

ORIGINAL ARTICLE

# Dextran Sulfate Sodium 장염 동물 모델에서 Benzoxazole 유도체인 B-98의 장염 예방 효과 및 T세포 분획 변화

송은미, 정성애, 이종수, 김성은, 심기남, 정혜경, 유 권, 박혜영<sup>1</sup>

이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실 의학연구소, 이화여자대학교 약학대학<sup>1</sup>

## Benzoxazole Derivative B-98 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-induced Acute Murine Colitis and the Change of T Cell Profiles in Acute Murine Colitis Model

Eun Mi Song, Sung Ae Jung, Jong-Soo Lee, Seung Eun Kim, Ki-Nam Shim, Hye-Kyung Jung, Kwon Yoo and Hae-Young Park<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, Ewha Womans University School of Medicine, College of Pharmacy<sup>1</sup>, Ewha Womans University, Seoul, Korea

**Background/Aims:** The unique role of enzyme 5-lipoxygenase (5-LO) in the production of leukotrienes makes it a therapeutic target for inflammatory bowel disease (IBD). The aim of this study was to evaluate the effects of B-98, a newly synthesized benzoxazole derivatives and a novel 5-LO inhibitor, in a mouse model of IBD induced by dextran sulfate sodium (DSS).

**Methods:** C57BL/6 mice were randomly assigned to four groups: normal control, DSS colitis (DSS+saline), low dose B-98 (DSS + B-98 20 mg/kg) and high dose B-98 (DSS + B-98 100 mg/kg). B-98 was administered with 3% DSS intraperitoneally. The severity of the colitis was assessed via the disease activity index (DAI), colon length, and histopathologic grading. The production of inflammatory cytokines interleukin (IL)-6 was determined by RT-PCR. Th cells were examined for the proportion of Th1 cell, Th2 cell, Th9 cell, Th17 cell and Treg cell using intracellular cytometry.

**Results:** The B-98 group showed lower DAI, less shortening of the colon length and lower histopathologic grading compared with the DSS colitis group ( $p < 0.01$ ). The expression of IL-6 in colonic tissue was significantly lower in the B-98 groups than the DSS colitis group ( $p < 0.05$ ). The cellular profiles revealed that the Th1, Th9 and Th17 cells were increased in the DSS colitis group compared to the B-98 group ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Our results suggest that acute intestinal inflammation is reduced in the group treated with B-98 by Th1, Th9 and Th17 involved cellular immunity. (Korean J Gastroenterol 2013;62:33-41)

**Key Words:** 5-Lipoxygenase inhibitors; Inflammatory bowel diseases; Colitis

## 서 론

크론병이나 궤양성 대장염으로 대표되는 염증성 장질환은 국내 발병률과 유병률이 서양보다 낮지만 최근 점차 늘어나는 추세이다. 최근에 송파 강동지역에서 시행한 연구에서 궤양성 대장염의 발병률은 인구 10만 명당 3.08명, 크론병은 인구 10만 명당 1.34명으로 보고되어 국내 염증성 장질환의 발병률이

증가하고 있다.<sup>1</sup>

염증성 장질환의 병인 및 발병 기전은 아직까지 명확하지 않으나, 현재까지 알려진 바로는 유전적 취약성이 있는 사람이 환경적인 원인 또는 유발인자에 노출되어 장 점막에 염증 및 면역반응이 초래되고, 부적절한 면역반응이 지속되고 증폭되어 만성적인 조직손상을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>2</sup> CD4 양성인 조력T세포(helper T cell) 중에서 Th1 세포(T helper

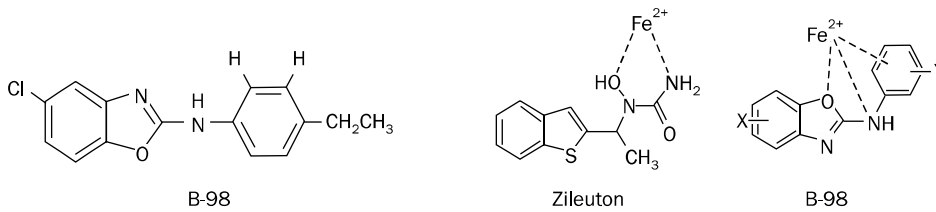
Received January 10, 2013. Revised May 21, 2013. Accepted May 21, 2013.

© 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.

교신저자: 정성애, 158-710, 서울시 양천구 안양천로 1071, 이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실 의학연구소

Correspondence to: Sung Ae Jung, Department of Internal Medicine, Ewha Womans University School of Medicine, 1071 Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 158-710, Korea. Tel: +82-2-2650-5053, Fax: +82-2-2655-2076, E-mail: jassa@ewha.ac.kr

Financial support: None. Conflict of interest: None.



**Fig. 1.** Chemical structure of B-98 and proposed affinity for the iron of zileuton and B-98. B-98 showed enhanced affinity of 5-lipoxygenase iron than zileuton.

type 1)와 Th2 세포(T helper type 2)의 불균형이 염증성 장 질환과 연관되어 있음이 많은 연구에서 보고되어 왔다. 크론 병은 Th1 세포와 관련된 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-2와 관련이 있고, 궤양성 대장염은 Th2 세포와 관련된 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-4, IL-5가 관련이 있는 것으로 알려져 있으며,<sup>3</sup> IL-6, IL-21, IL-23는 크론병, 궤양성 대장염 모두와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>4,5</sup> 최근 조절T세포 중에서 Th9 세포, Th17 세포가 발견되었으며, Th17이 염증성 장 질환에 미치는 영향에 관심이 모아지고 있다.<sup>6</sup> 조절T세포(regulatory T cell)는 주로 CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> T세포로 전사인자 FOXP3를 발현하며 다른 T세포를 조절하거나 억제하는 역할을 하고 면역반응의 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup>

염증성 장 질환의 염증반응에는 많은 염증매개물질들이 관여하는데, 이중에서 leukotriene은 강력한 염증 매개체로, 천식, 관절염, 건선, 염증성 장 질환의 병태생리에 주요 역할을 한다.<sup>8</sup> Leukotriene은 5-lipoxygenase (5-LO)에 의해 arachidonic acid에서 생성되며, 활성화된 leukotriene은 급성 염증반응 및 과민반응을 매개한다. 또한 leukotriene은 염증이거나 면역학적 자극에 의해 활성화된 백혈구에서 분비되며, 내피세포의 점액 분비, 평활근의 수축, 모세혈관의 투과율을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>9</sup> Leukotriene B<sub>4</sub>는 호중구의 화학적 유도에 중요한 역할을 하며, 대장염 동물모델<sup>10</sup> 및 염증성 장 질환 환자의 대장조직에서 증가되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup>

따라서 leukotriene의 생성을 억제하는 5-LO 억제제가 염증성 장 질환의 치료제로 많은 역할을 할 것으로 기대되었으나, 대표적인 5-LO 억제제인 zileuton이 약제의 부작용 및 다른 약물과의 상호작용이 확인되어 사용에 제한이 있었다.<sup>12</sup> 최근 Song 등<sup>13</sup>은 새로운 5-LO 억제제로 benzoxazole 유도체인 B-98 (5-Chloro-N-(4-ethylphenyl)benzo[d] oxazol-2-amine)을 호흡기 천식 동물 모델에 투여했을 때, 기관지 및 혈관 주위에 단핵구, 호산구 등의 염증세포 침윤이 감소하는 조직학적인 소견을 확인하였고, 천식의 염증반응에 중요한 역할을 하는 IL-4, IL-5, IL-13의 합성이 감소하는 것을 관찰하였다. 5-LO는 철(Fe)성분을 함유하고 있으며 여러 리간드에 의해

부착되어 있다. 효소의 작용과 관련이 있는 리간드가 철과 결합력을 가지는 물질(iron-chelating agent)로 대체되면서 효소의 촉매작용이 억제되는데, B-98은 zileuton보다 철과의 결합력이 강력한 것으로 알려져 있다(Fig. 1).

이번 연구는 새로운 5-LO 억제제인 B-98을 장염 마우스 모델에 투여하여 임상 양상 및 조직학적 변화를 확인하고, 관련 사이토카인인 IL-6, TNF- $\alpha$ 와 CD4<sup>+</sup> T세포 분획의 변화를 측정하여 B-98의 치료효과 기전을 알아보고자 하였다.

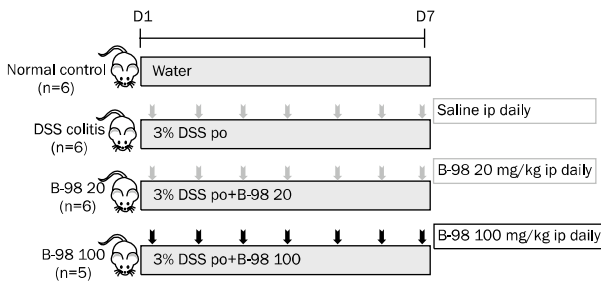
## 대상 및 방법

### 1. 실험동물

실험에 사용된 동물은 7-8주령의 수컷 C57BL/6 마우스로 오리엔트 바이오사(Orient Bio Co. Ltd., Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 이화여자대학교 의과대학연구소의 동물 실험실에서 7일간의 적응 기간 후 실험을 진행하였으며 적응 기간 동안 물과 사료를 제한하지 않았다. 실험동물에 표준화된 환경을 제공하였으며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 유지하였고, 실내 온도(23°C±2°C) 및 습도(50-55%)를 적정 수준으로 유지시켰다. 모든 실험은 이화여자대학교 의학전문대학원의 동물실험 윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호 ESM 10-0146).

### 2. 장염 모델 확립 및 B-98 투여

실험에 사용된 마우스는 정상 대조군, dextran sulfate sodium (DSS) 장염군, B-98 저용량 투여군, B-98 고용량 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다(Fig. 2). 정상 대조군을 제외한 마우스는 3% DSS (MP Biochemical, Irvine, CA, USA) 용액을 7일간 복용시켜 장염을 유발하였으며, 정상 대조군 마우스는 같은 시간 동안 동량의 물을 복용시켰다. B-98은 장염 유발을 하기 3일 전부터 투여하기 시작하여 총 10일 동안에 dimethyl sulfoxide에 용해하여 하루에 한번씩 복강 내로 주사하였으며, 투여한 양에 따라 저용량 투여군(20 mg/kg), 고용량 투여군(100 mg/kg)으로 나누었다. DSS 장염군은 B-98 대신 동량의 생리식염수(25 mL/kg)를 복강 내에 주사하였다. B-98에 대한 MTT assay 결과는, 1  $\mu$ g/mL 농도에서 생존율 78.49%, 30  $\mu$ g/mL 농도에서 32.70%, 100



**Fig. 2.** Schematic diagram describing type, dose, and timing of each treatment of all four groups. B-98 was injected intraperitoneally from day 1 to day 7. DSS, dextran sulfate sodium; po, per oral; ip, intraperitoneal.

μg/mL 농도에서 33.05%였다.

### 3. 육안적 평가 및 조직학적 분석

마우스의 체중 변화, 변의 굳기, 변이나 항문에서 육안적으로 관찰되는 혈변 유무를 7일간 매일 확인하여 disease activity index (DAI)를 측정하였다.<sup>14</sup> 마우스는 장염 유도 후 8일째에 경추 탈골로 희생시켰다. 마우스를 희생시킨 후 맹장에서 항문까지 이르는 장을 적출하여 장 길이를 측정하였고, 장의 근위부와 원위부에서 검체를 얻었다. 대장 조직은 포르말린에 고정시키고 H&E 염색을 시행하였다. 조직학적인 분석은 이전에 보고된 histologic colitis scoring system을 따랐다.<sup>15</sup> 각 검체의 염증의 정도, 염증의 범위, 음파(crypt) 손상 정도, 전체 대장의 손상 범위(%)를 측정하여 각 변수를 합산하였다.

### 4. 염증매개물질의 측정

채취한 검체는 -70°C 초저온 냉동고에 동결시켜 분석 전까지 보관하였다. 채취한 검체에서 Easy-BLUE™ (Intron Biothechnolgy, Seoul, Korea)을 이용하여 RNA를 분리하였고, 분리된 RNA의 농도를 UV-spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

RNA 2 μg을 oligo dT primer 0.5 μg에 넣고, 70°C에서 10분간 반응시킨 후, Molony Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV RT; Promega, Madison, WI, USA) 200 unit, RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega) 25 unit를 첨가하여 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA를 template로 사용하여 각각의 primer 5 pmol, Taq DNA polymerase (Promega) 1 unit, 5× polymerase reaction buffer, dNTP 200 μM를 사용하여 증폭시켰다. 이번 실험에서 사용한 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

PCR 수행 후 증폭산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 Geldoc 2000 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 통해

**Table 1.** Primer Sequences of RT-PCR

Gene		Primer sequences
GAPDH	Forward	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
	Reverse	5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
IL-6	Forward	5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT-3'
	Reverse	5'-CACTAGGTTTGCCGAGTAGATCTC-3'

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL-6, interleukin-6.

mRNA 발현을 확인하고 GAPDH mRNA 발현을 기준으로 IL-6의 상대적인 발현량을 측정하였다.

### 5. 소장 고유층 세포의 분리

유세포 분석을 위해 정상 대조군, DSS 장염군, B-98 투여군(20 mg/kg)으로 나누어 각 5마리씩 실험을 진행하였다. 정상 대조군을 제외한 마우스는 3% DSS가 용해된 물을 B-98을 투여하기 3일 전부터 투여하여 총 10일간 복용시켰으며, 장염을 유발하는 동안에 B-98 투여군은 위에 기술한대로 B-98을 총 7일간 하루에 한 번씩 복강 내로 투여하였다. 질환의 활성도를 측정하여 장염 유도를 확인하였고, B-98을 투여한지 8일째에 마우스를 희생하였다.

소장조직 고유층 세포의 분리는 이전에 보고된 방법을 따라서 시행하였다.<sup>16</sup> 마우스의 소장은 위장 바로 아래부터 맹장 전까지를 분리하여 인산완충식염수에 담긴 용기로 옮기고, B 세포를 먼저 제거하기 위하여 장간막이 붙어있는 반대쪽에 존재하는 파이어반(Peyer's patch)을 곡선가위로 잘라낸 후 장의 내강이 드러나도록 장의 장축을 따라 직선가위로 잘랐다. 소장을 핀셋으로 잡아 차가운 인산완충식염수에 3회 세척하여 소장의 내용물을 제거한 후 1.5-2.0 cm의 길이로 잘랐다. 이 조직을 미리 37°C로 따뜻하게 온도를 맞춘 세포분리용액(10% fetal bovine serum [FBS], 20 mM Hank's balanced salt solution, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM ethylenediamine-tetraacetic acid [EDTA], 10 μg/mL polymyxin B)이 첨가된 인산완충식염수에 넣고 30분간 37°C에서 회전시켜 장상피조직이 분리되도록 하였다. 이후 인산완충식염수로 5회 세척하여 가위로 조직을 잘게 자른 후 37°C에서 400 Mandl U/mL collagenase D (Roche, Mannheim, Germany)와 10 μg/mL DNase I (Roche)가 첨가된 RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)/10% FBS 배지를 사용하여 45-90분간 효소 처리를 하였다. 이후 EDTA를 첨가하여 최종 10 mM이 되게 한 후 얻어진 세포부유액을 40% (밀도 1.058 g/mL)/75% (1.093 g/mL) Percoll (GE Healthcare/Amersham, Buckinghamshire, UK) 용액을 사용하여 세포의 밀도차에 따라 고유

층의 면역세포를 분리한 후, 유세포 분석에 사용하였다.

## 6. 유세포 분석

소장고유층의 세포를 FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)의 Cell Quest software를 사용하여 유세포 분석하였다. 위에 기술한 세포분리용액에 부유한 세포액 중에서 500  $\mu$ L ( $1-2 \times 10^6$  /mL)에 항체를 2  $\mu$ L씩 첨가한 후 4°C, 차광상태로 30분간 정치하였고, 이것을 분석에 사용하였다. 사용한 항체는 phycoerythrin (PE) 결합 항 마우스 CD4 (GK1.5, Rat IgG<sub>2b</sub>,  $\kappa$ ), peridinin chlorophyll protein (PerCP) 결합 항 마우스 CD4 (GK1.5), fluorescein isothiocyanate (FITC) 결합 항 마우스 IFN- $\gamma$  (XMG1.2, Rat IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ ), PE 결합 항마우스 IL-4, PE 결합 항 마우스 IL-9 (RM9A4, Rat IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ ), PE 결합 항 마우스 IL-17A (TC11-18H10.1, Rat IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ ), Alexa Fluor® 488 결합 항 마우스 Foxp3 (150D, Mouse IgG<sub>1</sub>,  $\kappa$ ) (Biolegend, San Diego, CA, USA)였다.

## 7. 통계분석

통계 처리는 SPSS for Window 16.0 version (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였으며, mRNA 발현은 중앙값으로 표시하였고 그 외 검사 결과는 평균값과 표준편차로 표기하였다. 실험군 간의 차이에 대해서는 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U 검정을 시행하여 p값이 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

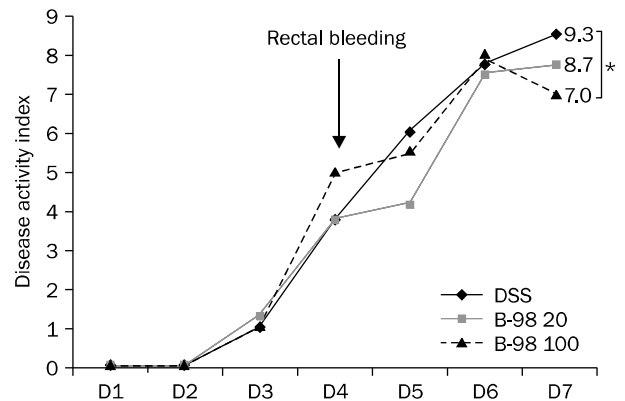
# 결 과

## 1. Disease activity index 및 육안적 분석

DSS를 투여한 마우스는 4일째부터 무른 변 및 육안적인 혈변이 보이기 시작하였으며 7일째에는 모든 마우스에서 설사와 혈변이 관찰되었다. 5일째부터 체중 감소가 관찰되었으며, 6마리 중 2마리는 20% 이상 체중이 감소하였다. B-98 투여군은 DSS 투여군과 비교하여 설사와 혈변이 심하지 않았으며, 특히 B-98 고용량 투여군은 5마리 모두에서 체중 감소가 심하지 않아 10-20% 이내의 체중 감소만이 관찰되었다.

DAI를 비교하였을 때, DSS 장염군과 B-98 투여군 모두에서 투약 기간 동안 지속적으로 DAI가 증가하였으나 투약 7일째에는 B-98 투여군에서 DSS 장염군에 비해 DAI가 낮은 경향을 보였으며, 특히 B-98 고용량 투여군에서 DSS 장염군에 비하여 DAI가 의미있게 낮았다( $7.0 \pm 1.0$  vs.  $9.3 \pm 1.2$ ,  $p < 0.05$ , Fig. 3).

정상 대조군의 평균 대장 길이가 82.5 mm였는데 DSS 장염군은 49.5 mm로 유의하게 짧았다( $p < 0.01$ ). B-98 투여군은 DSS 장염군에 비하여 대장 길이가 더 긴 경향을 보였으나,



**Fig. 3.** Effect of B-98 on the course of disease activity index (DAI). At day 4 after dextran sulfate sodium (DSS) administration, the gross rectal bleeding appeared. Administration of B-98 significantly attenuated the severity of clinical DAI compared with the corresponding DSS colitis group at day 7 after DSS administration (\* $p < 0.05$ ). Data are expressed as means.

통계적으로 유의한 차이는 없었다. 대장을 장축 방향으로 절개하여 육안적으로 관찰하였을 때 DSS 장염군에서 장내 출혈 정도가 심했으며 B-98 투여군에서는 출혈 정도가 상대적으로 경미하였다.

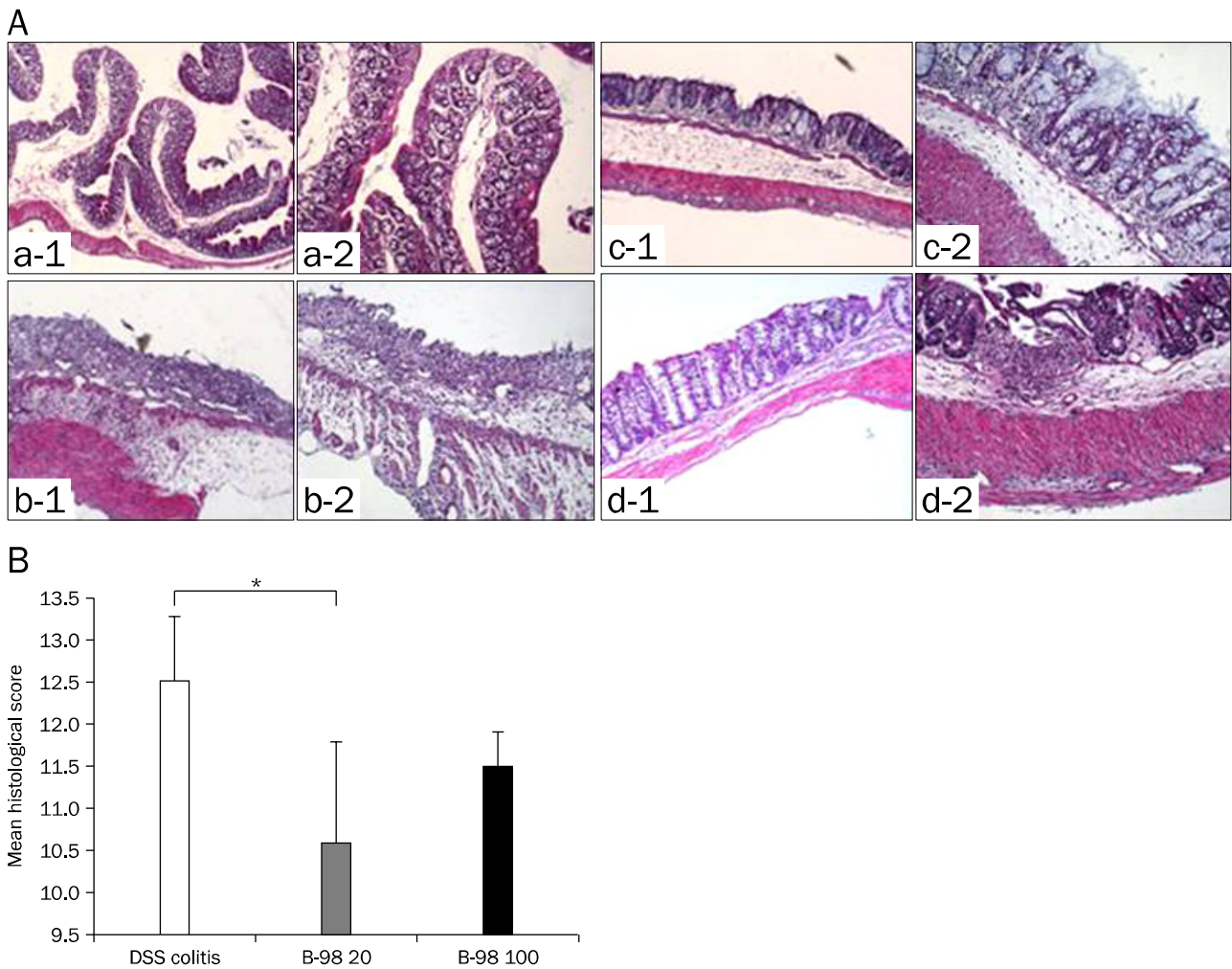
## 2. 조직학적 평가

정상 대조군과 비교하였을 때, DSS 장염군은 장벽 전체에 부종이 심하고, 상피층이 거의 소실되었다. 염증세포들은 점막하층과 근육층 일부까지 침윤되어 있었고, 음와(crypt)의 손상이 심하여 형태가 유지되지 않았다. B-98 저용량 투여군에서는 장벽의 부종이 DSS 장염군에 비하여 경미하고, 음와 형태는 비교적 잘 유지되어 있었으며, 음와 손상이 기저부의 2/3층에 국한되어 있었다. B-98 고용량 투여군도 염증세포의 침윤이 DSS 장염군에 비해 적었으나 점막하층에 국소적으로 염증세포의 침윤이 관찰되었다(Fig. 4A).

조직학적 점수체계(histologic scoring system)를 적용하였을 때 B-98 저용량 투여군이 DSS 장염군에 비하여 유의하게 낮은 점수를 보였다( $10.6 \pm 1.8$  vs.  $12.5 \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ). B-98 고용량 투여군도 DSS 장염군에 비해서 점수가 낮았으나( $11.5 \pm 0.4$  vs.  $12.5 \pm 0.8$ ), B-98 저용량 투여군과 유의한 차이는 없었다(Fig. 4B).

## 3. IL-6의 변화

DSS 장염군에서 정상 대조군에 비하여 IL-6 수치가 유의하게 증가했으며( $1.03$  vs.  $0.07$ ,  $p < 0.05$ ), B-98 저용량 투여군과 고용량 투여군에서 모두 IL-6 수치가 유의하게 감소하였다( $0.31$  vs.  $1.03$ ,  $0.08$  vs.  $1.03$ ,  $p < 0.05$ ). B-98의 용량에 의한 IL-6의 차이는 없었다(Fig. 5).



**Fig. 4.** (A) Histological appearance of the colon. a: Colon section from the normal control group; H&E,  $\times 40$  and  $\times 100$  for a-1 and a-2, respectively. b: Colon section from the dextran sulfate sodium (DSS) colitis group. Extensive erosions with predominantly inflammatory cell infiltrates in mucosa and submucosal layer were evident; H&E,  $\times 40$  and  $\times 100$  for b-1 and b-2, respectively. c: Colon section from the low dose B-98 (20 mg/kg) group. The mucosa was essentially unremarkable. There were fewer inflammatory cell infiltrates, erosions, or crypt distortion compared with b; H&E,  $\times 40$  and  $\times 100$  for c-1 and c-2, respectively. d: Colon section from the high dose B-98 (100 mg/kg) group. There were fewer inflammatory infiltrates, erosions, or crypt distortion compared with b. Occasionally, inflammatory cell infiltrates were also seen in the submucosal layer d-2; H&E,  $\times 40$  and  $\times 100$  for d-1 and d-2, respectively. (B) Histological scores of the DSS colitis and B-98 groups. Histological score levels were significantly lower in the low dose B-98 group in comparison with the DSS colitis group (\* $p < 0.05$ ).

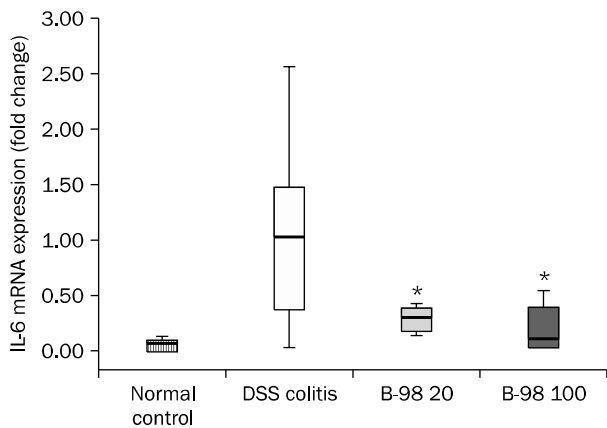
#### 4. CD4+ T세포의 표현형 분석

DSS 장염군에서 IFN- $\gamma$ + Th1 세포, IL-9+ Th9 세포, IL-17+ Th17 세포의 분획이 유의하게 증가하였다. B-98 저용량 투여군에서는 이들 세포분획이 모두 유의하게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 정상 대조군보다 더 낮은 수준을 보였다. 그러나 IL-4+ Th2 세포분획은 DSS 장염군에서 증가하지 않았으며 B-98에 의한 억제도 명확하지 않았다. Foxp3+ Treg 세포는 DSS 장염군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으나, B-98 투여군에서는 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 6).

## 고 찰

이번 연구를 통하여 DSS 장염 모델에 새로운 5-LO 억제제인 B-98을 투여하여 장염의 육안 소견 및 조직학적인 염증 소견이 감소하고, 장염 유도시 증가되었던 IL-6가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 B-98 투여시, DSS 장염모델에서 증가했던 Th1, Th9, Th17 세포분획이 감소하여 B-98이 Th1, Th9, Th17 세포의 면역반응에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

염증성 장질환의 염증 반응은 면역세포 및 여러 가지 염증 매개물질들이 복합적으로 작용하여 발생하는데, leukotriene



**Fig. 5.** Expression of inflammatory cytokine. Interleukin-6 (IL-6) concentration of the colonic tissue in the dextran sulfate sodium (DSS) colitis group was higher than that of the normal control group. And IL-6 level in the B-98 groups was significantly lower than that of the DSS colitis group (\* $p < 0.05$ ). Results are presented as fold-increase relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Bold line in the box means median values.

을 포함한 eicosanoid 등이 병태생리에 중요한 역할을 담당한다. Leukotriene은 5-LO의 작용에 의해 arachidonic acid에서 만들어지는데 이 중 leukotriene B<sub>4</sub>는 강력한 면역조절의 매개체로서 호중구에 대해 강력한 화학적 유도를 한다. 이 leukotriene B<sub>4</sub>는 염증성 장질환 환자의 대장 점막에 증가되어 있으며 염증성 장질환의 치료약제인 5-aminosalicylates나 glucocorticoids는 대장 점막에서 leukotriene B<sub>4</sub>의 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다.<sup>17,18</sup>

Cuzzocrea 등<sup>19</sup>은 5-LO가 내피세포 표면에 P-selectin, E-selectin과 intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecules (VCAM-1)의 발현을 증가시키고 내피세포와 호중구에 상호작용을 일으켜 호중구의 침윤을 활성화시키는 것을 밝혀냈으며, 5-LO 유전자결핍 동물모델에서 장손상이 감소하고 5-LO 억제제를 사용한 경우에 호중구의 침윤이 감소하였음을 보고하였다.

이러한 배경에 따라 염증성 장질환의 염증과정을 조절하기 위하여 leukotriene의 생성을 억제하기 위해 5-LO 억제제가 개발되어 왔다. 이 중 천식 치료제로 개발되었던 zileuton은 5-LO 억제제로 유일하게 상업적으로 사용이 가능한 약제였고, 최근 zileuton을 사용한 염증성 장질환과 관련된 연구 결과들이 발표되었다. Zileuton이 trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)에 의해 유도된 장염 모델에서 5-aminosalicylic acid나 다른 위약에 비해 효과적이었고,<sup>20</sup> DSS 장염모델에서도 백혈구의 화학적 유도를 억제하여 대장의 염증을 감소시켰다는 보고가 있었다.<sup>21</sup> 그러나, Zarif 등<sup>22</sup>은 zileuton이 동물모델에서 대장조직의 염증은 감소하였으나, 백혈구 침윤이나

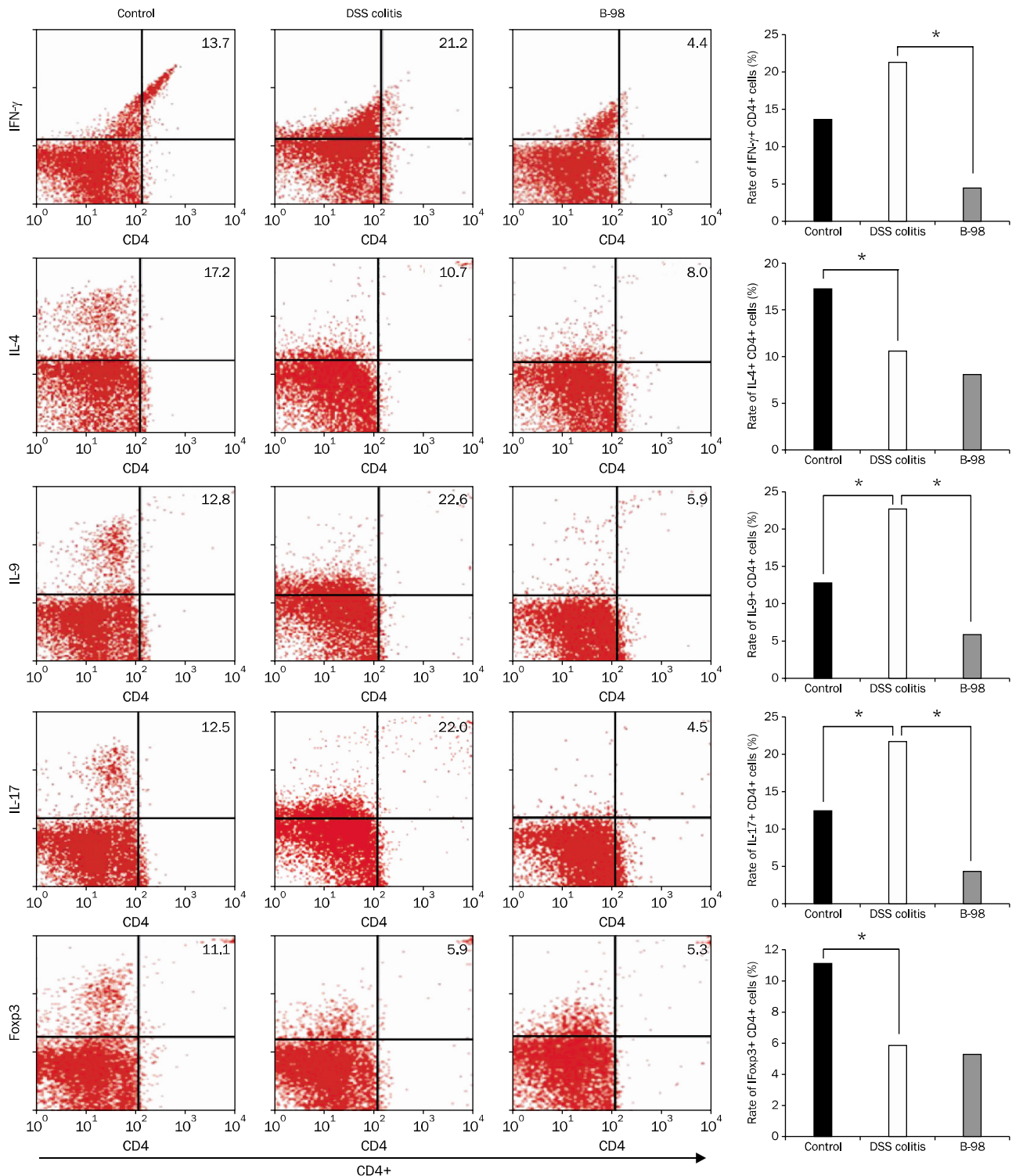
myeloperoxidase의 활성은 막지 못했다고 보고하였고, 궤양성 대장염 환자를 대상으로 zileuton과 mesalazine을 비교한 유럽의 다기관 임상시험 결과도 zileuton이 궤양성 대장염의 관해 유지에 효과가 없었다고 보고하였다.<sup>23</sup> 이 외에 leukotriene의 합성을 억제하는 다른 약제들 중에서 leukotriene-1 receptor antagonist인 montelukast<sup>24</sup>와 또 다른 5-LO 억제제인 BWA4C<sup>25</sup> 등이 실험되었으나 모두 임상적인 효능을 증명하는 데는 실패하였다.

Benzoxazole 유도체로서 B-98은 기존에 zileuton에 비하여 철분과 더 강하게 결합하여 5-LO에 대한 강한 억제 작용을 할 것으로 기대되었다. 실제로 동물 천식 모델을 대상으로 실험을 진행하였을 때 폐 조직에서 염증 정도가 대조군에 비하여 감소하였을 뿐만 아니라 zileuton을 사용한 군에 비해서도 더 감소한 소견을 보였다.<sup>13</sup> 마찬가지로 이번 염증성 장질환 모델에서도 DSS 장염군에 비하여 B-98을 투여한 군에서 육안적인 혈변 등으로 평가된 DAI가 낮았으며 조직학적 염증 정도가 감소하였다. 또한, 대장조직의 염증의 정도를 나타내는 IL-6를 측정하였을 때 DSS 장염군에서 IL-6가 증가하고, B-98을 투여하였을 때 IL-6 수치가 감소함을 확인하였다. 비록 제한된 항목에서 확인되었지만 염증성 장질환 동물모델에서의 B-98에 의한 염증 억제 효과가 확인되어 새로운 5-LO 억제제로서의 가능성을 제시하였다.

염증성 장질환에서는 T세포의 불균형 및 기능 이상과 관련된 염증매개물질이 염증반응을 지속적으로 활성화시켜 만성적인 조직손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. Olsen 등<sup>6</sup>은 크론병과 궤양성 대장염 환자의 대장 점막에서 IL-17, IL-23이 증가되어 있고 염증 반응 및 질환의 활성도와 관계가 있으며 크론병보다 궤양성 대장염에서 높게 측정되었다고 보고하였다. 동물실험에서 IL-17A가 DSS 대장염을 악화시키고, IL-17 knock-out 마우스에서 장손상이 감소하였으며,<sup>26</sup> TNBS 유도 장염에서도 IL-17이 염증 반응을 일으키는 데 중요한 역할을 하였다.<sup>27</sup> DSS 유발 대장염의 급성 모델에서 Th1, Th17 세포가 매개하는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17이 주로 증가하고, 만성 모델에서는 Th2 세포가 매개하는 IL-4, IL-10이 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>28</sup>

한편, IL-9은 Th2 세포 중에서 TGF- $\beta$ 에 의해 분화된 Th9 세포와 Th17 세포에서 분비되는데, 폐에 관련된 염증성 반응 및 천식, 아토피 질환, 기생충 질환과 연관이 있는 것으로 알려져 있으며 염증성 장질환과 연관관계는 아직 명확하지 않다.<sup>29</sup> 조절T세포(regulatory T cell)는 면역반응을 억제하는 기능이 있어서, 동종이식 후 발생하는 이식편대숙주병(graft-versus-host disease, GVHD)이나 자가면역질환의 치료에 시도되어 왔다. 동물 모델에서는 조절T세포가 장염의 치료에 효과가 있다고 하였다.<sup>30</sup>





**Fig. 6.** Flow cytometric characteristics of CD4<sup>+</sup> T cell in the B-98 group. The proportion of CD4<sup>+</sup> T cells from lamina propria were determined according to intracellular levels of cytokines for interferon (IFN)- $\gamma$  + Th1 cell, interleukin (IL)-4 + Th2 cells, IL-9 + Th9 cells, IL-17 + Th17 cells, and Foxp3 + Treg cells. The numbers of inside quadrant indicate the percentage of the cell population (\* $p < 0.05$ ). DSS, dextran sulfate sodium.

이번 연구는 DSS를 이용한 급성 대장염 모델을 이용하였으며, Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포분획이 증가하였고, Th2 세포분획의 증가는 관찰되지 않았다. B-98을 투여하였을 때 DSS 대장염에서 증가되었던 Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포의 분획이 의미있게 감소하여 B-98이 Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포와 연관된 면역작용과 관련있을 것으로 생각된다. DSS 대장염에서 면역억제 기능을 가지는 조절T세포가 감소하였으나, B-98 투여시 변화가 없었다.

이번 연구에서 B-98을 투여하였을 때, DSS 장염군에 비하여 약제의 농도에 비례하여 전반적인 임상양상이 호전되었고, 장 길이의 단축이 감소하는 효과를 보였으며 조직학적 소견의 호전이 관찰되었다. 추후에 IL-6 외에 다른 염증매개물질에 대한 분석이 필요할 것으로 보인다. 앞으로 B-98의 적정 농도에 대한 연구와 기존의 염증성 장질환의 치료제와 효능을 비교하는 연구가 필요할 것으로 생각되며, 만성 염증성 모델에서의 치료효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 dimethyl sulfoxide를 용매제로 사용하여 B-98을 복강 내로 투여했는데, dimethyl sulfoxide가 복강 내 화학적 염증을 일으킬 수 있으므로 추후에는 dimethyl sulfoxide를 대조군으로 하는 연구 및 B-98의 경구 투여에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론으로 이번 연구는 DSS를 이용한 장염 모델에서 새로운 5-LO 억제제인 B-98를 이용하여 장염의 육안적 질환의 활성 및 장염에 의한 장 길이 단축이 완화되고, 조직학적인 염증 소견이 호전되며 장염 유도시 증가되었던 IL-6가 감소한 것을 확인함으로써 장염 모델에서 B-98의 치료 효과가 있음을 제시하였다. 또한 DSS 장염 모델에서 CD4+ Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포가 관여하는 것으로 나타났으며, B-98 투여시 증가했던 Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포발현이 감소하여 약제의 치료 효과가 Th1, Th9, Th17 세포의 면역작용과 관련이 있는 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적:** 염증성 장질환의 염증반응에 많은 염증매개물질들이 관련하는데 이중 leukotriene은 강력한 염증 매개체로 leukotriene의 생성을 억제하는 5-lipoxygenase (5-LO) 억제제가 염증성 장질환의 치료제로 기대되어 왔다. 최근 새로운 5-LO 억제제로 benzothiazole 유도체인 B-98이 개발되어, 이번 연구는 이 약제를 장염 동물 모델에 투여하여 임상 양상 및 조직학적 변화를 확인하고 interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 와 CD4+ T세포 분획의 변화를 측정하여 B-98의 치료 효과를 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법:** C57BL/6 마우스를 정상 대조군, dextran sul-

fate sodium (DSS) 장염군, B-98 저용량 투여군(20 mg/kg), B-98 고용량 투여군(100 mg/kg)으로 나누고 3% DSS를 복용시켜 장염을 유발하였으며, B-98은 하루에 한번씩 복강 내로 주사하였다. 장염의 평가는 disease activity index (DAI), 장 길이, 조직학적 점수 체계(histologic colitis scoring system)를 이용하였다. 대장 조직의 IL-6를 RT-PCR을 이용하여 측정하였고 소장 고유층 세포를 분리하여 CD4+ T세포를 유세포 분석하였다.

**결과:** B-98 투여군에서 DSS 장염군에 비하여 DAI, 조직학적 점수가 유의하게 낮았으며( $p < 0.01$ ) 통계적 유의성은 없었으나 장 길이도 더 긴 경향을 보였다. DSS 장염군에서 정상 대조군에 비하여 IL-6 수치가 유의하게 증가했으며( $p < 0.05$ ), B-98 투여군에서 IL-6 수치가 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). DSS 장염군에서 Th1 세포, Th9 세포, Th17 세포의 분획이 증가하였고 B-98 투여군에서 모두 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ).

**결론:** DSS를 이용한 장염 모델에서 새로운 5-LO 억제제인 B-98를 이용하여 장염의 염증 소견이 호전되고 IL-6가 감소한 것을 확인함으로써 장염 모델에서 B-98의 치료 효과가 있음을 제시하였다. 또한 DSS 장염 모델에서 Th1, Th9, Th17 세포 분획이 증가하였으며 B-98 투여시 감소하여 치료 효과가 Th1, Th9, Th17 세포의 면역작용과 관련이 있는 것으로 생각된다.

**색인단어:** 5-Lipoxygenase 억제제; 염증성 장질환; 장염

## REFERENCES

1. Yang SK, Yun S, Kim JH, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-2005: a KASID study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:542-549.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-429.
3. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002;8:567-573.
4. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-1463.
5. Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1016-1023.
6. Olsen T, Rismo R, Cui G, Goll R, Christiansen I, Florholmen J. TH1 and TH17 interactions in untreated inflamed mucosa of inflammatory bowel disease, and their potential to mediate the inflammation. *Cytokine* 2011;56:633-640.
7. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mecha-



- nism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
8. Henderson WR Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 1994;121:684-697.
  9. Dahlén SE, Björk J, Hedqvist P, et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3887-3891.
  10. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989;97:326-337.
  11. Boughton-Smith NK, Hawkey CJ, Whittle BJ. Biosynthesis of lipooxygenase and cyclo-oxygenase products from [<sup>14</sup>C]-arachidonic acid by human colonic mucosa. *Gut* 1983;24:1176-1182.
  12. Berger W, De Chandt MT, Cairns CB. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract* 2007;61:663-676.
  13. Song H, Oh SR, Lee HK, et al. Synthesis and evaluation of benzoxazole derivatives as 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2010;18:7580-7585.
  14. Stevceva L, Pavli P, Husband A, Ramsay A, Doe WF. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice. *Genes Immun* 2001;2:309-316.
  15. Kihara N, de la Fuente SG, Fujino K, Takahashi T, Pappas TN, Mantyh CR. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats. *Gut* 2003;52:713-719.
  16. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, et al. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 2006;176:803-810.
  17. Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J. Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E2 and leukotriene B4 levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1986;91:837-844.
  18. Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J. In vivo effects of orally administered prednisolone on prostaglandin and leucotriene production in ulcerative colitis. *Gut* 1987;28:1095-1099.
  19. Cuzzocrea S, Rossi A, Mazzon E, et al. 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. *Lab Invest* 2005;85:808-822.
  20. Bertrán X, Mañé J, Fernández-Bañares F, et al. Intracolonic administration of zileuton, a selective 5-lipoxygenase inhibitor, accelerates healing in a rat model of chronic colitis. *Gut* 1996;38:899-904.
  21. Singh VP, Patil CS, Kulkarni SK. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on events associated with inflammatory bowel disease in rats. *Indian J Exp Biol* 2004;42:667-673.
  22. Zarif A, Eiznhamer D, Callaghan C, Doria MI, Broutman L, Keshavarzian A. The effect of a selective 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, on tissue damage in acute colonic inflammation in rats. *Inflammation* 1996;20:217-227.
  23. Hawkey CJ, Dube LM, Rountree LV, Linnen PJ, Lancaster JF. A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. The European Zileuton Study Group For Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 1997;112:718-724.
  24. Holma R, Salmenperä P, Riutta A, Virtanen I, Korpela R, Vapaatalo H. Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist, montelukast, on experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;429:309-318.
  25. Hawthorne AB, Boughton-Smith NK, Whittle BJ, Hawkey CJ. Colorectal leukotriene B4 synthesis in vitro in inflammatory bowel disease: inhibition by the selective 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C. *Gut* 1992;33:513-517.
  26. Ito R, Kita M, Shin-Ya M, et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:12-16.
  27. Leppkes M, Becker C, Ivanov II, et al. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. *Gastroenterology* 2009;136:257-267.
  28. Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:341-352.
  29. Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1247:56-68.
  30. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170:3939-3943.