

원 저

導赤地榆湯이 궤양성 대장염 유발 흰쥐에 미치는 영향

김승욱, 임성우

동국대학교 한의과 대학 내과학 교실

A Study on the Treatment Effect of *Dojeckjiyu-tang* for Ulcerative Colitis

Sung-Uk Kim, Seong-Woo Lim

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

Objectives : *Dojeckjiyu-tang* has been used to treat *Hwaseol* (火泄) & *Jeokri* (赤痢). The object of this study is examination of the treatment effect of *Dojeckjiyu-tang* for ulcerative colitis of the mouse descending colon.

Methods and Materials :

Twenty-one rats were divided into 3 groups and treated as follows: the control group was untreated mice. The UCE group was ulcerative colitis elicited mice. The DJT group was *Dojeckjiyu-tang* treated mice after ulcerative colitis elicitation.

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

Results :

1. The morphology of colonic mucosa from UCE mice: the disappearance of epithelium and intestinal propria in hemorrhagic erosions were seen, but in the morphology of colonic mucosa from DJT-treated mice, the configuration of epithelium and intestinal propria were the same as normal.

2. The distribution of goblet cells and absorptive cells with microvilli in intestinal propria from UCE mice: a noticeable decrease of goblet cells and absorptive cells with microvilli were seen, but with the distribution of goblet cells and absorptive cells with microvilli in intestinal propria from DJT-treated mice, the configuration of goblet cells and absorptive cells with microvilli were the same as normal.

3. The immunohistochemical stain for BrdU in colonic mucosa and COX-1 in lamina propria from UCE mice: BrdU positive cells and COX-1 positive cells in the region of hemorrhagic erosion disappeared, but in the immunohistochemical stain for BrdU in colonic mucosa and COX-1 in lamina propria from DJT-treated mice, BrdU positive cells and COX-1 positive cells were seen.

4. The immunohistochemical stain for COX-2 in lamina propria, IL-2R-in lamina propria, intestinal propria and submucosa and ICMA-1 in intestinal propria and submucosa from UCE mice: a noticeable increase COX-2, IL-2R-, ICMA-1 positive cells were seen, but in the immunohistochemical stain for COX-2 in lamina propria, IL-2R-in lamina propria, intestinal propria and submucosa and ICMA-1 in intestinal propria and submucosa from DJT-treated mice, a numerical decrease of COX-2, IL-2R-, ICMA-1 positive cells was observed.

5. The distribution of apoptotic cells in epithelium and lamina propria from UCE mice: a noticeable increase of apoptotic cells in region of hemorrhagic erosion was seen, but in the distribution of apoptotic cells in epithelium and lamina propria from DJT-treated mice, a remarkable decrease of apoptotic cells was seen.

Conclusions : According to the above results, *Dojeckjiyu-tang* has a moderate effect on ulcerative colitis in descending colon. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(3):200-210)

Key Words: *Dojeckjiyu-tang*, ulcerative colitis, COX-2, IL-2R-, ICMA-1.

서 론

궤양성 대장염은 소화관을 침범하는 원인 미상의 만성염증성 질환으로, 궤양성 대장염과 크론병으로 나누며¹⁾, 만성적인 재발성으로 대장만을 침범하는 광범위한 점막염증을 특징으로 한다²⁾. 혈성 설사와 복통, 배변후 후중감이 있으며, 발열, 빈맥, 체중감소 등을 동반하고 악화와 관해를 오랜기간 동안 지속하므로 증상완화와 관해의 유지가 치료의 요점이 된다³⁾. 서구에서 흔히 볼 수 있는 질환으로 알려져 있으나, 최근 한국에서도 식생활의 서구화와 진단방법의 발달로 보고되는 예가 점점 많아지고 있다^{3,4)}.

한의학적으로 궤양성 대장염은 赤痢, 火泄과 증상이 유사하다⁵⁾. 赤痢는 濕熱이 腸에 迫하여 발생하며 糞色如血, 身熱, 腹痛, 裏急後重하며, 火泄은 腸胃에 熱迫하여 瀉下赤色粘稠, 後重如滯, 痛一陣 瀉一陣, 口乾喜冷, 小便赤澀, 脈數한다^{6,9)}.

導赤地榆湯은 丹溪心法에 수록된 처방으로 赤痢에 널리 쓰이는 처방으로 알려져 있고^{9,11)}, 실험적 보고로는 止瀉, 지혈, 진통 및 해열작용에 미치는 영향에 대한 연구¹⁰⁾가 있으나 미비하고 대장의 직접적인 궤양 유발에 대한 치료 효과의 보고는 없었다.

이에 저자는 導赤地榆湯의 궤양성 대장염에 대한 치료효과를 살펴보고자 indomethacin으로 궤양성 대장염을 유발시킨 생쥐에 導赤地榆湯 추출액을 음용 투여 후 나타난 내림주름창자내 조직손상의 회복효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

대한실험동물센터에서 분양받은 태령 4주된 ICR 계 숫컷 생쥐를 무균 사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 아무런 처리를 하지 않은 대조군, 궤양성 대장염 유발군(UCE군), 궤양성 대장염 유발 후 도적지유탕 추출액 투여군(DJT군)으로 나누었다. 한편 UCE군과 DJT군은 다시 궤양성 대장염 유발 후 시간의 경과에 따라 24, 48 그리고 72시간으로 세분하고 각 군은 7 마리씩 배정하였다.

2) 약재

도적지유탕(Dojeckjiyu-tang : DJT) 2침을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압 농축한 후 DJT군에 궤양성 대장염 유발 직후, 24시간 후, 그리고 48시간 후에 2.5 ml/kg을 구강투여 하였다 (Table. 1).

3) 조직표본

궤양성 대장염 유발 후 24시간, 48시간 그리고 72시간이 경과되었을 때 sodium pentobarbital 용액으로 마취하여 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을

Table 1. The Amount and Composition of Dojeckjiyu-tang Extract.

Species	Part used	Latin name	Weight(g)
<i>Sanguisorba officinalis</i>	Roots	<i>Sanguisorbae Radix</i>	5.63
<i>Angelica gigas</i>	Roots	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	5.63
<i>Paeonia lactiflora</i>	Roots	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	3.75
<i>Coptis chinensis</i>	Rhizomes	<i>Coptidis Rhizoma</i>	3.75
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Roots	<i>Scutellariae Radix</i>	3.75
<i>Sophora japonica</i>	Flower	<i>Sophorae Flos</i>	3.75
<i>Equus asinus</i>	Skin	<i>Asini Gelatinum</i>	3.00
<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	Herb	<i>Schizonepetae Herba</i>	3.00
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Roots	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	1.88
Total amount			34.14

실시하였다. 직장쪽 내림주름창자(descending colon)를 적출하여 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작되었다. 내림주름창자의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

2. 방법

1) 궤양성 대장염 유발

궤양성 대장염을 유도하기 위해 indomethacin(Sigma, USA)을 0.9% NaCl이 포함된 70% 에탄올에 희석시킨 후 10 mg/kg를 UCE군과 DJT군에 3일간 응용투여하였다.

2) 조직학적 표본제작

가. 창자샘내 술잔세포의 변화 관찰

내림주름창자 창자샘내 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 대조염색하고 0.5% orange G(Sigma)용액에 처리 후 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 점막 표면상피의 흡수세포 변화 관찰

내림주름창자 점막 표면상피의 흡수세포(absorptive cell) 변화를 관찰하기 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액 30분간 반응시킨 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 표본제작

가. 점막 표면상피 세포 증식 변화 관찰

미분화 세포로부터 증식·분화된 점막 표면상피 세포 증식 변화를 조사하기 위해 5-bromo-2'-

deoxyuridine(BrdU, Sigma)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 내림주름창자를 적출하기 5시간, 3시간, 1시간전에 생리식염수에 녹인 BrdU 50mg/kg을 각각 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4℃와 37℃의 2N HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 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 1시간동안 반응시켰다. 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4℃ incubation chamber 내에서 48시간동안 반응시켰고 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1:100, DAKO)에 실온에서 4시간동안 반응시키고, Avidin biotin complex(ABC : Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diamino-benzidine(DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색하여, hematoxylin으로 대조염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

나. 점막내 cyclooxygenase-1 분포 변화 관찰

점막 표면상피의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse COX-1(1:250, Chyman, USA)에 4℃ humidified chamber에서 48시간 동안 반응시킨 다음 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG(1:100, DAKO)에 4℃ humidified chamber에서 24시간 동안 반응시켰으며 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

다. 점막내 염증 변화 관찰

점막내 염증변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse COX-2(1:500, Chyman)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 위에서 기술한 동일한 방

법으로 실시되었다.

라. 세포성 면역 변화 관찰

점막내 세포성 면역 변화를 관찰하기 위해서 rabbit anti-mouse IL-2R- α (CD25R- α : Pharmingen, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 위에서 기술한 동일한 방법으로 실시되었다.

마. 세포부착 분자 변화 관찰

조직내 세포이주(migration)에 관여하는 세포부착 분자(intercellular adhesion molecule : ICAM)의 분포 변화를 관찰하기 위해 hamster anti-mouse ICAM-1(CD54-1, Serotec, UK)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였으며, 위에서 기술한 동일한 방법으로 실시되었다.

4) Apoptosis 변화 관찰

Apoptotic 세포의 분포 변화를 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 시킨 다음 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 처리하고 Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Hematoxylin으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 영상분석과 통계처리

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

실험결과

1. 일반적 형태변화

UCE군의 점막 표면상피의 많은 부분에서 상피세포와 창자샘이 유실된 출혈성 침식(hemorrhagic erosion)으로 인하여 많은 수의 림프구, 섬유모세포, 과립백혈구 등 염증관여세포의 침윤(infiltration)이 보였으며, 점막 표면상피와 고유층(lamina propria)에서 일어난 출혈성 침식은 점차 확대되어 점막근층(muscularis mucosae)을 지나 점막밑층(submucosa)에서도 나타났다(Fig. 1).

DJT군에서는 시간에 따른 내림주름창자의 손상 회복이 72시간 후 가장 크게 나타나 일부 지역을 제외한 대부분의 지역에서 점막 표면상피세포와 창자샘의 배열, 점막 고유층 세포분포 등이 대조군과 유사한 형태로 회복되었다(Fig. 2).

2. 조직화학적 변화

가. 창자샘내 술잔세포의 변화

내림주름창자의 창자샘내 술잔세포의 변화를 조사하기 위해 Alcian blue-PAS-Orange G 염색을 실시하였다. 대조군에서 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 술잔세포는 검붉은색으로 염색되고, 산성점액질(acid mucin)을 분비하는 술잔세포는 검푸른색으로 염색되었으며 세포기저부에 더 많은 분비과립을 축적하고 있었다. 검푸른색의 술잔세포의 수가 검붉은색의 술잔세포보다 많은 수였다.

UCE군에서 출혈성 침식 주변의 창자샘에서는 두 개의 술잔세포가 대조군에 비해 줄어들었는데, 표면상피 상층부(apical surface)로 갈수록 숫자는 적었다(Fig. 3).

DJT 추출액 투여군은 UCE군에서 비해 술잔세포의 수가 많았는데, 이러한 차이는 표면상피 상층부로 갈수록 분명하게 나타났다(Fig. 4).

나. 점막 표면상피의 흡수세포 변화

대조군의 phloxine-tartrazine 염색 결과 진감색 양성반응을 보이는 점막 표면상피가 나타났으며, 이 흡

수세포의 세포상층부에는 미세융모(microvilli)가 관찰되었다.

UCE군에서 출혈성 침식지역과 그 주변에서는 양

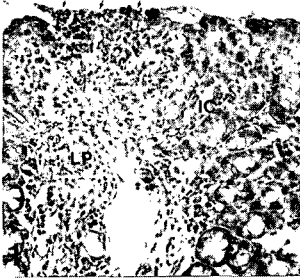


Fig. 1. The morphology of colonic mucosa from UCE mice. The disappearance of epithelium (arrow) and intestinal propria (IC) in hemorrhagic erosions are seen. EP, epithelium; LP, lamina propria. H & E. ×200



Fig. 2. The morphology of colonic mucosa from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The configuration of EP and IC were the same as normal. Arrow, absorptive cell with microvilli; occupied arrow head, goblet cell. H & E. ×200



Fig. 3. The distribution of goblet cells in IC from UCE mice. The noticeable decrease of goblet cells were seen. Long arrow, acid mucin secreted goblet cell; vacanted arrow head, neutral mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. ×200

성반응을 보이는 흡수세포를 관찰할 수 없었고, 이 부위의 점막 고유층에서 출혈로 인한 다소의 적혈구가 보였다(Fig. 5).

DJT 추출액 투여군의 점막 표면상피에서는 많은 수의 진감색 양성반응의 흡수세포를 관찰할 수 있었는데, 이들 상피세포 상층부에는 잘 발달된 미세융모를 확인할 수 있었다(Fig. 6).

3. 면역조직화학적 변화

가. 점막 표면상피 세포의 증식 변화

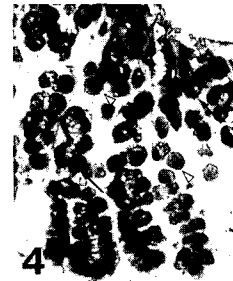


Fig. 4. The distribution of goblet cells in IC from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The configuration of goblet cells were the same as normal. Vacanted arrow head, neutral mucin secreted goblet cell; Long arrow, acid mucin secreted goblet cell. Alcian blue-PAS-Orange G. ×200



Fig. 5. The distribution of absorptive cells in EP from UCE mice. The noticeable decrease of absorptive cells were seen and infiltration of RBCs (vacanted arrow head) in LP were increased. Phloxine-tartrazine. ×400



Fig. 6. The distribution of absorptive cells in EP from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The dark reddish colored absorptive cells (arrow) with microvilli were seen. Phloxine-tartrazine. ×400

미분화세포로부터 증식·분화된 점막 표면상피세포의 분포 변화를 조사하기 위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 세포핵에 BrdU 양성반응을 보이는 세포가 창자샘과 주변 고유층에서 분포했다.

UCE군의 출혈성 침식 지역에서는 BrdU 양성반응세포가 관찰되지 않았으며 다만 주변 창자샘에서 소수가 관찰되나(Fig. 7), DJT 추출액 투여군에서는 BrdU 양성 반응 세포가 UCE군보다 많은 수가 관찰되어(Fig. 10), 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

나. COX-1 분포 변화

점막 표면상피의 보호기전에 관여하는 COX-1의

분포변화를 관찰하기위해 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 COX-1 양성반응세포가 점막 고유층에 분포하였다.

UCE군의 일부 출혈성 침식 지역과 주변 고유층에서 적은 수의 COX-1 양성반응세포가 관찰되었으나(Fig. 9), DJT 추출액 투여군에서는 고유층에서 UCE군보다 많은 수의 COX-1 양성반응세포가 나타나(Fig. 10), 유의성 있게 증가하였다(Table 2).

다. COX-2 분포 변화

점막내 염증변화를 관찰하기위해서 COX-2를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데 대조군에

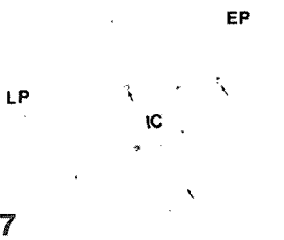


Fig. 7. The immunohistochemical stain for BrdU in colonic mucosa from UCE mice. The BrdU positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion (asterisk) were disappeared. ×200.

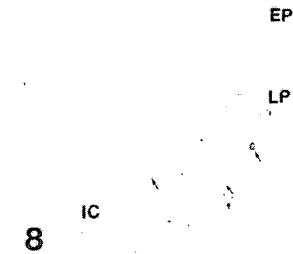


Fig. 8. The immunohistochemical stain for BrdU in colonic mucosa from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The BrdU positive cells (arrow) in IC surrounded region were seen. ×200.

Table 2. The Image Analysis of Immunohistochemistry and TUNEL in DJT-treated Murine Descending Colon after Ulcerative Colitis Elicitation.

Antibody	CONTROL		UCE		DJT	
	particle	intensity	particle	intensity	particle	intensity
BrdU	1941 ± 16.2	119.8 ± 21.4	865 ± 13.2	122.9 ± 23.5	1823 ± 19.4*	120.1 ± 22.8
COX-1	5234 ± 17.4	127.4 ± 16.9	1374 ± 19.4	136.1 ± 14.1	5033 ± 15.4*	128.8 ± 18.5
COX-2	2643 ± 21.6	132.5 ± 18.4	3986 ± 25.2	120.0 ± 25.8	2886 ± 19.6*	128.4 ± 22.5
IL-2R-α	1642 ± 24.3	134.2 ± 19.6	7850 ± 18.7	119.6 ± 25.1	1661 ± 19.1*	136.1 ± 12.7
ICAM-1	2014 ± 14.7	127.4 ± 20.3	4206 ± 20.1	125.4 ± 20.6	2443 ± 26.4*	126.3 ± 22.6
Apoptosis	21360 ± 79.4	124.6 ± 12.6	38052 ± 74.3	120.5 ± 24.1	24396 ± 94.2*	123.8 ± 23.9

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

Values are Mean ± Standard Deviation

CONTROL : No treated mice

UCE : Ulcerative colitis elicited mice

DJT : DJT treated mice after ulcerative colitis elicitation

BrdU : bromodeoxyuridine

COX-1 : cyclooxygenase-1

COX-2 : cyclooxygenase-2

ICMA-1 : Intercellular adhesion molecule

* : P < 0.05 compared with ACD.

서는 일부 고유판에서 COX-2 양성반응세포가 나타났다.

UCE군의 출혈성 침식 지역에서 많은수의 COX-2 양성반응세포가 관찰되었으나(Fig. 11), DJT 추출액 투여군에서는 COX-2 양성반응세포가 고유판에서 UCE군보다 적은 수로 관찰되어(Fig. 12), 유의성 있

게 감소하였다(Table 2).

라. 세포성 면역 변화

내림주름창자내 세포성 면역 변화를 관찰하기위해서 IL-2R- α 를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 일부 고유판, 창자샘 주변부, 점막밑층에서 적은 수의 양성반응세포가 관찰되었다.

UCE군의 출혈성 침식 지역과 주변 점막밑층에서 많은 수의 양성반응세포가 관찰되었고 IL-2R- α 양성 반응세포는 다양한 형태로 관찰되었으나(Fig. 13), DJT 추출액 투여군에서는 UCE군보다 적은 수로 나타나(Fig. 14), 유의성 있게 감소하였다(Table 2).

마. 세포부착분자 변화

내림주름창자내 세포부착분자의 변화를 관찰하기 위해 ICMA-1를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 대조군에서는 일부 고유판과 점막밑층의

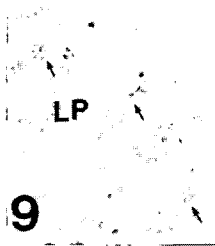


Fig. 9. The immunohistochemical stain for COX-1 in LP from UCE mice. The COX-1 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.

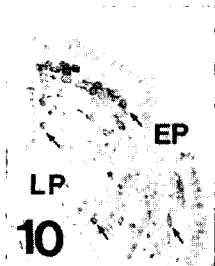


Fig. 10. The immunohistochemical stain for COX-1 in LP from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The COX-1 positive cells (arrow) were seen. $\times 200$.

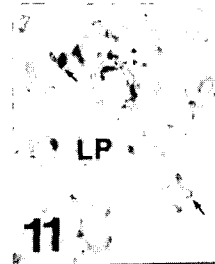


Fig. 11. The immunohistochemical stain for COX-2 in LP from UCE mice. The noticeable increase COX-2 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were seen. $\times 200$.

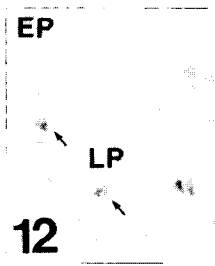


Fig. 12. The immunohistochemical stain for COX-2 in LP from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The numerical decrease of COX-2 positive cells (arrow) were observed. $\times 200$.

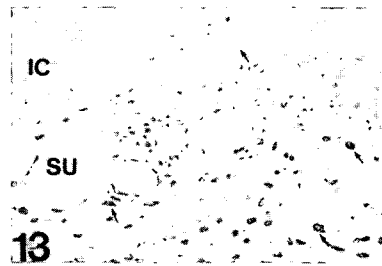


Fig. 13. The immunohistochemical stain for IL-2R- α in LP, IC, and submucosa (SU) from UCE mice. The noticeable increase IL-2R- α positive cells (arrow) in SU were seen. $\times 200$.

혈관주변에서 적은 수의 양성반응세포가 관찰되었다.

UCE군의 일부 출혈성 침식 지역과 주변 점막밑층의 혈관주변에서 많은 수의 양성반응세포가 관찰되었으나(Fig. 13), DJT 추출액 투여군에서는 UCE군보다 적은 수로 나타나(Fig. 14), 유의성 있게 감소하였다(Table 2).

4. Apoptosis 변화

Apoptotic 변화는 TUNEL 방법으로 실시하였는데 대조군에서는 핵과 주변부에 양성반응을 보이는 apoptotic 세포가 일부 점막 표면상피에서 적은 수로 관찰되었다.

UCE군의 출혈성 침식 지역과 주변 점막 상피와 고유판에서 많은 수의 apoptotic 세포가 관찰되었으나(Fig. 18), DJT 추출액 투여군에서는 대조군과 비슷한 양성 반응 세포의 분포를 보여 점막 표면상피의 일부 흡수세포와 고유판에서 적은 수의 apoptotic 세포가 나타나, 유의성 있게 감소하였다(Table 2).



Fig. 14. The immunohistochemical stain for IL-2R- α in IC and SU from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The numerical decrease of IL-2R- α positive cells (arrow) were observed. $\times 200$.

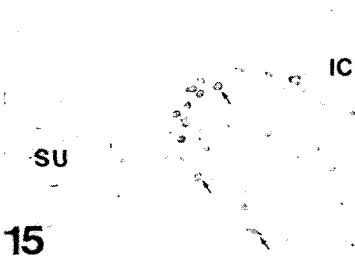


Fig. 15. The immunohistochemical stain for ICMA-1 in IC and SU from UCE mice. The noticeable increase ICMA-1 positive cells (arrow) in SU were seen. $\times 200$.

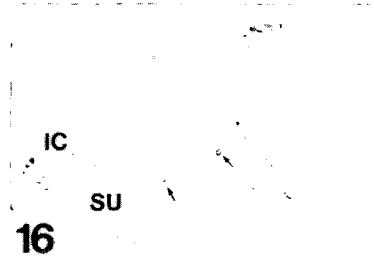


Fig. 16. The immunohistochemical stain for ICMA-1 in IC and SU from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The numerical decrease of IL-2R- α positive cells (arrow) were observed. $\times 200$.

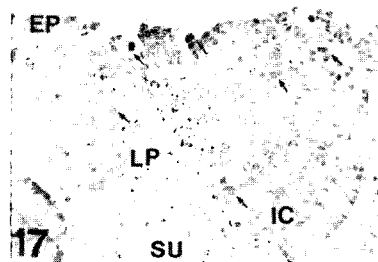


Fig. 17. The distribution of apoptotic cells in EP and LP from UCE mice. The noticeable increase of apoptotic cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were seen. TUNEL Method. $\times 200$.

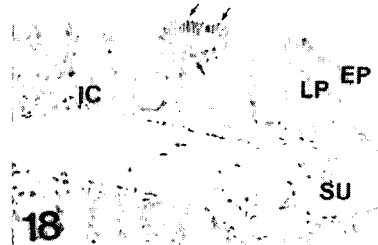


Fig. 18. The distribution of apoptotic cells in EP and LP from DJT-treated mice at 72 hours after UCE. The remarkable decrease of apoptotic cells (arrow) were seen. TUNEL Method. $\times 200$

고찰

궤양성 대장염은 백인과 유태인에서 호발하는 질환이지만 국내에도 최근 다수 보고되고 있으며, 아직까지 확실한 원인이 규명되어 있지 않은 질환이며, 최근에는 유전적인 요소와 면역학적인 요소, 정신적

인 스트레스를 발병의 주 원인으로 보고있다³⁾.

임상증상으로는 혈변성 설사, 복통, 배변후 후증감, 발열, 체중감소 등이 많이 관찰된다¹²⁾. 반복적인 회복과 악화를 거듭하면서 혈액이 섞인 점액성 설사가 수일, 수주 또는 수개월 지속되다 없어지기도 하고, 증상이 없는 기간이 수 개월에서 수 년 또는 수십년 지속된 후 재발하기도 한다. 처음 나타나는 증상은 끈끈한 점액을 포함한 출혈성 설사, 대변 배설 후 좋아지는 하복부 통증과 경련 등이 진행성으로 악화된다.

내시경 소견으로 점막의 집축 출혈, 궤양, 미만성 발적, 점막의 과립상, 가스용종, 협착 등이 보이고 이런 병변은 직장에 반드시 있으며, 상향성으로 연속적으로 있다는 것이 특징이다²³⁾. 현미경 소견상 궤양, 배세포 감소, 조직 괴사, crypt abscess, 상피세포 퇴행 및 이행성 등이 나타날 수 있다³⁾.

궤양성 대장염 환자 중 약 70%정도는 전형적인 만성, 반복성 재연의 경과를 밟는다¹³⁾. 환자의 약 60%는 내과적 치료에 잘 반응하나 약 25%의 환자에서는 갑작스런 발병으로 전격성 궤양성 대장염이 나타난다^{4,14)}. 치료에 잘 반응하지 않는 경우가 흔하고, 질환을 완치시킬 수도 없으며 오랜기간 병을 앓음으로 인하여 환자들은 정신적, 경제적 어려움을 느끼게 된다¹⁵⁾.

아직 궤양성 대장염에 대한 원인과 병태생리를 정확히 모르는 상태이므로 근원적인 약물요법은 없는 실정이다. 따라서 치료는 보조적이고 대증적일 수밖에 없다. 혈관 투과성을 감소시키거나, 염증의 생화학적 발현을 일으키는 매개인자를 억제시키거나 면역학적 조직손상을 억제시키면서 동시에 환자의 영양상태를 개선시켜 숙주 방어기전을 증가시키고 감염을 조절하는 것 등이 치료의 주가 되고 있다³⁾.

궤양성 대장염은 위의 임상 양상을 볼 때 한의학적으로泄瀉,痢疾에 해당된다고 볼 수 있다⁵⁾. 이 중赤痢는濕熱이腸에迫하여 발생하며糞色如血,身熱,腹痛,裏急後重의 증상을 보인다^{6,9)}.火泄은熱泄을 말하며腸胃에熱迫하여瀉下赤色粘稠,後重如滯,痛一陣瀉一陣,口乾喜冷,小便赤澀,脈數하는 증상을 보인다^{6,9)}. 임상양상의 유사성으로 볼 때 궤양성 대장

염은赤痢와火泄에 해당한다고 볼 수 있다.

導赤地榆湯은丹溪心法에 수록된 처방으로濕熱로 인한痢疾에 널리 쓰이는 처방이다. 처방의 특성을 살펴보면清熱,涼血,燥濕,補血,解毒하는藥材로 이루어져 있음을 알 수 있다.赤痢와火泄은濕熱蘊結을 원인으로¹¹⁾導赤地榆湯은 이에 부합한 처방으로 사료된다.

본 연구에서는 생쥐를 대조군, 궤양성 대장염 유발군(UCE군), 궤양성 대장염 유발 후導赤地榆湯 추출액 투여군(DJT군)으로 나누고, UCE군에 indomethacin을 투여하여 궤양성 대장염을 유도한 후 내림주름창자의 형태학적 변화, 창자샘 내 술잔세포와 점막 표면상피의 흡수세포의 변화, 점막표면상피세포와 COX-1, COX-2, IL-2R- α , 세포부착분자의 분포, apoptosis의 변화를 관찰하였다.

UCE군의 많은 지역에서 점막 표면 상피세포와 창자샘의 손실, 점막 밑층까지의 출혈성 침윤의 확대 등이 관찰되었는데, 이런 보호장벽과 관련된 손상은 Cyclooxygenase mRNA 발현과 일련의 연관성을 가진다¹⁶⁻¹⁸⁾. UCE군에서는 COX-1 mRNA 발현이 낮게 나타났는데, 이는 COX-1에 의한 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정의 저해를 의미하며 그 결과 prostaglandin의 분비 차단에 의한 mucus와 bicarbonate 보호장벽의 결핍을 일으키는 것으로 생각된다. 이것은 COX-1과 관련된 이전 보고와 동일한 결과이다^{19,20)}. COX-1과 65%정도 homologous protein인 COX-2 mRNA 발현은 높게 나타났는데, 이는 점막고유판 손상에 대한 염증 유도로 사료되며, 점막내 급속한 손상시 COX-2 분포가 증가한다는 이전 보고와 동일한 결과이다^{21,22)}. 한편 출혈성 침식으로 인한 점막손상과 COX-2에 의한 염증 증가는 세포성 면역체계를 자극하여 세포성 면역연쇄반응에 방아쇠적 역할을 담당하는 IL-2의 분비증가와 세포유착분자인 ICAM-1의 발현 증가를 유도하였는데^{23,24)}, 그 결과 점막고유판에서 점막 밑층까지 IL-2R- α 과 ICAM-1 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 점막 손상 외에도 점막표피세포의 분열과 apoptosis의 변화도 관찰되었다. 즉 창자샘 주변에서 일어나는 세포분열

을 통해 새로운 점막 표피세포의 생성이 이루어지는 데²⁵⁾, 본 실험에서는 이러한 세포분열이 감소한 것으로 관찰되었다. 이와 반대로 과도한 apoptosis가 출혈성 침윤지역의 표피세포에서 발생하여 분열과 apoptosis의 균형이 무너졌다. 한편 apoptosis는 COX-2와 무관하게 이미 보고된^{26,27)} caspase-3 activation, ceramide pathway activation, mitogen activated protein kinase activation 등과 같은 독자적 기전을 통해 이루어진 것으로 생각된다.

DJT군에서는 COX-1 발현 증가와 COX-2 발현 억제제를 통해 prostaglandin의 정상적인 분비는 mucus와 bicarbonate 보호장벽을 유지시킴으로써 대장내 점막 손상을 치료할 수 있었고 창자샘 주위 기저부에서 위치한 미분 화세포의 세포 분열의 지속과 표피세포의 apoptosis 억제제를 통해 안정적인 점액 표면상을 유지할 수 있었다. 그 결과 UCE군의 점막 고유판에서 관찰된 급격하고 과도한 염증반응과 세포성 면역반응이 DJT군에서는 나타나지 않았다.

이상의 실험결과 導赤地榆湯은 내림주름창자 조직의 손상의 회복과 염증의 감소에 효과가 있으며, 궤양성 대장염의 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

導赤地榆湯의 궤양성 대장염에 대한 치료효과를 조사하기 위해 행해진 본 실험은 인위적으로 궤양성 대장염이 유발된 생쥐에 導赤地榆湯 추출액을 구강 투여 시킨 후 나타나는 내림주름창자의 일반적인 형태, 창자샘 내 술잔세포, 점막 표면상피내 흡수세포, 점막내 세포증식, 점막보호인자인 COX-1, 염증관련 인자인 COX-2, 세포성 면역연쇄반응을 주도하는 IL-2R- α , 세포이주에 관여하는 세포유착분자인 ICMA-1 및 apoptotic 세포 분포 등의 변화 관찰을 통해서 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 내림주름창자의 일반적인 형태는 궤양성 대장염 유발군은 출혈성 침식으로 인한 점막 표면상피세포

와 창자샘의 유실, 점막밑층까지의 손상 확대가 관찰되었지만 導赤地榆湯 추출액 투여군에서는 투여시간이 증가할수록 대조군에 가까운 정상적인 형태로 관찰되었다.

2. 조직화학적 변화는 보면 궤양성 대장염 유발군에서는 미세용모를 가진 흡수세포, 산성점액질 분비 술잔세포, 중성점액질 분비 술잔세포 등의 분포가 대조군에 비해 현저하게 감소된 것으로 관찰되었으나, 導赤地榆湯 추출액 투여군의 경우 투여시간이 증가할수록 대조군과 유사한 점막 표면 상피의 세포배열을 보였다.

3. 면역조직화학적 변화는 궤양성 대장염 유발군에서는 세포증식의 감소, COX-1 감소, COX-2 증가, IL-2R- α 증가, ICAM-1 증가 등 내림주름대장 손상을 유도하는 인자들의 변화가 관찰된 반면 導赤地榆湯 추출액 투여군에서는 투여시간이 증가할수록 궤양성 대장염 유발군군에 비해 세포증식과 COX-1은 증가하고 COX-2, IL-2R- α 그리고 ICAM-1 등은 감소하는 경향을 보였다.

4. Apoptosis 변화를 보면 궤양성 대장염 유발군에서는 증가한 반면 사전투여 시간이 증가할수록 導赤地榆湯 추출액 투여군은 대조군과 비슷한 apoptotic 세포의 분포를 보였다.

이상의 결과를 통해 導赤地榆湯은 궤양성 대장염으로 기인된 내림주름 대장내 조직손상에 치료효과가 클 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 해리슨 내과학 편찬위원회. 내과학. 서울:정담. 1997:1276-1285.
2. Tierney LM Jr, McPhee SJ, Papadakis MA. Current Medical Diagnosis & Treatment. 서울: 한우리. 1999:686-695.
3. 민영일. 내과학의 최신지견. 서울:도서출판 한국의학. 1997:420-434.
4. 이삼범. 궤양성 대장염의 임상적 연구. 영남대학교

- 대학원 석사학위논문. 1991:14-17.
5. 이장훈 역. 동의입상내과학. 서울:법인문화사. 1999:306-361,743-754.
 6. 허준. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1992:189-220.
 7. 李穡. 醫學入門. 서울:성보사. 1977:373.
 8. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:행림서원. 1972:134.
 9. 方廣 編, 朱震亨 原著. 丹溪心法附餘. 서울:대성문화사. 1982:267-284.
 10. 이실. 이질에 활용되는 도적지유탕이 지사, 지혈, 진통 및 해열작용에 미치는 영향. 대구대학교 대학원 박사학위논문. 1991:27-30.
 11. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 1986:221-223,175-177,300-301,310-313,436-438, 224-225,521-522.
 12. 안명주 외. 궤양성 대장염 28예에 대한 임상적 고찰. 대한소화기내시경학회잡지. 1991; 7(1):19-26.
 13. 최창환. 궤양성 대장염의 임상경과에 영향을 미치는 인자. 연세대학교 대학원 석사학위논문. 2001:30-41.
 14. 대한병리학회 편. 병리학. 서울:고문사 1994:31-104,710-713.
 15. 조용석. 궤양성 대장염 환자에서 삶의 질 평가. 연세대학교 대학원 석사학위논문. 1999: 3-5,19-22.
 16. Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Am J med.* 1988;105:20s-30s.
 17. Faucheron JL, Parc R. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced colitis. *Int J Colorect Dis.* 1996;11:99-101.
 18. Krause W, DuBois RN. Eicosanoids and the large intestine. *Prostaglandins & othe Lipid Mediators.* 2000;61:145-161.
 19. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 1998;56:341-361.
 20. Sakamoto C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol.* 1998;33:618-624.
 21. Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2 - its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm res.* 2001;49:367-392.
 22. 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.
 23. Rothkötter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno immunopath.* 1999;72: 157-165.
 24. Kirman I, Vainer B, Nielsen OH. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm res.* 1998;47:285-289.
 25. Kulldorff M, McShane LM, Schatzkin A, Freedman LS, Wargovich MJ, Woods C, Purewal M, Burt RW, Lawson M, Mateski DJ, Lanza E, Corle DK, O'Brien B, Moler J. Measuring cell proliferation in rectal mucosa : Comparing bromodeoxyuridine(BrdU) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) assays. *J Clin Epidem.* 2000;53:875-883.
 26. Kim TI, Jin SH, Kim WH, Kang EH, Choi KY, Kim HJ, Shin SK, Kang JK. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int j colorectal Dis.* 2001;16:167-173.
 27. Lifshitz S, Lamprecht SA, Benharroch D, Prinsloo I, Charcon SP, Schwartz B. Apoptosis (programmed cell death) in colonic cells : from normal to transformed stage. 2001;163:229-238.