

상지추출물이 Dextran Sulfate Sodium으로 유도된 대장염 마우스 모델에 미치는 항염증 효능*

최설희, 김은정[†]
대구가톨릭대학교 식품영양학과

Anti-inflammatory effects of mulberry twig extracts on dextran sulfate sodium-induced colitis mouse model*

Xuele Cui and Eunjung Kim[†]

Department of Food Science and Nutrition, Daegu Catholic University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38430, Korea

ABSTRACT

Purpose: Ulcerative colitis is a common inflammatory bowel disease. Prolonged colitis can be a risk factor for the development of colorectal cancer. Mulberry twig (MT, Sangzhi), a dry branch of *Morus alba* L., which is widely distributed throughout East Asia, has been shown to have anti-inflammatory activities in the cells. However, the effects of MT extracts on colitis in *in vivo* are limited. Therefore, in this study, we investigated the anti-inflammatory effects of MT extracts in the dextran sulfate sodium (DSS)-induced mouse colitis model. **Methods:** Six week-old, male ICR mice were divided into 3 groups: Control (n = 5), DSS (n = 7), and DSS+MT (n = 7) groups. Mice in the DSS and DSS+MT groups were administrated 3% DSS in drinking water for 5 days to induce colitis. At the same time, water extracts of MT (5 g/kg body weight/day) were orally administered to mice in the DSS+MT groups for 5 days. **Results:** The MT extracts significantly reduced the clinical and pathological characteristics of colitis. Disease activity index, mucosal thickness, and colonocyte proliferation were significantly reduced in the DSS+MT group compared with the DSS group. Furthermore, MT administration reduced the levels of plasma TNF- α , IL-6, and the colonic myeloperoxidase activity as well as mRNA expression of TNF- α , IL-6, Cox-2, and iNOS. **Conclusion:** Taken together, these results suggest that MT water extracts have potent anti-colitis activities in the mouse colitis model.

KEY WORDS: mulberry twig, *Morus alba* L., colitis, dextran sulfate sodium, mouse

서 론

염증성 장질환은 위장관에 영향을 주는 만성 특발성 염증성 질환으로 궤양성 대장염 (ulcerative colitis, UC)과 크론병 (Crohn's disease) 2종류로 구분된다. 이 중 UC는 대장암 발병과 밀접한 상관관계를 가지는 것으로 보이는데 [1] UC 환자는 정상인에 비해 대장암 발병률이 2~8배 이상 높다고 보고되고 있으며 [2,3] 대장염의 정도 및 지속 시간이 증가할수록 대장암 발생의 위험성이 더 높아지는 것으로 알려져 있다 [4]. UC는 미국, 유럽, 캐나다 등 서구에서 호

발하는 질환이지만, 최근에는 한국을 포함한 아시아국가에서도 발생률이 증가하고 있다 [5,6]. 한국의 UC 발병 평균 연령은 35~40세로 환자의 3~13% 정도가 대장암으로 진행된다고 보고되고 있으며 남녀 비는 각각 1:1.1~1.3 정도로 여자에서 조금 더 흔한 발병률을 보인다 [7]. 대장염의 발생 원인은 확실히 밝혀지지 않았으나 유전자로 대표되는 내적요인과 식이, 음주, 담배, 비만 등과 같은 외적요인이 상호작용하여 대장염을 유발하는 것으로 생각된다. 대장염이 암으로 발전하는 기전으로는 우선 전염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)이 대장 점막의 림

Received: March 1, 2019 / Revised: March 15, 2019 / Accepted: March 18, 2019

* This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIP) (No. NRF-2015R1C1A2A01054514).

[†] To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-53-850-3523, e-mail: kimeunj@cu.ac.kr

© 2019 The Korean Nutrition Society

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.

프구, 대식세포, 그리고 호중구와 같은 면역세포들의 방어 반응을 활성화시켜 염증반응이 일어난 부위로 모여들게 하고 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-6 (IL-6) 등의 사이토카인을 과잉으로 생산하게 유도한다. 이렇게 과잉 생산된 염증성 사이토카인은 다른 염증세포, 혈관내피세포, 섬유아세포 등을 활성화시키고 염증을 촉진한다 [8]. 한편 대장염증이 발생하였을 때 성장 인자, TNF- α , 그리고 여러 사이토카인들에 의해 산화적 스트레스인자인 reactive oxygen species (ROS)와 nitric oxide (NO)의 생산이 증가하여 산화적 스트레스 상태를 유도하게 되는데 과도한 NO와 prostaglandin (PG)의 생산이 세포의 산화적 손상을 일으켜 종양생성을 유발하는 데 중요한 역할을 한다. 염증반응에서 NO는 주로 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해, PG의 대부분은 cyclooxygenase-2 (Cox-2)에 의해 생성되며 [9] iNOS와 Cox-2는 전사조절인자인 NF- κ B에 의해 발현이 조절된다.

상지 (mulberry twig, MT)는 뽕나무의 가지로 예로부터 류머티즘 및 관절염, 혈압, 당뇨, 혈중지질농도조절에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [10]. MT에는 mulberoside A (MSA), oxyresveratrol (ORT), resveratrol, moracin 등이 주요성분으로 함유되어 있으며 [11]. 이 중 MSA는 RAW 264.7 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 염증반응을 완화 [12]시키고, MT에서 추출된 ORT도 LPS에 의한 NF- κ B 활성화를 조절함으로써 iNOS와 Cox-2발현을 감소시키고 항염증효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다 [13]. 그러나 MT의 항염증효과에 대한 연구는 주로 세포 실험으로 진행되었으며 *in vivo*에서의 항염증, 특히 항대장염 효능에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 dextran sulfate sodium (DSS)으로 유도된 마우스 대장염모델에서 MT추출물의 항염증효능을 규명하고자 실험을 진행하였다.

연구방법

실험동물 및 식이

실험동물은 6주령 수컷 ICR 마우스를 코아텍(주)사 (Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 일주일간 pellet 형태의 lab. chow 식이를 제공하여 사육환경 (항온 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 항습 $50 \pm 5\%$, 12시간 명암주기)에 적응시킨 후, 난괴법 (randomized complete block design)에 따라 실험동물을 총 3개의 군으로 분류하였다: Control군 ($n = 5$), DSS를 공급한 군 (DSS군, $n = 7$), 그리고 DSS와 함께 MT열수추출물을 공급한 군 (DSS+MT, 5 g/kg body weight/day, $n = 7$). 실험식은 AIN-76A diet를 제조하여 공급하였으며 MT

열수추출물은 대구가톨릭대학교 최상원 교수님 실험실로부터 제공받아 사용하였다. 제조 방법으로는 뽕나무 (*Morus alba* L.) 가지 (MT)는 봄에 잎이 내돋지 않은 때에 청일뽕 뽕나무로부터 채취 후 세절하여 흐르는 물에 수세하였다. 일주일간 음지에서 자연 건조한 다음 $50 \pm 5.0^\circ\text{C}$ 의 열풍건조기 (COBP-15S, Shinheung, Seoul, Korea)에서 2일간 건조한 것을 실험재료로 사용하였다 (수분함량은 MT: $7.82 \pm 0.2\%$). 다음 세절한 건조 MT (100 g)에 이온수 1.5 L을 각각 가하여 초음파추출기 (Power Sonic 420, Hwashintech, Incheon, Korea)에서 2시간 2회 추출한 후 여과 (Whatman No. 2, Maidstone, England)하고 진공감압농축기 (Eyela, Tokyo, Japan)로 농축하여 MT 열수추출물을 제조하였다 [수율: MT ($2.5 \pm 0.3\%$)]. 식이 섭취량은 매일, 체중은 매주 1회 일정한 시간에 측정하여 기록하였다. 실험동물은 5일간 3% DSS (MP Biomedicals Korea, Seoul, Korea)를 음용수로 공급하고, DSS+MT군에는 DSS 공급과 함께 MT열수추출물을 5일간 경구투여하였다. 본 연구의 동물실험은 대구가톨릭대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 후 수행하였다 (IACUC-2014-041).

질병활성도 측정

DSS 공급기간 동안 대장염의 유발정도를 평가하기 위하여 매일 체중, 대변의 물기, 혈변 유무, 항문 출혈정도를 Cooper 등 [14]이 제시한 임상평가시스템에 기초하여 0~4점 척도로 평가하였다. 0, 체중감소 없음, 대변 물기 정상, 혈변 없음, 항문 출혈 없음; 1, 1~5% 체중 감소, 대변 물기 정상, 혈변 없음, 항문 출혈 없음; 2, 6~10% 체중 감소, 약간 묽은 대변, 갈색 변, 항문 출혈 보임; 3, 11~20% 체중 감소, 묽은 대변, 붉은색 변, 항문 출혈; 4, 20% 초과 체중 감소, 설사, 혈변, 항문 출혈 심함.

혈액 및 장기 채취

희생 전 마우스를 12시간 절식시킨 후, 실험동물은 CO_2 로 마취하여 개복을 하고, 복부 대정맥으로부터 헤파린 처리된 주사기를 사용하여 채혈하였다. 혈액은 4°C , 13,200 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후 -80°C deep freezer에 보관하였다. 채혈 후 즉시 맹장부터 직장까지의 대장을 적출하여 길이를 측정한 다음, 적출된 대장에 주사기로 생리식염수를 주입하여 분변을 뺀 후 물기를 제거하고 대장무게를 측정하였다. 대장조직은 proximal, middle, distal 세 부분으로 나누었으며 일부 개체의 rectal 부분은 병리학적 분석을 위해 10% 포르말린 용액에 고정시켰다. 나머지 조직은 액체질소로 급속 동결하여 -80°C deep freezer에 보관하였다.

혈장 NO 및 cytokine 측정

혈장 NO, TNF- α , IL-6 농도는 각각 NO detection kit (iNtRON, Seongnam, Korea), Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go! kit (eBioscience, San Diego, CA, USA), Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go! kit (eBioscience)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 측정하였다.

조직병리학적 분석

포름알린에 고정된 rectal 조직은 파라핀 조직 표본을 제작하여 4 μ m 두께로 절편한 다음 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색하였다. 대장점막의 증식정도를 분석하기 위해 Leica Appication Suite (Version 2.8.1) 프로그램을 이용하여, 100배의 배율로 점막의 두께를 수직으로 측정하였다. 무작위로 선정한 군당 3마리 개체의 조직에서 각각 6개의 다른 부위 측정값의 평균값을 구하여 비교하였다.

대장점막세포 증식 분석

희생 1시간 전에 100 mg/kg의 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)을 마우스에 복강 주사하였다. 대장 적출 후 파라핀 포매한 rectal 조직의 절편을 anti-BrdU antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 면역염색하였다. 광학 현미경을 이용하여 200배의 배율로 한 개체의 rectal 조직에서 무작위로 5구역을 선정하고 각 구역의 점막상피세포에 존재하는 BrdU 염색세포의 숫자를 계수하였다. 구역내에 존재하는 점막상피세포 총 수에 대한 BrdU 염색 세포 수의 비율을 BrdU labeling index로 나타내었다.

단백질 발현 분석

대장조직의 총 단백질은 RIPA buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris [pH 7.5], 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.5 M EDTA, 0.1 M EGTA)를 사용하여 용리한 뒤 10% SDS-PAGE에서 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane (Roche, Indianapolis, IN, USA)으로 transfer 하였다. Blot은 0.05% Tris-buffered saline Tween 20를 용매로 한 5% nonfat dried milk로 blocking한 후 1차 항체는 1:1,000의 비율로 희석한 antibody (Cell Signaling, Canvers, USA)를 사용하여 4°C에서 O/N incubation하였다. 0.1% TBST로 10분간 3번 세척한 후 blot은 1:1,000 비율로 희석한 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany)를 2차 항체로 사용하여 상온에서 1시간 incubation하였다. Specific band는 enhanced luminol-based chemiluminescent kit (Bio Science Technology, Pohang, Korea)를 사용하여 암실에서 medical

X-ray film (CP-BU new; AGFA)에 노출시켜 검출하였다.

Myeloperoxidase (MPO) 활성 측정

일정한 양의 대장조직 (10% wt/vol)에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 포함한 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 1 mL를 가하여 초음파 분쇄한 후 12,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 효소액으로 사용하였다. 효소액 100 μ L에 *O*-dianisidine (20 mg/mL) 30 μ L를 가한 후 H₂O₂의 최종농도가 0.0005%가 되게 가하여 20°C에서 10분간 반응시켰다. 2% sodium azide 30 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후, 25°C, 460 nm에서 Multiskan GO Microplate Reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 효소활성을 측정하였다. MPO 활성 1 unit는 25°C에서 H₂O₂ 1 μ mol/min을 분해하는 효소의 활성을 나타내며, 조직 g 당 MPO unit으로 표시하였다.

Real-Time PCR

대장조직 0.1 g을 동결 상태로 막자사발에서 균질화하여 1 mL의 RNAiso Plus (TakaRa, Otsu, Japan)를 첨가한 후 5분 동안 상온에서 가라앉혔다. Chloroform 200 μ L를 넣고 맹렬히 섞은 뒤 다시 상온에서 5분 동안 가라앉히고 10,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심 분리하였다. 분리된 상층액을 취하여 상층액과 동량의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 뒤 10분 동안 상온에서 가라앉히고 14,000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. RNA pellet은 75% ethanol이 포함된 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water를 넣고 섞은 뒤 7,500 rpm, 4°C에서 5분 동안 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 상온에서 건조한 후 얻은 RNA pellet을 0.1% DEPC-treated water에 녹였다. 분리된 total RNA는 분석 전까지 -80°C deep freezer에 보관하였다.

PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Otsu, Japan)를 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. Oligo dT Primer (50 μ M) 1 μ L, dNTP Mixture (10 μ M each) 1 μ L, template RNA 1 μ g을 취하여 RNase free dH₂O로 10 μ L가 되게 부피를 맞추고 65 °C에서 5분간 반응시킨 뒤 차갑게 식혔다. 그리고 5X PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L PrimeScript RTase (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase free dH₂O 4.5 μ L를 넣고 섞은 뒤 42°C에서 30분간 반응시켜 cDNA를 합성하고 95°C에서 5분간 반응시켜 효소의 활성을 억제하였다. 합성된 cDNA는 DEPC-treated water에 희석시켜 -20°C에서 보관하고 Real-Time PCR 수행 시에 template으로 사용하였다.

Template로 합성된 cDNA (10 ng/ μ L)는 SYBR Premix

Ex Taq (TaKaRa)을 사용하여 mRNA 발현 분석을 하였다. 각 유전자의 발현을 분석할 수 있는 primer는 Macrogen사 (Seoul, Korea)에서 합성하였다. 95°C에서 30초 동안 초기 denaturation 한 후에 95°C에서 5초, 60°C에서 30초를 1 cycle로 하여 40회 반응시켰다. 각 cycle 마다의 형광신호를 감지하여 나타내는 threshold cycle, C(t) 값을 분석하여 CFX96 Real time system (Bio-rad, Hercules, CA, USA)으로 각 실험군 간의 mRNA 발현을 정량분석 하였다. Internal transcription marker로는 GAPDH를 사용하였으며 증폭 시 사용한 gene primer 염기서열은 다음과 같다.

TNF- α : (F) *TAC CTT GTC TAC TCC CAG GTT CTC T* (R) *GTG TGG GTG AGG AGC ACG TA*, IL-6: (F) *CTT CCT ACC CCA ATT TCC AAT G* (R) *ATT GGA TGG TCT TGG TCC TTA GC*, Cox-2: (F) *CAT CCC AGG CCG ACT AAA TG* (R) *TTT CAG AGC ATT GGC CAT AGA A*, iNOS: (F) *TGA CGG CAA ACA TGA CTT CAG* (R) *GCC ATC GGG CAT CTG GTA*, GAPDH: (F) *GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC* (R) *CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG*

통계분석

실험의 모든 결과는 SPSS (ver.19, IBM, Armonk, NY, USA) 통계 처리 프로그램을 사용하였고, 각 항목에 따라 평균값 \pm 표준오차 (standard error, S.E.)를 구하였다. 각 군별 유의성 검증을 위하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 하였고, 여러 군 간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 유의 수준 $p < 0.05$ 에서 사후검정을 실시하였다.

결 과

질병활성도

대장염을 유발하기 위해 3% DSS를 5일 동안 음용수로 Control군을 제외한 실험동물에게 공급하였으며 이 기간 동안 매일 질병 활성도를 측정하여 대장염 유발정도를 확인하였다. 체중변화, 변의 물기와 혈변정도, 그리고 항문 출혈여부를 근거로 산정한 질병활성도의 경우, Control군은 5일 동안 거의 변화가 없었으나, DSS군의 질병활성도는 DSS 급여 2일째부터 Control군에 비해 유의적으로 증

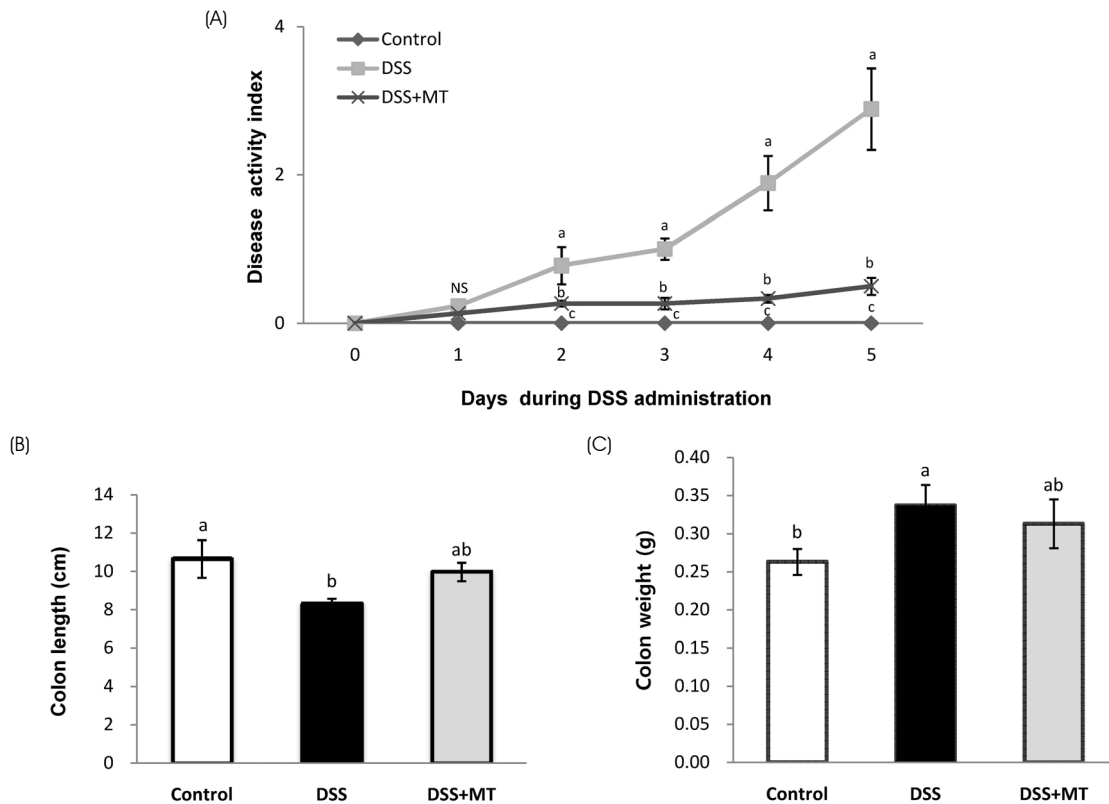


Fig. 1. Effects of MT on disease activity index, colon length and colon weight. (A) Disease activity index was measured daily during DSS administration. Large intestine was obtained after the DSS administration and their lengths (B) and weight (C) were measured. Value are presented as the mean \pm SE. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Control, group received water without DSS; DSS, group received 3% DSS in drinking water for 5 days; DSS+MT, group received 3% DSS and oral administration with MT water extracts (5 g/kg/day) for 5 days; DSS, dextran sulfate sodium; MT, mulberry twig; NS, not significant

가하였다 (Fig. 1A). 한편, DSS+MT군의 질병 활성도는 DSS군에 비해 현저하게 감소함을 보였다.

대장 길이와 무게

동물 희생 시 적출한 대장의 길이와 무게를 측정한 결과, 대장의 길이는 Control군이 10.65 cm, DSS군이 8.33 cm, DSS+MT군이 9.97 cm로 DSS군이 Control군에 비해 길이가 짧은 반면, DSS+MT군의 대장 길이는 DSS군에 비해 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 1B). 대장 무게는 Control군이 0.263 g, DSS군이 0.337 g, DSS+MT군이 0.313 g으로 DSS군의 대장 무게가 가장 많이 나갔으며 DSS군에 비해 DSS+MT군의 대장 무게는 감소하는 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 1C).

대장조직의 병리학적 변화 및 점막 증식 정도

마우스의 rectal 조직을 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였을 때, DSS군은 Control군에 비해 대장 crypt 소실과 대장점막의 비후, 염증 세포의 침투 등 대장 조직의 전형적인 염증성 변화를 현저히 보인 반면, MT의 투여는 DSS에 의한 대장염의 조직 특성이 상쇄되고 Control군과 같이 정상적인 대장 조직의 형태를 보였다 (Fig. 2A). 대장 점막의 두께 또한 Control군이 142.8 μ m, DSS군이 551.6 μ m, DSS+MT군이 323.4 μ m으로 Control군에 비해 DSS군의 점막 두께가 유의적으로 증가하였으며, DSS+MT군은 DSS군에 비해 41.4% 감소하였다 (Fig. 2B). 대장 점막 상피세포의 증식 정도를 나타내는 BrdU 염색결과 BrdU positive cell의 비율은 Control군에서는 3.11%, DSS군에서는 15.47%, DSS+MT군에서는 6.89%로 나타났다 (Fig. 3).

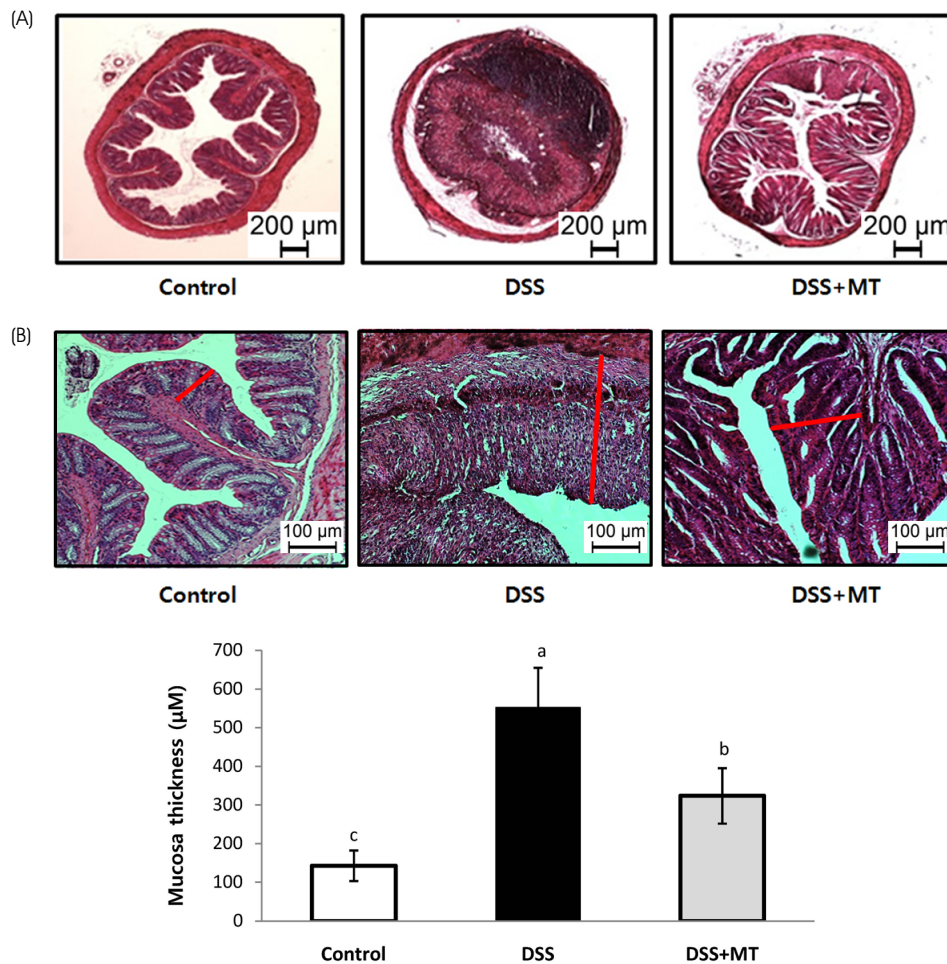


Fig. 2. Histopathological change of large intestine. The rectum of mouse was stained with hematoxylin and eosin. (A) Representative histological images of Control, DSS, and DSS+MT groups are shown. (B) Mucosal thickness was measured microscopically. Value are presented as the mean \pm SE. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Control, group received water without DSS; DSS, group received 3% DSS in drinking water for 5 days; DSS+MT, group received 3% DSS and oral administration with MT water extracts (5 g/kg/day) for 5 days; DSS, dextran sulfate sodium; MT, mulberry twig

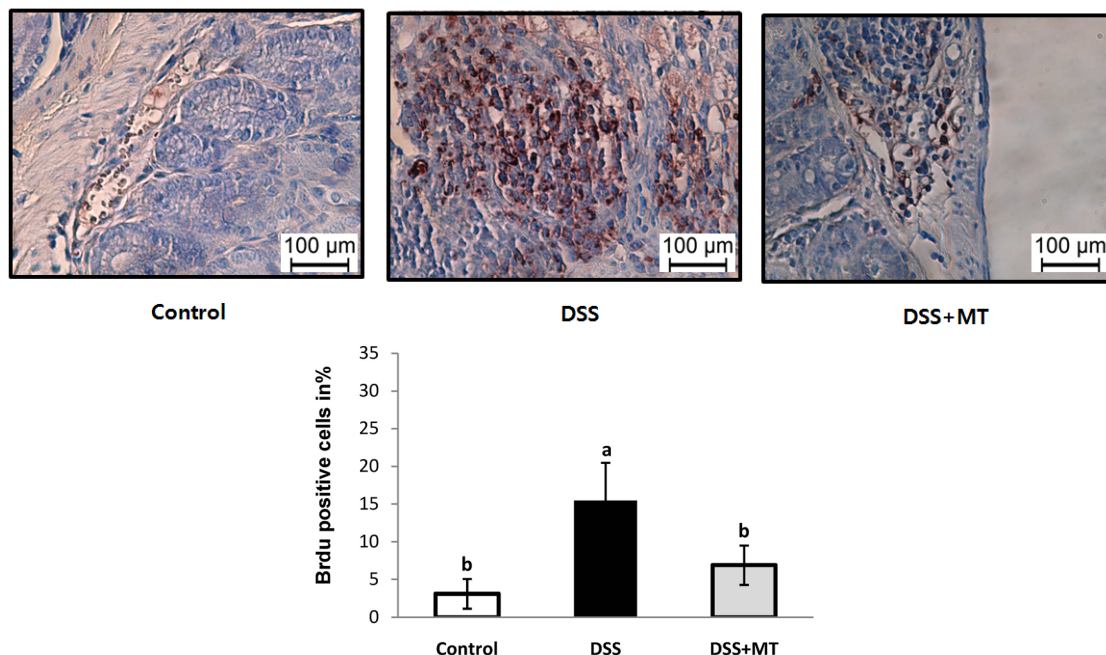


Fig. 3. Proliferation rate of colonocytes. BrdU incorporation was demonstrated immunohistochemically after i.p. injection of BrdU. The number of BrdU-labeled cells were counted and labeling index of BrdU was determined (BrdU-labeled cells/300 cells). Value are presented as the mean \pm SE. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Control, group received water without DSS; DSS, group received 3% DSS in drinking water for 5 days; DSS+MT, group received 3% DSS and oral administration with MT water extracts (5 g/kg/day) for 5 days; DSS, dextran sulfate sodium; MT, mulberry twig

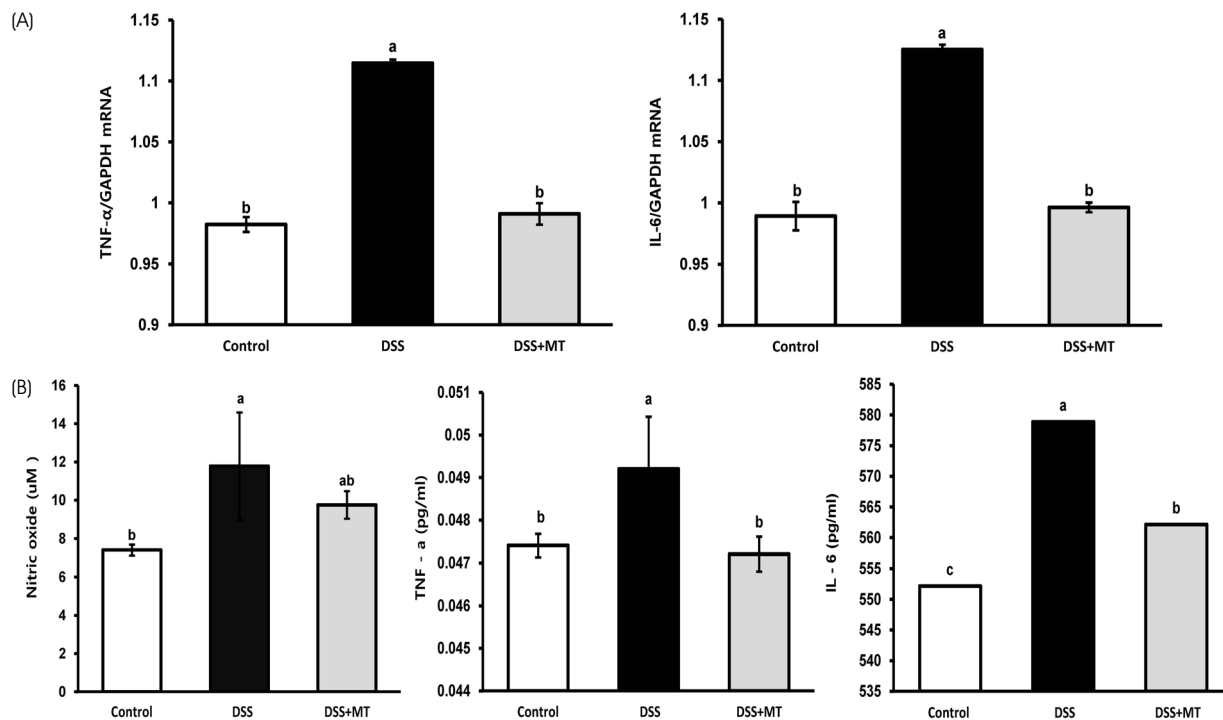


Fig. 4. The levels of inflammatory mediators in colorectal tissue and in plasma. (A) TNF-α and IL-6 mRNA expression in colorectal region were measured by qRT-PCR. (B) The levels of plasma NO, TNF-α and IL-6 were determined in experimental groups. Value are presented as the mean \pm SE. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Control, group received water without DSS; DSS, group received 3% DSS in drinking water for 5 days; DSS+MT, group received 3% DSS and oral administration with MT water extracts (5 g/kg/day) for 5 days; DSS, dextran sulfate sodium; MT, mulberry twig

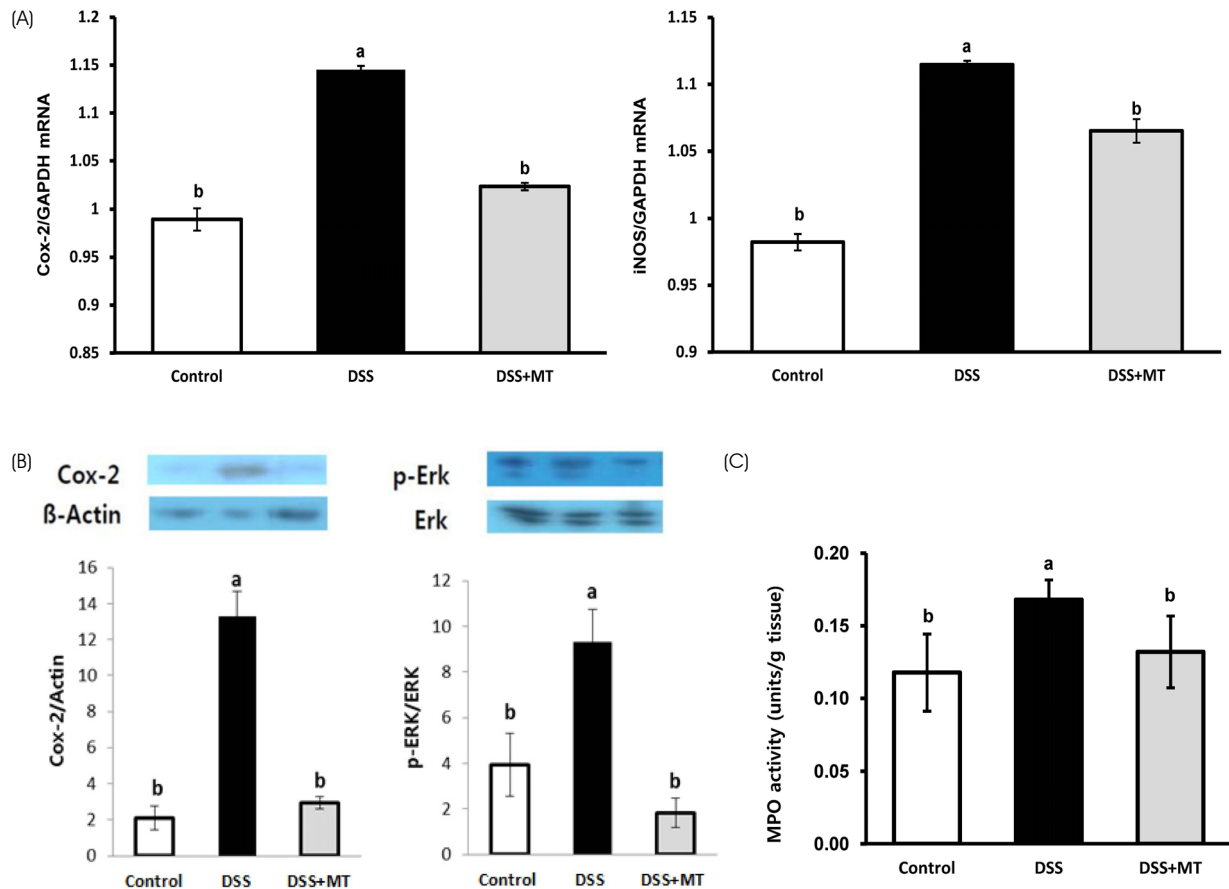


Fig. 5. Colorectal inflammatory gene expression and MPO activity. (A) Cox-2 and iNOS mRNA expression in the distal part of large intestine was analyzed by qRT-PCR. (B) Total protein lysates from the distal part of large intestine were subjected to western analysis with their relevant antibodies. Relative abundance of each band to β -actin or Erk was quantified. (C) MPO activities in colorectal tissues of each group of mice were determined. Value are presented as the mean \pm SE. Means with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. Control, group received water without DSS; DSS, group received 3% DSS in drinking water for 5 days; DSS+MT, group received 3% DSS and oral administration with MT water extracts (5 g/kg/day) for 5 days; DSS, dextran sulfate sodium; MT, mulberry twig; MPO, myeloperoxidase

이러한 결과는 MT의 투여가 DSS에 의한 대장 점막 상피 세포의 증식을 감소시키는 효과가 있음을 제시한다.

염증성 cytokine의 대장 조직 발현 및 혈장 수준 분석

염증성 사이토카인으로 TNF- α 와 IL-6의 대장 조직 발현량을 실험군간 비교하였을 때, Control군에 비해 DSS군에서 TNF- α 와 IL-6 mRNA 발현이 유의적으로 증가한 반면, DSS+MT군에서의 발현은 Control군 수준으로 감소하였다 (Fig. 4A). 혈장 NO 양은 Control군에 비해 DSS군에서 증가하였으며 MT의 투여는 NO양을 감소시키는 경향을 보였다 (Fig. 4B). 혈장 TNF- α 및 IL-6의 농도도 Control군에 비해 DSS군에서 증가하였으나 DSS+MT군에서는 Control군 수준으로 감소하였다.

대장 조직의 염증 지표 유전자 발현 및 MPO 활성 분석

실험군간 대장 조직의 염증 정도를 대표적인 염증 지표 유전자인 Cox-2와 iNOS의 발현으로 비교해 보았을 때, Control군에 비해 DSS군의 Cox-2와 iNOS mRNA 발현이 유의적으로 증가한 반면 DSS+MT군에서 이들 유전자 발현은 감소하였다 (Fig. 5A). MT의 투여가 대장의 NF- κ B 활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 Cox-2의 단백질 발현과 Erk1/2의 인산화 정도를 western으로 분석하였다. 그 결과 Cox-2와 pErk1/2의 발현은 Control군에 비해 DSS군에서 유의적으로 증가하였으며 DSS+MT군에서 발현은 Control군 수준으로 감소하였다 (Fig. 5B). 조직의 염증반응 중 하나로 호중구의 조직 침투를 들 수 있는데, 이러한 호중구 침투 정도를 측정하기 위해 대장조직에서 호중구에 많이 발현하는 효소인 MPO의 활성을 측정하였다. MPO 활성은

Control군에 비해 DSS군에서 유의적으로 증가하였으며 DSS군에 비해 DSS+MT군에서의 활성이 감소하는 것을 보였다 (Fig. 5C).

고 찰

UC는 대장의 점막 또는 점막하층에 국한된 원인불명의 염증성 장 질환으로 혈성 설사와 대변급박감, 그리고 복통 등이 주증상이다 [15-17]. 호전과 악화를 반복하는 만성적인 염증으로 고통 받는 사람들이 전 세계적으로 증가하고 있으며 합병증으로 대장암의 발병 가능성 또한 높아지기 때문에 적절한 예방과 치료가 필수적이다. 현재 사용되고 있는 UC 치료제로는 sulfasalazine, mesalazine 등의 5-aminosalicylic acid 제제, 스테로이드 제제, 항TNF 제제 등이 있는데 UC를 완전히 치료할 수 있는 약제는 없는 실정이며 일부 환자는 약물 치료에 반응하지 않거나 부작용으로 대장절제술을 받게 되는 경우가 있다 [18]. 따라서 부작용이 적고 순응도가 좋은 천연물 유래 UC 예방 혹은 치료제 개발에 대한 지속적인 연구가 필요하며 본 연구에서는 DSS 유도 마우스 UC 모델을 이용하여 MT추출물의 항대장염 효능과 관련 기작에 대해 연구하였다.

DSS는 포도당 분자량에 따라 최고 3개의 황산기를 포함하는 다당류로서 동물에 음용시켜 유도한 대장염의 초기에는 혈변, 체중 감소, 대장의 축소 및 점막 궤양 등 인체의 UC와 유사한 증상이 나타나 대장염 동물모델에 널리 사용되어오고 있다 [19]. DSS에 의한 대장염 발병기전은 아직 명확하지는 않지만 다음 기전들로 요약해 볼 수 있는데 1) 대장점막의 삼투율 증가에 따른 점막상피세포의 저항력 감소 및 사멸 [20,21] 2) 장 특이적 T cell에 의한 장내 면역염증반응 유도 [22] 3) TNF- α , IFN- γ , IL-10과 같은 cytokine들의 발현 증가 [23] 그리고 4) 장내 균총환경 변화 [24] 등이다. Okayasu 등의 연구 [19]에서는 CBA/J와 Balb/c 두 종류의 마우스에게 DSS를 0, 1, 5, 10%의 농도로 서로 다르게 공급하고 대장염 증상을 분석한 결과 대조군에 비해 DSS를 공급한 군에서 대장 길이의 단축 및 대장의 점막조직 파괴 현상이 두드러지는 것으로 나타났으며 DSS의 농도가 높을수록 대장염 증상 역시 악화되는 것으로 나타났다. 또한 정상 마우스에 비해 DSS로 유도된 대장염 마우스들은 질병활성도가 높아지고 체중감소 현상이 나타나는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 마우스 생존율을 고려하여 3% DSS를 공급하였으며 급여하는 동안에 각 군간의 체중 변화와 질병활성도를 분석한 결과, DSS군의 질병활성도는 Control군에 비해 유의적으로 증가한 반면, DSS+MT군은 DSS군에 비해 질병활성도의 증가

가 유의적으로 감소되었다. Choi 등 [25]은 DSS를 5%로 7일간 급여한 마우스 대장염 모델에서 청일뿔 물 추출물을 급여했을 때 DSS에 의한 질병활성도가 감소되고 대장 길이는 증가하였다고 보고한 바 있다.

염증은 점막 상피세포 장벽의 건전성을 손상시켜 점막 파괴와 흡수기능 소실을 유발하게 된다. 대장 조직을 병리학적으로 분석하였을 때 DSS군에서 점막의 crypt 결손, 염증세포 침투, 점막 세포 증식 등의 현상이 뚜렷하게 나타났다. 그에 반해 DSS+MT군에서는 이러한 변화가 유의하게 개선됨이 확인되었다. 한편, 염증 상태에서는 염증성 사이토카인, 성장인자 등의 과잉 분비에 의해 crypt 세포들의 세포주기 중 DNA를 합성하는 S phase가 증가되어 비정상적인 증식과 분화를 하게 된다 [26]. DNA 합성시 BrdU가 유입되는 것으로 crypt 세포증식 정도를 확인할 수 있는데 본 연구에서는 MT추출물을 급여한 DSS+MT군이 DSS군에 비하여 BrdU labeling index가 유의적으로 감소하였다. 이는 MT 추출물이 염증으로 인한 대장 손상을 회복시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인들은 염증성 장 질환에서 염증반응의 초기에 많이 생성된다 [8]. 단핵구나 대식세포에서 생성된 TNF- α 는 점막의 염증반응에 중요한 작용을 하는데, 기질세포로부터 metalloproteinase의 분비를 유도하여 조직손상을 초래하고, 내피세포를 직접적으로 활성화시켜 ICAM-1과 같은 부착분자의 발현을 증가시킨다. 또한 TNF- α 는 상피세포의 사멸을 유도하여 점막층을 파괴하고 염증반응이 지속적으로 일어날 수 있도록 한다. 따라서 TNF- α 를 과발현 시키면 만성 대장염을 지속시킬 수 있고 반대로 TNF- α 를 억제하면 만성 대장염이 개선될 수 있다고 보고되고 있다 [27]. 본 연구에서도 대장 조직에서의 TNF- α 발현과 혈장 TNF- α 농도가 DSS 급여에 의해 유의적으로 증가하였으며 MT 추출물의 투여가 TNF- α 양을 감소시키는 것을 확인하였다. 대장염 환자들은 건강인보다 IL-6 생성량 또한 증가된다는 것이 보고되었고 [28] 대장암 환자를 대상으로 한 연구에서는, 1기, 2기 환자에서 수술 3개월 후에 IL-6의 농도가 수술 전보다 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 [29]. 본 연구에서 MT추출물의 투여는 DSS에 의해 증가된 대장 조직과 혈장의 IL-6 생성량을 유의적으로 감소시켰다.

MT추출물이 DSS에 의한 대장염 증상 개선효능을 보이는 기전의 한 가지로 대표적인 염증성 단백질인 Cox-2와 iNOS 유전자 발현의 억제를 들 수 있다. 염증반응이 일어날 때 MAP kinase 활성화에 의해 NF- κ B가 활성화되며 [30,31] 이는 Cox-2와 iNOS의 유전자 발현 증가와 염증성 사이토카인 분비량 증가로 이어지게 된다. MT추출물은

DSS에 의한 대장조직 Erk 활성화 및 Cox-2와 iNOS 유전자 발현의 증가를 억제하는 결과를 보였다. MPO 효소는 HOCl 산화제 등 세포 독성물질의 생성 시 필요로 되는 효소 촉매로써 마우스 대장염모델에서 나타난 과립구 침윤 현상을 평가하는 지표로 많이 사용된다. 호중구 침윤은 대장점막 염증의 첫 단계로서 조직 손상, 점막 궤양 등의 임상증상을 나타내게 된다 [32]. 본 연구에서 MT추출물이 MPO 활성을 억제하는데 영향을 끼치는지 실험해 본 결과, 대장조직에서 Control군에 비해 DSS군의 MPO 활성이 유의적으로 증가하였으며 DSS군에 비해 DSS+MT군의 MPO 활성이 유의적으로 감소하였다.

지금까지 MT 추출물의 항염효능은 주로 *in vitro* 세포실험에서 Cox-2와 iNOS의 유전자 발현, 그리고 NO, prostaglandin E₂, IL-6 수준의 유의적 감소로 확인된 바 있으나 DSS-유도 마우스 대장염 모델에서 대장염 완화 효능을 보인 연구는 제한적이다. 본 연구에서는 마우스 대장염의 다양한 지표들이 MT열수추출물의 급여에 의해서 현저히 개선됨을 제시하였다. 향후에는 MT열수추출물의 주요 생리활성물질인 ORT의 대장염 예방효과를 연구하고 현재 대장염 치료제로 사용되고 있는 약제의 효능과 비교 분석 및 기능성 식품개발로의 가능성을 추후에 볼 가치가 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 DSS 유도 대장염 마우스 모델에서 MT열수추출물의 항대장염 효능을 확인하고자 ICR 마우스에 5일 동안 3% DSS와 함께 MT추출물을 경구투여한 후 대장염의 임상적 증상 및 염증 지표들을 분석하였다. 그 결과 MT추출물의 투여는 DSS에 의해 유도된 마우스 대장염 증상의 지표들, 즉 체중 감소와 혈성 설사를 포함한 질병 활성도, 대장점막증식, 그리고 TNF- α 와 IL-6를 포함한 염증성 사이토카인량 증가를 개선시키는 것으로 나타났다. 또한 DSS에 의해 증가된 Cox-2, iNOS, p-Erk 등 염증 지표 단백질의 발현도 MT추출물 투여군에서 감소되었다. 이러한 결과들은 MT추출물이 항대장염 효능이 있음을 제시하며 향후 MT추출물에 포함되어 있는 생리활성물질의 효능과 관련기작이 규명된다면 상지를 물로 우려내어 섭취하는 상지차 형태의 대장염 예방 혹은 개선용 건강식품으로의 개발을 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

ORCID

최설희: <https://orcid.org/0000-0002-8981-6772>

김은정: <https://orcid.org/0000-0003-4548-2632>

References

1. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2009; 361(21): 2066-2078.
2. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. Gut 2001; 48(4): 526-535.
3. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. Gut 1994; 35(11): 1590-1592.
4. van Hogezaand RA, Eichhorn RF, Choudry A, Veenendaal RA, Lamers CB. Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction? Scand J Gastroenterol Suppl 2002; 37(236): 48-53.
5. Yang SK, Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. Inflamm Bowel Dis 2001; 7(3): 260-270.
6. Ng WK, Wong SH, Ng SC. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. Intest Res 2016; 14(2): 111-119.
7. Yang DH, Yang SK. Trends in the incidence of ulcerative colitis in Korea. Korean J Med 2009; 76(6): 637-642.
8. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Immunol 1997; 9(1): 4-9.
9. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. Nature 2002; 420(6917): 860-867.
10. Jang YJ, Leem HH, Jeon YH, Lee DH, Choi SW. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from morus root bark. J Korean Soc Food Sci Nutr 2015; 44(7): 1090-1099.
11. Choi SW, Jang YJ, Lee YJ, Leem HH, Kim EO. Analysis of functional constituents in mulberry (Morus alba L.) twigs by different cultivars, producing areas, and heat processings. Prev Nutr Food Sci 2013; 18(4): 256-262.
12. Zhang Z, Shi L. Anti-inflammatory and analgesic properties of cis-mulberoside A from Ramulus mori. Fitoterapia 2010; 81(3): 214-218.
13. Chung KO, Kim BY, Lee MH, Kim YR, Chung HY, Park JH, et al. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from Morus alba L. J Pharm Pharmacol 2003; 55(12): 1695-1700.
14. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest 1993; 69(2): 238-249.
15. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev 2002; 15(1): 79-94.
16. 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): 501-523.
17. Su C, Lichtenstein GR. Ulcerative colitis. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, editors. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis,

- Management. Volume 2. 8th edition. Philadelphia (PA): Saunders; 2006. p.2499-2548.
18. Choi CH, Moon W, Kim YS, Kim ES, Lee BI, Jung Y, et al. Second Korean guideline for the management of ulcerative colitis. *Korean J Gastroenterol* 2017; 69(1): 1-28.
 19. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98(3): 694-702.
 20. Walsh-Reitz MM, Huang EF, Musch MW, Chang EB, Martin TE, Kartha S, et al. AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289(1): G163-G171.
 21. Araki Y, Sugihara H, Hattori T. In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis. *Oncol Rep* 2006; 16(6): 1357-1362.
 22. Johansson ME, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 2010; 5(8): e12238.
 23. Morgan ME, Zheng B, Koelink PJ, van de Kant HJ, Haazen LC, van Roest M, et al. New perspective on dextran sodium sulfate colitis: antigen-specific T cell development during intestinal inflammation. *PLoS One* 2013; 8(7): e69936.
 24. Forbes E, Murase T, Yang M, Matthaei KI, Lee JJ, Lee NA, et al. Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J Immunol* 2004; 172(9): 5664-5675.
 25. Choi IY, Lee KT, Kim MC, Kim SJ, Kim DS, Jeon YD, et al. Anti-inflammatory effects of Cheongilppong on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Orient Pharm Exp Med* 2011; 11(1): 35-39.
 26. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, van Noorden S, Price Y, Lane DP, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991; 165(2): 173-178.
 27. Min HY, Chung HJ, Kim EH, Kim S, Park EJ, Lee SK. Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(9): 1356-1364.
 28. Hoffmann A, Leung TH, Baltimore D. Genetic analysis of NF- κ B/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J* 2003; 22(20): 5530-5539.
 29. Kinoshita T, Ito H, Miki C. Serum interleukin-6 level reflects the tumor proliferative activity in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 85(12): 2526-2531.
 30. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor κ B. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(9): 1317-1327.
 31. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S. Regulation of NF- κ B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 1997; 198(1-3): 35-49.
 32. Costa F, Mumolo MG, Ceccarelli L, Bellini M, Romano MR, Sterpi C, et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54(3): 364-368.