

Indomethacin으로 유발된 백서의 위점막 손상에 대한 시호계지탕의 효과

김보람, 허 경, 임성우
동국대학교 한의과대학 한방내과

Effect of *Sihogejji-tang* Extract on Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Lesions in Rats

Bo-ram Kim, Kyung Huh, Seong-woo Lim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to investigate the effects of *sihogejji-tang* on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats.

Methods : Experimental rats were classified into three groups. The normal group had no inflammation elicited. The control group was rats administered water after elicitation of gastro-inflammation. The sample group were administered *sihogejji-tang* after gastro-inflammation elicitation.

Results : In the common morphology and histochemical change, the control group were observed to have various injuries by hemorrhagic erosion, while the sample group had noticeably fewer injuries than the control.

In the immunohistochemical change, the distribution of HSP-70, PCNA treated with *sihogejji-tang* noticeably increased over the control group. The distribution of NF-kB, COX-2 treated with *sihogejji-tang* noticeably decreased compared to the control group. (p<0.05)

Conclusions : *Sihogejji-tang* had significant effects on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats.

Key words : *sihogejji-tang*(*chaihuguizhi-tang*), indomethacin, gastric mucosal lesions

1. 서 론

우리사회의 고령화와 심혈관계 질환의 증가를 고려할 때, 향후 아스피린을 포함한 비스테로이드 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)의 사용례는 기하급수적으로 증가할 것으로 예상된다¹. 비스테로이드소염제는 항염증, 진통, 해열 효과가 있는 약물로 전세계적으로 다양한 질환에

널리 이용되는 약물이며, 최근에는 항혈소판 작용을 가지고 있는 아스피린의 심혈관계 질환에 대한 사용 빈도가 급증하고 있다².

비스테로이드소염제의 광범위한 사용은 약물에 의한 부작용 증가라는 새로운 문제를 제기하고 있는데, 그 중 가장 흔히 발생하는 부작용은 소화기계 합병증으로 비스테로이드소염제를 복용하는 환자들을 대상으로 상부위장관내시경검사를 시행한 연구에 의하면, 처음 약물을 복용하고 3개월 이내에 10-40%에서 위궤양이 발생한다³⁻⁶. 또한 약물복용 1년 내에 2%의 환자에서 위장관 출혈, 천공, 협

· 교신저자: 임성우 경기도 고양시 일산동구 석사동 814번지
동국대학교 일산한방병원 한방내과
TEL: 031-961-9046 FAX: 031-961-9045
E-mail: omdslw@naver.com

착 등의 심각한 합병증이 발생한다⁷. 최근 소화성 궤양 발생의 원인 개념도 과거 위산과 펩신에만 초점을 두고 설명한 “no acid : no ulcer”의 개념이, Helicobacter pylori(HP) 및 비스테로이드소염제가 중요한 병인인이 밝혀짐에 따라 “no HP, no NSAIDs : no ulcer”의 개념으로 바뀌고 있다^{8,9}.

이러한 소화성 궤양 발생시 가장 흔한 증상은 심와부 동통이며, 그 외의 증상으로 식욕감퇴, 체중감소, 구역, 구토, 속쓰림, 소화불량, 상부 위장관 출혈, 천공, 위장관 출구 폐쇄 등의 증상이 나타날 수 있다^{8,9}.

한의학적으로는 이를 증상에 따라 胃完痛, 痞滿, 吞酸, 嘈雜 등의 병증과 유사하다고 볼 수 있겠다⁸.

柴胡桂枝湯은 『傷寒論』¹⁰, 『金匱要略』¹¹에 기재된 처방으로 『金匱要略·腹滿, 寒疝, 腹痛篇』¹¹에서 “外臺柴胡桂枝湯方, 治心腹卒中痛者.”라 한 이후 명치와 배가 갑자기 아픈 증상을 치료하는 데 응용되고 있는 처방이다. 임상에서는 이에 따라 급성 위염, 위·십이지장궤양, 담낭염, 담석증, 간기능장애, 췌장염 등에 사용되고 있다^{12,13}.

지금까지 실험적으로 여러 기전을 통한 위점막 손상 모델에 있어 한약재의 치료 효과에 관한 많은 연구보고가 있었고¹⁴⁻¹⁷, 柴胡桂枝湯 또한 담석증, 간기능 장애¹⁸⁻²⁰ 등에 대한 실험적 보고는 있었으나, 아직까지 柴胡桂枝湯의 위점막 손상으로 나타나는 위염, 위궤양의 치료 효과에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 위점막 손상의 대표적인 원인인 비스테로이드소염제의 일종인 indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대한 柴胡桂枝湯의 실험적 치료 효과를 규명하기 위해 위점막의 형태적 변화, 점액분포, 염증관련매개물질 발현, 세포보호 및 세포증식 효과를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료 및 방법

1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 30 g의 ICR계 수컷 생쥐를 대한실험동물센터로부터 구입하였으며, 일주일 동안 온도 22±1℃, 습도 55±3%인 실험실 환경에서 12시간 밤낮 주기로 적응시킨 후 실험군 당 5마리씩 나누어 사용하였다.

2) 柴胡桂枝湯 엑기스 추출 및 투여량

Table 1의 조성으로 준비된 柴胡桂枝湯(*Sihogeeji-tang*, SGT) 2침에 물 1 L를 넣어 90℃에서 3시간 달인 후 100 ml로 감압 농축한 후, 농축된 추출물을 성인 1일 분량을 100 ml/60 kg로 계산하여 1.67 ml/kg의 3배 농도로 하루 1회씩 3일 동안 구강 투여하였다.

본 실험에 사용된 약제는 동국대학교 일산한방병원에서 구입하여 정선한 것이다.

Table 1. Contents of *Sihogeeji-tang*

Herb Name	Scientific Name	Amount (g)
柴胡	<i>BUPLEURI RADIX</i>	8
黃芩	<i>SCUTELLARIAE RADIX</i>	4
人蔘	<i>GINSENG RADIX</i>	4
芍藥	<i>PAEONIAE RADIX ALBA</i>	4
桂枝	<i>CINNAMOMI RAMULUS</i>	4
生薑	<i>ZINGIBERIS RHIZOMA RECENS</i>	6
甘草	<i>GLYCYRRHIZAE RADIX</i>	2.4
半夏	<i>PINELLIAE RHIZOMA</i>	3.2
大棗	<i>JUJUBAE FRUCTUS</i>	4
Total		39.6

2. 위점막 손상 유발 실험 모델

위점막 손상 유발을 위하여 indomethacin을 5% NaHCO₃에 녹인 후 5 mg/kg의 농도로 24시간 간격으로 2회 피하 주사하였으며, 개체당 volume을 100 μl로 주사하였다.

실험 동물은 indomethacin 주사 후 생수를 투여한 군(대조군)과 indomethacin 주사 후 추출물을 투여한

군(실험군)으로 나누어 관찰하였으며, indomethacin 주사하지 않은 건강한 실험쥐를 정상군으로 하였다. 각 실험군들은 indomethacin 주사 후 3일 동안 柴胡桂枝湯 추출물 또는 생수를 투여한 후 다음날 인 4일째 희생시켜 위(stomach) 조직을 적출하였다.

3. 조직표본 준비

동물을 sodium pentobarbital(0.003 ml/g)로 마취시킨 후 복부를 절개하여 위를 채취한 후 얻어진 조직을 10% 포르말린에 12시간 고정시킨 후 흐르는 물에 수세하였으며, 탈수화과정을 거친 다음 파라핀에 포매시켜 4 μm로 연속 절편하여 조직화학 및 면역조직화학적 염색에 이용하였다.

4. 조직화학 및 면역조직화학적 염색

절편된 조직 표본을 xylene을 이용하여 탈파라핀한 후 가수화(rehydration)하여 조직화학적 염색으로는, 일반적으로 시행하는 H-E 염색과 탄수화물 염색에 이용되는 PAS를 행하였다. 또한 면역조직화학적 염색으로는 탈파라핀한 후 가수화시킨 표본을 proteinase K(20 μg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 3% H₂O₂로 5분간 처리하여 조직내의 내인성 과산화효소를 제거하고, 1차 항체(Table 2)를 처리하여 4°C humidified chamber에서 24시간 동안 반응시켰다. 다음 0.02M phosphate buffered saline (PBS)에 충분히 수세한 후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit/mouse IgG(Dako, USA)에 실온에서 10분간 link하였다. PBS로 수세한 후 streptavidin peroxidase(Dako, USA)에 10분간 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)로 발색 반응을 확인하였으며, Hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경(Olympus BX50, Japan) 하에서 비교 관찰한 후 디지털 카메라(Nikon E995, Japan)로 촬영하였다. 염색한 조직 표본 중 PAS 염색과 NF-κB p65, COX-2, HSP70 발현을 관찰한 샘플은 400배율에서 발현값을 측정(Image-Pro Plus, ver. 7.0)하였으며, 각 조직표본당

3곳을 측정하여 통계 처리하였고, 실험에서 사용된 항체는 다음과 같다(Table 2).

Table 2. List of Antibodies

Antibody	Source	Dilution	Company
NF-κB p65*	mouse	1:500	Santa cruz
COX-2†	rabbit	1:200	Santa cruz
Hsp70‡	mouse	1:200	Stressgen
PCNA§	rabbit	1:200	Santa cruz

* NF-κB p65 : nuclear factor kappa B p65

† COX-2 : cyclooxygenase 2

‡ Hsp70 : heat shock protein 70

§ PCNA : proliferating cell nuclear antigen

5. 통계

실험군 간의 유의성검증을 위해 SPSS(ver. 17.0) program을 이용하였으며, one-way ANOVA로 분석하고 DUNCAN으로 사후 검증하였다. 유의수준은 p<0.05에서 판별하였다.

III. 결 과

1. 형태적 변화

위조직의 형태적 변화를 확인하고자 H-E염색을 시행한 결과, 정상군은 전형적인 위샘의 구조를 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 그러나 대조군은 위샘의 구조가 명확한 형태를 나타내지 못하며 깃무름(erosion) 현상으로 매우 손상되었으며(upper Fig. 1B), 또한 점막내 근육층이 소실된 부분이 나타났으며 점막밑층에는 염증세포들의 침투, 증식이 두드러지게 관찰되었다(lower Fig. 1B). 실험군에서는 대조군에 비해 위샘의 손상 정도가 감소되었으며(upper Fig. 1C), 점막밑층에서 관찰되는 염증세포도 대조군에 비해 현저히 감소하였다(lower Fig. 1C).

PAS 염색을 통한 위조직의 변화를 관찰한 결과 정상군에서는 표면상피세포에서 분비된 점액이 적색으로 염색되어 위오목과 위샘의 표면을 덮고 있었으며, 이는 산성의 환경으로부터 보호되고 있음을 알 수 있다(Fig. 2A). 반면, 대조군은 위샘조직

손상으로 인해 점액을 분비할 수 있는 세포가 소실되어 정상군에 비해 감소되었으나(Fig. 2B), 실험군에서는 대조군에 비해 많이 증가되었다(Fig. 2C). 유의성 검증에 있어서도 정상군, 대조군, 실험군이 각각 pixel count log값 7.86±0.5, 7.15±0.10, 7.70±0.12로 측정되었으며, 대조군은 정상군과 실험군과 유의한 차이를 나타내었고 정상군과 실험군 간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2D).

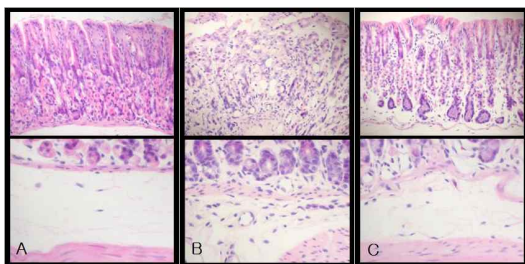


Fig. 1. The change of gastric gland(upper figures, 200x) and infiltration of inflammatory cells in submucosa(lower figures, 400x).

A : normal group without indomethacin injection.
 B : water treatment after indomethacin injection.
 C : SGT treatment after indomethacin. H-E stain.

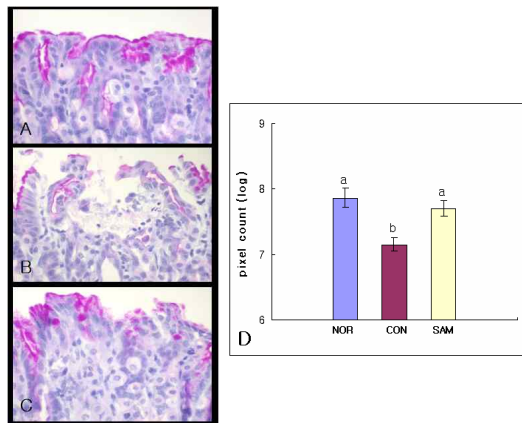


Fig. 2. The mucosa change of stomach.

A : normal group without indomethacin injection (NOR). B : water treatment after indomethacin injection(CON). C : SGT treatment after indomethacin(SAM). D : image analysis of PAS stain.(means±S.E, CON p<0.05)
 magnification of photomicrograph = 400x

2. 항염증 효과

염증 진행을 확인하고자 NF-kB p65와 COX-2의 발현을 비교 관찰하였다. 먼저 NF-kB p65발현에서 정상군은 발현되지 않았으나(Fig. 3A), 대조군에서는 위오목(pit) 부분(Fig. 3C)과 점막내 근육 및 위샘의 바닥(base) 부위(Fig. 3D)에서 발현이 증가되었다. 그러나 실험군에서는 대조군에 비해 현저히 감소되었다(Fig. 3B). 유의성 검증에 있어서 정상군, 대조군, 실험군이 각각 pixel count log값 0, 7.28±0.20, 5.64±0.15로 측정되었으며, 각 실험군간에 모두 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 3E). 정상군에 비해 대조군과 실험군은 염증반응이 유의하게 증가되었고, 실험군도 대조군에 비하여 염증반응이 유의하게 감소하였다.

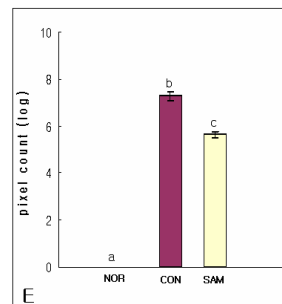
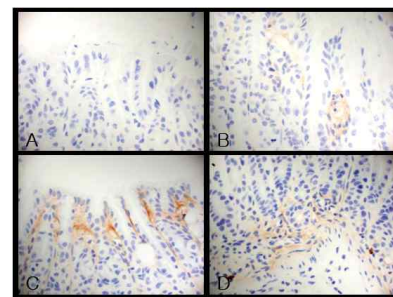


Fig. 3. Immunohistochemical stain of NF-kB p65.

A : normal group without indomethacin injection (NOR), B : SGT treatment after indomethacin (SAM), C, D : water treatment after indomethacin injection (CON), E : image analysis of NF-kB p65 expression. (means±S.E, p<0.05)
 magnification of photomicrograph = 400x

NF-kB 에 의해 조절되는 것으로 알려진 COX-2 의 발현을 확인한 결과, NF-kB p65의 발현과 거의 유사한 경향으로, 정상군에서는 발현되지 않았으며 (Fig. 4A) 대조군에서는 위오목과 점막내 근육 및 위샘의 바닥 부위에서 발현이 증가된 반면(Fig. 4C, D), 실험군에서는 대조군에 비해 발현양이 현저히 감소되었다(Fig. 4B). 유의성 검증에 있어서도 정상군, 대조군, 실험군이 각각 pixel count log 값 0, 7.29±0.23, 6.17±0.14로 측정되었으며, 각 실험군 간에 모두 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 4E). 이것은 柴胡桂枝湯이 NF-kB p65 발현을 억제시키고, 이것의 발현 억제는 곧 COX-2 발현을 억제시켜 염증 진행을 억제시킨 것으로 확인되었다.

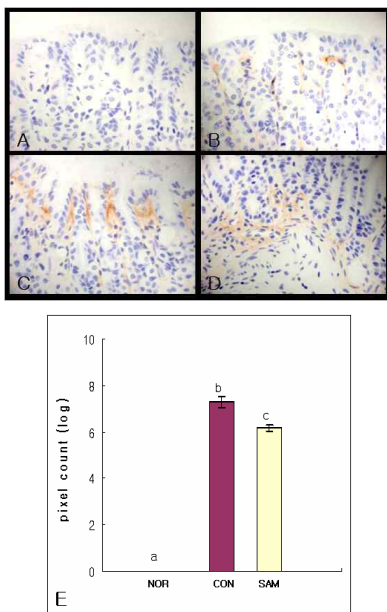


Fig. 4. Immunohistochemical stain of COX-2.

A : normal group without indomethacin injection (NOR), B : SGT treatment after indomethacin (SAM), C, D : water treatment after indomethacin injection (CON), E : image analysis of COX-2 expression. (means±S.E, p<0.05)
magnification of photomicrograph = 400x

3. 세포보호 효과

염증이나 여러 스트레스로부터 세포를 보호하는 기능이 있는 것으로 알려져 있는 HSP70의 발현을 통해 柴胡桂枝湯이 위조직의 보호 효과에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 정상군에서는 발현이 관찰되지 않았으나(Fig. 5A), 대조군에서는 위샘의 바닥부분에서 간혹 양성 반응이 나타났으며 점막내 근육에서도 약한 발현이 관찰되었다(Fig. 5B). 반면 실험군은 위샘의 2/3 정도까지 양성 반응이 나타났으며 위표면 상피 아래에 놓인 점막고유층에서도 발현이 매우 증가되었다(Fig. 5C, D). 유의성 검증에 있어서 정상군, 대조군, 실험군이 각각 pixel count log 값 0, 6.35±0.06, 7.38±0.15로 측정되었으며, 정상군에 비하여 대조군과 실험군 모두 HSP70이 유의하게 증가되었고 대조군에 비하여 실험군에서 HSP70이 증가하였다(Fig. 5E).

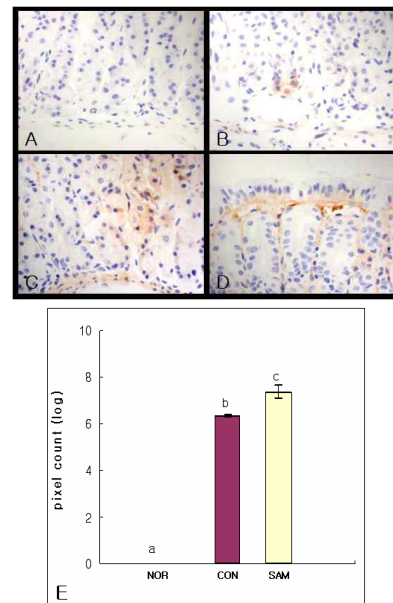


Fig. 5. Immunohistochemical stain of HSP70.

A : normal group without indomethacin injection (NOR), B : water treatment after indomethacin injection (CON), C, D : SGT treatment after indomethacin (SAM), E : image analysis of HSP70 expression. (means±S.E, p<0.05)
magnification of photomicrograph = 400x

4. 세포증식 효과

세포분열을 확인하는 방법 중의 하나인 PCNA 발현으로 그 효과를 확인한 결과, 정상군에서는 위샘의 1/3 정도 까지 양성 반응이 관찰되었으나 (Fig. 6A), 대조군에서는 점막내 근육층과 위샘의 바닥 근처에 놓여진 점막고유층에서 발현이 나타났으며, 특히 염증세포에서 발현이 강하게 관찰되었다 (Fig. 6B). 반면, 실험군에서는 발현이 위샘에서 정상군에 비해 더 넓은 범위에 걸쳐 양성 반응이 관찰되었다 (Fig. 6C).

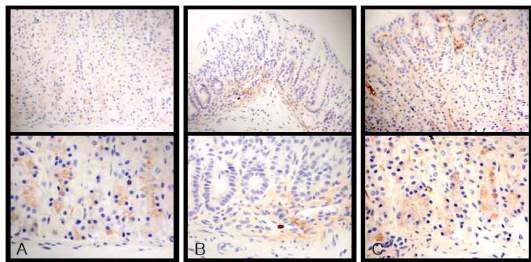


Fig. 6. PCNA expression of gastric gland.

A : normal group without indomethacin injection.
 B : water treatment after indomethacin injection.
 C : SGT treatment after indomethacin.
 (upper : 200x; lower : 400x)

IV. 고 찰

급성 위점막병변(acute gastric mucosal lesion : AGML)이란 급격한 위증상과 함께 내시경상 위점막 손상이 나타난 상태로, 위의 점막 손상 질환인 급성 위염과 급성 위궤양을 총칭한 것이다²¹. 이는 비스테로이드소염제, 항생제, 스테로이드 등의 약물과 알코올 등의 기호품, 정신 및 신체적 스트레스, anisakiasis, H.pylori, 방사선 치료 등으로 인해 발생하며, 이중 비스테로이드소염제는 위점막 손상의 주된 원인으로 위점막을 직접 손상시킬 뿐 아니라 점막장벽부전, 위장의 프로스타글란딘 생성억제, 위장점막혈류 감소를 유발하여 조직손상회복을 방해함으로써 위점막 손상을 유발한다^{21,22}.

위점막 손상시 조직학적으로 괴사된 점막의 결손이 점막하층 이하까지 발생한 경우를 궤양이라고 정의하며, 점막층만으로 결손이 국한된 경우는 미란이라고 정의하지만, 내시경 또는 영상의학 검사에서 미란과 궤양을 정확히 구분하기 어려우므로 실제 임상에서는 두 가지가 유사한 의미를 갖는다^{9,21}.

궤양 발생 시 가장 흔한 증상은 심와부 동통이나, 증상 자체가 질환에 특이적이지 않고 심한 정도에 비례하지 않는다. 그 외의 증상으로는 식욕감퇴, 체중감소, 구역, 구토, 속쓰림, 소화불량, 지방음식 거부감, 헛배부름, 트림 등이 있을 수 있으며 상부 위장관 출혈, 천공에 따른 심한 복통 및 발열, 반복적인 궤양에 따른 합병증인 위장관 출구 폐쇄 등의 증상이 나타날 수 있다^{8,9}.

이의 예방이나 치료를 위해 미소프로스톨(Misoprostol), H2 수용체 길항제(H2 receptor antagonist), 양성자펌프 억제제(Proton pump inhibitor, PPI) 등을 사용하나², 지난 30년간 이러한 궤양치료제 개발과 발전에도 불구하고 소화성 궤양의 합병증에 의한 사망률은 개선되지 않았으며 소화성 궤양 출혈에 의한 사망률은 6-12%에 달하고 있다²³.

이러한 위점막 손상은 임상적인 증상에 따라 한의학적으로 胃脘痛, 痞滿, 吞酸, 嘈雜 등의 병증과 유사하다고 볼 수 있으며⁸, 최근의 연구 결과에 의하면 滋陰健脾湯¹⁴, 平陳湯¹⁵, 枳實導滯丸¹⁶, 地榆湯¹⁷ 등이 비스테로이드소염제인 indomethacin으로 유발된 위점막 손상의 치료에 효과적임이 실험적으로 보고되어 있다.

柴胡桂枝湯은 小柴胡湯에 桂枝湯을 합한 방제로 『傷寒論』¹⁰, 『金匱要略』¹¹에 최초로 기재되었다. 『傷寒論·太陽病 下篇』¹⁰에서 “傷寒六七日, 發熱微惡寒, 支節煩疼, 微嘔, 心下支結, 外證未去者, 柴胡桂枝湯主之”라 하였고, 『金匱要略·腹滿, 寒疝, 腹痛篇』¹¹에서 “外臺柴胡桂枝湯方, 治心腹卒中痛者.”라 하여 본래는 太陽, 少陽 두 가지 併病에 사용되는 처방으로, 근래에는 이를 상한, 즉 급성증상에 쓰

이는 경우와 잡병, 즉 만성질환에 쓰이는 경우에 관점을 달리하여 처방하고 있다. 급성증상에서는 '傷寒六七日, 發熱微惡寒, 支節煩疼' 조문에 근거하여 감기, 유행성 감기, 폐렴, 폐결핵 등의 열성질환에^{12,13}, 만성질환에서는 '微嘔, 心下支結, 心腹卒中痛' 조문에 근거하여 복진상 心下支結, 즉 胸脇苦滿이나 心下痞硬의 정도는 가볍지만 복직근이 긴장되어 腹表에 뜬 것 같이 단단하게 촉진되는 상태를 보이는²⁴ 급성 위염, 위 십이지장궤양, 담낭염, 담석증, 간기능장애, 췌장염 등에 사용하고 있다^{12,13,24}.

이에 대한 연구로 백서의 간손상 회복¹⁸, 간 보호작용¹⁹, 담석증 예방²⁰ 효과에 대한 연구결과가 보고된 바 있으나, 비스테로이드소염제로 유발된 위점막 손상의 치료에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 柴胡桂枝湯의 비스테로이드소염제로 유발된 위점막 손상에 대한 치료 효과를 규명하기 위하여 아무 처치도 받지 않은 군(정상군)과 indomethacin을 피하 주사하여 급성 위점막 손상을 유발한 군(대조군), 급성 위점막 손상 유발 후 柴胡桂枝湯을 투여한 군(실험군)으로 나누어, 위점막의 형태적 변화, 점액분포, 염증관련 매개물질의 발현, 세포보호 및 세포증식 효과를 관찰하였다.

본 연구 결과 먼저, 조직학적 염색으로는 정상군의 경우 위(stomach)에서는 위 표면상피와 위 오목 그리고 위액을 분비하는 위샘의 전형적인 형태를 나타내고 있었다. PAS에 강하게 염색된 점액은 세포에서 분비된 후 위 표면에 두꺼운 층을 형성하여 산성의 환경으로부터 세포를 보호하고 있었다. 그러나 대조군에서는 위의 많은 표피세포들이 깃무르고(erosion) 위 표면상피 뿐만 아니라 위샘이 없어지며 점막층에는 많은 염증관련 세포들이 침투 증식하고 있었으며, PAS 염색성에서도 매우 약하게 나타나거나 조직 손상이 심한 곳에는 산성의 환경으로부터 보호될 수 있는 점액 물질이 형성되지 않아 조직 손상이 더욱 심각해질 수 있음을 추측할 수 있었다. 반면, 실험군에서는 위의 대조군에 비해 염증이 완화되었으며 고유의 형태

로 회복되고 있었으므로 추출물에 의해 조직의 형태적 변화가 억제됨을 알 수 있다.

면역조직화학적 방법을 이용하여 그 효과를 구체적으로 검증하였다. 우선 항염증 효과를 확인하고자 NF-kB(nuclear factor kappa B)와 COX(cyclooxygenase)를 이용하여 그 발현을 비교하였다. NF-kB는 유핵세포의 전사인자 중 일군으로서 모두 다섯 종류의 NF-kB/Rel군 단백질 -c-Rel, p65(Rel A), Rel B, p50(NFkB1), p52(NFkB2)-들의 동합체 혹은 이합체로 이루어져 있다. 이 중 p65와 p50의 이합체가 자연계에 가장 많은 양으로 존재하며 일반적으로 NF-kB라 함은 이 이합체를 지칭한다. NF-kB는 평상시에는 세포질에 Inhibitor kB(IkB)와 결합해 있거나 p50의 전구체인 p105/p65의 이합체 형태로 존재하는데 이들은 모두 불활성 상태이다. 세포에 가해진 다양한 자극들은 IKK(inhibitory kappa B kinase)를 활성화시키고 활성화된 IKK는 먼저 IkB- α 를 phosphorylation하여 proteosome에 의해 IkB- α 가 proteolysis되어 자유형태의 NF-kB를 생성하게 된다. 자유형태의 NF-kB가 핵 안으로 이동하여 여러 유전자와 결합하여 전사인자로서의 역할을 한다²⁵. NF-kB의 활성화는 염증 반응에 관여하는 COX-2 및 신경세포의 산화적 손상을 유발하는 nitric oxide 등을 생성하는 iNOS의 발현과 관련되어 있고, NF-kB의 활성화가 증가되면 COX-2의 활성화에 의해 염증 반응을 증가시킨다고 보고되어 있다²⁶. COX enzyme는 COX-1, COX-2 두개의 isoenzyme으로 이루어져 있으며 각기 다른 유전자로부터 발현된다. 이것은 prostaglandins(PGs)의 합성을 조절하는 효소이기도 하다. 내인성 PGs(PGE2, PG12)는 위액의 분비 조절, 점막의 혈류량과 점액의 알칼리 분비 촉진, 점막 연속성을 유지하는 기능을 가지고 있으며 이로 인해 위장관이 보호된다는 사실이 알려져 있다. COX enzyme 중 COX-1은 대부분의 세포에 널리 분포하고 있으며 정상적인 위장관의 PGs 생산에 관여하여 점막 보호에 중요한 역할을 하는 것으로

알려져 있는 반면, COX-2는 cytokine, 성장인자, 종양촉진자 등의 여러 자극에 의해 유도되며²⁷, 주로 조직에서 PGs를 생성하여 염증과 통증을 유발하는 것으로도 보고되고 있다²⁸. 본 연구에서 NF-kB p65와 COX-2의 반응은 정상군에서는 발현되지 않았으나 대조군에서는 NF-kB p65와 COX-2의 반응 모두가 증가하였다. 반면 실험군에서는 대조군보다 오히려 감소하였다. Kim 등²⁹의 보고에 의하면 indomethacin은 COX-1과 COX-2 모두에 작용하여 그 활성도를 감소시키는 것으로 알려져 있으며 이의 COX 활성도 억제작용은 투여 후 3시간째 가장 심하다고 보고되어 있다. 따라서 그들의 연구에서 위병증과 소장병증 모델에서 유발 1일째 측정된 결과 COX-1은 정상 점막과 위병증 및 소장병증이 유발된 병변 모두에서 동일하게 발현되는 양상을 보였으나, COX-2는 정상 위점막 및 정상 소장점막에서는 발현되지 않다가 병변유발 1일째 새롭게 발현이 유도되는 양상을 보였다고 보고하였으며 이것은 COX 활성도 억제 작용은 24시간 이전에 모두 종료되어 COX-1과 COX-2 유발이 회복된 것으로 추측하였다. 본 연구 결과 또한 indomethacin 주사 후 4일째 관찰한 결과로 인해 indomethacin에 의한 COX-2의 활성도 억제 작용은 종료된 것으로 추측되며, NF-kB p65와 COX-2의 발현 양상이 유사하게 나타난 것으로 보아 추출물이 NF-kB의 활성을 억제시킴으로 인해 COX-2의 발현이 대조군에 비해 감소된 것으로 볼 수 있고, 이것은 柴胡桂枝湯이 NF-kB 조절에 관여하여 염증 억제 또는 완화 작용에 매우 효과적임을 알 수 있다.

또한 대부분의 조직에서 세포의 보호 작용으로 알려진 HSP70(heat shock protein 70)은 식물이나 이스트, 박테리아 및 포유류 등 모든 살아있는 세포에서 발견되는 가장 대표적인 유도성 HSP(heat shock protein)이다. HSP family에는 그 분자량에 의하여 명칭이 붙여진 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 및 HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재한다.

Heat-shock-factor proteins(HSFs)으로부터 분리되기 시작하여, HSFs로부터 HSP90이 분리되면 HSF가 활성화되고, 활성화된 HSFs는 HSP70 gene의 전사를 촉진하여 스트레스를 받은 세포내에는 HSP70 단백질과 mRNA 수준이 급격히 증가하게 된다³⁰. 스트레스 상태에서 세포의 생존을 위한 HSP의 중요성에 관해서는 많은 연구에서 보여주고 있으며 HSP family가 heat stress로 배양된 위점막 세포에서 유도된다는 것이 증명되고 있으며, 이 단백질은 생체내에서 보호기능을 가진다³¹. 또한 Koh 등³²은 endotoxin으로 유발된 폐 손상에서 HSP70이 항염증 작용을 하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서 정상군에서는 약한 양성반응을 나타낸 반면 柴胡桂枝湯을 투여한 실험군의 발현은 대조군에 비해 현저한 증가를 보였다. Indomethacin 주사 후 4일째 나타나는 염증반응으로 인해 HSP70의 발현이 점차 약해진 시기인 것으로 추측되어, 대조군의 HSP70 발현은 염증 진행에 의한 병변으로 점차 감소되었으며, 실험군에서는 柴胡桂枝湯이 HSP70 발현을 유도함으로써 항염증 작용에 관여하여 대조군에 비해 세포 손상으로부터 보호되는 것으로 추측된다.

재생세포(regenerative cells)들은 주로 위목(neck)의 목점액세포들 사이에 흩어져 존재하며 분열하여 위바닥샘, 위오목, 관내강쪽 표면에 있는 모든 세포들을 대체한다. 새로 만들어진 세포들은 아래쪽으로 위바닥샘을 향해 이동하거나 또는 위쪽의 위오목과 관내강쪽 표면을 향해 이동하게 된다³³. 손상된 조직이 다시 복구되기 위해서는 이들 재생 세포들의 활발한 증식이 요구되는데, 柴胡桂枝湯이 세포증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서 PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen) 발현을 통해 검증하였다. PCNA는 세포분열을 확인하는 방법 중의 하나로 널리 이용되고 있는 면역반응이다. PCNA는 분자량이 약 34kD인 내인성 단백질로서 세포분열기 중에서 G1, S기 또한 G2기에도 발현되는 것으로 알려지고 있으며 DNA polymerase delta

의 cofactor로 작용하는 물질이다³⁴. 본 실험의 경우 대조군의 세포증식이 위샘에서는 잘 나타나지 않았으나 추출물을 투여한 실험군에서는 위샘의 대부분 지역에서 PCNA 양성 반응이 관찰되어 정상군에 비해 그 반응이 오히려 증가되었다. 이것은 柴胡桂枝湯이 손상된 조직을 빨리 회복시키는데 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

그러므로 본 연구에서 柴胡桂枝湯은 indomethacin에 의해 유발된 위점막 손상에 있어서 염증 진행을 억제 또는 완화시키며 또한 손상된 조직을 신속히 회복시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

이번 연구에서는 柴胡桂枝湯의 비스테로이드소염제로 유발된 위점막 손상의 치료에 대한 실험적 연구를 진행하였으나, 추후에는 다른 기전에 의해 유발된 위점막 손상의 재발을 면역학적으로 억제하는 연구, 기존 위점막 손상 치료제와의 병용 치료에 대한 차별성 등이 추가로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

Indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대한 柴胡桂枝湯의 치료 효과를 조사하기 위해서 행해진 본 연구는 위점막 손상 유발된 백서에서 위점막의 형태적 변화, 점액분포, 항염증효과(NF-kB, COX-2), 세포보호효과(HSP) 및 세포증식효과(PCNA)를 관찰하였다.

1. 일반적인 형태에서 점막에서 다발적으로 야기된 염증반응과 점막상피의 상해가 실험군이 대조군에 비해 감소하였다.
2. 염증관련 매개물질인 NF-kB, COX-2의 분포가 실험군이 대조군에 비해 감소하였다.
3. 스트레스에 대한 완충적 역할을 하여 세포를 보호하는 HSP 70 및 세포분열시 양성반응으로 나타나는 PCNA 발현이 실험군에서 증가하였다.

이상의 결과로 柴胡桂枝湯은 indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상을 완화시키는 효과가 있음이 확인되었다.

참고문헌

1. 이준행, 이용찬, 전성우, 김정옥, 이상우. 비스테로이드소염제 관련 소화성 궤양의 예방과 치료 가이드라인. 대한소화기학회지. 2009;54:309-17.
2. Miner J, Hoffhines A. The discovery of aspirin's antithrombotic effects. Tex Heart Inst J. 2007; 34:179-86.
3. Graham DY, Agrawal NM, Roth SH. Prevention of NSAID induced gastric ulcer with misoprostol: multicentre, doubleblind, placebo-controlled trial. Lancet. 1988;2:1277-80.
4. Graham DY, White RH, Moreland LW, Schubert TT, Katz R, Jaszewski R, et al. Duodenal and gastric ulcer prevention with misoprostol in arthritis patients taking NSAIDs. Misoprostol Study Group. Ann Intern Med. 1993;119:257-62.
5. Langman MJ, Weil J, Wainwright P, Lawson DH, Rawlins MD, Logan RF, et al. Risks of bleeding peptic ulcer associated with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs. Lancet. 1994;343:1075-8.
6. Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. Gastroenterology. 2000;119:521-35.
7. Adebayo D, Bjarnason I. Is non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID) enteropathy clinically more important than NSAID gastropathy? Postgrad Med J. 2006;82:186-91.
8. 전국한 의과대학 비계내과학교실. 비계내과학. 서울: 군자출판사; 2008, p. 333, 336-7.
9. 김상균, 김재규, 신성관, 김현수, 설상영. 소화성 궤양의 진단 가이드라인. 대한소화기학회지. 2009;54:279-84.

10. 大塚敬節 著. 박병희 譯. 임상응용상한론해설. 원주: 의방출판사; 2004, p. 246-7.
11. 최달영, 김준기, 염용하. 金匱要略 釋講. 서울: 동국대학교 출판부; 2004, p. 280.
12. 寺澤捷年 著. 조기호, 김영설 역. 증례로 배우는 동서의학. 서울: 군자출판사; 2005, p. 323-4.
13. 黃煌. 經方100首. 北京: 江蘇科學技術出版社; 2006, p. 117-20.
14. 백태현, 이해연. Indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대한 자음건비탕(滋陰健脾湯)의 효과. 대한한의학회지. 2004;25(3):111-22.
15. 박정한, 백태현, 박종형. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 평진탕(平陳湯)의 효과. 대한한의학회지. 2005;26(3):215-27.
16. 이슬희, 백태현. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 지실도체환(枳實導滯丸)과 Misoprostol의 효과 비교 연구. 대한한방내과학회지. 2008;29(4):939-49.
17. 강아미, 최은영, 김학재, 한이수, 임성우. Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위와 회장 점막 염증에 미치는 지유탕(地榆湯)의 효과. 대한한의학회지. 2007;28(2):224-40.
18. 이선희, 박경식, 하지용. 柴胡桂枝湯 CCl₄ 誘發된 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1996;10(2):92-102.
19. 김창중, 조승길, 최충식, 최윤석. 식물성생리활성물질(植物性生理活性物質)의 간보호작용(肝保護作用)(I) 한약처방(韓藥處方)의 간보호작용(肝保護作用). 한국생약학회. 1990;21(3):223-34.
20. 금동영, 금광호. 柴胡桂枝湯, 海金沙 및 鬱金이 膽石症 豫防效果에 미치는 影響. 경희한의대는 문집. 1989;12(1):365-77.
21. 村川裕二 著. 이용찬 譯. Steps to internal medicine 내과학: 소화기질환(6). 서울: 정담; 2008, p. 71, 80.
22. Wallace JL. How do NSAIDs cause ulcer disease? Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2000;14:147-59.
23. Tramèr MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. Quantitative estimation of rare adverse events which follow a biological progression: a new model applied to chronic NSAID use. Pain. 2000;85:169-82.
24. 大塚敬節 著. 朴盛洙 譯. 症候에 의한 漢方治療의 實際. 원주: 의방출판사; 2006, p. 475.
25. Kim JH, Kim YA, Yang SH. Activation of nuclear factor kappa B by inducers in gestational tissues at Term. Korean J Obstet Gynecol. 2003;46(9):1736-40.
26. Jeong IK, Song H. The effects of bee venom and melittin solution on PGE₂, COX-2, and NF-κB dependent luciferase activity in RAW 264.7 cells. 대한침구학회지. 2004;21(6):19-36.
27. Mitchell IA, Larkim S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. Biochem Pharmacol. 1995;50:1535-42.
28. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of elecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res. 1998;58:409-12.
29. Kim YS, Lee NR, Kim JS, Jung HC, Song IS, Kim CY. The pathophysiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy in rat. The Korean J of Gastroenterology. 2000;36(1):61-71.
30. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science. 1990;248:850-4.
31. Fukushima M, Sataka T, Tsuusui K, Arase K, Gomita Y, Asano C. Circadian pattern of stress response to affective cues of foot shock. Physiol Behav. 1981;27:915-20.
32. Koh Y, Lim CM, Kim MJ, Shim TS, Lee SD,

- Kim WS, et al. Heat shock response decrease endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Respirology*. 1999;4(4):325-30.
33. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology* 3th. E.Public Co.Ltd; 2007, p. 388.
34. Fairman MP. DNA polymerase δ /PCNA : actions and interactions. *J Cell Sci*. 1990;95 :1-4.