DSS로 유도된 마우스 대장염 모델에서 꽃새우 추출물의 항염증 효능

최유민¹ · 박지선¹ · 강정은¹ · 최수철¹ · 이성훈² · 이인아¹

¹군산대학교 화학과
²청주대학교 제약공학과

Anti-Inflammatory Effect of *Trachysalambria curvirostris* Extract on a DSS-Induced Mouse Colitis Model

Yu Min Choi¹, Ji Sun Park¹, Jeong Eun Kang¹, Soo Cheol Choi¹,
Sung Hoon Lee², and In-Ah Lee¹

¹Department of Chemistry, Kunsan National University

²Department of Pharmaceutical Engineering, Cheongju University

ABSTRACT *Trachysalambria curvirostris* is a crustacean found near the southwest coast of Korea which contains various nutrients such as iron, calcium, taurine, and chitosan. In particular, chitosan has anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, and antioxidant effects. The purpose of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of the extract of *Trachysalambria curvirostris* on inflammatory bowel disease (IBD). Inflammatory factors (COX-2, IL-1 β , IL-6, iNOS, TNF- α) in cells and colon tissue induced by lipopolysaccharide (LPS) and dextran sulfate sodium (DSS) were confirmed using RT-PCR. The generation of cytokines (IL-6, TNF- α) in the colon tissue protein of ICR mice caused by DSS was measured by ELISA. Compared to the LPS and DSS groups, the expression level of inflammatory cytokines showed a reduction in the group treated with the *Trachysalambria curvirostris* extract. Similarly, the ELISA results showed that the expression level of inflammatory cytokine decreased compared to the DSS group. As a result of H&E staining using mouse colon tissue, it was possible to observe a lower invasion of inflammatory cells in the *Trachysalambria curvirostris* treated group than in the DSS group. It is necessary to conduct additional research on the exact mechanism of reaction to identify the active components in the *Trachysalambria curvirostris* extract, and to prove the value of the *Trachysalambria curvirostris* for IBD prevention and treatment.

Key words: *Trachysalambria curvirostris*, anti-inflammatory activity, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis

서 론

염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)은 인간의 비감염성 만성 장 염증성 질환으로 임상 특성에 따라 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)과 크론병(Crohn's disease, CD) 두 가지 유형으로 구분된다(Matsumoto 등, 1999). 염증성 장 질환은 유전적, 면역학적 이상 및 스트레스나 약물 등과 같은 환경적 요인 등의 관련이 있을 것으로 알려졌지만 명확한 발병 기전은 밝혀져 있지 않다(Kim 등, 2018). 염증성 장 질환은 유럽이나 미국 등 육식을 주로 하는 나라에서 흔하며 최근에는 한국에서도 현저히 증가하는 추

세를 보인다(Chang 등, 2005). 이 중 궤양성 대장염은 대장의 점막 또는 점막하층에 국한된 염증을 특징으로 하는 원인 불명의 만성 염증성 장 질환이다(Kim 등, 2018). 하지만 궤양성 대장염을 완치할 수 있는 수술 방법은 후유증이 크기 때문에 약물요법으로 치료하며 주로 스테로이드를 사용한다(Kim, 2019). 이러한 약물을 장기적으로 복용할 시 부작용과 독성 그리고 내성이 생기기 때문에 궤양성 대장염 치료에 효과가 있는 천연물 소재에 대한 연구가 필요하다.

최근 기능성 식품의 관심이 증가하면서 독특한 맛과 풍미 및 풍부한 영양가를 가진 새우, 가재, 게 등과 같은 갑각류 식품의 소비가 증가하였고, 이로 인해 기능성 해양생물 소재

Received 12 May 2021; Revised 9 June 2021; Accepted 21 June 2021

Corresponding author: In-Ah Lee, Department of Chemistry, Kunsan National University, 558, Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk 54150, Korea, E-mail: leeinah@kunsan.ac.kr

Author information: Yu Min Choi (Graduate student), Ji Sun Park (Graduate student), Jeong Eun Kang (Graduate student), Soo Cheol Choi (Graduate student), Sung Hoon Lee (Professor), In-Ah Lee (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Kim 등, 2014a). 키토산은 새우의 껍질에 포함되어 있으며 *in vivo*와 *in vitro*에서 항염 효과와 항암 효과, 항산화 작용 등이 보고되어 있다(Pangestuti 등, 2011; Qiao 등, 2011; Qi와 Xu, 2006; Jeon 등, 2003). 꽃새우(*Trachysalambria curvirostris*)는 십각목(Decapoda) 보리새우과(Penaeidae)의 갑각류로 주로 남해안과 서해안에 분포하고 있으며, 꽃새우에 함유되어 있는 유리 아미노산들은 다양한 풍미와 맛을 나타내는 아미노산의 구성 성분에 대한 연구도 이어지고 있다. 또한, 붉은색을 띠는 아스타잔틴은 갑각류와 같은 생물체에서 자연적으로 발생하며 강력하고 광범위한 항산화 효과를 나타낸다(Santos 등, 2012).

염증성 장 질환에 대한 연구를 위하여 dextran sulfate sodium(DSS)으로 염증을 유도한 후 염증과 장관 면역에 대해 연구한 논문들이 보고되고 있다(Low 등, 2013). DSS는 설사, 혈변, 체중 감소 등의 특징을 가지고 조직학적으로 상피세포에 손상을 유발해 상피층의 장샘이 염증없이 떨어져 나가는 것이 특징이며, 이 특징은 사람의 궤양성 대장염과 흡사하기 때문에 DSS를 대장염 모델 설정에 흔히 사용된다(Bauer 등, 2010; Kim 등, 2014b; Chassaing 등, 2014). DSS로 유도된 마우스의 대장 조직에서 interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine이 검출되며, 이러한 사이토카인은 주로 활성화된 대식세포에 의해 생성된다(Mizoguchi 등, 2013).

이에 따라 본 연구에서는 꽃새우 추출물의 항염증 효과를 알아보고자 lipopolysaccharide(LPS)로 유도된 RAW 264.7 세포와 DSS로 유도된 대장염 모델의 대장 조직을 이용해 IL-6, TNF- α , IL-1 β , inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2) 유전자 발현에 꽃새우 추출물이 미치는 영향을 확인하고 염증과의 연관성을 논의해보고자 한다.

재료 및 방법

실험 기기 및 시약

DMEM medium(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 10% inactivated fetal bovine serum(FBS; GE healthcare, Chicago, IL, USA), 1% penicillin-streptomycin(GE healthcare), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit(Ab Frontier, Seoul, Korea), chloroform(Daejung, Siheung, Korea), RT-PCR kit(Bioneer, Daejeon, Korea), Agarose-Power(Bioneer), ethanol(Daejung), DSS(dextran sulfate sodium; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), DEPC(diethyl pyrocarbonate) water(Thermo Scientific), agarose(Bioneer), TRIzol(Sigma-Aldrich), centrifuge(LABOGENE, Seoul, Korea), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) reader(Thermo Scientific),

fluoro box(NeoScience Co., Ltd., Seoul, Korea), Spectra Max M2 microplate reader(Molecular devices, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며 RAW 264.7(KCLB 40071) 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

시료 준비

건꽃새우 500 g을 분쇄한 뒤 증류수 1,500 mL를 첨가해 60°C에서 15분간 3 반복하여 추출하였다. 추출 후 원심분리를 이용하여 8,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리 후 상등액을 동결건조하여 가루 형태로 얻었으며, 건조 뒤 무게는 50.017 g으로 수율은 10.0%였다.

구성아미노산

꽃새우 추출물 160.0 mg을 취하여 6 N HCl 60.0 mL를 추가하여 N₂ gas purging 후 110°C에서 22시간 가수분해한 다음 50°C에서 감압 증발을 해준다. 0.02 N HCl로 재용해하여 62.5 mL 부피플라스크에 정용 후 0.45 μ m 수용성 filter로 여과한 뒤 아미노산 자동분석(Hitachi AAA L-8900, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

유리아미노산

유리아미노산 분석을 위해 시료를 1.0 g씩 취하여 80% 에탄올 10.0 mL를 가한 다음, 20분간 초음파 처리한 후 3,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 위의 과정을 2회 반복하고 상등액을 모아 여과지로 여과한 뒤 농축하였다. 0.02 N HCl 1.0 mL에 용해시킨 후 0.45 μ m nylon syringe filter(Merk Millipore, Burlington, MA, USA)로 2회 여과하여 분석용 시료로 사용하였다. 전처리 과정을 거친 실험용액의 유리아미노산 함량은 구성아미노산 분석기와 동일한 기기를 사용하였다. Column flow 1.0 mL/min, injection volume 20 μ L, wavelength 570 nm 및 440 nm, N₂ gas automatic purge로 분석하였다.

세포배양

마우스 대식세포 주인 RAW 264.7 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic(10 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 0.25 μ g/mL amphotericin)이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

실험동물 및 실험군 분리

생후 4주령의 수컷 ICR mouse를 오리엔트바이오(Orient Co., Gwangju, Korea)로부터 구입하여 꽃새우 추출물의 항염증 평가를 위한 실험에 사용하였다. 마우스는 20 $\pm$ 2°C, 습도 50 $\pm$ 10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 실험용 마우스를 Table 1과 같이 분리하였다. DSS+Low *Trachysalambria curvirostris* Extract(DL)군과 DSS+High *Tra-*

Table 1. Mouse groups classification according to sample processing

(n=6)	5% DSS	<i>Trachysalambria curvirostris</i> Extract
Normal (Nor)	—	—
DSS	+	—
DL	+	250 mg/kg
DH	+	500 mg/kg

chysalambria curvirostris Extract(DH)군은 증류수를 이용하여 각각 250 mg/kg, 500 mg/kg 농도로 제조하였으며, 10일간 매일 같은 시간에 100 μ L씩 경구 투여하였다. DSS 군, DL군, DH군에는 대장염을 유도하기 위해 시료 투여 4일째부터 증류수에 녹인 5% DSS를 7일간 자유롭게 음용하도록 하였다. 본 실험은 군산대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다(승인번호: 2021-05).

RNA 추출

LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포에 꽃새우 추출물을 1~10 mg/mL 농도로 처리한 후, TRIzol을 이용하여 RNA를 추출하였다. 대장 조직의 RNA는 각 그룹의 대장 조직을 일정한 무게로 채취해 세포와 동일한 방법으로 추출하였다.

RT-PCR

추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 증류수에 용해시켜 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 수행하였다. PCR은 DNA polymerase, buffer, dNTP, tracking dye가 포함된 RT-PCR kit을 사용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성한 후 각각의 유전자에 해당하는 primer를 사용하여 94°C에서 30초 동안 denaturation, 55~62°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 35 cycle 반복하였다. PCR product는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인했으며, 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 분석에 사용된 각각의 pri-

mer 염기서열은 Table 2에 나타내었다.

Myeloperoxidase(MPO) 활성

일정량의 마우스 대장 조직(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 분석 시료로 사용하였다. 분석 시료 100 μ L에 *O*-dianisidine(20 mg/mL) 30 μ L를 가한 후 H₂O₂의 최종 농도가 0.0005%가 되게 가하여 20°C에서 10분간 반응시켰다. 2% sodium azide 30 μ L를 가하여 반응을 정지시킨 후, 25°C, 460 nm에서 SpectraMax M2 microplate reader로 MPO 효소 활성을 측정하였다. MPO 활성 1 unit은 25°C에서 H₂O₂ 1 μ mole/min을 분해하는 효소의 활성을 나타내며, 조직 g 당 MPO unit으로 표시하여 나타내었다.

ELISA를 이용한 IL-6와 TNF- α 측정

본 실험에선 마우스에서 얻은 대장 조직을 1×PBS를 이용해 추출한 단백질을 사용하였다. IL-6와 TNF- α cytokine은 ELISA kit을 이용해 측정하였으며, 제조사 프로토콜에 따라 진행한 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

H&E를 통한 조직학적 분석

Hematoxylin and Eosin(H&E) 염색법을 이용해 조직을 염색하였다. 마우스의 대장 조직을 절단하여 파라핀으로 고정하고 조직 슬라이드의 파라핀을 제거하기 위해 xylene 용액에 5분간 3회 담근 후, 100%, 95%, 70% ethanol에 차례대로 5분씩 담갔다. 염색을 위해 hematoxylin 용액에 약 5분 동안 염색한 뒤 흐르는 물에 수세하였다. 1% HCl 용액과 1% 암모니아 용액을 이용하여 세포질의 hematoxylin을 제거하고 eosin 용액에 2분간 세포질을 염색하였다. 이후 70%, 95%, 100% ethanol, xylene에 차례대로 5분 동안 담근 뒤 cover glass를 덮어 봉입하였다.

Table 2. Inflammatory cytokine primer used for PCR

Target gene	Sequences	
IL-6	Forward	5'-TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3'
	Reverse	5'-TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC-3'
TNF- α	Forward	5'-GGCAGGTCTATTTGGAGTCATTGC-3'
	Reverse	5'-ACATTCGAGGTCCAGTGAATTCGG-3'
IL-1 β	Forward	5'-GCCTTGGGCCTCAAAGGAAAGAATC-3'
	Reverse	5'-GGAAGACACAGATTCCATGGTGAAG-3'
iNOS	Forward	5'-GTTCTCAGCCCCAACAATAAAGA-3'
	Reverse	5'-GTGGACGGGTCGATGTCAC-3'
COX-2	Forward	5'-GCAAATCCTTGCTGTTCGAATC-3'
	Reverse	5'-GGAGAAGGCTTCCCAGTTTTC-3'
GAPDH	Forward	5'-CATGGCCTTCGTGTTC-3'
	Reverse	5'-CCTGGTCCTCAGTGTAGC-3'

통계분석

통계분석은 PASW Statistics(ver. 18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용해 수행하였고, 각 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 계산하였다. 각 군간 유의성 검증은 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 실시하였으며, 통계적 유의성은 신뢰수준 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

구성아미노산

꽃새우 추출물을 아미노산 분석기를 이용하여 분석한 결과 18종의 구성아미노산이 검출되었다. Glycine이 2,559.89 mg/L로 가장 많은 함유량을 포함하고 있으며 threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine 총 9종의 필수아미노산이 함유되어 있음을 확인하였다(Table 3). 꽃새우의 구성아미노산 확인을 통해 꽃새우 단백질 구성에 관여하는 아미노산의 종류를 인지하고자 하였으며, 지속적인 연구를 통해 꽃새우 펩타이드 분석의 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

유리아미노산

꽃새우 추출물의 유리아미노산 분석 결과 38종의 유리아미노산이 검출되었다. Arginine이 14,832.82 mg/L로 가장 많은 양이 검출되었으며, glycine, tau가 각각 12,427.06 mg/L, 10,673.28 mg/L로 arginine 다음으로 많은 함유량을 포함하였다. Valine, leucine, isoleucine, methionine, threonine, lysine, phenylalanine, arginine 총 8종의 필수아미노산이 함유되어 있음을 확인하였다(Table 4). 가장 많은 양이 검출된 arginine은 쓴맛에 관여하는 아미노산으로 알려져 있으나, 단맛을 나타내는 glycine과 같은 아미노산의 함유량도 높은 편이어서 전체적인 꽃새우 풍미가 이루어진다고 생각된다.

RAW 264.7 세포에서 염증성 사이토카인 발현 평가

LPS는 대식세포 매개 염증 반응을 유발하는 대표적인 병원성 물질로 알려져 있으며, 대식세포 표면에 발현하는 toll-like receptor 4(TLR4)에 결합하여 염증성 사이토카인을 생성하고 염증 반응을 유도한다(Kim 등, 2019). LPS에 의해 활성화되는 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B)는 염증과 관련된

Table 3. Contents of total amino acid in *Trachysalambria curvirostris*

Name	Conc. (mg/L)	Name	Conc. (mg/L)
Alanine (Ala)	11.72	Lysine (Lys)	720.09
Arginine (Arg)	2,076.59	Methionine (Met)	204.73
Aspartic acid (Asp)	797.56	NH ₃	196.32
Cysteine (Cys)	2,173.57	Phenylalanine (Phe)	179.07
Glutamic acid (Glu)	1,918.3	Proline (Pro)	1,416.22
Glycine (Gly)	2,559.89	Serine (Ser)	376.94
Histidine (His)	131.92	Threonine (Thr)	312.54
Isoleucine (Ile)	247.48	Tyrosine (Tyr)	142.31
Leucine (Leu)	710.57	Valine (Val)	429.23

Table 4. Contents of free amino acid in *Trachysalambria curvirostris*

Name	Conc. (mg/L)	Name	Conc. (mg/L)
1Mehis	0	Hyls	0
3Mehis	54.66	Hypso	105.88
a-AAA	54.34	Isoleucine (Ile)	1,264.26
a-ABA	20.7	Leucine (Leu)	2,768.66
Alanine (Ala)	5,588.3	Lysine (Lys)	2,356.84
Ans	273.26	Methionine (Met)	239.94
Arginine (Arg)	14,832.82	NH ₃	95.36
Aspartic acid (Asp)	49.76	Ornithine (Orn)	300.56
b-AiBA	83.42	P-Ser	281.14
b-Ala	93.94	PEA	0
Car	29.8	Phenylalanine (Phe)	1,298.86
Citrulline (Cit)	19.88	Proline (Pro)	8,178.84
Cysteine (Cys)	4.92	Sarcosine (Sar)	15.08
Cysthi	1.6	Serine (Ser)	941.64
EOHNH ₂	26.4	Tau	10,673.28
g-ABA	84	Threonine (Thr)	1,467.88
Glutamic acid (Glu)	1,247.1	Tyrosine (Tyr)	1,067.92
Glycine (Gly)	12,427.06	Urea	235.7
Histidine (His)	249.66	Valine (Val)	2,024.54

매개인자의 발현을 유도하는 전사조절인자로 알려져 있으며, COX-2, IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 생성에 관여한다(Hoshino 등, 1999). RAW 264.7 세포에 LPS를 이용하여 염증을 유도한 후 꽃새우 추출물을 처리하여 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 와 효소인 iNOS의 유전자 발현을 확인하였다. IL-6, TNF- α , iNOS에서 LPS군의 사이토카인 발현이 정상군보다 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 유전자 IL-6, TNF- α 에서는 꽃새우 추출물을 5, 10 mg/mL 농도로 처리하였을 때 1, 2.5 mg/mL 농도보다 염증성 사이토카인의 발현이 현저하게 감소하였다. 이는 염증의 반응기전에서 꽃새우 추출물이 염증의 진행을 막아주는 역할을 하고 있으며, 이로 인해 염증성 사이토카인의 생산이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

대장 조직에서 염증성 사이토카인 mRNA 발현 평가

꽃새우 추출물이 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 생성량에 미치는 영향을 확인하였으며, 이러한 결과가 염증 관련 인자의 유전자 발현과도 관련이 있는지 확인하기 위해 RT-

PCR을 진행하였다. 본 연구에서는 5% DSS로 궤양성 대장염을 유도한 마우스의 대장 조직에서 IL-6, TNF- α , IL-1 β 및 COX-2의 발현을 측정하였다(Fig. 2). DSS군은 정상군에 비해 mRNA의 발현이 크게 증가하였으며, DL군과 DH군은 DSS군에 비해 IL-6, TNF- α , IL-1 β , COX-2의 발현이 줄어들었다. 또한, DH군은 IL-6, TNF- α , IL-1 β 에서 정상군과 비슷한 수준의 mRNA 발현을 나타내었다. 이 결과는 LPS로 유도된 염증성 세포에서의 꽃새우 추출물의 염증 완화 효과를 검증하고 있으며, 꽃새우 추출물의 염증 관련 유전자에도 영향을 주고 있는 것을 확인할 수 있었다.

MPO 활성 평가

염증성 대장염을 연구에서 질병의 경중을 확인하기 위해 MPO 활성에 대한 증가 여부를 확인하였다. 염증 활성 지표인 호중구의 조직 침윤 정도를 확인하기 위해 대장 조직에서 MPO 활성을 측정한 결과, MPO 활성은 정상군에 비해 DSS군에서 증가하였으며 DSS군에 비해 DL, DH군에서의 MPO 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이

Fig. 1. Effect of *Trachysalambria curvirostris* extract on the mRNA of iNOS, IL-6, and TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (1, 2.5, 5, and 10 mg/mL) of *Trachysalambria curvirostris* or LPS (1 μ g/mL) for 24 h. (A) Total RNA was isolated, and level of mRNA expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were measured by RT-PCR. For standardization, GAPDH was used as a reference band, comparison band (B) IL-6/GAPDH, (C) TNF- α /GAPDH, and (D) iNOS/GAPDH were quantified by a numerical graph. Data are expressed as mean $\pm$ SD. Significant as compared to LPS group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

Fig. 2. Effect of *Trachysalambria curvirostris* extract on the mRNA of iNOS, IL-6, and TNF- α in colon tissue. (A) Total RNA was isolated, and level of mRNA expression of IL-1 β , cox-2, IL-6, and TNF- α were measured by RT-PCR. For standardization, GAPDH was used as a reference band, comparison band (B) IL-6/GAPDH, (C) TNF- α /GAPDH, (D) IL-1 β /GAPDH, and (E) COX-2/GAPDH were quantified by a numerical graph. Data are expressed as mean $\pm$ SD. Significant as compared to DSS group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

결과로 염증성 대장염으로 인한 장 손상으로 확인하였으며 꽃새우 추출물의 투여로 인해 손상된 장이 부분적으로 회복되었다는 것을 확인할 수 있었다.

대장 조직에서 염증성 사이토카인 농도 측정

염증성 장 질환은 체중 감소, 복통 및 혈변 증상을 포함하고 대장에 염증과 궤양을 동반하는 염증 질환 중 하나로 뚜

렷한 원인은 아직 밝혀지지 않았다(Hendrickson 등, 2002). T 림프구, macrophage와 같은 면역 세포는 염증성 장 질환의 염증 반응에 관여하며, 사이토카인과 chemokine을 분비한다. 면역세포의 작용은 pro-inflammatory cytokine과 anti-inflammatory cytokine 사이의 불균형을 일으키는데 이러한 장내 불균형은 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 과생성을 불러와 염증성 장 질환을 일으킨다.

Fig. 3. MPO activities in colon tissue of each group of mice were determined. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=6). Nor, group received water without DSS; DSS, group received 5% DSS in drinking water for 7 days; DL, group received 5% DSS and oral administration with 250 mg/kg *Trachysalambria curvirostris* extract; DH, group received 5% DSS and oral administration with 500 mg/kg *Trachysalambria curvirostris* extract. Significant as compared to DSS group. * $P<0.05$.

DSS로 염증을 유도한 마우스의 대장 조직을 이용하여 TNF- α 와 IL-6 사이토카인의 생성량을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 TNF- α 생성량은 정상군과 DSS군 각각 72.4 ± 32.3 pg/mL, 608.1 ± 40.4 pg/mL로 정상군에 비해 DSS군에서의 생성량이 약 8.4배 증가한 것을 확인하였다. DL군과 DH군에서는 각각 506.0 ± 25.2 pg/mL, 123.1 ± 39.3 pg/mL의 값을 보였다. IL-6의 경우 정상군에서 13.3 ± 0.7 pg/mL의 값을 보였으며, DSS군에서 63.5 ± 6.4 pg/mL로 DSS를 유도하였을 때 장 내 사이토카인 생성이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, DL군과 DH군에서 18.4 ± 7.3 pg/mL, 9.7 ± 2.7 pg/mL 값을 보였으며 꽃새우 추출물이 염증성 사이토카인 생성을 감소시키며 염증의 진행을 억제한다는 것을 확인하였다.

조직학적 평가

염증이 유도된 마우스의 대장 조직과 꽃새우 추출물을 투여한 마우스의 대장 조직의 형태학적 변화를 확인하기 위해 hematoxylin과 eosin을 사용하였으며, 광학현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 5). Hematoxylin과 eosin을 이용한 조직학적 검사를 확인하였을 때, 정상군은 대장 조직에서 이상소견이 없었으나 DSS군은 핵의 파괴와 점막과 점막 하에 염증세포의 침윤, 상피조직의 손실을 확인할 수 있었다. 반면에 꽃새우를 투여한 DL군과 DH군은 정상군에 비해 조직 형태가 부분적으로 손상된 것을 확인할 수 있었으나 DSS로 인한 대장 조직의 형태학적 변화가 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.

결론

장 질환 치료의 기본은 염증 반응을 가라앉히고 손상된 조직이 치유되도록 하며, 설사, 혈변, 복통 등의 증상을 완화하여 염증이 재발하지 않도록 이를 유지하는 것이다. 가장 많이 사용되고 있는 치료제는 항염증제, 부신피질 호르몬제(스테로이드), 면역조절제, 생물학적 제제 등이 있으며, 주사, 경구 복용제, 좌약, 관장 등 여러 가지 형태의 치료제가 사용되고 있다. 그러나 염증성 장 질환의 호전과 악화의 반복은 치료제의 남용을 불러일으키고, 이로 인해 면역 결핍, 부종, 구토 등의 심각한 부작용을 일으킨다고 보고되어 있어 천연 소재를 이용한 기능성 소재 개발이 지속해서 증가하는 추세이며 매우 활발하게 연구가 진행되고 있다. 본 실험에서는 항균, 항산화 및 항염증 효능을 가지고 있는 꽃새우 추출물을 DSS로 염증성 장 질환이 유도된 동물모델에 경구 투여하여 꽃새우 추출물이 염증성 장 질환 치료제 소재로서의 가능성을 연구하였다.

본 연구에서 세포실험을 기반으로 대장염 동물모델을 이용한 실험에서도 동일한 결과를 나타내었으며 이를 통해 *in vivo*와 *in vitro*에서 꽃새우 추출물의 효능을 검증하였다.

Fig. 4. IL-6, TNF- α concentration variation graphs in the colon with separation groups. (A) Results of TNF- α cytokine in ELISA, (B) Results of IL-6 cytokine in ELISA. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=6). Significant as compared to DSS group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 5. Histological effects of *Trachysalambria curvirostris* extract on the colon in DSS-induced colitis mice. Tissues by staining H&E is examined by optical microscope. Magnification $\times 20$.

결과 및 고찰에서 언급한 실험적인 결과로부터 꽃새우 추출물의 항염증 효능은 염증 매개인자를 조절함으로써 염증을 억제하는 것으로 추정할 수 있으며, 이러한 효능은 꽃새우에 함유된 아미노산들의 구성과 연관된 부분도 있을 것이라는 추측이 있지만 자세한 증명을 위해서는 아미노산의 성분 구성과 염증과의 관계에 관한 연구가 진행되어야 할 것이다. 꽃새우 추출물이 나타내는 염증에 대한 개선 효능을 나타내는 연구 결과는 꽃새우가 식품 또는 가공식품으로서 상업적 가치를 높일 수 있는 자료가 될 것이라 생각된다. 또한 꽃새우를 구성하는 아미노산들의 조합으로 이루어진 펩타이드를 활용하여 꽃새우 추출물이 염증에 효능을 나타내는 정확한 반응 기전을 확인할 필요성도 있으며 아미노산의 함유량과 키틴과의 복합적인 효능도 고려해봐야 할 것이다. 본 연구에서 제시된 결과는 꽃새우 추출물에서 염증 반응에 영향을 주는 요인들과 꽃새우가 갖는 염증성 장 질환을 경감하는 효능을 통해 대장염에 영향을 주는 유효식품 소재로서의 가치평가를 나타내고자 하였다.

요 약

꽃새우는 우리나라 서·남해안에 분포하며 철분, 칼슘, 타우린 등 다양한 영양소가 들어있다. 본 연구에서는 꽃새우 추출물을 이용하여 LPS로 염증이 유도된 RAW 264.7 세포와 DSS로 염증이 유도된 ICR mouse 모델에서 항염증 효과를 실험하였다. RAW 264.7 세포와 마우스의 대장 조직을 이용해 RT-PCR을 진행하였을 때 꽃새우 추출물 투여는 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 염증매개 물질인 iNOS, COX-2의 발현이 감소하였다. 또한, 대장 조직 내 단백질

발현을 유의하게 감소시켰으며, 대장 조직 손상을 개선하였다. 이와 같은 연구 결과를 보아 꽃새우 추출물은 *in vivo*와 *in vitro*에서 염증성 사이토카인을 억제하는 효과가 있음을 제시하고 있다. 꽃새우가 염증성 장 질환 치료 및 예방에 효과적인 물질로서의 가치를 입증하기 위해서는 염증 반응에 영향을 미치는 성분 확인이 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단을 통해 과학기술정보통신부의 기초연구실 지원사업으로부터 지원받아 수행되었습니다(과제 번호 NRF-2019R1A4A1026423).

REFERENCES

- Bauer C, Duewell P, Mayer C, Lehr HA, Fitzgerald KA, Dauer M, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 2010. 59:1192-1199.
- Chang DK, Kim YH, Byeon JS, Yang SK, Chung YW, Han DS, et al. The current status of ulcerative colitis-associated colorectal cancer in Korea: A KASID study. *Korean J Gastroenterol*. 2005. 46:276-282.
- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*. 2014. 104:15-25.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev*. 2002. 15:79-94.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as *Lps* gene product. *J Immunol*. 1999. 162:3749-3752.

- Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Jung YR, Shin SI, Choi SD, et al. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*. 2003. 187:67-73.
- Kim HK. Effect of heated radish extract on DSS-induced ulcerative colitis and anti-inflammatory effect. *J Adv Eng Tech*. 2019. 12:163-171.
- Kim HS, Kim MA, Yishan D, Kang DS, Jang SH, Ryu JY, et al. Studies on the nutritional components and amino acid compositions of krill (*Euphausia superba*). *J Environ Sci Int*. 2014a. 23:165-170.
- Kim JH, Kim SA, Edwards MS, Lee IA. Anti-inflammatory effects of polyphenol extracts from *Ulva linza* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Toxicol Environ Health Sci*. 2018. 10:212-219.
- Kim NE, Kim YS, Jee SY, Hwangbo M. Anti-inflammatory effects of Cheongsimyanggyeok-san via NF- κ B inhibition. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2019. 32(2): 11-23.
- Kim SJ, Kim SH, Lim YI, Kim YG, Park KY. Inhibitory effects of ginger and beopje ginger on DSS-induced colitis in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014b. 43:477-484.
- Low D, Tran HT, Lee IA, Dreux N, Kamba A, Reinecker HC, et al. Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology*. 2013. 145:602-612.
- Matsumoto S, Watanabe N, Okabe Y, Umesaki Y. Enteric bacteria and their roles in inflammatory bowel disease. *Bioscience Microflora*. 1999. 18:1-9.
- Mizoguchi E, Mizoguchi A, Bhan AK. Insights from recent advances in animal models of inflammatory bowel disease. In: D'Amato M, Rioux JD, editors. *Molecular Genetics of inflammatory Bowel Disease*. Springer, Berlin, Germany. 2013. p 45-83.
- Pangestuti R, Bak SS, Kim SK. Attenuation of pro-inflammatory mediators in LPS-stimulated BV2 microglia by chitooligosaccharides via the MAPK signaling pathway. *Int J Biol Macromol*. 2011. 49:599-606.
- Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006. 16:4243-4245.
- Qiao Y, Bai XF, Du YG. Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol*. 2011. 11:121-127.
- Santos SD, Cahu TB, Firmino GO, de Castro CC, Carvalho Jr LB, Bezerra RS, et al. Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. *J Food Sci*. 2012. 77:H141-H146.