나, 최근 국내에서도 UC의 발병률이 급증하고 있다. 한국에서 UC의 유병율은 1980년에는 3.8%이던 것이 1995년 8.1%로 증가하였고, 2009년에 10만명 당 41.4명에서 2016년에 이르러서는 66명으로 약 1.6배 증가하였으며 발병률 또한 2009년 10만명 당 4.0명에서 2016년 5.3명으로 1.3배 증가하였다^{3,4}. 염증성 장 질환 (inflammatory bowel disease, IBD)으로 인한 증상에는 혈변, 점액변, 심한 복통 등이 있으며 이러한 증상들이 장기화되면 대장암으로 발전할 수 있다⁵. 염증성 장 질환이 20대와 30대에서 호발하지만 소아에게서도 7~20%의 발병률을 보이고 있으며, 소아에게서 UC이 발병하하면 성장장애를 일으킬 수 있다². 또한, 기존에 치료약으로 사용되는 Pentasa 같은 5-ASA 계통의 약물이 근본적인 원인을 치료하는 것이 아니라 임상적 증상만 완화시켜서 치료 효율이 높지 않으며, 부작용으로 혈성 설사를 악화시키고 폐렴과 간염을 유발하기도 한다⁶⁻¹². 현재 UC의 확실한 치료약은 존재하지 않으며, 한약재를 이용한 치료약물 또한 개발이 전무한 상황이다.

한의학에서 두시 (Douchi, fermented *Glycine max* Merr.; 豆豉)는 폐에 入하며 解表除煩, 宣發鬱熱의 효능이 있다고 알려져 있으며, Th2 분화 조절에 관여하여 아토피성 피부염, 알러지성 비염 등의 면역관련 질환에 효과가 있다^{13,14}. 두시 추출물은 genistein, daidzein이라는 isoflavone 성분이 함유되어 있으며, isoflavone 성분은 Th2 skewed condition 조절에 관여하여 항염증 효과가 있음이 보고된 바 있다¹⁵⁻¹⁹. 또한 최근 하태독법에 이용되는 황련, 감초 복합추출물의 항염증 효과를 통해 폐와 대장간에 상관관계가 있다는 연구결과가 보고되었기에²⁰ 두시 역시 이와 유사한 효과가 있을 것으로 생각되었다.

본 연구는 태령 3주의 생쥐에 Dextran sulfate sodium (DSS)을 통해 UC를 유발한 후, 두시 추출물이 폐포 형

성과 대장에서의 항염증 효과를 관찰함으로써 한의학에서의 폐, 대장의 표리관계가 실제로 상관관계가 있는지 확인하고자 하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. Materials and Methods

1. 실험재료

1) 실험동물

오리엔트 (한국)에서 분양 받은 태령 3주된 Balb/C 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 $15 \pm g$ 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군 (Ctrl), DSS로 UC 유발군 (UCEG), DSS로 UC 유발 후 Pentasa 처리군 (OPTG), DSS로 UC 유발 후 두시추출물 처리군 (FGTG)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 본 연구과정은 부산대학교 IACUC 승인을 받아 시행되었으며 (IACUC number: PNU-2018-1959), 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따라 시행되었다.

2) 두시추출물

두시는 남영제약영농조합 (Muju, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 두시는 청호 (*Artemisia Apiacea* Herba, 青蒿)와 소엽 (*Mori Folium*, 蘇葉)의 전탕액에 흑대두를 담가 흡수시킨 후, 남은 전탕액으로 흑대두를 삶고, 흑대두를 37~38 °C에서 3~5일간 발효시켜 제조되었다. 두시 100 g을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압, 농축한 후 동결 건조하여 추출물 20.2 g (수득률 20.2%)을 얻어 연구에 사용하였다.

2. 실험 방법

1) UC 유발

UC를 유발하기 위해 5일 동안 5% (wt/vol) Dextran sulfate sodium (DSS, with a molecular weight of 40,000, ICN, Aurora, OH)을 voluntary administration 시켰다.

2) 두시추출물과 펜타사 투여

생리식염수에 희석된 펜타사 (Pentasa SR Tab, 한국 페링제약)는 OPTG에 UC 유발 후 5일 동안 40 mg/kg

/day으로 100 μ l 구강투여 하였다. 생리식염수에 희석된 두시추출물은 FGTG군에 UC 유발 후 5일 동안 40 mg/kg/day으로 100 μ l 경구 투여 하였다. Ctrl과 UCEG에는 생리식염수 100 μ l/day으로 구강투여 하였다.

3) 조직표본제작

DSS 처리 5일 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin: NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 대장과 폐를 분리한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

4) 조직화학

대장과 폐조직 변화는 Masson trichrome 염색을 통해 조사되었다. 우선 50-60 °C Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리한 후 관찰하였다.

대장점막 손상 정도는 점액장벽유지에 관여하는 점액분비세포의 분포조사를 통해서 이루어졌으며, periodic acid-schiff reaction (PAS) stain를 통해 확인되었다. 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에 대조염색하였다.

폐에서 혈관생성변화 관찰을 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액에 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 관찰하였다.

모든 조직화학 결과는 광학현미경 (BX52, Olympus, Japan)을 통해서 관찰하였다.

5) 면역조직화학

면역조직화학은 조직을 proteinase K (20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-NF-kB P65 (1:500, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-p-IkB (1:500, Santa

Cruz Biotech, USA), mouse anti-iNOS (1:200, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-COX-2 (1:100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-EGF (1:100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-catalase (1:100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-Hoxa-5 (1:50, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 mouse anti-Hoaxb-5 (1:50, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG1 (1:100, Santa Cruz Biotech)에 실온에서 24시간 동안 반응시켰고, 그런 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

6) 영상처리, 분석

면역조직화학의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means \pm standard error) 했다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 조직을 촬영한 다음 positive pixels /10,000,000 pixels로 영상분석하였다.

7) 통계

통계는 SPSS software (SPSS 25, SPSS Inc., USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ($p < 0.05$)을 검증하고 Least significant difference (LSD)로 사후 검증하였다.

III. Results

1. 폐포와 대장점막의 변화

UCEG의 손상된 대장점막의 표면상피 상층부 (apical surface)에서는 출혈성찰과에 따른 점막손상, 점막고유층 붕괴와 염증세포의 침윤증가와 같은 UC에 따른 조직손상이 광범위하게 관찰되었다. 이에 반해 OPTG과 FGTG에서는 완화된 점막손상을 보였으며, FGTG에서 가장 낮은 손상을 관찰하였다. 또한 PAS 양성염색된 점액분비세포의 분포 변화도 조사되었는데, UCEG의 손상된 표면상피 상층부 (apical surface)에서는 PAS 양성반응을 보이는 창자세포가 관찰되지 않았지만,

OPTG와 FGTG의 일부 표면상피 상층부를 제외하고는 정상적인 창자세포의 배열을 확인하였다 (Fig. 1).

UCEG의 기관지 (bronchus) 주변에서 미성장된 폐포를 확인되었다. 이에 반해 OPTG와 FGTG의 일부 지역을 제외하고는 대조군과 유사한 폐포의 분포가 확인되었다. 또한 FGTG이 OPTG보다 폐포의 분포가 많은 것으로 관찰되었다. 폐포사이내 혈관생성은 PT를 통해서 조사되었는데, UCEG의 혈관생성은 제대로 이루어지지 않았으나, OPTG와 FGTG의 일부 지역을 제외하고 대조군과 유사한 혈관분포를 보였다 (Fig. 1).

2. 대장내 염증 억제

UCEG에서 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 양성반응 (50,328 \pm 1,654/20,000,000 pixel cells)은 증가하였으며, Ctrl (3,632 \pm 228/20,000,000 pixel cells)에 비해 양성반응이 1286% 증가하였다. 이에 반해 OPTG (31,304

\pm 692/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 38%, FGTG (18,147 \pm 534/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 64% 감소하였다. FGTG은 OPTG에 비해 42% 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 2).

UCEG에서 p-I κ B 양성반응 (44,908 \pm 1,172/20,000,000 pixel cells)은 증가했으며, Ctrl (4,203 \pm 191/20,000,000 pixel cells)에 비해 968% 증가하였다. OPTG (25,835 \pm 908/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 42%, FGTG (15,149 \pm 547/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 66% 유의성 있게 감소하였다. FGTG은 OPTG에 비해 41% 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 2).

UCEG에서 iNOS 양성반응 (43,557 \pm 985/20,000,000 pixel cells)은 증가하였으며, Ctrl (4,121 \pm 178/20,000,000 pixel cells)에 비해 957% 증가하였다. OPTG (27,566 \pm

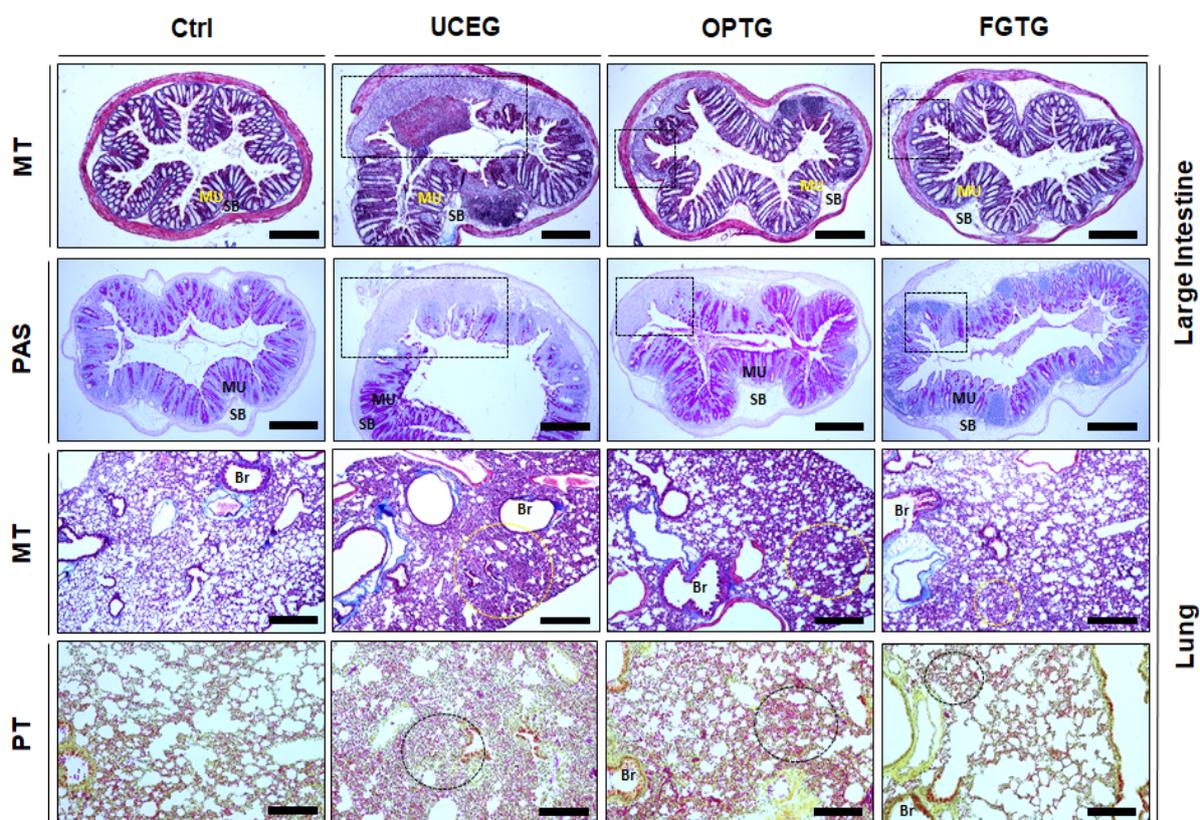


Fig. 1. Histochemistry feature of large intestine and lung mouse with ulcerative colitis by Pentasa and fermented *Glycine max* Merr

(FG). abbreviation. Ctrl, no treated mouse; UCEG, Ulcerative colitis elicited mouse; OPTG, Oral *Pentasa* treated mouse after Ulcerative colitis elicitation; FGTG, FG treated mouse after ulcerative colitis elicitation; MT, Masson trichrome stain; PAS, periodic acid-schiff reaction; PT, phloxine-tartrazine stain; MU, mucosa; SM, submucosa; Br, bronchus; Square, ulcerative colitis induced region; Circle, un-development region; Bar size, 100 μ m.

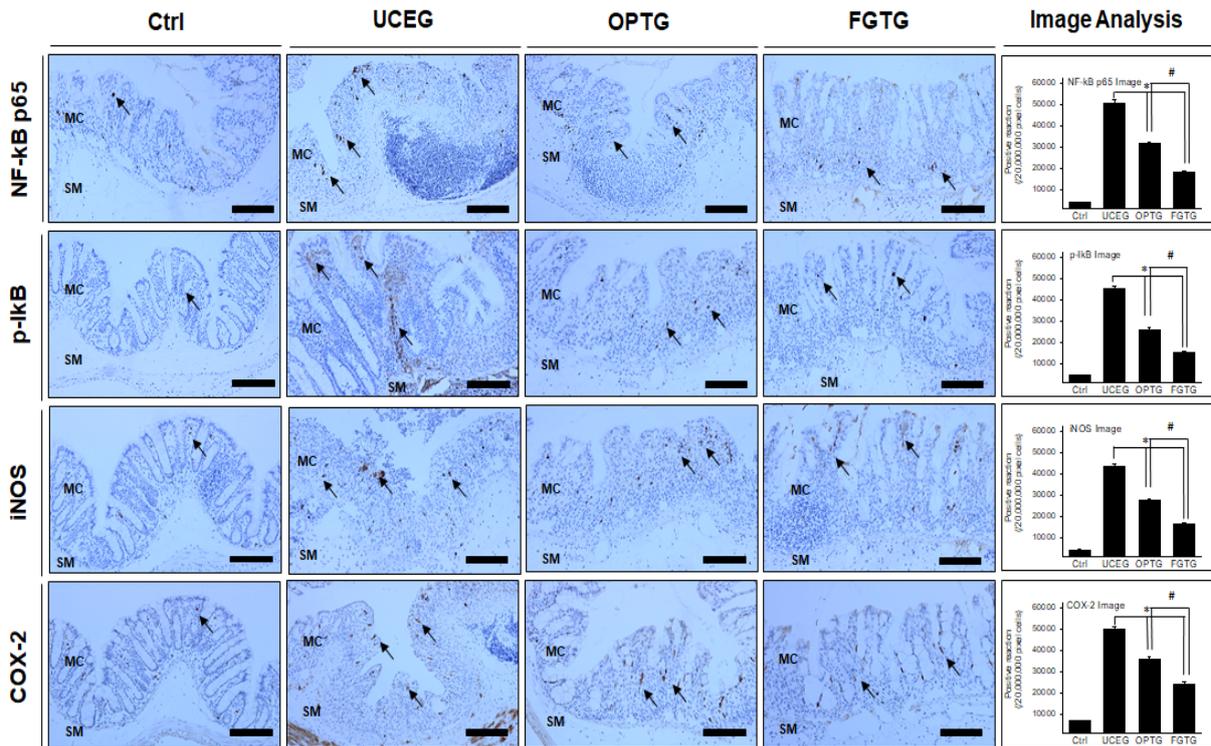


Fig. 2. Anti-inflammation of large intestine in mouse with ulcerative colitis by Pentasa and CG

Abbreviation. MC, Mucosa; SM, submucosa; arrow, positive reaction in immunohistochemistry; Bar size, 50 μm; *, p<0.05 compared with UCEG; #, p<0.05 compared with FGTT. Other abbreviation same as Fig. 1.

687/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성 반응이 37%, FGTT (15,960 ± 819/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 63% 유의성 있게 감소하였다. FGTT은 OPTG에 비해 42% 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 2).

UCEG에서 COX-2 양성반응 (50,039 ± 1,000/20,000,000 pixel cells)은 증가하였으며, Ctrl (6,725 ± 174/20,000,000 pixel cells)에 비해 644% 증가하였다. OPTG (35,891 ± 681/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성 반응이 29%, FGTT (24,076 ± 1,030/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 52% 유의성 있게 감소하였다. FGTT은 OPTG에 비해 33% 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 2).

3. 폐포 형성

UCEG에서 Epithelial Growing Factor (EGF) 양성반응 (12,349 ± 969/20,000,000 pixel cells)은 줄었으며, Ctrl (47,258 ± 925/20,000,000 pixel cells)에 비해 양성 반응이 74% 감소하였다. OPTG (23,047 ± 693/20,000,000

pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 87%, FGTT (34,707 ± 623/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 181% 유의성 있게 증가하였다. FGTT은 OPTG에 비해 51% 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 3).

UCEG에서 catalase 양성반응 (10,155 ± 563/20,000,000 pixel cells)은 줄었으며, Ctrl (43,443 ± 993/20,000,000 pixel cells)에 비해 77% 감소하였다. OPTG (21,776 ± 874/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성 반응이 114%, FGTT (33,240 ± 839/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 227% 유의성 있게 증가하였다. FGTT은 OPTG에 비해 53% 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 3).

UCEG에서 homebox gene a-5(hoxa-5) 양성반응 (41,357 ± 810/20,000,000 pixel cells)도 줄었으며, Ctrl (7,551 ± 296/20,000,000 pixel cells)에 비해 82% 감소하였다. OPTG (17,748 ± 855/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 135%, FGTT (34,590 ± 862/20,000,000 pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성

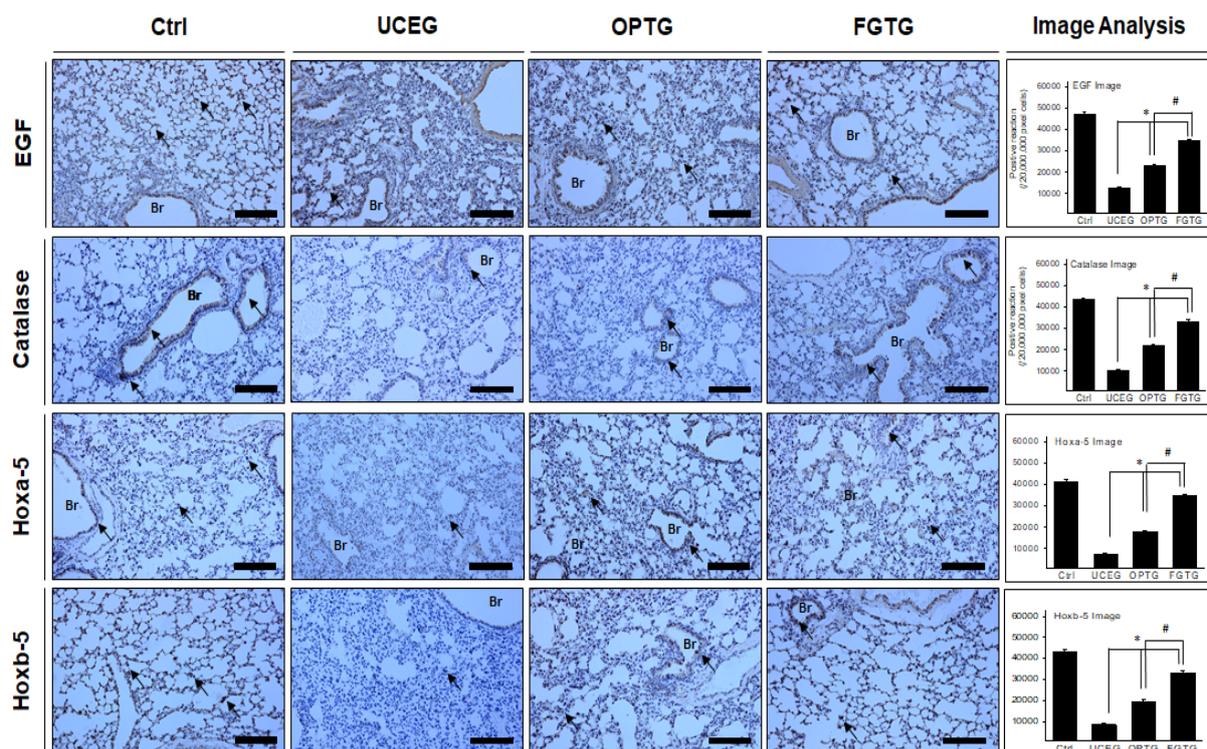


Fig. 3. Generation of alveolar sac and branching in mouse with ulcerative colitis by Pentasa and FG

(Br, bronchiole; arrow, positive reaction in immunohistochemistry; Bar size, 50 μ m). Other abbreviation same as Fig. 2.

반응이 358% 유의성 있게 증가하였다. FG TG은 OPTG에 비해 94% 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 3).

UCEG에서 homeobox gene b-5 (hoxb-5) 양성반응 ($42,793 \pm 1,229/20,000,000$ pixel cells)은 줄었으며, Ctrl ($8,564 \pm 427/20,000,000$ pixel cells)에 비해 80% 감소하였다. OPTG ($19,119 \pm 1,371/20,000,000$ pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 123%, FG TG ($33,210 \pm 894/20,000,000$ pixel cells)에서는 UCEG에 비해 양성반응이 288% 유의성 있게 증가하였다. FG TG은 OPTG에 비해 74% 유의성 있는 증가를 보였다 (Fig. 3).

IV. Discussion

최근 서구화된 식습관과 스트레스 등의 다양한 원인과 진단방법의 발달로 인해 UC이 한국에서도 점차 증가하고 있다²¹⁾. 또한 UC은 혈전을 생성하여 색전증을 일으켜 사망에 일으킬 수 있는데 소아, 청소년기에도 발생한 사례가 최근 보고되고 있다^{22,23)}. 세균과 바이러스 등에 의해 발생하는 장내 염증은 발병원인이

특정되어 있고 일시적인 반면, UC은 6개월 이상 지속되며, 발병원인이 불분명하기 때문에 원인을 찾아 치료하기가 어렵다²⁴⁾. UC의 기존 치료제로는 Steroid, Sulfasalazine, Mesalmine 등이 있지만, Steroid는 UC의 관해 유도에는 효과적이지만 장기간 복용 시 백내장, 골감소증, 대퇴골 머리부의 골괴사, 근병증과 감염증 등의 부작용이 있으며²⁵⁾, Sulfasalazine은 Sulfapyridine 성분으로 인해 오심, 구역, 구토, 두통, 소화불량 및 설사 등의 부작용이 생길 수 있다²⁶⁾. 이러한 이유로 임상 현장에서는 Sulfapyridine 성분이 없는 Mesalmine 제제인 Pentasa의 사용이 권장되고 있으나²⁵⁾, Pentasa도 감염, 혈성 설사, 폐렴 등의 부작용이 있다. 또한 한의학에서 UC에 대한 치료에 상용하는 약물이 없어 한의 임상 측면에서 대체할 수 있는 약물이 필요하다. 이러한 이유로 계지가용골모려탕(桂枝加龍骨牡蠣湯), 의이인(薏苡仁) 추출물 등이 UC에 효능이 있는지 실험한 선행연구들이 있지만²⁷⁻²⁸⁾, 대조군에 비해 효과가 있음을 입증하였을 뿐 실제 임상현장에서 사용중인 Pentasa에 비해 치료 효과가 우수한지는 연구된 바가 없다. 식방풍(植防風) 추출물을 Pentasa와 비교한 연구가 있지만 기존 치료제를 대체할 정도로 효과가 있지는 않았다²⁹⁾.

이런 이유로 본 연구에서는 두시추출물이 단순히 효과가 있음을 넘어 기존에 사용되고 있는 Pentasa를 대체할 수 있는지 가능성을 확인하고자 하였다.

NF- κ B는 정상상태에서는 비활성상태로 있으나 급성 또는 만성 염증이 발생할 시 빠르게 활성화되어 염증에 관련된 다른 유전자들을 조절하여 반응이 일어나도록 하는 전사인자이다³⁰. 대장에서 NF- κ B가 UCEG, OPTG, FGIG 순으로 낮아진 것은 두시추출물이 Pentasa에 비해 NF- κ B의 활성화를 억제하는 효능이 뛰어난 것이라 생각된다.

p-I κ B는 IKK복합체가 NF- κ B dimer에 결합하여 NF- κ B의 활성을 억제하고 있는 I κ B 단백질을 인산화시켜 분리된 것으로, NF- κ B가 활성화될수록 p-I κ B 또한 많이 관찰된다³¹. 본 연구에서는 Ctrl과 OPTG에 비해 FGIG에서 p-I κ B가 감소된 것을 볼 수 있는데, 이는 앞에서 본 NF- κ B가 FGIG에서 가장 낮은 양성반응을 보인 것과 같은 결과를 나타낸다.

I-NOS는 macrophage에서 NO를 생성하는 화학반응에 관여하는 산화환원효소이다. 염증반응에 의해 NO가 과다하게 생성되면 조직 손상, 패혈성 쇼크, 신경손상 등의 합병증을 유발할 수 있다³². 이러한 I-NOS의 발현 기전은 모두 밝혀지지는 않았지만, NOS 프로모터의 활성화는 NF- κ B에 의해 유도된다³³. 또한 COX-2는 Prostaglandin의 대량 생성을 일으키며, 혈관의 이완과 혈관이 새롭게 형성되는 부작용을 가지고 있다³⁴⁻³⁵. 본 연구의 결과를 보면 I-NOS와 COX-2의 발현 억제 또한 Ctrl과 OPTG에 비해 FGIG에서 유의하게 높았는데, 이를 통해 두시가 I-NOS와 COX-2의 발현을 억제하여 항염증 효과가 있음을 알 수 있으며 그 효과가 Pentasa보다 우수함을 확인하였다.

대장 내 염증반응 개선에 있어 OPTG과 FGIG은 Ctrl에 비해 효과가 있었다. 또한 FGIG은 OPTG에 비해서도 더욱 뛰어난 효과가 있다. 이러한 결과는 두시추출물이 대장 내 염증반응에서 Ctrl에 비해 유의한 효과가 있음을 의미하고, OPTG에 비해서도 염증 치료에 있어 유의하게 뛰어나므로 기존에 치료제로 사용되는 Pentasa를 대체할 수 있는 가능성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

EGF는 폐에서 mesenchymal cell이 폐포로 분화되기 위해 필요한 인자로서, 세포분열 주기 중 G1기의 길이를 단축시켜 빠르게 S기로 들어갈 수 있도록 도와주는 인자이다³⁶. 본 연구에서 EGF의 양성반응을 관찰한 결과, UCEG이 Ctrl에 비해 확연히 낮았으며, UCEG에

Pentasa와 두시추출물을 각각 처리한 결과 FGIG에서 양성반응이 증가하였다. 이러한 결과는 두시가 mesenchymal cell이 폐포로 분화되는 과정에 관여하였을 가능성이 있음을 의미한다.

catalase는 폐포에 존재하는 내재성 항산화효소로 과산화수소를 물과 산소로 분해하는데, 과산화수소는 인체 내 다양한 조직의 손상을 야기하는 유해물질이다³⁷. catalase에 대한 선행연구를 살펴보면 폐섬유화가 일어난 집단이 정상적인 폐를 가진 집단에 비해 catalase의 활성이 낮음을 보여주는데, 이는 catalase의 활성도가 폐의 손상과 연관이 있음을 보여준다³⁸. 본 연구에서는 catalase 양성반응이 UCEG이 Ctrl보다 낮았으며, OPTG이 FGIG에 비해 양성반응이 증가하였는데, 이를 통해 FGIG이 폐에서 catalase의 생성을 증가시켜 hydrogen peroxide로부터 폐포의 손상을 막았을 것이라 생각할 수 있다.

homeobox gene은 형태형성에 관여하는 유전자로서, homeobox gene의 종류 중 하나인 hoxa-5와 hoxb-5는 paralog (이원체) 관계로써 폐의 mesenchymal cell에서 발현되어 morphogenesis, differentiation에 관여하는 유사한 기능을 가지고 있다^{39,40}. hoxa-5 단백질의 RNA는 EGF 관련 유전자의 발현을 증가시킨다. EGF가 mesenchymal cell이 폐포로 분화될 때 필요한 인자이며, hoxa-5 또한 폐포의 분화에 도움을 준다⁴¹. hoxa-5, hoxb-5는 UCEG이 Ctrl에 비해 양성반응 정도가 낮았으며, OPTG보다 FGIG에서 hoxa-5, hoxb-5의 양성반응이 증가하였다. 이는 두시추출물 투여가 폐포가 새롭게 형성되는 데 도움을 주었음을 의미한다.

이러한 연구결과를 통하여 Pentasa나 두시추출물이 대장에서의 염증반응 외에도 폐에서 폐포의 형성과 손상에도 유의하게 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

앞에서 UC을 유발하였을 때 미성장 폐포가 관찰되었으며, Pentasa와 두시추출물을 처리하였을 때 대장에서는 염증반응이 감소하였고, 폐에서는 미성장폐포가 거의 관찰되지 않았다. 이는 대장과 폐를 표리관계로 연관지어 생각한 한의학 이론이 의학적으로 타당하다는 근거가 될 수 있다. 또한 본 연구결과는 Pentasa를 대체할 수 있는 약물로서 두시추출물이 폐 질환에도 이용될 수 있는 가능성을 제시한다. 특히 소아의 경우 신체 장기가 완전히 발달되지 않아 mesenchymal cell이 많이 존재하고 있는데⁴², 두시추출물 복용을 통해 소아의 폐가 더 건강하게 발달할 수 있을 것이라 생각된다.

이상으로 본 연구결과를 통해 두시추출물이 기존에

사용하던 UC 치료제인 Pentasa에 비해 항염증 효과가 더 우수함을 확인하였으며, 이를 통해 UC에서 한의학적인 치료제로서의 가능성을 볼 수 있었다. 다만, 연구를 진행하면서 폐와 대장이 관련 가능성이 있음을 확인하였으나 구체적인 기전에 대한 부분은 밝히지 못하였다. 향후 이러한 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이라 생각한다.

V. Conclusion

본 연구는 두시추출물의 대장에서 항염증 효과, 폐포 형성에 대한 효과를 확인하고자 하였다. DSS로 UC이 유발된 태령 3주의 생쥐에게 Pentasa와 두시추출물을 투여하고 면역조직학적, 조직화학적 변화를 관찰, 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. UC이 유발된 군에서 미성장한 폐포가 관찰되었다.
2. 대장에서 NF-κB 양성반응, p-IκB 양성반응, iNOS 양성반응, COX-2 양성반응은 FGTG군에서 유의성 있게 감소하였다.
3. 폐에서 EGF 양성반응, catalase 양성반응, hoxa-5 양성반응, hoxb-5 양성반응은 FGTG군에서 유의성 있게 증가하였다.

VI. Acknowledgement

본 연구는 2020년도 부산대학교병원 임상연구비 지원으로 이루어졌음.

VII. References

1. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2007;448(7152):427-34.
2. Lee JH. Inflammatory bowel disease in pediatric age. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;14(1):34-41
3. Song I. Inflammatory bowel disease in Korean. *Korean Journal of Medicine*. 1999 ;57(4):661-75.

4. Kwak MS, Cha JM, Lee HH, Choi YS, Seo SI, Ko KJ, Park DI, KIM SH, KIM TJ. Emerging trends of inflammatory bowel disease in south korea: a nationwide population-based study. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019; 34(6):1018-26.
5. Jess T, Loftus EV, Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Schleck CD, Tremaine WJ, Melton LJ, Munkholm P, Sandborn WJ. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1039-46.
6. Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Netw*. 2017;17(1):25-40.
7. Guo BJ, Bian ZX, Qiu HC, Wang YT, Wang Y. Biological and clinical implications of herbal medicine and natural products for the treatment of inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1401(1):37-48.
8. SHI Y, Takanashi K, Waga E, Fujita T, Katsuki S, Nomura M. Exacerbation of bloody diarrhea as a side effect of mesalamine treatment of active ulcerative colitis. *Case Rep Gastroenterol*. 2011;5(1):159-65.
9. Park JE, Hwangbo Y, Chang R, Chang TW, Jang JY, Kim BH, Dong SH, Kim HJ. Mesalazine-induced eosinophilic pneumonia in a patient with Crohn's disease. *Korean J Gastroenterol*. 2009;53(2):116-20.
10. Foster RA, Zander DS, Mergo PJ, Valentine JF. Mesalamine related lung disease: clinical, radiographic, and pathologic manifestations. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9(5):308-15.
11. Abraham A, Karakurum A. Acute respiratory failure secondary to mesalamine-induced interstitial pneumonitis. *BMJ Case Rep*. 2013;2013:bcr2013009834.
12. Shah N, Desai A, Potashinsky A, Swales C. Mesalamine: good for IBD but bad for the liver? A case of DILI caused by mesalamine. *American J gastroenterol*. 2018; 113;1267-8.
13. Ahn SH, Kim KB. Effects of douchi Hataedock treatment on induction of Allergic rhinitis in obese induced NC/Nga mice. *J Korean orient pediatr*. 2018;32(2):1-10.
14. Ahn SH, Kim KB. Anti-inflammatory effects of Hataedock with douchi in atopic dermatitis-like skin lesions in house dust mite-induced NC/Nga mice, *J*

- Korean orient pediatr. 2016;30(4):77-86.
15. Jung AR, Ahn SH, Park IS, Park SY, Jeong SI, Cheon JH, Kim K. Douchi (fermented *Glycine max* Merr.) alleviates atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by regulation of PKC and IL-4. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):416.
 16. Zhang JH, Tatsumi E, Ding CH, Li LT. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in Douchi, a Chinese traditional fermented soybean product. *Food Chem*. 2006;98(3):551-7.
 17. Lin J, Xu Y, Zhao T, Sun L, Yang M, Liu T, Sun H, Zhang L. Genistein suppresses smooth muscle cell-derived foam cell formation through tyrosine kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):1297-304.
 18. Bao ZS, Hong L, Guan Y, Dong XW, Zheng HS, Tan GL, Xie QM. Inhibition of airway inflammation, hyperresponsiveness and remodeling by soy isoflavone in a murine model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(8):899-906.
 19. Ahn SH, Kim KB. A Comparative Study of Douchi Hataedock versus Omega-3 on the Effect of Anti-inflammation in the Colonic Muscle through Th2 Skewed Condition Control. *J Korean orient pediatr*. 2017; 31(3):37-45.
 20. Ahn SH, Kim KB. Study of The Correlation of Lung-Large intestine-Skin by Ulcerative Colitis-Induced 3 Weeks Old Mice, *J Korean orient pediatr*. 2019;33(3): 103-11.
 21. Yang SK. Current Status and Clinical Characteristics of Inflammatory Bowel Disease in Korea. *Korean J Gastroenterol*. 2002;40:1-14.
 22. Talbot RW, Heppell J, Dozois RR, Beart RW. Vascular complications of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1986;61(2):140-5.
 23. Kim JS, Kim KM. A Case of Hepatic Vein Thrombosis Associated with Ulcerative Colitis. *Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;12(2):235-9.
 24. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: new insights into mechanisms of inflammation and increasingly customized approaches to diagnosis and therapy. *Curr Opin Gastroenterol*. 2004;20(4):309-10.
 25. Lee KJ. Pharmacologic treatment for inflammatory bowel disease. *J Korean Med Assoc*. 2015;58(1):57-63
 26. Kornbluth A, Sachar DB. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(3):501-23.
 27. Kang A, Lim SW. Therapeutic Effects of Gaejigayong-golmoryo-tang on Dextran Sodium Sulfate-induced Ulcerative Colitis in Mice. *J. Int. Korean Med*. 2017; 38(6):1021-34.
 28. Heo G, Jang MW, Lim SW. The effects of coicis semen extract (CSE) on dextran sulfate sodium - induced colitis in mice. *Korean J. Orient. Int. Med*. 2012;33(4):520-32.
 29. Jung HK, Jung WS, Ahn BK, Kang BM, Yeo JH, Cha SW, Park CG, Cho JH, Cho HW. *Paxakannum japonicum* thunberg leaf alleviates the symptoms of dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis in mice. *Korean J Plant Res*. 2014;27(5):421-8.
 30. Baeuerle PA. IκB-NF-κB structure: at the interface of inflammation control. *Cell*. 1998;95(6):729-31.
 31. Liu T, Lingyun Z, Joo DH, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017; 2:17023.
 32. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.
 33. Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Bada S, Hess A, Michel O, Yagi T. Nuclear-factor kappa B (NF-κB)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria Vascularis in cisplatin-treated mice, *Anticancer Res*. 2002;22(6):4081-5.
 34. Park YS. COX-2 inhibitors in inflammatory bowel disease: friends or foes?. *Korean J Gastroenterol*. 2007; 50(6):350-5.
 35. Hwang JY, Lee GH, Yoo JH, Lee SY, Yang HS. Combined expression of COX-2, MMP-9, p53 and VEGF in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Korean J Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 2008; 51(11):1036-42.
 36. Edward B, Wharton W, Judson J, Van W, Pldeger WJ. Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res*. 1982;141(1):107-15.
 37. Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide

- poisoning. *Toxicological Reviews*. 2004;23(1):51-7.
38. Nao O, Tomoko B, Katsura N, Chinatsu M, Wang DH, Tomoko T, Keiki O, Masaharu N. The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 2010;11:183-95.
39. Isabel M, Aubin J, Leblanc M, Melanie LH, Marie FJ, Guy MT, Lucie J. Impact of the Loss of Hoxa5 Function on Lung Alveogenesis. *American J Pathology*. 2006; 169(4):1312-27.
40. Olivier B, Severine M, Felix A, Josee A, Polyxeni P, Deneen MW, Jeremy SD, Lucie J. Partial functional redundancy between Hoxa5 and Hoxb5 paralog genes during lung morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(12):817-30.
41. Saki S, Yuki K, Shoichiro T, Kazuhito R, Kensei N. A novel long non-coding rna from the hoxa6-hoxa5 locus facilitates colon cancer cell growth. *BMC Cancer*, 2019;19(1):1-14.
42. Vamsee DM, I9n MC, Daniel M, Lynn VC, Karoly M, Joseph MF, Brian IL, Eva M. Mesenchymal stromal cells from infants with simple polydactyly modulate immune responses more efficiently than adult mesenchymal stromal cells. *Cytptherapy*. 2019;21(2):148-61.