

흰쥐소장 점막의 허혈재관류손상에서 프로스타글란딘 E₁이 세포자멸사에 미치는 영향

배태희 · 김승홍 · 김철규 · 김한구 · 김우섭

중앙대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effect of Prostaglandin E₁ on Apoptosis Induced by Ischemia Reperfusion Injury in Rat Intestinal Mucosa

Tae Hui Bae, M.D., Seung Hong Kim, M.D., Cheol Kyu Kim, M.D., Han Koo Kim, M.D., Woo Seob Kim, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Apoptosis is a physiologic or programmed cell death process which is controlled by genes. It is essential for the function and the appropriate development of multicellular organism. It is also thought to be one of the main mechanisms of cell death in ischemic tissues. The effect of prostaglandin E₁(PGE₁) is proven to be useful in the recovery of ischemic changes by inducing vasodilation of peripheral vessels and platelet disaggregation. PGE₁ is also known to suppress apoptosis in human liver sinusoidal endothelial cell from ischemia-reperfusion injury.

The purpose of this study is to evaluate the effects of PGE₁ on the apoptosis in the ischemia reperfusion injury of rat intestine.

Thirty Sprague-Dawley rats were used. In control group(N=15), superior mesenteric artery was occluded for 60 minutes and after removing the vessel clamp, it was reperfused for 60 minutes and harvested. In experimental group(N=15), a jejunal flap was also made as in the control group except for the intraarterial administration of the PGE₁ right after clamping the artery and removing the clamp.

H&E, TUNEL and immunohistochemical stains for

Received March 24, 2005

Revised April 20, 2005

Address Correspondence : Seung Hong Kim, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University, 224-1 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-070, Korea, Tel: 02) 6299-1615 / Fax: 02) 825-9880 / E-mail: shkimps@lycos.co.kr

* 본 논문은 2003년 11월 제 54차 대한성형외과학회 추계학술대회에서 발표되었음.

* 본 논문은 2003년도 중앙대학교 교내연구비 지원에 도움을 받은 논문임.

p53, bax, and bcl-2 were performed. There were ischemic changes in gross and microscopic findings in both groups. The apoptotic index was significantly lower in the experimental group(1.29 ± 0.82 ($p=0.003$)) than in the control group (2.33 ± 0.95). The rat intestinal ischemia apoptosis by ischemia-reperfusion was partly related to the modulating of bcl-2, bax, and p53 expression.

Our results indicate that PGE₁ suppresses the apoptosis in the ischemic jejunal flap and this effect is probably the result of a increase in expression of bcl-2.

Key Words: Apoptosis, Prostaglandin E₁, Intestines, Ischemia-reperfusion injury

I. 서 론

공장(jejunum)은 두경부에서 유리피판으로 가장 많이 쓰이는 공여부위로 인두 및 경부 식도의 재건 시 첫번쩨로 선택되어지는 부위이다. 그러나 공장은 인체에서 허혈재관류 손상에 가장 취약한 부위중의 하나로¹ 이런 공장피판의 특성 때문에 혈관문합 시 혹은 수술 후 경파관찰 기간에 특별한 주의가 요구되며 허혈손상이 수술 후 누공이나 협착 등 합병증의 중요한 원인인자로 영향을 준다.²

소장에서 허혈재관류 손상을 줄이기 위한 여러 가지 방법들이 연구되고 있는데, 이들 중에서 중성구 박탈, cyclosporine, pentoxifylline, sodium nitroprusside, FK409, L-glutamine, glycine, alpha-melanocyte-stimulating hormone 투여 등의 방법들이 일부 성공적인 결과를 보이고 있다.³ 최근에 소장에서 허혈 전 처치가 허혈손상에 대해 보호적인 효과를 보이는 것으로 알려져 있으며⁴ 공장피판에서 이런 허혈 전 처치가 임상적으로 적절히 이용되면 피판의 허혈에 대한 내성을 증가시키고 피판의 착상 및 혈관문합술시 술기를 좀더 용이하게 시행할 수 있을 것이다.

생체조직의 허혈 시 세포괴사와 동반되어 일어나는 세포자멸사는 일명 계획된 세포사(programmed cell death)로서 정상으로 진화되는 조직에서 일어나고 면역 기관의 발달에 관여하며 조직 세포의 생성과 소멸을 조절하여 조직의 항상성(homeostasis)에 중요한 역할을 하며 허혈재관류 손상 시 세포자멸사가 세포사의 주된 기전으로 보고되고 있다.⁵

저자는 흰쥐의 소장으로 가는 혈류를 차단하여 일차성 혀혈을 유도하고, 다시 재관류시켜 공장피판에 이차성 혀혈에 의한 손상을 일으킨 모델에서 유리피판술 시행 시 혼히 사용되고 있는 PGE₁의 투여가 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 아울러 세포자멸사에 영향을 미치는 중요 단백인 p53, bax, bcl-2를 측정하여 PGE₁이 유전자 경로를 통해 세포자멸사에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 재료

실험동물은 동일조건하에서 사육된 평균 250 g 내외의 Sprague-Dawley종 흰쥐 30 마리를 암·수 구분 없이 각각 15마리씩 대조군과 실험군으로 하였다.

나. 실험방법

15마리의 흰쥐를 5% ketamine hydrochloride(Ketar®, 유한양행, 서울) 45 mg/kg과 xylazine hydrochloride(Rompun®, 바이엘코리아, 서울) 3 mg/kg을 혼합하여 대퇴근육에 주사하여 마취한 후 전기 제모기로 복부의 털을 제거하고, 10% povidone iodine 용액과 alcohol로 복부를 소독한 후 사지를 앙와위로 하여 고정하였다.

복부에 전총으로 정중절개를 가하여 소장과 상장간막동맥(superior mesenteric artery)을 노출시키고 상장간막동맥을 혈관경자로 60분간 결찰하여 소장으로 가는 혈류를 차단하고, 결찰을 풀어 60분 동안 재관류시킨 후 트리이츠인대(treitz ligament)하방 10 cm지점의 소장(jejunum)의 절편을 5 cm 채취하였다(Fig. 1).

15마리의 실험군은 대조군과 같은 방법으로 상장간막동맥을 결찰하여 혈류를 차단하여 소장의 혀혈을 유도하였는데, 상장간막동맥을 결찰하기 전과 결찰을 풀어 재관류

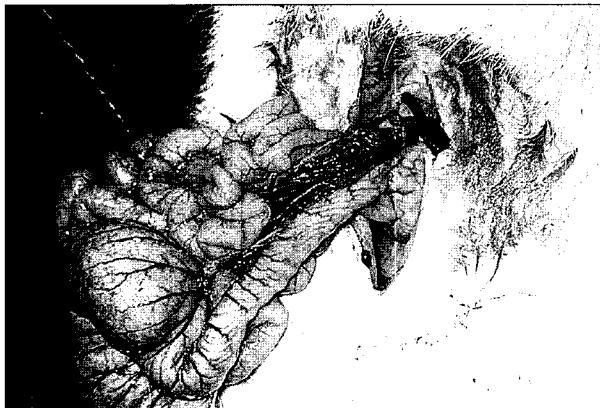


Fig. 1. Ischemia was induced by application of a microvascular clamp to the superior mesenteric artery for 60 minutes.

시킬 때 20 ng/cc 농도의 PGE₁을 50 ng/kg의 용량으로 두 차례에 걸쳐 대퇴동맥에 투여하였다.

다. 조직의 염색

1) Hematoxylin and eosin stain

Hematoxylin and eosin(H&E)으로 염색하여 세포자멸사를 포함한 혀혈성 변화를 관찰하였다.

2) TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL)

파라핀에 포매된 조직을 5 μm로 박절하여 poly-lysine으로 전처리한 유리 슬라이드에 부착 후 xylene과 알코올과정을 거쳐 파라핀을 제거하고 알코올로 함수시켰다. *In situ* detection kit는 Mebstain Apoptosis kit II를 사용하여 유리 슬라이드를 중류수에 수세한 후 37°C PBS에 30 분간 방치하였다. PBS를 제거한 후 20 μl/ml의 proteinase K 용액을 가하고 37°C에서 30분간 작용시켰다. 중류수로 2분간 4회 수세하고 DNA nick end labelling 과정으로 50 μl TdT buffer II를 가한 후 5-0분간 실온에서 방치하였다가 여분의 용액을 제거하고, 50 μl의 TdT 용액을 가하고 37°C에서 60분간 작용시켰다. TB 완충액을 용기(coprin jar)에 넣고 유리슬라이드를 실온에 15분간 둔 후 중류수로 수세하였다. 50 μl의 차단 용액으로 10분간 실온에 방치한 후 PBS 완충액으로 5분씩 3회 수세하고 peroxidase가 결합한 streptoavidin에 20분간 방치하였다. 반응이 끝난 후 유리슬라이드 표본을 PBS 완충액으로 세척하고, DAB로 1분 동안 발색하였다. 그 후 슬라이드를 중류수에 2분씩 3회 세척한 후 Mayer's hematoxyline으로 10분간 대조염색하고 흐르는 물에 수세하여 알코올 탈수과정을 거치고 Canada balsam으로 봉입 후 400배 배율에서 광학현미경으로 관찰하였다. 관찰방법은 조직표본 전체의 세포를 센 후 핵에 진하게 갈색으로 염색된 세포를 양성으로 판정하여 백분율로 환산하는 세포자멸사지수(apoptotic index)로 표시하였다.

3) 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직을 5 μm 두께로 박절하여 통상의 탈파라핀 및 함수과정을 거친 뒤, 3% 과산화수소로 5분간 처리하여 내인성 과산화수소의 작용을 차단하였다. 중류수와 Tris 완충액으로 수세한 후 일차항체를 1:50으로 희석하여 표본에 가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이차항체로 LSAB kit를 사용하고, DAB로 발색한 후 Mayor hematoxylin으로 대조염색하고 알코올 탈수과정을 거친 후 Canada balsam으로 봉입하고 관찰하였다. 염색결과의 판정은 p53의 경우는 소장점막 세포의 핵에, bax과 bcl-2의 경우는 세포질에 진한 갈색으로 염색된 세포가 전체세포의 5% 이하이면 (-), 5-10%이면 (+), 10-50%이면

(++), 50% 이상이면 (+++)로 표기하였다.

라. 통계학적 분석

Window용 SPSS(version 8.0) 통계프로그램을 이용하여 ANOVA와 Spearman 상관관계를 분석하였으며, p 값이 0.05 이하인 것을 통계학적으로 유의성 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

가. 육안적인 소견

대조군이나 실험군 모두에서 공장 피판의 육안적 모습은 큰 차이를 보이지 않았으며, 양측 모두 60분간의 허혈을 유도 한 후 울혈에 의해 불규칙적으로 검붉은색을 띠었고 종창의 소견이 관찰되었다. 60분의 재판류 후에도 육안적인 소견은 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

나. 조직학적 소견과 TUNEL 및 면역조직화학염색 소견

H&E염색에서 실험군과 대조군에서 전체적으로 상피세포 전반에 걸쳐 세포질이 붉어지고 핵의 응축을 보이는 허혈성 괴사 소견을 보이면서 종종 핵이 분할되거나 응축된 세포자멸사의 소견이 관찰되었으며 실험군에서 대조군에 비해 세포자멸사가 더 적게 관찰되었다(Fig. 3).

TUNEL방법에 의한 조직소견에서 세포자멸사지수는

대조군이 2.33 ± 0.95 였고 실험군이 1.29 ± 0.82 로 통계학적으로 유의하게 실험군에서 세포자멸사지수가 낮았다($p=0.003$)(Fig. 4).

p53의 발현은 대조군, 실험군 모두에서(+)였고(Fig. 5, Table I), bax의 발현은 대조군에서(++)가 7예, (+++)가 8예였고 실험군 15 예 모두에서(+)였다. (Fig. 6, Table I). Bcl-2의 발현은 대조군은(-)가 3예, (+)가 9예, (++)가 3예였고 실험군에서는(+)가 3예, (++)가 12예였다(Fig. 7, Table I).



Fig. 2. Gross findings of jejunal flap with ischemic change after 60 minutes reperfusion in experimental group. There are no differences between control group and experimental group.

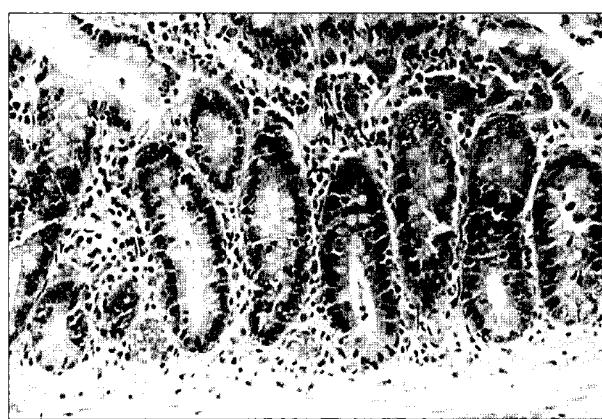
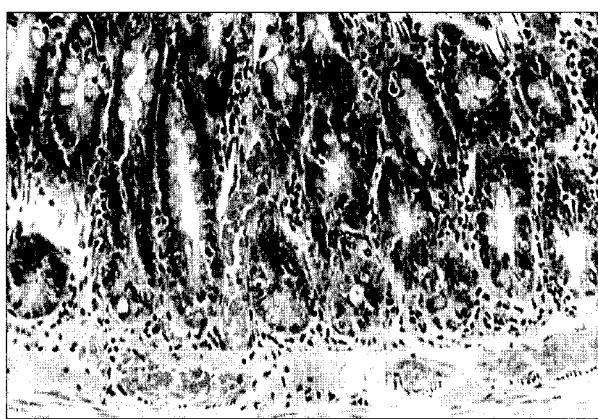


Fig. 3. Intestinal epithelia are relatively well preserved in control (Left) and experimental group (Right). Apoptotic cells which have aggregated and fragmented nucleus with eosinophilic cytoplasm are less noted in experimental group(H/E, $\times 200$).

Table I. Degree of Immunohistochemical Staining of P53, Bax, Bcl-2

	P53				Bax				Bcl-2			
	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
Control group	0	15	0	0	0	0	7	8	3	9	0	3
Experimental group	0	15	0	0	0	15	0	0	0	3	12	0

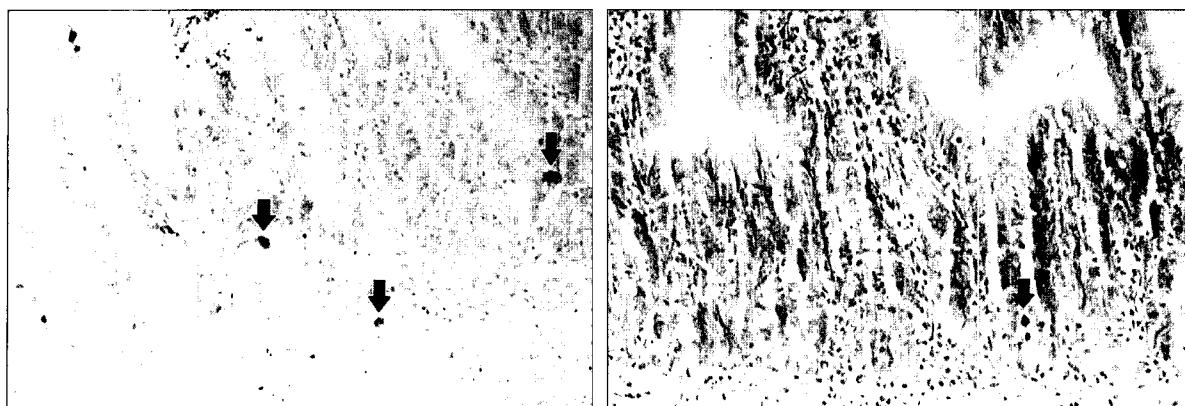


Fig. 4. TUNEL staining for apoptotic cells. Positive cells(arrow) are occasionally noted in control group (Left), positive cells are rarely noted in experimental group (Right) (TUNEL, $\times 200$).

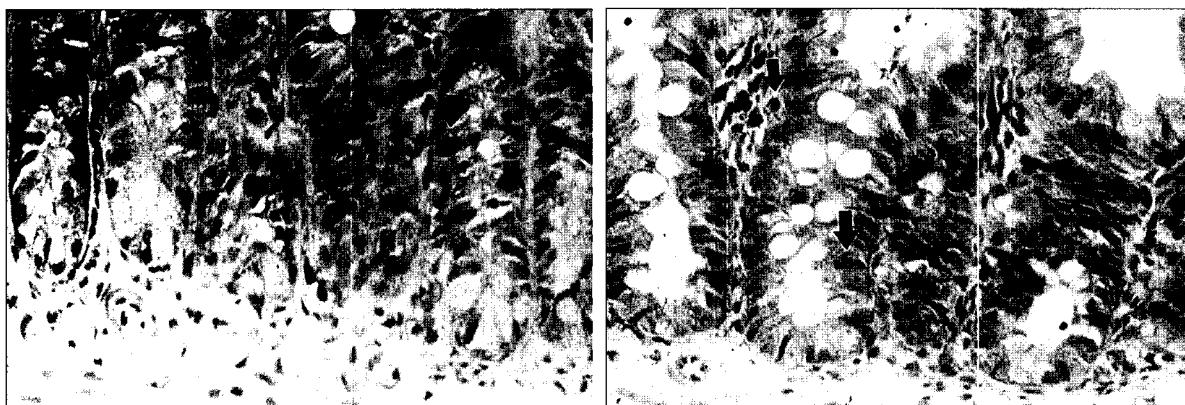


Fig. 5. Immunohistochemical staining for p53 in jejunum. P53 positive cells(arrow) with nuclear staining are occasionally noted in control (Left) and experimental group (Right) (ABC*, $\times 400$). *ABC(Avidine Biotin Complex)

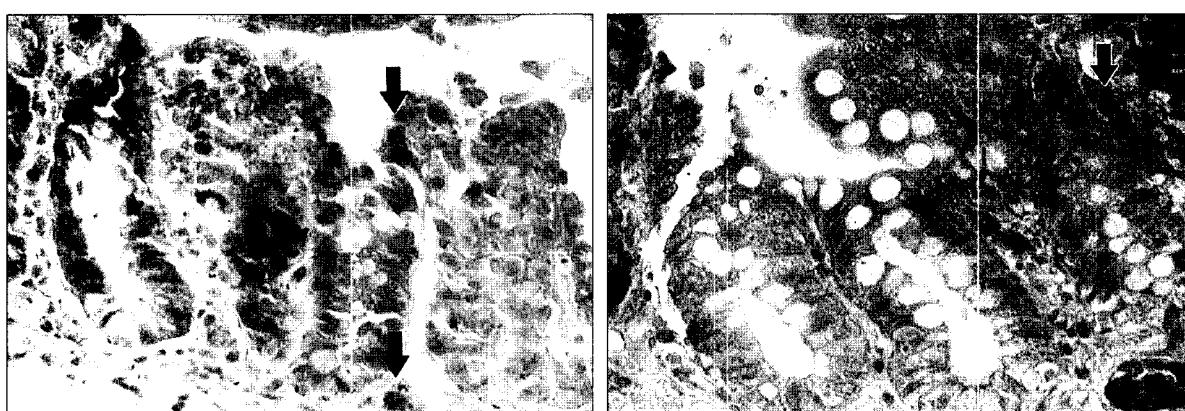


Fig. 6. Immunohistochemical staining for bax in jejunum. Bax positive cells(arrow) with cytoplasmic staining are occasionally noted in control group (Left) and positive cells are rarely noted in experimental group (Right) (ABC*, $\times 400$). *ABC(Avidine Biotin Complex)

IV. 고 찰

유리피판술은 성형외과 영역에서 연부조직의 재건을 위해 자주 이용되는 시술로 조직의 일부를 혈관경과 함께 공

여부에서 완전히 분리하여 멀리 있는 수혜부 혈관에 곧바로 연결해주는 방법으로 미세수술의 발달로 단기간 내에 조직결손을 대체해 주기 위하여 유용하게 쓰이고 있다. 그러나 이러한 피판술은 기술적인 숙련도의 부족, 혈관연축

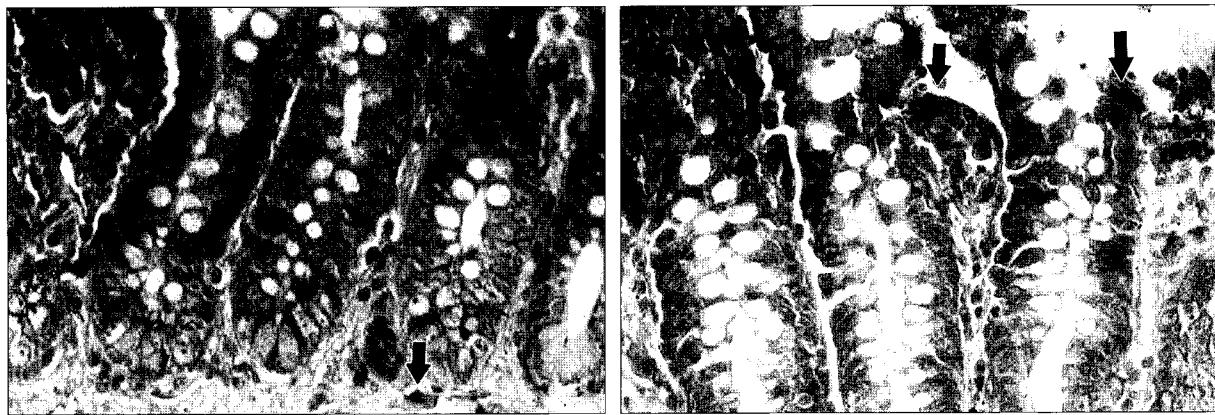


Fig. 7. Immunohistochemical staining for bcl-2 in jejunum. Bcl-2 positive cells (arrow) with cytoplasmic staining are rarely noted in control group (Left) and positive cells are occasionally noted in experimental group (Right) (ABC*, $\times 400$). *ABC(Avidine Biotin Complex)

(vasospasm), 혈관손상으로 인한 혈전의 생성 등으로 허혈에 의한 피판의 손실로 수해부 재건에 실패할 수 있어 수술 중이나 수술 후 허혈을 막는 것이 중요하며 피판술 후 이러한 허혈을 최소화하기 위하여 국소혈관확장제 투여, 전신적 혈파린 또는 PGE₁ 투여 등의 방법을 사용한다.⁶

유리피판에서 산화유리기, lipid peroxides, arachidonic acid 대사산물 등이 허혈 재관류 손상에 중요한 역할을 하는데, 발생기전은 허혈기간 동안 피판내에 축적된 산화유리기가 재관류 즉시 혈관내피세포에 손상을 주게 되고, 혈액 내 호중구가 이에 부착하여 활성화되면 arachidonic acid의 대사산물과 여러 가지 주화물질(chemotactic factor)을 분비하여 혈관내피세포의 손상을 가속화하고 염증반응을 일으킨다. 혈류가 중단된 조직의 혈관경이 문합되기 전까지의 일차성 허혈에 의한 피판의 손상은 미세수술의 발달로 현저히 감소하였으나, 혈관의 재개통 후 혈류의 재관류 시 허혈기간 동안 피판내에 축적된 산화유리기 등이 혈관내피세포를 손상시켜 발생하는 동맥 또는 정맥내의 혈전이 이차성 허혈을 일으키며 이것이 유리피판술 후의 주요 실패원인으로 알려져 있다.

세포자멸사는 유전자에 의하여 조절되는 생리학적이고 계획된 세포의 죽음으로 다세포 유기체에서 불필요하거나 손상 받은 세포, 위험할 수 있는 세포를 제거함으로써 주위의 건강한 세포조직들이 구조적으로나 기능적으로 항상성을 유지하는데 반드시 필요한 것이다. 또한 세포자멸사가 과도하게 일어나거나 부적절한 시기에 발생하거나 또는 충분히 일어나지 않아 질병이 시작되고 진행될 수도 있는 것으로 알려져 있다.⁷

소장의 점막은 허혈재관류 손상에 매우 민감한 것으로 잘 알려져 있지만 허혈재관류 손상으로 유도된 세포자멸사와 소장의 조직손상과의 관계는 명확히 밝혀진 바는 없다. 몇몇 최근의 연구들에서 허혈재관류 손상이 뇌, 심근,

간에서 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있으며⁸⁻¹⁰ 뇌에서 세포자멸사의 정도는 허혈시간의 기간과 비례해서 나타난다고 보고되고 있다.⁸ 흰쥐의 상장간동맥을 결찰 후 재관류시키면 소장에서도 세포자멸사를 관찰할 수 있는데 이 세포자멸사가 소장의 허혈재관류 손상 시 주된 세포사의 기전으로 여겨지고 있다.⁵

프로스타글란дин은 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase를 거쳐 생성되는 긴사슬 불포화 지방산(long chain polyunsaturated fatty acid)으로 처음 발견된 후, 폐색성 동맥경화 등 하지 말초혈관 질환 환자의 혈류 개선을 위해 사용되어 왔으며, 동물실험 등을 통해 피부판 생존률을 높이는 작용을 한다고 보고된 바 있었고 최근의 연구에서 PGE₁가 간세포 및 위접막세포에서 허혈재관류 손상으로 유도된 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹¹

세포자멸사에 관여하는 물질 중에 현재 interleukin-1 β converting enzyme, bcl-2, 그리고 종양억제 유전자인 p53 등 세 유전자 집단이 세포자멸사의 조절에 관여하는 인자로 활발히 연구되고 있으며, 포유류의 cysteine protease인 interleukin-1 β converting enzyme(ICE)이 선충류(Nematoda)의 ced-3과 유사하며 이것으로 미루어보아 ced-3이 단백질분해를 통해 세포자멸사과정을 진행시키는 것임을 알 수 있다.

Bcl-2 유전자는 선충류의 ced-9 유전자와 유사하며, 세포자멸사과정을 억제하는 것으로 알려져 있으며, ced-3과 연관된 ICE의 작용을 차단하고 항산화제 경로(antioxidant pathway)에 의하여 반응성 산소의 농도를 조절하며 세포질세망(endoplasmic reticulum)에서 세포질로 칼슘이온의 유리를 억제함으로서 세포질내 칼슘이온의 농도를 조절하고 핵막(nuclear envelope)의 소공을 통한 단백질의 이동을 조절하여 bax 유전자를 통제하여 세포 자멸사를 예방하고 p53은 세포 자멸사를 억제하는 bcl-2를 억제하고 bax

유전자를 활성화시켜 세포 자멸사를 촉진하게 된다.

P53은 세포주기 중 유전자의 손상유무를 감시하는 기능을 하며, 유전자 손상 시 증가하며 DNA의 이상이 발견될 경우 세포주기 중 G1/S-phase 세포주기를 정지시켜 유전자가 자연 치유될 수 있는 시간을 갖도록 하거나 DNA를 치유시키고, 치유 불가능할 경우 세포소멸로 유도하는 역할을 한다.

약물학적인 허혈 전 처치의 조직보호 효과는 세포자멸사를 억제하는데 일부 관여하고 있으며¹² 이것은 기관의 기능적인 회복에도 중요한 역할을 하게 되며 이런 허혈 전 처치가 최근에 소장에서도 세포자멸사를 억제한다는 사실들이 보고되고 있다.¹³

소장에서 세포자멸사의 기능적인 중요성은 세균의 전위의 증가와 연관되어 있으며 세포자멸사의 존재는 재관류 기간에 따라 변하게 된다.

저자는 흰쥐의 허혈재관류손상 모델에서 60분간 상장간 동맥을 결찰하여 허혈을 유도하고 60분 동안 재관류시켰을 때 소장점막세포에서 세포자멸사가 가장 많이 관찰되었다는 실험에 근거하여 실험을 시행하였다.⁵

흰쥐의 허혈성 공장 피판에서 TUNEL법에 의하여 세포자멸사가 관찰되었고 PGE₁을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 세포자멸사가 적게 관찰되었다. 면역조직화학염색상 p53의 발현은 두군간에 차이가 없었으나 bax의 발현은 대조군에서 더 높게 관찰되었으며, 세포자멸사를 억제하는 bcl-2의 발현은 실험군에서 더 높게 관찰되었다.

이상의 결과들은 소장의 허혈재관류 손상으로 유도된 세포자멸사를 PGE₁의 투여로 감소시킬 수 있으며 여기에는 bcl-2 유전자의 발현증가와 관련되어 있는 것을 의미한다.

세포자멸사가 허혈재관류 손상에서 중요한 역할을 하므로 조기에 이런 세포자멸사를 발견하고 치료를 시작함으로써 공장피판을 이용한 재건술 시 임상적으로 적절히 이용된다면 피판의 허혈에 대한 내성을 증가시키고 더 폭넓은 공여부를 선택할 수 있으며 피판의 착상 및 혈관문합술 시 술기를 좀더 용이하게 시행할 수 있으며 피판의 생존률을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 실험은 허혈시간이 짧아 임상에서 특히 주의가 요구되는 공장피판의 허혈재관류손상의 억제를 유도하기 위해 고안된 실험으로 흰쥐의 소장에서 허혈재관류손상 시 PGE₁을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 세포

자멸사가 감소하였고, PGE에 의한 세포자멸사의 억제는 bcl-2 유전자 발현의 증가와 연관성이 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Tsuchida Y, Aoki N, Fukuda O, Nakano M: Changes in hemodynamics in jejunal flaps of rabbits due to ischemia, venous congestion, and reperfusion as measured by means of colored microspheres. *Plast Reconstr Surg* 101: 147, 1998
2. Olding M, Jeng JC: Ischemic tolerance of canine jejunal flaps. *Plast Reconstr Surg* 94: 167, 1994
3. Hassoun HT, Zou L, Moore FA: Alpha-melanocyte-stimulating hormone protects against mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: 1059, 2002
4. Zhang Y, Wu YX, Hao YB, Dun Y, Yang SP: Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. *Life Sci* 68: 1013, 2001
5. Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY: Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 274: G270, 1998
6. Sohn WR, Lee JW, Burm JS, Chung CH, Oh SJ: The effect of PGE₁ on the skin flap survival after secondary venous ischemia. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 24: 651, 1997
7. Web SJ, Harrison DJ, Wyllie AH: *Apoptosis, An overview of the process and its relevance in disease*. Kaufmann SH (editor): Apoptosis, California, Academic Press, 1997, p 1
8. Hill IE, MacManus JP, Rasquinho I, Tuor UI: DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 676: 398, 1995
9. Itoh G, Tamura M, Suzuki Y: DNA fragmentation in infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labelling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 146: 1325, 1995
10. Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF: Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *Am J Pathol* 142: 935, 1993
11. Hong Y, Pietro M, Philippe M, Christian T, Fre' deric T, Jose' O, Gilles M, Jinning L: Prostaglandin E1 protects human liver sinusoidal endothelial cell from apoptosis induced by hypoxia reoxygenation. *Microvas Resear* 64: 94, 2002
12. Liu H, McPherson BC, Yao Z: Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: Role of protein kinase C ϵ and - δ isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: 404, 2001
13. Kojima M, Iwakiri R, Wu B, Fujise T, Watanabe K, Lin T, Amemori S, Sakata H, Shimoda R, Oguzu T, Ootani A, Tunada S, Fujimoto K: Effects of antioxidative agents on apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 139, 2003