대한한의학회지 제25권 제3호(2004년 9월)
J Korean Oriental Med 2004;25(3):111-122

원 저

# Indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대한 滋陰健脾湯의 효과

이해연, 백태현

상지대학교 한의과대학 내과학교실

## Effects of *Jaeumgeonbi-tang* Extract on Indomethacin-Induced Gastric Mucosal Lesions

Hae-Yeon Lee, Tae-Hyun Baik

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

**Objectives** : This study was carried out to investigate the effects of *Jaeumgeonbi-tang* extract on indomethacin-induced gastric mucosal lesions of mice.

**Methods** : Experimental groups were classified into non-treatment group (CON group), non-administered group (GE group), *misoprostol* administered group (MA group) and *Jaeumgeonbi-tang* extract administered group (JG group). This study examined the morphological change, distribution of mast cells, mucous secreted cells and apoptotic cells, BrdU, COX-1, Hsp70, NF-κB p50, PKC, COX-2 and TNF-α of gastric mucosa.

**Results** :1. The hemorrhagic erosion of gastric mucosa and infiltrated mast cells were reduced in the MA and JG groups.

2. PNA reaction and mucous secreted cells were increased in the MA and JG groups.

3. The distribution of apoptotic cells, Hsp70, NF-κB p50, PKC, COX-2 and TNF-α were increased in the gastro-inflammation elicitated group, but decreased in the MA and JG groups.

4. The MA and JG groups showed increase on COX-1, BrdU.

**Conclusions** : *Jaeumgeonbi-tang* extract had excellent effects on indomethacin-induced gastric mucosal lesions.

***Key Words:*** *Jaeumgeonbi-tang* (*ziyinjianpi-tang*), misoprostol, indomethacin, mucosa, gastric

## 서 론

위점막 손상은 미란 (erosion)과 궤양 (ulcer)으로 구분하는데, 점막근판을 초과하지 않고 점막층에만 나타나는 염증성 손상을 미란이라고 하고, 점막근판을 넘어서 위장관의 점막, 점막하조직 및 근육층까지 침범되는 국한된 조직의 손상을 궤양이라고 한다[1].

소화기 염증 및 궤양의 치료에 대한 한의학적 연구로는 四君子湯, 六君子湯, 香砂六君子湯 등의 脾胃氣虛證에 활용할 수 있는 處方[2-4]이나 活血化瘀하는 槐花散[5], 養陰益胃하는 沙蔘麥門冬湯[6], 益胃湯[7] 등의 위점막 손상에 대한 예방 및 치료 효과가 보고된 바 있다.

이에 저자는 소화기 염증 및 궤양의 치료와 예방

· 접수 : 2004년 7월 20일 · 논문심사 : 2004년 8월 10일
· 채택 : 2004년 8월 21일
· 교신저자 : 이해연. 강원도 원주시 우산동 상지대학교 부속 한방병원 내과 의국 304호
(Tel: 033-741-9382, H.P: 011-9484-1075, E-mail: dlgodus@empal.com)

에 활용도가 높은 *Misoprostol*과 祛濕化痰을 주로 하고 氣血을 補하여 소화기 염증 및 궤양의 치료에 효과가 있을 것으로 사료되는 滋陰健脾湯을 Indomethacin으로 위점막 손상이 유발된 생쥐에 투여하여, 滋陰健脾湯의 소화성 궤양에 대한 치료 효과를 알아보기 위해 위점막의 일반적인 형태와 표면상피세포, 위점액 분비세포의 변화, 세포자멸사 (TUNEL), 세포분열 (BrdU), 점막보호인자 (COX-1), 스트레스에 대한 완충적 물질 (Hsp70), 염증관련매개물질 (NF-κB p50, PKC, COX-2, TNF-α) 등의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

대한실험동물센타에서 분양 받은 태령 4주된 BALB/c 수컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후, 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 실험동물은 대조군 (Control, 이하 CON군), 위점막 손상 유발군 (Gastro-inflammation elicitated mice, 이하 GE군), 위점막 손상 유발 후 Misoprostol 투여군 (misoprostol administered mice after gastro-inflammation elicitation, 이하 MA군), 위점막 손상유발 후 자음건비탕 투여군 (*Jaeumgeonbitang* extract administered mice after gastro-inflammation elicitation, 이하 JG군)으로 나누어 각 군 당 10마리씩 배정하였다.

### 2. 위점막 손상 유발

위점막 손상을 유발하기 위해서 indomethacin (Sigma, USA)을 0.9% NaCl이 포함된 70% 에탄올용액에 희석시킨 후 10㎎/kg을 GE군, MA군, JG군에 5일 동안 경구 투여 (intragastric administration)하였다.

### 3. Misoprostol의 제조와 투여

위점막 손상 후 MA군에 Misoprostol (Cytotec, Searle Korea)를 생리식염수에 희석시킨 후 40㎍/kg씩 5일 동안 경구 투여하였다.

### 4. 자음건비탕 추출액의 제조와 투여

『東醫寶鑑』 外形篇 頭門 虛暈[16]에 수록된 자음건비탕의 처방에 따른 구성약물로 시중에서 구입하여 약재 2첩 분량 (89.6g)을 증류수 500㎖에 넣고 2시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50㎖로 감압 농축하여 JG군에 위점막 손상 유발 후 매일 2.5㎖/kg으로 5일 동안 경구 투여하였다(Table 1).

### 5. 조직표본 제작

위점막 손상 유발 후 5일이 경과되었을 때 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 위 몸통(body)을 적출 하여 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5㎛ 두께의 연속절편으로 제작되었다. 위점막의 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% $OsO_4$용액에 후고정하였다. Uranyl

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

| 韓藥名 | 生藥名 | 重量(g) |
|---|---|---|
| 白朮 | *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* | 6.0 |
| 陳皮 | *Citri Reticulata* | 4.0 |
| 半夏 | *Pinelliae Rhizoma* | 4.0 |
| 白茯苓 | *Pachyma Hoelen Rumphius* | 4.0 |
| 當歸 | *Angelicae Gigantis Radix* | 2.8 |
| 白芍藥 | *Paeoniae Radix Alba* | 2.8 |
| 生乾地黃 | *Rehmanniae Glutinosa* | 2.8 |
| 人參 | *Ginseng Radix* | 2.0 |
| 白茯神 | *Poria Cocas wolf* | 2.0 |
| 麥門冬 | *Liriopis Tuber* | 2.0 |
| 遠志 | *Polygalae Radix* | 2.0 |
| 川芎 | *Cnidii Radix* | 1.2 |
| 甘草 | *Glycrrhizae Radix* | 1.2 |
| 生薑 | *Zingiberis Rhizoma Recens* | 4.0 |
| 大棗 | *Jujubae Fructus* | 4.0 |
| 總量 | | 44.8 |

acetate에 90분 동안 염색한 후 통상적인 방법으로 epon에 포매하였다. ultramicrotome (LKB, Nova)으로 990㎚ 두께로 절편을 만들어 toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 표면점액세포 (surface mucose cell)의 변화를 관찰하였다.

6. 조직화학적 변화 관찰

1) 출혈성 찰과 시 누출 혈액세포와 비만세포의 변화 관찰

혈액세포와 비만세포의 동시 변화를 조사하기 위하여 복합 Luna' s method를 실시하였다. 우선 위점막 하층의 비만세포 과립은 aldehyde fuchsin에 30분간 염색하였다. 그 후 출혈성 찰과 시 누출 혈액세포를 hematoxylin-Biebrich scarlet 용액에 5분간 처리하고 0.5% lithium carbonate 용액에서 분별한 후 관찰하였다. 한편 본 염색을 실시한 조직은 심장관류 고정없이 조직적출 후 바로 10% NBF로 고정 처리하였다.

2) 중성점액분비세포의 분포 변화 관찰

위산에 의한 자가분해 (autolysis) 방벽작용을 하는 중성점액질 (neutral mucin)을 분비하는 표면점액세포의 변화를 조사하기 위하여 periodic acid-schiff reaction (PAS) stain을 실시하였는데 우선 periodic acid에서 5분간 반응시킨 후 Schiff reagent에서 15분 동안 처리하였다. 그 후 sulfurous rinse에서 각 2분씩 3회 세척한 후 Hematoxylin에서 1분 동안 대조염색 하였다.

3) 산성점액분비세포의 분포 변화 관찰

산성점액질 (acid mucin)을 분비하는 점액세포의 변화를 조사하기 위해서 Alcian blue 염색법을 실시하였다. Alcian blue (pH 2)에 30분간 염색한 후 nuclear fast red 용액 10분간 대조 염색시켰다.

7. 면역조직화학적 변화 관찰

1) 복합당질의 분포 변화 관찰

복합당질 (glycoconjugate)의 하나인 Peanut Agglutinin (PNA; Sigma, USA)의 자음건비탕 추출액에 의한 위점막내 분포 변화를 조사하기 위하여 lectin을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 조직을 실온에서 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma, USA)에 1시간 동안 blocking한 다음 1:100으로 희석한 biotinylated anti PNA (Sigma, USA)에 4℃ incubation chamber내에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 ABC kit (avidin biotin complex; Vector Lab, USA.)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3' -diamino benzidine (DAB; Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하였다. Lectin 반응의 강도는 -(음성), +(약한), ++(중간정도의 양성) 그리고 +++(강한 양성) 등으로 표시하였다(Table 2).

**Table 2.** Sugar Specifities and Inhibitory Carbohydrate of Peanet Agglutinin

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

2) 점막내 세포증식 변화 관찰

점막내 세포증식의 변화를 관찰하기 위하여 항 BrdU항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 실험동물에서 조직을 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2' -deoxyuridine (BrdU, Sigma, USA) 50㎎/kg을 복강 주사하였다. 얻어진 연속절편은 4℃와 37℃의 2N HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기 위하여 0.01%의 proteinase K (Dako, Dnmark)가 포함된 normal goat serum (1:20, Dako)에 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU (1:50, Amersham, UK)에 4℃ humidified chamber내에서 72시간 반응시켰으며, biotinylated goat anti-mouse IgG (DAKO)에 실온에서 10분간 link하였다. Steptavidin peroxidase (LSAB : DAKO)에 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 DAB에서 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

3) 점막내 보호장벽의 변화 관찰

점막상피세포의 보호기전에 관여하는 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 분포변화를 관찰하기 위한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을

proteinase K (20㎍/㎖)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 rabbit anti-mouse COX-1 (1:250, Chyman, USA)에 4℃ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:100, DAKO)에 실온에서 10분간 link 하였다. 이후 과정은 위에서 기술한 면역조직화학적 염색법과 동일하였다. 한편 스트레스에 대한 완충적 물질인 열충격 단백질 (heat shock protein, HSP)의 하나인 Hsp70 분포변화를 관찰하기 위한 rabbit anti mouse Hsp70 (1:200, Santa Cruz Biotec)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

4) 점막내 염증관련 매개물질 관찰

점막내 염증관련 신호에 관여하는 nuclear factor (NF)-κB p50과 cyclooxygenase (COX)-2, 세포활성을 주도하는 protein kinase C (PKC) 그리고 염증유발성 cytokine인 TNF-α의 분포 변화를 조사하기 위해서 rabbit anti-mouse NF-κB p50 (1:200, Santa Cruz Biotec)과 rabbit anti-mouse COX-2 (1:500, Chyman, USA), rabbit anti-mouse PKC (1:200, Santa Cruz Biotec) 그리고 rabbit anti-mouse TNF-α (1:200, Santa Cruz Biotec) 등의 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

### 8. TUNEL 방법

세포자멸사가 일어나는 apoptotic 세포의 분포 변화를 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. 그 다음 strength TdT enzyme (36㎕ TdT enzyme : 72㎕ reaction buffer)을 처리하여 37℃의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB를 처리하여 Methyl green으로 대조 염색하였다.

### 9. 영상분석과 통계처리

면역조직화학과 TUNEL 염색 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigma Plot 4.0 (Sigma)을 통한 student *t* -test로 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 일반적인 형태변화

GE군의 위점막에서는 심각한 출혈성 침식 (hemorrhagic erosion)이 관찰되었다 (Fig. 1). 이러한 점막손상부위에서 연접복합체 소실과 세포 소기관의 손상이 확인된 점액분비세포 뿐만 아니라 (Fig. 3) 많은 수의 벽세포 (parietal cell)와 주세포 (chief cell)의 유실도 관찰되었다. 특히 일부지역에서는 주세포 분포지역인 기저부 (basement membrane)까지 확장된 궤양까지도 나타났다. 한편 MA군 (Fig. 7, 9)과 JG군 (Fig. 13, 15)에서는 GE군에 비해 심각한 출혈성 침식은 관찰되지 않았으며, 대부분의 지역에서 CON군에서 보이는 정상적인 위점막조직 형태가 관찰되어 정상적인 점액분비세포의 배열과 함께 이웃한 표면상피세포의 연접복합체가 유지되었으며 자유면 쪽 세포질에서 점액원과립이 관찰되었고 벽세포와 주세포의 손상은 일어나지 않았다. 이러한 경향은 MA군보다 JG군에서 더 잘 관찰되었다.

### 2. 조직화학적 변화

1) 출혈성 찰과 시 누출 혈액세포와 비만세포의 감소

GE군의 출혈성 찰과가 일어난 주변에는 적혈구염주, 중성호성 백혈구를 비롯한 과립백혈구와 림프구의 침윤 (infiltration)이 증가된 것으로 관찰되었고 (Fig. 2). 비만세포는 출혈성 침식 주변의 기저부와 점막하층 (submucosa)에서 증가하였고, 특히 탈과립형 (degranulated type)이 다수를 차지했다. 이에 반해 MA군 (Fig. 8)과 JG군 (Fig. 14)에서는 간간이 점막고유층에서 백혈구와 혈관 내 적혈구가 관찰되고 비만세포도 GE군보다 적은 분포를 점막하층에서 보였고, 기

저부로 이주한 비만세포는 관찰되지 않았다. 관찰된 비만세포는 대부분이 과립형 (granulated type) 이었다.

2) 중성점액분비세포 분포 증가

GE군의 출혈성 침식 주변의 점막 상피에서는 PAS 양성반응을 보이는 표면점액세포와 목점액세포가 관찰되지 않았다(Fig. 4). MA군 (Fig. 10)과 JG군 (Fig. 16)에서는 세포상층부에 중성점액을 분비하는 PAS 양성반응 표면점액세포가 상층 표면 (apical surface)에서 위오목 (gastric pit)까지 확장된 것으로 관찰되었으며 이러한 분포는 CON군과 유사하였다. 그러나 MA군에서는 일부 지역에서 표면점액분비세포 배열의 유실이 관찰되었다.

3) 산성점액분비세포 분포 증가

GE군 점막 상피에서는 산성점액을 분비하는 표면점액세포가 관찰되지 않았다(Fig. 5). MA군 (Fig. 11)과 JG군 (Fig. 17)에서는 점막표면에서 관찰되었으며 이러한 배열은 CON군과 유사하였다. 그러나 출혈성 침식이 일어난 일부 MA군에서는 관찰되지 않았다.

### 3. 면역조직화학적 변화

1) 복합당질의 분포 변화

CON군에서의 PNA반응은 표면점액세포, 일부 벽세포의 세포질 그리고 주세포의 자유면 쪽 미세융모에서 강한 PNA 양성반응을 보였다. 그러나 GE군에서는 표면점액세포와 벽세포에서 양성반응이 없었고, 주세포의 자유면 쪽 미세융모에서만 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig. 6). MA군 (Fig. 12)과 JG군 (Fig. 18)에서는 CON군과 유사한 분포양상을 보였으며, 특히 표면점액세포와 벽세포에서 뚜렷한 PNA 양성반응이 나타났다(Table 3).

**Table 3.** The Effect of *Jaeumgeonbi-tang* Extract Administration on PNA Distribution in Gastric Mucosa of Mice at Days 5 after Gastro-inflammation Elicitation

| Lectin | POSITION | GROUP | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | CON | GE | MA | JG |
| PNA | surface mucous cell | +++ | - | + | +++ |
| | neck mucous cell | - | - | - | - |
| | parietal cell | + | - | + | + |
| | chief cell | +++ | ++ | ++ | +++ |

Abbreviation>
- : negative, + : weak, ++ : moderate, +++ : strong
CON : No treated mice
GE : mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin
MA : *Misoprostol* administered mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin
JG : Jaeumgeonbitang administered mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin

2) 세포자멸사의 감소와 세포증식의 증가

CON군에서는 표면점액분비세포가 분포하는 점막 상층에서 apoptotic 양성반응세포는 핵에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 apoptotic 양성반응세포의 분포가 증가하였다 이러한 분포 증가는 GE군에서 605.6% 증가한 27081±360 / 2500,000 pick cell로 관되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 TUNEL 양성반응 세포는 적었으며, MA군은 60.5% 감소한 10705±148 / 250,000 pick cell로, JG군은 69.5 % 감소한 8260±148 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 TUNEL 양성반응세포 분포는 MA군에 비해 22.8%나 적었다(Table 4).

한편 위샘 목부분에서 증식된 세포에서 관찰되는 BrdU 양성반응은 핵에서 강하게 나타났으며, 위 점막 손상 유발 후 BrdU 양성반응세포의 분포가 감소하였다. 이러한 분포 감소는 GE군에서 80.0% 감소한 1327±24 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 BrdU 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, MA군은 163.2% 증가한 3492±48 / 250,000 pick cell로, JG군은 295.6% 증가한 5250±93 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 BrdU 양성반응세포 분포는 MA군에 비해 50.3%나 많았다(Table 4).

3) 점막 내 보호장벽 증가

CON군에서는 점막 고유층과 표면상피에서 COX-1 양성반응세포는 핵주변 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위점막 손상 유발 후 COX-1 양성반응세포의 분포가 감소하였다. GE군에서 72.3% 감소한 9186±87 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 COX-1 양성반응세포의 분포가 증가하였는데, MA군은 48.0% 증가한 13593±124 / 250,000 pick cell로, JG군은 62.3% 증가한 14910±208 / 250,000 pick cell로 관찰되

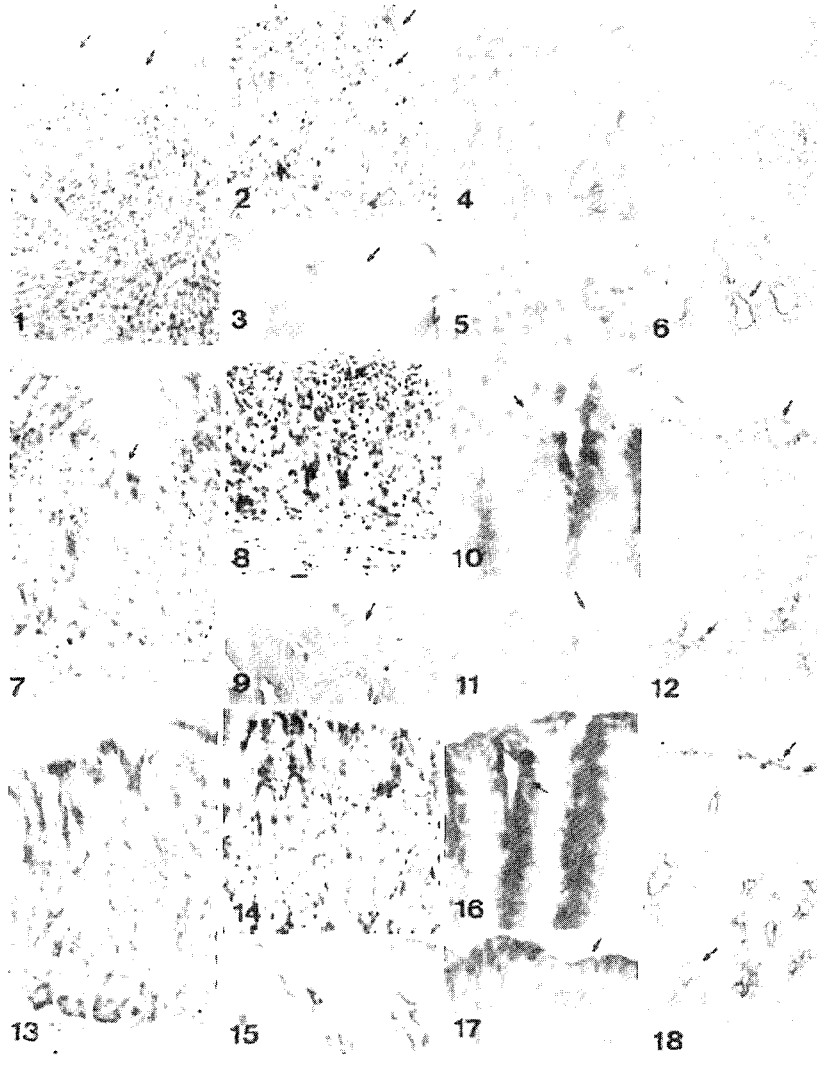
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

**Fig. 1.** The morphology of gastric mucosa from GE mice at days 5 after gastropathy elicitation. The aggregation of leucocytes in hemorrhagic erosions (arrow) evoked region are seen. H & E. ×200.
**Fig. 2.** The morphology of gastric mucosa from GE mice. The noticeable increase of RBC (arrow) into base of hemorrhagic erosion evoked region were seen. The increase of infiltrated mast cell were observed. vacanted arrow, degranulated type mast cell. Luna' s method. ×200.
**Fig. 3.** The magnification of damaged apical surface in gastric mucosa from GE mice at days 5 after gastropathy elicitation. Toluidine blue. ×1000
**Fig. 4.** The configuration of neutral mucous secreted cell in gastric mucosa from GE mice at days 5 after gastropathy elicitation. The disappearance of surface mucous cell and neck cell were observed. PAS. ×400.
**Fig. 5.** The configuration of acid mucous secreted cell in gastric mucosa from GE mice at days 5 after gastropathy elicitation. The disappearance of mucous cell were observed. Alcian blue. ×400.
**Fig. 6.** The immunohistochemical stain for PNA reaction in gastric mucosa from GE mice at days 5 after gastropathy elicitation. The PNA positive reaction in region of hemorrhagic erosion were decreased. ×200.
**Fig. 7.** The morphology of gastric mucosa from MA mice at days 5 after gastropathy elicitation. The partial hemorrhagic erosions (arrow) are seen. H & E. ×200.
**Fig. 8.** The morphology of gastric mucosa from MA mice. The decrease of infiltrated mast cell(arrow) were observed. Luna' s method. ×200.
**Fig. 9.** The magnification of damaged apical surface in gastric mucosa from MA mice at days 5 after gastropathy elicitation. The partial damage of surface mucous cell are seen. Toluidine blue. ×1000
**Fig. 10.** The configuration of neutral mucous secreted cell in gastric mucosa from MA mice at days 5 after gastropathy elicitation. The surface mucous cell (arrow) were observed except hemorrhage evoked region. PAS. ×400.
**Fig. 11.** The configuration of acid mucous secreted cell in gastric mucosa from MA mice at days 5 after gastropathy elicitation. The mucose cell were observed. Alcian blue. ×400.
**Fig. 12.** The immunohistochemical stain for PNA reaction in gastric mucosa from MA mice at days 5 after gastropathy elicitation. The PNA positive reaction were seen. ×200.
**Fig. 13.** The morphology of gastric mucosa from JG mice at days 5 after gastropathy elicitation. The partial hemorrhagic erosions (arrow) are seen. H & E. ×200.
**Fig. 14.** The morphology of gastric mucosa from JG mice. The decrease of infiltrated mast cell(arrow) were observed. Luna' s method. ×200.
**Fig. 15.** The magnification of damaged apical surface in gastric mucosa from JG mice at days 5 after gastropathy elicitation. The surface mucous cell same as normal morphology. Toluidine blue. ×1000
**Fig. 16.** The configuration of neutral mucous secreted cell in gastric mucosa from JG mice at days 5 after gastropathy elicitation. The configuration of surface mucous cell (arrow) seen as same as normal feature. PAS. ×400.
**Fig. 17.** The configuration of acid mucous secreted cell in gastric mucosa from JG mice at days 5 after gastropathy elicitation. The mucose cell were observed. Alcian blue. ×400.
**Fig. 18.** The immunohistochemical stain for PNA reaction in gastric mucosa from JG mice at days 5 after gastropathy elicitation. The PNA positive reaction were seen. ×200.

었다. JG군의 COX-1 양성반응세포 분포는 MA군에 비해 10.4%나 많았다(Table 4).

한편 스트레스에 대한 완충적 물질인 Hsp70 분포는 CON군에서 점막고유층에 분포하였으며 핵과 주변 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었다. 위점막 손상 유발 후 Hsp70 양성반응세포의 분포가 증가하였다. 이러한 분포 증가는 GE군에서 458.7%증가한 28993±298 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 Hsp70 양성반응세포가 적었는데, MA군은 36.4% 감소한 18438±196 / 250,000 pick cell로, JG군은 65.1% 감소한 10113±187 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 Hsp70 양성반응세포 분포는 MA군에 비해 45.2%나 적었다(Table 4).

4) 염증관련 매개물질의 변화

점막상피에서 관찰되는 PKC 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위점막 손상 유발 후 PKC 양성반응세포의 분포가 증가하였다. GE군에서 508.0% 증가한 32989±496 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 PKC 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MA군은 11.9% 감소한 29050±321 / 250,000 pick

**Table 4.** The Image Analysis of Immunohistochemistry, Apoptosis and Cell proliferation of Gastric Mucosa in Mice with Gastropathy

| Antibody | CON | Gastropathy | | |
|---|---|---|---|---|
| | | GE | MA | JG |
| Apoptosis | 4472±85 | 27081±369 | 10705±148* | 8260±148** |
| BrdU | 6021±41 | 1327±24 | 3492±48* | 5250±93** |
| COX-1 | 33214±632 | 9186±87 | 13593±124* | 14901±208** |
| Hsp70 | 6321±69 | 28993±298 | 18438±196* | 10113±187** |
| PKC | 6495±62 | 32989±496 | 29050±321* | 15406±264** |
| NF-κB p50 | 8936±34 | 44579±598 | 33641±472* | 10131±194** |
| COX-2 | 6146±74 | 23675±382 | 116236±247* | 7367±251** |
| TNF-α | 2639±98 | 15150±115 | 8620±215* | 5280±84** |

(image analysis for 250000 particles / range of intensity : 50 - 150)
M ± S.D, Mean ± Standard Deviation
CON : No treated mice
GE : mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin
MA : Misoprostol administered mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin
JG : *Jaeumgeonbitang* administered mice with gastro-inflammation elicitated by indomethacin
*, $p < 0.05$ compared with GE
**, $p < 0.05$ compared with MA

cell로, JG군은 53.3% 감소한 15406±264 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 PKC 분포는 MA군에 비해 47.0%나 적었다(Table 4).

점막상피에서 관찰되는 NF-κB p50 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 NF-κB p50 양성반응세포의 분포가 증가하였다. GE군에서 498.9% 증가한 44579±598 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 NF-κB p50 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MA군은 24.5% 감소한 33641±472 / 250,000 pick cell로, JG군은 77.3% 감소한 10131±194 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 NF-κB p50 분포는 MA군에 비해 69.9%나 적었다(Table 4).

점막상피에서 관찰되는 COX-2 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 COX-2 양성반응세포의 분포가 증가하였다. GE군에서 385.2% 증가한 23675±382 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 COX-2 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MA군은 31.4% 감소한 16236±247 / 250,000 pick cell로, JG군은 68.9% 감소한 7367±251 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 COX-2 분포는 MA군에 비해 54.6%나 적었다(Table 4).

점막상피에서 관찰되는 TNF-α 양성반응세포는 세포질에서 강한 양성반응을 보이는 것으로 관찰되었는데, 위 점막 손상 유발 후 TNF-α 양성반응세포의 분포가 증가하였다. GE군에서 474.1% 증가한 15150±115 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. MA군과 JG군에서는 GE군에 비해 TNF-α 양성반응 세포의 증가가 적었는데, MA군은 43.1% 감소한 8620±215 / 250,000 pick cell로, JG군은 65.1% 감소한 5280±84 / 250,000 pick cell로 관찰되었다. JG군의 TNF-α 분포는 MA군에 비해 38.7%나 적었다(Table 4).

## 고 찰

위점막 (gastric mucosa)과 점막하 조직의 결손 (hemorrhagic infarct and erosion)은 주로 1차 보호장벽인 점액분비세포의 손상으로 기인되며, 만성적인 궤양에 이르게 된다. 이러한 점액분비세포의 손상은 위산 (gastric acid)과 pepsin의 분비증가, 점막 혈액 흐름의 차단, 내재성 prostaglandin 분비 감소, 세포분열의 억제 등으로부터 발생된다[8].

소화성 궤양의 서의학적 치료는 약물요법으로 공격인자 억제제와 방어인자 증강제를 사용하는데 제산제, 항콜린성 약물, anti-histamine (cimetidine,

ranitidine), protron-pump inhibitor, 점막보호제 등이 있다. *Misoprostol*은 Prostaglandin 합성제제로 위점막보호제이며 위점막 손상을 보호함으로써 공격인자와 방어인자에 모두 관여하여 소화성 궤양의 치료나 예방에 효과가 있어, 최근에는 Aspirin과 NSAID투여시 소화성 궤양의 예방목적으로 함께 활용하고 있다[9].

Indomethacin은 Prostaglandin 합성을 억제하며 위점막 방어벽을 파괴함으로써 수소이온의 역확산이 일어나 위점막을 손상시킨다. 점액분비와 위 · 십이지장의 bicarbonate분비를 감소시키고 위산분비를 증가시킨다. 점막 Prostaglandin의 결핍은 손상 후 내피세포의 재건을 방해한다[10-12]

소화성 궤양의 증상으로는 상복부와 심와부의 동통, 속쓰림, 팽만감, 신물 오름, 토혈이나 흑변이 나타나거나 오심과 구토가 있을 수 있는데[1,13] 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 유사하다[14-18]. 소화성 궤양의 辨證施治에 대하여 陳 등[16]은 肝胃不和型, 脾胃氣虛型, 脾胃虛寒型, 脾胃陰虛型으로 나누어 각각의 治法을 疏肝理氣法, 補氣健脾法, 溫中益氣法, 養陰益胃法을 제시하였다. 그밖에도 李 등[18]에 의해 瘀血阻滯型에는 活血化瘀法이, 危 등[17]과 楊 등[19]에 의해 鬱熱型에는 泄熱和胃法이 각각 제시되었다.

滋陰建脾湯은 明代 龔 廷賢의 『萬病回春』[20]에 氣血虛損으로 나타나는 眩暈에 仙劑라고 처음으로 기재된 處方이다. 處方 中의 半夏 陳皮 白茯苓 甘草는 二陳湯으로 祛痰하고 乾地黃 當歸 白芍藥 川芎은 四物湯으로 補血하고 白朮 白茯苓 人蔘 甘草는 四君子湯으로 補氣하고 人蔘 白茯神 遠志는 寧神益智하고 人蔘 麥門冬은 補心生津한다. 따라서 滋陰建脾湯은 氣血이 虛損하고 脾胃虛弱과 心脾虛로 생기는 痰飮의 치료에 탁월한 효과가 있다[21].

본 실험에서 GE군의 위점막에서 출혈성 침식과 중성 점액질 분비세포 및 산성점액질 분비세포의 유실 등의 점막손상이 일어났으며, 이는 COX-1 mRNA 발현억제에 의한 세포내 arachidonic acid의 prostaglandin 전환과정 저해의 결과로[12,23] prostaglandin의 분비 차단에 의해 점막의 mucus와 bicarbonate 보호장벽이 결핍되어 점막보호장벽의 손상에 기인한다[24]. COX-1은 house-keeping enzyme으로서 위장관 보호, 신장의 혈류조절 및 혈소판 응집과 같은 정상적인 생리적 과정을 유지함으로써 세포의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다[25,26]. 본 실험에서는 출혈성 침식 지역주변에서 COX-1에 대한 양성반응이 거의 나타나지 않아 COX-1의 결핍이 점막손상의 일차적 원인으로 설명될 수 있다.

GE군의 위점막 손상은 점막고유층에 존재하면서 위점막 손상의 회복에 관여하는 표층 모세혈관망의 손상을 초래하였고[27] 그 결과 그 주변부에서 적혈구 울혈이 관찰되었다. 또한 이러한 모세혈관의 손상은 재관류 시 허혈성 조직손상을 유발하기도 하였고[28] 이러한 손상부위에서는 중성호성 백혈구를 비롯한 백혈구, 대식세포, 비만세포 등의 염증관여세포들의 침윤증가도 확인되었다[29].

점막손상은 외부로부터 가해지는 여러 가지 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위한 스트레스 단백질의 합성 증가를 유도하며 열 충격 단백질 (Hsp)군이 대량 합성된다[30]. 이 단백질의 하나인 Hsp70은 정상적으로 세포질 내에 위치하다가 스트레스가 가해지면 핵내 핵소체 주위로 이동하며 회복기에 들어서면 다시 세포질로 돌아간다. Hsp70은 환경적 스트레스에 의해 부분적으로 변성된 단백질들과 결합하여 변성된 단백질간의 상호 응축을 감소시키거나 새롭게 합성되어지는 폴리펩타이드의 적절한 폴딩과 세포 내 이동위치를 조절함으로써 세포를 보호하는 molecular chaperone으로 작용하는데[31] GE군에서 Hsp70 양성반응이 증가하였으며 이러한 Hsp70의 양성반응은 핵 내에서 강하게 나타났다.

소화관 세포 분열에 있어서 위샘 목부분에서 일어나는 세포분열을 통해 새로운 표면점액세포의 생성이 이루어지는데 GE군에서 세포분열이 감소한 것이 thymidine analogue인 BrdU[32]를 통해 확인되었다. 점막손상지역에서는 세포분열 (proliferation) 의 변화와 함께 점막상피세포의 세포자멸사(apoptosis)도 관찰되었다. 또한 과도한 세포자멸사가 출혈성 침윤지역의 세

포에서 발생하여 분열과 세포자멸사의 균형을 잃었다. 이러한 세포자멸사는 점액분비세포의 oxidative stress와 미토콘드리아 기능 저하, caspase-3 activation, ceramide pathway activation, mitogen activatedprotein kinase activation 등과 같은 기전을 통해 이루어진 것으로 생각된다[33-35].

본 실험에서는 NF-κB의 변화를 NF-κB p50 항체를 이용한 면역조직화학으로 조사하였는데 GE군의 점막상피 손상지역에서 급격하게 증가된 양상을 보였다. 점막손상은 oxygen free radical에 의한 lipid peroxidation (지질과산화)으로 세포막의 polyunsaturated fatty acids를 degradation시켜 막구조의 붕괴를 초래되는데 이러한 외부자극에 의한 세포 내 산화환원상태 및 외부에서 첨가된 산화제, 항산화 등에 의해 nuclear factor (NF)-κB의 세포 내 작용이 유도된다. 이러한 NF-κB의 조절이 깨어졌을 때 급성 염증에 의한 조직손상이 초래된다[36]. 전사인자인 NF-κB는 세포질 내에서 I-κB라는 inhibitory protein이 부착된 상태로 존재하다가 자극이오면 I-κB가 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 κB site에 결합함으로써 전사를 유도한다[37]. NF-κB의 증가는 다시 전염증성 물질인 COX-2를 비롯해, 세포성 면역과 세포 기용 등의 과도한 증가를 촉발시키는데 먼저 COX-2의 증가가 GE군에서 관찰되었다. COX-2는 외부자극에 의해 염증이 유발되어 전달되는 과정에서 유도성 동종효소 (inducible isoform)로 섬유모세포와 큰 포식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되어 염증이 일어나는 곳에서 proinflammatory prostagladin을 과량 방출한다[38,39]. 또한 PKC의 활성은 염증 유발성 cycytokine인 TNF-α의 발현 증가를 통해 염증 반응 가속화를 유도한다[40]. TNF-α의 증가는 IL-8, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor 등의 생성을 증강시켜 혈관생성을 촉진하는 역할을 하게 되는데41 본 실험에서는 점막 고유층 내 적혈구 누출 증가를 통해 신생 혈관 증가를 간접적으로 확인할 수 있었다.

한편 MA군과 JG군에서는 COX-1 발현을 통한 prostaglandin의 정상적인 분비는 mucus와 bicarbonate 보호장벽을 유지시켰으며 점막세포의 세포분열 지속과 세포자멸사 감소의 균형을 이루었다. 그 결과 GE군의 점막에서 관찰된 점막세포의 손상과 염증반응 정도는 MA군과 JG군보다 강하게 나타났고, MA군에 비해 JG군에서 정상적인 위점막에 더 가까운 형태가 관찰되었다.

이상의 결과로 補氣補血 健脾化痰하는 滋陰健脾湯은 위점막 손상에 대한 치료효과가 인정되었으며, 滋陰健脾湯 투여군이 Misoprostol 투여군에 비하여 우수한 효과를 나타내었다. 이로 미루어 祛濕化痰을 주로 하고 氣血을 補하는 滋陰健脾湯은 扶正祛邪하는 약물로 소화기 염증 및 궤양에 있어서 임상적 활용이 기대된다.

## 결 론

위점막 손상에 대한 滋陰健脾湯의 치료효과를 연구하기 위하여 indomethacin을 이용하여 실험용 생쥐의 위점막 손상을 유발한 후, 각각 滋陰健脾湯과 Misoprostol을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 출혈성 침식과 궤양 및 출혈성 찰과 시 누출되는 혈액세포와 비만세포는 Misoprostol 투여군과 滋陰健脾湯 투여군에서 모두 감소하였다.
2. 중성점액분비세포의 분포와 산성점액분비세포의 분포 및 복합당질 PNA 양성반응은 Misoprostol 투여군과 滋陰健脾湯 투여군에서 모두 증가하였다.
3. 세포자멸사 (Apoptosis), 스트레스에 대한 완충적 물질 (Hsp70), 급성 염증 관련매개물질 (PKC, NF-κB p50, COX-2, TNF-α)은 Misoprostol 투여군과 滋陰健脾湯 투여군에서 모두 감소하였는데, 滋陰健脾湯 투여군이 Misoprostol 투여군에 비하여 유의한 결과를 나타내었다.
4. 세포증식에서 관찰되는 BrdU와 세포내 보호기전에 관계하는 COX-1의 양성반응은 Misoprostol

투여군과 滋陰健脾湯 투여군에서 모두 증가하였는데, 滋陰健脾湯 투여군이 *Misoprostol* 투여군에 비하여 유의한 결과를 나타내었다.

## 參考文獻


1. 新谷太. Steps to internal medicine pathophysiology로 이해하는 내과학 소화기질환(6). 서울: 정담. 2002:63-72
2. 손정숙, 임성우. 四君子湯合蒼朮地楡湯이 위점막손상에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(2):231-48
3. 김경선, 신홍묵. 加味香砂六君子湯의 Indomethacin 유도 위점막손상에 미치는 항산화효과. 대한한의학회지. 1998;19(1):165-78
4. 공경환. 香砂六君子湯의 Indomethacin 유발 위점막 손상에 대한 효과. 상지대학교 석사학위논문. 2001
5. 강재춘, 박동원, 유기원. 槐花散이 항소화성궤양 및 혈액응고작용에 미치는 실험적 연구. 대한한의학회지. 1997;18(1):238-50
6. 김주성. 沙蔘麥門冬湯이 위 · 십이지장 점막손상의 회복에 미치는 영향. 동국대학교 박사학위논문. 2001
7. 신혜승. 益胃湯의 Indomethacin 유발 위점막 손상에 대한 효과. 상지대학교 석사학위논문. 2003
8. Georg D. Arlt and Maarkus Leyh : Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. *Langenbeck's Arch Surg.* 2001;386:75-81
9. 김경환 역음. 이우주의 약리학 강의. 서울:의학문화사. 1997:719-28
10. 全國韓醫科大學 脾係內科學教授 共著. 脾係內科學. 서울:아트동방. 1998:239-49
11. Koji Takeuchi, Shigeru Ueki, and Susumu Okabe. Importance of gastric motility in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric lesions in rats. Digestive Diseases & Sciences. 1986;31(10):1114-22
12. Lee S. Siomon. Biology and toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current Oponion in Rheumato logy.* 1998;10:153-8
13. 서울대학교 의과대학편. 소화기학원론. 서울:서울대학교출판부. 1998:122-9
14. 方藥中, 鄭鐵濤, 李克光, 金壽山, 黃星垣, 董建謙 등. 實用中醫內科學. 中國: 上海科學技術出版社. 1986:207-32
15. 北京中醫學院. 漢醫學臨床病理. 서울:성보사. 1983:195-9
16. 陳貴廷, 楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京:中醫藥科技出版社. 1991:437-41
17. 危北海, 越榮萊, 李乾构 . 中醫脾胃學說應用研究. 北京:北京出版社. 1993:203-10
18. 李乾构 , 王自立. 中醫胃腸病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1995:448-54
19. 楊思澍, 陳貴廷, 胡國臣. 實用中西醫結合臨床手冊. 北京:人民衛生出版社. 1992:637
20. 龔廷賢. 萬病回春. 北京:人民衛生出版社. 1993:217-8
21. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울:의성당. 2002:290
22. 許峻. 原本 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1998:203
23. Byron Cryer and Michael B. Kimmey : Gastrointestinal side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Am J med.* 1998;105:20-30
24. 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
25. Byron Cryer and Andre Dubois : The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase-a review. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 1998;56:341-61
26. Choitsu Sakamoto ; Roles of COX-1 and COX-2 in gastrointestinal pathophysiology. *J Gastroenterol.* 1998;33:618-24
27. Wallace, J. L., and Granger, D. N. : The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB.* 1996;10:731-40
28. Wallace, J. L. : Gastric ulceration ; critical eventsat the neutrophil-endothelium interface. Can. *J. Physiol. Pharmacol.* 1993;71:98-102
29. Kathleen B. Bamford : Chronic gastrointestinal inflammation. FEMS *Immuno Med Microbio.* 1999;24:161-69
30. De Maio A. : The heat-shock response. *New Horiz.* 1995;2:198-207
31. Valazquez J. M. and Lindquist S. H : Hsp 70 - Nuclear concentration during enviromental stress and cytoplasmic stroage during recovery. *Cell.* 1984;36:655-62
32. Martin Kulldorff, Lisa M. McShane, Arthur Schatzkin, Laurence S. Freedman, Michael J. Wargovich, Cindy Woods, Donald K. Corle, Barbara O' Brien, and James Moler : Measuring cell proliferation in rectal mucosa : Comparing bromodeoxyuridine(BrdU) and proliferating cell

nuclear antigen (PCNA) assays. *J Clin Epidem.* 2000;53: 875-83

33. Peter Ch. Konturek, Tomasz Brozowski, Stanislaw J. Konturek, Astrid Taut, Zbigniew Sliwowski,: Activation of gene growth factors and cyclooxygenases in rat gastric mucosa during recovery form stress damage. *Europe J Pharmaco.* 1998;342:55-65
34. 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
35. 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;16:167-73
36. Baeuerle P. A. : IκB-NF-κB structure: at the interface of inflammation control. *Cell.* 1998;95:729-31
37. Baeuerle P. A. and Baltimore D. : NF-κB - Ten years after. *Cell.* 1996;87:13-20
38. I. Kirman, B. Vainer, and O. H. Nielsen : Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm res.* 1998;47:285-9
39. 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;72:157-65
40. 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
41. Yoshida S., Ono M., Shono T., Izumi H., Ishibashi T., Suzuki H., Kuwano M. : Involvement of IL-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in TNF-α dependent angiogenesis. *Mol. Cell Biol.* 1997;17: 4015-23