

Helicobacter pylori 감염에 의한 Cytokines 유전자 발현에 대한 治瘍湯의 효과

원광대학교 한의과대학 비계내과학교실 *
경희대학교 한의과대학 비계내과학교실 **

이형주*, 원진희*, 문구*, 문석재*, 박동원**

ABSTRACT

Effects of Chiyangtang on Helicobacter pylori-induced
increase of cytokines gene expression

Lee Hyung-ju*, Won Jin-hee*, Moon Goo*,
Moon Seok-jae*, Park Dong-won**

* Department of Gastrointèstinal internal medicine, College of
oriental medicine, Wonkwang University.

** Department of Gastrointèstinal internal medicine, College of
Oriental medicine, Kyunghee university.

Effects of Chiyangtang(CYT) on H. pylori-induced increase of interleukin 8 and interleukin 1 gene expression was studied in Kato III cell line, a human stomach epithelial cell line. Treatment of H. pylori to the cell culture significantly increased IL-8 and IL-1 mRNA synthesis. When CYT was added along with H. pylori, the increase of IL-8 and IL-1 mRNA synthesis was blocked. Activation of transcription factor NF- κ B

접수일 : 1999. 5. 24

심사일 : 1999. 7. 15

and AP-1 which were known to important in IL-8 and IL-1 gene expression was also studied using chloramphenicol acetyltransferase(CAT) assay. Treatment of *H. pylori* increased activation of NF- κ B and AP-1 and CYT effectively protected the activation. Electrophoretic mobility shift assay suggested that CYT effectively inhibited DNA binding of NF- κ B and AP-1 to their cognate site.

These results suggested that CYT could prevent stomach diseases through the down regulation of IL-8 and IL-1 gene expression which might be mediated by the inhibition of NF- κ B and AP-1 activities and their binding to DNA.

*KEY WORDS : *Helicobacter pylori*, Chiyangtang, IL-8 , IL-1, NF- κ B, AP-1

I. 緒論

Helicobacter pylori(*H. pylori*)는 위점막 상피 세포간 접합부에 서식하는 Gram음성 나선형 간균으로¹⁻⁵⁾ 세계 인구의 약 반수가 감염되어 있는 것으로 알려져 있으며⁶⁻⁸⁾, 우리나라의 경우 감염율이 이보다 높은 것으로 보고되고 있다⁹⁻¹⁰⁾. Warren 과 Mashall¹¹⁾이 처음으로 만성활동성위염 환자에서 분리해 낸 이후 많은 연구들¹⁻⁵⁾을 통해 만성위염, 위·십이지장궤양, 위암 등을 유발하는 중요한 인자로 인식되고 있다.

1996년 European *Helicobacter pylori* study group에서는 *H. pylori*가 위염, 위·십이지장궤양, 위암 발생의 중요한 원인으로 작용할 수 있음이 인정되어, 이에 대한 박멸 지침을 마련한 바도 있다⁸⁾. 그러나 이러한 박멸 요법은 감염율이 너무 높고, 부작용 발생율이 높다는 점과 박멸자체가 힘들며 실패시 동반되는 높은 내성의 발생이 문제점으로 제기 되었다¹²⁻¹⁴⁾.

이러한 문제점을 해결하기 위한 韓醫學的 치료 방법이 요구되나, 아직 國內에는 이에 대한 구체적인 研究가 보고된 바 없고, 中國에서는 陳松飛

등이 *H. pylori*의 양성율이 脾胃濕熱型의 實證에서 높다 하였고, 危北海 등은 脾胃虛弱型이 轉化한 熱狀으로 보았으며¹⁴⁻¹⁵⁾, 房¹⁶⁾은 扶正祛邪의 治法에 의한 치료 성과를 보고하는 등 *H. pylori*에 대해 辨證施治를 통한 치료 방법이 보고되어 있다.

韓醫學에서는 胃脘痛, 吞酸, 嘈雜, 噯氣, 惡心, 嘔吐 등이 위 및 십이지장질환에 相應하며¹⁷⁻¹⁹⁾, 治瘍湯은 이에 대한 치료방으로써 文²⁰⁾에 의해 구성되어 위·십이지장염 및 궤양의 치료에 활용되고 있는 方劑이다.

이에 저자는 *H. pylori*에 대한 治瘍湯의 효과를 실험을 통해서 究明해 보고자 인간 胃 상피세포에서 *H. pylori*의 감염에 의해 분비가 증가되는 interleukin 8(IL-8)²¹⁻²²⁾과 interleukin 1(IL-1)유전자 발현에 대한 治瘍湯의 보호효과를 실험하였고, 이에 관여하는 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성화에 대한 영향을 실험하여 有意性있는 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 실험 세포 배양

인간 위상피細胞柱인 KATO III cell line을 10% fetal bovine serum(FBS)과 2-merc - aptoethanol (50mM), L-glutamin (200mM), penicillin, streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 complete 배지에서 배양하였다. 배양시 조건은 온도 37℃, 5% CO₂ 농도를 유지하였다. 실험에 사용하는 세포는 5×10⁵ cells/ml이 되도록 배지를 더하여 희석하였으며, 이를 60mm animal

Prescription of Chiyangtang

本草名	生藥名(學名)	重量(g)
白芍藥	<i>Radix paeoniae lactiflorae</i> (<i>Paeonia japonica</i> (Makino) Miyabe et Takeda var.)	8.0
香附子	<i>Rhizoma cyperi</i> (<i>Cyperus rotundus</i> L.)	6.0
桂枝	<i>Ramulus cinnamomi</i> (<i>Cinnamomum loureirii</i> NEES.)	4.0
木香	<i>Radix saussurea</i> (<i>Inula helenium</i> L.)	4.0
烏藥	<i>Radix linderae</i> (<i>Lindera strychnifolia</i> Viel.)	4.0
蒼朮	<i>Rhizoma atractylodis</i> (<i>Atractylodes japonica</i> Koidz.)	4.0
陳皮	<i>Pericarpium citri nobilis</i> (<i>Citrus aurantium</i> L.)	4.0
厚朴	<i>Cortex magnoliae</i> (<i>Machilus thunbergii</i> Siebold et Zuscarnini)	4.0
烏賊骨	<i>Os sepiae</i> (<i>Sepia esculenta</i> Hoyle)	4.0
沒藥	<i>Myrrha</i> (<i>Commiphora molmol</i> Engler)	4.0
玄胡索	<i>Tuber corydalis</i> (<i>Corydalis turtschaninovi</i> BESS.)	4.0
黃芩	<i>Radix scutellariae</i> (<i>Scutellaria baikalensis</i> George)	4.0
沙參	<i>Radix adenophræ</i> (<i>Codonopsis lauceolata</i> Bentham et Hooker)	4.0
甘草	<i>Radix glycyrrhizae</i> (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer et De Candolle)	4.0
Total amount		62.0

cell culture dish에 plating 하여 이용하였다. 실험에 이용하기 위하여 접시 바닥을 cell scraper로 잘 긁어 준 뒤, 15ml tube에 담고 700rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 그 침전물만을 취하였다.

2) Helicobacter pylori의 배양

H. pylori는 10% FBS와 항생제인 vancomycin (1mg/ml), nalidixic acid(2.5mg/ml), 그리고 amphotericin B (100 μg/ml)가 포함된 Mueller-Hinton medium에서 배양하였다. 배양일은 최대 5일이 넘지 않도록 하여 계대 배양하였다. 배양 조건은 온도 37℃와 10% CO₂ 농도로 하여 유지하였다.

실험에 이용하기 위하여 H. pylori를 PBS에 suspension 한 뒤, spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 optical density(OD)값을 측정하였다. 모든 실험에서 사용한 양은 600nm에서 OD값이 0.1 이었다.

3) 藥材

本實驗에 사용한 藥材는 圓光大學校 光州韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였고, 處方的內容은 文²⁰⁾에 準하였으며 한첩分量은 표(Pr - escription of Chiyangtang)와 같다.

4) 검액의 제조

治瘍湯 2첩 분량 124g을 1500ml의 증류수를 가하여 100℃로 4시간 동안 증탕하여 550ml의 추출액을 얻은 후 이를 다시 증탕하여 농축시켰다. 최종 농축시킨 양은 280ml이었으며, 농축된 것을 Whatman filter paper No. 1으로 여과하였다.

2. 方法

1) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

60mm 세포 배양 dish에 plating 한 KATO III cell에 대하여 아무 것도 처리하지 않은 것, H. pylori를 처리한 것, H. pylori와 동시에 검액을 10%, 20%씩 처리한 것 등을 4시간 동안 5% CO₂, 37℃ incubator에서 배양하였다. 배양 후에

harvest를 하고 침전물에 TRI-reagent 1ml를 가하여 충분히 suspension 시켜 준 뒤 micro-centrifuge tube에 옮겼다. 여기에 0.2ml의 chloroform을 가한 뒤 각각 10~15초 동안 vigorously vortex 하였다. 1200rpm에서 15분간 원심 분리 한 뒤, 상층액만을 취하여 새 tube에 담았다. 여기에 0.5ml의 isopropanol을 가한 뒤 잘 섞어 주었다. 이를 잠시 방치한 뒤 12000rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물만을 취하였다. 침전물을 70% ethanol로 세척한 뒤에 nuclease-free water에 녹이고 일부를 취하여 260nm에서 RNA를 정량 하였다. 정량한 RNA는 1 μ g을 취하여 1% agarose gel을 걸어 모두 동일한 양인지 확인하였다.

위에서 동량으로 만든 RNA를 1 μ g 취하여 reverse transcription을 수행하였다. 이후에 polymerase chain reaction(PCR)을 진행하였다. Human IL-8 gene의 PCR primer는 다음과 같다.

Forward:

5'-TGTGCTCTCCAAATTTTTTTTACTG-3'

Reverse:

5'-CTCTCTTTCCTCTTTAATGTCCAGC-3'

그리고 Human IL-1 gene의 PCR primer는 다음과 같다.

Forward:

5'-AGTACGGCTATAGCCTGGACTTTCC-3'

Reverse:

5'-TGATTTAAAGAGAGCACACCAGTCC-3'

2) Chloramphenicol acetyltransferase(CAT) assay

Consensus NF- κ B site 또는, AP-1 site를 포함한 oligonucleotide를 가진 pCAT-vector를 이용하여 CAT assay를 수행하였다. 50mM Tris (pH 7.4) 용액에 왕성히 자라던 KATO III cell

과 NF- κ B 또는 AP-1 DNA (5 μ g), DE-AE-dextran (250 μ g/ml)을 넣어 주어 transfection 시켰다. 이것을 NF- κ B의 경우엔 40분간, AP-1의 경우엔 2시간 30분간 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 배양한 뒤, 1X HBS로 세척하여 100mm culture dish에 plating 하였다. 23시간 동안 배양한 다음 여기에 검액을 10%, 20% 가해 주었다. 그리고 1시간 후에 H. pylori를 각각 1000X 로 가한 뒤 18시간 동안 더 배양하였다.

이렇게 배양한 세포를 harvest 하여 freezing thawing 방법으로 세포를 lysis 시킨 뒤, cell lysate를 얻었다. 이것을 thin layer chromatography(TLC) 방법으로 CAT assay를 측정하였다. Cell lysate 100 μ g에 acetyl CoA와 [14C]-chloramphenicol을 각각 최종 농도 0.7mM, 0.52 μ Ci/ml이 되도록 하고 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 40분간 incubation한 다음 ethyl acetate로 추출하여 TLC로 분석하였다.

3) Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)

KATO III Cell에 30분 동안 H. pylori와 검액을 10% 또는 20%를 처리하여 준 뒤 세포를 harvest 하였다. 침전물에 lysis buffer (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl₂) 1ml를 가하여 세포를 터뜨렸다. 이것을 얼음에서 10-15분 정도 방치한 뒤 3000rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 여기에 K buffer (30mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 450mM KCl, 0.4mM EDTA, 10% glycerol, 1mM DTT, 1mM PMSF, aprotinin 1 μ g/ml)를 가하여 suspension 시킨 뒤 얼음에서 30분간 방치하였다. 14500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액만을 취하였다(nuclear extract). 이렇게 만든 extract는 소량씩 tube에 나누어 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

위에서 준비한 nuclear extract를 Bradford

assay²³⁾로 정량 하여 모두 동일한 양으로 만든 뒤, 5 μ g을 취하여 DNA binding reaction에 사용하였다. DNA binding reaction에는 32P로 label 된 DNA probe(NF- κ B, AP-1)와 함께 non-specific binding을 제거하기 위한 poly dIdC 1 μ g이 사용되었다.

4) Densitometric analysis

RT-PCR, CAT assay, EMSA의 실험에서 얻어진 data는 Image Quant (Molecular Dyan-micsTM)를 이용해서 상대비율을 구하였다. Hewlett Packard의 Scanjet 4C scanner로 각 data를 읽어들인 뒤, IQ program으로 block 당 volume의 비율을 측정하였다.

III. 實驗 成績

1. Interleukin 8 유전자 발현에 대한 영향

H. pylori 감염에 의한 IL-8 유전자 발현에 대한 영향을 평가하기 위하여 Kato III cell line에 양성대조군인 PMA + ionomycin, OD값 0.01, 0.1

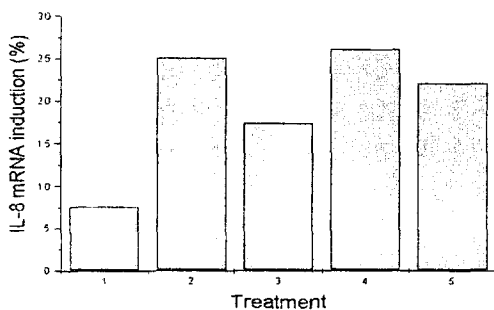


Fig 1. Induction of interleukin-8 (IL-8) mRNA synthesis by HP in KATO III cell line Lane 1 : Naive, 2 : PMA + Ionomycin (80nM+1 μ M), 3 : HP OD₆₀₀=0.01 4 : HP OD₆₀₀=0.1, and 5 : HP OD₆₀₀=1.0

및 1.0의 H. pylori를 배양액의 1/10농도로 가하여 4시간 동안 처리한 후 total RNA를 분리하였다. RNA를 cDNA로 reverse transcription 시킨 후 IL-8에 대한 primer를 사용하여 PCR를 수행한 결과, OD값 0.01, 0.1 및 1.0 농도에서 모두 mRNA 생성이 증가하였으며 특히, OD값 0.1 농도에서는 양성 대조군인 PMA + ionomycin과 유사한 정도로 IL-8 유전자 발현이 증가하였다(Fig 1).

H. pylori 감염에 의한 IL-8 mRNA 증가의 time-course를 조사한 결과, OD값 0.1을 배양액의 1/10 농도로 처리하였을 때 1시간 후부터 mRNA 생성이 증가하였으며, 8시간이 지난 후에는 약간의 감소 현상을 보였다(Fig. 2).

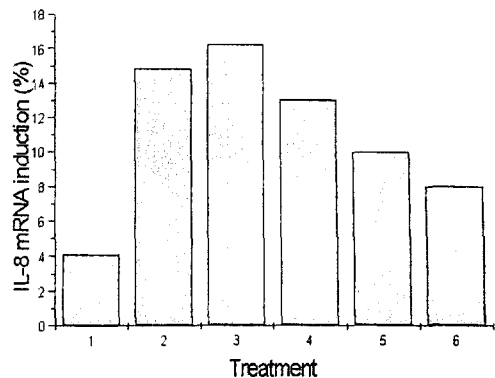


Fig 2. Time course effect of IL-8 mRNA induction by HP in KATO III cell line. (Lane 1 : 0 hr ; 2 : 1 hr ; 3 : 2 hr ; 4 : 4 hr ; 5 : 6 hr and 6 : 8 hr treatment)

H. pylori 감염에 의한 IL-8 유전자 발현에 대한 치양탕의 효과를 알기위해 검액과 H. pylori를 동시에 처리하였다. 이 결과 10%와 20%의 농도에서 모두 IL-8 mRNA의 생성이 현저히 감소되었다(Fig. 3).

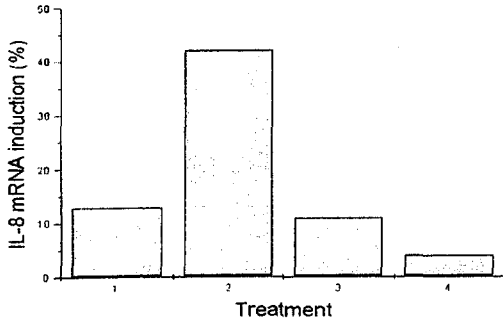


Fig 3. Protective effect of *CYT* on HP-induced increase of IL-8 mRNA synthesis. Lane 1 : Naive, 2 : HP only, 3 : HP + 10% *CYT* 4 : HP + 20% *CYT* HP and *CYT* was treated at the same time. * *CYT* : *Chiyangtang*

2. Interleukin 1 유전자 발현에 대한 영향

H. pylori 감염에 의한 IL-1 mRNA induction 결과, IL-8과 마찬가지로 *H. pylori*의 OD값을 0.01, 0.1 또는 1.0으로 조절하여 배양액의 1/10 농도로 4시간 처리한 결과, 모든 조건에서 IL-1 mRNA의 생성이 대조군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 4).

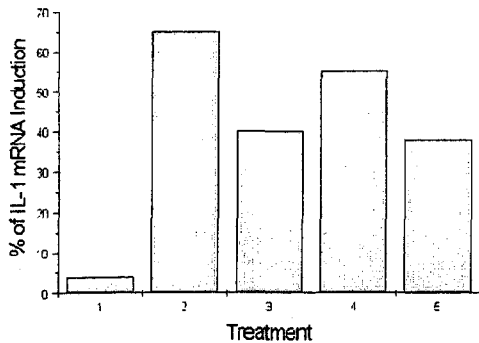


Fig 4. Induction of interleukin-1(IL-1)mRNA synthesis by HP in KATO III cell line Lane 1 : Naive, 2: LPS(100nM), 3 : HP(OD600=0.01) 4 : HP(OD600= 0.1) and 5 : HP(OD600=1.0)

H. pylori 감염에 의한 IL-1 유전자 발현에 대한 治瘍湯의 효과를 알기위해 검액을 10 또는 20%(v/v)의 농도로 배양액에 첨가하였을 때, *H. pylori*의 감염에 의하여 유도된 IL-1 mRNA의 생성이 두 농도에서 모두 현저하게 감소되었다(Fig. 5).

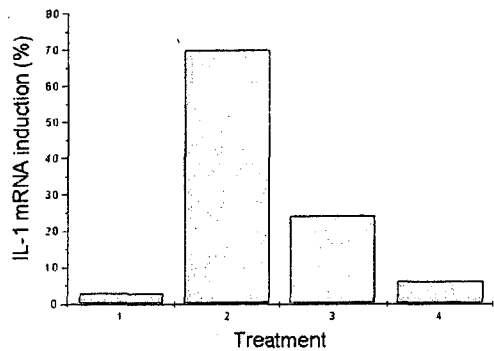


Fig 5. Protective effect of *CYT* on HP-induced increase of IL-1 mRNA synthesis in KATO III cell line. Lane 1 : Naive, 2 : HP only, 3 : HP + 10 % *CYT* 4 : HP + 20% *CYT* HP and *CYT* was treated at the same time. * *CYT* : *Chiyangtang*

3. 전사조절인자 NF- κ B와 AP-1의 활성화에 대한 영향

治瘍湯이 *H. pylori* 감염에 의해 유발되는 IL-8과 IL-1 유전자 발현을 억제함을 알 수 있었으므로 IL-8과 IL-1 유전자 발현에 매우 중요한 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성화에 대한 영향을 평가하였다.

NF- κ B site를 포함한 재조합 플라스미드를 Kato III 세포 내에 도입하여 *H. pylori*와 검액을 처리한 후 CAT 효소 활성도를 측정한 결과 *H. pylori* 대조군의 47%에 비해 10% 검액의 경우 7.5%, 그리고 20% 검액의 경우 0.7%로 상대적인 CAT 활성도가 현저히 감소하였다(Table 1).

Table 1. Densitometric analysis of the NF- κ B activation.

Lane	Treatment	Relative ratio
1	Native	43%
2	HP only	47%
3	HP+10%CYT	7.5%
4	HP+20%CYT	0.7%

*CYT : Chiyangtang

AP-1 활성도의 결과 또한 NF- κ B와 마찬가지로 검액을 10% 또는 20% 처리한 군은 상대적 활성도가 각각 26%와 13%로서, H. pylori 대조군 44%에 비하여 활성도가 현저히 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Densitometric analysis of AP-1 activation.

Lane	Treatment	Relative ratio
1	Native	15%
2	HP only	44%
3	HP+10%CYT	26%
4	HP+20%CYT	13%

*CYT : Chiyangtang

4. NF- κ B와 AP-1의 DNA 결합에 대한 영향

Table 3. Densitometric analysis of DNA binding activity of NF- κ B.

Lane	Treatment	Relative ratio
1	Native	9%
2	HP only	36%
3	HP+10%CYT	30%
4	HP+20%CYT	22%

*CYT : Chiyangtang

治瘍湯이 전사조절인자 NF- κ B와 AP-1의 활성도를 저해한 결과가 이들이 DNA에 결합하는 것을 방해하여 일어난 것인지 또는 DNA 결합 이후의 과정에 작용하는 것인지를 알아보기 위하여 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 수행하였다.

Kato III세포가 H. pylori에 의해 자극되면 cytosol에 있는 NF- κ B가 활성화되어 핵으로 이동한 후 IL-8과 IL-1의 promotor에 있는 결합 부위에 결합함으로써 진한 band를 관찰하게 되는 데, 治瘍湯은 이를 효과적으로 감소시켰다.

Densitometric analysis 결과 NF- κ B의 경우 H. pylori 처리군은 relative ratio가 36%로서 대조군의 9%에서 현저히 증가하였으며, 10%와 20% 治瘍湯의 처리 경우 relative ratio가 각각 30%와 22%로서 H. pylori 처리군에 비해서 감소함을 보였다(Table 3).

AP-1의 경우도 마찬가지로 H. pylori 처리군은 relative ratio가 40%로서 대조군의 33%에 비해 증가되었으며, 10%와 20% 治瘍湯 처리군은 각각 16%와 9%로 감소되었다(Table 4).

Table 4. Densitometric analysis of DNA binding of AP-1.

Lane	Treatment	Relative ratio
1	Native	33%
2	HP only	40%
3	HP+10%CYT	16%
4	HP+20%CYT	9%

*CYT : Chiyangtang

IV. 考 察

1983년 Warren과 Marshall¹¹⁾이 人體 胃 粘 膜 切片으로부터 H. pylori를 순수 培養한 이래 이

細菌은 胃腸疾患의 원인으로서는 큰 관심을 불러왔다. H. pylori의 생체 내 서식처는 胃의 幽門部와 前庭部로, 胃·十二指腸潰瘍²⁴⁻²⁵⁾과 慢性胃炎²⁶⁻²⁷⁾ 그리고 胃癌²⁸⁻²⁹⁾, 위림프종³⁰⁻³¹⁾과도 관계가 있다고 생각되고 있다. H. pylori의 일반적 특징은 그람음성(gram-negative)의 세균으로 微好氣性(microaerophilic)인 환경에서 살 수 있다^{8, 32)}. H. pylori가 微好氣性 세균이므로 이는 대기 중의 높은 산소 분압(20%)에서는 살지 못하는 것을 의미한다. 이러한 사실은 이 세균이 활성산소에 대해서 방어가 불가능함을 말한다. 따라서 다른 종류의 微好氣性 세균인 Campylobacter, Treponema, Borrelia 등의 전파 경로를 고려해 볼 때, 이 세균의 전파는 사람과 사람 사이의 접촉에 의한 것임을 짐작할 수 있다³³⁾.

H. pylori에 감염되지 않은 정상 胃粘膜 高유관에서는 염증세포가 관찰되지 않았으나, 감염환자에게서는 염증 세포의 심한 침윤과 동시에 lymphoid follicle이 발견되었다. H. pylori가 서식하는 위치는 이 세균을 제거하기 위한 人體의 自然的인 免疫體系로서는 도달하기가 어려운 곳이므로 이러한 상황이 오랜 기간동안 유지될 경우, H. pylori에 대항할 정도의 강력한 파괴력이 오히려 人體의 組織을 損傷시키는 결과를 나타낼 수 있다. 이것은 곧 免疫反應의 逆機能으로서 人體 胃粘膜에 作用할 것이고 그 결과, 慢性 萎縮性 胃炎, 十二指腸潰瘍, 胃癌 등이 誘發된다고 생각할 수 있다. 지금까지 밝혀진 바로는 이러한 질병들이 세균과 여기에 감염된 host factor에 依存的으로 일어난다고 생각된다³⁴⁾.

韓醫學的 접근을 위해 H. pylori가 誘發하는 特異 症狀를 알고자 하였으나, 아직 發症의 mechanism이 證明되지 않은 상태^{32,35)}이므로, 부득이 H. pylori가 유발하는 胃炎, 消化性潰瘍 등의 질환에서 症狀를 分析하였다. 대체로 消化性潰瘍의 경우 主症狀이 胃脘痛을 보인다는 점, 胃炎의 경우 特異 症狀를 보이지는 않지만 위산분비의 조절 과정에 영향을 주어 消化不良을 誘發한다는

점³⁵⁻⁴⁰⁾에서 胃脘痛과 痞滿이 主症으로 보인다. 房¹⁶⁾의 研究에도 臨床症狀이 上腹痛, 嘈雜, 噯氣, 腹脹 등의 순서로 나타나 內經⁴¹⁾에 “胃病者 腹脹, 胃脘當心而痛, ...膈咽不通, 飲食不下”라 하였듯이 病變이 胃腑에 있음을 알 수 있다.

韓方 辨證上 陳松飛 등에 따르면 H. pylori의 양성율이 脾胃濕熱型의 實證에서 높다 하였으나, 危北海에 의하면 脾胃虛弱證이 爲主인데 여기서 轉化하여 熱狀을 띠게 되어 本虛標實한 證候의 急性 活動性 炎症소견으로 보여진다 하였다¹⁴⁾. 房¹⁶⁾은 扶正祛邪의 治法에 立脚한 治療로 항생제 투여군과 비교하여 類似한 정도의 H. pylori 박멸을 보였고, 症狀개선 측면에서는 오히려 優位임을 입증하였다.

臨床上 脾胃病의 病期가 길어지면 虛實挾雜에 이르게 되므로^{15, 42)}, 慢性화된 경우에는 대부분 扶正祛邪의 治法이 필요하게 된다⁴³⁻⁴⁴⁾. H. pylori가 유발한 위장 질환의 경우 病期가 길어지는 경향^{12, 15)}을 보이므로, 扶正祛邪法이 중요한 治療方針이라 생각된다.

治瘍湯은 이러한 요구에 부합하는 처방으로 방제 구성상 虛寒證에 해당하는 建中湯, 胃陰虛에 쓰이는 一貫煎, 鬱熱證의 左金丸, 瘀血證의 膈下逐瘀湯, 食鬱, 食積의 平胃散을 참고하여 구성되었다^{20, 45-47)}. 본래는 文²⁰⁾에 의해 消化性潰瘍의 通治方으로 고안된 처방으로 消化性潰瘍의 임상적 특징과 辨證施治에 기초하여 疏肝解鬱, 和胃, 活血生氣, 解痙鎮痛, 制酸의 관점에서 구성된 方劑이다²⁰⁾. 본 연구에서는 病期가 짧은 실험의 특성상 慢性 虛寒證에 주로 활용되는 黃芪를 H. pylori에 대해 억제효과가 있고, 清熱解毒한 효능이 있어, 抗菌·消炎作用이 있는 黃芩⁴⁸⁻⁴⁹⁾으로 대체하여 사용하였다.

本處方 중 柴胡, 香附子, 白芍藥, 玄胡索은 氣滯證에, 桂枝, 甘草는 虛寒證에, 沙蔘, 白芍藥은 胃陰虛에, 沙蔘, 白芍藥, 黃芩은 鬱熱證에, 香附子, 玄胡索은 瘀血證에, 蒼朮, 厚朴, 陳皮는 食鬱, 食滯證을 각각 치료하는 효능이 있어²⁰⁾ 通治方으로

적합하리라 생각된다.

현재까지 H. pylori에 대한 한약재의 연구에서는 黃連, 大黃, 烏梅, 丹蔘, 三七根, 黃芩, 蒲公英, 白花蛇舌草, 半枝蓮, 徐長卿, 蓬朮 등이 H. pylori에 대해 抗菌作用이 있다고 보고되었다¹⁴⁻¹⁵⁾. 본 연구에서는 治瘍湯의 胃·十二指腸 질환에 대한 治療效果를 분자생물학적으로 究明하고자 Kato III cell line에서 H. pylori 감염에 의한 IL-8과 IL-1의 유전자발현에 대한 영향을 분석하였다.

H. pylori에 의해 활성화된 위 점막세포는 PTK(protein tyrosine kinase) pathway가 활성화되고 이에 의해 IL-8의 발현에 중요한 전사조절인자인 NF- κ B가 활성화된다. IL-8의 유전자 발현은 AP-1과 NF-IL6와 같은 다른 전사조절인자들과 함께 있을 때 더 높아지는데 이러한 것은 cell type에 의존적인 현상이다. KATO cell이나 MKN45 cell과 같은 경우에는 특히 AP-1이 NF- κ B의 cis element로 작용하므로 NF-IL6 보다 중요하다고 알려져 있다⁵⁰⁾. 또한 여러 실험을 통해서 NF- κ B에 의한 IL-8의 gene transcription 증가는 NF- κ B site를 억제하는 경우 IL-8유전자의 발현이 잘 되지 않음이 보고되었다⁵¹⁾.

H. pylori에 의해 위 점막세포가 자극되면 cytosol에 있는 AP-1과 NF- κ B가 활성화되어 핵으로 이동한 후 IL-8과 IL-1의 promoter에 있는 결합 부위에 결합하게 되는데, 治瘍湯 투여시 이를 효과적으로 감소시킴을 볼 수 있었다 (Table 3).

본 실험의 결과 治瘍湯은 인간 胃 상피세포인 Kato III cell line에서 H. pylori의 감염에 의해 유발되는 IL-8과 IL-1 유전자 발현을 효과적으로 억제시켰으며, 이는 전사 조절인자 NF- κ B와 AP-1의 활성도를 억제하여, 이들이 유전자의 promotor 부위에 결합하는 것을 방해하기 때문으로 思料된다.

V. 結 論

治瘍湯의 H. pylori 감염에 의한 위·십이지장 질환에 대한 치료 효과를 분자생물학적으로 究明하고자 interleukin 8과 interleukin 1 유전자 발현에 대한 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 治瘍湯은 인간 위 상피세포인 Kato III cell line에서 H. pylori의 감염에 의한 IL-8과 IL-1 mRNA 증가를 효과적으로 감소시켰다.

2. 治瘍湯은 IL-8과 IL-1 유전자 발현에 중요한 전사조절인자인 NF- κ B와 AP-1의 활성도를 효과적으로 감소시켰다.

3. 治瘍湯이 IL-8과 IL-1의 mRNA 생성을 감소시키는 것은 전사조절인자 NF- κ B와 AP-1의 활성도를 감소시켜, 이들이 유전자의 pro-motor 부위에 결합하는 것을 저해하기 때문인 것으로 究明되었다.

參 考 文 獻

1. 김정목·조양자·박경남·고영혜·정용훈·이인홍·한상진·김기호 : 한국인의 Campylobacter pylori 감염증 대한의학회지, 1989, 32:1091~1102.
2. 정현채·최상윤·송역옥·이효석·윤용범·송인성·최규완·김정룡·김의중·김봉철·김우호 : 소화성 궤양, 위염 및 기능성 위장장애 환자에서 Campylobacter pylori의 검출과 이에 대한 혈청 IgG 항체가의 의미, 대한소화기병학

- 회지, 1988, 20:47~56.
3. 이광호 · 조명제 · 김종배 · 최상경 · 김영채 : 위 십이지장 염증성 질환과 *Campylobacter pylori*에 관한 연구. 대한미생물학회지, 1988, 23(1):9~16.
 4. 이광호 · 조명제 · 김종배 · 최상경 · 김영채 · 박철근 · 최진학 · 최국진 : 위내시경생검체에서 분리한 *Campylobacter pylori*의 미생물학적특성, 대한미생물학회지, 1988, 23(1):17~26.
 5. Grahma DY, Klein PD, Opekun AR and Boutton TW : Effect of age on the frequency of active *Campylobacter pylori* infection diagnosed by the [13C] urea breath test in normal subjects and patients with peptic ulcer disease. J. infect. Dis. 1988, 157:777~780.
 6. Sitas F, Forman D, Yarnell JWG, Burr ML, Elwood PC : *Helicobacter pylori*infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. Gut, 1991, 32 : 25~28.
 7. Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM : Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori*infection. N Engl. J Med., 1990, 322: 359~363.
 8. Malfertheiner P, Megraud F, O' Morain C : Current European concepts in the management of *H. pylori* infection ; the Maastricht Consensus report. Eur J Gastroenterol Hepatol., 1997, 9:1~2.
 9. 이광호 : *Helicobacter pylori* 감염의 세균학적 특성, 대한의사협회지, 1997, 40(9).
 10. 최중영 · 방충상 · 양영상 · 박수현 · 채현석 · 최명규 · 정인식 · 박두호 · 김부성 : 한국에서의 *Helicobacter pylori* 감염의 유행을, 대한내과학회지, 1995, 47(1).
 11. Marshall BJ : Consistent curved bacilli and gastric epithelium inactive chromic gastritis. Lancet, 1983, 1:1273~1275.
 12. 김나영 · 박용주 · 안경주 · 이규현 · 임병철 · 임선희 · 이계희 : 소화성궤양에서 *H. pylori* 박멸을 위한 치료방법의 비교, 대한소화기학회지, 1996, 28(2) : 117.
 13. 신동운 : *Helicobacter pylori* 감염 소아와 그 부모에서 Western Immunoblot Technique 으 이요하 혈청학적 양상, 충북대학교 대학원, 1994, 27(2) 27~34
 14. 醫藥技術出版社, 北京, 1990, pp.64, 33, 121, 134, 438~440.
 15. 洪文旭 · 洪泓 : 實用中醫消化病學, 天津科技翻譯出版公司, 天津, 1994, pp.64, 491~496.
 16. 房靜遠 : 扶正去邪法治療幽門彎曲菌感染性胃病的臨床與理論探討, 南京中西醫結合雜誌, 1991, 11(3) : 150~152.
 17. 上海中醫學院 : 內科學, 上海科學技術出版社, 上海, 1979, pp.75~79.
 18. 陳貴廷 · 楊思澍 : 實用中西醫結合診斷治療學, 一中社, 서울, 1992, pp.423~441.
 19. 文錫哉 · 文九 · 元秦喜 : 新脾系內科學, 圓光大學校 出版局, 익산, 1999, pp.142~162, 412~475.
 20. 文九 · 임규상 · 최현 : 消化性潰瘍의 治法 및 通治方活用に 대한 考察, 圓光韓醫大論文集, 1989, 6 : 183~196.
 21. Hwang MJ, O'Toole PW, Doig P and Trust TJ : Stimulation of interleukin-8 production in plthelial cell lines by *Helicobacter pylori* infect. immun., 1995, 63: 1732~1783.
 22. Nuach LA, Bosma NB, Janse J, Hoek FJ, Van Deventer SJ and Tytgat GN : Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in pattents with *Helicobacter pylori* infection, Scand. J. Gastroenterol., 1994, 29: 425~

- 429.
23. Boyer, R :Modern Experimental Biochemistry, 2nd ed. Benjamin / Cumming Publishing Co., 1993, p.54.
 24. Leung KM, Hui P : Helicobacter pylori related gastritis and gastric ulcer. Am J Clin Pathol., 1992, 98 : 569~574.
 25. Andersen LP, Holck S, Povlsen CO, Elsborg L, Justesen T: Campylobacter pyloridis in peptic ulcer disease. I. Gastric and duodenal infection caused by Campylobacter pyloridis : Histopathologic and microbiologic findings. Scand J Gastroenterol., 1987, 22 : 219~224.
 26. 정순봉 : Helicobacter pylori가 만성위염과 위암의 점막에 미치는 형태학적 변화에 대한 면역조직화학적 및 전자현미경적 연구, 조선대학교 대학원, 1997.
 27. Blaser MJ : Gastric campylobacter-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. Gastroenterol., 1987, 93 : 371~383.
 28. Tsaka M, Kimura T, Kato M : Possible role of Helicobacter pylori infection in early gastric cancer development. Cancer, 1994, 73: 2691~2694.
 29. Endo S, Ohkusa T, Saito Y, Fujiki K, Okayasu I, Sato C : Detection of Helicobacter pyloriinfection in early stage gastric cancer. Cancer, 1995, 75:2203~2208.
 30. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L : Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N Engl J Med., 1994, 330(18): 1267~1272.
 31. Enno A, O'Rourke JL, Howlett CR, Jack A, Dixon MF, Lee A: MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with Helicobacter felis : A mouse model of Helicobacter pylori induced gastric lymphoma. Am J Pathol., 1995, 147(1):217~222.
 32. Julie Parsonnet : Helicobacter pylori: Infectious disease clinics of North America, 1998, 12(1): 185~197.
 33. Jung HC : Etiologic role of Helicobacter pylori in the pathogenesis ofhistologic chronic gastritis, Seoul J. Med., 1990, 31:231.
 34. Peterson WL : Helicobacter pylori and peptic ulcer disease, N. Engl. J.Med., 1991, 324:1043.
 35. Anthony SF, Eugene B, Kurt JI, Jean DW, Joseph BM : Harrison's Principles of Internal Medicine 15th edition, McGrow Hill, USA, 1998, pp.1599~1613.
 - 36.李文鎬 : 內科學, 學林社, 서울, 1986, pp. 861~897.
 37. 全國韓醫科大學 脾系內科學教室 : 脾系內科學, 그린문화사, 서울, 1994, pp.229~253.
 38. 李恩夏 : 胃病研究, 河北科學技術出版社, 石家莊市, 1997, pp. 105~106.
 39. 龐鴻茹 : 萎縮性胃炎治療案 100例, 北京科學技術出版社, 北京, 1993, pp.142~144.
 40. 大韓病理學會: 病理學, 高文社, 서울, 1995, pp.676~677.
 41. 郭霽春 : 黃帝內經 靈樞校注語譯, 醫聖堂, 서울, 1993, pp.50~51.
 42. 危北海 : 中醫脾胃學說, 北京出版社, 北京, 1993, pp.194~212.
 43. 張介賓 : 景岳全書, 大星文化社, 서울, 1988, pp. 13~14, 512~525.
 44. 徐復霖·田維君·吳仕九 : 脾胃理論與臨床, 湖南科學技術出版社, 長沙, 1990, pp.70, 72.
 45. 許凌 : 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, 1987, pp. 150, 430, 452.
 46. 黃度淵 : 證脈 方藥合編, 南山堂, 서울, 1989,

- pp.48, 142, 229.
47. 康舜洙 : 바른 방제학, 大星文化社, 서울, 1996, pp. 102~103.
48. 辛民教 : 臨床本草學, 南山堂, 서울, 1986, pp. 175, 223, 229, 308, 380, 385, 387, 388, 393, 414, 454, 470, 518, 690.
49. 李尙仁 : 漢藥臨床應用, 成輔社, 서울, 1990, pp.37, 114, 216, 218, 225, 231, 233, 234, 275, 292, 323, 360, 368, 404.
50. Aihara M : Mechanism involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by gastric cancer cell line, MKN451), *infect. Immu.*, 1997, 65, 3218~3224.
51. Igor CO : Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF- κ B site, *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14: 5300~5308.