대한한방내과학회지 제29권 4호(2008년 12월)
Korean J. Orient.Int. Med. 2008:29(4)939-949

Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 枳實導滯丸과 Misoprostol의 효과 비교 연구

이슬희, 백태현
상지대학교 부속 한방병원 내과

A Comparison Study on Effects of *Jisildoche-hwan* Extract and Misoprostol on Indomethacin-induced Gastric Mucosal Lesions in Mice

Seul-hee Lee, Tae-hyun Baek
Dept. of internal Medicine Oriental Hospital of Sangji University

ABSTRACT

Objective : This study was carried out to investigate the effects of *Jisildochehwan* extract on indomethacin-induced gastric mucosal lesions of mice, as compared with misoprostol.

Methods : Experimental mice were classified into four groups. No gastro-inflammation elicited mice were the normal group(NOR). Gastro-inflammation elicited mice were the control group(CON). Misoprostol-administered mice after gastro-inflammation elicitation were the misoprostol-administered group(MA). *Jisildochehwan*-administered mice after gastro-inflammation elicitation were the *Jisildochehwan*-administered group(JA). In this study, we examined superoxide dismutase(SOD) ability, anti-inflammatory ability arrangement of mucous-secreted cells, distribution of mucosal neck cells, mucosal surface cells, neutral mucous-secreted cells, PAS reaction, COX-1, TNF-α, NF-κB p65 and iNOS.

Results : The SOD ability of the *Jisildochehwan* group increased dose-dependently. The hemorrhagic erosion and the damage of arrangement of mucous-secreted cells increased in the CON group, but decreased in the MA and JA groups. The COX-1 positive were decreased in the CON group, but increased in the MA and JA groups. The distribution of mucosal neck cells and mucosal surface cells, PAS positive reaction of surface mucous cells were decreased in CON group, but increased in MA and JA group. TNF-α, NF-κB p65 and iNOS increased in the CON group, but decreased in the MA and JA groups. In all the results, the effects were better in the JA group than in the MA group.

Conclusion : *Jisildochehwan* extract was more effective than Misoprostol. *Jisildochehwan* has excellent protective effects on indomethacin-induced gastric mucosal lesions.

Key words : *Jisildoche-hwan* extract, indomethacin, Misoprostol, Gastric mucosa

Ⅰ. 서 론

갈수록 복잡해지는 현대 사회에서 사람들은 각종 스트레스에 노출되어 살아가고 있다. 소화성 궤양은 스트레스로 인해 유발되는 대표적인 질환으로, 현대인에게서 그 빈도가 증가하고 있다[1]. 2006년 발표된 우리나라의 건강보험통계에 따르면, 소화기 질환으로 진료받은 인원은 연 2,174만 명으로 호흡기 질환에 이어 두 번째로 많으며, 소화기 질환 중에서는 위염 및 십이지장염 423만 명, 위궤양

· 교신저자: 이슬희 강원도 원주시 우산동 283번지
상지대학교 부속한방병원 3내과
TEL: 033-741-9382 FAX: 033-743-7184
E-mail: 3-honey@hanmail.net

132만 명 순으로 높은 빈도로 나타났다[2].

위점막의 갑작스런 결손을 급성 위 미란 또는 궤양이라고 하며, 주로 심한 스트레스 후에 나타나므로 스트레스성 미란 또는 궤양이라고도 한다. 이 스트레스성 미란과 궤양은 쇽, 심한 화상, 패혈증, 심한 외상, 뇌 외상 및 뇌종양 그리고 뇌수술 등 두개내압의 증가를 초래하는 상태가 있을 때 흔히 나타나며, 비스테로이드 소염제(Non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAIDs)를 복용하는 경우에도 생길 수 있다[3].

임상증상으로는 심와부 통증, 속쓰림, 오심, 구토 등이 생기고 출혈에 의한 토혈, 혈변 등이 있을 수 있으며[4], 급성 위염에서는 실제적으로 통증이 없는 소화관 출혈이 유일한 증상일 때가 많다[5].

이러한 위점막병변은 한의학적으로 胃脘痛, 嘔吐, 霍亂, 便血, 吐血, 痞滿, 嘈雜 등의 범위에 속하며, 寒濕犯胃, 濕熱蘊胃, 食滯胃脘, 肝胃不和, 胃陽虛衰, 寒熱錯雜, 瘀血阻絡등으로 辨證된다[6].

枳實導滯丸은 金元代 李杲의 저작인《內外傷辨惑論》[7]에 처음 수록된 처방으로《東醫寶鑑》[8]에서는 "治傷濕熱之物不消, 作痞滿."라고 하여, 消化不良과 急性胃腸炎, 細菌性痢疾 등 질환에 濕熱積滯의 증상이 있는 경우에 가감하여 운용할 수 있는 처방이다[9].

지금까지 위점막 손상의 치료에 관한 많은 실험적 연구보고[10-14]가 있었으나, 아직까지 枳實導滯丸의 위점막 손상의 치료 효과에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

이에 저자는 Indomethacin으로 위점막 손상을 유발시킨 생쥐에 消導化積하고 淸熱祛濕시키는 효능이 있어 위점막병변에 효과가 있을 것으로 사료되는 枳實導滯丸과 소화성 궤양의 치료와 예방에 활용도가 높은 Misoprostol을 각각 투여하여 항산화능, 위점막 손상 치료 효과, 위점막 방어장벽의 보호 효과, 위점막내 항염증효과를 관찰하였고, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

대한실험동물센타에서 분양 받은 태령 4주된 ICR계 숫컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 정상군, indomethacin 처리로 위점막 손상유발군(이하 CON군), indomethacin 처리로 위점막 손상유발 후 misoprostol 투여군(이하 MA군) 그리고 idomethacin 처리로 위점막 손상유발 후 枳實導滯丸 추출액 투여군(이하 JA군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

2) 枳實導滯丸 추출물의 제조

본 실험에 사용한 한약재는《東醫寶鑑》[7]〈雜病篇·內傷門〉에 수록된 枳實導滯丸의 처방에 따른 구성약물로서 시중에서 구입하여 엄선된 약재만을 사용하였다(Table 1). 조제된 枳實導滯丸 각 2첩을 증류수 500㎖에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50㎖으로 감압·농축하여 동물실험에 사용하였다.

Table 1. Amount and Composition of *Jisildochehwan* (JDH) Extract

韓藥名	生藥名	重量 (g)
大 黃	*Rhei Radix et Rhizoma*	2.35
枳 實	*Ponciri Fructus*	1.20
神 麴	*Massa Medicata Fermentata*	1.20
白茯苓	*Poria*	0.70
黃 芩	*Scutellariae Radix*	0.70
黃 連	*Coptidis Rhizoma*	0.70
白 朮	*Atractylodis Rhizoma Alba*	0.70
澤 瀉	*Alismatis Rhizoma*	0.45
總 量		8.00

2. 실험 방법

1) 항산화능 측정

항산화능력을 측정하기위해 Riboflavin를 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에

40mM buffer 2.6㎖, nitroblue tetrazolium 100㎕, EDTA/cyanide 200㎕, riboflavin 100㎕ 그리고 항산화능을 측정할 枳實導滯丸 희석액 100㎕을 넣고 3번 섞어준다. Abs 560 nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정한다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 계산한다.

2) 위점막 손상 생쥐에서 치료 효과 관찰

(1) 위점막 손상 유발

위점막 손상 유발을 위해 indomethacin(Sigma, USA)를 0.9% NaCl이 포함된 용액에 희석시킨 후 10㎎/㎏를 5일 동안 CON군, MA군 그리고 JA군에 경구 투여하였다.

(2) Misoprostol의 투여

위점막 손상 유발 후 MA군에 misoprostol (Cytotec, Searle Korea)를 생리식염수에 희석시킨 다음 40㎍/㎏씩 5일 동안 경구 투여하였다.

(3) 枳實導滯丸 추출액의 투여

JA군에 枳實導滯丸 추출액을 2.5㎖/㎏으로 5일 동안 경구 투여하였다.

(4) 조직표본 제작

위점막 손상 유발 후 5일 경과되었을 때 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위 몸통과 날문의 연결부위을 적출하여 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 ㎛ 두께의 연속절편으로 제작되었다. 위점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

(5) 위점막 손상 완화 관찰

① 위점막내 출혈성 찰과 유발 변화 관찰

출혈성 찰과로 점막내 누출된 적혈구의 분포 변화를 조사하기 위해 Wright stain을 실시하였는데, 우선 wright 용액에 30분간 반응시킨 후 wright용 buffer 처리하여 관찰하였다. 한편 본 염색을 실시한 조직은 심장관류고정없이 조직 적출 후 바로 10% NBF로 고정처리하였다.

② 위점막내 방어 체계 변화 관찰

위산에 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 15분동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분동안 대조염색하여 관찰하였다.

또한 점막고유층내에서 점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1(이하 COX-1)의 분포변화를 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다. 우선 절편을 proteinase K(20㎍/㎖)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-mouse COX-1(1:250, Chyman, USA)에 4℃ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link하였고, 그런 다음 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

(6) NF-κB 활성 억제를 통한 항염증효과 관찰

pro-inflammatory cytokine인 tumor necrosis factor-α(이하 TNF-α), 염증효소의 전사인자 nuclear factor-κB(이하 NF-κB) 그리고 염증효소 iNOS 등의 변화를 조사하기 위해 mouse anti-TNF-α (1:250, Santa Cruz Biotec), mouse anti-NF-κB p65(1:500, Santa Cruz Biotec) 그리고 mouse anti-iNOS(1:100, Santa Cruz Biotec)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

4) 영상분석

mRNA 발현의 relative intensity, 조직화학 그리고 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas

5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다.

5) 통계처리

본 실험의 결과는 SPSS 8.0을 통한 ANOVA test로 유의성을 검증하였고, 군 간의 차이를 파악하기 위해 사후검정을 실시하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 항산화능

枳實導滯丸 추출물의 superoxide dismutase(SOD) activity는 1 ㎎/㎖에서 12±0.8%, 2 ㎎/㎖에서 24±1.2%, 4 ㎎/㎖에서 33±2.5%, 6 ㎎/㎖에서 41±3.1%, 8 ㎎/㎖에서 49±3.5%, 10 ㎎/㎖에서 67±2.8%로 농도-의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

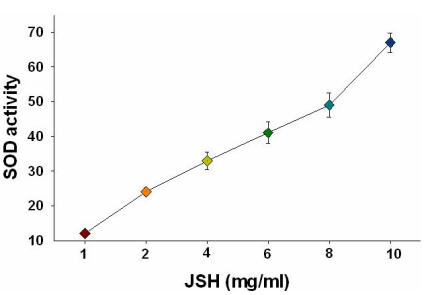

Fig. 1. Anti-oxidant Effects of *Jisildochehwan* (JDH). The SOD ability of JDH dose-dependantly increased.

2. 위점막 손상 생쥐에서 치료 효과

1) 위점막 손상 완화

CON군의 위점막에서는 심각한 출혈성 찰과(hemorrhagic erosion)로 인한 점액분비세포의 배열 유실이 관찰되었다. 위점막 손상 유발 후 Misoprostol을 투여한 MA군은 일부 지역에서 점액분비세포의 배열 유실이 관찰되었으나, CON군에 비해 그 분포가 적었다. 이에 비해 枳實導滯丸 추출액을 투여한 JA군은 정상군과 유사한 점액분비세포의 배열을 유지하였다(Fig. 2-A). 한편 출혈성 찰과가 심한 CON군에서는 누출된 적혈구의 분포가 많았으나 MA군과 JA군에서는 그 수가 줄어들었다. 특히 JA군은 정상군과 유사한 분포로 관찰되었다(Fig. 2-B).

2) 위점막내 방어 체계 보호 효과

(1) 중성점액장벽 복구

CON군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 PAS 양성반응을 보이는 표면점액세포와 목점액세포가 정상군에 비해 88% 감소하였는데, 이에 반해 MA군과 JA군에서는 CON군에 비해 PAS 양성반응이 증가된 양상으로 관찰되었다. MA군은 CON군에 비해 259%, JA군은 CON군에 비해 604% 증가하였다. JA군에서는 중성점액을 분비하는 PAS 양성반응 표면점액세포의 분포가 점막 상층 표면(apical surface)에서 위오목(gastric pit)까지 확장된 것으로 관찰되었다(Table 2, Fig. 2-C).

(2) 점막내 COX-1 분포 회복

정상군의 점막고유층내 COX-1 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, 양성반응세포는 주로 점막 상단부에서 다수 관찰되었다. 이러한 COX-1 양성반응은 CON군에서 93% 감소하였다. 이에 반해 MA군과 JA군은 CON군에 비해 COX-1 양성반응이 증가된 양상으로 나타났는데, MA군은 CON군에 비해 454%, JA군은 CON군에 비해 840% 증가한 것으로 관찰되었다(Table 2, Fig. 2-D).

Table 2. Image Analysis of Gastropathy Evoked Mucosal Barrier Damages

Objective	Group			
	NOR	CON	MA	JA
PAS	5734±87	676±25	2428±38*	4762±59*
COX-1	2874±84	214±15	1185±34*	2003±40*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)

Abbreviation.

PAS, periodic acid-schiff reaction stain; COX-1, cyclooxygenase-1; NOR, No-treated mice; CON, gastropathy elicitated group; MA, misoprostol treated mice after gastropathy elicitation; JA, JDH treated mice after gastropathy elicitation; *, $P < 0.05$ compared with CON.

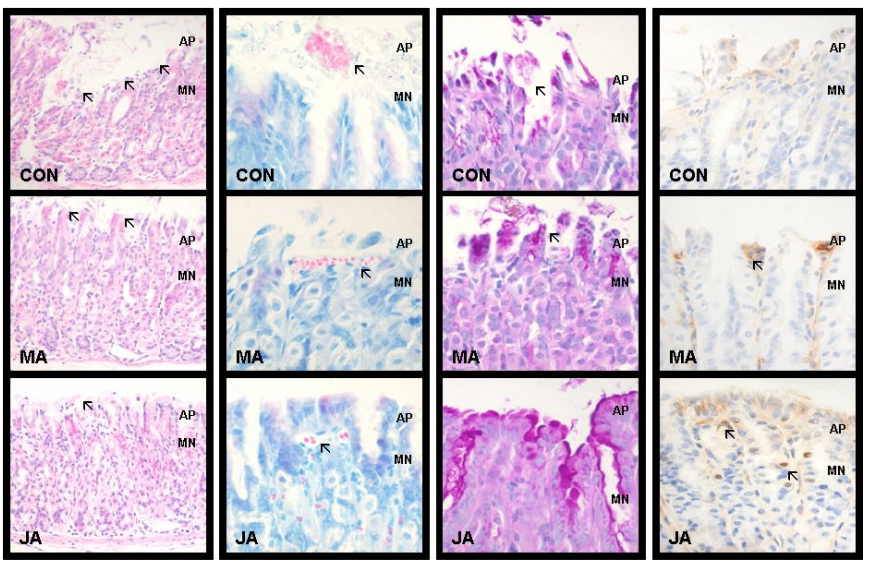

Fig. 2. Repair of Hemorrhagic Erosion and Damaged Mucosal Barrier by JDH.

A. The mucosal damages(arrow) in mice treated with JDH noticeably decreased(H&E, x200). B. The hemorrhagic erosion(arrow) in mice treated with JDH noticeably decreased(Wright's stain, x400). C. The PAS positive reaction(arrow) in mice treated with JDH noticeably repaired(PAS, x400). D. The COX-1 positive cell(arrow) in mice treated with JDH noticeably increased(COX-1 immunohistochemstry, x400).
Abbreviation.
CON, gastropathy elicitated group; MA, misoprostol treated mice after gastropathy elicitation; JA, JDH treated mice after gastropathy elicitation; AP, apical surface of mucosa; MN, mucosal neck.

3) NF-κB 활성 억제를 통한 항염증효과

(1) TNF-α 생성 억제

전염증효소인 TNF-α의 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군과 JA군에서는 감소하였다. 이런 TNF-α 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. TNF-α 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 정상군에 비해 1383% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 71%, JA군은 CON군에 비해 77% 감소하였다(Table 3, Fig. 3-A).

(2) NF-κB 활성 억제

iNOS 생성에 관여하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군과 JA군에서는 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 정상군에 비해 1695% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 39%, JA군은 CON군에 비해 75% 감소하였다(Table 3, Fig. 3-B).

(3) iNOS 생성 억제

염증효소 iNOS 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군과 JA군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 정상군에 비해 1199% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 47%, JA군은 CON군에 비해 61% 감소하였다(Table 3, Fig. 3-C).

Table 3. Image Analysis of Gastropathy Evoked Inflammation

Objective	Group			
	NOR	CON	MA	JA
TNF- α	320±10	4746±60	1382±25*	1117±21*
NF-κB p65	320±14	5745±32	3488±29*	1450±28*
iNOS	384±14	4987±37	2662±29*	1967±17*

(image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120)
Abbreviation.
TNF-α, tumor necrosis factor-α; NF-κB p65, Nuclear Factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase.
NOR, No-treated mice; CON, gastropathy elicitated group; MA, misoprostol treated mice after gastropathy elicitation; JA, JDH treated mice after gastropathy elicitation; *, P < 0.05 compared with CON.

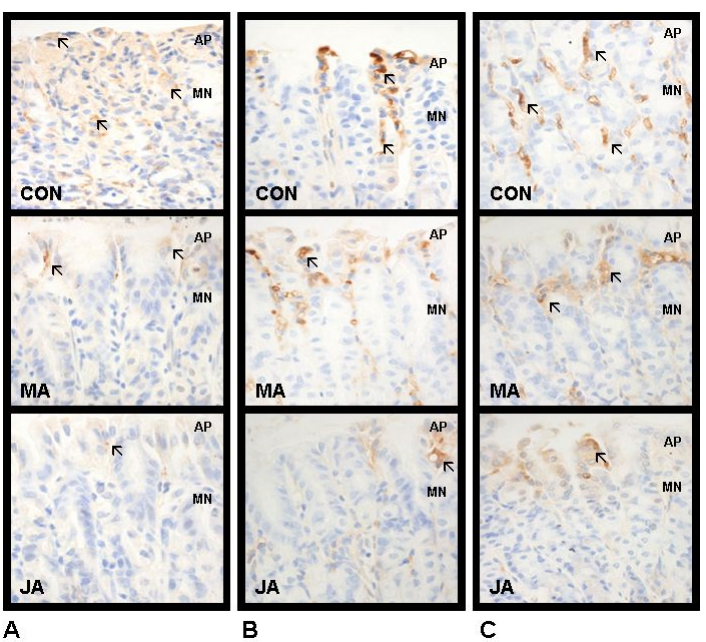

Fig. 3. Inhibition of Inflammation in JDH.

A. The TNF-α positive reaction(arrow) in mice treated with JDH noticeably decreased(TNF-α immunohistochemstry, x400). B. The NF-κB p65 positive reaction(arrow) in mice treated with JDH noticeably decreased(NF-κB p65 immunohistochemstry, x400). C. The distribution of iNOS positive cell(arrow) in mice treated with JDH noticeably decreased(iNOS immunohistochemstry, x400).
Abbreviation.
TNF-α, tumor necrosis factor-α; NF-κB p65, Nuclear Factor-κB p65; iNOS, inducible nitric oxide synthase.
NOR, No-treated mice; CON, gastropathy elicitated group; MA, misoprostol treated mice after gastropathy elicitation; JA, JDH treated mice after gastropathy elicitation.

Ⅳ. 고 찰

급성 위점막병변(AGML; Acute Gastric Mucosal Lesion)이란 급성 미란성 위염, 급성 궤양, 출혈성 위염을 일괄하여 총칭한 것으로, 발병이 급격한 위증상을 동반하고, 내시경에 의해 위점막에 이상 소견이 나타나는 병변으로 정의된다[15]. 정의상 점막의 결손이 점막근층을 넘지 않는 경우를 미란이라고 하며 결손이 점막근층을 넘는 경우를 궤양이라고 한다. 급성 위미란은 급성 위염의 심한 경우라고 볼 수 있으며 따라서 급성 미란성 위염과 본질적으로 같은 질병이다[3].

소화성 궤양은 발생기전에 산-펩신이 관여하는 십이지장의 근위부와 위를 포함한 상부 위장관의 궤양성 질환을 가리키며, 대부분은 십이지장 궤양과 위궤양으로, 스트레스나 약물섭취와 연관된 위 또는 십이지장 궤양도 포함된다[5]. 스트레스성 궤양은 급성으로 경과해서 위에 궤양을 만드는 경우가 많은데, 스트레스에 의해 신경계, 내분비계의 균형이 깨져, 그것이 공격인자와 방어인자의 균형에 영향을 미친다[15]. 염산과 펩신등 위점막에 공격적으로 작용하는 공격인자와 점액, 점막, 혈류, 프로스타글란딘 등 위점막을 보호하려는 방어인자 사이의 균형이 깨지면 소화성궤양이 생긴다는 설이 병인으로 인정되어 왔다[4].

AGML의 원인으로는 약물(NSAIDs, 항생제, steroid 등), 스트레스(정신적 스트레스, 외상, 쇼크, 감염, 화상, 패혈증, 뇌의 장애 등), 기호품(알코올, 커피 등), anisakiasis, H. pylori, radiation 등이며, 약물이 일으키는 AGML이 가장 많다[4,15].임상증상으로는 갑자기 나타나는 심와부통, 오심, 구토가 흔하며 하혈, 토혈등 출혈이 빈번하다[4].

서의학적인 치료로서는 우선 원인을 제거하고, 출혈이 있을 경우 지혈을 한 다음 약물요법, 안정, 수액보충, 식사요법 등의 보존적 치료를 하는 방법이 있다[15,16]. 약물요법은 공격인자인 위액 중의 염산이나 펩신의 작용을 억제하고, 방어인자인 점막의 저항력을 증강시키는 약제가 유효한데, 이러한 의미에서 제산제, 위액분비억제제, 항히스타민제, 소화관 호르몬 제제 등이 쓰이며 또 점막의 방어력을 강하게 하기 위해 점막보호제나 조직수복제 등이 쓰인다. 또 다량의 출혈이 오랫동안 계속되는 경우나 천공, 유문협착이 생긴 경우, 궤양의 악성화가 의심되는 경우, 난치성으로 내과적 치료에 저항하는 경우 등에는 외과적 치료법이 행해진다[16].

한의학적으로 위점막병변은 胃脘痛, 嘔吐, 霍亂, 便血, 吐血, 痞滿, 嘈雜 등과 유사한데, 寒濕犯胃, 濕熱蘊胃, 食滯胃脘, 肝胃不和, 胃陽虛衰, 寒熱錯雜, 瘀血阻絡등으로 辨證이 되며, 치법으로는 각 辨證에 따라 解表化濕, 淸熱利濕, 消食導滯, 疏肝解鬱, 益氣溫陽, 平調寒熱, 活血祛瘀등이 있다[6,17].

枳實導滯丸은 일명 導氣枳實丸[8]이라고도 하며, 消導化積하고 淸熱祛濕시키는 효능으로, 濕熱의 飮食物에 傷하여 施化되지 않아서 痞悶不安함을 다스린다[18]. 처방 중에 大黃은 苦 · 寒하여 脾 · 胃 · 大腸經으로 들어가 瀉熱通便시키는 功效가 있어 腸胃의 濕熱積滯를 攻積泄熱하므로 君藥으로 하였고, 枳實은 行氣散結시켜 消痞除滿하는 功效가 있어 胸痞腹滿을 치료하므로 臣藥으로 하였으며, 黃芩, 黃連은 苦 · 寒하여 脾 · 胃 · 大腸經에 들어가 淸熱燥濕하여 腸胃의 濕熱로 인한 下痢를 치료하고, 茯苓, 澤瀉는 利水滲濕하는 功效가 있어 止瀉하며, 白朮은 補脾燥濕하고, 神麴은 食積을 消食化濕하는 효능이 있어 佐藥으로 하였다[9]. 또한 大黃의 항균, 살충 작용 및 지혈 작용, 枳實의 위장 운동에 대한 조절 작용과 소염작용, 茯苓, 白朮의 항궤양 작용, 黃芩, 黃連의 H. pylori 억제, 소염 작용과 黃芩의 항산화 작용 등이 보고되었다[19]. 따라서 본 처방은 濕熱積滯로 인한 위점막의 미란이나 궤양 등에 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

위점막 손상의 치료 효과에 관해서는 많은 연구가 이루어지고 있으며, 여러 변증에 따라 香砂六君子湯[10], 沙蔘麥門冬湯[11], 槐花散[12], 消滯丸[13]등이 치료효과가 있음이 보고된 바 있다. 濕熱證을 치료하

는 처방으로는 鄭[14]이 궤양지수를 사용하여 三黃枳朮丸의 궤양억제효능을 보고한 연구가 있었으나 면역조직화학적인 조사는 없었으며, 아직까지 枳實導滯丸의 위점막 손상의 치료 효과에 대한 연구는 보고된 바 없었다.

NSAIDs는 모든 치료 약물 중 가장 폭넓게 사용되는 약물 중 하나이다[20]. 이들 약물은 진통 및 해열 작용이 있으며, 고농도에서는 항염증작용을 나타낸다[21]. 그러나 NSAIDs는 많은 부작용을 가지고 있어 간, 신장, 피부, 위장관 등에 영향을 미치는데, 위장관에의 부작용은 주로 위와 십이지장에서 발생하며, 경미한 증상만 나타나는 경우에서부터 치명적인 합병증을 동반한 궤양까지 다양하게 나타날 수 있다[22]. NSAIDs에 속하는 Indomethacin은 강한 항염증 작용을 나타내며 염증과 무관한 심한 통증을 조절하는 데도 효과가 있으나[20], 치료받은 환자들의 50%가 유해반응을 일으키며, 위장관 장애로는 오심, 구토, 식욕부진, 설사, 복통 등이 있고 때때로 천공 및 출혈과 함께 상부 위장관의 궤양이 발생할 수 있다[23].

Prostaglandin은 arachidonic acid에서 유도된 장쇄지방산으로 위장점막에 많은 양이 함유되어 있다. 위장관내에서의 prostaglandin의 역할은 다양하며 장운동 촉진, 수소이온 분비억제, 외분비 췌장의 분비억제, 수분 및 전해질 흡수억제, 위장관 혈류증가 및 Na^+이온펌프 억제기능 등이 있으며 특히 위에서는 위점막 혈류, 점액분비, 중탄산염 분비등을 증가시킴으로서 위점막세포에 대한 보호작용과 위산분비를 억제하는 것으로 알려져 있다[24,25]. Misoprostol은 prostaglandin E_1의 안정한 유사체이며, NSAID에 의해 야기되는 위궤양의 예방에 공인된 유일한 약물이다[23].

이에 저자는 枳實導滯丸의 위점막 손상에 대한 치료 효과를 연구하기 위하여 항산화능 및 in vitro 실험을 통한 항염증효과를 관찰하였으며, 실험용 생쥐를 정상군, Indomethacin으로 위점막 손상을 유발한 CON군, 위점막 손상 유발 후 Misoprostol을 투여한 MA군, 위점막 손상 유발 후 枳實導滯丸 추출액을 투여한 JA군으로 나누어 각 군에 10마리씩 배정하여 위점막 방어장벽의 보호 효과(중성점액분비세포와 COX-1), 위점막내 항염증효과(TNF-α, NF-κB p65 그리고 iNOS)를 조사하였다. NSAIDs는 위점막의 COX activity를 방해함으로써 점막방어에 중요한 역할을 하는 내인성 점막 prostaglandin의 합성을 감소시킨다[5]. Prostaglandin형성을 억제함으로서 점막 허혈을 일으키고, 점막 보호 장벽의 장해를 일으켜, 점막을 위산의 손상 작용에 폭로시켜 궤양을 일으킨다[21].

또한 장기적인 스트레스 상황에서는 위산 분비가 줄어들고, 아울러 mucus와 bicarbonate 분비도 줄어들며, 여기서 절약된 에너지원은 스트레스 반응에 돌려 진다. 그러나 스트레스 상황이 종료되면 부교감신경계가 활성화되어 위산 분비는 스트레스 이전 수준으로 돌아오게되나, 방어능력은 여전이 낮은 수준에 머문다. 즉, 얇아진 위점막층의 회복이 늦어지고, bicarbonate의 위산 중화 능력에 역부족인 상태에 놓임으로써 위점막이 손상을 받게 된다. 이런 스트레스 상황에 반복적으로 노출되면, 마침내 위궤양이 발생한다. 이는 스트레스에 의해 분비된 glucocorticoid의 prostaglandin의 합성 차단에 의한 점막의 mucus와 bicabonate 보호장벽의 결핍[26]과 non-inonized 된 약산성의 보호장벽 침투증가로 인한 점막내 중성환경의 변화[27]의 결과이다.

또한 모세혈관의 손상은 재관류시 허혈성 조직손상을 유발하기도 하는데[28], 재관류시 일어난 산소기(oxygen radical)의 증가와 유리기 제거물질(free radical quencher)의 생산량 감소도 위점막 손상을 일으킨다[29]. 따라서 항산화능은 위점막 손상의 예방 및 치료에 밀접한 관련이 있으며, 본 실험에서 枳實導滯丸 추출액의 항산화능을 측정한 결과 우수한 항산화능을 나타내었다.

본 실험에서 indomethacin에 의해 점막 보호장벽의 손상과 그에 따른 출혈성 찰과의 증가와 점액분비세포의 감소 등의 위점막 손상이 관찰되었

는데, 중성 점액분비세포의 손상은 prostaglandin합성 차단의 결과이며[20], 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정에 관여하는 COX-1 mRNA 발현이 indomethacin에 의해 억제된 것이다[30]. COX에는 두 가지 형태가 있는데, House-keeping enzyme인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하며[31] COX-2는 정상적인 상태의 조직에서는 대부분 발현되지 않으나, 이들 조직에 염증이 발생하면 발현이 증가되는 효소로서 만성 염증 및 악성 종양에서 발현이 증가한다. 기존의 NSAIDs는 COX-1과 COX-2를 모두 억제한다[22]. 본 실험에서는 출혈성 찰과 지역주변의 점막고유층 내에서 COX-1에 대한 양성반응이 거의 나타나지 않아, COX-1의 결핍이 Indomethacin에 의한 점막 손상의 일차적 원인으로 설명될 수 있었다. MA군과 JA군에서는 CON군에 비해 점액분비세포의 배열 유실이 감소하였고 점액분비세포 및 점막내 COX-1의 분포는 증가하였으며 특히 JA군에서는 더 우수한 효과를 나타내었다.

NF-κB는 p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성되며, 보통 상태에서는 세포질에서 그 inhibitor인 IκB protein들과 결합하고 있어 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 한편, 재관류시 나타나는 oxidative stress 증가는 전염증효소 TNF-α의 생성을 촉진하게되며 이는 IκB kinase로 알려진 IKK(IKKα, β)를 활성화시켜 IκB protein의 serine residue를 인산화시킨다. IκB protein이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF-κB는 핵으로 들어가 target 유전자의 binding site (consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자의 발현을 유도한다[32]. 본 실험에서는 TNF-α 및 NF-κB의 변화를 각각의 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데, 점막상피 손상지역에서 TNF-α 및 NF-κB p65의 증가를 확인할 수 있었다.

Nitric oxide(NO)는 매우 불안정한 자유래디칼로 L-arginine의 guanidironitrogen이 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 변환되면서 생성이 되며 혈관계, 면역계, 신경계등에서 다양한 역할을 하게 된다. NOS는 정상적인 생리적 조건에서 존재하는 constitutive형(cNOS)과 면역반응에 의해 일어나는 inducible형(iNOS)으로 나뉜다[33]. iNOS는 ROS의 일종인 NO를 생성하는데, NO는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유도, shock에 의한 혈관확장, 염증유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상를 가속화시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고[34], 이는 세포막지질을 peroxidation 시키며, thiorl, SH기를 oxidation하여 세포독성을 유발한다[35]. 본 실험에서는 iNOS의 변화를 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데 점막상피 손상지역에서 iNOS의 증가를 확인할 수 있었다. 한편, MA군과 JA군에서는 TNF-α, NF-κB p65, iNOS의 양성반응이 모두 감소한 것으로 나타났으며 JA군에서 특히 유의성 있게 감소하였는데, 이는 허혈성 재관류시 유도된 과도한 oxidative stress를 차단함으로써 NF-κB의 활성화에 따른 iNOS의 증가에 의한 과다한 염증성 점막손상을 막은 결과로 사료된다.

본 실험을 통해 枳實導滯丸이 항산화능, 위점막 손상 치료 효과, 위점막 방어장벽의 보호 효과, 위점막내 항염증효과가 있음을 확인하였으며, 현재 사용되는 약제인 Misoprostol 투여군과 비교했을 때에도 枳實導滯丸 투여군이 더 우수한 치료효과를 보임으로써 위점막 손상의 치료제로서의 사용이 기대된다. 향후 枳實導滯丸에 관해 보다 다양한

방법의 실험적 연구가 필요하며, 다른 위점막 손상 요인에 대한 치료 효과에 관해서도 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

Indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대한 Misoprostol과 枳實導滯丸의 치료 효과를 비교 · 조사하기 위해서 행해진 본 연구는 枳實導滯丸의 항산화능 및 indomethicine으로 위점막 손상 유발 생쥐에서 위점막 방어장벽의 보호 효과(중성점액 분비세포와 COX-1), 위점막내 항염증효과(TNF-α, NF-κB p65 그리고 iNOS)를 조사하였다.

1. 枳實導滯丸의 용량에 비례하여 superoxide dismutase (SOD)효과가 있었다.
2. 출혈성 찰과로 인한 점액분비세포의 배열 유실은 Misoprostol 투여군과 枳實導滯丸 투여군에서 모두 감소하였으나, 枳實導滯丸 투여군이 더 유의한 결과를 나타내었다.
3. PAS 양성반응 표면점액세포와 목점액세포의 분포는 Misoprostol 투여군과 枳實導滯丸 투여군에서 모두 증가하였으나, 枳實導滯丸 투여군이 더 유의한 결과를 나타내었다.
4. 세포내 보호기전에 관계하는 점막내 COX-1의 분포는 Misoprostol 투여군과 枳實導滯丸 투여군에서 모두 증가하였으나, 枳實導滯丸 투여군이 더 유의한 결과를 나타내었다.
5. 전염증효소인 TNF-α와 iNOS 생성에 관여하는 전사인자 NF-κB p65, 염증효소 iNOS는 Misoprostol 투여군과 枳實導滯丸 투여군에서 모두 감소하였으나, 枳實導滯丸 투여군이 더 유의한 결과를 나타내었다.

이상의 결과로 枳實導滯丸은 현재 사용되는 약제인 Misoprostol과 비교했을 때에도 더 우수한 치료효과를 보임으로써 위점막 손상의 치료제로서의 사용이 기대되며, 향후 이에 관해 더 많은 연구 및 보고가 이루어져야 할 것으로 보인다.

참고문헌

1. 랫드의 스트레스성 위궤양에 대한 *Opuntia dillenii Haw.*(선인장)의 항궤양작용에 관한 연구. 이후장, 이용욱, 김정현. *J Fd Hyg. Safety.* 1998;13(1):53.
2. 건강보험통계연보. 국민건강보험공단. 서울: 2006, p. 364, 456-72.
3. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 2000, p. 597.
4. 민영일, 김진호, 홍원선, 정훈용, 명승재, 김경모. 상부위장관 내시경 ATLAS. 서울: 군자출판사; 2001, p. 170-211.
5. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울: 정담; 1997, p. 1466-85.
6. 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철 외 2인. 實用東西醫學臨床叢書. 서울: 정담; 2001, p. 453-502.
7. 李杲. 東垣十種醫書. 서울: 대성문화사; 1996, p. 55-6.
8. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 법인문화사; 2002, p. 1132.
9. 한의과대학 방제학교수 共編著. 方劑學. 서울: 영림사; 1999, p. 557-559.
10. 공경환. 香砂六君子湯의 Indomethacin 유발 위점막 손상에 대한 효과. 상지대학교 석사학위논문. 2001.
11. 김주성. 沙蔘麥門冬湯이 위·십이지장 점막손상의 회복에 미치는 영향. 동국대학교 박사학위논문. 2001.
12. 강재춘, 박동원, 유기원. 槐花散이 항소화성궤양 및 혈액응고작용에 미치는 실험적 연구. 대한한의학회지. 1997;18(1):238-50.
13. 송창훈. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 消滯丸의 효과. 상지대학교 석

사학위논문. 2006.
14. 정재숙. 三黃枳朮丸의 潰瘍抑制效能에 關한 實驗的 硏究. 상지대학교 석사학위논문. 1995.
15. 新谷太. 문영명 역. Steps to internal medicine pathophysiology로 이해하는 내과학 소화기질환(6). 서울: 정담; 2002, p. 63-79.
16. 신태양사 편집국 백과사전부. The great medical encyclopedia(원색최신의료대백과사전). 서울: 도서출판 신태양사; 1996. p. 198.
17. 陳利國 外. 中西醫結合內科治療學. 北京: 人民軍醫出版社; 1999. p. 161-74.
18. 李梴. 醫學入門. 대구: 동양종합통신대학교육부; 1973. p. 1035.
19. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당; 2001, p. 129-33, 134-137, 174-7, 222-3, 270-1, 429-31.
20. 백영홍, 최봉규, 김재하, 김종근, 김경근, 임영채 외 4인. 약리학(제3판). 서울: 도서출판 신일상사; 2004, p. 621-6.
21. 임동윤, 이은화 共譯. 한 눈에 알 수 있는 약리학(제3판). 서울: 도서출판 신일상사; 2003, p. 70-1.
22. 이종철. NSAID에 의한 소화관 부작용 및 위험인자. 2002년도 제13회 대한소화기학회세미나: p. 23-31.
23. 임동윤 역. 리핀코트의 그림으로 보는 약리학. 서울: 도서출판 신일상사; 2000, p. 409, 238.
24. Russel RI. Protective effects of the prostaglandins on the gastric mucosa. *Am J Med.* 1986;81:2.
25. Robert A. Effects of prostaglandins on the stomach and the intestine. *Prostaglandin.* 1974;6(6):523.
26. Arakawa T, Higuchi K, Fukuda T, Fujiwara Y, Kobayashi K, Kuroki T. Prostaglandins in the stomach: an update. *J Clin Gastroenterol.* 1998;27:1-11.
27. Schoen RT and Vender RJ. Mechanism of NSAID-induced gastric damage. *AM J Med.* 1989;86:449-58.
28. Wallace JL. Gastric ulceration: critical eventsat the neutrophil-endothelium interface. *Can. J Physiol Pharmacol.* 1993;71:98-102.
29. Yi L and Sohn JH. Behavioral and physiological correlated of activity stress-induced ulcers: A critical review. *Exp. Neurobio.* 1995;4:61-80.
30. Cryer B and Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Am J med.* 1998;105:20s-30s.
31. Sakamoto C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol.* 1998;33(5):618-24.
32. Baeuerle PA and Baltimore D. NF-κB - Ten years after. *Cell.* 1996;87(1):13-20.
33. Bishop A, Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology.* 2005;208(2):193-205.
34. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet.* 1994;343(8907):1199-206.
35. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288(2):481-7.