

## 생쥐의 Gastrin 조절을 통한 六味地黃湯의 날문위염과 십이지장염 완화효과

정연서, 강아미, 임성우  
동국대학교 한의과대학 대학원 비계내과학교실

### Mitigating Effect of *Yukmijihwang-tang* on Antral Gastritis and Duodenitis

Yun-seo Cheong, A-mi Kang, Seong-woo Lim  
Dept. of Internal Medicine, Graduate School of Oriental Medicine, Dong-Guk University

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study investigated the mitigating effect of *Yukmijihwang-tang* on antral gastritis and duodenitis by regulating gastrin release in mice.

**Methods:** The normal group comprised mice with no inflammation; the control group comprised mice with ethanol-induced gastroduodenal inflammation. The sample group included inflammation-induced mice treated with *Yukmijihwang-tang*.

**Results:** Based on morphology and histochemistry findings, many hemorrhagic erosions were observed in the control group, while significantly fewer erosions were seen in the sample group. Immunohistochemistry findings showed that the distributions of gastrin, substance P, HSP70, NF- $\kappa$ B p65, and iNOS were considerably lower in the *Yukmijihwang-tang*-treated group than in the control group.

**Conclusions:** The findings suggest that *Yukmijihwang-tang* has a potent mitigating effect on antral gastritis and duodenitis in mice.

*Key words:* *Yukmijihwang-tang*, gastrin, gastritis, duodenitis

### 1. 서론

위와 십이지장의 점막통합성은 공격인자와 방어인자들 사이의 균형에 의해 유지되며, 이 두 인자들 사이의 균형이 깨어질 때 소화성 궤양이 발생한다<sup>1</sup>. 공격인자와 방어인자의 불균형은 공격인자의 증가와 방어인자의 약화에 의해 발생하는 것으로

알려져 있는데, 공격인자의 증가로는 산, pepsin의 증가 등을 들 수 있고, 방어인자의 약화로는 위 점막의 구조나 형태가 결손되어 약해지거나 점액 분비의 감소, 중탄산이온분비의 감소, 산분비의 feedback diffusion의 약화, 점막의 순환 혈류량 감소, prostaglandin 생산의 저하 등을 들 수 있다<sup>2</sup>. 원인으로는 *Helicobacter pylori* 감염, 비스테로이드계 항염증소염제(NSAID) 등 약물의 과다복용, 불규칙한 식습관, 음주, 정신적육체적 스트레스, 알코올 등이 알려져 있다<sup>3</sup>. 임상증상은 심와부 동통이 흔하고 기타 소화불량증과 궤양면 출혈로 인한 토혈, 하혈이 나타난다<sup>4</sup>.

- 투고일: 2015.09.11, 심사일: 2015.09.16, 게재확정일: 2015.09.18
- 교신저자: 임성우 경기 고양시 일산동구 식사동 814  
동국대학교 한의과대학 내과학교실  
TEL: 031-961-9043 E-mail: omdlsw@naver.com
- 본 논문은 2013년도 동국대학교 대학원 한의학 석사학위 논문을 정리한 연구임.

인체에 대한 공격인자와 방어인자와 관련하여 韓醫學에서는 正氣와 邪氣에 대한 개념이 있는데, 正氣가 虛하고 邪氣가 있는 病證에 正氣를 물질적으로 도와서 病邪에 대한 저항력을 증강시켜 질병을 극복하고, 臟腑의 氣血陰陽을 補益하여 기능을 회복시키고 개선시켜 人體의 抗病能力을 증진하려는 경우에 補益劑를 응용하며<sup>5</sup>, 면역력을 강화시키고 인체의 방어작용을 회복시키는 효과를 기대할 수 있다.

六味地黃湯은 錢乙의 小兒藥證直訣에 地黃元이라는 이름으로 최초로 수록된 처방으로 “治腎怯失音 顛開不合神不足 目中白睛多 面色咣白等”이라 하였다. 이후 諸醫家들에 의하여 腎水不足, 陰虛陽亢, 先天元氣不足, 腎精不足으로 發生하는 諸症에 광범위하게 사용되었으며<sup>6</sup>, 또한 尹은 陰虛로 인하여 發生하는 모든 病症을 本方에 加減하여 治療한다고도 하였다<sup>7</sup>.

위점막 손상에 대한 연구 중 補益劑에 속하는 方劑를 활용한 경우로는 손 등<sup>8</sup>이 四君子湯合蒼朮地榆湯이 위점막손상에 미치는 영향을, 이 등<sup>9</sup>이 알코올로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 四物湯의 보호효과를, 김 등<sup>10</sup>이 스트레스와 에탄올로 유발된 mouse의 위점막 손상에 대한 歸脾湯의 예방효과를 보고하는 등의 연구가 있었으나 아직까지 六味地黃湯의 소화관 점막 손상과 내분비 조절에 대한 효과에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 六味地黃湯의 Gastrin 생성 조절을 통한 黏膜위염과 십이지장염의 완화효과를 규명하기 위하여, 알코올 처리를 통해 黏膜위염과 십이지장염 유발된 생쥐에 六味地黃湯을 투여한 후 위십이지장연결부에서 Gastrin, 표면점막상피, 점액분비세포, P물질, 융모, HSP70, NF-κB p65 그리고 iNOS 등의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

오리엔트(한국)에서 분양 받은 태령 6주된 ICR 수컷 생쥐를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 정상 대조군, 알코올 처리군(Alcohol Treatment) 이하(AT군), 육미지황탕추출액 투여군(Yukmijihwang-tang Treatment) 이하(YT군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

#### 2) 六味地黃湯의 제조

六味地黃湯 2첩(Table 1)을 각각 증류수 1000 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축하였다.

Table 1. The Amount and Composition of Yukmijihwang-tang

Herb	Scientific name	Amount (g)
熟地黃	<i>Rehmanniae radix preparat</i>	16
山藥	<i>Dioscoreae rhizoma</i>	8
山茱萸	<i>Corni fructus</i>	8
白茯苓	<i>Poria</i>	6
牡丹皮	<i>Moutan cortex radices</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
Total amount		50

### 2. 실험 방법

#### 1) 黏膜위염과 십이지장염 유발

黏膜위염과 십이지장염 유발을 위해 0.9% NaCl이 포함된 50% ethyl alcohol(Sigma, USA)을 10 ml/kg 씩 5일 동안 AT군과 YT군에 구강투여하였다.

#### 2) 六味地黃湯 투여

六味地黃湯을 YT군에 알코올 투여 후 3일 동안 2.5 ml/kg/day 량으로 구강투여 하였다.

#### 3) 조직표본제작

六味地黃湯 처리 3일 후 sodium pentobarbital

용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위 날문(pyloric part)과 상부 십이지장(duodenum)이 포함된 위십이장 연결부(gastroduodenal junction, GDJ)를 적출한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작되었다. 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) GDJ내 위산분비와 연동운동 인자 변화 관찰  
G세포에서 분비되어 위산분비, 위 연동운동 그리고 날문조임근(pyloric sphincter) 이완에 관여하는 호르몬인 Gastrin의 분포 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal rabbit serum (DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti Gastrin(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:200, Santa Cruz Biotech)에 4 °C humidified chamber에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex (ABC) kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 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.

#### 5) 날문위염 변화 관찰

(1) 중성점액분비세포의 분포 변화 관찰  
위산에 의한 자가분해(autolysis) 방벽작용을 하는 중성점액질(neutral mucin)을 분비하는 표면점액 세포의 변화를 조사하기위해서 periodic acid-schiff reaction(PAS) stain을 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15

분동안 처리하였다. 그런 다음 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분 동안 대조염색하였다.

#### (2) Substance P 생성 변화

장크롬친화세포(enterochromaffin cell, EC cell)에서 분비되어 위 연동운동에 관여하는 호르몬인 P물질(substance P)의 점막내 분포를 조사하기 위해 goat anti-mouse substance P(1:100, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### 6) 십이지장염 변화 관찰

##### (1) 용모(villi) 변화 관찰

용모와 호산성과립세포(paneth cells) 변화를 관찰하기 위해 Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경으로 관찰하였다.

##### (2) 점막 손상 스트레스 변화 관찰

스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 하나인 HSP70의 분포 변화를 관찰하기 위해 goat anti-mouse HSP70(1:100, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다

##### (3) NF-κB 활성 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 nuclear factor(NF)-κB의 분포 변화를 조사하기 위해 mouse anti mouse NF-κB p65(1:250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

##### (4) iNOS 생성 변화 관찰

염증 효소인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 조직내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1:250, Santa Cruz Biotech)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### 7) 영상분석과 통계처리

면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)을 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 유의성은 ANOVA test(SPSS17, SPSS, USA)를 통해 확인하였다.

### III. 결 과

#### 1. GDJ내 Gastrin 분비 조절

G세포에서 분비되어 위산 분비와 위 연동운동 증가에 관여하는 Gastrin은 알코올 처리 후 양성반

응의 증가가 점막 고유층에 관찰되었으며, 세포질에서 강하게 양성반응을 보였다. AT군은 대조군에 비해 Gastrin 양성반응이 1182% 증가하였다. 이에 반해 YT군에서는 AT군에 비해 Gastrin 양성반응이 87% 감소하였다(Table 2, Fig. 1).

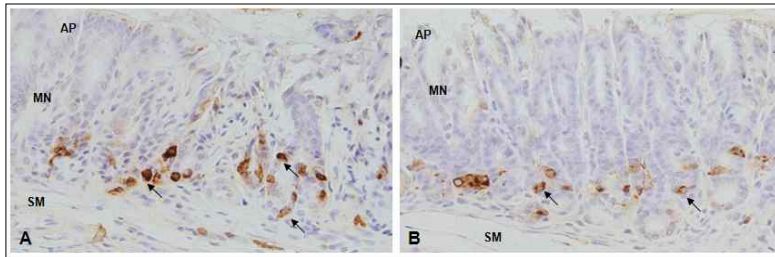


Fig. 1. The regulation effects of gastrin production by *Yukmijihwang-tang*.

A : The gastrin positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse. B : The gastrin positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria of mouse treated with *Yukmijihwang-tang* than only alcohol treated mouse. (gastrin immunohistochemistry, x200)  
 AP : apical surface of mucosa, MN : mucosa neck, SM : submucosa

Table 2. The Image Analysis for Regulation of Gastrin Production by *Yukmijihwang-tang*

Objective	Group		
	CON	AT	YT
Gastrin	9925±514	61968±897	19147±856*

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

CON : no treated mouse, AT : alcohol treated mouse, YT : *Yukmijihwang-tang* treated mouse after alcohol treatment

\* : P<0.05 compared with AT

#### 2. 날문위염 완화 효과

##### 1) GDJ내 출혈성 찰과 억제

알코올 투여 후 AT군의 GDJ내 점막에서는 출혈성 침식(hemorrhagic erosion)이 빈번하게 관찰되었으며, 일부지역에서는 점막하층(submucosa)까지 침투한 위궤양(gastric ulcer)이 발견되었다. 이에 반해 六味地黃湯을 처리한 YT군에서는 점막상층(apical surface)의 표면점막상피에서 AT군보다

약한 출혈성 침식이 관찰되었다(Fig. 2A, B).

##### 2) 점액분비세포 보호 효과

중성점액질을 분비하는 점액분비세포의 변화를 조사하기 위해 PAS 염색을 실시하였는데, 점막상층에 위치한 점액분비세포는 자주색으로 염색되었다. AT군의 출혈성 침식 주변에서는 PAS 염색에 대한 양성반응이 관찰되지 않았다. 이에 반해 YT군에서는 PAS 양성반응을 보이는 많은 수의 점액분비세포가 관찰되었다(Fig. 2C, D).

##### 3) P물질 생성 조절 효과

알코올 처리 후 장크롬친화세포에서 분비되어 위 연동운동에 관여하는 호르몬인 P물질의 양성반응은 점막 고유층에서 증가한 것으로 관찰되었으며, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. AT군은 대조군에 비해 P물질 양성반응이 4200% 증가하였다. 이에 반해 YT군에서는 AT군에 비해 P물질 양성반응이 87% 감소하였다(Table 3, Fig. 3E, F).

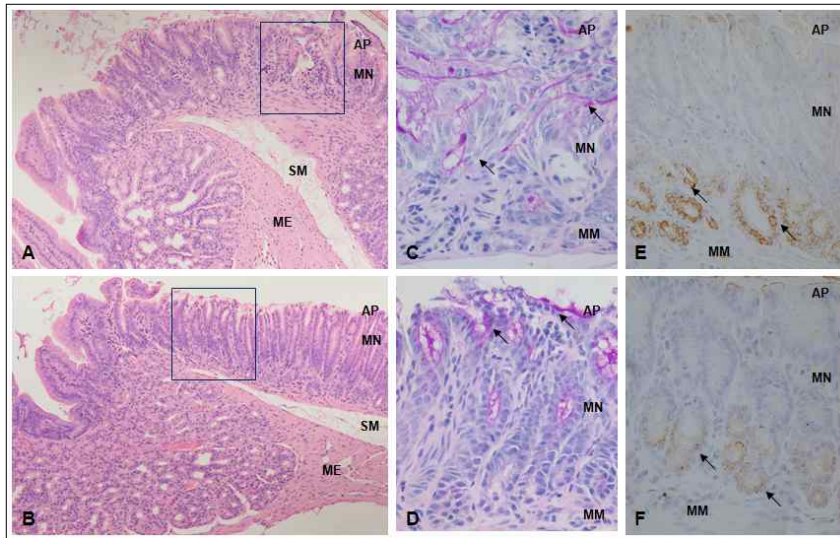


Fig. 2. The mitigative effects of antral gastritis by *Yukmijihwang-tang*.

A : The hemorrhagic erosion & ulceration (square) were increased in mucosa of only alcohol treated mouse. B : The hemorrhagic erosion & ulceration (square) were decreased in mucosa of mouse treated with *Yukmijihwang-tang* than only alcohol treated mouse (H & E, x40). C : The PAS positive reaction (arrow) were disappeared in mucosa of only alcohol treated mouse. D : The PAS positive reaction (arrow) were repaired in mucosa of mouse treated with *Yukmijihwang-tang* (PAS, x400). E : The substance P positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse. F : The substance P positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria (substance P immunohistochemistry, x400).

AP : apical surface of mucosa, ME : muscularis externa, MN : mucosa neck, SM : submucosa

Table 3. The Image Analysis for Regulation of Substance P Production by *Yukmijihwang-tang*

Objective	Group		
	CON	AT	YT
Substance P	2221±190	95492±750	19220±664*

(image analysis for 10,000,000 particles / range of intensity : 80-100)  
 CON : no treated mouse, AT : alcohol treated mouse, YT : *Yukmijihwang-tang* treated mouse after alcohol treatment

### 3. 십이지장염 완화 효과

#### 1) 용모 손상 완화

AT군의 일부 용모에서 표면흡수세포는 손상된 형태로 나타났고, 술잔세포(Goblet cell), 흡수세포(absorptive cell), 장내분비세포(enteroendocrine cells)

등의 배열도 사라졌다. 또한 호산성과립세포(Paneth cells) 내의 과립도 분비되어 세포질이 비어있었다. 점막고유층에는 많은 수의 염증관여세포의 침윤(infiltration)이 확인되었고, 일부는 점막하층까지 확대되었다. 이에 반해 YT군에서는 표면흡수세포의 손상과 점막고유층에서 염증관여세포의 침식이 적은 것으로 관찰되었다(Fig. 3A, B).

#### 2) 점막 손상 스트레스 완화

알코올 투여 후 스트레스에 대한 완충적 물질인 HSP70의 양성반응세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응세포의 핵과 주변세포질에서 강하게 양성반응을 보였다. AT군은 대조군에 비해 HSP70 양성반응이 445% 증가하였다. 이에 반해 YT군에서는 AT군에 비해 HSP70 양성반응이 69% 감소하였다(Table 4, Fig. 3C, D).

3) NF-κB 활성 억제

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF-κB p65의 양성반응세포의 분포는 대조군에 비해 AT군에서는 증가하는 반면, YT군은 AT군에 비해 감소하였다. 이런 NF-κB p65 양성반응세포는 점막고유층에 분포하였고, 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. NF-κB p65 양성반응의 영상분석 결과 AT군은 대조군에 비해 1066% 증가하였고, YT군은 AT군에 비해 58% 감소하였다(Table

4, Fig. 3E, F).

4) 염증효소 iNOS 분포 변화

핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 iNOS 양성세포는 점막고유층에서 관찰되며 대조군에 비해 AT군에서는 증가하는 반면, YT군은 AT군에 비해 감소하였다. iNOS 양성반응의 영상분석 결과 AT군은 대조군에 비해 3031% 증가하였고, YT군은 AT군에 비해 85% 감소하였다(Table 4, Fig. 3G, H).

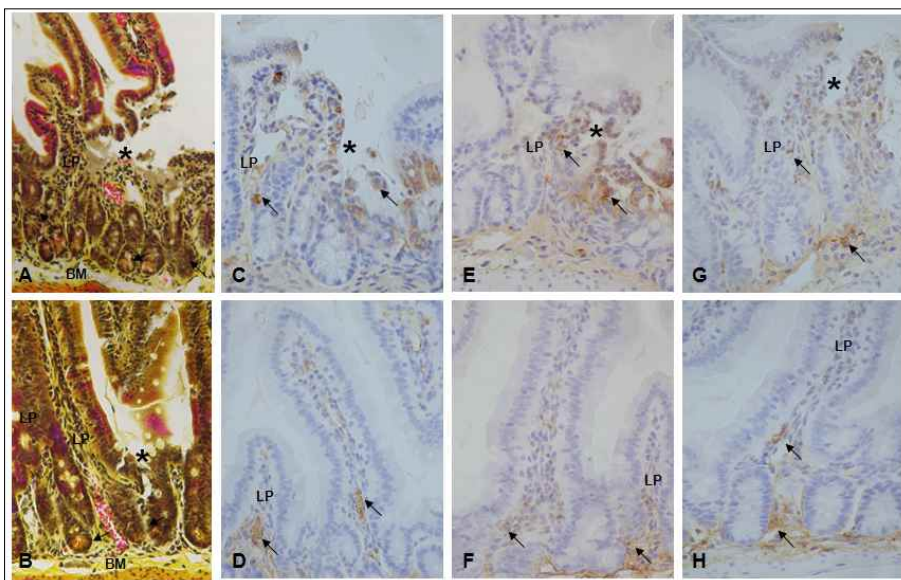


Fig. 3. The mitigative effects of duodenitis by *Yukmijihwang-tang*.

A : The damage of villi as disappearance of absorptive cell (asterisk), infiltration of inflammatory cell, and vacant paneth cell (arrow), were increased in duodenum of only alcohol treated mouse. B : The damage of villi were repaired in duodenum of mouse treated with *Yukmijihwang-tang* than only alcohol treated mouse (Phloxine-tartrazine, x400). C : The heat shock protein (HSP) 70 positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse. D : The HSP70 positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria (HSP70 immunohistochemistry, x400). E : The nuclear factor (NF)-κB p65 positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse. F : The NF-κB p65 positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria (NF-κB p65 immunohistochemistry, x400). G : The inducible nitric oxide synthase (iNOS) positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse. H : The iNOS positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria (iNOS immunohistochemistry, x400). AP : apical surface of mucosa, BM : basement membrane, MN : mucosa neck, SM : submucosa



Table 4. The Image Analysis for Mitigative Effects of Duodenal Damages by *Yukmijihwang-tang*

Objective	Group		
	CON	AT	YT
HSP70	16416±404	89501±767	27673±622*
NF-κB p65	3567±122	41588±814	17551±619*
iNOS	1891±88	59215±838	8888±111*

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

HSP70 : The heat shock protein 70, NF-κB p65 : nuclear factor κB p65, iNOS : inducible nitric oxide synthase, CON : no treated mouse, AT : alcohol treated mouse, YT : *Yukmijihwang-tang* treated mouse after alcohol treatment

#### IV. 고찰

위·십이지장점막은 산과 펩신뿐만 아니라 외인성 인자(NSAIDs, 알코올 등) 또는 내인성 인자(담즙산, lysolecithin 등)에 의하여 쉽게 손상받을 수 있으나 위가 지닌 고유의 방어기능 때문에 정상일 때에는 이들로부터 손상을 받지 않는 방어능력을 가지고 있다<sup>11</sup>.

위 점막 손상은 점막을 보호하는 방어인자와 점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형이 깨어져, 점막과 점막하 조직이 결손을 일으켜 위염과 소화성 궤양을 주도하는데<sup>12</sup>, 주로 1차 보호장벽인 점액 분비세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상은 위산과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandin분비 감소, 세포분열의 억제 등을 들 수 있다<sup>13</sup>.

위염과 소화성궤양은 한의학적으로 “胃脘痛”, “嘈雜”, “吞酸”, “嘔吐”, “腹脹” 등의 범주에 속하는데<sup>14</sup>,脾胃虛寒, 肝胃不和, 胃陰不足, 脾胃濕熱, 瘀血阻絡 등으로 辨證하며, 溫中健脾, 散寒止痛, 疏肝理氣, 緩急止痛, 養陰和胃, 潤燥止痛, 清熱利濕, 活血化瘀, 通絡止痛 등의 治法을 적용한다<sup>15</sup>.

六味地黃湯은 錢乙의 小兒藥證直訣에 地黃圓이라는 이름으로 최초로 수록된 처방으로 “治腎怯失

音 顛開不合神不足 目中白睛多 面色咣白等”이라 하였다. 이후 諸醫家들에 의하여 腎水不足, 陰虛陽亢, 先天元氣不足, 腎精不足으로 發生하는 諸症에 광범위하게 使用되었으며, 또한 尹은 陰虛로 인하여 發生하는 모든 病症을 本方에 加減하여 治療한다고도 하였다.

구성 약물을 살펴보면 熟地黃은 腎精을 滋養하는 君藥이고, 山茱萸는 肝腎澁精하고, 山藥은 補脾肺陰 益精하는 臣藥이다. 이들 세약을 배오하면 腎肝脾의 三陰을 함께 補하는 效능이 있다. 여기에 茯苓을 배오하여 脾濕을 滲濕함으로써 山藥의 益脾 작용을 돕고, 澤瀉를 배오하여 腎火를 清泄하는 동시에 熟地黃의 滋膩한 성질을 막으며, 牡丹皮를 배오하여 肝火를 식혀 涼血하는 동시에 山茱萸의 溫한 성질을 억제하는데, 이들은 모두 佐使藥으로서 瀉하는 作用을 한다<sup>16</sup>.

六味地黃湯의 기존 실험적 연구로, 최 등<sup>17</sup>의 六味地黃湯加減方이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향, 신 등<sup>18</sup>의 六味地黃湯加減方이 골형성 관련 유전자인 TG2와 BMP4의 전사활성에 미치는 영향, 김<sup>19</sup>의 六味地黃湯이 허혈-재관류에 의한 급성 신부전에 미치는 효과, 전 등<sup>20</sup>의 六味地黃湯이 면역세포에 미치는 실험적 효과, 문 등<sup>21</sup>의 六味地黃湯의 항산화작용에 관한 연구 등, 주로 인지기능, 골형성, 신장 조직 보호효과, 면역기능 조절, 항산화 등에 대한 연구가 주를 이루었으며, 그 외에 임상에서 김 등<sup>22</sup>의 재발성 아프타성 구내염 환자에서 구강점막 손상에 대한 加味六味地黃湯의 완화효과에 대한 보고가 있었을 뿐, 소화관에서의 점막 손상과 내분비 조절에 대한 六味地黃湯의 효과에 대해 보고된 바는 없었다.

이에 저자는 六味地黃湯의 Gastrin 생성 조절을 통한 날문위염과 십이지장염의 완화효과를 규명하기 위하여, 알코올 처리를 통해 날문위염과 십이지장염 유발된 생쥐에 六味地黃湯을 투여한 후 위십이지장연결부에서 Gastrin, 표면점막상피, 점액분비세포, P물질, 응모, HSP70, NF-κB p65 그리고

iNOS 등의 변화를 관찰하였다.

Gastrin은 위의 날문부근과 십이지장 구부에 존재하는 G세포에서 분비되는데 위산과 펩신의 분비와 위의 운동을 촉진한다<sup>23</sup>. 산과 펩신은 궤양의 병인으로 빼놓을 수 없는 중요한자인데, 십이지장궤양은 구부에 과다하게 부하된 산이 일차적인 병인이라 할 수 있고 위궤양은 만성 위염이나 비스테로이드성 소염제, 역류된 담즙, 흡연 또는 알코올 섭취 등에 의하여 이미 위점막 장벽이 파괴된 환경에 2차적으로 산이 작용하여 발생한다. 1910년 Schwartz는 “궤양은 위액 내 산과 펩신의 자가소화능력이 위 또는 장점막이 지닌 방어기전보다 높은 경우에 발생한다”는 사실을 밝히고 ‘No Acid or No Pepsin: No Ulcer’ 개념을 궤양이 발생하는 필수 불가결의 요인으로 정의하였다<sup>11</sup>.

본 실험에서 Gastrin은 알코올 처리 후 양성반응의 증가가 점막 고유층에 관찰되었으며, 세포질에서 강하게 양성반응을 보였는데, 알코올과 같은 해로운 물질의 노출에 의해 G-cell이 활성화 되면 이로 인해 Gastrin 방출이 증가되며 Gastrin은 위벽세포 막에 존재하는 CCK<sub>1</sub> receptor에 의해 세포 안으로 유입되며 그 후 세포내 자극 조절자인 Cyclic AMP나 Ca<sup>2+</sup>를 통해 protein kinase를 활성화 시켜 proton pump 활성화에 관여하는 cytoplasmic protein을 인산화시키고 결과적으로 위산분비를 증가시킨다<sup>24</sup>. 六味地黄湯 추출물을 처리하였을 때 Gastrin 양성반응이 감소하였으며, 이로써 위산의 분비를 감소시키고 자극으로 인한 위의 연동운동 증가가 다시 정상화 될 것으로 보이며 파괴된 위점막 장벽에 산이 과다하게 작용하여 2차적으로 위점막 손상을 일으키는 부분을 예방하여 위염 및 십이지장염의 진행을 완화할 수 있을 것으로 보인다.

위점막(gastric mucosa)과 점막하 조직의 결손(hemorrhage infarct and erosion)은 궤양(ulcer)을 유발하는데, 주로 1차 보호장벽인 점액 분비세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상은 위산과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단,

내재성 prostaglandins의 분비 감소, 세포분열의 억제 등에 의한다<sup>13</sup>.

본 실험에서 알코올 투여 후 AT군의 GDJ내 점막에서는 출혈성 침식(hemorrhagic erosion)이 빈번하게 관찰되었고, 일부지역에서는 점막하층(submucosa)까지 침투한 위궤양(gastric ulcer)이 발견되었으며, PAS 염색에서도 출혈성 침식 주변에서는 PAS 염색에 대한 양성반응이 관찰되지 않는 것으로 보아 조직손상이 심한 곳에는 산성의 환경으로 보호될 수 있는 중성점액질을 분비하는 점액분비세포가 손상되어 있음을 알 수 있었다. 또한 장크롬친화세포에서 분비되어 위 연동운동에 관여하는 호르몬인 P물질의 양성반응은 점막 고유층에서 증가한 것으로 관찰되었으며, 세포질에서 강한 양성반응을 보였는데, 이는 유해 자극에 의해 위 연동운동 증가로 이어짐을 추측할 수 있었다. 이에 반해 六味地黄湯을 처리한 YT군에서는 점막상층(apical surface)의 표면점막상피에서 AT군보다 약한 출혈성 침식이 관찰되었으며, PAS 양성반응을 보이는 많은 수의 점액분비세포가 관찰되어 점막조직의 손상을 완화시킴을 볼 수 있었으며, P물질의 양성반응 역시 감소하는 것으로 보아 위 연동운동을 안정화시킬 것으로 추측할 수 있다.

십이지장의 형태 변화 관찰에서는 알코올 투여 후 AT군의 일부 용모에서 술잔세포(Goblet cell), 흡수세포(absorptive cell), 장내분비세포(enteroendocrine cells) 등의 배열도 사라졌으며, 호산성과립세포(Paneth cells) 내 과립도 분비되어 세포질이 비어있었다. 점막고유층에는 많은 수의 염증관여세포의 침윤(infiltration)이 확인되었고, 일부는 점막하층까지 확대되었다. 이에 반해 YT군에서는 표면흡수세포의 손상과 점막고유층에서 염증관여세포의 침식이 적은 것으로 관찰되었는데, 알코올로 인한 직접적인 점막 손상의 회복을 돕고 염증관련 물질 억제에 따른 염증성 점막손상을 막은 결과로 사료된다.

점막손상은 외부로부터 가해지는 여러 가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기위한 스트레스 단



백질의 합성 증가를 유도하며, 열충격 단백질(HSP) 군이 대량 합성하고, 단백질의 하나인 HSP70은 환경적 스트레스에 의해 변성된 단백질 간의 상호 응축을 감소시키거나 새롭게 합성되어지는 폴리펩타이드의 적절한 결합과 세포내 이동위치를 조절함으로써 세포를 보호하는 molecular chaperone으로 작용한다<sup>25</sup>. 六味地黃湯 투여로 인한 점막의 보호효과도 보호단백질 합성 촉진과 관계가 있는 것으로 사료된다. HSP70은 정상적으로 세포질 내에 위치하다가 스트레스가 가해지면 핵 내 핵소체 주위로 이동하며 회복기에 들어서면 다시 세포질로 돌아간다<sup>26</sup>. AT군에서 HSP70의 양성반응세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응세포의 핵과 주변세포질에서 강하게 양성반응을 보였고, 이에 반해 YT군에서는 AT군에 비해 양성반응이 감소되었는데 이는 점막손상의 완화에 따른 결과로 보인다.

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 전염증 효소 TNF-α의 생성을 촉진하게 되며 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<sup>27</sup>. 특히 NF-κB 활성화는 혈관투과성의 증가를 유도하는 iNOS 증가를 통해 염증 반응의 가속화에 의한 조직손상을 유도한다<sup>28</sup>.

iNOS는 ROS의 일종인 NO를 생성하는데, NO는 세포내 2차 신호전달자로서 전염증성 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 생체 내 고농도의 NO생성은 숙주세포의 파괴, eosinophil의 증가 유

도, shock에 의한 혈관확장, 염증 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지고 있다. iNOS 발현 증가는 혈관투과성의 증가를 유도하여 oxidation stress를 증가시켜 염증에 의한 조직 손상을 가속화 시킨다. 또한 생성된 NO는 superoxide anion의 반응으로 peroxynitrite나 hydroxyl radical이 형성되고<sup>29</sup>, 이는 세포막지질을 peroxidation시키며, thiorl, SH기를 oxidation하여 세포독성을 유발한다<sup>30</sup>. 또한 단백질인 tyrosine에 nitration을 시켜 3-nitrotyrosine을 형성하여 세포대사에 중요한 cytochrome p450을 억제하거나, protein phosphorylation을 억제하고 DNA 합성에 관여하는 효소계를 억제하는 독성효과가 있다<sup>31</sup>. 면역조직화학 염색 결과 핵과 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 NF-κB p65와 iNOS의 양성반응세포는 점막고유층에서 관찰되었는데, 대조군에 비해 AT군에서는 증가하는 반면, YT군은 AT군에 비해 감소하였는데, 六味地黃湯이 NF-κB의 활성을 억제시킴으로 혈관투과성의 증가를 유도하는 iNOS 증가를 억제 하여 따라 염증성 점막손상이 완화됨을 알 수 있다.

본 실험을 통해 六味地黃湯은 위십이지장염결부에서 Gastrin 생성 감소를 통해 위산 분비를 감소시켜 이차적인 점막손상을 차단하는 것으로 생각되며, 위·십이지장 점막 손상의 완화, 점막 방어장벽의 보호, 자극에 의한 연동운동 증가 완화, 점막내 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 향후 위·십이지장 점막 손상과 관련된 소화기 질환에서 六味地黃湯의 임상적 활용 범위를 넓힐 수 있을 것이나, 六味地黃湯의 작용기전 및 개별 약제간의 상호작용 등에 대해서 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## V. 결론

六味地黃湯의 Gastrin 생성 조절을 통한 날문위염과 십이지장염의 완화효과를 조사하기 위해 행

해진 본 연구는 알코올 처리를 통해 날문위염과 십이지장염이 유발된 생쥐에 六味地黃湯 처리 후 위십이지장연결부에서 Gastrin, 표면점막상피, 점액 분비세포 그리고 P물질, 십이지장에서 용모, HSP70, NF- $\kappa$ B p65 그리고 iNOS 등의 변화를 관찰하였다. 六味地黃湯 처리 생쥐에서는 위·십이지장연결부에서 gastrin 생성 감소(위산 분비 감소), 표면점막상피에서의 출혈성 침식 완화, PAS 양성반응 증가(중성점액질 분비에 따른 보호장벽 회복), P물질 생성 감소(연동운동 감소)가 일어났다. 십이지장에서 용모 손상 완화, HSP70 감소(점막 손상 스트레스 완화), NF- $\kappa$ B p65와 iNOS 생성 감소(염증 감소)가 일어났다. 이상의 결과로 六味地黃湯은 gastrin 생성 조절을 통해 위산 분비 조절에 관여하고, 위·십이지장의 점막 손상과 염증을 완화시키는 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Wallace JL. Mucosal defense. New avenues for treatment of peptic ulcer disease? *Gastroenterol Clin North Am* 1990;19:87.
- Ostensen H. Smoking, alcohol, coffee and familial factors : Any Associations with Peptic ulcer Disease? *Scan J Gastroenterol* 1985;20:1227.
- Ramakrishnan K, Salinas RC. Peptic ulcer disease. *Am Fam Physician* 2007;76:1005-12.
- 신용태, 문영명 역. Step to internal medicine pathophysiology로 이해하는 내과학 소화기질환 (6). 서울: 정담; 2002, p. 63-79.
- 한의학대학 방제학교수. 방제학. 서울: 영림사; 1999, p. 271
- 李鳳敎. 症狀鑑別治療. 서울: 成輔社; 1992, p. 467-8.
- 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울: 明寶出版社; 1994, p. 319-21.
- 손정숙, 임성우. 四君子湯合蒼朮地榆湯이 위점막 손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 1999; 20(2):231-48.
- 이성환, 임성우. 알코올로 유발된 생쥐의 위점막 손상에 대한 四物湯의 보호효과. 대한한의학회지 2004;25(3):1-11.
- 김학재, 최준혁, 임성우. 스트레스와 에탄올로 유발된 mouse의 위점막손상에 대한 歸脾湯의 예방효과. 대한한의학회지 2003;24(1):155-68.
- 김정룡. 소화기계 질환. 서울: 일조각; 2011, p. 193-4.
- 순천향대 의과대학 소화기연구소 편. 소화기학. 서울: 고려의학; 2000, p. 181-200.
- Arlt GD, Leyh M. Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. *Langenbeck's Arch Surg* 2001;386:75-81
- 何春水. 易之 主編. 精選千家妙方. 北京: 學苑出版社; 1996, p. 81-114.
- 류재환. 통합의학개론. 서울: 경희대학교 출판문화원; 2013, p. 266-7.
- 배병철. 표준임상방제학. 서울: 정보사; 1995, p. 244
- 최보엽, 배현수, 신민규, 홍무창. 육미지황탕가미방이 흰쥐의 기억능력과 중추신경계 유전자 발현에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2002; 16(5):1025-34.
- 신용욱, 박용일, 김홍렬, 이승세. 육미지황탕가미방이 골형성 관련 유전자인 TG2와 BMP4의 전사활성에 미치는 영향. 대한한의학회지 2002; 23(2):190-7.
- 김명규. 육미지황탕이 허혈-재관류에 의한 급성 심부전에 미치는 효과. 원광대학교 대학원 2005.
- 전진오, 정현우. 육미지황탕이 면역세포에 미치는 실험적 효과. 대한한방내과학회지 2000;21(2): 243-50.
- 문성식, 김병수, 강정수. 육미지황탕의 항산화 작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 2003; 17(2):436-42.

22. 김주연, 김진성, 손지희, 선종기, 강경, 장승원, 손지영, 류봉하. 재발성 아프타성 구내염 환자에 대한 가미육미지황탕의 효능. *대한한방내과학회지* 2012;33(2):231-42.
23. 문영수 역. *Step Internal Medicine Gastroenterology*. 서울: 한국의학; 2011, p. 19.
24. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. *J Physiol Pharmacol* 2005;56: 507-30.
25. De Maio A. The heat-shock response. *New Horiz* 1995;2:198-207.
26. Valazquez JM, Lindquist SH. Hsp 70 - Nuclear concentration during enviromental stress and cytoplasmic stroage during recovery. *Cell* 1984;36 :655-22.
27. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B - Ten years after. *Cell* 1996;87(1):13-20.
28. Baeuerle PA. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell* 1998; 95(6):729-31.
29. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343(8907):1199-206.
30. 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.
31. Villa LM, Salas E, Darley-USmar VM, Radomski MW, Moncada S. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(26):12383-7.