염증성 장 질환 동물 모델에서 황금탕과 감초사심탕의 효능 연구

김영광, 문영호
동신대학교 한의과대학 내과학교실

A Study of the Effectiveness of *Hwanggeum-tang* and *Gamchosasim-tang* in the Mice Model of Inflammatory Bowel Disease

Young-kwang Kim, Young-ho Moon
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives: This study investigates the mechanism of *Hwanggeum-tang* (HGT) and *Gamchosasim-tang* (GST) on inflammatory bowel disease (IBD).

Methods: The mice (C57BL/6N) were treated with distilled water and 3% dextran sulfate sodium (DSS) to experimentally induce ulcerative colitis. The mice were divided into 7 groups of (6 mice: normal, negative control, positive control (with sulfasalazine), 4 experimental groups (with HGT and GST, respectively). RAW 264.7 cells were used for cell experiments. The experiment was conducted in two ways: in vitro and in vivo.

Results: In the experimental group (HGT, GST) of in vitro experiments, NO production decreased, and significant changes in gene expression and protein activation were observed.

The length of the colon recovered in the experimental groups (HGT, GST) of the in vivo experiment was longer than that of the negative control group, and the mucosal barrier was recovered. Some significant changes in the amount of mRNA expression were partially observed, and significant changes in protein activation also were confirmed.

Conclusions: HGT and GST are effective in treating IBD caused by DSS. In the same herbal preparation group, the higher the concentration, the better the experimental effect, and when the same concentration was tested, HGT was more effective than GST. Herbal medicine has a higher antioxidant effect than sulfasalazine, so it is also excellent for cell protection.

Key words: *Hwanggeum-tang*, *Gamchosasim-tang*, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, dextran sulfate sodium

1. 서 론

궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC) 및 크론병(Crohn's Disease, CD)으로 나눌 수 있는 염증성

장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 위장관 전체와 장점막에 만성적으로 호전과 악화를 반복하는 염증이 다양한 영향을 주면서, 대장암의 발병 위험률을 상승시키는 것을 특징으로 한다¹.

궤양성 대장염의 원인은 명확하지는 않으며, 여러 가지 요인들이 추정되고 있다. 환경적, 유전적 요인, 정신적 요인, 장의 면역기능 이상, 장내 미생물의 감염 등의 요인이 있다. 하지만 최근의 연구에서는 환경적인 인자들에 의해 장내 정상 세균총이 변화하면서 장 점막 면역계가 장내 유해미생물에 대한 내성

- 투고일: 2021.05.27, 심사일: 2021.07.05, 게재확정일: 2021.07.05
- 교신저자: 문영호 전라남도 나주시 교육길 14
나주동신대학교한방병원 2진료실
TEL: 061-338-7812 FAX: 061-338-7888
E-mail: doc4you@hanmail.net
- 이 논문은 2021학년도 동신대학교 대학원 한의학 박사학위논문임.

을 잃어버리고 비정상적 활성화가 되면서 장 점막 조직에 염증반응을 발생시킨다고 보고된 바가 있다².

궤양성 대장염의 치료 목표는 장 점막의 염증을 감소시키고 관해를 유도하여 환자의 삶의 질을 증가시키는 것이다³. 요즘의 표준 약물 치료제로 면역조절약물, 스테로이드, 5-aminosalicylic acid(5-ASA)를 사용하지만 환자의 20~40% 정도는 약물치료에 실패하며 부작용으로 대장절제술에 이르는 경우도 있다⁴. 이에 한약제제를 염증성 장 질환의 치료 대체제로 활용하는 연구가 증가하고 있는 추세이다⁵. 한약제제를 활용한 임상연구로는 궤양성 대장염 환자에 平胃地榆湯加味方⁶, 芍藥湯加味方⁷을 사용하여 치료효과에 대한 연구 등이 있고, 동물실험연구로는 桂枝加龍骨牡蠣湯⁸, 紫金錠⁹, 烏梅丸¹⁰, 육계·시호 복합추출물¹¹ 등이 있으며, 이를 이용하여 염증 억제 회복 효능을 보고하였다.

黃芩湯과 甘草瀉心湯의 주요 약재인 黃芩과 甘草가 염증반응에 효과적이라는 것이 보고되어 있다^{12,13}. 또한, 黃芩湯은 임상적으로 주로 하부 위장관 증상(설사, 이질)이 있을 때 사용하는 처방이고 甘草瀉心湯은 상부 위장관 증상(惡心, 心下痞硬)과 하부 위장관 증상(설사)이 병발되어 있을 때 사용하는 처방이다¹⁴.

또한, 甘草瀉心湯은 구강 및 음부에 궤양이 생기는 베체트병(Behcet's disease)에도 사용할 수 있는 처방이어서¹⁵, 甘草瀉心湯 역시 하부 위장관 질환인 염증성 장 질환에도 적용할 수 있을 것이라는 생각을 하였다.

이에 저자는 黃芩湯과 甘草瀉心湯이 염증성 장 질환(궤양성 대장염)에 효과가 있을 것으로 판단하여, Dextran sulfate sodium(DSS)으로부터 유발된 궤양성 대장염 동물 모델에 黃芩湯과 甘草瀉心湯을 투여한 후, NO 생성량, 대장 길이, 유전자 및 단백질 활성화의 측정, 조직 염색 및 관찰을 하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 시 료

본 동물 모델 실험에서 사용한 황금탕(*Hwanggeum-tang*, 이하 HGT로 표기)과 감초사심탕(*Gamchosasim-tang*, 이하 GST로 표기)은 동신대학교 목포 한방병원(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 HGT와 GST의 구성은 아래 Table 1과 같다.

Table 1. The Amount and Composition of *Hwanggeum-tang* (HGT) and *Gamchosasim-tang* (GST)

Herbal name	Scientific name	Dose (g)
<i>Scutellariae Radix</i> (黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	6
<i>Zyzyphi Fructus</i> (大棗)	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	8
<i>Paenoniae Radix</i> (白芍藥)	<i>Paenonia japonica</i>	4
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4
Total		22
Herbal name	Scientific name	Dose (g)
<i>Pinelliae Tuber</i> (半夏)	<i>Pinellia ternata</i> Breitenbach	5
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	8
<i>Scutellariae Radix</i> (黃芩)	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	6
<i>Ginseng Radix</i> (人蔘)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	6
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (乾薑)	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	6
<i>Zyzyphi Fructus</i> (大棗)	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	8
<i>Coptidis Rhizoma</i> (黃連)	<i>Coptis japonica</i> Makino	2
Total		41

HST 처방 220 g(10접 분량)과 1.5 L의 물, 그리고 GST 처방 410 g(10접 분량)과 2.5 L의 물을 전기약탕기(대웅, Korea)에서 2시간 가열 추출한 후 여과한 다음 HST와 GST를 분말화 하기 위해 freeze dryer(ilshin biobase, Korea)를 이용하여 72시간 동안 동결건조를 진행하였다(HGT 수율 : 14.18%, GST 수율 : 28.23%).

2) 시 약

사용된 시약은 dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.), Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM : Gibco, U.S.A.), penicillin-streptomycin(Sigma, U.S.A.), trypan blue(Sigma, U.S.A.), trypsin-EDTA solution (Welgene, Korea), lipopolysaccharide(Sigma, U.S.A.), NO assay kit(Intronbio, Korea), EZ-cytox(Daeilab, Korea), dexamethasone(Sigma, U.S.A.), accupower cyclescript RT premix(Bioneer, Korea), total RNA prep kit(Intronbio, Korea), SYBR Green(Qiagen, Germany), DEPC-DW(Bioneer, Korea), mouse IL-6 ELISA kit(Komabiotech, Korea), mouse IL-1 β ELISA kit(Komabiotech, Korea), mouse TNF- α (Komabiotech, Korea), pierceTM BCA protein assay Kit(Thermo Fisher, U.S.A.), RIPA lysis and extraction buffer(Thermo Fisher, U.S.A.), protease inhibitor cocktail 1·2·3(Sigma, U.S.A.), bovine serum albumin (BSA : Gendepot, U.S.A.), miracle-starTM western blot detection system(Intron Biotechnology, Korea), Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP[®] Rabbit mAb(Cell signaling, U.S.A.), p44/42 MAPK(Erk1/2)(137F5) Rabbit mAb(Cell signaling, U.S.A.), SAPK/JNK Antibody(Cell signaling, U.S.A.), Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185)(G9) Mouse mAb(Cell signaling, U.S.A.), Phospho-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)(D3F9) XP[®] Rabbit mAb (Cell signaling, U.S.A.), p38 MAPK Antibody(Cell signaling, U.S.A.), peroxidase-conjugated affininpure rabbit anti-goat IgG(Jackson immunoresearch, U.S.A.),

peroxidase-conjugated affininpure goat anti-mouse IgG(H+L)(Jackson immunoresearch, U.S.A.), 4% formaldehyde(Sigma, U.S.A.) 등을 사용하였다.

3) 기 기

본 동물 모델 실험에 사용된 기기는 freeze dryer (ilshin biobase, Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA FDU-540, Japan), CO₂ incubator(Sanyo, Japan), autoclave(Sanyo, Japan), clean bench(Vision scientific, Korea), vortex mixer(Vision scientific, Korea), deep-freezer(Sanyo, Japan), centrifuge(Hanil, Korea), ice-maker(Brema, Australia), micro plate reader(Molecular Devices, U.S.A.), plate shaker(Lab-Line, U.S.A.), nanodrop(Thermo Fisher, U.S.A.), real time PCR(Qiagen, Germany), alpha cyclor 1 PCRmax (PCRmax, U.K.), mini trans-Blot[®](Bio-RAD, U.S.A.), fursion FX(Vilber, U.S.A.)등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 세포배양

RAW 264.7 cells은 10% fetal bovine serum과 DMEM 배지(1% penicillin-streptomycin으로 조성)를 이용하여 5% CO₂ 37 °C 조건으로 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고, 2-3일을 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

2) Nitric Oxide(NO) 생성량 측정

RAW 264.7 cells을 24 well plate에 4×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 50, 100, 200 μ g/ml 농도의 HGT와 GST를 처리하고 2시간 후, 100 ng/ml의 LPS를 하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후 96 well plate 위에 세포배양액 100 μ l를 투여하고 N1 buffer 50 μ l를 추가하여서 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 N2 buffer 50 μ l를 추가하여서 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응 이후, 540 nm 조건에서 흡광도 변화를 측정하였고, 대조군에 대한 NO 생성량을 백분율로 표기하였다.

3) 동물 및 사료

본 동물 모델 실험을 위해 사용된 C57BL/6N

mouse(5주령, 수컷, 20~25 g)은 라온바이오(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 1주 정도의 안정기를 거치면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험기간 동안 모든 실험군에는 충분한 고형사료와 물을 충분히 공급하였다. 안정기 이후 6주령부터 1주간 동물 실험을 진행하였다. 동물 사육실은 conventional system 조건으로 하루 24시간 중 12시간은 200-300 Lux로 조명을 비추고, 12시간은 모든 빛을 차단하였고 온도는 22 ± 2 °C를 유지하였다. 본 동물 모델 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다(승인번호 DJUAR2020-022).

4) 대장염 유발 및 시료처리

아무것도 처치하지 않는 정상군, 증류수만을 경구 투여하는 음성대조군, sulfasalazine 30 mg/kg/day로 투여하는 양성대조군, HGT와 GST를 200, 400 mg/kg/day로 투여하는 4개의 실험군 등 총 7개의 군으로 군당 6마리씩 나누어 매일 1회, 오전 10시에 200 μ l씩 oral zonde를 사용하여 7일 동안 경구 투여하였다. 경구투여가 진행되는 동안 정상군을 제외한 6개의 실험그룹에는 3% dextran sulfate sodium(DSS) 수용액을 공급하였으며, 1주일간의 투여가 종료된 이후 ethyl ether로 마취하여 심장천자법으로 채혈하였다. 시료의 투여량은 성인 체중 1 kg에 200, 400 mg으로 기준삼아 계산한 후, mouse의 체중에 비례하여 산출하였다.

5) 대장 조직 분리

1주간의 경구 투여가 종료된 이후, ethyl ether를 이용하여 실험동물을 마취 및 심장 천자법으로 채혈한 후 대장조직을 분리하여 길이를 바로 측정하였다. 이후 조직을 잘라 조직염색용 검체는 4% 포르말린에 담가 보관하였고 유전자 및 단백질 활성화 측정용 검체는 초저온 냉동고(-80 °C)에 보관하였다.

6) 유전자 발현량 측정

(1) RNA 추출

세포와 대장조직에 easy blue 1 ml, chloroform

200 μ l를 투여하고 vortexing 해준 이후, 13000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리 하였다. binding buffer 400 μ l와 상층액 400 μ l를 1분 동안 실온에서 반응시킨 뒤 반응액 700 μ l를 column에 주입한 후, 13000 rpm조건에서 30초 동안 원심분리 하였다. Column안에 washing buffer A를 700 μ l 투여하고 13000 rpm 조건에서 30초 동안 원심분리 후, washing buffer B를 700 μ l 투여하고 동일하게 원심분리 하였다. Column의 하단부분을 1.5 ml tube로 교체한 후에, column에 elution buffer를 30 μ l 투입한 뒤 1분 동안 반응시키고 나서 13000 rpm 조건에서 원심분리를 1분 동안 진행하여 total RNA를 추출하였다.

(2) cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture(oligo dT15 primer, stabilizer, reaction buffer, RNase inhibitor, dNTPs mixture) total RNA를 1 μ g 넣고 DEPC-DW의 최종 부피가 20 μ l가 되도록 첨가하였다. 이 혼합액을 잘 섞은 후에, 45 °C 조건에서 60분 동안 반응시켜서 first-strand cDNA를 합성하였다. 이후, 95 °C에서 5분 동안 방치한 뒤 M-MLV RT를 불활성화 시켜서 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

(3) 유전자 증폭

합성 완료된 cDNA의 증폭을 위하여 real-time PCR을 진행하였고, 이후 real-time 전용 tube에 각 primer 2 μ l, cDNA 1 μ l, DEPC-DW 5 μ l, SYBR Green 10 μ l씩 넣어 95 °C 조건에서 2분간 반응시키고 다음 95 °C 조건에서 5초, 62.5 °C조건에서 30초씩 40회 반복하여 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 대조군에 대한 비율로 계산하였으며, 사용된 primer의 sequences는 Table 2와 같다.

Table 2. The Sequences of Primers

Primer	F/R*	Sequences
<i>PTGS2</i>	F	AACCGCATTGCCTCTGAAT
	R	CATGTTCCAGGAGGATGGAG
<i>NOS2</i>	F	CGAAACGCTTCACTTCCAA
	R	TGAGCCTATATTGCTGTGGCT
<i>IL1B</i>	F	AAGAAGAGCCCATCCTCTGT
	R	GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
<i>IL6</i>	F	AGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
	R	GGTCTTGGTCCTTAGCCACT
<i>TNFA</i>	F	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT
	R	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
<i>IL10</i>	F	GCTCTTGCACTACCAAAGCC
	R	CTGCTGATCCTCATGCCAGT
<i>HPGD</i>	F	CTTCGAAGCACGGCATCATC
	R	TCCACAAAGCCTGGGCAAAT
<i>NQO1</i>	F	TCGCCATTTTCTTCGGGGCTA
	R	TGAGCAATTCCCTTCTGCCC
<i>HO1</i>	F	ATGGCGTCACTTCGTCAGAG
	R	GCTGATCTGGGGTTTCCCTC
<i>NFE2L2</i>	F	AACAGAACGGCCCTAAAGCA
	R	TGGGATTACGCATAGGAGC
<i>ACTB</i>	F	AGGGAAATCGTGCGTGACAT
	R	TCCAGGGAGGAAGAGGATGC

* F : forward, R : reverse

7) 단백질 활성화 측정

세포와 대장조직에 phosphatase inhibitor II · III, protease inhibitor cocktail I 이 포함된 RIPA buffer 를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 pierce BCA protein assay kit를 사용하여 정량화 하였으며, sample loading buffer와 섞어서 95 °C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 이용해 SDS-PAGE하여 크기별로 분리한 뒤, PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 3% BSA에 담아 2 시간 동안 상온에서 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 3번 세척하고 ERK(1 : 1000), p-ERK (1 : 1000), p38(1 : 1000), p-p38(1 : 1000), JNK (1 : 1000), p-JNK(1 : 1000), β -actin(1 : 1000)

first antibody를 넣어 4 °C에서 14시간 동안 반응시켰다. 다시 3회 세척하고 난 후 secondary antibody (1 : 10000)를 투여하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 이후, 다시 10회 세척하고 ECL solution을 통하여 단백질을 발색시켰다. 발색 후, chemidoc fusion FX를 사용하여 단백질 활성화도를 분석하였다.

8) 조직염색 및 관찰

4% 포르말린에 담가 고정시킨 대장조직을 PBS로 세척한 후, 알코올 탈수 및 파리핀 포매 후 파리핀 불력을 5 μ m의 두께로 연속 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 관찰하였다.

3. 통계처리

동물 모델 실험 결과는 mean $\pm$ standard error of mean으로 표기하였으며, SPSS Statistics Version 21.0(IBM, New York, United States) 통계프로그램을 이용하였다. 우선 두 그룹 간의 통계적 비교는 independent sample t-test를 사용하여 수행하였고 여러 그룹 간의 통계적 비교는 analysis of variance(ANOVA)를 사용하여 수행하였으며, Tukey's HSD test를 통해 유의수준 0.05으로 설정하여 유의성을 검정하였으며, p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 총 3가지 유의수준으로 나누어 표기하였다.

III. 실험 결과

1. In vitro 실험 결과

1) NO 생성량

HGT와 GST는 50 μ g/ml 이상의 농도조건에서 NO 생성량이 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001) (Table 3, Fig. 1).

Table 3. Effect of HGT and GST on NO Level in RAW 264.7 Cells

Concentration (μg/ml)		Nitric oxide level (uM)
Normal		1.88±0.51
Control		14.15±0.67
HGT	50	12.21±0.24*
	100	9.48±0.09**
	200	7.62±0.17***
GST	50	12.24±0.11
	100	8.30±0.12
	200	8.00±0.23

Fig. 1. Effect of HGT and GST on NO level in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells : treated 50, 100, and 200 μg/ml of HGT and GST with 100 ng/ml LPS for 24 h. NO level were calculated as percentage relative to the control. The results : presented by the mean ±S.D from 3 independent experiments (Significance of results - ### : p<0.001 compared to normal, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

2) 유전자 발현량

(1) 염증 관련 인자

① *PTGS2*

PTGS2 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 100 μg/ml, GST는 200 μg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(** : p<0.01, *** : p<0.001)(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Effect of HGT and GST on mRNA (*PTGS2*, *NOS2*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA*, *IL10*, *HPGD*, *NQO1*, *HO1*, *NFE2L2*) Expression Level in RAW 264.7 Cells

Concentration (μg/ml)	mRNA fold change									
	<i>PTGS2/ACTB</i>	<i>NOS2/ACTB</i>	<i>IL1B/ACTB</i>	<i>IL6/ACTB</i>	<i>TNFA/ACTB</i>	<i>IL10/ACTB</i>	<i>HPGD/ACTB</i>	<i>NQO1/ACTB</i>	<i>HO1/ACTB</i>	<i>NFE2L2/ACTB</i>
Normal	0.03±0.01	0.38±0.02	0.10±0.05	0.03±0.00	0.18±0.02	2.46±0.12	2.41±0.14	3.15±0.11	0.19±0.01	3.36±0.27
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
HGT	50	0.95±0.06	1.00±0.06	0.83±0.03*	0.81±0.07*	1.02±0.07	1.05±0.05	1.01±0.08	1.10±0.19	0.98±0.07
	100	0.77±0.02**	0.80±0.09*	0.75±0.01***	0.64±0.04*	0.83±0.06*	1.16±0.03*	1.27±0.18	1.22±0.07*	0.98±0.07
	200	0.38±0.07***	0.43±0.05***	0.65±0.03***	0.46±0.07***	0.60±0.03***	1.28±0.02**	1.41±0.11*	1.74±0.07**	2.22±0.10***
GST	50	1.03±0.07	1.02±0.02	0.82±0.04*	1.00±0.01	1.06±0.08	1.01±0.01	0.98±0.07	0.95±0.10	0.96±0.03
	100	0.98±0.06	0.86±0.03**	0.74±0.06**	0.76±0.01**	0.95±0.02	1.04±0.04	1.01±0.10	1.06±0.02	1.00±0.07
	200	0.69±0.06**	0.56±0.06***	0.63±0.04***	0.59±0.02***	0.88±0.03*	1.10±0.04*	1.04±0.05	1.08±0.06	1.17±0.08*

Fig. 2. Effect of HGT and GST on mRNA (*PTGS2*, *NOS2*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA*, *IL10*, *HPGD*, *NQO1*, *HO1*, *NFE2L2*) expression level in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells : treated 50, 100, and 200 µg/ml of HGT and GST with 100 ng/ml LPS for 24 h. NO level were calculated as percentage relative to the control. The results : presented by the mean±S.D from 3 independent experiments (Significance of results - ### : p<0.001 compared to normal, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

② NOS2

NOS2 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT와 GST는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

③ IL1B

IL1B 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT와 GST는 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

④ IL6

IL6 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 50 µg/ml, GST는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

⑤ TNFA

TNFA 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 100 µg/ml, GST는 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

(2) 항염증 관련 인자

① IL10

IL10 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 100 µg/ml, GST는 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)(Table 4, Fig. 2).

② HPGD

HPGD 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타나지 않았다(* : $p<0.05$)(Table 4, Fig. 2).

(3) 항산화 효소

① NQO1

NQO1 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하

여 유의한 증가가 나타나지 않았다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)(Table 4, Fig. 2).

② HO1

HO1 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT와 GST는 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났다(* : $p<0.05$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

③ NFE2L2

NFE2L2 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타나지 않았다(** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 4, Fig. 2).

3) 단백질 활성화

(1) 염증 활성화 효소

① COX-2

COX-2 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT와 GST는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

② STAT3

STAT3 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT는 200 µg/ml, GST는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

(2) MAPK(mitogen-activated protein kinase)

① ERK

ERK 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT와 GST는 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(*** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

② JNK

JNK 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT와 GST는 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(*** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

③ P38

P38 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT와 GST는 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타났다(*** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

(3) 항산화효소

① HO-1

HO-1 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT는 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유

의한 증가가 나타나지 않았다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

② NRF2

NRF2 단백질 활성화를 측정한 결과, HGT는 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타나지 않았다(*** : $p<0.001$)(Table 5, Fig. 3).

Table 5. Effect of HGT and GST on Protein (COX-2, STAT3, ERK, JNK, P38, HO-1, NRF2) Expression Level in RAW 264.7 Cells

Concentration (µg/ml)	Protein fold change						
	COX-2/ β-actin	p-STAT3/ STAT3	p-ERK/ ERK	p-JNK/ JNK	p-P38/ P38	HO-1/ β-actin	NRF2/ β-actin
Normal	0.43±0.00	0.42±0.00	0.48±0.00	0.32±0.00	0.60±0.01	0.36±0.01	1.70±0.01
Control	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.01	1.00±0.02
HGT	50	1.00±0.01	1.06±0.03	0.63±0.01***	1.05±0.01	0.41±0.00***	1.08±0.03*
	100	0.41±0.00***	1.06±0.00	0.62±0.01***	0.53±0.01***	0.28±0.01***	1.06±0.02**
	200	0.24±0.01***	0.18±0.01***	0.45±0.01***	0.26±0.01***	0.19±0.00***	1.12±0.01***
GST	50	1.09±0.01	1.02±0.03	0.66±0.03***	1.03±0.01	0.44±0.01***	1.00±0.02
	100	0.73±0.02**	0.81±0.07*	0.65±0.02***	0.37±0.01***	0.40±0.02***	1.01±0.03
	200	0.43±0.01***	0.53±0.04**	0.37±0.02***	0.33±0.03***	0.35±0.00***	1.07±0.02

염증성 장 질환 동물 모델에서 황금탕과 감초사심탕의 효능 연구

Fig. 3. Effect of HGT and GST on protein (COX-2, STAT3, ERK, JNK, P38, HO-1, NRF2) expression level in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells : treated 50, 100, and 200 µg/ml of HGT and GST with 100 ng/ml LPS for 24 h. NO level were calculated as percentage relative to the control. The results : presented by the mean±S.D from 3 independent experiments (Significance of results - ### : p<0.001 compared to normal, * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 compared to control).

2. In vivo 실험 결과

1) 대장 조직 길이

대장 조직의 길이를 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군, GST는 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가가 나타났다(** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$)(Table 6, Fig. 4).

Table 6. Effect of HGT and GST on Colon Length in DSS-induced Colitis Model

Concentration (mg/kg)	Colon length (cm)
Normal	9.93±0.14
Control	7.48±0.50
Sulfasalazine 30	9.25±0.43***
HGT 200	8.87±0.76**
HGT 400	8.92±0.39***
GST 200	7.22±0.81
GST 400	8.70±0.64***

Fig. 4. Effect of HGT and GST on colon length in DSS-induced colitis model.

The result were presented by the mean±S.D (Significance of results - ### : $p<0.001$ compared to normal, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$ compared to control) (n=6). A : data graphic image, B : photograph image

2) 조직학적 분석

조직학적 분석을 진행한 결과, 정상군에서 표면 상피 및 점막층이 정상적인 형태를 유지하고 있으며, 대조군에서는 DSS로 인해 조직의 심각한 손상이 관찰되었고 대장점막에 전반적으로 염증세포가 침윤되어 있었다. 하지만 HGT 모든 투여군과 GST

400 mg/kg 투여군에서는 대조군과 비교했을 때 일부 손상되지 않은 표면 상피와 점막층이 관찰되었고 염증세포의 침윤도 감소하여 대장점막조직이 보호되었음을 관찰할 수 있었다. 다만 GST 200 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 완화된 부분이 관찰되지 않았다(Fig. 5).

Fig. 5. Representative colon sections stained with hematoxylin & eosin (H&E).

Magnifications : $\times 100$

3) 유전자 발현량

(1) 염증 관련 인자

① *PTGS2*

PTGS2 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 400 mg/kg 투여군에서 유의한 감소가 나타났다(* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$) (Table 7, Fig. 6).

② *NOS2*

NOS2 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군, GST는 400 mg/kg 투

여군에서 유의한 감소가 나타났다(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) (Table 7, Fig. 6).

③ *IL1B*

IL1B 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT 400 mg/kg 투여군에서 유의한 감소가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타나지 않았다(* : $p < 0.05$) (Table 7, Fig. 6).

④ *IL6*

IL6 유전자 발현량을 측정한 결과, HGT와 GST는 모든 투여군에서 대조군에 비하여 유의한 감소

가 나타나지 않았다(Table 7, Fig. 6).

⑤ *TNFA*

TNFA 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군, GST는 400 mg/kg 투여군에서 유의한 감소가 나타났다(* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$)(Table 7, Fig. 6).

(2) 항염증 관련 인자

① *IL10*

IL10 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 모든 투여군에서 유의한 증가가 나타나지 않았다(Table 7, Fig. 6).

② *HPGD*

HPGD 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 증

가가 나타나지 않았다(* : $p<0.05$)(Table 7, Fig. 6).

(3) 항산화효소

① *NQO1*

NQO1 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가가 나타났다(* : $p<0.05$)(Table 7, Fig. 6).

② *HO1*

HO1 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 모든 투여군에서 유의한 증가가 나타나지 않았다(Table 7, Fig. 6).

③ *NFE2L2*

NFE2L2 유전자 발현량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 모든 투여군에서 유의한 증가가 나타나지 않았다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. Effect of HGT and GST on mRNA (*PTGS2*, *NOS2*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA*, *IL10*, *HPGD*, *NQO1*, *HO1*, *NFE2L2*) Expression Level in DSS-induced Colitis Model

Concentration (mg/kg)	mRNA fold change									
	<i>PTGS2</i> / <i>ACTB</i>	<i>NOS2</i> / <i>ACTB</i>	<i>IL1B</i> / <i>ACTB</i>	<i>IL6</i> / <i>ACTB</i>	<i>TNFA</i> / <i>ACTB</i>	<i>IL10</i> / <i>ACTB</i>	<i>HPGD</i> / <i>ACTB</i>	<i>NQO1</i> / <i>ACTB</i>	<i>HO1</i> / <i>ACTB</i>	<i>NFE2L2</i> / <i>ACTB</i>
Normal	0.16± 0.04	0.13± 0.08	0.10± 0.05	0.03± 0.00	0.18± 0.02	2.46± 0.12	2.41± 0.14	3.15± 0.11	0.19± 0.01	3.36± 0.27
Control	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00
Sulfasalazine 30	0.38± 0.05***	0.59± 0.02***	0.83± 0.03*	0.81± 0.07*	1.02± 0.07	1.05± 0.05	1.01± 0.08	1.10± 0.19	0.98± 0.07	0.97± 0.07
HGT 200	1.00± 0.06	0.85± 0.02*	0.75± 0.01***	0.64± 0.04**	0.83± 0.06*	1.16± 0.03*	1.27± 0.18	1.22± 0.07*	0.98± 0.07	1.19± 0.04**
HGT 400	0.57± 0.01***	0.72± 0.04**	0.65± 0.03***	0.46± 0.07***	0.60± 0.03***	1.28± 0.02**	1.41± 0.11*	1.74± 0.07**	2.22± 0.10***	1.50± 0.04***
GST 200	0.99± 0.03	0.98± 0.05	0.82± 0.04*	1.00± 0.01	1.06± 0.08	1.01± 0.01	0.98± 0.07	0.95± 0.10	0.96± 0.03	0.99± 0.07
GST 400	0.82± 0.02*	0.88±0.03*	0.74± 0.06**	0.76± 0.01**	0.95± 0.02	1.04± 0.04	1.01± 0.10	1.06± 0.02	1.00± 0.07	1.01± 0.04

Fig. 6. Effect of HGT and GST on mRNA (*PTGS2*, *NOS2*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA*, *IL10*, *HPGD*, *NQO1*, *HO1*, *NFE2L2*) expression level in DSS-induced colitis model.

The results : presented by the mean±S.D (Significance of results - ### : $p < 0.001$ compared to normal, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to control) (n=6).

4) 단백질 활성화

(1) 염증 활성화 효소

① COX-2

COX-2 단백질 활성화를 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군에서 유의한 감소가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 감소가 나타나지 않았다(*** : $p < 0.001$)(Table 8, Fig. 7).

② STAT3

STAT3 단백질 활성화를 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군에서 유의한 감소가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 감소가

나타나지 않았다(*** : $p < 0.001$)(Table 8, Fig. 7).

(2) 항산화효소

① HO-1

HO-1 단백질 활성화를 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT와 GST는 모든 투여군에서 유의한 증가가 나타났다(*** : $p < 0.001$)(Table 8, Fig. 7).

② NRF2

NRF2 단백질 활성화를 측정한 결과, 대조군에 비하여 HGT는 모든 투여군에서 유의한 증가가 나타났으며, GST는 대조군에 비하여 유의한 증가가 나타나지 않았다(*** : $p < 0.001$)(Table 8, Fig. 7).

Table 8. Effect of HGT and GST on Protein (COX-2, STAT3, HO-1, NRF2) Expression Level in DSS-induced Colitis Model

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Protein fold change			
	COX-2/ β -actin	p-STAT3/STAT3	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK
Normal	0.43 $\pm$ 0.00	0.42 $\pm$ 0.00	0.48 $\pm$ 0.00	0.32 $\pm$ 0.00
Control	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01
HGT	50	1.00 $\pm$ 0.01	1.06 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.01***
	100	0.41 $\pm$ 0.00***	1.06 $\pm$ 0.00	0.62 $\pm$ 0.01***
	200	0.24 $\pm$ 0.01***	0.18 $\pm$ 0.01***	0.45 $\pm$ 0.01***
GST	50	1.09 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.03***
	100	0.73 $\pm$ 0.02**	0.81 $\pm$ 0.07*	0.65 $\pm$ 0.02***
	200	0.43 $\pm$ 0.01***	0.53 $\pm$ 0.04**	0.37 $\pm$ 0.02***

Fig. 7. Effect of HGT and GST on protein (COX-2, STAT3, HO-1, NRF2) expression level in DSS-induced colitis model.

The results : presented by the mean±S.D (Significance of results - ### : $p < 0.001$ compared to normal, *** : $p < 0.001$ compared to control) (n=6).

Ⅳ. 고 찰

서구화되는 한국인의 식생활 습관으로 인해 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)에 해당하는 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)과 크론병(Crohn's Disease, CD)이 증가하고 있다¹⁶.

건강보험심사평가원에 따르면 2009년에서 2016년까지 궤양성 대장염 발병률은 10만 명 당 3.98명에서 5.27명(남성 3.13명 · 여성 2.14명)으로 32% 증가했다. 유병률은 궤양성 대장염이 10만 명 당 41.41명에서 65.95명(남성 38.27명 · 여성 27.7명)으로 59% 증가했다¹⁷. 또한 보건의료빅데이터개방시스템에서 제공하는 자료에 따르면 국내에서 궤양성 대장염(K51)으로 진료받은 환자 수는 2015년 35,623명에서 2019년 46,681명으로 31% 증가한 추세를 보여주고 있다¹⁸.

궤양성 대장염은 주 증상으로 혈변과 설사가 발생하며, 점액변, 변실금, 이급후증, 복통 등이 나타난다. 이와 더불어 식욕부진, 피로감, 체중감소 등의 전신증상이 동반되는 만성적인 경과로 진행되는 것이 특징이다. 한의학에서는 腹痛, 積聚, 便血, 腸風, 腸毒, 腸澼, 休息痢, 久痢, 久瀉 등의 범주에 해당한다고 볼 수 있다¹⁹. 임상에서는 虛實證으로 구분하여 脾虛阻滯, 脾腎陽虛, 肝鬱脾虛, 陰血虧損, 氣滯血瘀, 濕熱內蘊 등의 변증을 하여 치료하고 있다²⁰.

염증성 장 질환의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않는으나, 유전적 취약성을 지닌 환자에게서 외부요인(정상 상재균, 감염체)과 숙주요인(장 상피세포 방어기능, 신경활성도, 혈류공급)이 환경요인(흡연 등)과 함께 작용하여 만성적으로 점막의 면역반응 이상을 초래하는 것으로 설명되고 있다²¹.

면역학적 요인으로서는 선천성, CD4+ T cell의 활성화, cytokine의 생성 등이 있고, 현재는 cytokine의 면역 및 염증반응의 조절기능에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다²². CD4+ T는 3가지(Th1, Th2, Th17)인데, 그 중 Th2는 IL-6, TNF를 발생시켜 케양성 장 질환을 일으킨다. 또한 Th1 cytokine pathway는 점막에 염증을 발생시키는 실험모델에서 중요하게 사용되는 cytokine인 IL-12를 통해 유도된다²³.

현재 사용하고 있는 치료제로는 스테로이드 제제, sulfasalazine, mesalazine 등의 5-aminosalicylic acid(5-ASA) 제제가 사용되고 있으며, 스테로이드 제제에 반응하지 않는 경우 cyclosporin, 6-mercaptopurine, azathioprine 등의 면역억제제도 사용되고 있으나 완치를 기대할 수 있는 약물은 없는 실정이다²⁴. 또한 이러한 약제들의 사용은 질병의 재발 가능성이 높기 때문에 sulfasalazine, mesalazine 등의 관해 유도가 확인된 약제의 장기투여를 통해 재발을 방지해야 하는 경우도 있다. 그러나 이러한 장기간의 약제 투여는 구역, 구토, 피부 부작용 등 여러 부작용을 일으킬 수 있으며, 심한 경우 약제의 내성까지도 생길 수 있다²⁵. 따라서 케양성 대장염에 대한 보다 안전하고 유효성이 높은 치료제의 개발이 요구되고 있는 상황이며, 전통적인 한약이 이러한 치료제의 대안으로 각광받고 있다²⁶.

黃芩湯은 張仲景의 《傷寒論》에 처음 수록되어 있는 처방으로 黃芩, 芍藥, 甘草, 大棗로 구성되어 있다. 熱證의 下痢증상이 있을 때 주로 사용할 수 있다. 또한 黃芩은 黃芩湯의 君藥으로 열을 없애는 작용에 사용되는 약제이다¹⁴. 甘草瀉心湯 역시 張仲景의 《傷寒論》에 수록되어 있는 처방으로 甘草, 黃芩, 半夏, 大棗, 黃連, 乾薑으로 구성되어 있으며, 오목가슴 부위가 답답하며, 무언가가 차있는 느낌이 들면서, 무른 변의 증상과 함께 입맛이 저하될 때 사용할 수 있는 처방이다¹⁴.

서론에서 언급한 黃芩과 甘草의 항염증 효능과 黃芩湯과 甘草瀉心湯이 하부 위장관 질환에 작용

할 수 있다는 점에 착안하여 黃芩湯과 甘草瀉心湯이 염증이 발생한 대장의 회복에 효과가 있을 것이라 가정하였다. 이에 본 연구에서는 DSS로 케양성 대장염이 유발된 쥐에 黃芩湯 및 甘草瀉心湯 추출물을 투여하여 in vitro 실험을 통해 NO 생성 억제 효과, 유전자 발현량의 유의한 변화(염증 관련 인자의 감소, 항염증 관련 인자의 증가, 항산화 효소의 증가), 단백질 활성화의 유의한 변화(염증 활성화 효소의 감소, MAPK의 감소, 항산화효소의 증가)를 살펴보았다. 또한 in vivo 실험을 통해, 대장 길이의 회복, 조직학적 변화, 일부 유전자 발현량의 유의한 변화(염증 관련 인자의 감소, 항염증 관련 인자의 증가, 항산화효소의 증가), 일부 단백질 활성화의 유의한 변화(염증 활성화 효소의 감소, 항산화효소의 증가)를 살펴보았다.

In vitro 실험에서 NO 생성량은 HGT와 GST 모두 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 유의한 감소가 나타났다. NO는 면역세포를 포함한 다양한 세포들로부터 L-arginine의 guanidine group으로 합성된다²⁷. 또한 다양한 염증반응이 체내에서 일어나면 NO의 생성이 증가하여 조직의 손상에 영향을 준다^{28,29}.

유전자 발현량 검사 항목은 3가지 category(염증 관련 인자, 항염증 관련 인자, 항산화 효소)로 분류할 수 있다. 염증 관련 인자로 *PTGS2*(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), *NOS2*(Nitric oxide synthase 2), *IL1B*(Interleukin-1β), *IL6*(Interleukin-6), *TNFA*(Tumor necrosis factor-α)가 있고, 항염증 관련 인자로 *IL10*(Interleukin-10), *HPGD*(Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase)가 있으며, 항산화 효소로는 *NQO1*(NAD(P)H quinone oxidoreductase), *HO1*(Heme oxygenase-1), *NFE2L2*(Nuclear factor erythroid 2-like 2)가 있다.

염증 관련 인자들 중 *PTGS2*, *TNFA*는 HGT 100 µg/ml, GST 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났고, *NOS2*는 HGT와 GST 모두 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다. *IL1B*

는 HGT와 GST 모두 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났고, *IL6*은 HGT 50 µg/ml, GST 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다. 항염증 관련 인자들 중 *IL10*는 HGT 100 µg/ml, GST 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났고, *HPGD*는 HGT 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만 GST는 대조군에 비해 유의적인 증가가 나타나지 않았다. 항산화효소들 중 *HO1*는 HGT와 GST 모두 200 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났고, *NQO1*, *NFE2L2*는 HGT 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만 GST는 대조군에 비해 유의적인 증가가 나타나지 않았다. 이를 통해 염증 관련 인자들의 감소, 항염증 관련 인자들의 증가, 항산화효소의 증가를 알 수 있다.

*PTGS-2*는 염증과 통증을 유발하는 물질을 형성하는 효소로 *COX-2*(Cyclooxygenase-2)라고 불리기도 한다. 이것은 LPS(Lipopolysaccharide), *TNF-α*, *IL-1β* 등의 자극에 의해 발현될 수 있고, 즉각적인 발현유도가 일어난다. 최근에는 비스테로이드성 항염증제(Nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)의 부작용을 줄이기 위해 *COX-2*만을 선택적으로 억제하는 천연물의 연구들이 지속해서 늘어나고 있다³⁰. NO 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)는 inducible NOS(iNOS), neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS)가 있다. iNOS는 *NOS-2*라고도 불리며, 이 중에 염증이 있는 경우 내피세포 및 다양한 염증세포로부터 iNOS의 합성으로 인해 다량의 NO를 생산하게 되며, 궤양성 대장염(UC)의 NO 생산, NOS의 활성도가 증가하게 된다²⁷. *IL-1β*는 *TNF-α*와 더불어 대표적인 염증성 cytokine으로, NO를 생성하게끔 만들어주는 매개물질이다³¹. *IL-6*은 여러 종류의 세포에서 분비되면서 다양한 기능을 가지고 있는 cytokine이고³², *TNF-α*는 조직과 혈액 사이의 구조물인 내피세포를 자극하여 각종 백혈구들을 염

증부위로 이동시키는 역할을 한다^{33,34}. 이러한 작용을 하면서 염증반응을 발생시키며 조직을 손상시킬 수 있으므로³⁵, *TNF-α* 생성을 감소시키는 것이 염증반응조절에서 매우 중요하다고 할 수 있다³⁶.

*IL-10*는 *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*의 분비를 조절하여 면역 조절작용에 관여가 되는 것으로 보고되어 있다^{37,38}. *HPGD*는 프로스타글란딘의 불활성화에 영향을 주는 핵심적인 효소로, 염증반응과정을 조절한다³⁹.

*NQO1*은 종양, 특히 암에서 그 발현이 두드러지며, 세포 보호의 기능과 세포 독성을 야기하는 기능을 모두 가지고 있는 물질이다⁴⁰. *HO1*은 산화적 스트레스에 대하여 보호 작용을 하고 조직과 세포의 항염증성 활성화에 도움을 주며⁴¹, *HO1*의 산물인 bilirubin은 염증성 cytokine의 생성을 줄여주는 것으로 알려져 있다⁴². *NFE2L2*는 산화 스트레스 시 세포 보호 단백질의 발현을 유도하여, 암을 예방하는 데 도움이 되는 물질이다⁴³.

단백질 활성화 검사 항목은 3가지 category(염증 활성화 효소, MAPK, 항산화효소)로 분류할 수 있다. 염증 활성화 효소로는 COX-2, STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3)가 있고, MAPK에는 ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinase), P38가 있으며, 항산화효소로는 HO-1, NRF2가 있다.

염증 활성화 효소들 중 COX-2는 HGT와 GST 모두 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났고, STAT3는 HGT 200 µg/ml, GST 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다. MAPK 중 ERK, P38은 HGT와 GST 모두 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났고, JNK는 HGT와 GST 모두 100 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다. 항산화효소 중 HO-1은 HGT 50 µg/ml 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만 GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았으며, NRF2는 HGT 200 µg/ml 이상의 농도조건에

서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만 GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았다.

STAT3는 다양한 유전자의 발현을 조절하면서 세포의 분화, 증식, 사멸 등을 유발시키며, 특히 종양세포 내에서 발현이 증가하는 물질로 알려져 있다⁴⁴. MAPK는 ERK, JNK, P38 단백질을 포함한다. LPS 등 다양한 자극에 의해 활성화되면서 염증반응에 중요한 역할을 한다⁴⁵. ERK는 자극 인자 등에 의해 활성화되고, 이 활성화된 ERK는 NF- κ B의 핵 내부로의 이전을 유도하여 염증반응을 조절한다⁴⁶. JNK 역시 activator protein(AP)-1, c-Jun 인산화의 증가를 통해서 염증반응을 조절하며⁴⁷, P38은 체내 염증반응의 중심적 조절자로, 백혈구의 이동과 축적을 유도하면서 *TNF- α* , *IL-6* 등의 발현을 조절한다⁴⁸.

In vivo 실험에서는 대장 조직 길이 측정, 조직학적 분석, 유전자 발현량 검사 및 단백질 활성화 검사가 이루어졌다. 먼저 대장 조직 길이를 측정할 결과 HGT는 모든 투여군(HGT 200, HGT 400), GST는 일부 투여군(GST 400)에서 대조군에 비해 유의한 길이의 증가가 나타났다. 이는 HGT이 GST보다 항염증 반응효과가 더욱 좋다는 것을 알 수 있고, GST 400일 때의 대장 조직 길이(8.70 cm)와 HGT 200일 때의 대장 조직 길이(8.87 cm)를 비교해 보았을 때, GST가 고농도이면 염증반응 회복에 어느 정도 효과가 있는 것으로 판단된다.

조직학적 분석에서는 정상적인 표면 상피세포 및 점막층에서 DSS를 통해 조직의 심각한 손상을 확인하였고, HGT 모든 투여군(HGT 200, HGT 400), GST 일부 투여군(GST 400)에서 일부 손상되지 않은 표면 상피와 점막층이 관찰되었다. 또한 염증세포의 침윤도 감소하여 대장의 점막조직이 보호되었음을 알 수 있었다. 하지만 GST 200 투여군에서는 대조군에 비하여 완화된 부분이 관찰되지 않았다.

유전자 발현량 검사 항목은 in vitro 실험과 동일한 3가지 category(염증 관련 인자, 항염증 관련 인자, 항산화 효소)로 분류할 수 있다. 염증 관련

인자들 중 *PTGS2*, *NOS2*는 HGT와 GST 모두 400 mg/kg 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났고, *IL1B*는 HGT 400 mg/kg 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났지만, GST에서는 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다. *IL6*는 HGT와 GST 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았고, *TNFA*는 HGT 모든 투여군, GST 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났다.

항염증 관련 인자들 중 *IL10*은 HGT와 GST 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았고, *HPGD*는 HGT 400 mg/kg 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만, GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았다.

항산화효소 중 *NQO1*은 HGT 400 mg/kg 이상의 농도조건에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만 GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았고, *H01*, *NFE2L2*는 HGT와 GST 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다. 또한 HGT, GST가 sulfasalazine보다 항산화효소 증가에 더욱 효과가 있는 것으로 보아 한 약제제가 sulfasalazine보다 세포 보호(cell protection) 효과가 더욱 우수하다는 것을 알 수 있다.

단백질 활성화 검사 항목은 2개의 category(염증 활성화 효소, 항산화효소)로 분류할 수 있다. 염증 활성화 효소에 해당하는 COX-2, STAT3는 HGT 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타났지만, GST는 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다. 항산화효소에 해당하는 H0-1는 HGT와 GST 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났고, NRF2는 HGT 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만, GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았다.

In vitro 실험과 In vivo 실험 결과를 합쳐서 비교해 보았을 때 두 실험 모두 유전자 발현량 검사에서, 염증관련 항목의 감소, 항염증 관련 항목의 증가, 항산화관련 항목의 증가의 경향성이 나타났다(Fig. 8).

단백질 활성화 검사에서는 염증 활성화에 관련한 COX-2, STAT3를 확인해볼 때, 두 실험 모두 염증 활성화를 감소시키는 결과가 나왔지만, in vivo 일 때 GST에서 유의성이 없는 것으로 나타났다. 세부적으로 보았을 때 In vivo 실험에서 결과의 유의성이 결여되는 항목이 더 많았는데, 아무래도 In vitro 실험보다 In vivo 실험이 생체 내에서 이루어지므로 여러 변수들이 더 많아서라고 해석할 수 있다.

유전자 발현량 검사와 단백질 활성화 검사에 쓰인 여러 지표들은 염증관련인자, 항염증관련인자, 항산화관련인자들로 크게 분류할 수 있는데, 실험 결과를 토대로 분석해 보았을 때 염증관련인자의 수치는 감소하였고, 항염증관련인자의 수치는 증가하였으며, 항산화관련인자의 수치는 증가하였음을 알 수 있다. 이는 HGT, GST이 염증을 완화해주고 산화를 방지해주는 효능이 있음을 나타낸다. 즉, 황금과 감초가 포함된 처방이 염증성 장 질환의 항염증 효과에 도움이 될 수 있음을 알 수 있다. 특히 HGT이 GST보다 유의한 결과치가 나온 것으로 미루어 보아, 염증성 장 질환에서 HGT이 GST보다 더욱 효능이 좋음을 확인할 수 있다. 따라서 본 질환에서는 HGT이 GST보다는 더욱 적합한 처

방으로 생각되며, 염증성 장 질환 같은 하부 위장관 질환에 HGT이 더욱 효과적임을 알 수 있다. 또한 시료(한약제제)의 농도가 높을수록 실험 결과가 좋게 나왔으며, GST 관련 결과에서는 고농도 군에서 더 유의한 결과로 나온 것으로 보아 GST을 본 질환에 사용할 때 GST의 약재의 용량을 늘리는 것도 하나의 방법이 될 것이라 사료된다. 또한, In vivo 실험에서 HGT, GST 모두 *TNFA*를 억제하는 효능이 다른 항목들에 비해 우수함을 알 수 있는데, HGT가 GST보다 억제를 더 잘하는 것을 알 수 있다. 특히 HGT, GST가 sulfasalazine보다 항산화작용, 대장점막조직의 보호 능력이 우수하므로 HGT, GST가 세포 보호작용 등의 안전성 측면에서도 sulfasalazine보다 우수하다고 할 수 있다. 즉 한약 치료제가 양약 치료제보다 질환의 부작용과 재발률을 최소화할 수 있어서 안전성이 높다고 할 수 있는 것이다. 이러한 연구 결과를 토대로 향후에는 HGT과 GST의 케양성 대장염, 크론병 등의 염증성 장 질환에 있어서 임상적인 연구의 효용성을 증명하는 것을 목표로 해야 할 것이고, HGT, GST의 추가적인 독성연구 및 임상연구가 지속되어야 할 것이다.

Fig. 8. Schematic diagram of this experiment.

Animal : 7 week-old C57BL/6N mice

* 3% DSS in drinking water for 7 days

** HGT & GST as oral gavage, 200 and 400 mg/kg for 2 weeks

*** HGT & GST unit : µg/ml

(DSS : Dextran sulfate sodium, HGT : *Hwanggeum-tang*, GST : *Gamchosasim-tang*)

V. 결 론

黃芩湯(HGT)과 甘草瀉心湯(GST)이 DSS로 유발된 동물 모델의 궤양성 대장염에 미치는 영향을 실험적 방법을 통해 규명하기 위하여, HGT와 GST를 투여한 후 NO 생성 억제 효과, 유전자 발현량과 단백질 활성화 실험을 통한 염증반응 및 항산화 억제 효과, 대장 길이의 변화, 조직화학적 변화를 영상 분석 및 통계 분석 처리를 이용, 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. In vitro 유전자 발현량 검사에서, HGT와 GST를 투여하여 염증 관련 인자(*PTGS2*, *NOS2*, *IL1B*, *IL6*, *TNFA*)의 감소, 항염증 관련 인자(*IL10*, *HPGD*)의 증가, 항산화효소(*NQO1*, *HO1*, *NFE2L2*)의 감소가 나타났다.
2. In vitro 단백질 활성화 검사에서, HGT와 GST를 투여하여 염증 활성화 효소(COX-2, STAT3)의 감소, MAPK(ERK, JNK, P38)의 감소, 항산화효소(HO-1, NRF2)의 증가가 나타났다.
3. In vivo 실험에서, 동물 모델의 대장 조직 길이를 측정한 결과 HGT는 모든 투여군(HGT 200, HGT 400), GST는 일부 투여군(GST 400)에서 대조군에 비해 유의한 길이의 증가가 나타났다.
4. In vivo 실험의 조직학적 분석에서, HGT 모든 투여군(HGT 200, HGT 400), GST 일부 투여군(GST 400)에서 일부 손상되지 않은 표면 상피와 점막층이 관찰되었고, 염증세포의 침윤도 감소하여 대장의 점막조직이 보호되었음을 알 수 있었다.
5. In vivo 유전자 발현량 검사에서는 In vitro 유전자 발현량 검사 결과와 비슷한 경향성(염증 인자의 감소, 항염증 인자의 증가, 항산화효소의 감소)이 나타났지만, 유의성이 저하된 항목들도 존재하였다.
6. In vivo 단백질 활성화 검사에서 염증 활성화 효소(COX-2, STAT3)는 HGT 모든 투여군에서

감소가 나타났지만, GST는 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았다. 항산화효소 항목 중 HO-1는 HGT와 GST 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났고, NRF2는 HGT 모든 투여군에서 대조군에 비해 유의한 증가가 나타났지만, GST는 대조군에 비해 유의한 증가가 나타나지 않았다.

7. 黃芩과 甘草가 포함된 처방인 HGT, GST가 항염증 효과에 도움이 되며, 염증성 장 질환과 같은 하부 위장관 질환에는 HGT가 더욱 효과적임을 알 수 있다. 또한 한약제제가 sulfasalazine보다 항산화능이 높아서 cell protection 및 안전성 측면에서도 우수함을 알 수 있다.

참고문헌

1. Choi EJ, Lee HJ, Kim WJ, Han KI, Iwasa M, Kobayashi K, et al. Enterococcus faecalis EF-2001 protects DNBS-induced inflammatory bowel disease in mice model. *PLoS one* 2019; 14(2):e0210854.
2. Korean Association for the Study of Intestinal Diseases (KASID). Easy to understand ulcerative colitis. Seoul: Koonja; 2003, p. 8.
3. Su C, Lewis JD, Goldberg B, Brensinger C, Lichtenstein GR. A meta-analysis of the placebo rates of remission and response in clinical trials of active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132(2):516-26.
4. Jeon YT, Kim J. Advances in ulcerative colitis therapy. *The Korean Journal of Medicine* 2009; 76(6):654-60.
5. Lin Z, Wu H, Fu Y, Dai S. Application of Herbaceous Medications for Inflammatory Bowel Disease as a Complementary and Alternative Therapy. *Inflammatory bowel diseases* 2019;25(12):1886-95.

6. Hwang JW, Choi HJ, Baik YS, Jeong SH, Shin GC, Lee WC. A Case of Pyungwijiyutang-gamibang Diagnosed as Constipation due to Stagnation of Eum with Ulcerative Colitis. *The Journal of Internal Korean Medicine* 2007;28(4):972-7.
7. Seo CH, Lee HH, Choi KS, Lim DS, Ryu HC, Lee YS, et al. Two Cases of Ulcerative Colitis Diagnosed as Damp-Heat Dysentery Treated with Jakyaktang-gamibang. *The Journal of Internal Korean Medicine* 2006;27(4):984-90.
8. Kang AM, Lim SW. Therapeutic Effects of *Gaejigayonggolmoryo-tang* on Dextran Sodium Sulfate-induced Ulcerative Colitis in Mice. *The Journal of Internal Korean Medicine* 2017;38(6):1021-34.
9. Choi JY, Ahn SH, Shih YH, Sa BS, Kin KB. Mitigating Effect of Jageum-jung on Dextran Sulfate Sodium-induced Ulcerative Colitis through Anti-inflammatory Regulation. *The Journal of Internal Korean Medicine* 2017;38(6):944-54.
10. Kim ES, Shin MK, Kim TR, Shin MH, Lee YS. Effect of Ohmae-hwan and Mume Fructus on DSS-Induced Inflammatory Bowel Disease in a Mice Model System. *The Journal of Internal Korean Medicine* 2015;36(3):284-96.
11. Kim KJ, Shin M-R, Kim SH, Kim SJ, Lee AR, Kwon OJ, et al. Anti-inflammatory and apoptosis improving effects of sulfasalazine and Cinnamomi cortex and Bupleuri radix mixture in TNBS-induced colitis mouse model. *Journal of Applied Biological Chemistry* 2017;60(3):227-34.
12. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of Scutellariae Radix Extract on the Proinflammatory Mediators in Raw 264.7 Cells Induced by LPS. *The Korea Journal of Herbology* 2011;26(2):75-81.
13. Han MH, Lee MH, Hong SH, Choi YH, Moon JS, Song MK, et al. Comparison of Anti-inflammatory Activities among Ethanol Extracts of *Sophora flavescens*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Dictamnus dasycarpus*, and their Mixtures in RAW 246.7 Murine Macrophages. *Journal of Life Science* 2014;24(3):329-35.
14. Hu X. 胡希恕傷寒論講義. Paju: Fishwood: 2019, p. 290-2, 310-1.
15. Yang DS, Gu HJ, Yeo EJ, Yang SJ, Jo SH, Park KM. A Case of Suggested Behcet's Disease Patient Treated by Gamchosasim-tang. *The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology* 2009;22(4):187-93.
16. Yang SK. Current status and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Korea. *The Korean journal of gastroenterology* 2002;40(1):1-14.
17. Kwak MS, Cha JM, Lee HH, Choi YS, Seo SI, Ko KJ, et al. Emerging trends of inflammatory bowel disease in South Korea: a nationwide population-based study. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2019;34(6):1018-26.
18. "Classification of diseases (3 stage chronic disease) statistics" *Healthcare Bigdata Hub*. last modified Apr 1, 2020, accessed Dec 1, 2020, <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olap3thDsInfo.do>.
19. Cha HY, Jeong AR, Cheon JH, Ahn SH, Park SY, Kim KB. The anti-oxidative and anti-inflammatory effect of *Lonicera Japonica* on ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *The Journal of Pediatrics of Korean Medicine* 2015;29(3):54-64.
20. Department of gastrointestinal medicine Korean medicine. gastrointestinal internal medicine. Seoul: Gunja Publishing Co., Ltd.: 2008, p. 365, 374.
21. Korean Federation of Internal Medicine compilation

- Harrison's Internal Medicine. Seoul: Do Seo Publishing MIP; 2006, p. 1937-50.
22. Liang HL, Ouyang Q. A clinical trial of combined use of rosiglitazone and 5-aminosalicylate for ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology: WJG* 2008;14(1):114.
23. Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2014;14(5):329-42.
24. Choi CH, Kim YH, Kim YS, Ye BD, Lee KM, Lee Bi, et al. Guidelines for the management of ulcerative colitis. *The Korean Journal of Gastroenterology* 2012;59(2):118-40.
25. Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Hasegawa M, Kadomatsu K, Ohmiya N, et al. Paeonol attenuates TNBS-induced colitis by inhibiting NF- κ B and STAT1 transactivation. *Toxicology and applied pharmacology* 2006;217(1):35-42.
26. Myung NY. The inhibitory effect of Orostachys japonicus on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *The Korea Journal of Herbology* 2014;29(4):29-34.
27. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78(6):915-8.
28. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985;82(22):7738-42.
29. Belvisi M, Barnes PJ, Larkin S, Yacoub M, Tadjkarimi S, Williams TJ, et al. Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. *European journal of pharmacology* 1995;283(1-3):255-8.
30. Kim YK, Ha HK, Lee JH, Kim CS. COX-2 inhibition and anti-inflammatory effects of traditional herbal medicine. *Korean Journal of Oriental Medicine* 2002;8(1):65-74.
31. Benveniste EN. Immunology of the Nervous System. New York: Oxford University Press; 1997, p. 419-59.
32. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *Journal of molecular medicine* 1996;74(1):1-12.
33. Briscoe D, Cotran R, Pober J. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration. *The Journal of Immunology* 1992;149(9):2954-60.
34. Gamble J, Harlan J, Klebanoff S, Vadas M. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985;82(24):8667-71.
35. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987;330(6149):662-4.
36. Marriott JB, Westby M, Cookson S, Guckian M, Goodbourn S, Muller G, et al. CC-3052: a water-soluble analog of thalidomide and potent inhibitor of activation-induced TNF- α production. *The Journal of Immunology* 1998;161(8):4236-43.
37. Pender SL, Breese EJ, Günther U, Howie D, Wathen NC, Schuppan D, et al. Suppression of T cell-mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterology* 1998;115(3):573-83.
38. Schotte H, Schluter B, Willeke P, Mickholz E, Schorat M, Domschke W, et al. Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of proinflammatory cytokine-secreting

- peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004; 43(8):960-4.
39. Diggle CP, Carr IM, Zitt E, Wusik K, Hopkin RJ, Prada CE, et al. Common and recurrent HPGD mutations in Caucasian individuals with primary hypertrophic osteoarthropathy. *Rheumatology* 2010;49(6):1056-62.
40. Park EJ, Kwon TK. NAD (P) H Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) as a Cancer Therapeutic Target. *Journal of Life Science* 2014;24(1):98-103.
41. Li L, Grenard P, Van Nhieu JT, Julien B, Mallat A, Habib Ad, et al. Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 2003;125(2):460-9.
42. Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimizuka K, et al. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 2004; 127(2):595-606.
43. Kim YR, Oh JE, Kim MS, Kang MR, Park SW, Han JY, et al. Oncogenic NFE2L2 mutations in squamous cell carcinomas of esophagus and skin. *The Journal of Pathology* 2010;220(4):446-51.
44. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* 2005;114(3):301-12.
45. Song HY, Lee JA, Ju SM, Yoo KY, Won MH, Kwon HJ, et al. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice. *Biochemical pharmacology* 2008;75(6):1348-57.
46. Su YW, Chiou WF, Chao SH, Lee MH, Chen CC, Tsai YC. Ligustilide prevents LPS-induced iNOS expression in RAW 264.7 macrophages by preventing ROS production and down-regulating the MAPK, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *International immunopharmacology* 2011;11(9):1166-72.
47. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 2008;47(4):409-14.
48. Schieven GL. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Current topics in medicinal chemistry* 2005;5(10):921-8.