

酒蒸黃連이 iNOS 활성 억제를 통해 생쥐 위·십이지장 점막에 미치는 영향

김명호, 임성우
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effect of *Coptidis Rhizoma* Steamed with Rice Wine on Gastroduodenal Mucosa of Mouse through Inhibiting iNOS Activation

Myung-ho Kim, Seong-woo Lim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives: This study was carried out to investigate the protective effect of *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine (CR) against gastroduodenal mucosal injury through inhibiting inducible nitric oxide synthase (iNOS) activation.

Methods: In *in vitro* experiment, LPS-induced RAW 264.7 macrophages were treated with CR(0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) and iNOS mRNA expression and nitric oxide (NO) production were measured. In *in vivo* experiment normal group mice were treated with neither ethanol nor CR. Both control and sample group mice were orally administrated with ethanol. Five hours after ethanol administration control group mice were orally administrated with distilled water, sample group mice were orally administrated with CR. After three days administration, gastroduodenal mucosa of mice was observed histopathologically and iNOS, nuclear factor-kappa B (NF-κB) activation were observed immunohistochemically.

Results: In *in vitro* experiment iNOS mRNA expression and NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages were decreased by CR dose-dependently. In *in vivo* experiment, gastroduodenal mucosal injury was repaired by CR and iNOS, NF-κB activation in gastroduodenal mucosa were decreased by CR.

Conclusions: *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine has a protective effect against gastroduodenal mucosal injury through inhibiting iNOS activation.

Key words: *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine, Gastroduodenal Ulcer, Nitric Oxide, Inducible Nitric Oxide Synthase, Nuclear Factor kappa B

1. 서론

위·십이지장의 점막은 위산, 펩신, 담즙 등의 내부인자들과 약물, 술, 세균 등의 외부인자들에 의해 손상되는데 점액, 중탄산염으로 이루어진 점

막 보호 체계가 위·십이지장 점막을 보호한다. 이러한 병태생리에 따라서 제산제나 산 분비 억제제, 위 점막 보호제, Helicobacter Pylori 제균제 등이 위·십이지장 점막을 보호하기 위해 사용된다¹⁾.

黃連(*Coptidis Rhizoma*)는 淸熱燥濕, 瀉心除煩, 瀉火解毒의 效能을 가지고 있어 濕熱痞滿, 嘔吐吞酸, 瀉痢, 黃疸, 高熱神昏, 心火亢盛, 心煩不寐, 血熱吐衄, 目赤, 牙痛, 消渴, 癰腫疔瘡, 濕疹, 濕瘡, 耳道

· 교신저자: 임성우 경기도 고양시 일산동구 식사동 814
동국대학교 한의과대학 내과학교실
TEL: 031-961-9046 FAX: 031-961-9045
E-mail: omdlsw@naver.com

流膿의 치료에 활용된다². 黃連은 주로 berberine, coptisine, epiberberine, palmatine, jateorrhizine, magnoflorine, worenine 등의 성분을 포함하여 항염증, 항균, 항암, 항산화 작용을 나타내고 간 질환과 심혈관계 질환 등에도 응용된다³. 그리고 黃連은 손상된 위 점막의 산도를 낮추고, 항산화·항염증 작용을 통해 위·십이지장 점막 손상에 대한 보호 효과를 가진다고 보고되었다^{4,6}.

酒蒸黃連은 黃連을 술에 축여 찐 것인데 酒蒸黃連은 腸胃를 두텁게 하고⁷, 酒毒積熱로 인한 便血을 치료하는데 활용된다고 하여⁸, 黃連처럼 위·십이지장 점막 보호 효과를 가질 것으로 기대된다. 酒蒸黃連도 黃連의 주요 성분인 jatrorrhizine, columbamine, epiberberine, coptisine, palmatine, berberine을 포함하고 있어 黃連과 유사한 작용을 할 것으로 생각된다⁹. 그러나 酒蒸黃連의 위·십이지장 점막 손상 보호 효과에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 저자는 위·십이지장 점막 손상에 대한 酒蒸黃連의 보호 효과를 확인하기 위하여 LPS를 처리한 RAW 264.7 macrophages에 酒蒸黃連을 적용한 후 inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA의 발현과 nitric oxide(NO)의 생성량을 측정하고, 에탄올 경구 투여로 위·십이지장 점막 손상이 유발된 생쥐에게 酒蒸黃連을 경구 투여한 후 위·십이지장 점막을 조직병리학적으로 관찰하고 위·십이지장 점막에서 iNOS와 nuclear factor-kappa B (NF-κB)의 활성을 면역조직화학적으로 측정하였다. 이상의 실험을 통해 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 실험 재료

1) 세포주

실험에 사용한 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 macrophages는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37 °C, 5% CO₂ incubator

에서 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, USA)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 PBS로 씻어주고, Trypsin-EDTA (Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하여 주었다.

2) 동 물

대한실험동물센터에서 분양 받은 태령 4주된 ICR계 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중이 30 g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 아무 처치도 하지 않은 군(정상군), ethanol 투여군(대조군) 그리고 ethanol 투여 후 酒蒸黃連 투여군(실험군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 실험동물에 대하여 동국대학교 동물실험 연구윤리를 준수하였다.

3) 약 재

중국 사천에서 생산된 黃連(*Coptidis Rhizoma*)을 (주)옴니허브에서 구입하여, 포천막걸리에 2시간 동안 버무렸다가 2시간 동안 찌고 4시간 동안 건조시켜 酒蒸黃連을 제조하였다.

제조된 酒蒸黃連 80 g을 증류수 2000 ml에 넣고 3시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 1000 ml로 감압, 농축한 추출액을 동물실험에 사용하였다. 추출액의 농도는 임상적으로 사람에게 투여하는 농도에 근거하였다. 세포주 실험에 사용된 약재 추출물은 감압, 농축 후 동결 건조(수득률 21.2%)하여 사용하였고, MTT assay 측정을 위한 酒蒸黃連 추출물 10 mg/ml까지는 세포 생존률의 변화가 일어나지 않아 추출물의 첨가량을 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 결정하였다.

2. 실험 방법

1) in vitro

(1) iNOS mRNA 발현 측정을 위한 RT-PCR
酒蒸黃連이 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향을

조사하기 위해 역전사중합효소연쇄반응법(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RAW 264.7 macrophages 5×10^5 cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 LPS(1 μ g/ml, Sigma)를 2시간 동안 처리하여 iNOS의 활성을 유도한 후 酒蒸黃連 추출물 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 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 primer를 PCR machine으로 반응시켰다(Table 1). PCR 산물은 1-2% agarose gel상에서 전기 영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β -actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

Table 1. The Primer of iNOS and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product (bp)	No. of cycles
iNOS	sense	5'-AGACTGGATTTGGCTGGTCCCTCC-3'	527	30
	antisense	5'-AGAAGTGGGGTACATGCTGGAGCC-3'		
β -actin	sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

(2) Nitrite Assay

Nitrite assay를 통해 NO의 생성량을 측정하였는데, 12시간 배양된 RAW 264.7 macrophages 5×10^5 cells/well에 LPS(1 μ g/ml)를 2시간 동안 처리한 후 酒蒸黃連 추출물을 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액 상층액 50 μ l에 Greiss reagent(Sigma) 50 μ l을 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 아질산나트륨(NaNO_2)을 사용하여 표준용량곡선을 작성하고, NO 생성을 산출하였다.

2) *in vivo*

(1) 위·십이지장 점막 손상 유발

위·십이지장 점막 손상을 유발하기 위해 0.9% NaCl이 포함된 50% ethanol(Sigma)을 10 ml/kg씩 3일 동안 대조군과 실험군에 경구 투여 하였다.

(2) 酒蒸黃連 추출액의 투여

酒蒸黃連 추출액은 ethanol 투여 5시간 경과 후 실험군에 5 ml/kg/day 용량으로 3일 동안 경구 투여하였다. 대조군에는 ethanol 투여 5시간 경과 후

생리식염수를 5 ml/kg/day 용량으로 3일 동안 경구 투여하였다.

(3) 조직표본

마지막 ethanol 투여 24시간 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 위와 십이지장을 적출하여 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께의 연속절편으로 제작되었다. 위와 십이지장내 점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속 절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

(4) 위 점막 관찰

① 위 점막 점액 분비 세포

위 점막 점액 분비 세포의 변화를 조사하기 위해서 periodic acid-schiff reaction(PAS) stain을 실시하였는데, 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분 동안 대조 염색하여 관찰하였다.

② 위 점막 내 NF- κ B, iNOS 활성화

NF- κ B p65, iNOS의 분포 변화를 면역조직화학적 염색 후 관찰하였다. 우선 절편을 proteinase K (20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-NF- κ B p65(1:200, Santa Cruz Biotech)와 mouse anti-iNOS (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG 1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link한 후 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)에 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 대조 염색은 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시켜 hematoxylin으로 하였다.

(5) 십이지장 점막 관찰

① 파넷 세포

Phloxine-tartrazine(PT) 염색법으로 십이지장의 파넷세포 내 분비과립의 변화를 관찰하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액 30분간 반응시켰다. 그 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 관찰하였다.

② 십이지장 점막 내 NF- κ B, iNOS 활성화

위 점막 관찰에서와 동일한 방법으로 NF- κ B p65와 iNOS의 분포 변화를 관찰하였다.

3) 영상분석과 통계처리

iNOS mRNA 발현의 relative intensity와 면역조

직화학 검사 결과의 수치화를 위해 Image pro Plus (Media Cybernetic, USA)을 이용한 영상분석을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma Plot 2000(Sigma)을 통한 student's T test로 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. *in vitro* 실험에서 iNOS mRNA 발현과 NO 생성 억제 효과

1) iNOS mRNA 발현 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 iNOS mRNA의 발현은 증가하였는데, 酒蒸黃連 추출물 처리 후 농도-의존적으로 iNOS mRNA의 발현이 감소되었다. 酒蒸黃連 추출물 처리 후 iNOS mRNA의 발현량은 0.4 mg/ml에서 12.4%, 0.6 mg/ml에서 13.9%, 0.8 mg/ml에서 32.1%, 1.0 mg/ml에서 50%로 감소되었다(Fig. 1-A).

2) NO 생성 억제

RAW 264.7 macrophages에서 LPS 자극에 의한 NO의 생성은 709%($4.61 \pm 0.10 \mu\text{m}/5 \times 10^5 \text{ cells}$)로 증가하였는데, 酒蒸黃連 추출물 처리 후 농도-의존적으로 유의성 있게 NO의 생성이 감소되었다. 酒蒸黃連 추출물 처리 후 NO의 생성은 0.4 mg/ml 처리 시 9%($4.19 \pm 0.5 \mu\text{m}/5 \times 10^5 \text{ cells}$), 0.6 mg/ml 처리 시 81%($0.85 \pm 0.03 \mu\text{m}/5 \times 10^5 \text{ cells}$), 0.8 mg/ml 처리 시 84%($0.72 \pm 0.02 \mu\text{m}/5 \times 10^5 \text{ cells}$) 그리고 1.0 mg/ml 처리 시 85%($0.68 \pm 0.02 \mu\text{m}/5 \times 10^5 \text{ cells}$)로 감소하였다(Fig. 1-B).

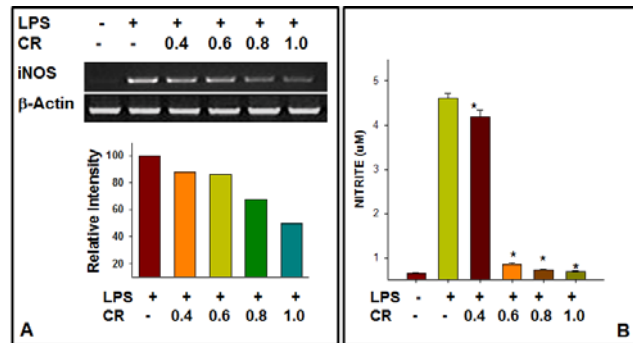


Fig. 1. The Inhibition of iNOS mRNA Expression (A) and NO Production (B) by CR.

The LPS-induced iNOS mRNA expression and NO production were dose-dependantly decreased by CR in LAW 264.7 macrophages.

* : P<0.05 compared with LPS alone

CR : *Coptidis Rhizoma* steamed with rice wine

2. *in vivo* 실험에서 위·십이지장 점막 손상 보호 효과

1) 위 점막

(1) 위 점막 손상 회복

대조군에서 위 점막 세포 배열의 심한 유실이 관찰되었고 실험군에서도 위 점막 세포 배열의 유실이 관찰되었으나, 대조군에 비해 그 분포가 적었다. 대조군에서 누출된 적혈구의 분포가 많았으나

실험군에서는 거의 없었다(Fig. 2-A).

(2) 점액 분비 세포 손상 회복

대조군의 점막 상피에서 PAS 양성 반응을 보이는 점액 분비 세포가 거의 관찰되지 않았고 실험군에서는 PAS 양성 반응을 보이는 점액 분비 세포가 대조군에 비해 많이 관찰되었다. 실험군에서 PAS 양성 반응을 보이는 점액 분비 세포는 상피 상부에서 뿐만 아니라 위오목에서도 관찰되었다(Fig. 2-B).

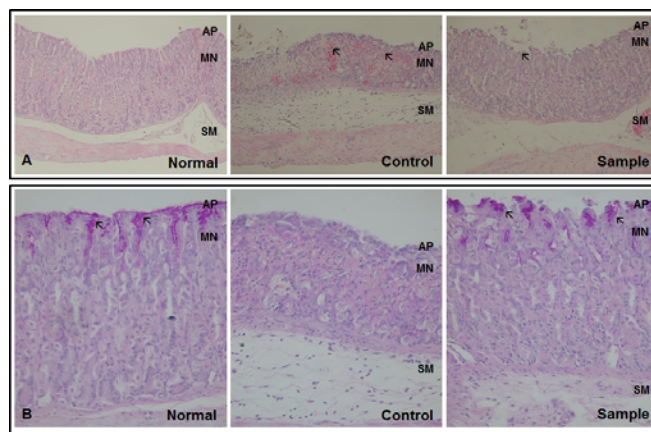


Fig. 2. The Repair of Gastric Mucosal Injury by CR.

A : The loss of gastric mucosal cell arrangement and hemorrhagic erosion (arrow) were decreased by CR (H&E, ×100).

B : The PAS positive reaction (arrow) was increased by CR (PAS, ×200).

AP : apical surface of mucosa, MN : mucosal neck, SM : submucosa

(3) 위 점막 내 NF-κB, iNOS 활성화 억제

① NF-κB 활성화 억제

NF-κB p65 양성 반응 세포의 분포가 대조군에서 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. NF-κB p65 양성 반응 세포는 점막에 고루 분포하였고, 핵과 핵막 주변 세포질에서 강한 양성 반응을 보였다. 영상분석 결과 NF-κB p65 양성 반응이 대조군에서 정상군에 비해 1071% 증가하였지만, 실험군에서는 대조군에 비해 85% 감소하였다(Table 2, Fig. 3-A).

② iNOS 활성화 억제

iNOS 양성 반응 세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 iNOS 양성 반응 세포는 점막에 고루 분포하였고, 핵과 핵

막 주변 세포질에서 강한 양성 반응을 보였다. 영상분석 결과 iNOS 양성 반응이 대조군에서 정상군에 비해 1899% 증가하였지만, 실험군에서는 대조군에 비해 77% 감소하였다(Table 2, Fig. 3-B).

Table 2. The Image Analysis of NF-κB, iNOS Activation in Gastric Mucosa

Objective	Group		
	Normal	Control	Sample
NF-κB p65	4433±278	47468±1305	11323±791*
iNOS	1505±159	28427±1008	6544±230*

image analysis for 10,000,000 particles / range of intensity : 80-100

* : P<0.05 compared with control group

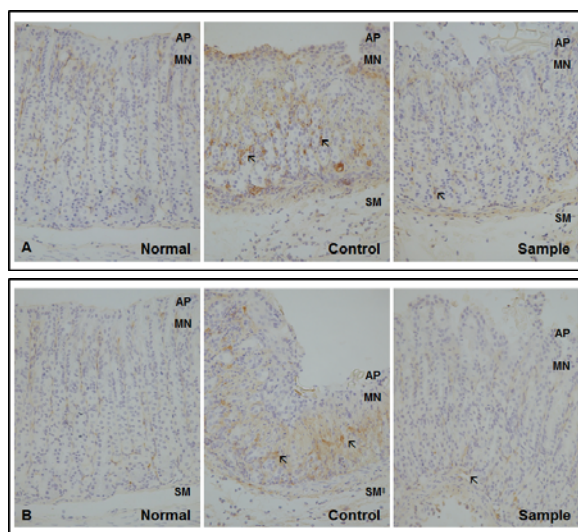


Fig. 3. The Inhibition of NF-κB, iNOS Activation by CR in Gastric Mucosa.

A : The NF-κB p65 positive reaction (arrow) was decreased by CR (NF-κB p65 immunohistochemistry, ×200).

B : The iNOS positive reaction (arrow) was decreased by CR (iNOS immunohistochemistry, ×200).

AP : apical surface of mucosa, MN : mucosal neck, SM : submucosa

2) 십이지장 점막

(1) 십이지장 점막 손상 회복

대조군의 십이지장에서서는 용모와 창자음 상부의 일부 점막 세포에서 손상이 관찰되었으나, 과도한 출혈성 침식은 나타나지 않았다. 이에 비해 실험군

에서는 정상군과 유사하게 정상적인 용모와 창자음의 형태를 관찰할 수 있었다(Fig. 4-A).

(2) 파넷 세포 손상 회복

파넷 세포에서 PT 양성 반응 과립의 수가 대조군에서 감소되고, 그 분포지역이 세포 주변부에 국

한되어 관찰되었다. 이에 비해 실험군에서는 많은 수의 양성 반응 과립이 관찰되었고, 세포 주변부

뿐만 아니라 세포 심부까지도 분포된 것이 관찰되었다(Fig. 4-B).

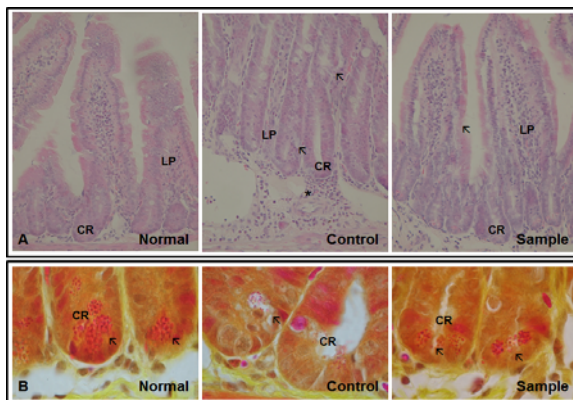


Fig. 4. The Repair of Duodenal Mucosal Injury by CR.

A : The damage of villi & crypt (arrow) and infiltration of inflammatory cell (asterisk) were decreased by CR (H&E, $\times 100$).
 B : The PT positive reaction (arrow) was increased by CR (Phloxine-tartrazine, $\times 1000$).
 LP : lamina propria, CR : crypt

(3) 십이지장 점막 내 NF- κ B, iNOS 활성 억제 효과

① NF- κ B 활성 억제

NF- κ B p65의 양성 반응 세포의 분포가 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 NF- κ B p65 양성 반응 세포는 점막에 고루 분포하였고, 핵과 핵막 주변 세포질에서 강한 양성 반응을 보였다. 영상분석 결과 NF- κ B p65 양성 반응이 대조군에서 정상군에 비해 295% 증가하였고, 실험군에서는 대조군에 비해 42% 감소하였다(Table 3, Fig. 5-A).

② iNOS 활성 억제

iNOS 양성 반응 세포의 분포는 대조군에서는 증가하는 반면 실험군에서는 감소하였다. 이런 iNOS

양성 반응 세포는 점막에 고루 분포하였고, 핵과 핵막 주변 세포질에서 강한 양성 반응을 보였다. 영상분석 결과 iNOS 양성 반응이 대조군에서 정상군에 비해 373% 증가하였고, 실험군에서는 대조군에 비해 43% 감소하였다(Table 3, Fig. 5-B).

Table 3. The Image Analysis of NF- κ B, iNOS Activation in Duodenal Mucosa

Objective	Group		
	Normal	Control	Sample
NF- κ B p65	9595 \pm 277	28337 \pm 1276	16479 \pm 1212*
iNOS	5740 \pm 351	21425 \pm 1461	12178 \pm 1270*

image analysis for 10,000,000 particles / range of intensity : 80-100

* : P<0.05 compared with control group

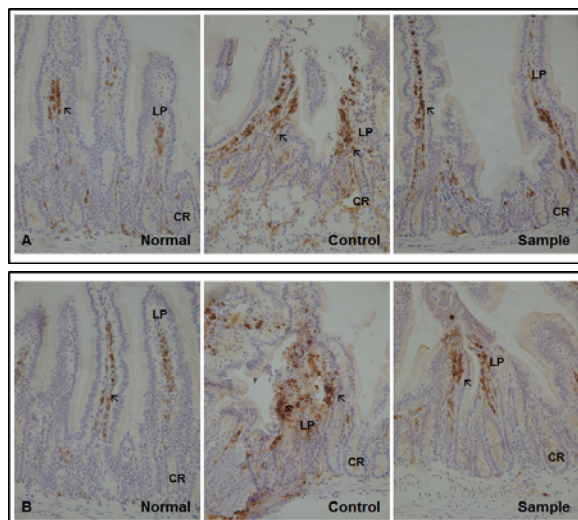


Fig. 5. The Inhibition of NF- κ B, iNOS Activation by CR in Duodenal Mucosa.

A : The NF- κ B p65 positive reaction (arrow) was decreased by CR (NF- κ B p65 immunohistochemistry, $\times 200$).

B : The iNOS positive reaction (arrow) was decreased by CR (iNOS immunohistochemistry, $\times 200$).

LP : lamina propria, CR : crypt

IV. 고찰

黃連은 性味가 大苦大寒하여 心火를 瀉하고 腸胃의 濕熱을 清하는 효능으로 清心, 除煩, 消痞, 止痢 등 濕火가 鬱結된 것을 치료한다. 그래서 心火亢盛으로 인한 煩熱神昏, 心煩不眠과 血熱妄行으로 인한 吐血, 衄血을 치료하고, 腸胃濕熱로 인한 痞滿嘔吐와 瀉痢腹痛을 치료한다. 또한 心火를 瀉하고 熱毒을 解毒시키는 효능으로 外科의 疔毒癰腫과 口舌赤爛에 內服과 外用을 막론하고 활용된다. 그리고 黃連은 木香과 配合되어 清腸止痢하는 효능으로 瀉痢腹痛과 裏急後重을 치료하고, 葛根·黃芩 등과 配合되어 痢疾初期의 發熱表證을 치료하고, 黃芩·半夏·生薑 등과 配合되어 清胃止嘔하는 효능으로 脘腹痞滿, 惡心嘔吐를 치료하고, 吳茱萸와 配合되어 肝鬱化火·胃失和降로 인한 嘔吐吞酸을 치료하는 등 위장관 질환에 활용된다².

黃連의 위·십이지장 점막 손상 보호 효과와 관련된 기존의 연구를 살펴보면, 黃連은 생쥐의 손상

된 위 점막에서 위산의 산도를 낮추고 위산의 분비량을 감소시킨다⁴. 그리고 catalase와 superoxide dismutase의 활성을 촉진시키고 nitrate/nitrite의 함량을 증가시키며 lipid peroxidation를 감소시킴으로써 쥐의 위 점막 손상에 대한 항산화 작용을 나타낸다⁵. 또한 constitutive nitric oxide synthase (cNOS)의 활성을 촉진하고 iNOS의 활성과 tumor necrosis factor alpha(TNF- α)의 생성을 억제함으로써 Helicobacter Pylori의 LPS로 유발된 쥐의 위 점막 손상에 대한 항염증 작용을 한다⁶. 이상을 통해 黃連이 위·십이지장 점막 손상에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 사료된다.

酒蒸黃連은 黃連을 술에 燻여 찌는 것으로 酒毒으로 인한 腸胃의 積熱과 吐血·便血·肛門灼熱을 치료한다^{7,8}. 이는 알코올 섭취로 인한 위·십이지장 점막의 손상을 설명하는 것으로 酒蒸黃連을 위·십이지장 점막 손상을 보호하기 위하여 활용할 수 있다고 생각된다.

위·십이지장 점막에는 내외부 공격 인자들로

유발되는 손상에 대한 점막 보호 체계가 있는데 상피상부, 상피, 상피하부로 이루어진다. 상피상부의 점액-중탄산염층은 수소이온 등을 비롯한 여러 가지 물질들에 대한 물리화학적 방어벽 역할을 하는데, 점액은 펩신과 같은 이온과 입자의 투과를 방해하고 중탄산염은 상피의 산도가 위 내강에 비해 낮게 유지되도록 한다. 상피는 점액과 중탄산염을 분비하여 상피상부의 방어벽을 조성한다. 상피하부에서는 위·십이지장 점막하 혈관으로 중탄산염, 영양소, 산소가 공급되며 해로운 대사산물들이 제거된다¹.

NO는 중요한 생물학적 매개체로서 다양한 생리, 병리적 기전에 관여하여 혈관을 확장시키고 신경계에서 신호를 전달하는 기능과 함께 염증과 면역 기능에도 중요한 역할을 한다¹⁰. NO는 위·십이지장 점막 보호 체계의 모든 요소들을 조절하는 중요한 매개체이다. NO는 위·십이지장 점막의 투과성을 감소시켜 외부 공격 인자들에 의한 손상을 막고, 상피에서 점액과 중탄산염의 분비를 증가시킨다. 그리고 비만세포의 탈과립과 대식세포, 혈소판, 호중구로부터의 염증 유발 물질 방출을 감소시키며, 혈관을 확장시키고 호중구가 혈관 상피에 부착되는 것을 막는다. 또한 항산화 작용을 하고 손상된 위·십이지장 점막의 회복을 촉진시킨다. 그래서 NO의 생성이 억제되면 위·십이지장 점막의 손상이 증가되고 NO가 공급되면 위·십이지장 점막 손상이 감소된다¹¹.

위·십이지장 점막 보호 작용을 하는 NO는 주로 cNOS를 통해 생성되는 반면에 병리적인 상황에서 iNOS에 의해 다량 생성된 NO는 세포 독성을 띠면서 위·십이지장 점막의 손상에 기여한다. 그래서 cNOS의 활성이 억제되면 위·십이지장 점막의 손상이 증가되고 iNOS의 활성이 억제되면 위·십이지장 점막의 손상이 감소된다. 따라서 iNOS의 활성을 억제하여 과도한 양의 NO 생성을 억제하는 것은 위·십이지장 점막의 손상에 대한 보호 효과를 나타낼 것이라 사료된다¹¹.

黃連이 iNOS의 활성과 NO의 생성에 미치는 영향에 대한 연구들을 살펴보면, 黃連이 iNOS의 활성을 억제함으로써 NO의 생성을 감소시켰다는 보고가 다수 있다. 黃連의 성분인 berberine이 생쥐 뇌신경소교세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 감소시키고¹², LPS로 유도된 생쥐 장염 모델에서 NO의 생성을 감소시켰다¹³. 그리고 黃連의 chloroform 분획물이 생쥐 뇌신경소교세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 억제하고¹⁴, 黃連의 열수 추출물이 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 감소시키고¹⁵, 黃連의 methanol 추출물도 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성을 감소시켰다¹⁶. 이상의 연구들처럼 酒蒸黃連이 생쥐의 위·십이지장 점막에서 iNOS의 활성을 억제하여 NO의 생성을 감소시킨다면 점막 손상 보호 효과를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 LPS 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 iNOS mRNA의 발현과 NO의 생성량이 증가되고 酒蒸黃連 처리에 의해 농도-의존적으로 감소되었다. 그리고 에탄올로 손상된 생쥐의 위·십이지장 점막에서 iNOS의 활성이 증가되고 酒蒸黃連 처리에 의해 감소되었다. 酒蒸黃連이 위·십이지장 점막 손상에서 iNOS의 활성을 억제하였기 때문에 酒蒸黃連은 에탄올로 유발된 생쥐의 위·십이지장 점막 손상에 대한 보호 효과를 가진다고 사료된다.

NF- κ B는 면역과 염증 반응에 중요한 역할을 하여 다양한 면역염증성 질환에 관련되는데¹⁷, iNOS의 활성화에도 관여된다^{18,19}. 위장관 점막의 손상에서 NF- κ B의 활성이 증가되고²⁰⁻²², 회장 점막의 손상에서 黃連 처리에 의해 NF- κ B의 활성이 억제된다는 연구가 있어²³, 위·십이지장 점막 손상에서 酒蒸黃連의 NF- κ B 억제 효과도 기대된다. 본 연구에서 에탄올로 손상시킨 생쥐의 위·십이지장 점막에서 NF- κ B의 활성이 촉진되고 酒蒸黃連 처리를 통해 억제되어, 酒蒸黃連이 iNOS를 억제할 뿐만 아니라 NF- κ B도 억제함으로써 에탄올로 손상된 생쥐의 위·십이지장 점막을 보호하는 효과를

가진다고 사료된다.

생쥐의 위·십이지장 점막에서 iNOS와 NF-κB의 활성화 정도를 측정하기 위하여 생쥐의 위·십이지장 점막을 iNOS와 NF-κB에 선택적으로 면역조직화학적 염색을 한 후 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)를 사용하여 영상 분석하였다. 영상 분석을 통해 iNOS와 NF-κB가 면역조직화학적으로 염색된 부분을 측정하여 수치화 할 수 있다²⁴. 수치화된 iNOS와 NF-κB의 활성화 정도를 비교함으로써 실험군 생쥐 위·십이지장 점막에서의 iNOS, NF-κB 활성이 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

알코올로 손상된 위·십이지장 점막에서 내시경 검사 상 침식, 홍반, 출혈 등이 관찰되고 현미경 검사 상 점막 출혈과 상피하 출혈이 나타난다^{25,26}. 본 연구에서도 대조군에서 위·십이지장 점막의 손상이 관찰되었으나 실험군에서는 대조군에 비해 점막의 손상이 적었다. 그리고 정상군에서 위·십이지장 점막의 PAS 양성 반응과 PT 양성 반응이 관찰되었는데 대조군에서는 그에 비해 적게 관찰되었고, 실험군에서는 PAS 양성 반응과 PT 양성 반응이 대조군에 비해 많이 관찰되었다. PAS 양성 반응은 위 점막 상피에서 분비되는 점액에 반응하여 나타나는 것으로 PAS 양성 반응이 많이 관찰된다는 것은 점액을 분비하는 점막 상피의 손상이 적다는 것을 의미한다^{1,27}. 파넷 세포는 소장 상피 세포계의 주요한 세포인데 PT 양성 반응은 파넷 세포의 분비 기관에 반응하여 나타나는 것으로 PT 양성 반응이 많이 관찰된다는 것은 파넷 세포의 손상이 적다는 것을 의미한다²⁸. 이상을 통해 에탄올로 유발된 생쥐의 위·십이지장 점막 손상에 대한 酒蒸黃連의 보호 효과를 확인하였다.

본 연구에서는 酒蒸黃連의 위·십이지장 점막 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 iNOS 활성 억제를 위주로 연구하였다. 酒蒸黃連의 위·십이지장 점막 손상 보호 기전을 명확하게 밝히기 위하여, 酒蒸黃連이 손상된 위·십이지장 점막에서 위산

분비를 억제하는지, 산화·염증 작용을 억제하는지, Helicobacter Pylori 제균 효과를 가지는지 연구해 볼 필요가 있다.

본 연구의 결과와 유사하게 黃連도 iNOS 활성을 억제함으로써 Helicobacter Pylori LPS로 유발된 쥐의 위 점막 손상을 보호한다⁶. 黃連의 지표물질인 berberine이 메탄올과 같은 유기용매에서 추출효율이 높다는 점을 고려하면²⁹, iNOS 활성 억제를 통해 위·십이지장 점막 손상을 보호하기 위한 목적으로 酒蒸黃連이 黃連에 비해 효율적일 것으로 생각된다. 추후 연구를 통해 酒蒸黃連과 黃連이 iNOS 활성 억제를 통해 나타내는 위·십이지장 점막 손상 보호 효과를 비교해 볼 가치가 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

酒蒸黃連의 생쥐 위·십이지장 점막 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 LPS를 처리한 RAW 264.7 macrophages에 酒蒸黃連을 적용한 후 iNOS mRNA의 발현과 NO의 생성량을 측정한 후, 에탄올을 경구 투여하여 위·십이지장 점막이 손상된 생쥐에 酒蒸黃連을 경구 투여한 후, 위·십이지장 점막을 조직병리학적으로 관찰하고 위·십이지장 점막에서 iNOS와 NF-κB의 활성을 면역조직화학적 측정으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

酒蒸黃連은 LPS 처리된 RAW 264.7 macrophages에서 iNOS의 활성화와 NO의 생성을 억제하고, 에탄올로 손상시킨 생쥐의 위·십이지장 점막에서 NF-κB와 iNOS의 활성을 억제하여 생쥐의 위·십이지장 점막 손상을 회복시킨다.

이상의 결과로 酒蒸黃連은 에탄올로 유발된 생쥐의 위·십이지장 점막 손상에서 iNOS의 활성 억제를 통해 생쥐 위·십이지장 점막 손상에 대한 보호 효과를 가진 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한내과학회 해리슨내과학 편집위원회. Harrison's 내과학 16th edition. 서울: 도서출판 MIP; 2006, p. 1907.
2. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 초판. 서울: 도서출판 영림사; 2006, p. 221-2.
3. Kim KB, Lee HT, Ku KH, Hong JW, Cho SI. Review of pharmacological effects of Coptidis Rhizoma and its bioactive compounds. *J Korean Oriental Med* 2012;33(3):160-83.
4. Li B, Shang JC, Zhou QX. Study of total alkaloids from Rhizoma Coptis Chinensis on experimental gastric ulcers. *Chin J Integr Med* 2005;11(3):217-21.
5. Byun JS. Protective effects of Coptidis Rhizoma on ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2012;26(1):67-73.
6. Lu JS, Liu YQ, Li M, Li BS, Xu Y. Protective effects and its mechanisms of total alkaloids from rhizoma Coptis chinensis on Helicobacter pylori LPS induced gastric lesion in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2007;32(13):1333-6.
7. 허준 저. 윤석희 김형준, 외 옮김. 동의보감. 초판. 경남: 동의보감 출판사; 2006, p. 140, 2157.
8. 전국한의과대학 비계내과학교실. 비계내과학. 초판. 서울: 군자출판사; 2008, p. 79, 213.
9. Li JC, Shen XF, Meng XL. A traditional Chinese medicine JiuHuangLian (Rhizoma coptidis steamed with rice wine) reduces oxidative stress injury in type 2 diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2013 Sep;59:222-9.
10. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54(2):171-8.
11. Elliott SN, Wallace JL. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol* 1998;33(6):792-803.
12. Park YK, Jung HW, Kim CM, Choi JS, Kim YS. Effects of Berberine on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology* 2007;22(4):117-25.
13. Zhang Q, Piao XL, Piao XS, Lu T, Wang D, Kim SW. Preventive effect of Coptis chinensis and berberine on intestinal injury in rats challenged with lipopolysaccharides. *Food Chem Toxicol* 2011;49(1):61-9.
14. Park YK, Lee KY. Anti-inflammatory effect of chloroform fraction of Coptidis rhizoma on the production of inflammatory mediators from LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology* 2007;22(4):109-16.
15. Jung HW, Park YK. Inhibitory effects of Coptidis Rhizoma on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α in mouse macrophage cells. *The Korea Journal of Herbology* 2006; 21(2):165-73.
16. Jung HW, Park YK. Effects of subfractions of Coptidis Rhizoma extract on the nitric oxide production in LPS-stimulated BV2 microglial cells. *The Korea Journal of Herbology* 2007; 22(2):73-8.
17. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001;107(1):7-11.
18. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 2004;75(6):639-53.
19. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of Transcription Factor NF- κ B/Rel in Induction of Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem* 1994; 269(7):4705-8.
20. van Den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, van Deventer SJ,

- et al. Expression and activation of NF- κ B in the antrum of the human stomach. *J Immunol* 2000;164(6):3353-9.
21. Neurath MF, Fuss I, Schürmann G, Pettersson S, Arnold K, Müller-Lobeck H, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:149-59.
 22. Moorchung N, Srivastava AN, Sharma AK, Achyut BR, Mittal B. Nuclear factor kappa-B and histopathology of chronic gastritis. *Indian J Pathol Microbiol* 2010;53(3):418-21.
 23. Zhang Q, Piao XL, Piao XS, Lu T, Wang D, Kim SW. Preventive effect of Coptis chinensis and berberine on intestinal injury in rats challenged with lipopolysaccharides. *Food and Chemical Toxicology* 2011;49(1):61-9.
 24. Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research—a review. *J Med Syst* 2012; 36(4):2621-31.
 25. Knoll MR, Kölbl CB, Teyssen S, Singer MV. Action of pure ethanol and some alcoholic beverages on the gastric mucosa in healthy humans: A descriptive endoscopic study. *Endoscopy* 1998; 30(3):293-301.
 26. Gottfried EB, Korsten MA, Lieber CS. Alcohol-induced Gastric and Duodenal Lesions in Men. *Am J Gastroenterol* 1978;70(6):587-92.
 27. McManus JFA. Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid. *Stain Technol* 1948;23(3):99-108.
 28. Bry L, Falk P, Huttner K, Ouellette A, Midtvedt T, Gordon JI. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(22):10335-9.
 29. Lee JS, Park HK, Woo ER, Lee EJ, Ahn DK, Youn WS, Shin KH. A study on the Extraction Efficiency of berberine in Coptidis Rhizoma. *Analytical Science & Technology* 1997;10(2):83-90.