

원 지

흰쥐의 급성 십이지장 손상에 대한 半夏瀉心湯의 방어효과에 관한 연구

한이수, 최준혁, 임성우

동국대학교 한의과대학 내과학교실

A Study on the Defence Effect of *Banhasasim-tang* for White Rat's Acute Duodenal Injury

I-Su Han, Jun-Hyuk Choi, Seong-Woo Lim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : *Banhasasim-tang* has been clinically used to treat upper gastric intestinal discomfort. The object of this study is to examine the defense effect of *Banhasasim-tang* for acute duodenal injury of the mouse.

Methods and Materials :

Twenty-one rats were divided into 3 groups and treated as follows: the control group was untreated mice. The ADE group was acute duodenal-damage-elicited mice. The BST group was *Banhasasim-tang* treated mice before acute duodenal damage elicitation.

The groups were examined with common morphology, paneth cells in intestinal crypt, absorptive cells and goblet cells in epithelium, cell division in mucosa, COX-1 as mucosal protector, COX-2 (which appears to play an important role in inflammation), IL-2R-inducing cellular immuno-chainreaction, and the distribution of apoptotic cells.

Results :

1. Common morphology: the ADE group was observed with duodenal injury - loss of villi, infiltration of cells concerned to inflammation (lymphocytes, granular leukocytes) to submucosal layer - by hemorrhagic erosions, while the BST group was seen the same as normal in proportion to increasing treatment time before injury.

2. Histochemical change: the ADE group was observed with noticeable decreased distribution of absorptive cells with microvilli, acid mucin secreted goblet cell, neutral mucin secreted goblet cell, paneth cells compared to the normal group. The BST group was seen to have distribution of epithelium cells resembling normal in proportion to increasing treatment time before injury.

3. Immunohistochemical change: the ADE group showed a change of factors leading to duodenal injury as reduce of cytokinesis, COX-1, increase of COX-2, IL-2R-. In contrast, the BST group tended to reduction of cytokinesis, COX-1, increase of COX-2, IL-2R- in proportion to increasing taking time before injury.

4. Apoptosis change: the ADE group showed increasing apoptosis cells, in contrast to the BST group which was the same as normal in proportion to increasing treatment time before injury.

Conclusions : According to the above results, by increasing the defense system of mucosal epithelium, *Banhasasim-tang* is thought to effectively protect tissue against ulcers resulting from acute duodenal injury. (*J Korean Oriental Med 2002;23(3):188-199*)

Key Words: *Banhasasim-tang*, acute duodenal injury, COX-1, COX-2, IL-2R-. the defense system.

서 론

소화성 궤양의 많은 부분을 차지하는 십이지장 궤양은 흡연자와 nonsteroidal anti-inflammatory drug(NSAID) 와 같은 약물의 습관적 복용자에게 발생 빈도가 높고 심와부 동통 및 불쾌감, 메스꺼움, 식욕부진 등의 증상이 리듬성을 나타내며, 10-20% 정도에서 출혈과 함께 궤양으로 발전하여 흔한 재발성의 특징을 가진다¹⁾. 치료는 원인인자의 제거, 공격인자의 억제, 방어 인자의 증강 등이 복합적으로 사용된다²⁾.

십이지장의 출혈과 궤양은 한의학적으로 痞滿, 呑(吐)酸, 嘈雜, 胃脘痛, 吐血, 便血 등의 범주에 속하고 健脾, 消導, 溫中, 除濕, 清熱, 止血, 止痛 등의 치법이 사용되고 있으며³⁾, 실험연구로 手拈散⁴⁾, 丹蔘補血湯 및 保和丸⁵⁾, 香砂六君子湯⁶⁾ 등이 위액 분비기능과 조직학적 변화를 통한 점막손상의 회복 효과를 보고하였다.

이에 저자는 문헌에 心下滿而不痛, 乾嘔, 嘔吐, 腸鳴下痢를 治하는 것으로 보고된⁸⁾ 半夏瀉心湯이 십이지장 점막손상에 예방 효과가 있을 것으로 사료되어, 흰쥐에 먼저 半夏瀉心湯을 투여하고 십이지장에 출혈과 궤양을 유발하였을 때 나타나는 억제효과를 조직학적, 면역조직학적으로 살펴보아 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

대한 실험 동물 센터에서 분양 받은 테링 4주된 ICR계 수컷 생쥐를 무균 사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 30g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 대조군, 급성 십이지장 손상 유발군(ADE군), 半夏瀉心湯 추출물 투여 후 급성 십이지장 손상 유발군(BST군)으로 나누고 각 군 당 7마리씩 배정하였다. BST군은 급성 십이지장 손상 유발 직전, 24시간 전, 48시간 전 그리고 72시간 전으로 세분하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용한 半夏瀉心湯은 仲景의 <傷寒論>에 근거하여, 동국대학교 부속 강남한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며 1첩의 내용과 분량은 (Table 1.)과 같다. 半夏瀉心湯(Banhasasim-tang: BST) 2첩을 증류수 500 ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과한 후 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압 농축한 후 BST군에 급성 십이지장 손상 유발 직전, 24시간, 48시간, 72시간전에 2.5 ml/kg 량을 각각 구강투여 하였다.

Table 1. The Amount and Composition of *Banahnsasim-tang*(BST) Extract

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
<i>Pinellia ternata</i>	Rhizomes	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	15.00
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Roots	<i>Scutellariae Radix</i>	11.25
<i>Panax ginseng</i>	Roots	<i>Ginseng Radix</i>	11.25
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Roots	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	11.25
<i>Zingiberis officinale</i>	Rhizomes	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	7.50
<i>Coptis chinensis</i>	Rhizomes	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3.75
<i>Zingiber officinale</i>	Rhizomes	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	6.00
<i>Zizyphus jujuba var. inermis</i>	Fruit	<i>Jujubae Fructus</i>	7.50
Total amount			73.50

2. 방법

1) 급성 십이지장 손상 및 일반 표본 제작

급성 십이지장 손상을 유도하기 위해 indomethacin(Sigma, USA)을 0.9% NaCl이 포함된 70% 에탄올에 희석시킨 후 25 mg/kg을 ADE군과 BST군에 응용투여 하였다. 급성 십이지장 손상 유발 6시간 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin: NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위 날문(pyloric part) 연결부위의 십이지장을 적출하여 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직을 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작하여 십이지장의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

2) 조직화학 염색 표본 제작

가. 점막상피세포의 변화 관찰

십이지장 점막상피에서 흡수세포(absorptive cell)와 술잔세포(goblet cell)의 변화를 조사하기 위해 Alcian blue-PAS-Orange G 염색을 실시하였다. 먼저 절편을 alcian blue solution(pH 2.5 : Sigma)에 30분간 염색시킨 다음 periodic acid(Sigma)에서 10분간 산화시킨 후 schiff reagent에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 완충을 위해 sulfurous rinse에 각 2분씩 3회 세척하고 hematoxylin에서 1분 동안 대조 염색하여 5% orange G(Sigma)용액에 처리한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 파넷 세포의 변화 관찰

십이지장 고유판에 형성된 창자샘(intestinal crypt)에 분포하는 파넷 세포(paneth cell)의 변화를 관찰하기 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액으로 30분간 반응시킨 다음 tartrazine 용액에서 분별하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 표본 제작

가. 점막상피세포의 증식 관찰

미분화 세포로부터 증식·분화된 점막상피세포의 분포변화를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU, Sigma) 50 mg/kg를 흰쥐의 십이지장을 적출하기 5시간, 3시간, 1시간전에 각각 복강주사 하였다. 얻은 연속절편을 4 °C와 37 °C의 2NHCl 용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 유발하고 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후, 비특이적 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO, Denmark)가 포함된 normal goat serum(1:20, DAKO)에 1시간 동안 반응시켰다. 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4°C incubation chamber 내에서 48시간 동안, 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1:100, DAKO)에 실온에서 4시간 동안 각각 반응시켰다. Avidin biotin complex(ABC : Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 점막 내 cyclooxygenase-1 분포 관찰

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K에 5분 동안 proteolysis한 후, blocking serum인 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시킨 다음 1차 항체인 rabbit anti-mouse COX-1(1:250, Chyman, USA)에 4°C humidified chamber에서 48시간 동안, 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG(1:100, DAKO)에 4°C humidified chamber에서 24시간 동안 각각 반응시켰다. 이후 '가. 점막상피세포의 증식 변화'에 기술한 방법과 동일하였다.

다. 점막 내 염증 관찰

점막 내 염증변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse COX-2(1:500, Chyman)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, '가. 점막상피세포의 증식 변화'에서 기술한 방법으로 실시되었다.

라. 점막 내 세포성 면역 관찰

점막 내 세포성 면역 변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse IL-2R- α (CD 25R- α : Pharmingen, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, '가. 점막상피세포의 증식 변화'에서 기술한 방법으로 실시되었다.

4) Apoptosis 변화 관찰

Apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 in situ apoptosis detection kit(Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL(terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K(20 μ g/ml)에 5분간 proteolysis 시켜 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그 다음 strength TdT enzyme(36 μ l TdT enzyme : 72 μ l reaction buffer)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하여. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하여 Hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 영상분석과 통계

면역조직화학과 TUNEL 염색 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하여 Sigma Plot 4.0(Sigma)을 통한 student T test로 유의성을 입증하였다.

실험 결과

1. 일반 형태변화

ADE군의 많은 용모에서 출혈성 침식(hemorrhagic

erosion)이 관찰되었고, 일부 출혈성 침식부위의 확대로 인한 용모의 유실도 있었다. 출혈성 침식이 일어난 점막은 상피세포가 소실되었고, 주변 용모의 일부 점막상피에서도 정상적인 상피세포의 형태가 나타나지 않았다.

고유판(lamina propria)에서는 많은 수의 림프구, 섬유모세포, 과립백혈구 등 염증관여세포의 침윤(infiltration)이 일어나, 점막근층(muscularis mucosae)뿐 아니라 점막밑층(submucosa)까지 확대되었다. 또한 고유판에 분포하는 창자샘(intestinal crypt) 바닥근처에서는 여러 분비세포의 유실이 확인되었다(Fig. 1).

급성 십이지장 손상 유발 전에 半夏瀉心湯 추출물을 투여한 BST군에서는 사전투여 시간에 따른 십이지장 손상의 정도가 관찰되었다. 72시간 사전 투여군에서 가장 적은 조직손상이 관찰되어, 일부 지역을 제외한 대부분의 지역에서 대조군과 같은 정상적인 십이지장 조직형태가 나타났는데, 점막상피 대부분에서 미세융모(microvilli)를 가진 흡수세포가 관찰되었고, 술잔세포의 분포도 대조군과 동일하였으며 고유판에서도 림프구를 비롯한 여러 세포들의 분포와 창자샘의 배열이 정상적이었다(Fig. 2).

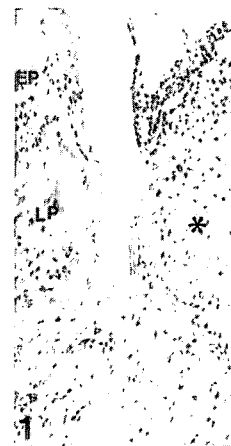


Fig. 1. The morphology of villi from ADE mice. The hemorrhagic erosions(Asterisk) are seen. EP, epithelium; LP, lamina propria. H & E. \times 200

2. 조직학적 변화

1) 파넛 세포의 변화

대조군의 Lendrum phloxine-tartrazine 염색 결과 붉은 색으로 염색된 분비과립의 분포를 통해 파넛 세포가 창자샘 바닥 쪽에 다수 분포하고 있는 것으로 관찰되었고, ADE군에서는 파넛 세포의 수가 감소하였으며, 관찰된 파넛 세포에서 붉은 색의 양성반응을 보이는 분비과립은 세포 주변부(halo)에 적은 수로 나타났다. 파넛 세포가 분포하는 창자샘 주변 고유판에는 많은 수의 호산성 백혈구와 T 림프구의 침윤이



Fig. 2. The morphology of villi from BST treated mice at 72 hours before ADE. The configuration of EP in villi were the same as normal. Vacant arrow head, goblet cell; Occupied arrow head, absorptive cell with microvilli; Arrow, paneth cell. H & E. ×200

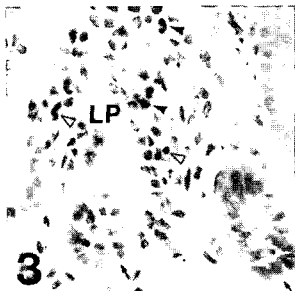


Fig. 3. The distribution of paneth cells in intestinal crypt(IC) from ADE mice. The noticeable decrease of paneth cells with reddish granules were seen and infiltration of lymphocytes(Vacant arrow head) and granular leukocytes(Occupied arrow head) were increased. Arrow, paneth cell in IC. Phloxine-tartrazine. ×400

관찰되었다(Fig. 3).

BST 추출액 72시간 사전투여군의 파넛 세포에서 가장 많은 호산성 분비과립을 관찰할 수 있었고 붉은 색의 양성반응 과립은 세포 주변부뿐만 아니라 심부(core)에서도 강한 양성반응을 보였다. 백혈구 침윤은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

2) 점막상피세포의 변화

십이지장 점막상피에서 흡수세포(absorptive cell)와 술잔세포(goblet cell)의 변화를 조사하기 위해 Alcian blue-PAS-Orange G 염색을 실시하였다. 대조군에서 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 술잔세포는 검붉은 색으로 염색되었고, 산성점액질(acid mucin)을 분비하는 술잔세포는 적자색으로 염색되었고 적

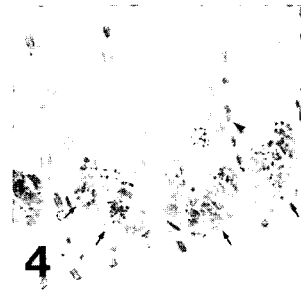


Fig. 4. The distribution of paneth cells in IC from BST treated mice at 72 hours before ADE. The paneth cells(Arrow) with reddish granules were seen. Phloxine-tartrazine. ×400

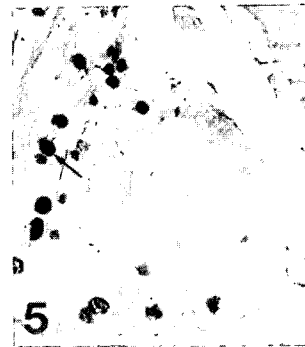


Fig. 5. The distribution of goblet cells in EP from ADE mice. The noticeable decrease of goblet cells and absorptive cells with brush border were seen. Long arrow, acid mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. ×200

자색의 술잔세포 수가 검붉은 색의 술잔세포보다 많았으나 ADE군에서 출혈성 침식 주변의 점막 상피는 두개의 술잔세포 모두 적은 수였다(Fig. 5).

BST 추출액 72시간 사전 투여군은 대조군과 비슷한 분포경향을 보여 ADE군에서 비해 술잔세포의 수가 많았고(Fig. 6), 창자샘의 바닥 부위에서도 분비과립이 가득 찬 술잔세포들이 많이 관찰되었다(Fig. 8).

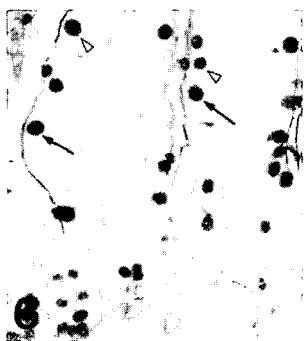


Fig. 6. The distribution of goblet cells in EP from BST treated mice at 72 hours before ADE. The configuration of goblet cells and absorptive cells were the same as normal. Vacant arrow head, neutral mucin secreted goblet cell; Long arrow, acid mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. $\times 200$



Fig. 7. The magnification of EP in Fig. 6. The 2 typed goblet cells and absorptive cells(Arrow) with microvilli were seen. Long arrow, acid mucin secreted goblet cell; Vacant arrow head, neutral mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. $\times 400$



Fig. 8. The magnification of base in IC of Fig. 6. The 2 typed goblets cell and paneth cells(Long arrow) were seen. Vacant arrow head, acid mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. $\times 400$

ADE군에서 흡수세포의 표면에서 용모로 인한 슬모양 가장자리는 관찰되지 않았지만(Fig. 5), BST군에서는 검붉은 색 양성반응을 보인 슬모양 가장자리가 잘 나타났다(Fig. 7).

3. 면역조직화학적 변화

1) 점막상피세포의 증식 변화

미분화세포로부터 증식·분화된 점막상피세포의 분포변화를 조사하기 위해 BrdU 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 세포핵에 양성반응을 보이는 세포가 창자샘 주변부에 분포했고, ADE군의 출혈성 침식 지역에서는 BrdU 양성반응세포가 관찰되지 않았으나(Fig. 9), BST 추출액 72시간 사전 투여군에서는 BrdU 양성반응세포가 ADE군보다 많은 수로 관찰되어(Fig. 10), 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

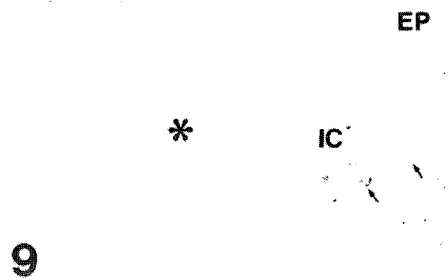


Fig. 9. The immunohistochemical stain for BrdU in villi from ADE mice. The BrdU positive cells(Arrow) in region of hemorrhagic erosion(Asterisk) were disappeared. $\times 200$.



Fig. 10. The immunohistochemical stain for BrdU in villi from BST treated mice at 72 hours before ADE. The BrdU positive cells(Arrow) in IC surrounded region were seen. $\times 200$.

Table 2. The Image Analysis of Immunohistochemistry and TUNEL in BST treated Murine Duodenum before Acute Duodenal Damage.

Antibody	CONTROL		ADE		BST	
	particle	intensity	particle	intensity	particle	intensity
BrdU	2314±17.4	121.8±25.2	833±15.4	124.2±19.6	2208±22.5*	122.9±27.3
COX-1	4280±21.4	130.1±19.4	444±17.8	137.0±11.6	4040±19.3*	131.9±16.1
COX-2	895±23.6	139.4±11.5	6949±22.3	116.4±26.1	950±15.8*	137.3±12.7
IL-2R- α	913±22.6	139.4±20.5	3998±15.3	132.4±14.8	957±17.5*	136.0±22.0
Apoptosis	2847±19.8	119.6±24.2	12931±21.9	117.6±26.1	3001±22.1*	118.4±27.3

(image analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Values are Mean ± Standard Deviation

CONTROL : No treated mice

ADE : Acute duodenal damage elicited mice

BST : BST treated mice before acute duodenal damage elicitation

BrdU : bromodeoxyuridine

COX-1 : cyclooxygenase-1

COX-2 : cyclooxygenase-2

* : P < 0.05 compared with ACD.

2) 점막 내 COX-1 분포 변화

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 COX-1의 분포변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 COX-1 양성반응세포가 용모의 고유판에 분포하였고, ADE군의 일부 출혈성 침식 지역과 주변 용모의 고유판에서 적은 수의 COX-1 양성반응세포가 관찰되었으나(Fig. 11), BST 추출액 72시간 사전 투여군의 고유판에서는 ADE군 보다 많은 수가 나타나(Fig. 12, 13) 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

3) 점막 내 COX-2 분포 변화

점막 내 염증변화를 관찰하기 위해서 COX-2를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데 대조군에서는 일부 용모 고유판에서 COX-2 양성반응세포가 나타났고 ADE군의 출혈성 침식 지역에서 많은 수의 COX-2 양성반응세포가 관찰되었으나(Fig. 14), BST 추출액 72시간 사전 투여군의 용모 고유판에서는 COX-2 양성반응세포가 ADE군보다 적은 수로 관찰되어(Fig. 15) 유의성 있는 감소를 나타내었다(Table 2).

4) 점막 내 세포성 면역 변화

점막 내 세포성 면역 변화를 관찰하기 위해서 IL-2R- α 를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 일부 용모 고유판, 장자샘 주변부

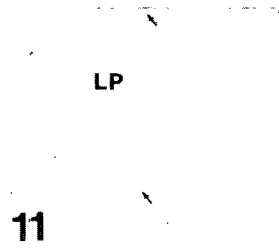


Fig. 11. The immunohistochemical stain for COX-1 in LP from ADE mice. The COX-1 positive cells(Arrow) in region of hemorrhagic erosion were disappeared. ×200.



Fig. 12. The immunohistochemical stain for COX-1 in LP from BST treated mice at 72 hours before ADE. The COX-1 positive cells(Arrow) were seen. ×200.

점막밑층에서 적은 수의 양성반응세포가 관찰되었고, ADE군의 출혈성 침식 지역과 주변 점막밑층에서 많은 수의 양성반응세포가 관찰되었으며 IL-2R- α 양성반응세포는 다양한 형태로 관찰되었으나(Fig. 16), BST 추출액 72시간 사전 투여군에서는 ADE군

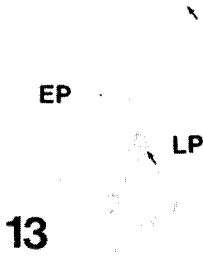


Fig. 13. The magnification of COX-1 positive cells in Fig. 12. $\times 400$.



Fig. 14. The immunohistochemical stain for COX-2 in LP from ADE mice. The noticeable increase COX-2 positive cells(Arrow) in region of hemorrhagic erosion were seen. $\times 200$.

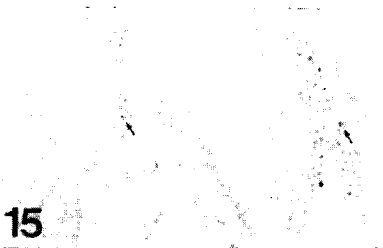


Fig. 15. The immunohistochemical stain for COX-2 in LP from BST treated mice at 72 hours before ADE. The numerical decrease of COX-2 positive cells(Arrow) were observed. $\times 200$.



Fig. 16. The immunohistochemical stain for IL-2R- α in LP and submucosa(SU) from ADE mice. The noticeable increase IL-2R- α positive cells(Arrow) in SU were seen. $\times 200$.

보다 양성반응세포가 적은 수가 나타나(Fig. 17) .유의성 있는 감소를 보였다(Table 2).

4. Apoptosis 변화

Apoptotic 변화는 TUNEL 방법으로 실시하였는데 대조군에서는 핵과 주변부에 양성반응을 보이는 apoptotic 세포가 일부 점막상피, 용모 고유판에서 적은 수로 관찰되었고 ADE군의 출혈성 침식 지역과 주변 점막 상피와 고유판에서 많은 수의 apoptotic 세포가 관찰되었으나(Fig. 18), BST 추출액 72시간 사전 투여군에서는 대조군과 비슷한 양성반응세포의 분포를 보여 용모 고유판에서 적은 수의 apoptotic 세포가 관찰되었고(Fig. 19), 유의성 있게 감소하였다(Table 2).



Fig. 17. The immunohistochemical stain for IL-2R- α in LP and SU from BST treated mice at 72 hours before ADE. The numerical decrease of IL-2R- α positive cells(Arrow) were observed. $\times 200$.



Fig. 18. The distribution of apoptotic cells in LP from ADE mice. The noticeable increase of apoptotic cells(Arrow) in region of hemorrhagic erosion(Asterisk) in seen. TUNEL Method. $\times 200$.

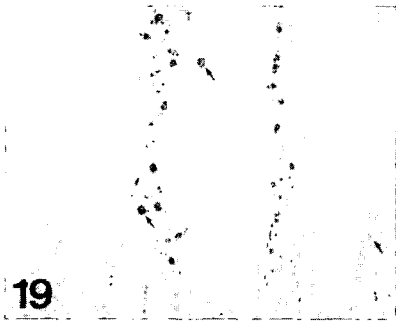


Fig. 19. The distribution of apoptotic cells in LP from BST treated mice at 72 hours before ADE. The remarkable decrease of apoptotic cells(Arrow) were seen. TUNEL Method. ×200

고찰

십이지장 점막의 손상은 환경, 유전, 약물, 정신적 원인 등에 의해 점막을 보호하는 방어인자와 점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형이 깨져, 점막과 점막하 조직의 결손으로 출혈과 궤양을 유발하는데, 주로 1차 보호장벽인 점액분비세포의 손상으로 나타난다^{16,2)}.

십이지장 점막 손상의 치료는 공격인자를 억제하고 방어인자를 증강시키는데, 공격인자를 억제하는 약물로는 제산제, 항 choline제, 항 pepsin제, H⁺이온 길항제 등이 있고 방어 인자를 증강 시키는 약물로는 소화관 점막보호제나 점막재생촉진제 등이 있다¹³⁾.

그러나 강력한 위산분비 억제제와 점막방어 증강제의 사용에도 불구하고 난치성 궤양과 출혈, 천공, 협착 등의 합병증의 빈도가 감소되지 않고 잦은 재발 등이 문제점으로 보고^{14,5)}되고 있다. 그러므로 십이지장 궤양의 치료는 예방이 중요하며 방어인자의 보강이 필요한 실정이다.

한의학에서는 십이지장 궤양을 心下痞, 吞酸, 嘈雜, 胃脘痛, 心痛 등의 범주에서 情志所傷과 飲食失節로 인한 脾胃乘降失調 및 燥濕失調를 기본 병리로 보고²⁴⁾ 和胃降逆, 消食化痰, 溫中健脾, 補益消導, 活血化痰, 養陰潤燥의 처방을 扶正祛邪의 범주에서 운용하는데²⁾, 이는 임상적으로 위장관의 정상적인 소화기능 유지를 통하여 궤양성 소화불량증을 예방하고 재

발을 억제하는 방법으로 발전 될 수 있다.

점막 손상으로 유발된 상부위장관 출혈과 궤양 치료에 관한 실험적 연구로 손 등¹⁷⁾의 四君子湯合蒼朮地榆湯의 위점막손상에 대한 방어 효과, 이 등¹⁸⁾의 桃花湯이 만성 유문부 협착성 소화성 궤양에 효과, 강 등¹⁹⁾의 槐花散이 항궤양 및 지혈과 혈액응고 작용에 미치는 연구, 김 등²⁰⁾의 大建中湯이 항궤양 및 위장관에 미치는 효과에 관한 실험적 연구 등이 있다. 모두 십이지장의 출혈과 궤양 유발후 한약을 투여한 치료 효과에 관한 연구로, 본 연구가 약물 투여 후 병태 유발에 관한 예방 효과를 보고자 한 것과 차이가 있다.

半夏瀉心湯은 半夏, 人蔘, 黃芩, 黃連, 甘草, 大棗, 乾薑, 生薑으로 구성되어 心下の 熱邪와 濕邪를 제거하여 胃中濕熱, 胃火上炎을 치료하고, 和胃降逆, 開結消痞하는 효능으로²¹⁾, 吐血 및 胃脘痛 등의 증상이 나타나는 소화성 궤양의 예방효과가 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 半夏瀉心湯을 투여 후 Nonsteroidal anti-inflammatory drug(NSAID)로 인한 급성 십이지장 손상에 미치는 조직화학적, 면역조직화학적 영향 및 apoptosis의 변화를 실험적으로 관찰하였다.

본 실험에서는 태령 4주된 ICR계의 체중 30g 된 수컷 생쥐를 선별하여 각 7마리씩 대조군, 급성 십이지장 손상 유발군(ADE군), 半夏瀉心湯 추출물 투여 후 급성 십이지장 손상 유발군(BST군)으로 나누었고, BST군은 다시 급성 십이지장염 유발 직전, 24시간 전, 48시간 전 그리고 72시간 전으로 세분시켰다. 대조군을 제외한 나머지의 급성 십이지장 손상의 유도에는 NSAID의 일종인 indomethacin(Sigma, USA) 2.5 mg/kg의 음용 투여를 이용하였다.

조직표본은 급성 십이지장 손상 유발 후 6시간이 경과된 시점에서, 위 날문(pyloric part) 연결부위의 십이지장을 적출하여 24시간동안 10% NBF에 고정한 후, paraffin에 포매한 후 5µm 두께의 연속절편으로 제작하였다.

십이지장의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해서 hematoxylin과 eosin 염색을, 점막상피세포-흡수세포(absorptive cell), 술잔세포(goblet cell)의 변화를 조사하

기 위해 Alcian blue-PAS-Orange G 염색, 십이지장 고유판에 형성된 창자샘(intestinal crypt)에 분포하는 파넷 세포의 변화를 관찰하기 위해서는 Phloxine-tartrazine 염색법을 사용하였으며, 점막상피세포의 증식을 조사하기 위한 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색과 점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였고, 점막 내 염증변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse COX-2(1:500, Chyman)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 점막 내 세포성 면역 변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse IL-2R- α (CD25R- α : Pharmingen, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 또한 Apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 TUNEL (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진, 면역조직화학과 TUNEL 염색 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co., USA)를 이용한 영상 분석(image analysis)을 실시하였으며, 영상분석 결과는 Sigma Plot 4.0(Sigma)을 통한 student T test로 유의성을 검증하였다.

그 결과, 본 실험에서는 ADE군의 많은 지역에서 출혈성 침식이 일어나 용모 유실, 창자샘 손상, 염증 관여 세포의 침윤 증가 등이 관찰되었다. 이는 NSAID로 인한 prostaglandin(PG)의 분비 차단으로 mucus와 bicarbonate 보호 장벽의 결핍이 유도된 것으로 생각된다. NSAID는 cyclooxygenase (COX) mRNA 발현억제를 통해 세포 내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환을 억제한다^{23,4)}. 이와 같은 보호장벽의 손실로 인해 산성 점액질 분비, 술잔세포의 감소, 흡수상피에서 미세용모 손상, peptidase 등 분비과립을 함유하고 있는 파넷 세포를 비롯한 창자샘 내 분비 세포의 손상 등이 관찰되었다. 이는 염증과 십이지장 점액 내 투과성증가를 일으키는 NSAID 유도 enteropathy가 iron deficiency anemia, malabsorption, protein-losing enteropathy를 유발한다. NSAID는 백혈구의 합성 등을 증가시켜, 점막층의 미세혈관 내의 중성구 유착의 증가를 유도함으로 혈류를 감소시키

며, 호중구가 생산하는 산소자유기로 인해 점막을 손상시킨다^{25,6)}. 그밖에 NSAID는 세포의 apoptosis를 유도하며, energy 대사를 방해한다²⁷⁾.

손상된 점막의 회복·유지를 위해서 창자샘 주위 기저부에서 분포하는 미분화세포의 세포분열을 통한 새로운 점막 상피의 생성이 필요하다. 본 실험에서는 세포분열의 상태를 알기 위해 thymidine analogue로서 세포의 S-phase를 labeling하는 BrdU를 합성되는 DNA에 끼워 넣은 후 면역조직화학을 통해 세포분열 세포의 분포를 조사하였는데²⁸⁾, ADE군에서 세포분열 세포수가 적은 것으로 관찰되었다. 이는 점액손상을 좀 더 가속화시키는 결과를 초래하는 것으로 사료된다.

COX-1은 실질적으로 점막상피를 보호에 관여하는 단백질로 점막 조직 내 prostaglandin의 정상적인 생리상태 유지에 관여하는데²⁹⁾, 본 실험의 ADE군에서 감소된 결과로 나타남으로써 점막손상의 1차적 요인으로 생각된다.

한편 급격한 염증 유발을 주도하는 것으로 보고^{29,30)} 된 COX-2는 점막손상으로 인해 출혈성 침식지역의 점막 고유판에서 급격하게 증가하고 있는 것으로 관찰되었다. COX-2의 과도한 발현을 통한 염증관여세포의 침윤 증가를 유발하였으며, 또한 이미 보고^{23,4)} 된 것과 같이 IL-2 분비 증가를 통한 세포성 면역연쇄반응 작동을 유발시키게 되었다. 이러한 결과는 점막 고유판에서 시작된 염증관여세포의 침식이 점막 근판을 지나 점막밑층까지 확대시킨 것이다. 본 실험에 apoptosis는 증가하였는데, 이는 이전 보고³¹⁾와 일치되는 결과로 용모와 창자샘 세포에서 oxidative stress와 미토콘드리아 기능 저하로 기인되는 것으로 사료된다.

한편 半夏瀉心湯을 투여한 BST군에서는 NSAID에 의한 COX-1 발현 억제와 COX-2 발현 증가의 저해를 통해 prostaglandin의 정상적인 분비가 이루어져 mucus와 bicarbonate 보호 장벽을 유지시킴으로써 십이지장 점막손상을 방어할 수 있었다. 또한 BST는 창자샘 주위 기저부에서 위치한 미분화세포의 세포분열 지속을 통해 안정적인 점액 표면상피를 유지할 수 있었다. 그 결과 ADE군의 점막 고유판에서 관찰

된 급격하고 과도한 염증반응과 세포성 면역반응이 BST군에서는 나타나지 않았다.

한편, 이번 실험에서 BST군의 사전 투여시간이 증가할수록 일반적인 형태변화와 조직화학적 변화가 대조군에 가까운 정상적인 형태로 관찰되었으며, apoptosis 변화와 면역조직화학적 변화에서도 역시 BST군의 사전투여시간이 증가할수록 대조군에 가까운 apoptotic 세포의 분포, 세포증식과 COX-1의 증가, COX-2와 IL-2R- α 의 감소 경향을 보였다.

이상과 같은 실험 결과로 보아, 半夏瀉心湯은 임상적으로 출혈성 소화성 궤양의 예방에는 유의한 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 이는 방어인자의 보강에 기인한 것이나 이번 실험에서는 半夏瀉心湯의 조직학적 및 면역조직화학적에 미치는 영향에 대해서만 연구가 이루어졌으므로 향후 연구방향은 소화성 궤양에 있어서 半夏瀉心湯의 내분비계 및 면역혈청에 대한 효과 등 보다 심도 깊고 광범위한 측면으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

半夏瀉心湯의 급성 십이지장 손상에 대한 항 궤양 효과를 조사하기 위해서 행해진 본 연구는 半夏瀉心湯 추출액을 사전 응용 투여한 생쥐에 인위적인 급성 십이지장 손상을 유발시켜 나타난 일반적인 형태, 창자샘 내 분비세포, 점막 상피 내 흡수세포와 술잔 세포, 점막 내 세포증식, 점막보호인자인 COX-1, 염증관련인자인 COX-2, 세포성 면역연쇄반응을 주도하는 IL-2R- α 그리고 apoptotic 세포의 분포 등의 변화의 관찰을 통해서 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 일반적인 형태변화를 보면 ADE군은 출혈성 침식으로 인한 음모 유실, 점막 밑층까지의 염증관여세포의 침윤 등의 십이지장 손상이 관찰되었지만 BST군에서는 사전투여시간이 증가할수록 대조군에 가까운 정상적인 형태로 관찰되었다.

2. 조직화학적 변화를 보면 ADE군에서는 미세음모를 가진 흡수세포, 산성점액질 분비 술잔세포, 중성

점액질 분비 술잔세포, 파넷 세포 등의 분포가 대조군에 비해 현저하게 감소된 것으로 관찰되었지만 BST군의 경우 사전투여시간이 증가할수록 대조군과 유사한 점막상피의 세포배열을 보였다.

3. 면역조직화학적 변화를 보면 ADE군에서는 세포 증식의 감소, COX-1 감소, COX-2 증가, IL-2R- α 증가 등 십이지장 손상을 유도하는 인자들의 변화가 관찰된 반면 BST군에서는 사전투여시간이 증가할수록 ADE군에 비해 세포증식과 COX-1는 증가하고 COX-2와 IL-2R- α 는 감소하는 경향을 보였다.

4. Apoptosis 변화를 보면 ADE군에서는 증가한 반면 사전 투여 시간이 증가할수록 BST군에 대조군에 가까운 apoptotic 세포의 분포를 보였다.

이상의 결과를 통해 半夏瀉心湯은 점막상피의 방어기전을 증강시켜 급성 십이지장 손상에서 발생하는 조직의 출혈성 궤양을 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Richard AL. Sturdevant. Duodenal ulcer. In : Sleisenger MH, et al. Gastrointestinal Disease. 2nd ed. W. B. Saunders Co. 1978:851.
2. Laine L, Peter W. Bleeding peptic ulcer. N Engl J Med. 1994;331:717.
3. 李家庚, 傅延齡. 脾胃病證治精要. 北京:科學技術文獻出版. 1999:16-38,128-180.
4. 陳貴延, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울:일중사. 1992:46-49,437-441.
5. 김영준, 류기원. 수점삼이 위궤양 및 진통에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1989;9:29-50.
6. 박동원. 단삼보혈탕 및 보화환이 위궤양에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1985;8:111-127.
7. 김경선, 신흥목. 가미향사육군자탕이 Indometacin 유도 위점막손상에 미치는 항산화 효과. 대한한의학회지. 1998;19(1):127-137.
8. 秦伯未. 內經類證. 上海:上海科學技術出版社.

- 1981:67-68.
9. 張仲景. 仲景全書. 서울:大成文化社. 1984:201-202.
 10. Shay H, Sun DCH. Etiology and pathology of peptic ulcer. Bockus's gastroenterology 3rd ed. Philadelphia London and Toronto:W.B. Saunders Co. 1974:512.
 11. Georg D, Arlt, Maarkus Leyh. Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. Langenbeck's Arch. 2001;386:75-81.
 12. 서울대학교 의과대학 편. 소화기학. 서울:서울대학교 출판부. 1996:75-83.
 13. 임승욱 외 12인. 위장질환 치료용 의약조성물(DWP 301)의 일반약리작용. 응용약물학회지. 1994;2:347.
 14. 久保田和彦 外 3人. 基礎藥理學實驗. 東京:南江堂. 1987:97.
 15. 김유선 외 10인. 소화성 궤양 환자에서 *Helicobacter pylori* 박멸 전후의 전정부 위염 양상의 변화. 대한소화기학회지. 1999;34(5):572-581.
 16. 박의련 외 7인. 출혈성 소화성 궤양의 장기 재발을. 대한소화기내시경학회지. 1999;19(2):186-192.
 17. 손정숙, 임성우. 四君子湯合蒼朮地榆湯이 위점막손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(2):231-248.
 18. 이익행 외 4인. 桃花湯이 백성의 소화성 궤양 및 장관수송능에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2001;22(2):207-213.
 19. 강재춘 외 2인. 괴화산이 항궤양효과 및 혈액응고작용에 미치는 실험적 연구. 대한한의학회지. 1997;19(1):179-204.
 20. 김혁규, 백태현. 대건중탕의 항궤양 및 위장관에 미치는 효과에 관한 실험적 연구. 대한한의학회지. 1997;18(1):238-250.
 21. 이진섭. 반하사심탕, 생강사심탕 및 감초사심탕의 효능에 관한 실험적 비교연구. 경희대학교대학원. 1988:22-24.
 22. Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. Am J med. 1988;105:20s-30s.
 23. Kirman I, Vainer B, Nielsen OH. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. Inflamm res. 1988;47:285-289.
 24. Li YX, Li N, Li YS, Wu B, Li JS. Upregulated intragraft gene expression, ICAM-1 and IL-2R molecules, and apoptotic epithelial cells during rejection of rat small intestine allografts. Transplant Proceed. 2000;32:1283-1286.
 25. Sakamoto C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. J Gastroenterol. 1988;33:618-624.
 26. Wallace JL, Keenan LM, Granger DN. NSAID-induced gastropathy : a neutrophil dependent process. Gastroenterology. 1990;98:A145.
 27. Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. Ann Intern Med. 1991;115:787.
 28. Madesh M, Benad O, Balasubramanian KA. Apoptosisprocess in mokey snall intestinal epithelium : 2. possible role of oxidative stress. Free Radical Bio Med. 1999;26:431-438.
 29. Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2 - its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. Inflamm res. 2001;49:367-392.
 30. Hirata T, Ukawa H, Kitamura M, Takeuchi K. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on alkaline secretory and mucosal ulcerogenic responses in rat duodenum. Life Sciences. 1997;61:1603-1611.
 31. Zalev AH, Gardiner GW, Warren RE. NSAID injury to the small intestine. Abodm Imaging. 1998;23:40-44.