

Indomethacin으로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 二陳湯, 香砂二陳湯 및 內消散의 비교연구

박정한, 백태현

상지대학교 한의과대학 비계내과학교실

A Comparative Study of *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* Extracts on Indomethacin-induced Gastric Mucosal Lesions in Mice

Jung-han Park, Tai-hyeun Baik

Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Sang-Ji University

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to compare the effects of *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* extracts on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in mice.

Methods : Experimental mice were divided into six groups. The normal group had no gastro-inflammation. In the control group, gastro-inflammation was elicited by indomethacin. Misoprostol, *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* group were those in which misoprostol, *Eejin-tang* extract, *Hyangsaeejin-tang* extract and *Naeso-san* extract were administered after gastro-inflammation is elicited.

This study examined the anti-inflammation effects and distribution of mucus secreting cells, zonula occludin-1 (ZO-1), heat shock protein (HSP) 70, periodic acid-schiff reaction stain (PAS), peanut agglutinin (PNA), cyclooxygenase-1 (COX-1), 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) p65, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2).

Results :

1. The hemorrhagic erosion and damaged mucus secreting cell, the positive reaction HSP70 increased in the control group, but decreased in the *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* groups.

2. The positive reaction of ZO-1, PAS, PNA, COX-1 and BrdU decreased in the control group, but increased in the *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* groups.

3. The positive reaction of NF- κ B p65, iNOS and COX-2 increased in the control group, but decreased in the *Eejin-tang*, *Hyangsaeejin-tang* and *Naeso-san* groups.

Conclusions : Among the three extracts, the effects were in the order of *Naeso-san*, *Hyangsaeejin-tang* and *Eejin-tang* group, *Naeso-san* being the most effective.

Key words : *Eejin-tang* (*Erchen-tang*), *Hyangsaeejin-tang* (*Xiangshaerchen-tang*), *Naeso-san* (*Neixaio-san*), indomethacin, gastric mucosal lesions

· 교신저자: 백태현 강원도 원주시 우산동 283번지
상지대학교 부속한방병원 내과학교실
TEL: 033-741-9207
E-mail: white@sangji.ac.kr

· 본 논문은 2008년도 상지대학교 일반대학원 한의학 박사학위
논문임

1. 서론

위점막 손상(gastric mucosal lesion)이란 환경,
유전, 스트레스, 약물 등에 의해 위점막의 염증 및

궤양이 발생하는 것을 말하는데, 이는 손상 정도에 따라 점막근관을 침범하지 않는 염증성 손상인 미란(erosion)과 점막근관을 넘어 점막하조직 및 근육층까지 침범하는 국한된 조직의 손상인 궤양(ulcer)으로 나눌 수 있으며 일반적으로 미란이 심해지면 궤양이 발생하는 것으로 넓은 의미의 궤양이라고 볼 수 있다^{1,2}. 소화성 궤양은 과식, 식생활습관의 불규칙, 자극적인 음식과 부패된 음식물 섭취 등의 음식실조와 과음, 흡연, 항암제의 사용, 심한 화상이나 수술, 스트레스, 비스테로이드성 항염증성 약물의 장기 복용 등으로 나타나는 소화관 점막의 염증으로부터 유발되며, 위점막을 손상시키는 공격인자와 위점막을 보호하는 방어인자와의 불균형에 의해 궤양이 발생하는 것으로 알려져 있다^{1,2}.

소화성 궤양의 임상증상으로는 상복부의 동통과 속쓰림, 신트림, 팽만감, 오심, 구토, 토혈, 흑변, 혹은 식욕감퇴, 체중감소 등이 나타나는데^{1,2}, 한의학적으로는 대표적으로 胃脘痛의 질병범주에 속하며 胃痛, 心下痛, 吐酸, 痞滿, 嘈雜, 噯氣, 惡心, 嘔吐, 吐血, 便血 등의 病證과 유사하다³⁻⁵. 대부분 飲食傷으로 인해 발생되며 일반적으로 虛證, 虛中挾實證, 實證으로 분류하는데 虛證에는 補中益氣, 益氣健脾 시키는 補法, 虛中挾實證에는 溫中化痰 消導健脾 등의 扶正祛邪法, 實證에는 行氣祛濕, 消導破積 같은 祛邪法으로 치료한다. 그 중에서 祛邪法은 음식상의 輕重에 따라 祛濕, 祛痰, 行氣 或 降氣, 消導, 消積 및 瀉下 등의 순으로 단독 혹은 병행하여 치료법을 적용하고 이에 따른 다양한 처방이 활용된다^{6,7}.

二陳湯은 脾胃의 기능이 健運하지 못하여 생긴 痰飲으로 인한 일반적인 소화기질환에 응용되는 通治方이며^{8,9}, 香砂二陳湯은 二陳湯에 藿香, 砂仁을 가한 처방으로 二陳湯의 去痰 效能에 行氣效果가 추가된 처방이며^{8,9}, 內消散은 香砂二陳湯이 가지고 있는 去痰行氣 效果에 消導·消積 效果를 추가한 처방으로^{8,11} 實證으로 인한 음식상에 활용될 수 있는 대부분의 治法을 갖춘 처방이다. 二陳湯의 위산분비 억제 및 항궤양 효과에 대한 보고¹²와 內消散의

위궤양에 미치는 영향에 대한 연구보고¹³ 있었으나 二陳湯 및 二陳湯 關聯方⁹ 중에서 소화기질환의 치료법으로 많이 활용되는 ‘去痰’ ‘去痰 行氣’ ‘去痰 行氣 및 消導 消積’ 등의 처방 변화에 따른 처방 간 소화성 궤양의 치료효과에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 痰飲의 치료효과를 기본적으로 포함하고 있는 二陳湯, 香砂二陳湯 및 內消散의 효능을 비교연구하고자 실험용 생쥐에 indomethacin을 이용하여 위점막 손상을 유발시킨 후 각 처방의 농축전당액을 각각 투여하여 위점막의 형태학적 변화, 위점막 손상 변화[zonula occludin-1(ZO-1), heat shock protein(HSP) 70], 위점막 방어장벽의 변화[periodic acid-schiff reaction stain(PAS), peanut agglutinin(PNA), cyclooxygenase-1(COX-1), 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)], 위점막내 항염증효과[nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB) p65, inducible nitric oxide synthase(iNOS) and cyclooxygenase-2(COX-2)]와 *in vitro*에서의 항염증효과(iNOS mRNA, COX-2 mRNA) 등을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재 료

1) 실험동물

대한실험동물센터에서 분양 받은 대령 4주된 ICR 계 수컷 생쥐를 무균 사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 30 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 정상군(이하 NOR군), indomethacin 처리로 위점막 손상 유발군(이하 CON군), 위점막 손상유발 후 Misoprostol 투여군(이하 MA군), 위점막 손상유발 후 二陳湯 투여군(이하 EA군), 위점막 손상유발 후 香砂二陳湯 투여군(이하 HA군) 그리고 위점막 손상유발 후 內消散 투여군(이하 NA군)으로 나누었으며, 각 군당 10마리를 배정하였다.

2) 약 물

본 실험에 사용한 한약재는 《方藥合編》¹⁴에 수록된 二陳湯, 內消散과 《御纂醫宗金鑑》¹¹에 수록된 香砂二陳湯의 처방에 따른 구성약물로서, 시중에서

엄선된 약재만을 구입하여 실험에 사용하였으며 처방의 내용과 1첩의 분량은 다음과 같다(Table 1, 2, 3).

Table 1. The Amount and Composition of *Eejin-tang* Extract.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
<i>Pinelliae Rhizoma</i> (半夏)	<i>Pinellia ternata</i>	8.0
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	<i>Citrus unshiu</i>	4.0
<i>Hoelen</i> (赤茯苓)	<i>Poria cocos</i>	4.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	2.0
<i>Zingibers Rhizoma</i> (生薑)	<i>Zingiber officinale</i>	4.0
Total amount		22.0

Table 2. The Amount and Composition of *Hyangsaejin-tang* Extract.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
<i>Pinelliae Rhizoma</i> (半夏)	<i>Pinellia ternata</i>	8.0
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	<i>Citrus unshiu</i>	4.0
<i>Hoelen</i> (赤茯苓)	<i>Poria cocos</i>	4.0
<i>Glycyrrhizae Radix</i> (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	2.0
<i>Zingibers Rhizoma</i> (生薑)	<i>Zingiber officinale</i>	4.0
<i>Pogostemonis Herba</i> (藿香)	<i>Agastache rugosa</i>	4.0
<i>Amomi Semen</i> (砂仁)	<i>Amomum villosum</i>	4.0
Total amount		30.0

Table 3. The Amount and Composition of *Naeso-san* Extract.

Herbal name	Scientific name	Dosage (g)
<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i> (陳皮)	<i>Pinellia ternata</i>	4.0
<i>Pinelliae Rhizoma</i> (半夏)	<i>Citrus unshiu</i>	4.0
<i>Hoelen</i> (白茯苓)	<i>Poria cocos</i>	4.0
<i>Poneiri Fructus</i> (枳實)	<i>Poncirus trifoliata</i>	4.0
<i>Crataegi Fructus</i> (山楂)	<i>Crataegus pinnatifida</i>	4.0
<i>Massa Medicata Fermentata</i> (神曲)	<i>Triticum aestivum</i> L.	4.0
<i>Amomi Semen</i> (砂仁)	<i>Amomum villosum</i>	4.0
<i>Cyperi Rhizoma</i> (香附子)	<i>Cyperus rotundus</i>	4.0
<i>Scirpi Tuber</i> (三稜)	<i>Sparganium stoloniferum</i>	4.0
<i>Zedoariae Rhizoma</i> (蓬朮)	<i>Curcuma zedoaria</i>	4.0
<i>Zingiberis Rhizoma</i> (乾薑)	<i>Zingiber officinale</i>	4.0
Total amount		44.0

2. 方法

1) 위점막 손상 유발

위점막 손상을 유발하기 위해서 indomethacin (Sigma, USA)을 0.9% NaCl이 포함된 용액에 희석시킨 후 10 mg/kg을 CON군, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에 5일 동안 경구투여 하였다.

2) Misoprostol의 투여

위점막 손상유발 후 MA군에 Misoprostol(Cytotec, Searle Korea)을 생리식염수에 희석시킨 다음 40 µg/kg 씩 5일 동안 경구투여 하였다.

3) 약물의 제조 및 투여

二陳湯, 香砂二陳湯 그리고 內消散 각 2첩을 증류수 500 ml에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여과액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압농축하여 동물실험에 사용하였다. 한편 in vitro 실험에 사용된 추출물은 감압농축 후 동결 건조(二陳湯, 수득률 7.4%; 香砂二陳湯, 수득률 9%; 內消散, 수득률 10%)하여 사용하였고, MTT assay 결과 한약재 추출물 10 mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 1.0과 2.0 mg/ml를 첨가량으로 결정하였다. 한편 EA군에는 二陳湯 추출액을, HA군에는 香砂二陳湯 추출액을, NA군에는 內消散 추출액을 각각 성인 60 kg기준 용량의 3배인 2.5 ml/kg 량으로 1일 1회, 5일 동안 경구투여 하였다.

4) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Weljin, Korea)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 phosphate buffered saline(PBS)으로 씻어주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는

2일마다 교환하여 주었다.

5) 위점막의 출혈성 미란 유발

위점막 손상 유발 후 일어난 출혈성 미란의 유발 정도를 측정하기 위해 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석을 실시하였다. 적출된 위의 날문과 몸통부위를 씻은 후 x4 배율로 촬영한 후 Binary Morphology에서 invert 기능을 선택하여, 출혈성 잘과 지역을 intensity 180-200으로 전환시킨 다음, 영상분석을 통해 pixel의 분포 수를 측정하였다.

6) 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 연결부위를 적출하여 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포맷한 후 5 µm 두께의 연속 절편을 제작하였다. 위 점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편 Semi-thin 절편 제작은 절취된 위장 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선고정한 후 1% OsO₄ 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포맷하였다. ultramicrotome(LKB, Nova)으로 990 nm 두께로 절편을 만들어 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 위점막 손상의 변화 관찰

(1) 점액분비세포의 폐쇄이음 단백질 변화 관찰

Intestinal permeability는 폐쇄이음 손실과 연관되는데, 폐쇄이음 단백질의 하나인 zonula occludin(ZO)-1 분포 변화 관찰을 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 µg/ml, DAKO, DEN)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum(Vector Lab, USA)에 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti ZO-1(1:20, Santa Cruz Biotech,

USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:100, Santa Cruz Biotech)에 4 °C humidified chamber에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex(ABC) kit(Vector Lab)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma, USA)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

(2) HSP70 변화 관찰

점막 손상 스트레스를 조사하기 위해 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화를 rabbit anti mouse HSP70(1:100, Santa Cruz Biotech)을 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

8) 위점막 보호장벽의 변화 관찰

(1) 점액분비세포의 분포변화 관찰

위산에 의한 자가분해(autolysis) 방벽작용을 하는 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 점액분비세포의 변화를 조사하기 위해서 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 대조염색하여 관찰하였다.

(2) 점액분비세포내 골지체의 분포변화 관찰

점액분비세포내 골지체에 대한 양성반응을 보이는 peanut agglutinin(PNA)의 분포 변화를 조사하기 위해 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 조직을 실온에서 1% bovine serum albumin(BSA, Sigma)에 1시간 동안 blocking한 다음 1:100으로 희석한 biotinylated anti PNA(Sigma, USA)에 4 °C incubation chamber내에서 24시간 동안 반응시켰다. 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다(Table 4).

Table 4. Sugar Specificities and Inhibitory Carbohydrate of Peanut Agglutinin (PNA).

Lectin	Optimum dilution	Sugar specificity
PNA	10 µg/ml	galactosyl-β-1,3-N-acetylgalactosamine

(3) 점막내 COX-1 분포변화 관찰

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase (COX)-1의 점막고유층내에서 분포 변화를 mouse anti-mouse COX-1(1:250, Chyman, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다.

(4) 점액분비세포 분열의 변화 관찰

점막상피의 손상세포 교체를 통한 점막회복에 관여하는 점막상피세포의 세포증식 변화를 조사하기 위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 위 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU, Sigma) 50 mg/kg을 복강주사 하였다. 얻어진 연속절편은 4 °C와 37 °C의 2N HCl 용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1 M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO)가 포함된 normal goat serum에 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:20, Amersham, UK)에 4 °C incubation chamber내에서 72시간 반응시켰고 이후 과정은 위에 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다.

9) 항염증 변화에 대한 관찰

(1) *In vitro* 실험을 통한 항염증효과 관찰

二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散이 염증효소인 induce nitric oxide synthase(iNOS) mRNA과 cyclooxygenase (COX)-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages - 5×10⁵ cells/well을

6 well에 plating 하고 12시간 후에 lipopolysaccharide (1 µg/ml, Sigma)를 2시간 처리하여 NF-κB 활성을 유도한 후 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散 추출물 1.0 mg/ml과 2.0 mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer (Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR

kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 iNOS primer와 COX-2 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 5). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

Table 5. The Primer of iNOS, COX-2 and β-actin mRNA.

Primer	Primer sequences		Product (bp)	No. of cycles
iNOS	sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense	5'-AGAAGTGGAGGGTACATGCTGGAGCC-3'		
COX-2	sense	5'-TCTCCAACCTCTCCTACTAC-3'	624	35
	antisense	5'-GCACGTAGTCTTCGTTCACT-3'		
β-actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

iNOS : inducible nitric oxide synthase, COX-2 : cyclooxygenase-2

(2) *In Vivo* 실험을 통한 위점막내 항염증효과 관찰

염증유발유전자의 전사인자 nuclear factor(NF)-κB, 염증효소 iNOS와 COX-2의 변화를 조사하기 위해 mouse anti-NF-κB p65(1:500, Santa Cruz Biotech), mouse anti-iNOS(1:100, Santa Cruz Biotech), rabbit anti-mouse COX-2(1:250, Chyman)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

10) 영상분석과 통계처리

mRNA 발현의 relative intensity, 출혈성 찰과의 분포, 조직화학 그리고 면역조직화학 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2를 이용한 영상분석을 실시하였다. 본 실험의 결과 통계처리는 SPSS 8.0을 통한 ANOVA test를 실시하였고 Duncan test로 사후 분석을 시행하였으며 $p < 0.05$ 일 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 실험결과

1. 위점막 손상 변화

1) 위점막 표면의 변화

CON군에서는 몸통과 날문유문연접 부위에서 심각한 출혈성 찰과가 관찰되었는데, 전체 면적에 24% 해당하는 24,343±374/100,000 pixel로 측정되었다. CON군에 비해 MA, EA, HA 및 NA군에서 모두 유의성 있는 감소를 보였는데 MA군은 CON군에 비해 64% 감소한 8,766±37/100,000 pixel로, EA군은 MA군에 비해 46% 감소한 4,735±32/100,000 pixel로, HA군은 EA군에 비해 50% 감소한 2,355±38/100,000 pixel로 그리고 NA군은 HA군에 비해 43% 감소한 1,347±42/100,000 pixel로 측정되었다(Fig. 1). NA군에서는 출혈성 찰과가 거의 관찰되지 않았다. HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 감소경향을 보였다.

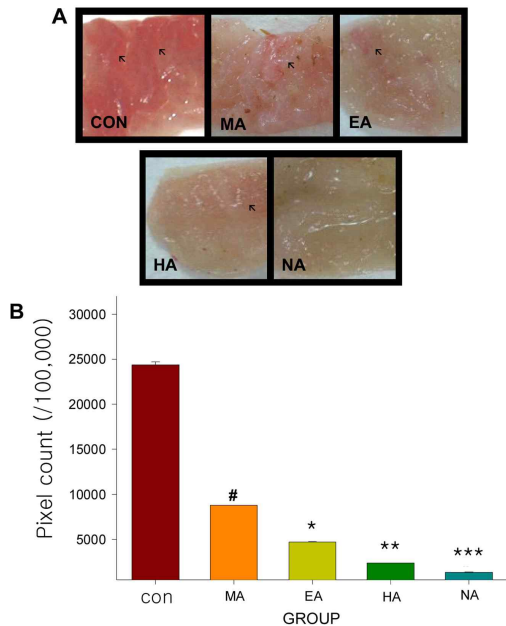


Fig. 1. The inhibition of hemorrhagic erosion in MA, EA, HA and NA group after gastropathy elicitation.

A : External morphology (x 4)
 B : Image analysis of hemorrhagic erosion
 CON : gastropathy elicited group, MA : Misoprostol treated mice after gastropathy elicitation, EA : *Eejin-tang* treated mice after gastropathy elicitation, HA : *Hyangsaeejin-tang* treated mice after gastropathy elicitation, NA : *Naeso-san* treated mice after gastropathy elicitation, Arrow : hemorrhagic erosion
 # : $p < 0.05$ compared with CON, * : $p < 0.05$ compared with MA, ** : $p < 0.05$ compared with EA, *** : $p < 0.05$ compared with HA

2) 위점막의 현미경적 형태 변화

CON군의 위 점막에서는 심각한 출혈성 찰과(hemorrhagic erosion)로 인한 점액분비세포의 배열 유실이 관찰되었다. 많은 수의 벽세포(parietal cell)와 주세포(chief cell)의 유실도 관찰되었다. MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 점막 손상이 적었다. 특히 NA군은 NOR군과 유사

한 점액분비세포의 배열을 유지하였다(Fig. 2-A).

한편 CON군의 점막손상부위에서 연결복합체 소실과 세포소기관의 손상과 공포화된 점액분비세포가 다수 관찰되었다. MA군, EA군, HA군 그리고 NA군은 CON군에 비해 손상 점액분비세포의 분포가 적었다. 특히 NA군에서의 표면상피세포의 연결복합체는 유지되었고, 자유면쪽 세포질에서 점액원과립이 관찰되었다(Fig. 2-B).

3) 점액분비세포의 폐쇄이음 단백질 변화

NOR군에서 ZO-1 양성반응은 점액분비세포 이음복합체의 상층부인 폐쇄이음 부위 세포막에서 잘 관찰되었다. 점액분비세포 이음복합체가 심하게 손상 받은 CON군에서는 ZO-1 양성반응이 NOR군에 비해 84% 감소하였다. 한편 점액분비세포 이음복합체가 회복된 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군 모두에서 CON군에 비해 ZO-1 양성반응이 증가하였는데, MA군은 CON군에 비해 13%, EA군은 MA군에 비해 6%, HA군은 EA군에 비해 56%, NA군은 HA군에 비해 56% 증가하였다(Fig. 2-C, Table 6). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 증가경향을 보였다.

4) HSP70의 변화

위점막 손상 유발 후 스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70 분포는 점막고유층에 증가하였으며 핵과 주변세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었다. 이러한 분포 증가는 NOR군에 비해 CON군에서 488% 증가하였다. 이에 반해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군은 CON군에 비해 HSP70 양성반응이 모두 유의성 있게 감소된 것으로 관찰되었는데, MA군은 CON군에 비해 20%, EA군은 MA군에 비해 41%, HA군은 EA군에 비해 9%, NA군은 HA군에 비해 1% 감소하였다(Fig. 2-D, Table 6). HA군과 NA군은 EA군에 비해 유의성 있는 감소 경향을 보였다.

Table 6. The Image Analysis of Gastropathy Evoked ZO-1 Destruction and HSP70 Increase.

Objective	Group					
	NOR	CON	MA	EA	HA	NA
ZO-1	1559±27	250±10	282±11 [#]	300±10 [#]	467±7 ^{**}	729±6 ^{***}
HSP70	266±7	1563±26	1252±22 [#]	742±9 [*]	674±11 ^{**}	667±9 ^{**}

ZO-1 : zonula occludin-1, HSP70 : heat shock protein 70, NOR : No-treated mice, CON : gastropathy elicited group, MA : Misoprostrol treated mice after gastropathy elicitation, EA : *Eejin-tang* treated mice after gastropathy elicitation, HA : *Hyangsaeejin-tang* treated mice after gastropathy elicitation, NA : *Naeso-san* treated mice after gastropathy elicitation
[#] : $p < 0.05$ compared with CON, ^{*} : $p < 0.05$ compared with MA, ^{**} : $p < 0.05$ compared with EA, ^{***} : $p < 0.05$ compared with HA

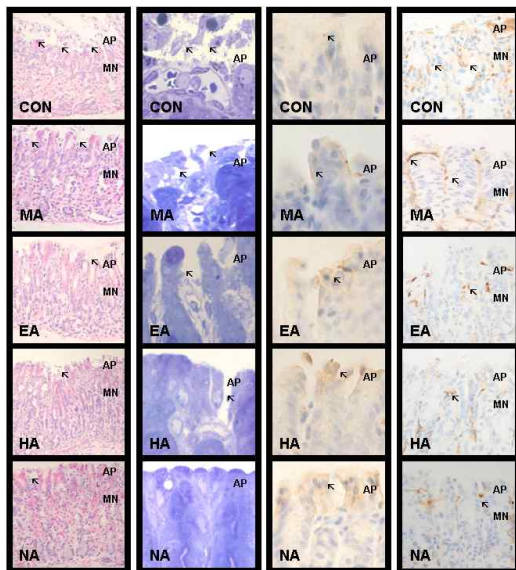


Fig. 2. Mitigative effects of gastropathy in MA, EA, HA and NA group.

A : The mucosal damages (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased (H&E, x 200)
 B : The destruction of mucose secreting cell (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased (semi-thin, x 1000)
 C : The ZO-1 positive reaction (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably increased than gastropathy elicited mice (ZO-1 immunohistochemistry, x 400).
 D : The HSP70 positive reaction (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased than gastropathy elicited mice (HSP70 immunohistochemistry, x 400).
 ZO : zonula occludin-1, HSP70 : heat shock protein 70, AP : apical surface of mucosa, MN : mucosal neck, Others Abbreviation same as Fig. 1

2. 위점막 방어장벽 변화

1) 중성점액세포의 분포 변화

CON군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 PAS 양성반응을 보이는 표면점액세포와 목점액세포가 NOR군에 비해 75% 감소하였는데, 이에 반해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 PAS 양성반응이 모두 유의성 있게 증가된 양상으로 관찰되었다. MA군은 CON군에 비해 28%, EA군은 MA군에 비해 48%, HA군은 EA군에 비해 18%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 50% 증가하였다. NA군에서는 중성점액을 분비하는 PAS 양성 반응 표면점액세포의 분포가 점막 상층 표면(apical surface)에서 위오목(gastric pit)까지 확장된 것으로 관찰되었다(Fig. 3-A, Table 7). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 증가 경향을 보였다.

2) 점액분비세포내 골지복합체의 분포 변화

표면점액세포내 골지복합체와 세포첨단부(apical surface)에서 강한 양성을 보이는 PNA 분포는 CON군에서 99% 감소하였다. 이에 반해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 PNA 양성 반응이 모두 유의성 있게 증가된 양상으로 관찰되었는데, MA군은 CON군에 비해 825%, EA군은 MA군에 비해 64%, HA군은 EA군에 비해 182%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 24% 증가하였다(Fig. 3-B, Table 7). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 증가 경향을 보였다.

3) 점막내 COX-1 분포 변화

NOR군의 점막고유층내 COX-1 양성반응은 세포질에서 강하게 나타났으며, 양성반응세포는 주로 점막 상단부에서 다수 관찰되었다. 이러한 COX-1

양성반응은 CON군에서 92% 감소하였다. 이에 반해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 COX-1 양성반응이 모두 유의성 있게 증가된 양상으로 관찰되었는데, MA군은 CON군에 비해 111%, EA군은 MA군에 비해 4%, HA군은 EA군에 비해 296%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 13% 증가하였다(Fig. 3-C, Table 7). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 증가경향을 보였다.

4) 점액분비세포 분열의 변화

NOR군에서 관찰된 세포분열중인 세포의 BrdU 양성반응은 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성

을 보였으며, 주된 분포지역의 위 오목(gastric pit)의 점액목(mucosal neck) 주변이었다. 위 점막 손상 유발 후 BrdU 양성반응세포의 분포가 감소하였는데, NOR군에 비해 CON군에서 96% 감소하였다. 이에 반해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 BrdU 양성반응이 모두 유의성 있게 증가된 양상으로 관찰되었는데, MA군은 CON군에 비해 1070%, EA군은 MA군에 비해 16%, HA군은 EA군에 비해 36%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 17% 증가하였다(Fig. 3-D, Table 7). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 증가경향을 보였다.

Table 7. The Image Analysis of Gastropathy Evoked Mucosal Barrier Damages.

Objective	Group					
	NOR	CON	MA	EA	HA	NA
PAS	7802±83	1975±29	2534±27 [#]	3749±62 [*]	4441±95 ^{**}	6642±85 ^{***}
PNA	1996±43	28±1	259±8 [#]	426±10 [*]	1201±47 ^{**}	1485±54 ^{***}
COX-1	3409±70	283±8	597±11 [#]	619±11 [#]	2450±26 ^{**}	2780±23 ^{***}
BrdU	2007±13	76±2	889±13 [#]	1031±27 [*]	1399±16 ^{**}	1633±33 ^{***}

PAS : periodic acid-schiff reaction stain. PNA : peanut agglutinin. COX-1 : cyclooxygenase-1. BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine. Others Abbreviation same as Table 6

: $p < 0.05$ compared with CON, * : $p < 0.05$ compared with MA, ** : $p < 0.05$ compared with EA, *** : $p < 0.05$ compared with HA

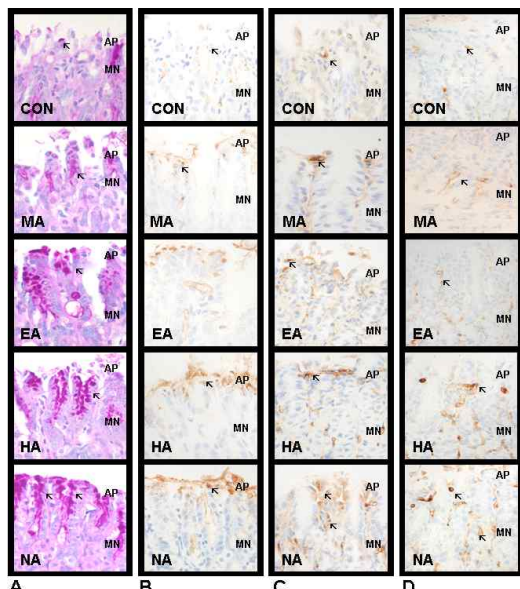


Fig. 3. The repair of damaged mucosal barrier in

MA, EA, HA and NA group.

A : The PAS positive reaction (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably repaired (PAS, x 400)

B : The PNA positive Golgi complex (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably increased (PNA immunohistochemistry, x 400)

C : The COX-1 positive cell (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably increased (COX-1 immunohistochemistry, x 400)

D : The BrdU positive cell (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably increased (BrdU immunohistochemistry, x 400)

Others Abbreviation same as Table 7

3. 항염증능 변화

1) *In vitro* 실험을 통한 항염증효과

(1) iNOS mRNA 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한

iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 二陳湯 추출물 처리 후 iNOS mRNA 발현량은 1.0 mg/ml에서 7%, 2.0 mg/ml에서 13%, 香砂二陳湯 추출물 처리 후 1.0 mg/ml에서 2%, 2.0 mg/ml에서 19%, 內消散 추출물 처리 후 1.0 mg/ml에서 1%, 2.0 mg/ml에서 25% 감소하였다 (Fig. 4).

(2) COX-2 mRNA 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 COX-2 mRNA 발현은 증가하였는데, 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散 추출물 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 二陳湯 추출물 처리 후 COX-2 mRNA 발현량은 1.0 mg/ml에서 7%, 2.0 mg/ml에서 14%, 香砂二陳湯 추출물 처리 후 1.0 mg/ml에서 9%, 2.0 mg/ml에서 12%, 內消散 추출물 처리 후 1.0 mg/ml에서 1%, 2.0 mg/ml에서 50% 감소하였다 (Fig. 4).

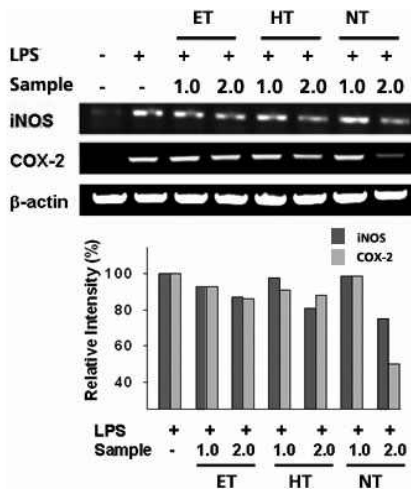


Fig. 4. *In vitro* test for anti-inflammation effects of ET, HT and NT.

The RAW 264.7 macrophages were treated with LPS for 2 hours prior to the addition of indicated concentrations (1.0 and 2.0 mg/ml) of ET, HT and NT, then the cells were further incubated for 24 hours. The LPS-induced iNOS and COX-2

mRNA expression were dose-dependantly decreased in ET, HT and NT treated RAW 264.7 macrophages. LPS : lipopolysaccharide, iNOS : induce Nitric oxide synthase, COX-2 : cyclooxygenase-2, ET : *Eejin-tang* extract, HT : *Hyangsaejin-tang* extract, NT : *Naeso-san* extract

2) *In Vivo* 실험을 통한 위점막내 항염증효과

(1) NF-κB 활성화 억제

염증효소생성에 관여하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서 모두 유의성 있게 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 NOR군에 비해 648% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 12%, EA군은 MA군에 비해 10%, HA군은 EA군에 비해 49%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 31% 감소하였다 (Fig. 5-A, Table 8).

HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 감소경향을 보였다.

(2) iNOS 생성 억제

염증효소 iNOS 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서 모두 유의성 있게 감소하였다. 이런 iNOS 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 NOR군에 비해 99% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 33%, EA군은 MA군에 비해 12%, HA군은 EA군에 비해 49%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 40% 감소하였다 (Fig. 5-B, Table 8). HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 감소경향을 보였다.

(3) COX-2 생성 억제

염증효소 COX-2 양성반응세포의 분포는 CON군에서는 증가하는 반면 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서 모두 유의성 있게 감소하였다. 이런

COX-2 양성반응세포는 점막 상층의 점막고유층에 분포하였고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. COX-2 양성반응의 영상분석 결과 CON군은 NOR 군에 비해 1613% 증가하였지만, MA군은 CON군에 비해 43%, EA군은 MA군에 비해 23%, HA군은 EA

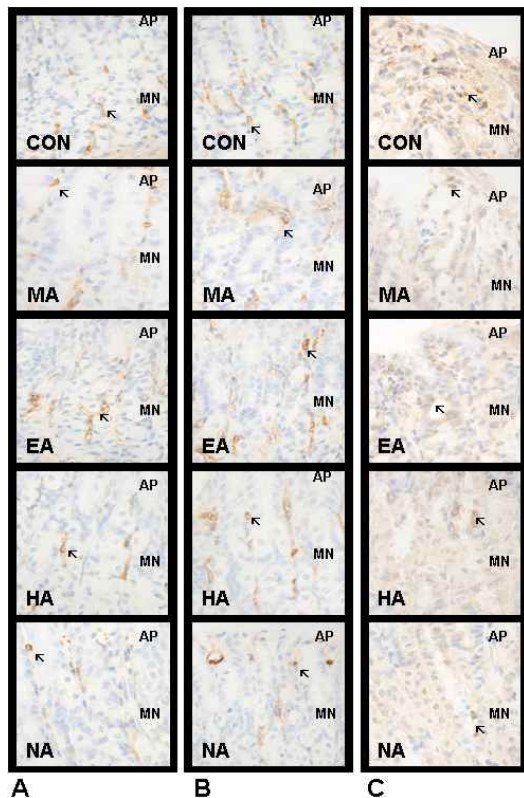
군에 비해 63%, 그리고 NA군에서는 HA군에 비해 48% 감소하였다(Fig. 5-C, Table 8). HA군은 EA 군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 감소경향을 보였다.

Table 8. The Image Analysis of Gastropathy Evoked Inflammation Mediated Substance.

Objective	Group					
	NOR	CON	MA	EA	HA	NA
NF-κB p65	133±6	995±11	873±16#	782±10*	397±13**	273±8***
iNOS	172±5	1894±26	1263±18#	1114±28*	571±9**	344±9***
COX-2	149±9	2553±35	1448±25#	1118±17*	414±12**	217±8***

NF-κB p65 : Nuclear Factor-κB p65, iNOS : inducible nitric oxide synthase, COX-2 : cyclooxygenase-2, Others Abbreviation same as Table 6

: $p < 0.05$ compared with CON, * : $p < 0.05$ compared with MA, ** : $p < 0.05$ compared with EA, *** : $p < 0.05$ compared with HA



A : The NF-κB p65 positive reaction (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased (NF-κB p65 immunohistochemistry, x 400)
 B : The distribution of iNOS positive cell (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased (iNOS immunohistochemistry, x 400)
 C : The distribution of COX-2 positive cell (arrow) in MA, EA, HA and NA group noticeably decreased (COX-2 immunohistochemistry, x 400)
 Others Abbreviation same as Table 8

IV. 고찰

위점막 손상은 점막을 보호하는 방어인자와 점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형이 깨어져서 발생하는 것으로, 손상 정도에 따라 점막근판을 침범하지 않는 미란(erosion)과 점막근판을 넘어 점막하조직 및 근육층까지 침범되며 심한 경우 장막층까지 침범하여 천공을 일으키는 궤양(ulcer)으로 나눌 수 있는데, 일반적으로 염증성 손상인 미란이 심해지면 궤양이 발생하는 것으로 넓은 의미의 궤양이라고 볼 수 있다^{1,2}.

소화성 궤양의 발생원인으로는 여러 가지 원인으로 인하여 점막방어 체계가 파괴되어 공격인자가

Fig. 5. The inhibition of inflammation by MA, EA, HA and NA group.

상대적으로 우위에 있을 때 궤양이 발생한다는 Shay의 원인설이 가장 타당한 것으로 알려지고 있다^{1,2}.

소화성 궤양의 유발 요인으로는 과식, 식생활습관의 불규칙, 자극적인 음식과 부패된 음식물 섭취 등의 음식실조와 과음, 흡연, 정신적 스트레스, 약물의 오남용, 두개강내 출혈 등의 중추신경계 질환이나 화상, 심한 감염증, 심근경색, 수술, shock 등이 있으며 최근에는 Helicobacter pylori의 감염과 aspirin 등의 비스테로이드성 항염증성 약물(NSAID)의 장기복용을 가장 많은 유발 요인으로 보고 있다³.

임상적인 증후에 따라 한의학적으로는 胃脘痛, 胃痛, 心下痛, 吐酸, 痞滿, 嘈雜, 噯氣, 惡心, 嘔吐, 便血 등의 病證과 유사하며 이러한 질병범주에 속하는 소화기 염증 및 궤양은 飲食傷이 가장 큰 요인이다^{4,5}.

飲食傷은 일반적으로 虛證, 虛中挾實證, 實證으로 분류하는데 虛證에는 補中益氣 益氣健脾 시키는 補法, 虛中挾實證에는 溫中化痰 消導健脾 등의 扶正祛邪法, 實證에는 行氣祛濕, 消導破積 같은 祛邪法으로 치료한다. 그 중에서 祛邪法은 음식상의 輕重에 따라 祛濕, 祛痰, 行氣, 或 降氣, 消導, 消積 및 瀉下 등의 순으로 단독 혹은 병행하여 치료법을 적용하고 이에 따른 다양한 처방이 활용 된다^{6,7}.

二陳湯은 宋代 陳師文的 《太平惠民和劑局方》¹⁵에 최초로 수록된 처방으로 燥濕化痰, 理氣和中하는 효능이 있어, 濕痰으로 인한 脾胃의 기능장애뿐만 아니라 痰飲이 변하여 百病이 된 것의 新舊를 막론하고 치료하는 처방이다⁸. 半夏 陳皮 赤茯苓 甘草 生薑으로 구성되는데, 처방 중에 半夏는 燥濕化痰, 陳皮는 理氣化痰, 茯苓은 健脾滲濕하여 痰의 생성을 방지하고, 甘草는 緩和補脾, 生薑은 降逆化痰한다⁸.

香砂二陳湯은 《御纂醫宗金鑑》¹¹에 처음 수록된 처방으로 二陳湯에 藿香 砂仁을 加하여 行氣消導의 효능이 강화된 처방으로 痰飲으로 인한 嘔吐, 眩暈등에 사용하는 처방이다⁸.

內消散은 明代 龔延賢의 《萬病回春》¹⁶에 처음

수록된 처방으로 半夏 陳皮 茯苓 枳實 香附子 山查 神曲 砂仁 三稜 蓬朮 乾薑으로 구성되어 있으며, 二陳湯의 약물인 半夏 陳皮 茯苓으로 燥濕化痰, 枳實 香附子 砂仁은 通氣行滯, 山查 神曲은 消導消食, 三稜 蓬朮은 破積, 乾薑은 溫中行氣하여 食慾不振, 消化不良, 腹痛 등에 많이 활용되며 實證의 증상이 심할 때 사용할 수 있다⁶.

위점막 손상의 예방 및 치료에 관한 최근의 실험적 연구에 있어서 虛證, 虛中挾實, 實證에 대한 많은 연구가 있었다. 實證 처방에 대한 연구에 있어서 최¹²는 二陳湯이 위산분비 억제효과 및 항궤양효과가 있음을, 홍¹³은 內消散이 위액분비 및 위궤양에 치료효과가 있음을, 백¹⁷은 平胃分消飲이 위점막 손상에 치료효과가 있음을 보고하였으나, 아직까지 痰飲 行氣 消導 破積하는 처방간의 비교연구는 없었다.

이에 저자는 二陳湯, 香砂二陳湯 및 內消散의 위점막 손상에 대한 치료효과를 비교연구하기 위하여 생쥐의 위점막 손상약물로 위점막 손상 유발시 안정적이고 편차를 줄일 수 있는 장점이 있어 최근 많이 활용되고 있는 indomethacin¹⁸을 사용하였고, 비교약물로는 prostaglandin 합성제제로 공격인자와 방어인자에 모두 관여하여 위점막 손상을 보호함으로써 소화성 궤양의 치료나 예방에 효과가 있어 최근에 aspirin과 같은 비스테로이드성 소염제 투여시 소화성 궤양의 예방목적으로 함께 활용하고 있는 Misoprostol¹⁹을 실험재료로 사용하였다. 실험용 생쥐를 정상군(NOR군), Indomethacin을 경구 투여하여 인위적으로 위점막 손상을 유발한 군(CON군), 위점막 손상 유발 후 Misoprostol 투여군(MA군), 위점막 손상 유발 후 二陳湯 투여군(EA군), 위점막 손상 유발 후 香砂二陳湯 투여군(HA군), 위점막 손상 유발 후 內消散 투여군(NA군)의 6군으로 나누어 각각 10마리씩 배정하였고, 위점막의 형태학적 변화, 위점막 손상 변화(ZO-1, HSP70), 위점막 방어장벽의 변화(PSA, PNA, COX-1, BrdU), 위점막내 항염증효과(NF-κB p65, iNOS,

COX-2)와 *In Vitro* 에서의 항염증효과(iNOS mRNA, COX-2 mRNA) 등을 관찰하였다.

본 실험에서는 indomethacin에 의해 점막 보호장벽의 손상과 그에 따른 출혈성 찰과의 증가, 점액분비세포의 감소 등의 위점막 손상이 관찰되었다. 위점막 표면의 변화에 있어서 CON군에서는 몸통과 날문유문연접 부위에서 심각한 출혈성 찰과가 관찰되었는데, 이에 비해 MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서 모두 출혈성 찰과가 감소되었다. HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있는 감소경향을 보였다. 또한 CON군의 위점막에서는 심각한 출혈성 찰과로 인한 점액분비세포의 배열유실이 관찰되었는데, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 모두 점막 손상이 적었으며 특히 NA군은 NOR군과 유사한 점액분비세포의 배열을 유지하였다.

폐쇄이음 단백질의 하나인 ZO-1 분포 감소는 점액상피세포사이에서 있는 이음 복합체의 가장 꼭대기 부분에 존재하는 폐쇄띠(zonula occludens)의 손상에 의한 것이다. 폐쇄띠의 손상에 따른 intestinal permeability의 증가는 장내 염증반응을 유도하여 궤양을 일으킨다²⁰. CON군에서는 ZO-1 양성반응이 NOR군에 비해 크게 감소했으며, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 모두 양성반응이 증가된 것으로 관찰되어 위점막 손상이 적었음을 알 수 있었다.

점막손상은 외부로부터 가해지는 여러 가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위한 스트레스 단백질의 합성 증가를 유도하며, 열 충격 단백질(HSP)군이 대량 합성된다²¹. 특히 HSP 70은 72,000 mol의 질량을 가지고 있으며 HSP72, 73, glucose regulated protein(GRP)75, 78 등이 이 단백질 군에 속하며 대부분의 생물체에서 발견되는 스트레스 저항 단백질로서, 허혈, 열, 저혈당, 바이러스 감염, 경련, 중금속 오염 등 다양한 형태의 스트레스 상황에서 농도가 증가한다²². 이와 같이 HSP70은 세포상해에 저항이 있는 지역에서 주로 발견되어,

HSP70의 방어기전으로써의 역할을 하는 것으로 사료된다. 본 실험에서도 출혈성 찰과 유발 점막내에서 HSP70 양성반응이 증가하였다. CON군에서는 HSP70 양성반응이 NOR군에 비해 크게 증가하였는데, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 양성반응이 감소된 것으로 보아 점막손상의 정도가 유의성 있게 감소되었는데 HA군과 NA군이 EA군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

중성점액장벽에 대한 효과는 CON군의 출혈성 침식 주변의 점막상피에서 PAS 양성반응을 보이는 표면점액세포와 목점액세포가 NOR군에 비해 감소하였는데, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 양성반응이 증가된 것으로 나타나 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 점액분비세포가 증가함으로써 위산에 대한 방벽효과가 인정되었으며 HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있게 효과적이었다.

표면점액세포내 골지복합체와 세포첨단부(apical surface)에서 강한 양성을 보이는 PNA 분포는 CON군에서 NOR군에 비해 크게 감소하였는데, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 양성반응이 증가된 것으로 나타나 위점막 방어효과가 인정되었으며 HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있게 효과적이었다.

Indomethacin에 의해 유도된 위점막 손상 시 중성 점액분비세포의 손상과 점액분비세포내 골지체 감소가 관찰된 것은 prostaglandin의 분비 차단에 의한 점막의 mucus와 bicarbonate 보호장벽의 결핍과 nonionized된 약산성의 보호장벽 침투 증가로 인한 점막내 중성환경의 변화의 결과이다²². 이는 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정에 관여하는 COX-1 mRNA 발현이 indomethacin에 의해 억제된 것이다²³. House-keeping enzyme인 COX-1은 위장관 보호, 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성(homeostasis) 유지에 중요한 역할을 한다. 본 실험에서는 NOR군에서 점막고유층내 COX-1 양성

반응이 세포질에서 강하게 나타났으나 CON군에서는 NOR군에 비해 크게 감소한 것으로 관찰되었으며, 이것은 COX-1의 결핍이 점막손상의 일차적 원인으로 설명될 수 있었다²⁴. MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서 CON군에 비해 양성반응이 증가된 것으로 나타나 위장관 보호효과가 있음이 인정되었는데 HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있게 효과적이었다.

점막 손상의 회복을 위해 세포분열을 통한 점액 분비세포의 생성이 필요한데²⁵, CON군에서 세포분열이 감소한 것을 thymidine analogue인 BrdU를 통해 확인하였으며, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 모두 증가된 것으로 나타나 점액분비세포의 생성에 효과적이었는데 HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있게 효과적이었다.

재관류시 나타나는 oxidative stress 증가는 I κ B kinase로 알려진 I κ K(I κ K α , β)를 활성화시켜 I κ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로서 불활성화된 상태로 세포질에 존재하는 NF- κ B의 세포 내 작용을 유도한다. 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site(consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자의 발현을 유도한다. 특히 NF- κ B 활성화는 혈관투과성의 증가를 유도하는 iNOS, COX-2 등의 염증효소의 발현 증가를 통해 염증반응의 가속화에 의한 조직 손상을 유도한다²⁶. 본 실험에서는 NF- κ B의 변화를 NF- κ B p65 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 조사하였는데, 점막상피 손상 지역에서 NF- κ B p65의 증가를 확인할 수 있었다.

iNOS는 ROS의 일종인 산화질소를 생성하는데, 산화질소(NO)는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체 내 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 혈관투과

성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고, 이는 세포막지질을 peroxidation 시키며, thiol, SH기를 oxidation하여 세포독성을 유발한다²⁷. 본 실험에서는 iNOS의 변화를 iNOS 항체를 이용한 면역조직화학적 방법으로 조사하였는데 점막상피 손상지역에서 iNOS의 증가를 확인할 수 있었다. COX-2는 유도성 동종효소(inducible isoform)로 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통한 다양한 만성염증질환, 즉 류마티스성 관절염, Crohn's disease, 궤양성 대장염, Helicobacter pylori 유도 위염 등을 유발하며, 혈관이완과 혈관 신생성에도 관여한다²⁸.

본 실험에서는 NF- κ B, iNOS, COX-2의 변화를 조사하였는데, CON군에서는 NOR군에 비해 양성반응세포의 분포가 증가하였으며, MA군, EA군, HA군 그리고 NA군에서는 CON군에 비해 모두 감소된 것으로 나타나 모두 위점막 내 항염증효과가 있음을 알 수 있었는데 HA군은 EA군에 비해, NA군은 HA군에 비해 유의성 있게 효과적이었다.

또한 *in vitro* 실험을 통해서 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散 추출물이 iNOS mRNA와 COX-2 mRNA의 발현 억제도 확인할 수 있었으며 특히 內消散 추출물에서 높은 항염증효과를 나타내었다.

이상의 결과로 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散은 위점막 손상에 대한 방어효과와 위점막내 항염증효과가 있는 것으로 나타났으며, 二陳湯보다는 香砂二陳湯이, 香砂二陳湯보다는 內消散이 치료효과가 더 있는 것으로 나타났다. 이로 미루어 보아 임상적으로 祛痰, 行氣, 消導, 消積하여 飲食傷에 활용될 수 있는 대부분의 治法이 포함된 內消散이 소화기염증 및 궤양에 치료 효과가 뛰어나는 것으로 사료되며, 향후 본 실험을 토대로 다양한 治法에 해당되는 처방들 간의 비교연구가 지속적으로 이루어지길 기대하는 바이다.

V. 결 론

위점막 손상에 대한 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散의 치료효과를 비교연구하기 위하여 실험용 생쥐에 indometacin을 이용하여 위점막 손상을 유발시킨 후, 각 처방의 농축전탕액을 각각 투여하여 위점막의 형태학적 변화, 위점막 손상 변화(ZO-1, HSP70), 위점막 방어장벽의 변화(PSA, PNA, COX-1, BrdU), 위점막내 항염증효과(NF-κB p65, iNOS, COX-2)와 *In Vitro*에서의 항염증효과(iNOS mRNA, COX-2 mRNA) 등을 관찰하였다.

1. 위점막 손상에 대한 효과는, 약물 투여군 모두에서 대조군에 비하여 출혈성 찰과, 점액분비세포의 배열유실, ZO-1 양성반응, HSP70 양성반응 등의 위점막 손상 소견이 감소된 것으로 나타났으며, 內消散 투여군, 香砂二陳湯 투여군, 二陳湯 투여군 순으로 위점막 손상에 대한 효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다.
2. 위점막 방어장벽의 보호 효과는, 약물 투여군 모두에서 대조군에 비하여 중성점액세포, COX-1, BrdU 양성반응 등의 위점막 방어장벽의 보호 소견이 증가된 것으로 나타났으며, 內消散 투여군, 香砂二陳湯 투여군, 二陳湯 투여군 순으로 위점막 방어장벽의 보호효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다.
3. 위점막내 항염증효과는, 약물 투여군 모두에서 대조군에 비하여 NF-κB p65, iNOS, COX-2 양성반응세포의 감소를 보였는데, 內消散 투여군, 香砂二陳湯 투여군, 二陳湯 투여군 순으로 항염증효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다.

또한, 약물의 항염증효과 측정에서는 二陳湯 추출물, 香砂二陳湯 추출물, 內消散 추출물에서 모두에서 효과가 있는 것으로 나타났으며, 그 중 內消散이 가장 우수한 것으로 관찰되었다.

이상의 결과에서 二陳湯, 香砂二陳湯, 內消散 모

두 위점막 손상에 대해 치료효과가 있는 것으로 나타났으며, 二陳湯보다는 香砂二陳湯이, 香砂二陳湯보다는 內消散이 효과가 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 대한소화기학회. 소화성궤양. 서울: 군자출판사; 2002, p. 19-32, 68-70, 123-31.
2. 서울대학교 의과대학편. 소화기학원론. 서울: 서울대학교출판부; 1998, p. 122-9.
3. 全國韓醫科大學 脾係內科學教授 共著. 脾係內科學. 서울: 아트동방; 1998, p. 229-49.
4. 危北海, 越榮萊, 李乾枸. 中醫脾胃學說應用研究. 北京: 北京出版社; 1993, p. 194-210.
5. 李乾枸, 王自立. 中醫胃腸病學. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1995, p. 448-54.
6. 金定濟. 診療要鑑. 서울: 東洋醫學研究院; 1974, 상권 p. 540-1.
7. 김현제, 김광호. 現代方劑學. 서울: 東洋醫學研究院; 1974, p. 82, 83, 86.
8. 韓醫科大學 方劑學教授 共編著. 方劑學. 서울: 永林社; 1999, p. 528-9.
9. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울: 한성사; 2002, p. 85, 86, 89, 522.
10. 危北海. 中醫脾胃學說. 北京: 北京出版社; 1993, p. 73.
11. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울: 法人文化社; 2006, p. 676.
12. 최정우, 이창현, 고병운, 이광규. 二陳湯 煎湯液이 흰쥐 위의 Gastrin, Histamin, Somatostin 면역반응세포에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(4):554-9.
13. 홍기철, 유봉하, 장인규, 박동원, 유기원. 내소산과 가미내소산이 위액분비 및 위궤양에 미치는 영향. 경희의약 1990;6(3):313-8.
14. 黃度淵. 方藥合編. 서울: 南山堂; 2005, p. 362, 427.
15. 陳師文. 太平惠民和劑局方(券三). 서울: 경희한

- 의과대학: 1974, p. 126.
16. 龔延賢. 萬病回春 上册. Hong Kong: 醫林書局: 1980, p. 105.
 17. 백태현. 平胃分消飲의 Indomethacin 유발 위점막 손상에 대한 효과. 대한한의학회지 2003;24(2):94-108.
 18. 권오윤, 강경원, 함준수, 이종철, 이동후, 기춘석, 등. 실험적으로 일으킨 위궤양 발생에 대한 Misoprostol (PG E₂)의 보호효과에 대한 연구. 대한소화기병학회지 1990;22(4):44-5.
 19. 김경환. 이우주의 약리학 강의. 서울: 의학문화사: 1997, p. 719-28.
 20. De Maio A. The heat-shock response. *New Horiz* 1995;3(2):198-207.
 21. Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR. Heat shock protein as markers of neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res* 1989;6(1):93-100.
 22. Graham DY. NSAID ulcers: prevalence and prevention. *Mod Rheumatol* 2000;10:2-7.
 23. Cryer B, Kimmey MB. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Am J Med* 1998;105(1):20-30.
 24. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998;56(5-6):341-61.
 25. Sakamoto C. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol* 1998;33(5):618-24.
 26. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B - Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
 27. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;9:1199-206.
 28. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol* 1993;17(2):38-40.