

HCl에 의한 식도염에서 식도와 하부괄약근의 점막과 근육세포의 염증변화

이승준 · 김창종 · 손의동 · 이무열* · 신용규* · 심상수#

*중앙대학교 약학대학, 의과대학

(Received November 3, 2001; Revised December 13, 2001)

Inflammatory Changes in Esophagus and Lower Esophageal Sphincter of HCl-elicited Esophagitis in Cats

Seung June Lee, Chang Jong Kim, Uy Dong Sohn, Moo Yeol Lee*,
Yong Kyoo Shin* and Sang Soo Sim#

*College of Pharmacy, College of Medicine,
Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Abstract — The underlying mechanism by which the reflux of gastric juice elicits esophagitis remains unclear. To investigate inflammatory response to HCl in tissue of esophagus and lower esophageal sphincter, experimental esophagitis was elicited by perfusion of 0.1 N HCl in cats. There was no difference in phospholipase A₂ (PLA₂) activity of tissue between control and esophagitis. Myeloperoxidase activity in esophagitis was significantly greater than that of control. However, histamine content in esophageal mucosa of esophagitis was significantly smaller than that of control. These findings suggest that inflammatory response to HCl in esophagitis is related to changes of myeloperoxidase activity and histamine rather than change of PLA₂ activity.

Keywords □ Esophagitis, phospholipase A₂, myeloperoxidase, histamine

지금까지 식도염을 유발하는 병인적 기전은 밝혀지지 않았으며, 식도염을 유발하는 인자도 다양한 것으로 알려져 있다. 식도염을 일으키는 인자로서 식도나 하부 괄약근의 신호전달계 변동, 체내의 산화성 스트레스를 유발하는 산소 유리기 (reactive oxygen species), 근이완이나 상해에 역할을 하는 NO 및 위산 (HCl)을 들 수 있다. 병리적인 조건에서 하부식도괄약근 (lower esophageal sphincter)의 긴장도 (tone)가 저하되면 위산이 식도로 역류되는 현상이 일어난다. 특히 수면 중에 위산이 식도 쪽으로 역류하는 빈도가 많아지면 생리적인 삼킴 (swallow)현상에 이상이 생겨 장기간 산이 식도 내에 남게 되어 만성적인 염증, 흡입성 폐염 (aspiration pneumonia), 식도 협착 (esophagus strictures), Barrett's esophagus 등을 유발시킨다.¹⁻³⁾

이러한 인자 중에 어린이와 성인에서 가장 흔히 식도염을 일으키는 원인으로 위산의 역류를 생각할 수 있다.^{4,5)} 위산은 위장관 기능에서 필수불가결한 인자는 아니지만 위기능에 있어서 중

요한 작용을 하고 있다. 보통 위산의 pH는 2-3으로 약 1 mM에서 10 mM 농도를 나타낸다. 이와 같이 pH가 낮은 위산이 점액 질로 방어할 수 없는 식도에 노출시 점막세포의 손상을 일으키는 것은 일반적인 사실로 알려져 있으며, 한편 점막의 손상은 식도와 하부괄약근의 기능을 담당하는 평활근에도 영향을 미칠 가능성을 제기할 수 있다. 그러나 식도염에서 점막과 근조직에서의 염증 기전에 대한 결과는 미비한 상태이다. 손상된 조직에서 가장 대표적인 염증반응으로 arachidonic acid의 유리 및 비만세포로부터의 histamine 유리 및 neutrophil의 침윤을 들 수 있다.^{6,8)} 그러므로 이 실험에서는 고양이에서 실험적으로 식도염을 일으켜 식도와 하부괄약근의 점막과 평활근에서 염증 변화를 관찰하기 위하여 phospholipase A₂ (PLA₂)활성과 histamine 양 및 myeloperoxidase (MPO)활성을 측정하였다.

실험방법

실험동물 및 재료 - 수컷 고양이 (체중 1.8~2.5 kg)를 온도와 습도가 자동 조절되는 동물실험실에서 1주일간 물과 음식을 자유로이 섭취하며 안정화 시킨 후 실험을 수행하였다. o-

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) simss@cau.ac.kr

phthalaldehyde, hexadecyltrimethyl ammonium bromide, N,N-dimethylformamide, tetramethylbenzidine, histamine은 Sigma Chemical 회사로부터 구입하였으며, 10-pyren phosphatidylcholine는 Molecular Probe에서 구입하였다.

식도염 유발 - 고양이를 ketamine(25~30 mg/kg, 근육주사) 마취하에서 상부식도와 위에 구멍이 난 카테타를 삽입한 후 0.1 N 염산을 분당 1 ml로 매일 45 분씩 3 일간 연속 처치하였다.^{4,5)} 매일 산을 관류한 후 깨어나기를 기다려 다음날 염산 관류때까지 음식과 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 식도염의 확인은 염산을 관류시키면 LES tone의 저하와 식도근 운동성이 저하되는데 이러한 현상은 염산을 관류하는 날이 지날수록 점점 더 식도하부 괄약근의 tone이 감소하고 식도근의 운동성이 악화되는 현상을 이용하여 확인하였다. 3일째 염산을 관류시킨 고양이의 식도와 LES를 적출하여 산소가 공급되는 0~4°C Krebs-Henseleit 용액 (mM: NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.64, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.4, glucose 5.6, pH 7.4)에 넣고 연결조직과 지방 조직을 제거하였다. 염증이 일어난 부위의 점막조직과 평활근조직을 식도 부위와 LES 부위에서 적출하여 -70°C에 보관하여 PLA₂ 활성, histamine 양 및 MPO 활성 측정에 사용하였다.

PLA₂ 정량 - 염증 조직을 5배의 균질용액(mM: Tris 50, pH 7.4, EGTA 1, EDTA 0.5, MgCl₂ 3, dithiothreitol 1, phenylmethyl sulfonyl fluoride 0.5, leupeptin 2 µg/ml)을 이용하여 균질화시킨 후 형광을 발생하는 10-pyren phosphatidylcholine을 기질로 이용하여 PLA₂의 활성을 측정하였다. 10-pyren phosphatidylcholine은 Ex. 345 nm와 Em. 398 nm에 형광을 나타내며 PLA₂에 의해 가수분해시 형광이 감소하는데 이러한 원리를 이용하여 염증 조직에서 PLA₂의 활성 변화를 관찰하였다.⁹⁾

Histamine 정량 - PLA₂ 정량하기 위해 마련한 균질액을 이용하여 염증 조직 내에 있는 histamine의 양을 측정하였다. 적당한 양의 시료를 취한후 모든 tube에 증류수를 가하여 2 ml로 조절하고 1 N NaOH 0.4 ml를 가하여 잘 혼합하였다. 1% OPT (o-phthalaldehyde, 10 mg/ml in absolute methanol) 0.1 ml를 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 4 분 이상 배양하고 3 N HCl 0.2 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 96 well microplate에 200 µl씩 소분하여 형광측정(Ex. 355 nm/Em. 455 nm)을 하였다.¹⁰⁾

MPO 활성도 - 조직을 10배의 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide(HTAB)를 함유한 80 mM sodium phosphate buffer(pH 5.4)를 가한후 조직 homogenizer를 이용하여 균질화하고 11,200 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액 30 µl를 96-well plate에 가하고 200 µl의 혼합 반응액(80 mM sodium phosphate(pH 5.4) : 0.22M sodium phosphate (pH 5.4) : 0.017% H₂O₂=100 : 85 : 15)을 첨가하였다. 기질 용액인 N,N-dimethylformamide(DMF)에 녹인 18.4 mM tetramethylbenzidine(TMB) 용액을 20 µl를 가하고 37°C에서 3분간 반

응 시킨후 1.46M sodium acetate(pH 3.0) 30 µl를 가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 620 nm에서 측정하였으며, 순수 분리 정제된 peroxidase를 이용하여 조직내의 MPO 활성을 산출하였다.¹¹⁾ 모든 균질액의 단백질 정량은 BCA 방법을¹²⁾ 이용하여 실험 개체간의 오차를 줄이기 위해 실험 결과는 단위 단백질 양으로 환산하였다.

자료분석 및 통계처리 - 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며 실험 군간의 통계적 유의성은 analysis of variance (ANOVA)와 Newman-Keuls test로 하였으며 P 값이 0.05 미만 일 때 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

평활근과 점막 조직에서 PLA₂의 변화 - 대조군 식도 부위의 점막조직과 평활근 조직내 PLA₂의 활성은 각각 5.20±0.76과 5.26±0.44 µmol/min/mg protein이었으며, 하부괄약근 부위의 PLA₂의 활성은 각각 5.48±0.49과 4.8±0.64 µmol/min/mg protein이었다. 식도조직과 하부괄약근에서 PLA₂ 활성도는 이렇다할 차이가 없는 것으로 보였으며, 또한 점막조직과 평활근 조직사이에 있어서도 별 다른 차이가 없었다. 염산을 관류한 식도염 고양이에 있어서 점막과 평활근 조직에서의 PLA₂ 활성도는 조직 부위에 상관없이 대조군과 유사한 활성도를 나타내었다(Figs. 1 & 2). 이러한 결과로 보아 염산 자극에 의한 조직손상에 있어서 PLA₂ 활성도의 변화는 연관성이 없는 것으로 사료된다. glial 세포인 C6 세포에서 배양액의 pH를 7.0에서 6.0까지 산성으로 변화시키면서 arachidonic acid의 유리를 관찰한 실험에서도 arachidonic acid의 유리에 별다른 변화를 일으키지 못했다.¹³⁾ 한편 비만세포로 알려진 RBL-2H3 세포에서 2~10 mM HCl은 오히려 arachidonic acid의 유리를 농도 의존적으로 억제시키는 것

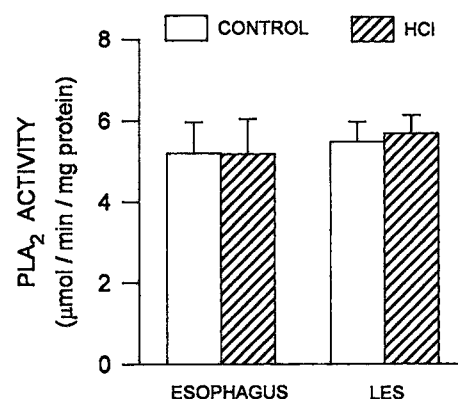


Fig. 1 - Changes of phospholipase A₂ (PLA₂) activity in mucosa of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Cats were perfused with 0.1 N HCl at a rate of 1 ml/min for 45 min during 3 consecutive days. Results indicate mean ± SE from five experiments.

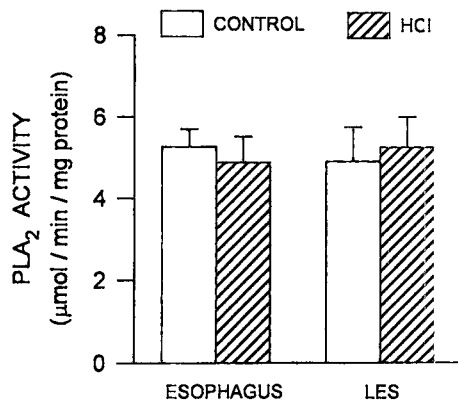


Fig. 2 - Changes of phospholipase A₂ (PLA₂) activity in smooth muscle of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Results indicate mean \pm SE from five experiments.

을 관찰하였다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 HCl에 의한 식도염의 발병기전에 PLA₂는 깊은 관련성이 없는 것으로 사료된다.

평활근과 점막 조직에서 MPO activity의 변화 - MPO 활성도는 호중성구(neutrophils)의 침윤을 나타내는 지표로 염증 조직 내에서 일반적으로 MPO activity는 증가하는 것으로 알려져 있다.^{14,15} 대조군 식도 부위의 점막조직과 평활근 조직내 MPO의 활성은 각각 1.13 ± 0.24 과 0.64 ± 0.13 mU/mg protein이었으며, 하부괄약근 부위의 MPO의 활성은 각각 1.13 ± 0.17 과 0.68 ± 0.15 mU/mg protein이었다. 식도조직과 하부괄약근에서 MPO 활성도는 이렇다할 차이가 없었으나 점막조직과 평활근 조직에 있어서는 점막조직에서 2배 정도 MPO의 활성도가 높게 나타났다.

염산을 관류한 식도염 고양이에서 식도와 하부괄약근부위의 점막조직에 있어서 MPO 활성도는 유의하게 증가하였으나 평활근에서는 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Figs. 3 & 4). MPO의 활성도의 증가가 점막에서 유의하게 증가하며 평활근에 있어

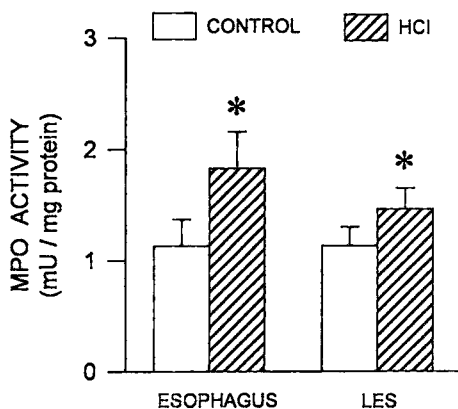


Fig. 3 - Changes of myeloperoxidase (MPO) activity in mucosa of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Results indicate mean \pm SE from five experiments. *P<0.05 significantly different from control.

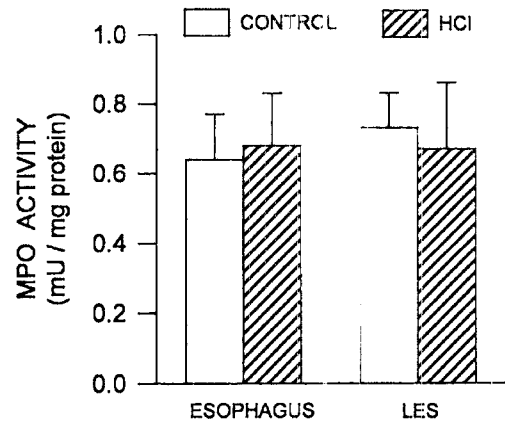


Fig. 4 - Changes of myeloperoxidase (MPO) activity in smooth muscle of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Results indicate mean \pm SE from five experiments.

서는 약간 증가하는 경향을 보이는 것으로 보아 점막 조직이 산에 의해 심한 조직 손상을 받은 것으로 사료된다.

평활근과 점막 조직에서 histamine content의 변화 - histamine은 비만세포나 호중성구에서 유리되어 염증 반응을 가속화시키는 염증 매개물질이다.¹⁶ 대조군 식도 부위의 점막조직과 평활근 조직내 histamine 양은 각각 10.72 ± 0.70 과 6.42 ± 1.11 μ g/mg protein이었으며, 하부괄약근 부위의 histamine의 양은 각각 9.03 ± 2.18 과 4.57 ± 5.65 μ g/mg protein이었다. 식도조직과 하부괄약근에서 조직 부위에 따른 histamine의 양은 이렇다할 차이가 없었으나 점막조직과 평활근조직에 있어서는 점막조직에서 1.7~2배 histamine의 양이 높게 나타났다. 이 결과는 비만세포가 근육조직보다는 점막조직에 더 많이 분포하고 있는 것을 제시한다. 염산을 관류한 식도염 고양이에서 식도와 하부괄약근부위의 점막조직에 있어서 histamine의 양이 유의하게 감소하였다(Figs. 5 & 6). 일반적으로 염증시 histamine의 양이 증가하는 것이 사실인데 이 실험에서 HCl을 관류한 점막에서 오

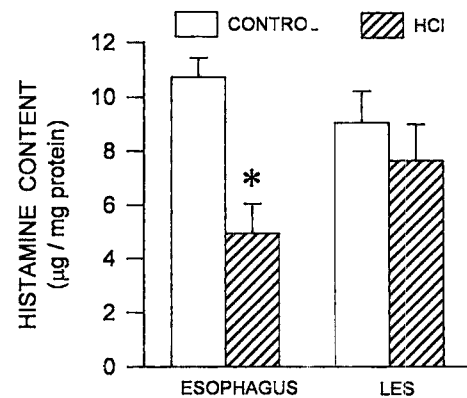


Fig. 5 - Changes of histamine content in mucosa of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Results indicate mean \pm SE from five experiments. *P<0.05 significantly different from control

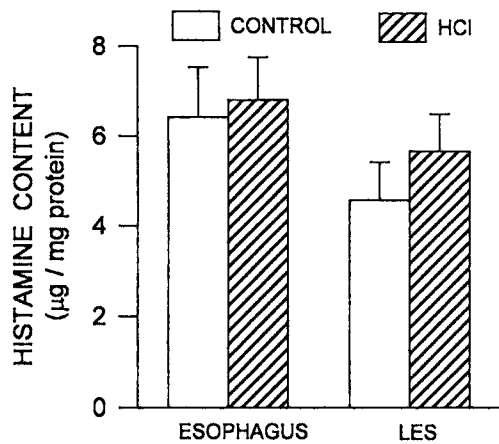


Fig. 6 - Changes of histamine content in smooth muscle of esophagus and lower esophageal sphincter (LES) of cats. Results indicate mean \pm SE from five experiments.

히려 histamine의 양이 감소한 것은 비만세포로부터 이미 많은 histamine의 탈과립이 일어났거나 심한 조직손상으로 인한 점막 조직의 탈락에 기인된 것으로 생각할 수 있다. 이러한 결과는 조직소견에 있어서 HCl을 관류할 때 점막조직이 손상되어 많은 비만세포가 탈락된 결과와 일치하고 있다(미발표 결과). 그러나 평활근에서는 HCl를 관류한 조직에서 histamine의 양이 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

결 론

역류된 위산에 의한 식도염 조직에서 염증반응을 관찰하기 위하여 HCl를 관류시키며 실험적으로 식도염을 유발시켰다. 실험적으로 유발시킨 식도염에서 PLA₂의 활성 변화는 점막이나 평활근에서 이렇다할 변화를 관찰되지 않았으나 MPO의 활성은 유의하게 증가하였으며, histamine의 양은 점막조직에서 유의한 감소를 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어 볼 때 위산에 의한 식도염 발병 이전에는 PLA₂보다는 비만세포로부터 유리되는 histamine과 neutrophile의 침윤이 밀접한 관련성이 있는 것으로 사료되며, 앞으로 비만세포 및 neutrophile에서 HCl의 염증 기전을 연구하는 것이 필요한 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (2000-1-21400-001-3) 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Dodds W. J., J. Dent, W. J. Hogan, J. F. Helm, R. Hauser, G. K.

Patel and M. S. Egide : Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *New Eng. J. Med.* **307**, 1547 (1982).

2) Helm J. F., Dodds W. J., Riedel D. R., Teeter B. C., Hogan W. J. and Arndorfer R. C. : Determinants of esophageal acid clearance in normal subjects. *Gastroenterology* **85**, 607 (1983).

3) Helm J. F., Dodds W. J., Pelc L.R., Palmer D. W., Hogan W. J. and Teeter B. C. : Effect of esophageal emptying and saliva on clearance of acid from the esophagus. *New. Eng. J. Med.* **310**, 284 (1984).

4) Biancani P. G., Billett C., Hillemeier M., Nissenshon B.Y., Rhim S., Sweczack and J. Behar : Acute experimental esophagitis impairs signal transduction in cat LES circular muscle. *Gastroenterology* **103**, 1199 (1992).

5) Sohn U. D., Zoukhri D., Dartt D., Sergheraert C., Harnett K. M., Behar J. and Biancani P. : Different PKC isozymes mediate lower esophageal sphincter (LES) tone and phasic contraction of esophageal (ESO) circular smooth muscle in the cat. *Mol. Pharmacol.* **51**, 462 (1997).

6) Attur M. G., Patel R., Thakker G., Vyas P., Levartovsky D., Patel P., Naqvi S., Raza R., Patel K., Abramson D., Bruno G., Abramson S. B. and Amin A. R. : Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE₂ production. *Inflamm. Res.* **49**, 20 (2000).

7) Petrone W. F., English D. K., Wong K. and McCord J. M. : Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1159 (1980).

8) Dana R., Leto T. L., Malech H. L. and Levy R. : Essential requirement of cytosolic phospholipase A₂ for activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 441 (1998).

9) Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F. and Bon C. : A sensitive and continuous fluometric assay for phospholipase A₂ using pyren-labeled phospholipids in the presence of serum albumin. *Anal. Biochem.* **177**, 103 (1989).

10) Ronnberg A.L. and Hakanson R. : A simplified procedure for the fluometric determination of histamine in rat stomach. *Agents Actions* **14**, 195 (1984).

11) Cuellar M. J., Giner R. M., Recio M. C., Just M. J., Manez S. and Rios J. L. : Effect of the basidiomycete *Poria cocos* on experimental dermatitis and other inflammatory conditions. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **45**, 492 (1997).

12) Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K. and Gartner F. H. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).

13) Sim S. S., Kim M. J., Yoon S. H., Kim C. J. and Jo Y. H. : The action of ATP on phospholipase A₂ activation in C6 cells.

Yakhak Hoeji 45, 413 (2001).

- 14) Goldblum S. E., Wu K. M. and Jay M. : Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 59, 1978 (1985).
- 15) Grisham M. B., Hernandez L. A. and Granger D. N. : Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.* 251, G567 (1986).
- 16) Benbarek H., Mouithys-Mickalad A., Déry-Dupont G., Deby C., Grulke S., Nemmar A., Lamy M. and Sertejn D. : High concentrations of histamine stimulate equine polymorphonuclear neutrophils to produce reactive oxygen species. *Inflamm. Res.* 48, 594 (1999).