

원 저

황련해독탕이 DSS로 유발된 흰쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향

안중환, 최은영, 이성환, 박인식¹, 임성우

동국대학교대학원 한의학과 비계내과학교실, 동국대학교 한의학과 해부학교실¹

Effects of *Hwangryunhaedoktang* on DSS-induced Colitis

Joong-Hwan An, En-Young Choi, Seong-Hwan Lee,
In-Sick Park¹, Seong-Woo Lim

Department of Oriental Internal Medicine,
College of Oriental Medicine, Dongguk University
Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongguk University¹

Objectives : We examined the effect of *Hwangryunhaedoktang* (HH) on the experimental ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS).

Methods : Experimental colitis was induced in rats by daily treatment with 5% DSS in the drinking water for 5 days. Afterward, the rats were divided into two groups : the control group was administered water and the sample group was administered HH for 7 days.

Results : The sample group provided HH for 7 days demonstrated fast recovery of body weight compared with the control group. Histologic change showed fast regeneration of crypt and surface epithelial cells and decreased edema of the submucosa and decreased lymphatic follicle of mucosa compared with the control group. Immunohistochemical stain using COX-2 gene was decreased and there was localized Ki-67 positive reaction. Regeneration of surface epithelial cell and goblet cell in mucosa was observed by transmission electron microscope.

Conclusion : These results indicate therapeutic effect of HH on DSS-induced colitis in rats.

Key Words: *Hwangryunhaedoktang*, colitis, dextran sulfate sodium, COX-2, Ki-67 protein.

서 론

염증성 장질환(inflammatory bowel disease; IBD)은 그 원인이 분명하지 않고, 조직학적인 변화가 비 특이적이다. 특히 궤양성 대장염은 서구를 중심으로 많이 발생하며, 대장 점막에 염증성 궤양이 생기는 병으로 증상은 다양하지만 설사, 장출혈 및 복통 등이 주된 증상이고, 발열, 식욕부진, 체중 감소 등도 흔히 올 수 있으며, 궤양성 대장염 환자의 3% 내지 13% 정도가 대장암으로 진행된다고 보고되고 있다¹⁾.

· 접수 : 2006년 6월 1일 · 논문심사 : 2006년 6월 1일
· 채택 : 2006년 6월 15일
· 교신저자 : 임성우, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814
번지 동국대학교 일산한방병원 한방내과
(Tel: 031-961-9043, Fax: 031-961-9009,
E-mail: omdlsw@hanmail.net)

치료는 약물치료와 수술치료가 있는데, 아직 정확한 원인과 병리상태를 알지 못하여 보조적이고 대증적인 약물치료를 하고 있으며, 심각한 부작용을 야기하는 것으로 보고 되고 있다¹⁻²⁾.

궤양성 대장염은 한의학의泄瀉,痢疾,腸風,腸毒의 범주에 해당 된다고 볼 수 있다³⁾.病因은外邪로脾胃를傷하거나정신적으로肝氣鬱結되어橫逆犯胃하거나飲食不節 또는 만성화 된 경우에는脾腎虛로 인하여, 또는大腸에濕鬱氣滯되어 발생된다⁴⁾.

病的 급성기와 활동기에는濕鬱化熱하거나濕熱이氣血과相搏하여大腸에壅滯된 경우가 많아清熱利濕,理氣行滯의治法을 쓴다⁴⁾.

黃連解毒湯은葛洪⁵⁾의<肘後備急方>에 처음 나오는處方으로,清熱燥濕,瀉火解毒,消炎作用이 있는黃連,黃芩,黃柏,梔子 등의藥材들로 구성 되어⁶⁾,一切의火熱,大熱煩燥 및一切熱毒을 치료하며⁷⁾,대장염의治療處方に 응용되고 있다⁴⁾. 실험적 연구로는腸管의弛緩作用에 대한 연구 등^{6,8-10)} 많은 연구가 보고 되고 있으나, 이 방제의 효능으로 보아 궤양성 대장염 급성기, 활동기에 효능이 있을 것으로 생각되나 아직 이에 대한 연구는 없었다.

이에 저자는黃連解毒湯이 궤양성 대장염에 미치는 영향을 연구하기 위하여 흰쥐에 DSS로 궤양성 대장염이 유발된 병태 모델을 통하여 육안적, 조직학적 및 면역조직화학적으로 관찰하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중 약 300g 내외의 수컷 흰쥐(male Sprague-Dawley rat)를 대한 실험동물 센터에서 분양 받아 실험실 환경에서 7일간 적응시키면서 물과 음식을 자유롭게 마실 수 있게 한 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 부속 경주한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고,黃連解毒湯(Hwangryunhaedoktang; HH)의 처방은方藥合編¹⁰⁾에 준하였으며, 처방 1첩의 구성 및 용량은 Table 1에 나타내었다.

3) 검액의 제조와 투여

黃連解毒湯 2첩 분량을 증류수 1l에 넣고 약 2 시간 전당한 후 여과하여, 여액을 감압 농축하여 검액으로 사용하였다. 검액의 농도는 60kg의 사람이 1일 2첩의 약제를 먹는 것을 기준으로 체중에 비례하여 사람 투여량의 3배를 투여기준으로 설정하였다.

방 법

1. Colitis 유발과 실험군 분류

실험은 흰쥐 5마리를 1군으로 하여 정상군, 대조군 및 실험군으로 분류하였다.

정상군은 아무런 처치를 하지 않은 군이며, 대조군과 실험군은 5% dextran sulfate sodium(이하

Table 1. Prescription of Hwangryunhaedoktang

Herbs	Name of Crude Drugs	Scientific Name	Dose (g)
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	<i>Coptis japonica Makino</i>	4.50
黃芩	<i>Scutellaria Radix</i>	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	4.50
黃柏	<i>Phellodendri Cortex</i>	<i>Phellodendron amurense Ruprecht</i>	4.50
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	<i>Gardenia jasminoides Ellis</i>	4.50
Total			18.00 (g)

DSS, mw 40,000, ICN, USA)을 5일간 경구투여하여 colitis 유발 후 DSS 음용을 중지하고, 7일간 생수를 경구 투여시킨 군은 대조군으로, 7일간 검액을 경구 투여시킨 군을 실험군으로 설정하였다.

2. 조직표본 준비

현미경 관찰을 위하여 실험동물을 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후, 복부를 정중절개하고 소화관을 전체적으로 적출하였다. 적출한 내장 중, 대장을 두 부위(결장 근위부, 결장 원위부)로 나누어 시료를 채취하였으며, 실온에서 24시간 동안 10% 중성 포르말린용액(NBF: natural buffered formalin)에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5µm 두께의 연속절편으로 제작하였다.

3. 조직학적 염색

1) Hematoxylin & Eosin (H & E) Stain

조직의 일반적인 성상을 관찰하기 위하여 paraffin에 포매하여 절편한 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀(deparaffination)한 후, ethanol을 농도별로 거치면서 가수(hydration)시킨 후 hematoxylin에서 5분 동안 염색하고, 다시 1% acid alcohol용액을 거친 후 ammonia water를 처리하였다. 다시 eosin용액으로 염색한 후 ethanol을 농도별로 거치면서 탈수(dehydration)시킨 후 Xylene을 이용하여 cleaning하고 봉입하였다.

2) Alcian Blue-PAS Stain

조직 내의 점액질과 glycogen을 관찰하기 위하여, paraffin에 포매하여 절편한 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀(deparaffination)한 후, ethanol을 농도별로 거치면서 가수(hydration)시킨 후 Alcian Blue용액에 30분 동안 염색하였다. 수세 후 0.3% sodium carbonate 용액으로 30분간 처리한 후 다시 수세하고, 0.5% periodic acid 용액으로 10분간 산화시켰다. 다시 수세 후 Schiff 용액으로 15분간 염색하고, sulfurous 용액으로 수세한 후 ethanol을 농도별로 거치면서 탈수(dehydration)시킨 후 Xylene을 이용하여 cleaning하고 봉입하였다.

4. 면역조직화학적 염색

먼저 paraffin에 포매된 조직을 Xylene 처리하여 탈파라핀화 한 후 절편을 proteinase K (20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후(혹은 항체에 따라서 microwave에 15분 처리), H₂O₂로 5분 처리하여 조직 내의 endogeneous peroxidase를 제거하고, 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체(primary antibody)로 Table 2에 있는 항체들을 이용하여 항원 항체 반응을 한 후, 4°C humidified chamber에서 12시간 동안 반응시켰다. 다음 2차 항체(secondary antibody)인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1000, DAKO, USA)에 실온에서 10분간 link 하였고, Steptavidin peroxidase(LSAB: DAKO)에 10분 동안 실온에서

Table 2. Primary Antibodies Used in Experiment

Antibody	Host	Sources
COX-1	Rabbit	Incstar Co.
COX-2	Rabbit	Incstar Co.
HSP 70	Rabbit	Incstar Co.
NF-kB p65	Rabbit	Incstar Co.
MPGES-1	Rabbit	Incstar Co.
MPGES 2	Rabbit	Incstar Co.
Ki-67	Rabbit	Incstar Co.

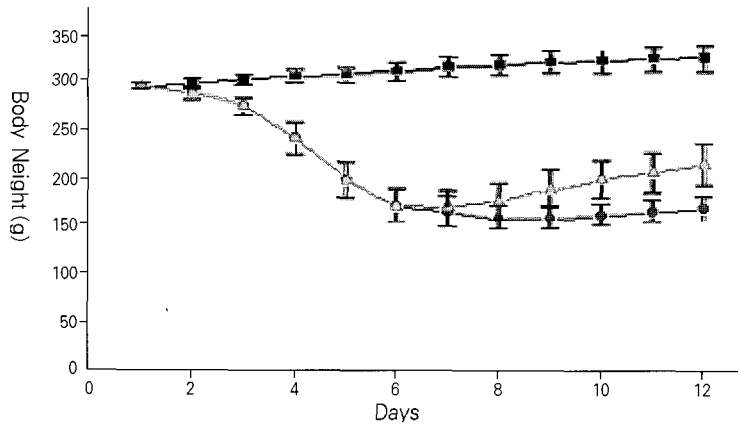


Fig. 1. Number of mycoplasma pneumonia cases by month and year.

반응시켜, DAB 발색처리 후 hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

는 평균 220g 정도 되었다(fig. 1).

결 과

1. 육안적 형태 변화 소견

DSS를 음용시킨 3일째부터 실험동물은 설사를 시작하며, 털의 윤기가 없어지고, 누렇게 탈색되고 있었으며, 일부 동물에서는 혈변을 보이기 시작하였고, 체중감소를 보이고 있었다.

실험동물은 평균적으로 체중 300g을 기준으로 하여, 정상군에서는 점차적으로 체중이 증가하여 실험 12일째는 평균 330g 정도로 되었다(fig. 1).

대장염 유발을 위하여 DSS를 음용시키는 대조군과 실험군에서 DSS 음용 5일 동안 거의 1/3의 체중감소가 일어나고 있었으며, 실험 5일째에는 평균 200g 정도로 되었으며, 그 과정에서 2마리는 사망하였다. 그 후 물을 음용한 대조군은 계속해서 9일까지 약간씩 체중감량이 되다가(평균 155g) 그 후부터 조금씩 회복되며, 12일째는 평균 170g 정도 되었고, 이 과정에서 다시 2마리가 사망하였다. 실험군인 黃連解毒湯 음용군은 6일부터 체중 회복을 보이고 있었으며, 9일째는 평균 186g 정도 되었고, 회복속도도 대조군에 비해 빨라져 12일째

2. 조직학적 염색 소견

대장 원위부의 상피의 염증반응은 주로 점막층에서 일어난다(fig. 2A). 정상적인 대장상피의 점막층은 상피세포층(epithelial cell layer)과 고유판(lamina propria)으로 구성되어 있는데, 상피세포층에는 잘 발달된 선와(crypt)를 관찰할 수 있었다. 선와의 기저부에는 미분화세포(undifferentiated cell)가 위치하고 있으며, 선와의 벽을 따라 많은 술잔세포(goblet cell)와 일부 흡수세포를 관찰할 수 있었다(fig. 2B,3A).

대장염 유발 실험동물의 표본에서는 점막층과 점막하층에 많은 임파소절(lymphatic follicle)이 형성되고 있었으며(fig. 2C), 상피의 여러 곳에서 선와부위가 짓물러져 없어지며(erosion), 일부 남아있는 부위도 표면상피세포(surface epithelial cell)가 탈락되고 있었다(fig. 2D,3B). 그리고 염증세포가 집단을 이루지 않은 점막하층(SM)에서는 혈관벽이 얇아지고, 점막하층의 부종현상을 관찰할 수 있었다(fig. 2E).

DSS 처리 후 생수를 먹인 대조군에서는 손상부위 재생소견이 3일째보다 7일째에 보다 많이 나타나고 있었다(fig. 3C,D).

조직내의 점액질과 glycogen을 관찰하기 위하여 Alcian Blue-PAS 염색을 시행한 결과, 정상군의 대장에서는 잘 발달된 선와와 함께 선와 표면에서 점액세포들이 분비한 많은 점액질을 관찰할 수 있었다(fig. 4A).

실험군에서 黃連解毒湯 음용 3일째에 활발한 상피의 재생현상을 관찰할 수 있었는데, 점막층의 표면부터 선와의 재생이 시작되고 있었으며(fig. 4B), 재생된 선와의 표면에서 점액질을 함유한 술잔세포의 활발한 재생도 관찰할 수 있었다(fig. 4D). 실험군 7일째의 표본에서는 남아있는 림프소절들을 관찰할 수 있었고(fig. 4C), 거의 완성된 선와와 선와 표면을 따라 재생된 술잔세포가 대장의 내강으로 점액을 생산, 분비하는 것을 관찰할 수 있었다(fig. 4E).

3. 면역조직화학적 염색 소견

1) Cyclooxygenase (COX)-1

정상군의 대장상피 점막에서 COX-1의 면역반응은 양성으로 나타나 표면상피세포나 술잔세포 그리고 점막하조직의 결합조직세포(connective tissue cell)에 전반적으로 양성반응이 나타났고, 대장염 유발 실험동물에서는 많은 염증상해의 모습을 보이지만, COX-1 염색성은 상피조직 전체에서 나타났다(fig. 5B).

실험군 3일째 표본 중 선와가 짓물러진 상태에서, 점막유리면의 상피세포가 남아있는 상태와 점막유리면의 상피가 탈락된 상태를 관찰할 수 있었는데, 새로 만들어지는 상피의 선와에서 표면상피를 따라 염색성이 약간 진하게 보이며 점막층 전반에 걸쳐 양성반응을 나타내고 있었으나, 염증반응에 따른 염색성에는 별다른 변화를 보이지 않았다(fig. 5C,D).

실험군 7일째 표본에서는 COX-1 염색성은 잘 재생된 선와와 표면상피세포와 술잔세포 등 상피 표면에서 진하게 염색되어 나타나지만, 염증반응

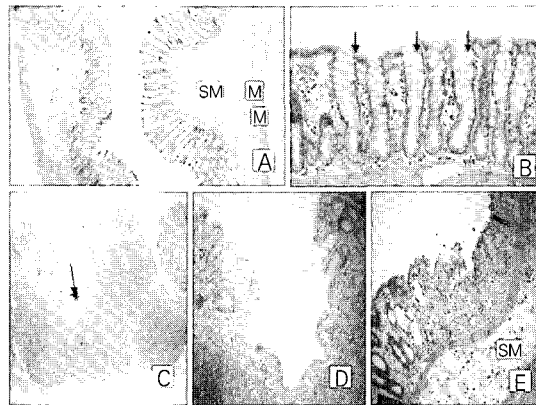


Fig. 2. Photomicrographs of the Distal Colon of Rat.

- (A) Normal group (magnification, ×40). The wall of colon consists of mucosa, submucosa (SM) and muscularis mucosa (M). H & E stain
- (B) Normal group (magnification, ×200). Magnified the region of the mucosa. There were well developed crypts (arrow). H & E stain
- (C) DSS 5days group (magnification, ×40). There were many lymphatic follicles in the mucosa and submucosa. H & E stain
- (D) DSS 5-days group (magnification, ×200). Magnified in the region of the arrow in (C). Note the well developed lymphatic follicles and crypts erosion. H & E stain
- (E) DSS 5-days group (magnification, ×200). Note the crypt erosion and submucosal edema (SM). H & E stain

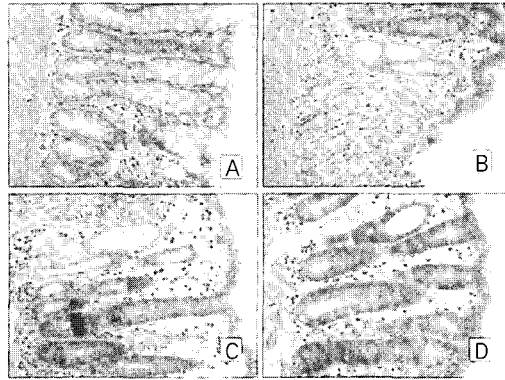


Fig. 3. Photomicrographs of the Distal Colon of Rat.

- (A) Normal group (magnification $\times 200$). Note the well-developed crypts in the epithelial cell layer. H & E stain
- (B) DSS 5-days group (magnification, $\times 200$). There were many erosive crypts and vacuoles in the mucosa. H & E stain
- (C) Control 3-days group (magnification $\times 200$). Note regeneration of crypts in damaged mucosa, but crypt destructions still existe. H & E stain
- (D) Control 7-days group (magnification $\times 200$). The regeneration was getting more remarkable than the control 3-days group. H & E stain

에 따른 염색성에는 별다른 변화를 보이지 않았다 (fig. 5E). 그리고 COX-1 염색은 점막하조직(submucosa)에서 많이 관찰되었으나, 염증의 진행정도나 회복 정도에 따른 COX-1의 면역반응의 변화는 관찰할 수 없었다(fig. 5F).

2) COX-2

COX-2를 이용한 면역조직화학적 염색의 결과, 정상군 점막층 및 점막하층에서 일부세포에 국한되어 나타나고 있으며, 비교적 그 염색성도 아주 약하게 나타났다(fig. 6A).

대조군 7일째, 대장염 유발 실험동물의 결과와 큰 변화 없이 고유판 내의 여러 세포들과 점막하조직의 결합조직세포에서 강한 양성반응을 나타내었다(fig. 6B). 이들의 반응양상은 주로 핵 주변 부위를 중심으로 세포질에 양성반응이 나타났으며, 일부 세포에서는 세포사이공간에도 양성반응이 나타났고, 점막층과 점막하층에서 관찰되는 림프소절(lymphatic follicle)에서도 강한 양성반응이 관찰되었다(fig. 6C).

실험군 7일째에서는 COX-2의 반응성이 대조군

에 비하여 많이 감소하여 나타났다(fig. 6D,E). 대조군 7일째와 실험군 7일째를 비교해 보면, 선와 부분과 점막하층 모두에서 대조군의 염색성이 훨씬 진하게 나타나고 있음을 알 수 있었다. 점막층과 점막하층에서 나타나는 림프소절의 반응양상도 대조군에 비해 실험군에서 감소되는 경향을 나타내었다.

3) Ki-67

Ki-67 항체는 세포분열 시기 중 G0 시기(stage)를 제외한 모든 단계의 세포에서 양성반응을 나타내는 항체로서, 세포분열과 증식이 과다한 세포에서 관찰할 수 있는 항체이다. 정상군에서 Ki-67의 반응양상을 보면, 주로 세포분열이 왕성하게 일어나는 부위인 선와의 아래쪽 1/3인 기저부에 국한되어 양성반응을 나타내고 있었다.

대장염 유발 실험동물의 표본을 보면 선와(crypt: arrow)를 따라 기저부위(base)에서 표면(surface)까지 전체에 걸쳐서 Ki-67의 염색이 잘 되고 있음을 볼 수 있었다(fig. 7A).

대조군 7일째에서는 재생되는 선와의 많은 부

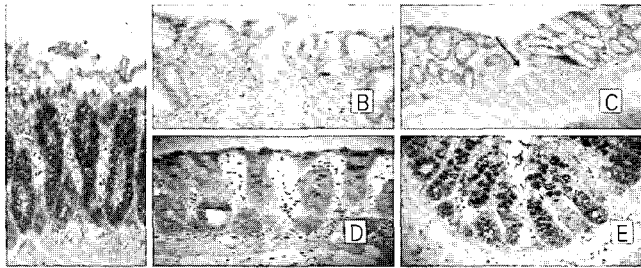


Fig. 4. Photomicrographs of the Distal Colon of Sample Group which is Provided with HH after 5% DSS Treatment for 5 Days.

- (A) Normal group (magnification, ×200). Note the complete crypt and goblet cells (violet color) in the normal intestinal mucosa. Alcian Blue-PAS stain
- (B) Sample 3-days group (magnification, ×100). There were many crypt regenerations in mucosa. H & E stain
- (C) Sample 7-days group (magnification, ×100). There were many crypt regenerations and remaining lymphatic follicles in mucosa (arrow). H & E stain
- (D) Sample 3-days group (magnification, ×200). Note the initiation of crypt regeneration and developing goblet cells(violet color) in mucosa. Alcian Blue-PAS stain
- (E) Sample 7-days group (magnification, ×200). Note the complete crypt and goblet cells (violet color) in mucosa. Alcian Blue-PAS stain

위에서 양성반응을 나타내고 있었다(fig. 7B).

실험군 7일째에서는 선와의 기저부를 중심으로 중간 1/2정도에서만 국한되어 양성반응을 나타내고 있었다(fig. 7C).

본 연구에 사용한 다른 항체는 HSP 70, NF-kB p65, MPGES-1, MPGES-2 등이 있었으나 반응이 나타나지 않았다(fig. 8A,B,C,D).

고 찰

염증성 장 질환 중 궤양성 대장염은 병변이 대장에 국한되어 나타나며, 복통, 설사, 출혈, 체중 감소가 주된 증상으로, 반복적인 회복과 악화를 거듭하고¹¹⁾, 국소적 합병증에는 대장천공, 장출혈, 양성협착, 염증성 폴립증, 치열, 치루, 림프육종 등이 있고, 전신적 합병증에는 관절염, 피부병, 구내염, 식도염, 신체발육부전 등이 있다. 약물치료는 부신피질호르몬(glucocorticoid)을 이용한 관장 및 복용법과 설파살라진(sulfasalazine) 및 면역억제제(immunosuppressive drug) 등을 사용하나, 이들은 때때로 부작용을 야기하는 것으로 보고되고 있

고, 약물치료가 효과 없고 대장출혈, 장천공 및 감염 등의 치명적 합병증이 있거나 대장암으로 진행이 의심되는 때는 수술을 시행 한다¹⁾.

궤양성 대장염은 한의학의泄瀉,痢疾,腸風,腸毒의 범주에 해당 된다고 볼 수 있으며³⁾,濕熱內蘊,氣滯血瘀,脾腎兩虛,陰血虧虛型으로辨證할 수 있는데, 그중 초기 급성기에 주로 나타나는濕熱內蘊으로 인한 증상은腹痛,泄瀉,便血,裡急後重,身熱,肛門灼熱,小便短赤,舌苔黃膩 등이며,治法은清熱利濕,理氣止痛을 사용 한다⁴⁾.

黃連解毒湯은葛洪⁵⁾의<肘後備急方>에 처음 나오는處方으로,一切의火熱,口燥咽乾,不得眠,吐血,衄血,大熱煩燥 및一切熱毒을 치료하며⁷⁾,구성藥材는清熱燥濕,瀉火解毒作用을 하며消炎作用이 있다고 보고 된黃芩,黃連,黃柏,梔子로 구성되어 있으며⁶⁾,현재까지 궤양성 대장염에 대한藥材 및方劑에 대한 연구로는黃芩¹²⁾,導赤地榆湯¹³⁾,四神丸¹⁴⁾ 등이 보고되고 있으나, 실제 임상에서 뚜렷한 효능이 있는藥材 및方劑는 보고 되지 않아서 궤양성 대장염에 대한 치료方劑의 개발이 시급히 필요하다고 사료된다. 이에 저자는

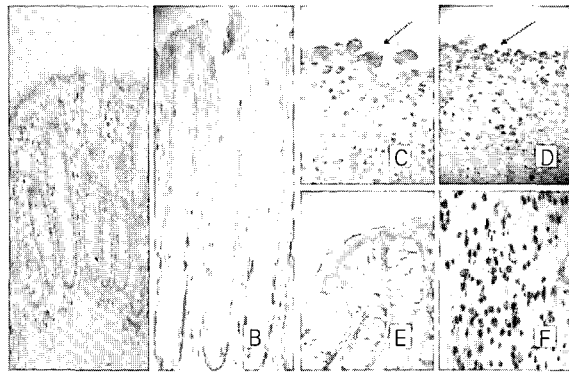


Fig. 5. Immunohistochemical Localization of COX-1 Protein Expression in the Mucosa of Distal Colon of Rat with DSS-induced Colitis.

- (A) Normal group (magnification, $\times 200$). There were overall COX-1 positive reaction.
- (B) DSS 5-days group (magnification, $\times 200$). There were COX-1 positive reaction in crypt.
- (C) Sample 3-days group (magnification, $\times 200$). Note the free surface epithelial cells (arrow) were COX-1 positive reaction.
- (D) Sample 3-days group (magnification, $\times 200$). Note the surface region of crypt erosion had COX-1 positive reaction which had not free surface epithelial cells (arrow).
- (E) Sample 7-days group (magnification, $\times 200$). Note there were many repaired crypt and goblet cells and intestinal epithelial cells in surface epithelium. Note the goblet cells were strong COX-1 positive reaction.
- (F) Sample 7-days group (magnification, $\times 400$). There were COX-1 positive reactions in the submucosa layer.

清熱燥濕, 消炎作用이 있는 藥材로 구성된 黃連解毒湯이 궤양성 대장염에 효과가 있을 것으로 사료되어 흰쥐의 DSS로 유발된 궤양성 대장염의 병태 모델에 黃連解毒湯을 투여하여 육안적 형태변화, 조직학적 및 면역조직화학적 변화를 관찰해 보았다.

염증성 대장질환을 유발하기 위한 실험방법은, 사람의 대장염과 유사한 대장염을 유발시키기 위하여 DSS를 음용시키거나¹⁵⁾, 초산(acetic acid)을 관장시키거나¹⁶⁾, TNBS(2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid)를 복강주사¹⁷⁾ 하는 등 여러 가지가 이용되고 있으나, 초산을 관장시키거나 TNBS를 주사하는 방법은 실험적인 오차를 유발할 가능성이 많을 뿐만 아니라, 음용할 DSS의 농도를 결정한 본 연구가 더욱 유의성 있는 결과를 내리라 사료되어, 본 연구에서는 DSS로 흰쥐의 궤양성 대장염을 유발한 병태모델을 사용하였다.

약물투여는 흰쥐의 식수에 약제를 타서 음용시키는데, 약제를 위(stomach)속으로 강제 경구투여

(intubation)하거나, 추출하여 주사하는 방법은 실험동물에게 많은 스트레스와 고통을 주어 스트레스로 인한 대장염이 유발될 수 있으므로, 대장염의 회복정도를 관찰하는 실험에서는 적절하지 않을 것으로 생각되어, 흰쥐의 1일 약제액 평균섭취량을 측정하고 음용시켜서 실험에 임하였다.

형태학적 소견으로는 평균 체중 300g의 정상군에서는 점차적으로 체중이 증가되었다. DSS를 음용시키면 실험동물은 전형적인 대장염의 소견을 보이며 설사와 함께 체중감소가 나타나는데, 본 연구도 DSS를 음용시키는 5일 동안 심한 설사 및 출혈과 함께 거의 1/3의 체중감소가 일어나고 있었다. DSS를 음용시킨 5일 후 생수를 먹인 대조군은 계속해서 9일까지 약간씩 체중감량이 되다가 그 후부터 조금씩 회복되는 경향을 보이고 있었다. 실험군인 黃連解毒湯 음용군은 6일부터 체중회복을 보이고 있었으며, 12일까지 체중회복 속도도 대조군에 비해 빨라졌다.

본 연구의 과정에서 보면, DSS가 흰쥐에서 대장염을 일으키며 심한 체중감소를 유발하였고, 일부 경우에는 치명적이며, 실험 도중 상당수의 흰쥐가 사망하였으나, DSS의 음용에도 불구하고 대장염의 증상이 나타나지 않는 동물도 있어 개체간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 본 연구에 사용한 黃連解毒湯은 흰쥐의 체중 회복을 도울 뿐만 아니라 사망률도 낮추고 있었다.

조직학적 염색 소견으로는 관찰한 대장의 상피는 술잔세포(goblet cell)라는 점액분비세포가 많이 분포하는데, 정상군의 대장 점막에서는 술잔세포가 선와의 벽의 대부분을 이루고 있었으며, 그 사이로 약간의 표면상피세포가 존재하였다.

술잔세포는 대장내의 점액을 생산하는 주된 세포로서 점액에 의한 장 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 위장관의 상피에 존재하는 점막은 산(acid)이나 효소(enzyme), 세균 그리고 독소(toxin)와 같은 잠재적인 장관내의 위해 물질에 대한 방벽의 역할을 한다. 이러한 장벽의 파괴는 염증성 장 질환이나 펩티드성 궤양(peptic

ulcers)과 같은 위장관의 장애를 일으키게 된다¹⁹⁾. 위장관내에는 여러 가지 일반적 혹은 특수한 방어 요소들이 존재하여 장벽의 기능을 유지시키는 것으로 생각된다. 그중에서도 술잔세포는 소장이나 대장의 표면 상피세포에 널리 분포하고 있으며, 점막방어¹⁸⁾에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.

그러나 DSS로 대장염이 유발된 실험동물(대조군, 실험군)에서는 선와의 많은 부분이 짓물러져, 그 벽을 이루던 술잔세포를 비롯한 여러 세포가 없어졌으며, 상피탈락 현상 그리고 염증세포의 침윤 등 심한 상해소견을 나타내는데, DSS의 공급을 중단하면 그 상해 정도가 감소되며 2일 후부터는 회복의 기미를 보인다.

실험군에서 선와의 재생과 함께 그 벽을 이루던 술잔세포도 선와의 바닥부위에서부터 재생되어 나오는 것을 볼 수 있었다. 새로 만들어지는 술잔세포의 세포질 내에 여러 점액과립을 관찰할 수 있었으며, 잘 발달된 골지체도 관찰할 수 있었다. 그러므로 대장염 유발 후 생수를 음용시킨 대

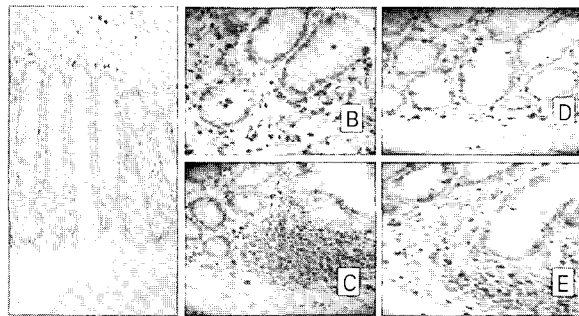


Fig. 6. Immunohistochemical Localization of COX-2 Protein Expression in the Mucosa of Distal Colon of Rat with DSS-induced Colitis.

- (A) Normal group (magnification, $\times 200$). There were some COX-2 positive reaction in the mucosa, submucosa.
- (B) Control 7-days group (magnification, $\times 400$). Note strong positive COX-2 reaction in the crypt and lamina propria.
- (C) Control 7-days group (magnification, $\times 400$). Note strong positive COX-2 reaction in the lymphatic follicle.
- (D) Sample 7-days group (magnification, $\times 400$). Note the repaired lamina propria had COX-2 positive reaction.
- (E) Sample 7-days group (magnification, $\times 400$). There were some COX-2 positive reaction in the lymphatic follicle.



Fig. 7. Immunohistochemical Localization of Ki-67 Protein Expression in the Mucosa of Distal Colon of Rat with DSS-induced Colitis.

- (A) DSS 5-days group (magnification, $\times 200$). There were Ki-67 positive reactions from crypt base to surface layer (arrow).
- (B) Control 7-days group (magnification, $\times 200$). The regenerating crypt had Ki-67 positive reaction which lining the crypt surface (arrow).
- (C) Sample 7-days group (magnification, $\times 200$). Note the Ki-67 positive reactions were limited in lower 1/2 region of crypt (arrow).

조군보다 黃連解毒湯을 음용시킨 실험군에서 조직병리학적으로 더 빠른 회복의 결과를 관찰할 수 있었다. 그리고 염증반응이 일어나면 선와의 것물러짐으로 인하여 술잔세포에서 분비되던 점액의 공급이 중단되게 되어 위장관내 점막방어의 효과가 떨어지게 되는데, 급성상해일 경우에 DSS의 공급이 중단되면 점막상피의 재생이 시작되는 것을 알 수 있었으며, 장상피의 재생속도 특히 술잔세포의 재생을 비롯한 장표면의 상피 재생이 대조군에 비해 빠른 것을 알 수 있었다. 그리고 점막하조직의 혈관으로부터 많은 수분이 빠져나오는 부종의 소견도 대조군보다 실험군에서 더 감소되어 치료효과를 확인할 수 있었다.

면역조직화학적 소견의 cyclooxygenase(COX) enzyme의 동종효소인 COX-1, COX-2는 생체 내 arachidonic acid를 PGG₂나 PGH₂로 만드는데 관여하는 효소 염증반응을 진행시키는데, COX-1 gene은 위장관, 신장, 혈소판, 혈관내피세포 등 모든 조직에 항상 내재적 구성성분으로 존재하는

housekeeping gene이지만, COX-2 gene은 정상적인 상태에서는 발현되지 않고 염증자극, cytokine (IL-1), growth factors 등의 자극에 의하여 염증조직, synoviocyte, macrophage 등에서 발현되는 immediate early gene 이다²⁰⁾. COX-1은 위십이지장 점막, 신장 등 모든 조직에서 prostaglandin을 생성하여 생리적 기능을 유지하며, COX-2는 주로 조직에서 prostaglandin을 생성하여 염증과 통증을 유발 한다²¹⁾고 보고 되고 있다.

위장관의 점막항상성과 관련된 COX-1과 COX-2의 기능은 많은 부분에서 아직 잘 알려지지 않고 있다. 이 COX 이성체들의 효소가 활성화되면 prostaglandins (PGs)이 생성되는데, 이들은 발열, 통각과민, 혈관의 투과성 그리고 부종과 관련된 proinflammatory role로서 작용하고, 설사를 촉진하여 표피세포에서 염의 분비를 조절하고 나트륨의 흡수를 막는다²²⁾. 염증반응이 일어나는 동안 점막의 PG 합성의 극적인 증가는 인간 염증성 대장질환과 실험적인 대장염의 질환 정도와 상관이 있다²³⁾. 그러나 PGs

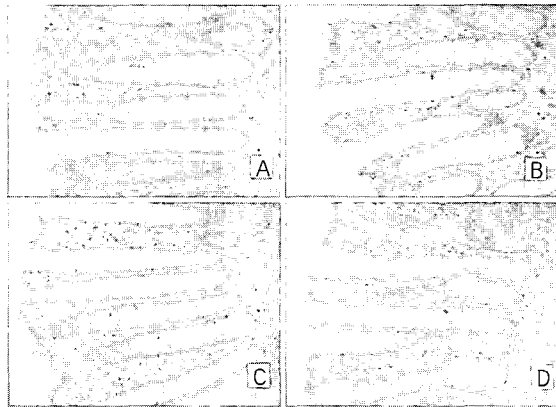


Fig. 8. The Expression of Immunohistochemistry of HSP 70, NF-κB p65, MPGES-1, MPGES-2 in the Mucosa of the Distal Colon of Rat.

There were no immunoreaction changes in all stages.

- (A) Normal group (magnification, ×200). HSP 70 immunostain
- (B) Normal group (magnification, ×200). NF-κB immunostain
- (C) Normal group (magnification, ×200). MPGES-1 immunostain
- (D) Normal group (magnification, ×200). MPGES-2 immunostain

들 또한 위장관 상해에 대한 방어작용²⁴⁾을 하고, proinflammatory cytokines들의 발현을 downregulation 한다²⁵⁾고 보고 되고 있다.

정상 점막에서 COX-1에 의해 생성된 PGE2는 점막상피세포로부터 점액분비를 증가시키고, HCO₃⁻분비를 증가시켜서, 점막상피세포 표면의 pH를 중성으로 유지하며, 점막상피세포막의 hydrophobicity를 증가시키고, 점막의 혈류량을 증가시켜 점막상피의 증식 및 복구 등에 관여함으로써 점막방어기전에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 효과는 세포방어 특성을 가지는 점막의 PGs의 저해 때문이다²⁶⁾. 이와 유사하게 PGE2, PGE1, 그리고 토끼에서 prostacyclin (PGI2)을 능동적 혹은 수동적으로 면역화시키면 위장관의 궤양이 유발된다²⁷⁾.

본 연구에서 관찰한 COX-1의 반응양상을 보면, 정상군에서는 대장조직 전체에 걸쳐서 양성반응을 보여 점막층의 표면 상피조직에서 강하게 나타났고, 점막하조직에서는 반응성이 약함을 알 수 있었다. 그리고 대조군과 실험군에서도 정상군의 반응성과 크게 차이가 나지 않으므로, 다른 여러 보고들과 마찬가지로 COX-1의 반응성은 염증으

로 인한 조직의 상해 정도와는 무관하게 조직 내에서 일정하게 발현되는 것을 알 수 있었다.

COX-2 gene과 단백질 발현은 macrophage에 의해서 자극된다고²⁸⁾ 보고되고 있는데, 장 상피세포에서의 이러한 과정은 nuclear factor NF-κB에 의해서 매개 된다²⁹⁾고 보고되고 있다. 그리고 흰 쥐에서 COX-2의 과발현은 세포보호효과를 가진 heat-shock proteins의 발현에 의해서 저해 된다³⁰⁾는 보고도 있다.

본 연구에서 관찰한 COX-2의 반응양상은 정상군에서는 점막하조직의 일부세포에서 약한 양성반응을 보이고 있으나 대조군에서의 반응은 점막층에서 강하게 양성반응을 나타낸다. 점막의 상피세포나 술잔세포 뿐만 아니고 결합조직에서도 강한 양성반응을 나타내고 있었으며, 점막하조직에서도 강한 양성반응을 나타내는 세포들의 수가 증가했으며, 점막하조직의 결합조직속에서도 강한 양성반응을 나타내고 있었다. 실험군은 전반적으로 대조군과 같이 반응성이 증가하여 나타나나, 그 반응강도가 대조군에 비해 감소되어 나타났다. 상기한 여러 보고에서와 같이 본 연구의 결과에서

도 COX-2는 염증반응 등 조직의 처한 상황에 따라 발현정도의 변화를 관찰할 수 있었으며, 특히 조직상해 및 재생과정에서 많이 나타나고 있었다. 본 연구에서 실험군의 COX-2의 면역성은 대조군보다 약해졌는데, 이러한 결과를 통하여 黃連解毒湯은 COX-2의 과반응을 억제시키는 것을 알 수 있었다.

단일클론 항체인 Ki-67은 핵항원에 작용하여 조직과 암세포의 성장 및 재생과정을 밝힐 수 있어서 세포 증식의 측정을 위해 사용하고 최근에 개발된 Ki-67은 항원회복 후에 formalin으로 고정하고 paraffin으로 포매한 조직표본에서도 면역 양성반응을 나타내어³¹⁾ 상해를 입은 세포들의 증식과 재생을 알 수 있는 중요한 지표로 사용되고 있다.

몇몇의 연구 등에 의해서 Ki-67의 면역염색성과 세포주기 사이에 많은 연관이 있음이 밝혀졌는데 Ki-67의 면역염색성은 G1기의 중간에 발현이 나타나고, S기와 G2기를 통하여 최대치에 도달하며, 유사분열이 끝나면 Ki-67에 대한 항원은 빠르게 감소하게 된다. S기와 G2기의 분획을 측정할 연구에서 Ki-67의 발현과 세포증식이 상관관계가 있다는 것을 알 수 있다³²⁾.

정상적인 결장의 점막에서는 선와의 아래쪽 1/3의 미분화세포에서 주로 세포증식이 일어나고, 증식된 세포들은 분화되어 선와의 기저부에서 표면 쪽으로 이동하게 된다. Lipkin³³⁾은 궤양성 대장염이나 암과 같은 조직에서 선위에 비정상적인 세포증식으로 인한 상해가 나타난다는 것을 동물 모델과 사람에서 보고하고는, DNA합성의 증가가 악성종양화로 이끄는 최종 공통경로의 중요한 과정이라고 결론지었다. 그러므로 장상피의 선와가 짓물러진 후 재생되는 과정에서 세포분열이 왕성한 부위에서의 이상증식은 많은 부작용을 유발하게 된다.

본 연구에서도 Ki-67의 면역염색성은 정상군에서는 선와의 아래쪽 1/3에서 국한되어 양성반응을 보이고 있었다. 선와의 바닥부분에는 주로 미분화

세포(undifferentiated cell)가 존재하고 있으며, 이 세포들이 선와를 구성하는 흡수세포나 술잔세포로 분화하였다. 그러나 대조군에서 선와의 짓물러진 부위에서는 상피의 표면에서 강한 양성반응을 보이고 있었으며, 선와가 나타나는 부위에서는 선와의 기저부위에서부터 상피표면부위까지 모두에서 강한 양성반응을 나타내고 있었다. 이는 염증 자극에 의해서 세포증식 범위 및 분화범위가 증가되어 있음을 나타낸다. 실험군에서는 정상군과 같이 규칙적이지는 않았지만, 선와의 하단부위에서 양성반응을 보이고 있었다. 그러므로 본 연구에 사용한 黃連解毒湯은 상피의 재생에 관여하면서도 이상형성 및 과형성 등은 억제하는 것을 알 수 있었다.

이상의 실험결과 黃連解毒湯은 대장염으로 손상된 조직의 회복과 염증의 감소에 효과가 있었으며, 향후 그 기전에 대하여는 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

흰쥐에 5% DSS(mw;4000)를 5일 동안 음용시켜 궤양성 대장염을 유발시킨 후, 물을 7일간 경구투여 시킨 대조군과 黃連解毒湯을 7일간 경구투여 시킨 실험군에서, 유발된 궤양성 대장염에 미치는 효과를 비교 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험군은 생수를 음용시킨 대조군에 비해 빠른 body weight의 회복증가를 보였고, 대조군에 비하여 선와의 재생정도와 표면상피의 재생정도가 빠르고, 점막하 부종의 감소 및 점막부위 림프소절의 감소를 보였으며, 면역조직화학적 변화에서는, 실험군이 대조군에 비하여 COX-2의 염색성이 감소되고, Ki-67의 염색성이 선와의 기저부위로 국한되어 반응성이 안정화됨을 보였다.

결과적으로, 黃連解毒湯이 DSS를 이용하여 유발된 궤양성 대장염의 치료에 효과적임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*. 1990; 76: 655 - 663
2. Tiemey LM Jr, Mcphee SJ, Papadakis MA. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 서울: 한우리. 1999, 686-695
3. 류기원. 염증성장질환. *한방내과학회지*. 2005 ; spr(1): 24-31
4. 江楊淸. 中西醫結合內科研究. 北京: 北京出版社: 1997, 277-287
5. 葛洪. 肘後備急方. 臺北: 人民衛生出版社: 1996, 34-37
6. 金光湖, 金聖洙. 黃連解毒湯과 溫性瘀血方의 水針 및 經口投與가 鎮痛, 消炎, 解熱作用에 미치는 영향. *한의학회지*. 1994; 15(1): 9-25
7. 黃道淵. 證脈 方藥合編. 서울: 南山堂. 1990, 132
8. 손은진, 강대길, 이안숙, 김복해, 이호섭. 黃連解毒湯 및 六味地黃湯 加 釣鉤藤이 自發의 高血壓 白鼠의 血壓 및 腎臟 기능에 미치는 영향. *동의병리학회지*. 2002; 16(2): 359-364
9. 강운호, 김진택, 김성아. 黃連解毒湯이 알려 지성 접촉피부염에 미치는 영향. *한방내과학회지*. 2004; 25(3): 508-517
10. 杜鎬京. 黃連解毒湯의 藥理學的 研究. 경희대학교 논문집. 1982; 5: 103-114
11. 안명주. 靑양성대장염환자 28례에 대한 임상적 고찰. *대한소화기내시경학회잡지*. 1991; 7(1) : 19-26
12. Choi YA, Kang OH, Park HJ, Tae J, Kim DK, Kang CS, Choi SC, Yun KJ, Choi SJ, Nah YH, Kim YH, Bae KH, Lee YM. Effect of processed *Scutellaria baicalensis* on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Int J Mol Med*. 2005; 16(4): 667-72
13. 김승욱. 導赤地榆湯이 靑양성 대장염(ulcerative colitis) 유발 흰쥐에 미치는 영향. *한의학회지*. 2002; 23(3): 200-210
14. 광근신. 四神丸이 TNBS에 의하여 유도된 대장염의 방어효과에 관한 연구. *원광대학교 대학원*. 2004
15. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990; 98: 694-702
16. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978; 17: 135-150
17. Morris GP, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 96: 795-803
18. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J Physiol*. 1991 ; 260: C183-C193
19. Owen DA, Kelly JK. Inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. *Mod Pathol*. 1995 ; 8: 97-108
20. DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology*. 1996; 110: 1259-1262
21. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 1998; 58: 409-412
22. Sartor, R.B., and Powell, D.W. 1991. In *Diarrheal diseases*. M. Field, editor. Elsevier Science. New York, NY. 75-114
23. Rachmilewitz D, et al. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology*. 1989; 97: 326-327
24. Hoult JRS, Moore PK. Sulphasalazine is a

- potent inhibitor of prostaglandin 15 hydroxy-dehydrogenase: possible basis for therapeutic action in ulcerative colitis. *Br J Pharmacol.* 1978; 64: 6-8
25. Knudsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Prostaglandin posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J Immunol.* 1986; 137: 3189-3194
26. Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by NSAIDs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology.* 1992; 102: 18-27
27. Redfern JS, Blair AJ, Lee E, Feldman M. Gastrointestinal ulcer formation in rabbits immunized with prostaglandin E2. *Gastroenterology.* 1987; 93: 744-752
28. O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, Kaplan MD, Coleman PD. Interleukin 1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte culture. *J Neurochem.* 1996; 66: 2532-2540
29. Jobin C, Morteau O, Han DS, Sartor RB. Specific NF-kappa B blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology.* 1998; 95: 537-543
30. Ethridge RT, Hellmich MR, DuBois RN, Evers BM. Inhibition of heat-shock protein 70 induction in intestinal cells overexpressing cyclooxygenase 2. *Gastroenterology.* 1998; 115 : 1454-1463
31. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363
32. Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol* 1991; 165: 173-178
33. Lipkin M. Phase 1 and phase 2 proliferative lesions of colonic epithelial cells in diseases leading to colonic cancer. *Cancer* 1974; 34 : 878-888