

원 저

스트레스와 에탄올로 유발된 mouse의 위점막 손상에 대한 귀비탕의 예방효과

김학재, 최준혁, 임성우

동국대학교 한의과대학 내과학교실

The Defensive Effect of *Keuibi-tang* on the Gastric Mucous Membrane of Mouse Injured by Stress and Ethanol

Hak-Jae Kim, Jun-Hyuk Choi, Seong-Woo Lim

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was carried out to investigate the effect of *Keuibi-tang* (KBT) on the injury of gastric mucous membrane by stress and ethanol in mice.

The normal group was non-inflammation elicited mice. The two control groups were mice with gastro-inflammation elicited by stress and ethanol. The two sample groups were mice administered KBT before gastro-inflammation elicitation.

In the common morphology and histochemical change, the two control groups were observed with various injuries such as hemorrhagic erosion and ulcer, while the sample group was the same as the normal group.

In the immunohistochemical change, the distributions of PNA and COX-1 treated with KBT noticeably increased over the control group ($P < 0.05$). The distributions of NF- κ B p50, COX-2 and TUNEL in the group treated with KBT were noticeably lower than in the control group ($P < 0.05$). The distribution of KBT was the same as the normal group.

According to the above results, it is supposed that KBT is applicable to gastritis and gastric ulcer due to stress and alcoholic drinks. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(1):155-168)

Key Words: *Keuibi-tang*, the injury of gastric mucous membrane, COX-1, NF- κ B p50, COX-2

서 론

위점막 손상은 점막, 점막하조직 및 근육층까지 침범되는 조직의 결손으로 위점막의 통합성을 유지하

려고 하는 보호작용이 파괴되었을 때 생기고, 소화성 궤양은 위산-펩신이 관여하며 십이지장의 근위부와 위를 포함한 상부소화관에 발생한다. 임상증상은 심와부 동통 및 불쾌감, 소화불량등의 자각증상이 리듬성과 주기성의 특징을 갖고, 약 반수 이상에서 재발하여 증상의 호전과 악화가 반복된다. 치료의 목적은 동통의 완화, 궤양의 치유와 함께 재발의 방지 및 예방에 있다^{1,2)}.

위염과 소화성궤양은 한의학적으로 “胃脘痛”, “嘔雜”, “吞酸”, “嘔吐”, “腹脹” 등의 범주에 속한다³⁾. 원

· 접수 : 2003년 1월 9일 · 채택 : 2003년 2월 13일
· 교신저자 : 최준혁, 서울시 강남구 논현동 37-21 동국대 강남한방병원 비계내과 교실
(Tel. 02-3416-9791, Fax. 02-3416-9790, E-mail: ana1913@hanmail.net)

인은 평소에 飲食失時, 過食生冷하여 胃氣를 손상하거나 嗜食肥甘, 恣飲熱酒하면 종종 濕熱中阻하여 脾胃의 昇降失調를 초래하여 발병하고, 憂愁思慮로 肝鬱氣滯하여 鬱結日久하면 血氣凝滯, 胃絡不通하여 통증이 나타난다⁴⁾.

歸脾湯은 宋代 嚴用和의 <濟生方>에 최초로 수록되어, 明代 薛己가 완성한 처방⁵⁾으로 思慮傷脾, 心脾兩虛하여 일어나는 健忘, 怔忡, 惰怠起臥, 消食, 盜汗, 肢體作痛, 不寐, 吐血, 下血 등에 주로 활용⁶⁾되었으며, 최근에는 심인성 질환 및 스트레스성 질환에 널리 활용되고 있다⁸⁾.

지금까지 보고된 귀비탕의 항스트레스에 관한 연구로는 이⁹⁾의 귀비탕과 Ascorbic acid의 항스트레스 효능에 관한 연구, 류¹⁰⁾의 뇌 catecholamines에 의한 항스트레스 효과 연구, 김¹¹⁾의 위산과 위액분비물의 측정에 의한 귀비탕의 항 위양효과에 관한 연구등이 있으나, 위점막 손상에 대한 귀비탕의 방어효과에 대한 연구는 미흡하다.

이에 저자는 화상과 에탄올로 유발된 위점막 손상에 대한 귀비탕의 방어효과를 실험적으로 규명하기 위하여 위 점막의 일반적인 형태, 표면상피세포, 복합당질 (PNA), 점막보호인자 (COX-1), 염증관련매개물질 (NF-κB p50, COX-2), 세포자기살해 (TUNEL) 등의 변화를 관찰하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

대한실험동물센터에서 분양받은 태령 4주된 ICR 계 숫컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 대조군, 스트레스에 의한 위점막 손상 유발군 (Stress군), 귀비탕 추출액 사전 투여 후 스트레스에 의한 위점막 손상 유발군 (KS군), 에탄올에 의한 위점막 손상 유발군 (Ethanol군), 귀비탕 추출액 사전 투여 후 에탄올에 의한 위점막 손상 유발군 (KE군)로 나누었으며 각 군당 10마리를 배정하였다.

2) 약재 (Table 1)

3) 귀비탕 추출액의 제조와 투여

귀비탕 (Keubi-tang : KBT) 2침을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압농축하여 KS군과 KE군에 위점막손상 유발 72시간 전 부터 매일 2.5 ml/kg 량으로 구강투여 하였다.

2. 방법

1) 에탄올에 의한 위점막 손상 유발

에탄올에 의한 위점막 손상은 50% ethanol (Sigma, USA) 10 ml/kg를 Ethanol군과 KE군에 구강투여 (intragastric administration)를 통해 유발시켰다.

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

Species	Part used	Latin-name	Weight(g)
<i>Panax ginseng</i>	root	<i>Ginseng Radix</i>	7.00
<i>Atractylodes macrocephala</i>	rootstock	<i>Atractylodis macrocephale Rhizoma</i>	7.00
<i>Poria cocos</i>	root	<i>Poria</i>	7.00
<i>Zizyphus spinosa</i>	seed	<i>Zizyphi spinosae Semen</i>	7.00
<i>Euphoria longan</i>	testa	<i>Longanae Arillus</i>	7.00
<i>Astragalus membranaceus</i>	root	<i>Astragali Radix</i>	7.00
<i>Angelica gigas</i>	root	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	7.00
<i>Polygala tenuifolia</i>	root	<i>Polygalae Tenuifolia</i>	7.00
<i>Aucklandia lappa</i>	root	<i>Aucklandiae Radix</i>	3.75
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	rootstock	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.24
<i>Zingiber officinale</i>	rootstock	<i>Zingiberis Rhizoma Pecens</i>	5.00
<i>Zizyphus jujuba var. inermis</i>	fruit	<i>Jujubae Fructus</i>	5.00
Total amount			71.99

2) 스트레스에 의한 위점막 손상 유발

위점막 손상을 위한 스트레스로 화상을 유발하였는데 80℃ hot melting glue에 30초동안 노출시킴으로써 Stress군과 KS군에 화상을 유발시켰다.

3) 조직표본 제작

위점막 손상 유발 후 5시간이 경과되었을 때 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위 몸통 (body)을 적출하여 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μm 두께의 연속절편으로 제작되었다. 위점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편 Semi-thin 절편 제작은 절취된 피부 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선고정한 후 1% OsO4 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. ultramicrotome (LKB, Nova)으로 990nm 두께로 절편을 만들어 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 표면점액세포 (surface mucose cell)의 변화를 관찰하였다.

4) 조직화학적 변화관찰

(1) 위점막 침윤 세포의 변화 관찰

위점막에 침윤 (infiltration)된 세포의 변화를 조사하기 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액에 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 점액분비세포의 분포 변화 관찰

위산에 의한 자가분해 (autolysis) 방벽작용을 하는 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 표면점액세포의 변화를 조사하기위해서 periodic acid-schiff

reaction(PAS) stain를 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분동안 대조염색하였다. 염색된 절편은 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 비만세포의 분포 변화 관찰

위점막 손상시 비만세포 변화를 관찰하기 위해 Luna's method를 실시하였다. 우선 5 μm 연속절편을 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각각 1분, 5분동안 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 면역조직화학적 변화관찰

(1) 복합당질의 분포 변화 관찰

복합당질 (glycoconjugate)인 Peanut Agglutinin (PNA ; Sigma, USA)의 점막에서의 분포 변화를 조사하기위해 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 조직을 실온에서 1% bovine serum albumin (BSA)에 30분간 처리한 다음 1:100으로 희석된 biotinylated anti PNA (Sigma)에 4℃ incubation chamber내에서 24시간동안 반응시켰다. Avidin biotin complex (ABC : Vector Lab, USA)에 1시간동안 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 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. Lectin 반응의 강도는 - (음성), + (약함), ++ (중간 양성) 및 +++ (강한 양성) 등으로 표시하였다.(Table 2.)

(2) 점막내 cyclooxygenase-1 분포 변화

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 분포변화를 관찰하기위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K (20 μg/ml, DAKO, Denmark)에 5분 동안

Table 2. Sungen Specificities and Inhibitory Carbohydrates of Lectins

Lectin	Optium dilution	Sugar specificity
PNA	10 μg/ml	galactosyl-β-1,3-N-acetylgalactosamine

proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum (DAKO)에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse COX-1 (1:250, Chyman, USA)에 4℃ humidified chamber에서 48시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG (1:100, DAKO)에 4℃ humidified chamber에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

(3) 염증관련 매개물질의 변화

점막내 염증관련 신호에 관여하는 nuclear factor (NF)-κB p50과 cyclooxygenase(COX)-2의 변화를 관찰하기 위해 rabbit anti-mouse NF-κB p50(1:200, Santa Cruz Biotec) 과 rabbit anti-mouse COX-2 (1:500, Chyman, USA) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

6) 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 K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme (36 μl TdT enzyme : 72 μl reaction buffer)을 처리하여 37℃의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB로 처리하였다. Hematoxylin으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 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.

결 과

1. 일반적인 형태변화

1) 위 손상 완화

Ethanol 투여군과 Stress 유발군의 위점막에서는 심각한 출혈성 침식 (hemorrhagic erosion)이 관찰되었으며(Fig. 1, 7), 이러한 점막손상부위에서 연접복합체 소실과 세포소기관의 손상이 확인된 점액분비세포 뿐만 아니라 많은 수의 벽세포 (parietal cell)와 주세포 (chief cell)의 유실도 관찰되었다(Fig. 2, 8). 특히 일부지역에서는 주세포 분포지역인 기저부 (baesment membrane)까지 확장된 궤양 (ulcer)이 나타났다. 위 점막손상은 Ethanol군이 Stress군에 비해 더 심했다. 한편 위점막 손상 유발 전 쿠비탕을 사전 투여한 KE군과 KS군에서는 위점막 손상이 적었는데, 일부 지역을 제외한 대부분의 지역에서 대조군에서 보이는 정상적인 위 점막조직 형태가 관찰되었다(Fig. 4, 10). 즉 정상적인 점액분비세포의 배열이 나타났는데 이웃한 표면상피세포의 연접복합체가 유지되었으며, 자유면쪽세포질에서는 점액원과립이 관찰되었다(Fig. 5, 11). 또한 벽세포와 주세포의 손상은 일어나지 않았고, 간간히 점막고유판에서 백혈구와 혈관내 적혈구가 관찰될 뿐 Ethanol군과 Stress군에서 나

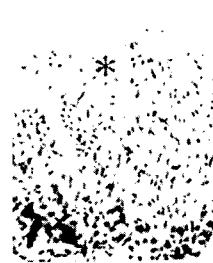


Fig. 1. The morphology of gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The hemorrhagic erosions (asterisk) and aggregation of leucocytes (arrow) are seen. H & E. ×200.



Fig. 7. The morphology of gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The hemorrhagic erosions (asterisk) and aggregation of leucocytes (arrow) are seen. H & E. × 200.

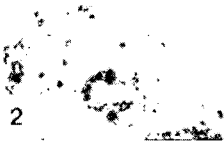


Fig. 2. The magnification of damaged apical surface in gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. Toluidine blue. $\times 1000$

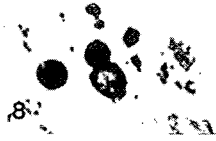


Fig. 8. The magnification of damaged apical surface in gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. Toluidine blue. $\times 1000$

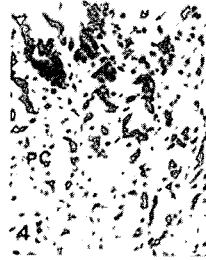


Fig. 4. The morphology of gastric mucosa from KBT administered mice before ethanol induced gastropathy elicitation. The decrease of hemorrhagic erosions (arrow) were appeared. H & E. $\times 200$. SM, surface mucous cell; PC, parietal cell, H & E. $\times 200$.

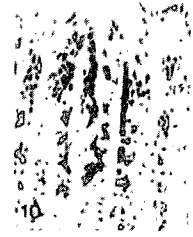


Fig. 10. The morphology of gastric mucosa from KBT administered mice before stress induced gastropathy elicitation. The decrease of hemorrhagic erosions (arrow) were appeared. H & E. $\times 200$.

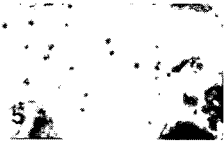


Fig. 5. The magnification of apical surface in gastric mucosa from KBT administered mice before ethanol induced gastropathy elicitation. The surface mucose cell same as normal morphology. Toluidine blue. $\times 1000$



Fig. 11. The magnification of apical surface in gastric mucosa from KBT administered mice before stress induced gastropathy elicitation. The surface mucose cell same as normal morphology. Toluidine blue. $\times 1000$



Fig. 6. The morphology of gastric mucosa from KBT administered mice before ethanol induced gastropathy elicitation. The remarkable decrease of RBC (arrow) and lymphocytes (vacanted arrow head) were seen. Phloxine-tartrazine. $\times 200$.



Fig. 12. The morphology of gastric mucosa from KBT administered mice before stress induced gastropathy elicitation. The remarkable decrease of RBC (arrow) and lymphocytes (vacanted arrow head) were seen. Phloxine-tartrazine. $\times 200$.

타나는 과도한 침윤은 관찰되지 않았다(Fig. 6, 12).

2. 조직화학적 변화

1) 위점막 침윤 세포의 변화

Ethanol 투여군과 Stress 유발군의 출혈성 침식이

일어난 주변에는 rouleaux formation, neutrophil leukocyte를 비롯한 granular leukocyte와 림프구의 침윤이 증가된 것으로 관찰되었다(Fig. 3, 9). 이러한 침윤은 위 점막 상층뿐만 아니라 기저부까지 확산되어 있으며, 이 지역은 주로 과립백혈구 침윤이 두드러졌



Fig. 3. The morphology of gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The noticeable increase of RBC (arrow) and lymphocytes (vacanted arrow head) in base of hemorrhagic erosion evoked region were seen. Phloxine-tartrazine. $\times 200$.

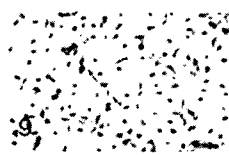


Fig. 9. The morphology of gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The noticeable increase of RBC (arrow) and lymphocytes (vacanted arrow head) in base of hemorrhagic erosion evoked region were seen. Phloxine-tartrazine. $\times 200$.



Fig. 19. The distribution of mast cell in gastric submucosa from mice with stress induced gastropathy. The remarkable increase of infiltrated degranulated type mast cell (arrow) were observed. Luna's method. $\times 200$.



Fig. 20. The distribution of mast cell in gastric submucosa from KBT administered mice before stress induced gastropathy elicitation. The decrease of mast cell (arrow) seen. Luna's method. $\times 400$.

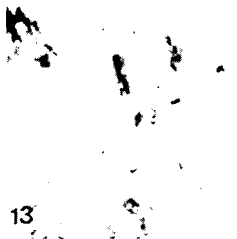


Fig. 13. The morphology of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The disappearance of surface mucose cell (arrow) were observed. PAS. $\times 400$.



Fig. 15. The morphology of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The disappearance of surface mucose cell (arrow) were observed. PAS. $\times 400$.



Fig. 14. The morphology of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from KBT administered mice before ethanol induced gastropathy elicitation. The configuration of surface mucose cell (arrow) seen as same as normal feature. PAS. $\times 400$.

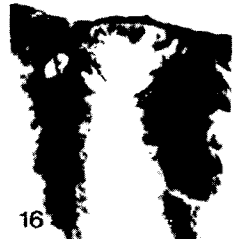


Fig. 16. The morphology of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from KBT administered mice before stress induced gastropathy elicitation. The morphology of surface mucose cell (arrow) in gastric pit same as normal. PAS. $\times 400$.

다. KE군과 KS군에서는 간간히 점막고유판에서 백혈구와 혈관내 적혈구가 관찰될 뿐 Ethanol군과 Stress군과 같은 과도한 침윤은 관찰되지 않았다(Fig. 6, 12).

2) 점액분비세포의 변화

Ethanol 투여군과 Stress 유발군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 표면점액세포가 관찰되지 않았다(Fig. 13, 15). KE군과 KS군에서는 세포상층부에 분비과립이 가득찬 표면점액세포가 대부분의 표면상



Fig. 17. The distribution of mast cell in gastric submucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The increase of infiltrated mast cell (arrow) were observed. Luna's method. SB, submucosa, $\times 200$.

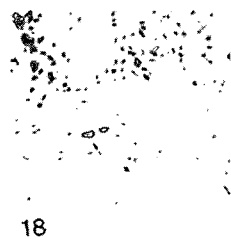


Fig. 18. The distribution of mast cell in gastric submucosa from KBT administered mice before ethanol induced gastropathy elucitation. The decrease of mast cell (arrow) seen. Luna's method. $\times 400$.

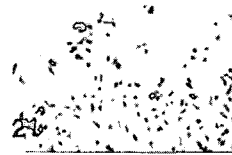


Fig. 21. The immunohistochemical stain for PNA in apical gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The PNA positive cells in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.



Fig. 25. The immunohistochemical stain for PNA in apical gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The PNA positive cells in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.

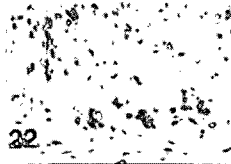


Fig. 22. The immunohistochemical stain for PNA in base of gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The PNA position in chief cell were disappeared. $\times 200$.

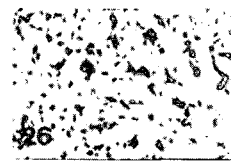


Fig. 26. The immunohistochemical stain for PNA in base of gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The PNA position in chief cell were disappeared. $\times 200$.

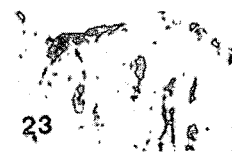


Fig. 23. The immunohistochemical stain for PNA in apical gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The PNA positive cells (arrow) were appeared. $\times 200$.



Fig. 27. The immunohistochemical stain for PNA in apical gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The PNA positive cells (arrow) were appeared. $\times 200$.

피에서 나타났으며, 이러한 배열은 대조군과 유사하였다(Fig. 14, 16).

3) 비만세포의 변화

Ethanol 투여군과 Stress 유발군의 출혈성 침식 주변의 기저부와 점막 하층에서는 비만세포가 증가하였다(Fig. 17, 18). 특히 Stress군에서 Ethanol군보다 더 많은 분포를 나타내었으며 그중 탈과립형

(degranulated type)이 다수를 차지했다. KE군과 KS군에서는 Ethanol군과 Stress군보다 적은 분포를 점막하층에서 보였으며, 기저부로 이주한 비만세포는 관찰되지 않았다.

Table 3. The Effect of KBT Extract Administration on PNA Distribution in Gastric Mucosa of Mice with Burn and Ethanol induced Gastropathy

LECTIN	POSITION	GROUP				
		CON	Ethanol	Stress	KE	KS
PNA	surface mucous cell	+++	-	-	++	+++
	neck mucous cell	-	-	-	-	-
	parietal cell	+	+++	+++	+	+
	chief cell	+++	-	-	+++	++

Abbreviation> -, negative; +, weak; ++, moderate; +++, strong

CON : No treated mice

Ethanol : mice with ethanol induced gastropathy

Stress : mice with burn induced gastropathy

KE : KBT extract administered mice with ethanol induced gastropathy

KS : KBT extract administered mice with burn induced gastropathy



Fig. 24. The immunohistochemical stain for PNA in base of gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The PNA position (arrow) in chief cell were appeared. $\times 200$.

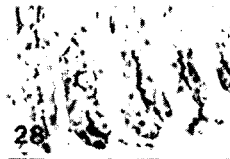


Fig. 28. The immunohistochemical stain for PNA in base of gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The PNA position (arrow) in chief cell were appeared. $\times 200$.



Fig. 29. The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The COX-1 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.



Fig. 31. The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The COX-1 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.

3. 면역조직화학적 변화

1) 복합당질의 분포 변화

대조군에서의 PNA반응은 표면점액세포, 일부 벽세포의 세포질과 주세포의 자유면쪽 미세융모에서 강한 PNA 양성반응을 보였다. 그러나 Ethanol군과 Stress군에서는 표면점액세포와 주세포의 자유면쪽 미세융모에서 양성반응이 없었고(Fig. 21, 25), 주로 벽세포의 핵주변부 세포질에서만 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 22, 26). KE군과 KS군에서는 대조군과 유사한 분포양상을 보였으며(Fig. 23, 27), 특히 주세포의 자유면쪽 미세융모에서 뚜렷한 PNA 양성반응이 나타났다(Table 3, Fig. 24, 28).

2) 점막내 COX-1 분포 변화

표면점액분비세포가 분포하는 점막 상층 (apical surface)에서 COX-1 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, Ethanol 투여군과 Stress 유발군에서는 위 점막 손상 유발 후 COX-1 양성반응세포의 분포가 감소되었다(Fig. 29, 31). 이러한 분포감소는 Ethanol군에서 72.7% 감소한 $1550 \pm 46 / 200,000$ pick cell, Stress군에서는 84.7% 감소한 $868 \pm 21 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4). KE군과 KS군에서는 Ethanol군과 Stress군에 비해 COX-1 양성반응 세포의 감소가 적었는데(Fig. 30, 32), KE군은 Ethanol군에 비해 184.9% 증가한 4416

Table 4. The Image Analysis of Immunohistochemistry and TUNEL in KBT-treated Murine Stomach with Gastropathy.

Antibody	CONTROL	Gastropathy			
		Ethanol	Stress	KE	KS
COX-1	5,684±92	1,550±46	868 ±21	4,416±87*	5,091±55**
NF-κB p50	1,212±75	5,726±79	4,044±31	1,754±21*	1,709±19**
COX-2	551±36	7,684±89	7,215±73	6,140±90*	5,312±49**
Apoptosis	2,237±85	16,774±246	30,413±321	9,223±81*	13,092±331**

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

Abbreviation : Mean ± Standard Deviation

* : P < 0.05 compared with Ethanol

** : P < 0.05 compared with Stress

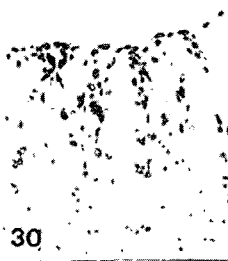


Fig. 30. The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The increase of COX-1 positive cells (arrow) were appeared. ×200.

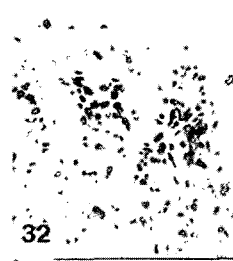


Fig. 32. The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The increase of COX-1 positive cells (arrow) were appeared. ×200.



Fig. 33. The immunohistochemical stain for NF-κB p50 in apical gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The NF-κB p50 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. ×200.

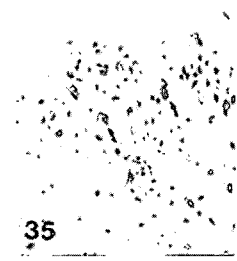


Fig. 35. The immunohistochemical stain for NF-κB p50 in apical gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The increase of NF-κB p50 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were appeared. ×200.

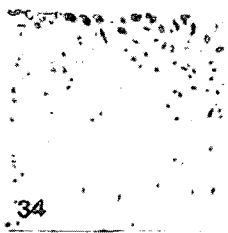


Fig. 34. The immunohistochemical stain for NF-κB p50 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The decrease of NF-κB p50 positive cells (arrow) were appeared. ×200.

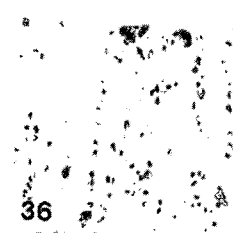


Fig. 36. The immunohistochemical stain for NF-κB p50 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The decrease of NF-κB p50 positive cells (arrow) were appeared. ×200.

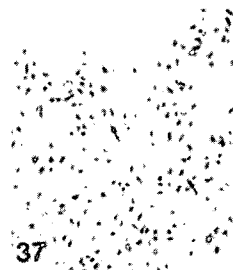


Fig. 37. The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The COX-2 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. ×200.



Fig. 39. The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The increase of COX-2 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were appeared. ×200.



Fig. 38. The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The decrease of COX-2 positive cells (arrow) were appeared. $\times 200$.



Fig. 40. The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The decrease of COX-2 positive cells (arrow) were appeared. $\times 200$.



Fig. 41. The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from mice with ethanol induced gastropathy. The apoptotic cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.

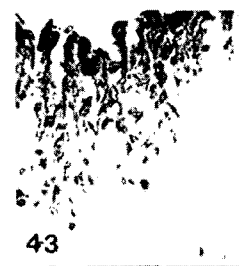


Fig. 43. The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from mice with stress induced gastropathy. The increase of apoptotic cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were appeared. $\times 200$.

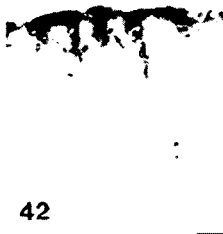


Fig. 42. The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from KBT administered mice with ethanol induced gastropathy. The decrease of apoptotic cells (arrow) were appeared. $\times 200$.

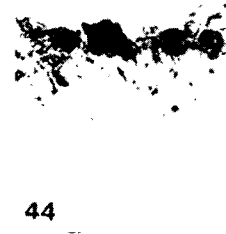


Fig. 44. The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from KBT administered mice with stress induced gastropathy. The decrease of distribution of apoptotic cells (arrow) were appeared. $\times 200$.

$\pm 87 / 200,000$ pick cell로, KS군은 Stress군에 비해 486.5% 증가한 $5091 \pm 55 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4).

3) NF- κ B p50 변화

점막상피에서 관찰되는 NF- κ B p50 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰

되었는데, 위 점막 손상 유발 후 NF- κ B p50 양성반응세포의 분포가 증가하였다(Fig. 33, 35). 이러한 분포 증가는 Ethanol군에서 372.4% 증가한 $5726 \pm 79 / 200,000$ pick cell, Stress군에서는 233.7% 증가한 $4044 \pm 31 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4). KE군과 KS군에서는 Ethanol군과 Stress군에 비해 NF- κ B p50 양성반응 세포의 증가가 적었는데(Fig. 34, 36), KE군은 Ethanol군에 비해 69.4% 감소한 $1754 \pm 21 / 200,000$ pick cell로, KS군은 Stress군에 비해 57.7% 감소한 $1709 \pm 19 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4).

4) 위점막내 COX-2 분포 변화

점막상피에서 관찰되는 COX-2 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 COX-2 양성반응세포의 분포가 증가하였다(Fig. 37, 39). 이러한 분포 증가는 Ethanol군에서 1294.6% 증가한 $5684 \pm 89 / 200,000$ pick cell, Stress군에서는 1209.4% 증가한 $7215 \pm 73 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4). KE군과 KS군에서는 Ethanol군과 Stress군에 비해 COX-2 양성반응 세포의 증가가 적었는데(Fig. 38, 40), KE군은

Ethanol군에 비해 20.1% 감소한 $6140 \pm 90 / 200,000$ pick cell로, KS군은 Stress군에 비해 26.4% 감소한 $5321 \pm 49 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4).

4. Apoptosis변화

대조군에서는 표면점액분비세포가 분포하는 점막 상층에서 TUNEL 양성반응세포는 핵에서 강한 양성 반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 TUNEL 양성반응세포의 분포가 증가하였다 (Fig. 41, 43). 이러한 분포 증가는 Ethanol군에서 649.8% 증가한 $16774 \pm 246 / 200,000$ pick cell, Stress군에서는 1259.5% 증가한 $30413 \pm 321 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table 4.). KE군과 KS군에서는 Ethanol군과 Stress군에 비해 TUNEL 양성반응 세포의 증가가 적었는데(Fig. 42, 44), KE군은 Ethanol군에 비해 45.0% 감소한 $9223 \pm 81 / 200,000$ pick cell로, KS군은 Stress군에 비해 57.0% 감소한 $13092 \pm 331 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table 4).

고 찰

위점막 손상은 위점막 혈류량이 부족하거나, NSAID 등과 같은 약물, 내적매개물질 및 세균, 바이러스, 염증세포 및 면역세포와 같은 생물학적으로인, 환경, 유전, 스트레스 등에 의해 점막을 보호하는 방어인자와 점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형이 깨어져, 점막과 점막하조직이 결손을 일으켜 위염과 소화성 궤양을 주도하는데, 주로 1차 보호장벽인 점액분비세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상은 위산과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandin 분비 감소, 세포분열의 억제 등을 들 수 있다¹²⁾.

소화성궤양은 점막공격인자와 방어인자간의 불균형으로 생기며, 원인은 H. pylori 감염, NSAID계열 약물 복용, 스트레스 등이 있다³⁾. 치료의 목적은 통증의 완화, 궤양의 치유와 함께 궤양재발의 방지와 적절한 예방치료가 필요하다.

위염과 소화성 궤양은 한의학적으로 胃脘痛, 呑酸,

嘈雜, 惛惱, 心痛 등의 범주⁹⁾에 속하며, 음식노권으로 인한 脾의 濕熱阻滯로 升降失調하여 발생하거나, 優愁思慮로 肝鬱氣滯하여 鬱結日久하면 血氣凝滯, 胃絡不通하여 통증과 출혈을 유발한다^{4,12,13)}.

스트레스는 교감신경을 흥분시켜서 동맥의 수축으로 인한 위점막의 혈류장애를 유발하고, 미주신경의 자극으로 펩신, 가스트린의 분비를 증가시키므로, 위점막 공격인자는 강화되고 방어인자는 약화되므로 인해 위점막의 손상을 일으킨다¹⁾. 한의학적으로 七情의 변화와 六淫의 변화는 인체에 스트레스로 작용하며 맥관 및 자율신경의 긴장과 이완을 유발한다¹⁴⁾.

歸脾湯은 宋代 嚴用和의 <濟生方>에 처음 기재된 처방으로 인삼, 백출, 복신, 산조인, 용안육, 황기, 당귀, 원지, 목향, 감초, 생강, 대조등으로 구성되어 있으며^{5,6)}, 思慮傷脾, 心脾兩虛하여 나타나는 健忘, 怔忡, 惰怠起臥, 食少, 盜汗, 肢體作痛, 不寐, 吐血, 下血 등에 적용된다^{7,15,16)}.

귀비탕에 관한 실험적 연구로는 이⁹⁾가 Ascorbic acid와의 비교 연구에서 귀비탕이 유효한 항스트레스 작용이 있다고 하였고, 류¹⁰⁾는 뇌의 catecholamines 함량을 지표로 귀비탕의 항스트레스 효과를 밝혔고, 김¹¹⁾은 소화성궤양과 관련된 위액분비물, 위산도 및 궤양계수를 측정하여 귀비탕의 항궤양 효과를 밝혔으나 아직 위점막손상에 대한 귀비탕의 방어효과를 확인하는 조직학적 연구가 미흡하였다.

이에 저자는 위점막 손상으로 인한 소화성 궤양의 예방효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 귀비탕을 사전 투여한 후, 화상에 의한 stress와 에탄올 투여를 통해 인위적인 위점막 손상을 유도하여 나타난 위점막의 일반적인 형태, 표면상피세포, 복합당질 (PNA), 점막보호인자 (COX-1), 염증관련매개물질 (NF- κ B p50, COX-2), 세포자기살해 (TUNEL) 등의 변화를 관찰하였다.

실험동물로는 태령 4주된 ICR계 숫컷 생쥐를 무균 사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 대조군, 스트레스에 의한 위점막 손상 유발군 (Stress군), 귀비

탕 추출액 사전 투여 후 스트레스에 의한 위점막 손상 유발군 (KS군), 에탄올에 의한 위점막 손상 유발군 (Ethanol군), 귀비탕 추출액 사전 투여 후 에탄올에 의한 위점막 손상 유발군 (KE군)로 나누었으며 각 군당 10마리를 배정하였다.

소화기 점막(gastric mucosa)과 점막밑조직의 결손(hemorrhage infarct and erosion)은 궤양(ulcer)을 주도하며, 주로 1차 보호장벽인 점액분비세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상은 위산 (gastric acid)과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandins 분비 감소, 세포분열의 억제 등을 들 수 있다¹⁷⁾.

본 실험에서 Ethanol군과 stress군의 위 점막에서 출혈성 침식과 중성 점액질 분비세포의 유실 등의 점막 손상이 일어났는데, 이러한 점막보호장벽의 손상 즉, 점막의 mucus와 bicarbonate 보호장벽의 결핍은 prostaglandin의 분비 차단에 의해 발생된 것으로¹⁸⁾, COX-1 mRNA 발현억제에 의한 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정 저해의 결과이다^{19,20)}. COX-1은 house-keeping enzyme으로서, 위장관 보호 (gastroprotection), 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리과정을 유지함으로써 세포의 항상성 (homeostasis)을 유지하는 중요한 역할을 한다. 본 실험에서 출혈성 침식 지역주변에서는 COX-1에 대한 양성반응이 거의 나타나지 않아 COX-1의 결핍이 점막손상의 일차적 원인으로 설명될 수 있었다^{21,22)}. 또한 이러한 조직손상은 점막과 유층에 존재하면서 위점막손상의 회복에 관여하는 표층모세혈관망의 손상을 초래하였고²³⁾, 그 결과 그 주변부에서 적혈구 울혈이 관찰되었다. 또한 이러한 모세혈관의 손상은 reperfusion시 허혈성 조직손상을 유발하기도 하는데²⁴⁾, 이러한 손상부위에서는 중성호성 백혈구를 비롯한 백혈구, 대식세포, 비만세포 등의 염증관여세포들의 침윤증가가 확인되었다²⁵⁾.

이러한 점막 손상지역에서는 점막상피세포의 apoptosis 변화도 관찰되었다. 이러한 세포자기살해는 점액분비세포의 oxidative stress와 미토콘드리아 기능 저하, caspase-3 activation, ceramide pathway

activation, mitogen activatedprotein kinase activation 등과 같은 기전을 통해 이루어진 것으로 생각된다²⁶⁻²⁸⁾.

점막손상은 oxygen free radical에 의한 lipid peroxidation (지질과산화)는 세포막의 polyunsaturated fatty acids를 퇴화시켜 막구조의 붕괴를 초래하는데 이러한 외부자극에 의한 세포내 산화환원 상태 및 외부에서 첨가된 산화제, 항산화등에의해 nuclear factor (NF- κ B)의 세포내 작용이 유도된다²⁹⁾. 이러한 NF- κ B의 조절이 깨어졌을 때 급성 염증상황에 의한 조직손상이 초래된다. 전사인자인 NF- κ B는 세포질내에서 I- κ B라는 inhibitory protein이 부착된 상태로 존재하다가 자극이오면 I- κ B가 떨어져 나가면서 분해되며 남은 dimer (보통 p50-p65 heterodimer)가 세포질에서 핵으로 이동하게 된다. 이동 후 cytokine, cytokine receptor, cell adhesion molecule, growth factor 등의 발현에 관여하는 유전자의 promoter나 enhancer의 κ B site에 결합함으로써 전사를 유도한다. 본 실험에서는 NF- κ B의 변화를 NF- κ B p50 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데 점막상피 손상지역에서 급격하게 증가된 양상을 보였다. 이는 전염증성 물질인 COX-2를 비롯해, 세포성 면역과 세포 기용 등의 과도한 증가를 촉발시켰다. 먼저 COX-2의 증가가 Ethanol군과 Stress군에서 관찰되었는데, COX-2는 외부자극에 의해 염증이 유발되어 전달되는 과정에서 유도성 동종효소 (inducible isoform)로 섬유모세포와 큰포식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되어 염증이 일어나는 곳에서 proinflammatory prostaglandin을 과량 방출한다^{29,30)}.

한편 귀비탕 추출물을 사전투여한 KE군과 KS군에서는 COX-1 발현을 통한 prostaglandin의 정상적인 분비는 mucus와 bicarbonate 보호장벽을 유지시켰으며, 점막세포의 세포자기살해가 적었다. 그 결과 Ethanol군과 Stress군의 점막에서 관찰된 과도한 점막세포의 손상과 염증반응은 KE군과 KS군에서는 나타나지 않았다. 또한 KE군과 KS군에서는 galactosyl- β -1,3-N-acetylgalactosamine와 관련된 복합당질인 PNA 양성반응의 유지가 점막표면에서 관찰되었는데, 이전의 보고^{31,32)}를 미루어보아 위점막보호

에 관여하는 것으로 보인다.

이상의 결과로 볼 때 귀비탕은 실험적으로 스트레스와 에탄올에 의한 위염과 소화성 궤양에 방어효과가 있었다. 향후 위염과 소화성궤양의 예방효과에 대한 귀비탕의 내분비계 및 면역혈청에 대한 효과와 개별 약제간의 상호작용 등의 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론

스트레스와 에탄올로 기인된 위점막손상에 대한 귀비탕의 방어효과를 조사하기 위하여 귀비탕 추출물을 사전에 투여한 후 화상과 에탄올 투여로 인한 위 점막 손상을 유도하여 나타난 위 점막의 일반적인 형태, 표면상피세포, 복합당질 (PNA), 점막보호인자 (COX-1), 염증관련매개물질 (NF- κ B p50, COX-2), apoptosis 등의 변화를 관찰하였다.

귀비탕 투여군은 스트레스와 에탄올로 인한 위 점막 손상을 적게 유발시켰으며 위표면상피세포의 배열유지와 PNA 및 COX-1 분포를 고르게 유지시켰다. 또한 NF- κ B p50의 활성도를 감소시켜 COX-2의 과발현을 억제하여 자기살해세포의 반응을 감소시켰다

이상의 결과로 귀비탕은 스트레스와 에탄올로 기인된 위점막손상에 대한 방어작용을 함으로써 2차적인 급성 염증성 점막손상을 차단하는 것으로 생각되며, 스트레스나 음주에 의한 위염, 위궤양을 방어할수 있을것으로 기대된다.

참고문헌

1. 박인서 편. 위염. 서울:대한소화기학회. 1998;7, 52, 57-58, 89, 169.
2. 순천향대 의과대학 소화기연구소 편. 소화기학. 서울: 고려의학. 2000:181-200.
3. 何春水. 易之 主編. 精選千家妙方. 북경:學苑出版社. 1996:81-114.
4. 楊思樹 主編. 東醫臨床內科學. 서울:법인문화사. 1999:288-305.

5. 嚴用和. 濟生方. 북경:人民衛生出版社. 1980:117.
6. 薛己. 內科摘要. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985:41-42.
7. 汪昂. 醫方集解. 서울:大成文化社. 1984:263-265.
8. 李鳳教 편역. 症狀鑑別治療. 서울:성보사. 1992:81-82.
9. 李和信. 熱Stress 및 遊泳Stress에 대한 歸脾湯과 Asocorbic Acid의 抗Stress 效能比較研究. 東醫神經精神科學會誌. 1995;6(1):19-40.
10. 柳在奎. 歸脾湯과 Asocorbic Acid가 熱 및 遊泳 Stress Guinea Pig의 腦 Catecholamine 含量에 미치는 影響. 東醫神經精神科學會誌. 1995;6(1):41-50.
11. 金勁宅. 歸脾湯이 흰쥐의 胃潰瘍에 미치는 影響. 경희대학교 대학원. 1982.
12. 전국한의과대학 비계내과학교수 공저. 비계내과학. 서울:아트동방. 1998:46-49.
13. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:大成文化社. 1999:191-192.
14. 金相孝. 東醫神經精神科學. 서울:杏林書院. 1980:62.
15. 신재용 편저. 방약합편해설. 서울:전통의학연구소. 1993:60-61.
16. 李 槿. 醫學入門. 서울:翰成社. 1983:903-904.
17. Arlt GD, Leyh M. Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. Langenbeck's Arch Surg. 2001;386:75-81.
18. Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara Y, Kobayashi K, Kuroki T. Prostaglandins in the stomach. an update. J. Clin. Gastroenterol. 1983;27:1-11.
19. Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. Am J med. 1998;105:20s-30s.
20. Siomon LS. Biology and toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Current Opinion in Rheumatology. 1998;10:153-158.
21. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. Prostaglandins & other Lipid Mediators. 1998;56:341-361.
22. Sakamoto C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. J Gastroenterol. 1998;33:618-624.
23. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. FASEB J. 1996;10:731-740.
24. Wallace JL. Gastric ulceration ; critical eventsat the neutrophil-endothelium interface. Can. J. Physiol. Pharmacol. 193;71:98-102.

25. Bamford KB. Chronic gastrointestinal inflammation. *FEMS Immuno Med Microbio.* 1999;24:161-169.
26. Konturek PC, Brozowski T, Konturek SJ, Taut A, Sliwowski Z, Stachura J, Hahn EG. Activation of gene growth factors and cyclooxygenases in rat gastric mucosa during recovery form stress damage. *Europe J Pharmaco.* 1998;342:55-65.
27. Porter SN, Howarth GS, Butler RN. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and apoptosis in the gastrointestinal tract ; potential role of the pentose phosphate pathways. *Europe J Pharmaco.* 2000;397:1-9.
28. 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.
29. Graham DY. NSAID ulcers : prevalence and prevention. *Mod Rheumatol.* 2000;10: 2-7.
30. 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.
31. Kitajima M, Mogi M, Kiuchi T, Shimizu A, Nakajima M, Oshima A, Kawakami H, Hirano H. Alternation of gastric mucosal glycoprotein in gastric mucosa in stress ; A light and electron microscopic study. *J. Clin Gastroenterol.* 1990;12:1-7.
32. Falk P, Roth KA, Gordon JJ. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. 1994;266:987-1003.