

## 益胃湯의 Indomethacin-유발 위점막 손상에 대한 효과

신혜승, 백태현

상지대학교 한의과대학 내과학교실

### The Effects of Ikwitang Extract on Indomethacin-induced Gastric Mucosal Lesions

Hye-Seung Shin, Tae-Hyun Baik

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

This study was carried out to investigate the effects of Ikwitang extract on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in mice.

Experimental groups were classified into a non-treated group(NM group), a non-administered group(CON group), the Misoprostol-administered group(MI group) and the Ikwitang-extract-administered group(IW group).

This study examined the morphological change, distribution of mast cells, mucous surface cells, acid mucose secreted cells, and apoptic cells, BrdU, COX-1, Hsp70, NF- $\kappa$ B p50, PKC, COX-2 and IL-12B of gastric mucosa.

**Results :** The results of this study were as follows:

1. In the Misoprostol-administered group and the Ikwitang-extract-administered group, the hemorrhagic erosion of gastric mucous and infiltrated mast cells decreased.
2. Mucous surface cells and acid mucose secreted cells observed in the Misoprostol-administered group and the Ikwitang-extract-administered group.
3. The distribution of apoptic cells, Hsp70, NF- $\kappa$ B p50, PKC, COX-2, and IL-12B increased in the Control group, but decreased in the Misoprostol-administered group and Ikwitang-extract-administered group.
4. Cell proliferation of gastric mucosa and the COX-1 positive cells decreased in the Control group, but increased in the Misoprostol-administered group and the Ikwitang-extract-administered group.

The above results suggest the Ikwitang extract had beneficial effects on indomethacin induced gastric mucosal lesions

**Key Words:** Ikwitang extract, Misoprostol, indomethacin, gastric mucosal lesions

### 1. 緒 論

위점막(gastric mucosa)과 점막밑조직의 결손은 궤양(ulcer)을 주도하며, 주로 1차 보호장벽인 점액분비 세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상의 원인으로 위산(gastric acid)과 pepsin의 분비증가,

점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandin 분비 감소, 세포분열의 억제 등을 들 수 있다.

소화성궤양의 원인은 산-pepsin설, 방어인자와 분비 억제인자설, 위염설, 유전설, 혈관-자율신경설, 내분비 관계설 등이 있으나 현재로는 산 및 pepsin의 점막에 대한 공격인자와 그 장해작용으로부터 점막을 방해하는 기구로서의 방어인자와의 평형이 파괴되어 공격인자가 상대적으로 우위의 상태가 되었을 때에 궤양이 발생한다는 shay의 원인설이 가장 타당한 것으로 알려지고 있다<sup>2,3</sup>.

소화성궤양의 서양의학적 치료목표는 증상의 완

· 접수 :2004년 7월 26일    채택 :2004년 8월 6일  
· 교신저자 : 신혜승, 강원도 원주시 우산동 283번지 상지대학교 부속한방병원 내과의국  
(Tel : 033-741-9382    H.p : 019-318-6360, E-Mail : sunyear9000@nate.com)

화, 궤양의 치유, 합병증 및 재발의 방지이며, 수술 등의 외과적 치료방법과 안정요법, 식이요법, 약물요법 등의 내과적 치료방법이 있다. 약물요법은 공격인자 억제제와 방어인자증강제를 사용한다. 공격인자억제제에는 제산제와 위산분비억제제인 항콜린제, H<sub>2</sub>-수용체 길항제, 항가스트린제제, Prostaglandin제제, Proton Pump 길항제 등이 있으며, 방어인자증강제에는 점액분비개선훈제와 궤양소피복제, 미세순환개선훈제, 세포조직보호제 등이 있다<sup>24</sup>.

Misoprostol은 Prostaglandin제제로 위산분비를 감소시킬 뿐만 아니라, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 분비와 점액분비를 증가시키고 아스피린과 같은 NSAID 등에 의한 위점막 손상을 보호함으로써 공격인자와 방어인자에 모두 관여하여 소화성궤양의 치료나 예방에 효과적인 것으로 보고 되고 있다<sup>25</sup>.

益胃湯은 清代 吳鞠通的 《溫病條辨》에 처음 기재된 處方<sup>6</sup>으로 益胃生津의 효능을 가지고 있어 胃陰不足時 나타나는 飮食不思, 胃脘隱痛, 食後飽脹, 口乾咽燥, 大便乾燥, 心煩微熱 等の 症狀에 사용할 수 있다.

이에 저자는 소화성궤양의 점막에 작용하여 治療효과가 있는 misoprostol과 滋陰養胃의 효능이 있는 益胃湯과의 治療효과를 비교연구하기 위해 indomethacin으로 위점막 손상을 유도하여 위점막의 一般的인 형태와 표면상피세포, 위점액 분비세포의 변화, 세포자기살해(TUNEL), 세포분열(BrdU), 점막보호인자(COX-1), 스트레스에 대한 완충적 물질(Hsp70), 염증관련매개물질(NF-κB p50, PKC, COX-2, IL-12B) 등의 변화를 관찰하였으며 이에 그 결과를 보고하고자 한다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 실험동물

대한실험동물센터에서 분양받은 4주령 BALB/c 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후, 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 정상군(이하 NM군), 위점막 손상유발군(이하 CON군), 위점막 손상유발 후 Misoprostol 투여군(이하 MI군), 위점막 손상유발 후 익위탕 투여군(이하 IW

군)으로 나누었으며, 각 군당 10마리를 배정하였다.

### 2. 위점막 손상 유발

위점막 손상을 유발하기 위해서 indomethacin (Sigma, USA)을 0.9% NaCl이 포함된 70% 에탄올용액에 희석시킨 후 10mg/kg를 CON군, MI군 그리고 IW군에 5일 동안 경구투여하였다.

### 3. Misoprostol의 제조와 투여

위점막 손상 후 MI군에 Misoprostol(Cytotec, Searle Korea)를 생리식염수에 희석시킨 다음 40μg/kg씩 5일 동안 경구투여하였다.

### 4. 한약재 추출액의 제조와 투여

익위탕의 처방에 따른 구성약물을 시중에서 구입하여 한약재 1첩(46.5g)을 증류수 500ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50ml으로 감압농축하여 IW군에 위점막 손상 유발 후 매일 2.5ml/kg으로 5일 동안 경구투여 하였다.

### 5. 조직표본 제작

위점막 손상 유발 후 5일이 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 연속절

Table 1. Composition of Ikwitang

韓藥名	生藥名	重量(g)
麥門冬	Liriodopsis tuber	15.0
生地黃	Rehmanniae radix	15.0
沙蔘	Adenophorae radix	9.0
玉竹	Polygonati odorati rhizoma	4.5
冰糖	Sacchrum Glacialis	3.0
	總藥量	46.5

편으로 제작되었다. 위점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

## 6. 조직화학적 변화 관찰

### 1) 출혈성 침식시 누출 혈액세포 변화 관찰

출혈성 침식시 발생하는 혈액세포 변화를 조사하기 위해 혈액세포를 위한 Luna's method를 실시하였다. 위점막 절편을 hematoxylin-Biebrich scarlet 용액에 5분간 염색하고 0.5% lithium carbonate 용액에서 분별한 후 관찰하였다. 한편 본 염색을 실시한 조직은 심장관류고정없이 조직적출 후 바로 10% NBF로 고정 처리하였다.

### 2) 비만세포의 분포 변화 관찰

위점막 손상시 일어나는 비만세포 변화를 관찰하기 위해 Luna's method를 실시하였다. 우선 5 $\mu$ m 연속 절편을 aldehyde fuchsin에 30분간 염색한 후 Weigert's iron hematoxylin과 methyl orange solution에 각각 1분, 5분 동안 대조염색하였다.

### 3) 중성점액분비세포의 분포 변화 관찰

위상에 의한 자가분해(autolysis) 방벽작용을 하는 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 표면점액세포의 변화를 조사하기위해서 periodic acid-schiff reaction (PAS) stain을 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분 동안 대조염색하였다.

### 4) 산성점액분비세포의 분포 변화 관찰

산성점액질(acid mucin)을 분비하는 목점액세포의 변화를 조사하기 위해서 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## 7. 면역조직화학적 변화 관찰

### 1) 점막내 세포증식 변화 관찰

점막내 세포증식의 변화를 관찰하기 위해 항 BrdU

항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 조직을 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU, Sigma, USA) 50mg/kg을 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C의 2N HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기위해 0.01%의 proteinase K(Dako, Denmark)가 포함된 normal goat serum(1:20, Dako)에 1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber내에서 72시간 반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG(DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였다. Steptavidin peroxidase(LSAB : DAKO)에 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 2) 점막내 보호인자의 변화 관찰

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 $\mu$ g/ml)에 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 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(1:100, DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였다. 이후 과정은 위에서 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다. 한편 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 하나인 Hsp70 분포변화를 관찰하기 위한 rabbit anti mouse Hsp70(1:200, Santa Cruz Biotec)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

### 3) 점막내 염증관련 매개물질 관찰

점막내 염증관련 신호에 관여하는 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p50과 cyclooxygenase(COX)-2, 세포활성을 주

도하는 protein kinase C(PKC) 그리고 염증유발성 cytokine인 Interleukin-12(IL-12)의 분포 변화를 조사하기 위해서 rabbit anti-mouse NF- $\kappa$ B p50(1:200, Santa Cruz Biotec)과 rabbit anti-mouse COX-2(1:500, Chyman, USA), rabbit anti-mouse PKC(1:200, Santa Cruz Biotec) 그리고 rabbit anti-mouse IL-12B(1:200, Santa Cruz Biotec) 등의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

### 8. TUNEL 방법

세포자기살해가 일어나는 apoptotic 세포의 분포 변화를 조사하기 위해 *in situ* apoptosis detection kit (Apo ptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL(terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직절편을 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그런 다음 strength TdT enzyme(36  $\mu$ l TdT enzyme : 72  $\mu$ l reaction buffer)을 처리하여 37  $^{\circ}$ C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하였다. Methyl green으로 대조염색하였다.

### 9. 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's T test로 유의성을 검증하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 일반적인 형태 변화

위점막 손상 유발군의 위점막에서는 심각한 출혈성 침식(hemorrhagic erosion)이 일어났고(Fig. 1), 많은 수의 벽세포(parietal cell)와 주세포(chief cell)의 유실도 관찰되었다. 특히 일부지역에서는 주세포 분포지

역인 기저부(basement membrane)까지 확장된 궤양(ulcer)도 나타났다. 한편 위점막 손상 유발 후 Miso prostol을 투여한 MI군(Fig. 6)은 일부 지역에서만 기저부까지 확장된 출혈성 침식이 확인되었다. 이에 반해 익위탕을 투여한 IW군에서는 대부분의 지역에서 정상군에서 보이는 정상적인 위 점막조직 형태가 관찰되었다(Fig. 11). 즉 정상적인 표면점액세포의 배열이 나타났으며, 벽세포와 주세포의 손상은 일어나지 않았다.

### 2. 조직화학적 변화

#### 1) 출혈성 침식시 누출 혈액세포의 변화

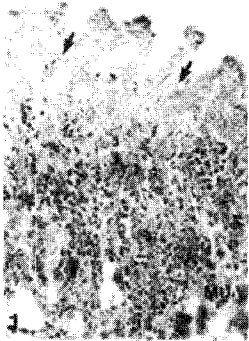
CON군의 출혈성 침식이 일어난 주변에는 적혈구 염주, 중성호성백혈구를 비롯한 과립백혈구와 림프구의 침윤(infiltration)이 증가된 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 침윤은 위 점막 상층뿐만 아니라 기저부까지 확산되어 있으며, 위점막 상층에서 적혈구 염주 분포 증가가 두드러졌다. MI군과 IW군에서는 간간히 점막 고유판에서 백혈구와 혈관내 적혈구가 관찰될 뿐 CON군에서 나타나는 과도한 혈액세포 침윤은 관찰되지 않았다(Fig. 7, 12).

#### 2) 비만세포 분포 변화

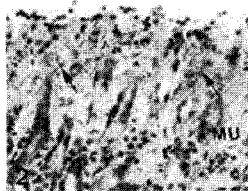
CON군의 출혈성 침식 주변의 기저부와 점막 하층(submucosa)에서는 비만세포가 증가하였다(Fig. 3). 특히 탈과립형(degranulated type)이 다수를 차지했다. MI군과 IW군에서는 CON군보다 적은 분포를 점막 하층에서 보였으며, 기저부로 이주한 비만세포는 관찰되지 않았다(Fig. 8, 13). 또한 MI군과 IW군에서 관찰된 비만세포는 대부분이 과립형(granulated type)이었다.

#### 3) 중성점액분비세포 분포 변화

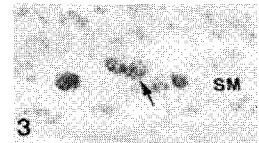
CON군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 PAS 양성반응을 보이는 표면점액세포가 관찰되지 않았다(Fig. 4). MI군과 IW군에서는 세포상층부에 중성점액을 분비하는 PAS 양성반응 표면점액세포가 상층 표면(apical surface)에서 위오목(gastric pit)까지 확장된 것으로 관찰되었는데, 이러한 분포는 정상군과 유사하였다(Fig. 9, 14). 그러나 MI군에서는 일부 지역



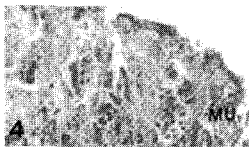
**Fig. 1.** The morphology of gastric mucosa from CON mice at days 5 after gastropathy elicitation. The aggregation of leucocytes in hemorrhagic erosions (arrow) evoked region are seen. MU, mucosa. H & E.  $\times 200$ .



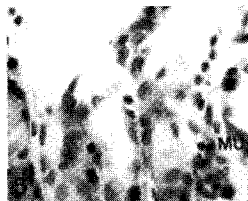
**Fig. 2.** The morphology of gastric mucosa from CON mice at days 5 after gastropathy elicitation. The noticeable increase of RBC (arrow) in base of hemorrhagic erosion evoked region were seen. Luna's method for blood cell.  $\times 200$ .



**Fig. 3.** The distribution of mast cell in gastric submucosa from CON mice at days 5 after gastropathy elicitation. The increase of infiltrated mast cell (arrow) were observed. arrow, degranulated type mast cell. Luna's method.  $\times 400$ .



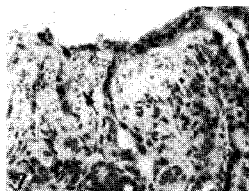
**Fig. 4.** The configuration of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from CON mice at days 5 after gastropathy elicitation. The disappearance of surface mucose cell were observed. PAS.  $\times 200$ .



**Fig. 5.** The configuration of acid mucose secreted cell in gastric pit from CON mice at days 5 after gastropathy elicitation. The disappearance of mucose cell were observed. Phloxine-tartrazine.  $\times 200$ .



**Fig. 6.** The morphology of gastric mucosa from MI mice at days 5 after gastropathy elicitation. The partial hemorrhagic erosions (arrow) are seen. SM, submucosa. H & E.  $\times 200$ .



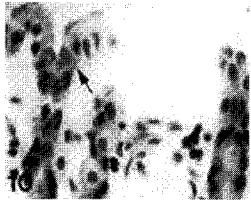
**Fig. 7.** The morphology of gastric mucosa from MI mice at days 5 after gastropathy elicitation. The decrease of RBC (arrow) in partial hemorrhagic erosion evoked region were seen. Luna's method for blood cell.  $\times 200$ .



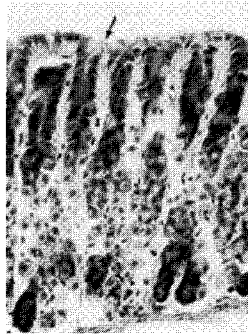
**Fig. 8.** The distribution of mast cell in gastric submucosa from MI mice at days 5 after gastropathy elicitation. The decrease of infiltrated mast cell (arrow) were observed. arrow, granulated type mast cell. Luna's method.  $\times 400$ .



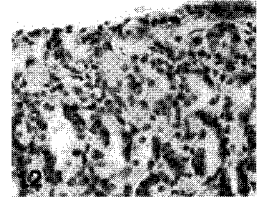
**Fig. 9.** The configuration of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from MI mice at days 5 after gastropathy elicitation. The surface mucose cell were observed except hemorrhage evoked region (arrow). PAS.  $\times 400$ .



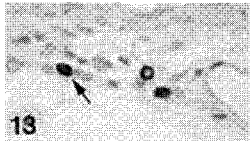
**Fig. 10.** The configuration of acid mucose secreted cell in gastric pit from MI mice at days 5 after gastropathy elicitation. The mucose cell (arrow) were observed except hemorrhage evoked region. Phloxine-tartrazine.  $\times 200$ .



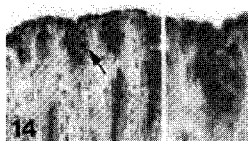
**Fig. 11.** The morphology of gastric mucosa from IW mice at days 5 after gastropathy elicitation. The hemorrhagic erosions were disappeared. H & E.  $\times 200$ .



**Fig. 12.** The morphology of gastric mucosa from IW mice at days 5 after gastropathy elicitation. The aggregation of RBC (arrow) were decreased than MI. Luna's method for blood cell.  $\times 200$ .



**Fig. 13.** The distribution of mast cell in gastric submucosa from IW mice at days 5 after gastropathy elicitation. The infiltrated mast cell (arrow) were decreased than MI. Luna's method. arrow, granulated mast cell.  $\times 400$ .



**Fig. 14.** The configuration of neutral mucose secreted cell in gastric mucosa from IW mice at days 5 after gastropathy elicitation. The configuration of surface mucose cell (arrow) seen as same as normal feature. Right photo, enlargement of arrow indicated region. PAS.  $\times 200$ .



**Fig. 15.** The configuration of acid mucose secreted cell in gastric pit from IW mice at days 5 after gastropathy elicitation. The configuration of mucose cell (arrow) seen as same as normal feature. Phloxine-tartrazine.  $\times 200$ .

에서 표면점액분비세포 배열의 유실이 관찰되었다.

#### 4) 산성점액분비세포 분포 변화

CON군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 산성점액을 분비하는 목점액세포가 관찰되지 않았다 (Fig. 5). MI군과 IW군에서는 위오목(gastric pit)에서 관찰되었으며, 이러한 배열은 정상군과 유사하였다(Fig. 10, 15). 그러나 출혈성 침식이 일어난 일부 MI군의 위오목에서는 목점액세포 분포가 관찰되지 않았다.

### 3. 면역조직화학적 변화

#### 1) 세포자기살해와 세포증식의 변화

##### ① 세포자기살해의 변화

정상군에서는 표면점액분비세포가 분포하는 점막 상층에서 apoptotic 양성반응세포는 핵에서 강한 양성 반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 apoptotic 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 CON군에서 605.6% 증가한  $27081 \pm$

**Table 2.** The image analysis of apoptosis, cell proliferation, COX-1, Hsp70, PKC, COX-2 and IL-12B of gastric mucosa in mice with gastropathy.

Antibody	NM	Gastropathy		
		CON	MI	IW
Apoptosis	4472 ± 85	27081 ± 369	10705 ± 148*	7356 ± 84**
BrdU	6021 ± 41	1327 ± 24	3492 ± 48*	5981 ± 67**
COX-1	33214 ± 632	9186 ± 87	13593 ± 124*	27994 ± 398**
Hsp70	6321 ± 69	28993 ± 298	18438 ± 196*	12344 ± 135**
NF-κB p50	8936 ± 34	44579 ± 598	33641 ± 472*	21224 ± 299**
PKC	6495 ± 62	32989 ± 496	29050 ± 321*	10306 ± 598**
COX-2	6146 ± 74	23675 ± 382	16236 ± 247*	10306 ± 198**
IL-12B	2346 ± 28	40076 ± 579	31798 ± 414*	7656 ± 68**

(image analysis for 250000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard

NM : NO inflammation elicited mice

CON : gastro-inflammation elicited mice

MI : misoprostol administered mice after gastro-inflammation elicitation

IW : Ikwitang administered mice after gastro-inflammation elicitation

\*, P < 0.05 compared with CON

\*\* , P < 0.05 compared with MI

369/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 TUNEL 양성반응 세포의 분포가 적었는데, MI군은 60.5% 감소한 10705 ± 148/250,000 pick cell로, IW군은 72.8% 감소한 7356 ± 84/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 TUNEL 양성반응세포 분포는 MI군에 비해 31.9%나 적었다(Table 2).

②세포증식의 변화

위샘 목부분에서 증식된 세포에서 관찰되는 BrdU 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 위 점막 손상 유발 후 BrdU 양성반응세포의 분포가 감소하였다. 이러한 분포 감소는 CON군에서 80.0% 감소한 1327 ± 24/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 BrdU 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, MI군은 263.2% 증가한 3492 ± 48/250,000 pick cell로, IW군은 450.7% 증가한 5981 ± 67/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 BrdU 양성반응세포 분포는 MI군에 비해 71.3%나 많았다(Table 2).

2) 점막내 보호장벽의 변화

① 점막내 COX-1의 분포 변화

정상군에서는 점막 고유층과 표면상피에서 COX-1 양성반응세포는 핵주변 세포질에서 강한 양성반응을

보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 COX-1 양성반응세포의 분포가 감소하였다. 이러한 분포 감소는 CON군에서 72.3% 감소한 9186 ± 87/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 COX-1 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, MI군은 148.0% 증가한 13593 ± 124/250,000 pick cell로, IW군은 304.8% 증가한 27994 ± 398/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 COX-1 양성반응세포 분포는 MI군에 비해 105.9%나 많았다(Table 2).

② 점막내 Hsp70의 분포 변화

스트레스에 대한 완충적 물질인 Hsp70 분포는 정상군에서 점막 고유층에 분포하였으며 핵과 주변세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었다. 위 점막 손상 유발후 Hsp70 양성반응세포의 분포가 증가하였다 이러한 분포 증가는 CON군에서 458.7% 증가한 28993 ± 298/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 Hsp70 양성반응세포가 적었는데, MI군은 36.4% 감소한 18438 ± 196/250,000 pick cell로, IW군은 57.4% 감소한 12344 ± 135/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 Hsp70 양성반응세포 분포는 MI군에 비해 33.1%나 적었다(Table 2).

3) 염증관련 매개물질의 변화

① NF- $\kappa$ B p50의 분포 변화

점막상피에서 관찰되는 NF- $\kappa$ B p50 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 NF- $\kappa$ B p50 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 CON군에서 498.9% 증가한 44579 $\pm$ 598/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 NF- $\kappa$ B p50 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MI군은 24.5% 감소한 33641 $\pm$ 472/250,000 pick cell로, IW군은 52.4% 감소한 21224 $\pm$ 299/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 NF- $\kappa$ B p50 분포는 MI군에 비해 36.9%나 적었다(Table 2).

② PKC 양성반응세포의 분포 변화

점막상피에서 관찰되는 PKC 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 PKC 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 CON군에서 508.0% 증가한 32989 $\pm$ 496/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 PKC 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MI군은 11.9% 감소한 29050 $\pm$ 321/250,000 pick cell로, IW군은 65.6% 감소한 10306 $\pm$ 244/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 PKC 분포는 MI군에 비해 65.6%나 적었다(Table 2).

③ COX-2 양성반응세포의 분포 변화

점막상피에서 관찰되는 COX-2 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 COX-2 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 CON군에서 385.2% 증가한 23675 $\pm$ 382/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 COX-2 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MI군은 31.4% 감소한 16236 $\pm$ 247/250,000 pick cell로, IW군은 56.5% 감소한 10306 $\pm$ 198/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 COX-2 분포는 MI군에 비해 36.5%나 적었다(Table 2).

④ IL-12B 양성반응세포의 분포 변화

점막상피에서 관찰되는 IL-12B 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었

는데, 위 점막 손상 유발 후 IL-12B 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 CON군에서 1708.3% 증가한 40076 $\pm$ 579/250,000 pick cell로 관찰되었다. MI군과 IW군에서는 CON군에 비해 IL-12B 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MI군은 20.7% 감소한 31798 $\pm$ 414/250,000 pick cell로, IW군은 80.9% 감소한 7656 $\pm$ 68/250,000 pick cell로 관찰되었다. IW군의 IL-12B 분포는 MI군에 비해 75.9%나 적었다(Table 2).

IV. 考 察

본 실험을 시행한 결과, CON군의 위점막에서 출혈성 침식과 중성 점액질 분비세포의 유실 등의 점막 손상이 일어났다. 이러한 점막보호장벽의 손상 즉, 점막의 mucus와 bicarbonate 보호장벽의 결핍은 prostaglandin의 분비 차단에 의해 발생된 것인데<sup>7,8</sup>, 이는 COX-1 mRNA 발현억제에 의한 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정 저해의 결과이다<sup>9,10</sup>. COX-1은 house-keeping enzyme으로서, 위장관 보호(gastroprotection), 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 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<sup>11,12</sup>. 또한 이러한 조직손상은 점막고유층에 존재하면 위점막손상의 회복에 관여하는 표층모세혈관망의 손상을 초래하였고<sup>13</sup>, 그 결과 그 주변부에서 적혈구 울혈이 관찰되었다. 또한 이러한 모세혈관의 손상은 reperfusion시 허혈성 조직손상을 유발하기도 한다<sup>14</sup>. 이러한 손상부위에서는 중성호성 백혈구를 비롯한 백혈구, 대식세포, 비만세포 등의 염증관세포들의 침윤증가도 확인되었다<sup>15</sup>. 한편 이러한 점막손상은 외부로부터 가해지는 여러 가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위한 스트레스 단백질의 합성 증가를 유도하며, 열 충격 단백질(Hsp)군이 대량 합성된다<sup>16</sup>. 이 단백질의 하나인 Hsp70은 환경적 스트레스에 의해 부분적으로 변성된 단백질들과 결합하여 변성된



단백질간의 상호 응축을 감소시키거나 새롭게 합성되어지는 폴리펩타이드의 적절한 폴딩과 세포내 이동위치를 조절함으로써 세포를 보호하는 molecular chaperone으로 작용한다. Hsp70은 정상적으로 세포질 내에 위치하다가 스트레스가 가해지면 핵 내 핵소체 주위로 이동하며 회복기에 들어서면 다시 세포질로 돌아간다<sup>17</sup>. 이러한 Hsp70은 CON군에서 Hsp70 양성 반응이 증가하였으며, 양성반응은 핵 내에서 강하게 나타났다.

점막 손상지역에서는 점막상피세포의 세포자기살해(apoptosis)와 세포분열(proliferation)의 변화도 관찰되었다. 즉 위샘 목부분에서 일어나는 세포분열을 통해 새로운 표면점액세포의 생성이 이루어지는데, CON군에서 세포분열이 감소한 것을 thymidine analogue인 BrdU<sup>18</sup>를 통해 확인하였다. 또한 과도한 세포자기살해가 출혈성 침윤지역의 세포에서 발생하여 분열과 세포자기살해의 균형이 무너졌다. 이러한 세포자기살해는 점액분비세포의 oxidative stress와 미토콘드리아 기능 저하, caspase-3 activation, ceramide pathway activation, mitogen activated protein kinase activation 등과 같은 기전을 통해 이루어진 것으로 생각된다<sup>19,21</sup>.

점막손상은 oxygen free radical에 의한 lipid peroxidation(지질과산화)는 세포막의 polyunsaturated fatty acids를 퇴화(degrade)시켜 막구조의 붕괴를 초래하는데 이러한 외부자극에 의한 세포내 산화환원상태 및 외부에서 첨가된 산화제, 항산화 등에 의해 nuclear factor(NF)- $\kappa$ B의 세포내 작용이 유도된다. 이러한 NF- $\kappa$ B의 조절이 깨어졌을 때 급성 염증에 의한 조직손상이 초래된다<sup>22</sup>. 전사인자인 NF- $\kappa$ B는 세포질 내에서 I- $\kappa$ B라는 inhibitory protein이 부착된 상태로 존재하다가 자극이오면 I- $\kappa$ B가 떨어져 나가면서 분해되며 남은 dimer(보통 p50-p65 heterodimer)가 세포질에서 핵으로 이동하여 cytokine, cytokine receptor, cell adhesion molecule, growth factor 등의 발현에 관여하는 유전자의 promoter나 enhancer의  $\kappa$ B site에 결합함으로써 전사를 유도한다<sup>23</sup>. 본 실험에서는 NF- $\kappa$ B의

변화를 NF- $\kappa$ 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 CON군에서 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<sup>24,25</sup>. 또한 PKC의 활성화는 IL-12 등의 염증유발성 cytokine의 발현 증가를 통해 염증반응 가속화를 유도한다<sup>26</sup>.

한편 MI군과 IW군에서는 COX-1 발현을 통한 prostaglandin의 정상적인 분비는 mucus와 bicarbonate 보호장벽을 유지시켰으며 점막세포의 세포분열 지속과 세포자기살해 감소의 균형을 이루었다. 그 결과 CON군의 점막에서 관찰된 과도한 점막세포의 손상과 염증반응은 MI군과 IW군에서는 나타나지 않았다. 그러나 MI군에 비해 IW군에서 정상적인 위점막에 더 가까운 형태가 관찰됨으로 미루어보아 치료효과는 MI군보다 IW군이 더 뛰어난 것으로 사료된다.

이상의 결과로 胃陰不足에 활용되는 益胃湯은 위점막 손상에 대한 치료효과가 인정되었으며, 치료효과에 있어서 益胃湯 투여군이 misoprostol 투여군보다 우수한 효과를 나타내었다. 따라서 그 임상적인 활용이 기대되는 바이며, 앞으로 더 많은 연구가 이루어지길 바라는 바이다.

## V. 結 論

위·십이지장 점막 손상에 대한 益胃湯의 효능을 연구하기 위하여 indomethacin을 이용해 생쥐의 위점막 손상을 유도한 후, 위점막의 일반적인형태, 점액분비세포, 세포증식(BrdU), 점막보호인자(COX-1, Hsp70), 염증관련매개물질(NF- $\kappa$ B, PKC, COX-2, IL-12B), 세포자기살해(TUNEL) 등의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 위점막 손상은 益胃湯 투여군과 misoprostol 투여군에서 완화되었는데, 우선 점막에서 다발적으로 야기된 출혈성 침식과 궤양이 감소하였고, 정상적인 표면점액세포의 배열이 나타나기도 하였다.
2. 益胃湯과 misoprostol 투여군의 표면상피세포에서 세포자기살해 감소와 세포분열 증가가 관찰되었으며 益胃湯 투여군이 misoprostol 투여군에 비하여 유의한 결과를 나타내었다.
3. 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정에 관여하는 점막보호인자인 COX-1의 분포는 益胃湯과 misoprostol 투여군 모두에서 증가하였으며 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질인 Hsp70의 분포는 益胃湯과 misoprostol 투여군 모두 감소하였다. 또한 益胃湯 투여군이 misoprostol 투여군에 비하여 유의한 결과를 나타내었다.
4. 益胃湯과 misoprostol 투여군 모두 급성 염증에 의한 조직손상을 유도하는 NF- $\kappa$ B p50, 세포활성에 관여하는 PKC가 감소되었으며, 그 결과 염증 유도성 동종효소인 COX-2의 과발현과 염증유도성 cytokine인 IL-12B 분비가 감소되었다. 또한 益胃湯 투여군이 misoprostol 투여군에 비하여 유의한 결과를 나타내었다.

### 參 考 文 獻

1. Georg D. Arlt and Maarkus Leyh. Incidence and pathophysiology of Peptic ulcer bleeding. *Langenbeck's Arch Surg.* 2001;386:75-81.
2. 전국의한외과대학 비계내과학교수 공저. 비계내과학. 서울:아트동방; 1998, p.41, 239-49.
3. 의학교육연구원. 가정의학. 서울:서울대학교출판부; 1993, p.234-6.
4. 東西醫學融合研究會編. 臨床東西醫學. 서울:영림사; 1997, p.458-70.
5. 김경환. 이우주의 약리학 강의. 서울:의학문화사; 1997, p.719-28.
6. 吳鞠通. 溫病條辨. 北京:人民衛生出版社; 1998, p.65-6.
7. David Y. Graham. NSAID ulcers (prevalence and prevention). *Mod Rheumatol.* 2000; 10:2-7.
8. Tetsuo Arakawa, Kazuhide Higuchi, Takashi Fukuda, Yasuhiro

- Fujiwara, Kenzo Kobayashi, and Tetsuo kuroki. Prostaglandins in the stomach. *J. Clin. Gastroenterol.* 1998;27:1-11.
9. Byron Cryer and Michael B. Kimmey. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Am J med.* 1998; 105: 20-30.
10. Lee S. Siomon. Biology and toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Opinion in Rheumatology.* 1998;10:153-8.
11. Byron Cryer and Andre Dubois. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.*;1998, 56, p.341-61.
12. Choitsu Sakamoto. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol.* 1998; 33:118-24.
13. Wallace, J. L., and Granger, D. N.. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB.* 1996; 10:731-40.
14. Wallace, J. L.. Gastric ulceration (critical events at the neutrophil-endothelium interface). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1993; 71: 98-102.
15. Kathleen B. Bamford. Chronic gastrointestinal inflammation. *FEMS Immuno Med Microbio.* 1999; 24: 161-9.
16. DeMaio A.. The heat-shock response. *New Horiz.* 1995; 2:198-207.
17. Valazquez J. M. and Lindquist S. H.. Hsp 70 - Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell.* 1994; 36: 655-62.
18. Martin Kullendorff, Lisa M. McShane, Arthur Schatzkin, Laurence S. Freedman, Michael J. Wargovich, Cindy Woods, Madhu Purewal, Randall W. Burt, Michael Lawson, Donna J. Mateski, Elaine Lanza, Donald K. Corle, Barbara O' Brien, and James Moler. Measuring cell proliferation in rectal mucosa (Comparing bromodeoxy uridine(BrdU) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) assays). *J Clin Epidemiol.* 2000; 53: 875-83.
19. Peter Ch. Konturek, Tomasz Brozowski, Stanislaw J. Konturek, Astrid Taut, Zbigniew Sliwowski, Jerzy Stachura, and Eckhart G. Hahn. Activation of gene growth factors and cyclooxygenases in rat gastric mucosa during recovery from stress damage. *Europe J Pharmacol.* 1998; 342: 55-65.
20. Shane N. Porter, Gordon S. Howarth, Ross N. Butler. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and apoptosis in the gastrointestinal tract (potential role of the pentose phosphate pathways). *Europe J Pharmacol.* 2000; 397: 1-9.
21. Tae Il Kim, Soo Hyun Jin, Won Ho Kim, Eun Hye Kang, Kang Yel Choi, Hyun Jin Kim, Sung Kwan Shin, and Jin

- Kyung Kang. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int j colorectal Dis.* 2001; 16: 167-73.
22. Baeuerle P. A.. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* ; 1998; 95: 729-31.
  23. Baeuerle P. A. and Baltimore D.. NF- $\kappa$ B - Ten years after. *Cell.* 1996; 87: 13-20
  24. R. Pabst, H. J. Rothkötter, and M. Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa (entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen). *Vetrinary Immuno immunopath.*. 1999; 72: 157-65.
  25. I. Kirman, B. Vainer, and O. H. Nielsen. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm res.* 1998; 47: 285-9.
  26. Andrea H., Thomas k., Josef P. and Konrad S.. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2000; 1485: 63-99.