

원 저

알코올로 유발된 생쥐의 위점막손상에 대한 사물탕의 보호효과

이성환, 임성우

동국대학교 한의과대학 내과학교실

The Defensive Effect of *Samooltang* on Injury of Gastric Mucous Membrane of Mouse by Ethanol

Seong-Hwan Lee, Seong-Woo Lim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : This study was carried out to investigate the effect of *Samooltang* (SMT) on the injury of gastric mucous membrane by ethanol in mice.

Methods : The normal group was mice with no inflammation. The control group was mice with gastro-inflammation elicited by ethanol. The sample group was SMT-administered mice before gastro-inflammation elicitation.

Results : In the immunohistochemical change, the distribution of SBA and COX-1 treated with SMT noticeably increased over the control group ($p<0.05$). The distribution of NF- κ B P50, COX-2, and TUNEL treated with SMT noticeably decreased over the control group ($p<0.05$). The distribution of SMT was the same as the normal group.

Conclusions : According to the above results, it is supposed that SMT would be helpful against gastritis and gastric ulcer caused by alcoholic drinks.

Key Words: *Samooltang*, mucous membrane, COX-1, NF- κ B P50, COX-2

서 론

위점막 손상은 위내벽의 점막, 점막하 조직 및 근육층까지 침범되는 조직의 결손으로, 위점막을 보호하는 방어인자와 위점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형을 깨뜨려 위염 및 소화성 궤양을 유발한

다^{1,2)}, 원인으로는 *Helicobacter pylori*(H.P)균 감염, NSAID(non-steroid anti-inflammatory drugs), 스트레스, 알코올 등이 있다³⁾.

이 중 알코올로 인한 위점막 손상은 한의학에서 酒傷이라 하여 음주과도로 인한 내상으로 정의된다⁴⁾. 알코올로 인한 위점막 손상에 대한 연구로, 채⁵⁾ 등의 葛花解醒湯이 酒傷으로 인한 위점막의 산화적 손상의 보호에 대한 보고가 있고, 김⁶⁾등의 歸脾湯이 七情傷과 酒傷으로 인한 위점막 손상에 예방효과에 관한 보고 등이 있다. 四物湯은 宋代《太平惠民和劑局方》에 “調益榮衛, 滋養氣血”한 처방으로 처음 기재되었고, 임상적으로 소화성 궤양의 예방 효과가 있는 처

· 접수 : 2004년 5월 4일 · 논문심사 : 2004년 6월 25일
· 채택 : 2004년 7월 2일
· 교신저자 : 임성우, 서울 강남구 논현동 37-21 동국대학교 부속 강남한방병원 비계내과학교실
(Tel : 02-3416-9732, Fax : 02-3416-9790, E-mail: omdlsw@hanmail.net)

* 본 연구는 동국대학교 연구지원으로 이루어 졌음

Table 1. The Amount and Composition of *Samooltang*(SMT) Extracts.

Species	Part used	Latin name	Weight (g)
<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCH.	roots	<i>Rehmanniae radix preparat</i>	10.00
<i>Paeonia lactiflora</i> PALL.	roots	<i>Paeoniae radix alba</i>	10.00
<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	roots	<i>Cnidii rhizoma</i>	10.00
<i>Angelica gigas</i> NAKAI	roots	<i>Angelicae gigantis radix</i>	10.00
Total amount			40.00

방으로 보고⁶⁾되었다. 실험적 연구로, 김⁷⁾은 간세포의 산화적 손상에 四物湯이 세포의 회복력을 증강시키는 치료효과가 있음을 보고하였고, 박⁸⁾, 김⁹⁾은 소화관 내 점막세포의 손상에 대한 四物湯의 방어효과에 대해 언급하였고, 유¹⁰⁾, 최¹¹⁾는 면역기능을 강화시키는 효과에 대해 보고하였다.

이상의 연구 결과를 바탕으로 저자는 四物湯이 酒傷으로 인한 소화기계 점막의 손상에도 일정한 예방 효과가 있을 것이라고 생각되어 생쥐를 대상으로 四物湯을 사전투여한 후 알코올로 인한 생쥐의 위장관 점막의 면역조직학적 변화를 관찰하여 유의한 방어 효과에 대한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 四物湯(Samooltang : SMT)은 《太平惠民和劑局方》에 준하여 동국대학교 부속 강남한방병원에서 조제된 것으로 1첩의 분량은 다음과 같다.

2) 동물

대한실험동물센터에서 분양받은 태령 4주된 ICR 계 수컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2. 방법

1) 동물의 준비

실험동물은 대조군, 알콜성 위점막 손상유발군(EIG군), 위점막 손상유발 전 四物湯 추출물 투여군(SMT군)로 나누었으며, 각 군 당 10마리를 배정하였다.

2) 검액의 제조와 투여

1첩을 증류수 500 ml에 넣고 2시간동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml로 감압농축하여 SMT군에 위점막 손상 유발 전 매일 2.5 ml/kg의 양으로 3일 동안 구강투여 하였다.

3) 알콜성 위점막 손상 유발

알콜성 위점막 손상을 유도하기 위하여 50% ethanol (Sigma, USA) 10 ml/kg를 EIG군과 SMT군에 경구 투여하여 유발시켰다.

4) 조직표본 제작

위점막 손상 유발 후 6시간이 경과되었을 때 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위점막 손상을 유발한 후 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μm 두께의 연속절편으로 만들었다. 위점막의 일반적인 형태변화를 관찰하기 위해 연속절편을 hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 한편 Semi-thin 절편 제작은 절취된 피부 절편을 1/2 Karnovsky 용액에 선고정한 후 1% OsO₄ 용액에 후고정하였다. Uranyl acetate에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. 조직절편은 ultramicrotome(LKB, Nova)으로 90 nm 두께로 절편을 만들어 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 피부 미세구조의 변화를 관찰하였다.

5) 면역조직화학적 변화 관찰

(1) 복합당질의 분포 변화 관찰

복합당질 (glycoconjugate)의 하나인 soybean agglutinin(SBA ; Sigma, USA)의 SM 추출액에 의한

Table 2. Sugar Specificities and Inhibitory Carbohydrate of Soybean Agglutinin (SBA)

Lectin	Optium ditution	Sugar specificity
SBA	4 $\mu\text{g/ml}$	D-N-acetylgalactosamine

위점막내 분포 변화를 조사하기 위해 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 조직을 실온에서 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma, USA)에 20분간 blocking한 다음 1:100으로 희석한 biotinylated anti SBA (Sigma, USA)에 4°C incubation chamber내에서 24시간동안 반응시켰다. 그후 ABC kit (avidin biotin complex; Vector Lab, USA.)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. Lectin 반응의 강도는 - (음성), + (약함), ++ (중간정도의 양성) 및 +++ (강한 양성) 등으로 표시하였다.

(2)점막 내 보호장벽의 변화

점막 상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 절편을 proteinase K (20 $\mu\text{g/ml}$)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum (DAKO, Denmark)에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse COX-1 (1:250, Chyman, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그후 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(1:100, DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였고, Steptavidin peroxidase(LSAB : DAKO)에 10분 동안 실온에서 반응시켰다. DAB 발색처리 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 한편 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질 (heat shock protein, HSP)의 하나인 Hsp70 분포변화를 관찰하기 위한 rabbit anti mouse Hsp70 (1:200, Santa Cruz Biotec, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

(3) 점막 내 염증관련 매개물질 관찰

점막 내 세포활성을 주도하는 protein kinase C (PKC), 염증관련 신호에 관여하는 nuclear factor (NF)- κ B p50과 COX-2 및 염증유발성 cytokine인 Interleukin-12 (IL-12)의 분포 변화를 조사하기 위해 rabbit anti-mouse PKC (1:200, Santa Cruz Biotec), rabbit anti-mouse NF- κ B p50 (1:200, Santa Cruz Biotec), rabbit anti-mouse COX-2 (1:500, Chyman) 및 rabbit anti-mouse IL-12B (1:200, Santa Cruz Biotec) 등의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

(4) 점막 내 세포증식변화 관찰

점막 내 세포증식의 변화를 관찰하기 위해 BrdU를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 조직을 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma, USA) 50 mg/kg을 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4°C와 37°C의 2N HCl 용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K가 포함된 normal goat serum (1:20)에 1시간동안 반응시켰다. 그후 mouse anti-mouse BrdU (1:50, Amersham, UK) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

6) TUNEL 방법

세포자기살해가 일어나는 apoptotic 세포의 분포변화를 조사하기 위해 in situ apoptosis detection kit (Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그후 strength TdT enzyme (36 μl TdT enzyme : 72 μl reaction buffer)을 처리하여 37°C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후

Table 3. The Distribution of SBA Distribution in SM Treated Mice before Gastropathy Elicitation.

Organ	Position	Group		
		CON	EIG	SMT
stomach	surface mucous cell	+++	-	++
	neck mucous cell	-	++	-
	parietal cell	+	++	+
	chief cell	++	-	++

Abbreviation : -, negative, +; weak, ++; moderate, +++; strong
CON; no treated mice,

EIG; Ethanol induced gastropathy elicited mice,

SMT; SM administered mice before gastropathy elicitation.

Table 4. The Image Analysis of COX-1 and Hsp70 of Gastric Mucosa in SM treated Mice before Gastropathy Elicitation.

Antibody	CON	Gastropathy	
		EIG	SMT
COX-1	2349 ± 124	1510 ± 86	1819 ± 91*
Hsp70	398 ± 21	10361 ± 421	1857 ± 142*

(image analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard Deviation;

*, $p < 0.05$ compared with EIG

Table 5. The Image Analysis of PKC, NF- κ B p50, COX-2, and IL-12B of Gastric Mucosa in SM treated Mice before Gastropathy Elicitation.

Antibody	CON	Gastropathy	
		EIG	SMT
PKC	490 ± 23	1159 ± 121	502 ± 34*
NF- κ B p50	987 ± 67	2292 ± 163	1294 ± 87*
COX-2	854 ± 35	2919 ± 147	1325 ± 84*
IL-12B	501 ± 29	2945 ± 163	1159 ± 75*

(image analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard Deviation;

*, $p < 0.05$ compared with EIG

Table 6. The Image Analysis of Cell Proliferation and Apoptosis of Gastric Mucosa in SM treated Mice before Gastropathy Elicitation.

Antibody	CON	Gastropathy	
		EIG	SMT
Apoptosis	867 ± 63	18173 ± 354	3615 ± 192*
BrdU	1982 ± 127	603 ± 41	1556 ± 83*

(image analysis for 200000 particles / range of intensity : 50 - 150)

Abbreviation : M ± S.D, Mean ± Standard Deviation;

*, $p < 0.05$ compared with EIG

DAB로 처리하여 Methyl green으로 대조염색하였다.

7) 영상분석과 통계

면역조직화학과 TUNEL 염색 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma Plot 2000 (Sigma)을 통한 student *t*-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 복합당질의 분포 변화

대조군에서 SBA 양성반응이 표면점액분비세포에서 강한 반응, 목점액분비세포에서 무반응, 벽세포와 주세포에서 중간정도의 반응을 보였다 (Table III). 그러나 EIG군의 위 점막에서는 표면점액분비세포에서 약한 반응이 나타날 뿐 그 외의 위 점막에서는 어떤 양성반응도 나타나지 않았다(Fig. 1, Table III). 이에 비해 SMT군에서는 표면점액분비세포에서 강한 반응, 목점액분비세포에서 무반응, 벽세포에서 약한 반응, 주세포에서 중등정도의 반응을 보여 대조군과 유사한 SBA 양성반응을 보였다(Fig. 2, Table III).

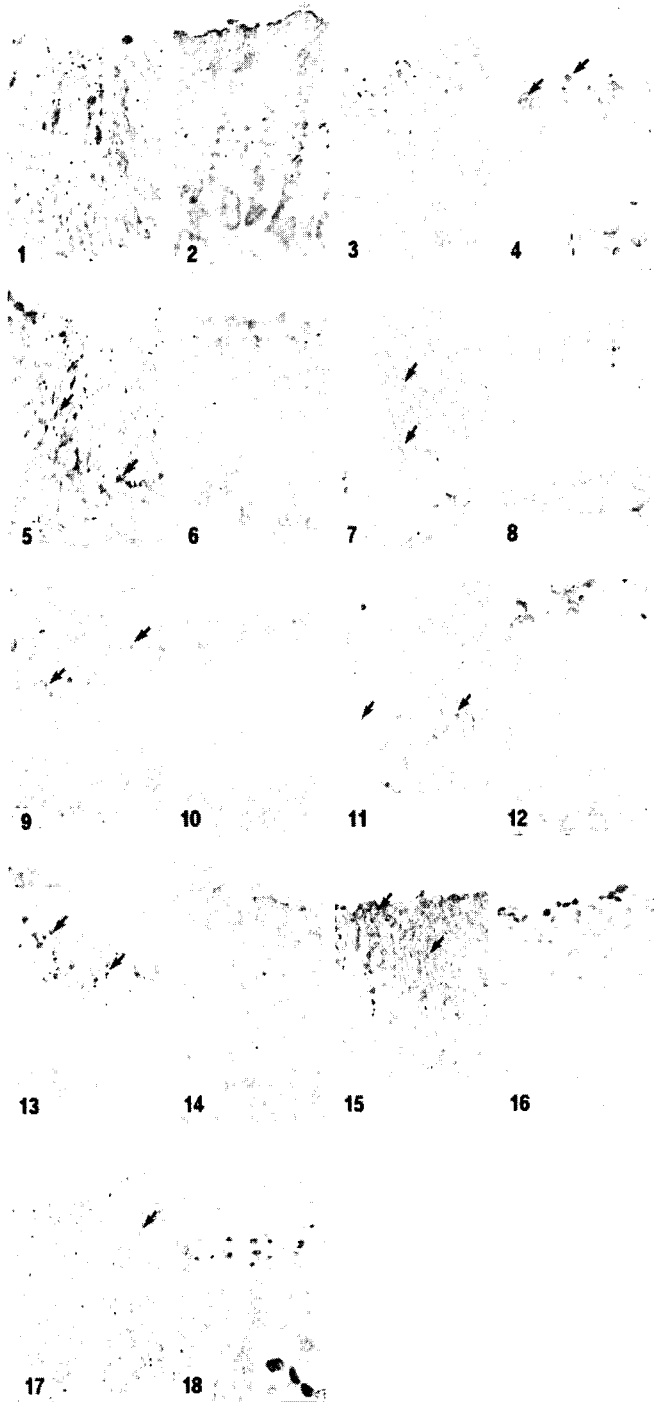
2. 점막 내 보호장벽 증가

대조군에서 점막 고유층과 표면상피에서 COX-1 양성반응세포는 핵 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 COX-1 양성반응세포의 분포가 감소하였다. 이러한 분포 감소는 EIG군에서 35.7% 감소한 $1,510 \pm 86 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table IV, Fig. 3). SMT군에서는 EIG군에 비해 COX-1 양성반응세포의 분포가 20.5% 증가한 $1,819 \pm 91 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table IV, Fig. 4). 스트레스에 대한 완충적 물질인 Hsp70 분포는 대조군에서 점막고유층에 분포하였으며, 핵과 주변세포질에서 강한 양성반응을 나타내는 것으로 관찰되었다. 위점막 손상 유발 후 Hsp70 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, 이러한 분포 증가는 EIG군에서 2603.3% 증가한 $10,361 \pm 421 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table IV, Fig. 5).

SMT군에서는 EIG군에 비해 Hsp70 양성반응세포가 82.1% 감소한 $1,857 \pm 142 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다(Table IV, Fig. 6).

3. 염증관련 매개물질의 변화

점막상피에서 관찰되는 PKC 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 나타내는데, 위점막 손상 유발 후에는 PKC 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 EIG군에서 236.5% 증가한 $1,159 \pm 121 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 7). SMT군에서는 EIG군에 비해 PKC 양성반응 세포의 증가가 적어, EIG군보다 56.7% 감소한 $502 \pm 34 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 8). 점막상피에서 관찰되는 NF- κ B p50 양성반응세포는 핵에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 NF- κ B p50 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 EIG군에서 232.2% 증가한 $2,292 \pm 163 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 9). SMT군에서는 EIG군에 비해 NF- κ B p50 양성반응 세포의 증가가 적었는데, 43.5% 감소한 $1,294 \pm 87 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 10). 점막상피에서 관찰되는 COX-2 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 나타내었는데, 위 점막 손상 유발 후에는 COX-2 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 EIG군에서 341.8% 증가한 $2,919 \pm 147 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 11). SMT군에서는 EIG군에 비해 COX-2 양성반응 세포의 증가가 적어, EIG군보다 54.6% 감소한 $1,325 \pm 84 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 12). 점막상피에서 관찰되는 IL-12B 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 나타내었는데, 위 점막 손상 유발 후에는 IL-12B 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 EIG군에서 587.8% 증가한 $2,945 \pm 163 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 22). SMT군에서는 EIG군에 비해 IL-12B 양성반응 세포가 60.6% 감소한 $1,159 \pm 75 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table V, Fig. 13).



- Fig. 1.** The immunohistochemical stain for SBA reaction in gastric mucosa from EIG mice. The SBA positive reaction in region of hemorrhagic erosion were decreased. $\times 200$.
- Fig. 2.** The immunohistochemical stain for SBA reaction in gastric mucosa from SMT mice. The SBA positive reaction in apical surface of mucosa were increased. $\times 200$.
- Fig. 3.** The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from EIG mice. The COX-1 positive cells in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.
- Fig. 4.** The immunohistochemical stain for COX-1 in apical gastric mucosa from SMT mice. The increase of COX-1 positive cells (arrow) were appeared. Right lower, magnification of COX-1 positive reacted cell. $\times 200$.
- Fig. 5.** The immunohistochemical stain for Hsp70 in gastric mucosa from EIG mice. The Hsp70 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.
- Fig. 6.** The immunohistochemical stain for Hsp70 in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of Hsp70 positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 7.** The immunohistochemical stain for PKC in gastric mucosa from EIG mice. The PKC positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.
- Fig. 8.** The immunohistochemical stain for PKC in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of PKC positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 9.** The immunohistochemical stain for NF- κ B p50 in gastric mucosa from EIG mice. The NF- κ B p50 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.
- Fig. 10.** The immunohistochemical stain for NF- κ B p50 in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of NF- κ B p50 positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 11.** The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from EIG mice. The COX-2 positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.
- Fig. 12.** The immunohistochemical stain for COX-2 in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of COX-2 positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 13.** The immunohistochemical stain for IL-12B in apical gastric mucosa from EIG mice. The IL-12B positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were increased. $\times 200$.
- Fig. 14.** The immunohistochemical stain for IL-12B in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of IL-12B positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 15.** The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from EIG. The TUNEL positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were remarkably increased. $\times 200$.
- Fig. 16.** The distribution of apoptotic cells in apical gastric mucosa from SMT mice. The decrease of TUNEL positive cells were appeared. $\times 200$.
- Fig. 17.** The immunohistochemical stain for BrdU in gastric neck from EIG mice. The BrdU positive cells (arrow) in region of hemorrhagic erosion were disappeared. $\times 200$.
- Fig. 18.** The immunohistochemical stain for BrdU in gastric neck from SMT mice. The increase of BrdU positive cells were appeared. Right lower, magnification of BrdU positive cells. $\times 200$.

4. 세포자기살해의 감소와 세포증식의 증가

대조군에서는 표면점액분비세포가 분포하는 점막 상층에서 apoptotic 양성반응세포는 핵에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 apoptotic 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 EIG군에서 2096.1% 증가한 $18,173 \pm 354 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table VI, Fig. 15). SMT군에서는 EIG군에비해 80.1% 감소한 $3,615 \pm 192 / 200,000$ pick cell로 나타났다(Table VI, Fig. 16). 위샘 목부분에서 증식된 세포에서 관찰되는 BrdU 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 위 점막 손상 유발 후 BrdU 양성반응세포의 분포가 감소하였다. 이러한 분포 감소는 EIG군에서 69.6% 감소한 $603 \pm 41 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table VI, Fig. 17). SMT군에서는 EIG군에비해 BrdU 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, SMT군은 158.02% 증가한 $1,556 \pm 83 / 200,000$ pick cell로 관찰되었다 (Table VI, Fig. 18).

고 찰

《靈樞, 論勇》¹²⁾에 술은 “其氣標悍, 其入於胃中, 則胃脹上逆, 滿於胸中, 肝浮膽橫”이라 하였고, 《素問, 厥論》¹³⁾에 “酒入於胃, 則絡脈滿而經脈虛. 脾主爲胃行氣津液也. 陰氣虛, 則陽氣入. 陽氣入, 則胃不和. 胃不和, 則精氣竭. 正氣竭, 則不營於四肢.”라 하여 음주가 胃腑病證의 원인이 됨을 설명하였고, 巢¹⁴⁾도 “飲酒過多, 酒毒積於腸胃”라 하여, 과음이 위장관 질환의 원인임을 한 것으로 볼 수 있다.

酒傷의 한의학적 치료는, 홍¹⁵⁾ 등이 주상의 관찰법에 대한 고찰과 박¹⁶⁾ 등의 주상치료에 대한 고찰, 박¹⁷⁾ 등의 술이 인체에 미치는 영향에 관한 동서의학적 고찰등을 통해서 正氣持存과 扶正을 통한 예방효과를 주장하였다. 이에 채⁴⁾ 등이 葛花解醒湯이 酒傷으로 인한 위점막의 산화적 손상의 보호에 유효했음을 보고하였고, 김⁹⁾ 등이 歸脾湯이 七情傷과 酒傷으로 인한 위점막 손상에 예방효과가 있음을 보고하였다. 四物湯은 “調益榮衛, 滋養氣血”하여 인체면역기능을

향진시키는 扶正의 효과가 있는 처방이다. 안¹⁸⁾, 은¹⁹⁾은 四物湯이 면역기능을 개선시켜주는 작용에 대해 유의한 효과가 있음을 보고하였고, 박⁸⁾, 김⁹⁾은 점막세포의 손상에 대해 四物湯의 치료 및 방어효과가 있음을 보고하였다. 이에 저자는 四物湯을 사전 투여한 후 알콜성 위점막 손상을 유도하여 나타난 복합당질 분포, COX-1, Hsp70, PKC, NF-κB p50, COX-2, IL-12B, BrdU, TUNEL 등을 관찰하여 위점막의 四物湯 사전 투여로 인한 알콜성 위점막 손상에 대한 방어효과를 면역조직화학적으로 살펴보았다.

위점막 (gastric mucosa)과 점막밑조직의 결손 (hemorrhage infarct and erosion)은 궤양(ulcer)을 유발하는데, 주로 1차 보호장벽인 점액분비세포의 손상으로 기인된다. 이러한 점액분비의 손상은 위산 (gastric acid)과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandins의 분비 감소, 세포분열억제 등에 의한다²⁰⁾. 본 실험에서 EIG군의 위점막에서 알콜에 의한 출혈성 침식과 중성 점액질 분비세포 유실 등의 점막 손상이 일어났다. 이러한 점막보호장벽의 손상 즉, 점막의 mucus와 bicarbonate 보호장벽의 결핍은 prostaglandin의 분비 차단에 의해 발생된 것으로²⁴⁻²⁵⁾, 이는 COX-1 mRNA 발현억제에 의한 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정 저해로 인한 것이다²³⁻²⁴⁾. COX-1은 house-keeping enzyme으로서, 위장관 보호 (gastroprotection), 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성 (homeostasis)를 유지하는 중요한 역할을 한다. 본 실험에서 출혈성 침식 지역 주변에서는 COX-1에 대한 양성반응이 거의 나타나지 않아 COX-1의 결핍이 점막손상의 일차적 원인으로 설명될 수 있었다²⁵⁻²⁶⁾. 또한 이러한 조직손상은 점막고유층에 존재하면서 위점막손상의 회복에 관여하는 표층모세혈관망의 손상을 초래하여, 주변부에서 적혈구 울혈이 관찰되었는데, 이러한 모세혈관의 손상은 reperfusion시 허혈성 조직손상을 유발하기도 한다²⁷⁾. 이러한 손상부위에서는 중성호성 백혈구, 림프구 등의 염증관여세포들의 침윤증가도 확인되었다. 이와같은 점막손상은 외부로부터 가해지는 여러

가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위한 스트레스 단백질의 합성 증가를 유도하며, 열 충격 단백질 (Hsp)군을 대량으로 합성하고, 단백질의 하나인 Hsp 70은 환경적 스트레스에 의해 부분적으로 변성된 단백질들과 결합하여 변성된 단백질간의 상호 응축을 감소시키거나 새롭게 합성되어지는 폴리펩타이드의 적절한 결합과 세포 내 이동위치를 조절함으로써 세포를 보호하는 molecular chaperone으로 작용한다²⁸⁾. 사물당투여로 인한 위점막의 보호효과도 보호 단백질합성 촉진과 관계가 있는 것으로 사료된다. Hsp70은 정상적으로 세포질 내에 위치하다가 스트레스가 가해지면 핵 내 핵소체 주위로 이동하며 회복기에 들어서면 다시 세포질로 돌아간다²⁹⁾. EIG군에서 Hsp 70 양성반응이 증가하였으며, 이러한 Hsp 70의 양성반응은 핵 내에서 강하게 나타났다.

점막 손상지역에서는 점막상피세포의 세포자기살해(apoptosis)와 세포분열(proliferation)의 변화도 관찰되었다. 위샘 목부분에서 일어나는 세포분열을 통해 새로운 표면점액세포의 생성이 이루어지는데, EIG군에서 세포분열이 감소한 것을 thymidine analogue인 BrdU를 통해 확인하였다. 또한 과도한 세포자기살해가 출혈성 침윤지역의 세포에서 발생하여 분열과 세포자기살해의 균형이 무너졌다. 이러한 세포자기살해는 점액분비세포의 oxidative stress와 미토콘드리아 기능 저하, caspase-3 activation, ceramide pathway activation, mitogen activated protein kinase activation 등과 같은 기전을 통해 이루어진 것으로 생각된다³⁰⁻³²⁾.

점막손상은 oxygen free radical에 의한 lipid peroxidation(지질과산화)이 세포막의 polyunsaturated fatty acids를 퇴화시켜 막구조를 붕괴시키는데, 이러한 외부자극에 의한 세포 내 산화환원상태 및 외부에서 첨가된 산화제, 항산화억제제 등에 의해 NF(nuclear factor) - κ B의 세포 내 항상성이 안될 때 급성 염증에 의한 조직손상이 초래된다³³⁾. 전사인자인 NF- κ B는 세포질 내에서 I- κ B라는 inhibitory protein이 부착된 상태로 존재하다가 자극이 되면 I- κ B가 떨어져 나가면서 분해되며 남은 dimer(보통

p50-p65 heterodimer)가 세포질에서 핵으로 이동하여 cytokine, cytokine receptor, cell adhesion molecule, growth factor 등의 발현에 관여하는 유전자의 promoter나 enhancer의 κ B site에 결합함으로써 전사를 유도한다³⁴⁾. 본 실험에서도 NF- κ B p50의 분포가 점막상피 손상지역 확산으로, 전염증성 물질인 COX-2를 비롯해, 세포성 면역과 세포 기용 등의 과도한 증가를 유발하였다. 먼저 COX-2의 증가가 EIG군에서 관찰되었는데, COX-2는 외부자극에 의해 염증이 유발되어 전달되는 과정에서 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 콘포식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되어 염증이 일어나는 곳에서 proinflammatory prostaglandin을 과량 방출한다³⁵⁻³⁶⁾. 또한 PKC의 활성화는 IL-12 등의 염증유발성 cytokine의 발현 증가를 통해 염증반응 가속화를 유도한다³⁷⁾.

SMT군에서는 COX-1 발현을 통한 prostaglandin의 정상적인 분비는 mucus와 bicarbonate 보호장벽을 유지시켰으며 점막세포의 세포분열 지속과 세포자기살해 감소시켜 균형을 이루었다. 또한 D-N-acetylgalactosamine와 관련된 복합당질인 SBA 양성반응의 유지가 점막표면에서 관찰되었는데, 이전의 보고³⁸⁻³⁹⁾를 미루어보아 위점막보호에 관여하는 것으로 생각된다. 그 결과 EIG군의 점막에서 관찰된 과도한 점막세포의 손상과 염증반응은 SMT군에서는 나타나지 않았다.

이상의 결과로 四物湯은 알콜성 위점막 손상에 대한 방어작용을 가지며, 그 결과 이차적인 급성 염증성 점막손상을 차단하는 것으로 생각된다.

결론

알코올성 위점막 손상에 대한 四物湯의 보호효과를 알아보기 위해 인위적인 위점막 손상을 유도하여 나타난 복합당질 (SBA), 점막 내 보호장벽의 변화 (COX-1, Hsp70), 염증관련매개물질 (PKC, NF- κ B p50, COX-2, IL-12B) 및 세포자기살해와 세포증식 (TUNEL, BrdU) 등의 변화를 관찰하여 아래와 같은

결과를 얻었다.

1. 위점막 내 보호장벽의 변화에서는 SMT군에서 EIG군에 비해 세포 내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정에 관여하는 점막보호인자인 COX-1의 분포는 증가되었으며, 스트레스에 대한 완충적 물질인 열 충격 단백질인 Hsp70의 분포는 감소되었다.
2. 염증관련매개물질은 SMT군에서 EIG군에 비해 급성 염증에 의한 조직손상을 유도하는 NF- κ B p50, 세포활성에 관여하는 PKC가 감소되어 염증 유도성 동종효소인 COX-2의 과발현과 염증 유도성 cytokine인 IL-12B 분비가 감소되었다.
3. 표면상피세포는 SMT군에서 EIG군에 비해 세포 자기살해 감소와 세포분열 증가가 관찰되었다.

참고문헌

1. 양용석. 소화성궤양에 대한 Famotidine(Gaster)의 치료 효과. 대한소화기병학회잡지. 1987;19(1):56.
2. 한남익 외 6인. 소화성궤양에 대한 Nizatidine의 치료 효과. 대한소화기병학회잡지. 1989;21(1):56.
3. 김학재 외 2인. 스트레스와 에탄올로 유발된 mouse의 위점막 손상에 대한 귀비탕의 예방효과. 대한한의학회지. 2003;24(1):155-168.
4. 채종구 외 2인. 갈화해성탕이 주상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1999;20(1):113-121.
5. 송 · 태평혜민화제국편. 태평혜민화제국방. 북경: 인민위생출판사. 1985: 310-311.
6. 苗青 · 中醫藥治療潰瘍性胃腸炎臨床觀察. 天津中醫. 1998;15(5):211-212.
7. 김태기. 자호사물탕이 t-BHP로 유도된 간세포의 산화적 손상 및 자유기에 의한 지질과산화반응에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2001.
8. 박현숙. 사물탕 구성약물이 paeoniflorin의 흡수 · 대사 및 장내미생물 효소활성에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1998.
9. 김도환. Nitric oxide에 의해 유발된 C6 glial 세포독성에 대한 사물탕의 방어효과. 원광대학교 대학원. 2000.

10. 유동화. 사물탕이 L1210세포 및 항암제를 투여한 마우스의 면역세포에 미치는 영향. 우석대학교 대학원. 1998.
11. 최윤정. 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1997.
12. 왕빙 註. 황제내경영추. 서울: 고문사. 1972:193-194.
13. 왕빙 註. 황제내경소문. 서울: 대성문화사. 1994:243-248, 275-280.
14. 소원방. 소씨제병원후론. 서울: 대성문화사. 1992:192.
15. 홍성완 외 2인. 주상의 관찰법에 대한 문헌적고찰. 대한한의학회지. 1990;11(1):9-23.
16. 박태선 외 1인. 주상치료에 대한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학논문집. 1993;2(1):79-89.
17. 박승만 외 1인. 술이 인체에 미치는 영향에 관한 동서의학적 고찰. 대전대학교 한의학논문집. 1993;2(1):67-78.
18. 안희진. 사물탕의 항암제 부작용억제에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1995.
19. 은재순. 항암제 Mitomycin C의 부작용에 대한 수종 복합생약의 영향. 생약학회지. 1992;23(4):248-258.
20. Georg D. Arlt and Maarkus Leyh. Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. *Langenbeck's Arch Surg.* 2001;386: 75-81.
21. David Y. Graham. NSAID ulcers : prevalence and prevention. *Mod Rheumatol.* 2000;10: 2-7.
22. Tetsuo Arakawa, Kazuhide Higuchi, Takashi Fukuda, Yasuhiro Fujiwara, Kenzo Kobayashi, and Tetsuo kuroki. Prostaglandins in the stomach ; an update, *J. Clin. Gastroenterol.* 1998;27: 1-11.
23. Byron Cryer and Michael B. Kimme. Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug, *Am J med.* 1998;105:20-30.
24. Lee S. Siomon. Biology and toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Current Opinion in Rheumatology.* 1998;10:153-158.
25. Byron Cryer and Andre Dubois. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review, *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 1998;56: 341-361.

26. Choitsu Sakamoto. Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol.* 1998;33:618-624.
27. Wallace, J. L. Gastric ulceration ; critical events at the neutrophil -endothelium interface *Can, J. Physiol. Pharmacol.* 1993;71:98-102.
28. De Maio A. The heat-shock response, *New Horiz.* 1995;2:198-207.
29. Valazquez J. M. and Lindquist S. H. Hsp 70 - Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell.* 1984;36:655-622.
30. Peter Ch. Konturek, Tomasz Brozowski, Stanislaw J. Konturek, Astrid Taut, Zbigniew Sliwowski, Jerzy Stachura, and Eckhart G. Hahn. Activation of gene growth factors and cyclooxygenases in rat gastric mucosa during recovery from stress damage. *Europe J Pharmaco.* 1998;342:55-65.
31. Shane N. Porter, Gordon S. Howarth, Ross N. Butler. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and apoptosis in the gastrointestinal tract ; potential role of the pentose phosphate pathways. *Europe J Pharmaco.* 2000;397:1-9.
32. Tae Il Kim, Soo Hyun Jin, Won Ho Kim, Eun Hye Kang, Kang Yel Choi, Hyun Jin Kim, Sung Kwan Shin, and Jin Kyung Kang. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int j colorectal Dis.* 2001;16:167-173.
33. Baeuerle P. A. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998;95:729-731
34. Baeuerle P. A. and Baltimore D. NF- κ B - Ten years after. *Cell.* 1996;87: 13-20
35. R. Pabst, H. J. Rothkötter, and M. Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno immunopath.* 1999;72:157-165.
36. I. Kirman, B. Vainer, and O. H. Nielsen. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm res.* 1998;47:285-289.
37. Andrea H., Thomas k., Josef P. and Konrad S. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochemica et Biophysica Acta.* 2000;1485:63-99.
38. Masaki Kitajima, Mizuhiro Mogi, Tatsuo Kiuchi, Atsushi Shimizu, Masanobu Nakajima, Atsushi Oshima, Hayato Kawakami, and Hiroshi Hirano. Alternation of gastric mucosal glycoprotein in gastric mucosa in stress. A light and electron microscopic study. *J. Clin Gastroenterol.* 1990;12:1-7.
39. Per Falk, Kevin A. Roth, and Jeffrey I. Gordon. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. 1994;266:987-1003.