

원 저

Dextran Sulfate Sodium으로 유발된 생쥐의 대장염에 미치는 地榆湯의 효과

이성환, 최흥민, 임성우

동국대학교 한의과대학 비계내과학교실

Effects of *Jiyutang* on DSS-induced Colitis of the Mouse

Seong-hwan Lee, Heung-min Choi, Seong-woo Lim

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

Objectives : We examined the effect of *Jiyutang*(JYT) on the experimental ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium(DSS).

Methods : Experimental colitis was induced in mice by daily treatment with 3% DSS in the drinking water for 5 days. Afterward, the mice were divided into two groups: the control group was administered water and the sample group was administered JYT for 7 days.

Results : The sample group provided JYT for 7 days demonstrated faster recovery of body weight compared with the control group. Histologic change showed faster regeneration of crypt and surface epithelial cells, decreased edema of the submucosa, and decreased lymphatic follicles of mucosa compared with the control group. Immunohistochemical stain using COX-2 gene was decreased. Regeneration of surface epithelial cells and goblet cells in mucosa was observed by transmission electron microscope.

Conclusion : These results indicate therapeutic effect of JYT on DSS-induced colitis in mice.

Keywords : *Jiyutang*, colitis, dextran sulfate sodium, COX-2, HSP.

Key Words : *Jiyutang*, colitis, dextran sulfate sodium, COX-2, HSP.

서 론

염증성 장질환은 장에 만성적인 원인불명의 염증을 일으키는 질환으로, 통상 궤양성 대장염과 크론병을 지칭하며¹⁾, 임상증상은 혈성 설사, 복통, 배변 후 후중감 등이 있고 복부 종괴, 체중 감소, 발열 등이 동반되기도 한다. 원인과 병태 생리는

확실히 밝혀진 바가 없어서 근원적인 약물 요법은 없고 증상의 완화와 관해의 유지가 치료의 요점이 된다^{2,3)}.

한의학에서는泄瀉, 下痢, 腸澼, 腸風, 腹痛의 범주에 속하고⁴⁾, 病因은脾胃損傷 肝氣鬱結로 橫逆犯胃, 飲食不節로 脾胃虛, 大腸濕鬱氣滯 등으로 생기며, 病的 급성기와 활동기 濕熱이 氣血과 相搏하여 大腸에 壅滯된 경우 清熱利濕, 理氣行滯의 治法을 쓴다⁵⁾.

地榆湯은 [東醫臨床方劑學]에 기록된 처방으로, 直腸出血, 子宮出血, 搔爬手術 후 출혈에 대응하는 처방으로, 涼血止血, 解毒斂瘡, 活血補血하는 효능이 있고⁶⁾, 地榆湯의 동물 실험 연구로 흰쥐의 위

· 접수 : 2007년 2월 25일 · 논문심사 : 2007년 2월 25일
· 채택 : 2007년 3월 8일
· 교신저자 : 임성우, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지 동국대학교 일산한방병원 (Tel : 031-961-9043, Fax : 031-961-9009 E-mail : omdlsw@duih.org)

궤양에 대한 위점막의 항궤양효과와 補血효과에 대한보고⁷⁾가 있고, 김 등⁸⁾은 導赤地榆湯이, 최 등⁹⁾은 沙蔘麥門冬湯이, 안 등¹⁰⁾은 黃連解毒湯이 염증성 장질환의 치료에 효과가 있다는 실험적 보고를 한 바 있다.

이에 저자는 DSS(Dextran sulfate sodium : mw 40,000)로 유발된 대장 점막 손상에 대한 地榆湯의 효과를 실험적으로 규명하기 위하여, 생쥐 대장 점막의 육안적 소견, 점막 내 보호장벽, 염증관련매개물질, 세포자기살해 등의 변화를 관찰하던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 약재 및 동물

1) 약재

본 실험에 사용된 地榆湯(Jiyutang)은 《東醫臨牀方劑學》⁶⁾에 준하여 동국대학교 부속 일산한방병원에서 조제된 것으로 1첩의 분량은 다음과 같다(Table 1).

2) 동물

본 연구에 사용한 실험동물은 체중 약 30g 내외의 ICR계 수컷 생쥐를 대한실험동물센터에서 분양 받아 실험실 환경에서 7일 동안 적응시킨

후, 본 연구에 사용하였다. 실험에 들어가기 전까지 실험동물에게 물과 음식을 자유롭게 마실 수 있게 하였다

2. 방법

1) 대장염의 유발

본 실험의 대장염 유발군은 3%의 dextran sulfate sodium(이하 DSS, mw 40,000, ICN, USA)을 5일 동안 음용시킨 후 이상의 증상을 나타내는 생쥐들만을 선택하였고, 대조군은 대장염 유발군에 DSS의 음용을 중지하고 7일 동안 생수를 음용시켰으며, 실험군은 대장염 유발군에 DSS를 중지하고

7일동안 검액을 음용시켰다. 정상군, 대조군, 실험군은 최종시간(DSS 5일+시료7일=12일)까지 생존한 쥐를 사용하였고, 그룹당 최소 5마리씩을 사용하였다.

2) 검액의 제조와 투여 실험군에서 검액을 음용시켰는데, 2첩의 약제를 증류수 1ℓ에 넣고 약 2시간 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 100ml으로 감압 농축하여 7일 동안 매일 2.5 ml/kg 씩 투여하였다.

3) 조직표본의 준비

현미경 관찰을 위한 표본은 생쥐를 sodium pentobarbital용액으로 마취하고 복부 중앙을 절개하여 소화관 전체를 적출한 후 맹장 하부의 대장

Table 1. The amount and composition of Jiyutang (JYT) extract.

Species	Scientific name	Weight(g)
地榆 <i>Sanguisorbae radix</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	20.00
當歸 <i>Angelicae gigantis radix</i>	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	20.00
川芎 <i>Cnidii rhizoma</i>	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	20.00
阿膠珠 <i>Asini gelatinum</i>	<i>Equus aninus</i> L.	6.00
槐花 <i>Sophorae flos</i>	<i>Sophora japonica</i> L.	4.00
乾薑 <i>Zingiberis rhizoma</i>	<i>Zingiberis officinale</i> ROSC.	4.00
荊芥 <i>Schizonepetae herba</i>	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> BRIQ.	4.00
甘草 <i>Glycyrrhizae radix</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH.	2.00
Total amount		80.00

전체를 적출하여, 실온에서 24시간 동안 10% 중성 포르말린용액(NBF;natural buffered formalin)에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μ m 두께의 연속절편으로 제작하였다.

4) 조직화학적 염색

(1) Hematoxylin & Eosin(H & E) Stain

조직의 일반적인 성상은 paraffin에 포매한 절편한 조직을 Xylene으로 탈파라핀(deparaffination)한 후, 에탄올을 농도별로 거치면서 가수(hydration)시키고 hematoxylin에서 5분 동안 염색하고 다시 1% acid alcohol 용액 처리 후 ammonia water 처리하였다. 다시 eosin 용액으로 염색한 후 에탄올을 농도별로 거치면서 탈수(dehydration)시키고, Xylene을 이용하여 씻고 봉입하였다.

(2) Alcian Blue-PAS Stain

점액질과 glycogen을 관찰하기 위하여 paraffin에 포매하여 절편한 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀 후 에탄올을 농도별로 거치면서 가수시키고 Alcian blue 용액에 30분 동안 염색하여 물로 씻은 후 0.3% sodium carbonate 용액으로 30분 동안 처리한 후 다시 씻고, 0.5% periodic acid 용액으로 10분 동안 산화시켜 물로 씻은 후 Schiff 용액으로 15분 동안 염색하고 sulfurous 용액으로 씻은 후 에탄올을 농도별로 거치면서 탈수시키고 Xylene을 이용하여 씻고 봉입하였다.

5) 면역조직화학적 염색

파라핀에 포매된 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀한 후 절편을 proteinase K(20 μ g/ml)에 5분 동안 proteolysis한 후, blocking solution으로 serum을 H₂O₂로 5분 처리하여 endogeneous peroxidase

를 제거하고 10% normal goat serum에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체로 다음 표에 있는 항체들을 이용하여 항원항체반응을 한 후 rabbit anti-lab COX-1(1:500, Chyman, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 12시간 동안 반응시켰다. 다음 2차 항체(secondary antibody)인 biotinylated goat anti-rabbit IgG(1:1000, DAKO, USA)에 실온에서 10분 동안 link하였고, Steptavidin peroxidase(LSAB:DAKO)에 10분 동안 실온에서 반응시켰다. DAB 발색처리 후 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 1차로 사용한 항체들은 다음과 같다(Table 2).

6) Apoptosis 변화 관찰

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. 파라핀에 포매하여 절편한 조직을 Xylene을 이용하여 탈파라핀 후, proteinase K(20 μ g/ml)로 5분 동안 proteolysis시키고, quilibrium buffer에서 20초 동안 처리하였다. 다음 strength TdT enzyme(36 μ l dT enzyme : 72 μ l reaction buffer)을 처리하여 37 $^{\circ}$ C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후, strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB으로 처리하여 Methyl green으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7) 영상분석과 통계처리

면역조직화학과 TUNEL 염색 결과를 수치화하

Table 2. Antibody list.

Antibody	source	Company
Cox 1	rabbit	Santa cruz biotec, USA
Cox 2	rabbit	Santa cruz biotec, USA
PCNA	rabbit	Sigma, USA
Heat shock protein 70	rabbit	Chemicon, USA



Fig. 1. Colitis induced DSS. There are two inflammation region located in the left side.

여 SPSS(Statistical Package for Social Science) for Windows Ver.12.0 프로그램을 사용하여 통계 처리 및 분석하였으며, 모든 결과는 Mean±SEM 으로 표시하였다. 각 군 간의 비교는 one-way ANOVA test를 이용하였고, p<0.05를 유의한 수준으로 보았다.

결 과

1. 육안적 소견

DSS로 대장염을 유발시킨 생쥐의 육안적 변화는, 먼저 DSS를 음용시킨 후 3일에 혈변과 함께 설사를 시작하며 털의 윤기가 없어지고 누렇게 탈색되고 체중감소를 보였으며 항문주변의 피부조직이 짓물러졌다. 대조군은 DSS 음용 후 5일에 전형적인 대장염 증상을 보이는 것을 사용하였다.

조직처리를 하기 전 생쥐의 장표면을 살펴본 결과, 대장염이 유발된 장상피 표면에는 염증부위를 나타내는 흰색의 반점들을 다수 관찰하였다(fig. 1).

대장염이 유발된 생쥐의 대장 길이와 두께의 변화는, 정상군은 평균 76.50 mm 대조군은 평균

61.38 mm로 감소하였으나, 地榆湯을 투여한 실험군에서는 68.11mm였다. 두께의 변화는 정상군에서는 0.48 mm, 대조군에서는 0.61 mm, 실험군에서는 0.56 mm였다(Table 3).

2. 조직화학적 결과

정상 대장 점막 표면에서는 잘 발달된 선와(crypt)와 연속적으로 잘 배열된 상피세포 그리고 많은 점액세포들을 관찰하였으나(fig. 2A), 대조군은 선와가 모두 짓물러진(erosion) 상태를 보였고, 점막근층은 불연속으로 점막하조직 내의 염증세포들이 점막층으로 유입되어(arrow) 많은 공포(vacuoles)가 나타나며, 공포 속에 중성호성백혈구 등 crypt abscess의 소견도 보였다(fig. 2B). 실험군은 짓물러진 대장표면의 선와가 회복되어 표면 상피 세포의 재생이 보였고 crypt abscess도 줄어들었다(fig. 2C).

3. COX-1 면역조직화학적 결과

대조군은 선와가 짓물러졌고, COX- 1의 염색 반응은 탈락된 부위에서 표면 상피세포까지 상피

Table 3. Change of the length and thickness of the colon.

	Normal	Control	Sample
Length of the colon(mm)	76.50	61.38	68.11
Thickness of the colon(mm)	0.48	0.61	0.56



Fig. 2. The H&E stain of colon. Arrows indicate erosion and depleted mucosa.
A: normal $\times 400$, B: control $\times 400$, C: sample $\times 400$

조직 전체에서 고르게 나타났다. 실험군에서는 선와가 새로 만들어졌으며, 잘 재생된 선와가 표면 상피세포 전반에 걸쳐 나타났으나 염증의 진행 정도나 회복 정도에 따른 COX-1의 면역반응의 변화는 관찰할 수 없었다.

4. COX-2 면역조직화학적 결과

정상군 점막층에 일부 COX-2에 양성반응을 나타내는 세포들이 있으며(fig. 3A), 대조군의 염색성이 선와 부분과 점막하층 모두에서 실험군보다 상대적으로 진하게 나타나, 대조군에서는 COX-2의 발현이 실험군보다 많음을 알 수 있었고(fig. 3B, 3C), 대조군에 비해 실험군에서 COX-2의 발현이 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

5. PCNA 면역조직화학적 결과

PCNA의 면역염색반응은 정상군에서는 약하게

나타났고(fig. 4A), 대조군에서는 점막전체와 특히 기저부에 걸쳐 진하게 나타났으며(fig. 4B), 실험군에서는 정상군보다 약하게 나타나(fig. 4C), 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

6. HSP 면역조직화학적 결과

열충격단백질(HSP70)의 면역염색반응은 정상군에서는 거의 반응이 나타나지 않았으나(fig. 5A), 대조군에서는 짓물러진 부위를 비롯하여 점막 전체에 걸쳐서 진하게 나타났고(fig. 5B), 실험군에서는 대장 점막의 표층과 중간층에서 주로 HSP70에 염색된 세포들이 나타났으며(fig. 5C), 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

7. apoptosis 결과

TUNEL 염색반응은 정상군에서는 점막표층에서 국한되어 양성반응이 나타났으나(fig. 6A), 대

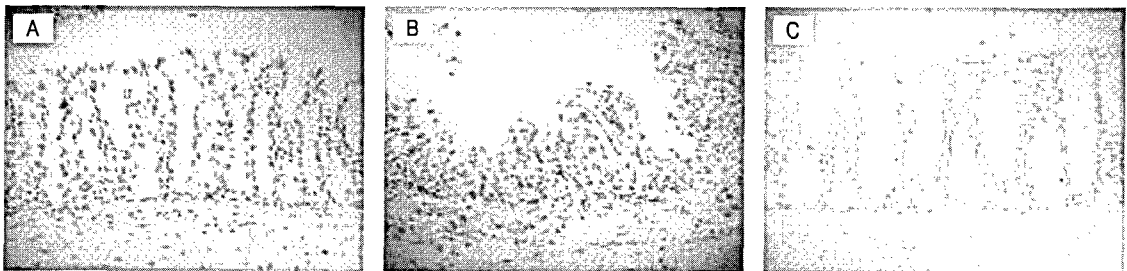


Fig. 3. The immunohistochemical stain of COX-2 antibody in colon.
A: normal $\times 200$, B: control $\times 200$, C: sample $\times 200$



Fig. 4. The immunohistochemical stain of PCNA antibody in colon.
A: normal $\times 400$, B: control $\times 400$, C: sample $\times 400$

조균에서는 표면상피의 탈락부위나 깃물러지는 부위 등 점막 전 층에서 진하게 나타났고(fig. 6B). 실험군에서는 염색반응이 정상군과 유사하게 점막 표층에만 국한되어 나타났고(fig. 6C), 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

고 찰

만성 염증성 장질환은 장의 원인불명의 염증을 일으키는 질환으로, 궤양성 대장염(ulcerative colitis)과 크론병(Crohn's disease)이 있다⁴⁾. 크론병은 복통, 복부 종괴, 항문 열상, 누공 등의 증상이 흔하고, 궤양성 대장염은 혈성 설사가 심하며 대장천공, 장출혈, 림육종등의 국소 합병증과 관절염, 신체발육부전, 만성 구내염과 같은 전신 합병증은 증상의 경과에 따른 치료의 아급성화를 심화시킨다^{1,11)}.

일반적인 약물치료인 부신피질호르몬(glucoc-

orticoid)을 이용한 관장 및 복용설파살라진(sulfasalazine) 및 면역억제제(immunosuppressive drug)의 사용은 안정적인 치료가 되지 못하고 경우가 많다. 약물치료가 효과 없고 대장출혈, 장 천공 및 감염 등의 치명적 합병증이 있거나 대장암으로 진행이 의심되는 육아종은 수술이 필요하다¹²⁾.

그러므로 만성 대장염은 안정적이면서도 효과적인 면역치료가 필요하다. 한의학의 下痢, 腸澀, 腸風 등은 濕熱內蘊, 氣滯血瘀, 脾腎兩虛, 陰血虧虛型으로 辨證할 수 있는데 腹痛, 泄瀉, 便血, 裡急後重, 身熱, 肛門灼熱, 小便短赤, 舌苔黃膩한 濕熱內蘊證의 만성대장염은 清熱利濕, 理氣活血法으로 치료한다⁹⁾.

地榆湯은 [東醫臨床方劑學]에 기록된 처방으로 涼血止血, 解毒斂瘡, 活血補血하는 효능이 있으며, 地榆, 當歸, 川芎, 阿膠珠, 槐花, 乾薑, 荊芥, 甘草로 구성되어 있고 腸風下血에 응용 할 수 있다⁶⁾.

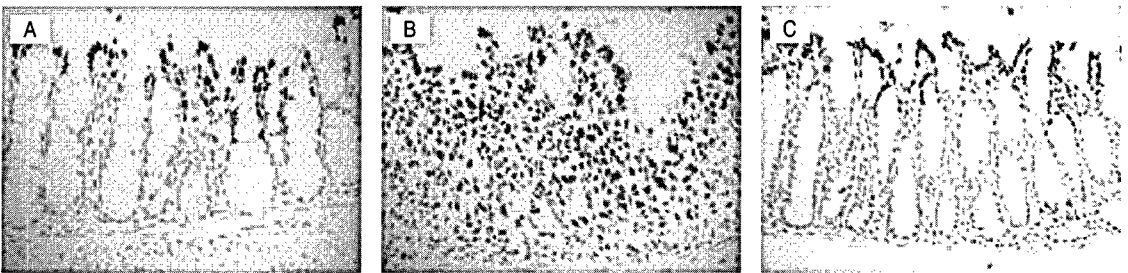


Fig. 5. The immunohistochemical stain of HSP70 antibody in colon.
A: normal $\times 400$, B: control $\times 400$, C: sample $\times 400$

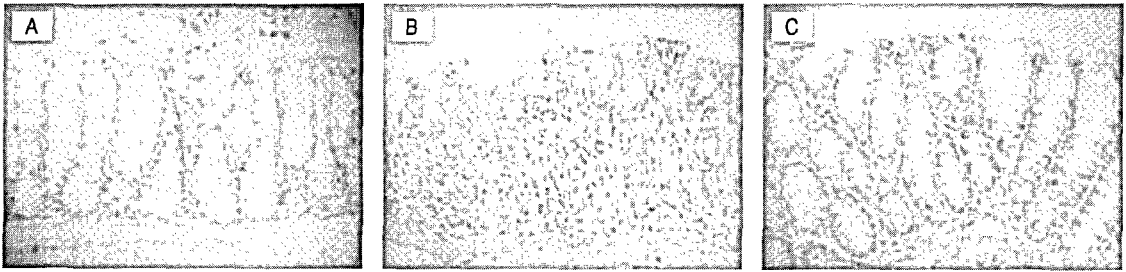


Fig. 6. The TUNEL stain for apoptosis in colon.
A: normal $\times 400$, B: control $\times 400$, C: sample $\times 400$

임상적으로 케양성 대장염이나 크론병등 만성 대장염에 효과가 기대되는 처방이다. 최근에 김 등⁸⁾은 導赤地榆湯이, 안 등¹⁰⁾은 黃連解毒湯이 흰쥐의 케양성 대장염 치료에 효과가 있으며, 최 등⁹⁾은 沙蔘麥門冬湯이 흰쥐의 대장 점막 손상의 치료에 효과가 있다는 세포면역실험을 하였다.

본 연구에서 DSS(Dextran sulfate sodium : mw 40,000)로 유발된 흰쥐의 대장 점막 손상에 대한 地榆湯의 효과를 대장 점막의 육안적 소견, 점막 내 보호장벽, 염증관련매개물질, 세포자기살해 등의 변화를 관찰하여 면역조직화학적 유의성을 얻었다.

염증성 장질환의 동물모델에 대한 실험연구들은 DSS를 음용시키거나¹³⁾, 초산(acetic acid)을 관장시키거나¹⁴⁾, TNBS(2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid)를 복강주사¹⁵⁾ 하는 등 여러 가지 방법이 이용하는데, 초산을 관장시키거나 TNBS를 주사하는 방법은 실험동물에게 상대적으로 많은 스트레스를 주고, 스트레스만으로도 대장염이 유발되어 실험적인 오차를 유발할 가능성이 많다.

DSS를 음용시키는 실험 방법은 실험동물에게 상대적으로 적은 스트레스를 주고, 사람의 대장염과 유사한 대장염을 유발시키므로, 본 연구에서는 흰쥐의 1일 평균섭취량을 측정하고 DSS를 식수에 희석하여 음용시켜서 대장염을 유발한 병태모델^{16,17)}을 사용하였다.

DSS로 대장염을 유발한 흰쥐의 체중 변화는, 정상군에서는 36g에서 점차적으로 체중이 증가하였으나 실험군에서는 일시적으로 체중이 감소하였으며, 地榆湯 음용 이후 체중의 회복을 보였다. 대장의 길이는 정상군, 실험군, 대조군의 순으로 평균길이가 길었고, 대장의 두께는 대조군, 실험군, 정상군의 순으로 평균두께가 두꺼워져 길이와 두께의 변화는 대장염과 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

조직학적으로는 정상군 대장의 상피에는 특히 술잔세포(goblet cell)가 많이 분포하여 창자샘 벽의 대부분을 이루고 있으며 그 사이로 약간의 표면 상피세포가 존재했다. DSS로 대장염이 유발된 대조군에서는 상피조직이 짓물러져 있었으며 염

Table 4. Cell count of the immunohistochemical stain and TUNEL stain.

Cell count	Normal	Control	Sample
COX-2 antibody	22 \pm 12.53 ^a	60.33 \pm 12.1 ^b	38.67 \pm 5.77 ^a
PCNA antibody	158.33 \pm 13.58 ^a	260.33 \pm 22.19 ^b	145.33 \pm 43.19 ^a
HSP70 antibody	2.0 \pm 1.0 ^a	82.7 \pm 22.72 ^b	21.3 \pm 9.29 ^a
Apoptosis	43.33 \pm 33.83 ^a	632.33 \pm 109.21 ^b	134.67 \pm 73.93 ^a

a-b Values with the different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

증세포가 증가했고, 실험군에서는 창자샘의 회복이 나타나면서 염증관련 세포도 대조군에 비해 상대적으로 감소했다. 대장에 존재하는 술잔세포는 대장 내의 점액을 생산하는 주된 세포로서 생산된 점액은 점막을 보호하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. DSS를 음용시켜 대장염을 유발시킨 생쥐에서는 창자샘의 많은 부분이 침식되어 없어지면서 그 벽을 이루던 술잔세포를 비롯한 여러 세포가 없어지며, 상피 탈락현상 그리고 염증세포의 침윤 등 심하게 손상된 모습을 나타내었다고 보고¹⁹⁾되었다. 본 연구에서도 이와 같은 전형적인 DSS로 인한 대장염 유발 확인 이후 地榆湯의 음용으로 대장염 회복 효과를 확인할 수 있었다.

cyclooxygenase(COX) enzyme은 COX-1, COX-2 두 개의 isoenzyme이 존재하는 것이 알려져 있으며, 각기 다른 유전자로부터 발현된다. COX enzyme은 prostaglandins(PGs)의 합성을 조절하는 효소이기도 하다. 내인성 PGs(PGE₂, PGI₂)는 위액의 분비조절, 점막의 혈류량과 점액의 알칼리 분비 촉진, 점막 연속성을 유지하는 기능으로 위장관이 보호된다는 사실이 알려져 있다²⁰⁾. COX enzyme 중 대부분의 세포에 널리 분포하고 있는 COX-1은 정상적인 위장관의 PGs 생산에 관여하여 점막 보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 반면, COX-2는 사이토카인, 성장인자, 종양촉진자 등의 여러 자극에 의해 유도되며^{21,22)}, 주로 조직에서 PGs를 생성하여 염증과 통증을 유발하는 것으로도 보고 되었다²³⁾. 그러나 COX-2가 위장관 손상을 치유하는 과정에서 중요한 기능을 한다는 보고들도 있어 아직 COX-2의 정확한 기능은 알려지지 않았다²⁴⁻²⁷⁾. 본 연구에서 COX-1의 반응은 실험군과 대조군에서 약한 양성반응을 나타내면서 정상군의 반응성과 크게 차이가 없어 COX-1의 반응성은 DSS로 유발된 염증 조직의 상해정도와는 상관없이 조직 내에 일정하게 발현되는 것을 알 수 있었다. COX-2의 반응 결과 정

상군에서는 거의 반응이 나타나지 않았으나, 대조군에서는 정상군보다 COX-2 양성반응이 증가하여 나타났으며, 실험군에서는 대조군보다는 감소하나 정상군보다는 증가하였다. 특히 대조군에서는 조직의 상해부위에 COX-2의 반응이 강하게 나타났다. 이는 염증상태의 COX-2의 과반응의 형태로 발현하여 염증반응을 증가시키는데 비해 地榆湯은 COX-2의 과반응을 억제시키는 것을 알 수 있었다.

세포분열을 확인하는 방법으로 널리 이용되고 있는 PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)는 분자량이 약 34kD인 내인성 단백질로 세포분열기 중에서 G1, S기 또한 G2기에도 발현되는 것으로 알려져 있으며, DNA polymerase delta의 cofactor로 작용하는 물질이다^{33,34)}. 정상군의 대장에서는 주로 창자샘의 하단부위에 양성 반응이 나타나고 있었으나, 대조군에서는 그 범위가 넓어져 있으며 염증유발 부위의 점막 전 층에서 양성 반응을 나타내었다. 실험군에서는 대조군에 비해 반응이 감소하였으며, 정상군과 유사한 반응을 나타내었다. 샘의 바닥부분에 주로 미분화세포가 존재하고 있으며 이들이 성숙부위로 이동하며, 여기에서 구조적, 효소적 성숙이 일어나 기능하는 세포로 분화하며 상피 쪽으로 이동하게 된다. 그러므로 염증유발로 인한 자극에 의해 세포증식 범위가 증가되었음을 나타내며, 실험군에서는 정상군에 가까운 정도의 양성반응을 보이고 있어 地榆湯이 상피세포 증식의 과반응을 억제하는 것을 알 수 있었다.

HSP70은 식물이나 이스트, 박테리아 및 포유류 등 살아있는 거의 모든 세포에서 발견되는 가장 대표적인 유도성 HSP(heat shock protein)이다. HSP family에는 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 및 HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재하며 이는 그 분자량에 의하여 명칭이 붙여졌다. Heat-shock-factor proteins(HSFs)으로부터 분리되기 시작하여, HSFs로부터 HSP90이 분리되면 HSF가 활성화되고, 활성화된 HSFs는 HSP70 gene의 전사를

촉진하여 스트레스를 받은 세포내에는 HSP70 단백질과 mRNA 수준이 급격히 증가하게 된다^{28,29}. 스트레스 상태에서 세포의 생존을 위한 HSP의 중요성을 많은 연구에서 보여주고 있으며, 또한 이 단백질은 생체 내에서 보호기능을 가진다^{30,31}. 또한 endotoxin으로 유발된 폐 손상에서 HSP70이 항염증 작용을 하는 것이 Koh 등³⁰에 의해 보고되고 있다. 본 연구에서 정상군의 대장에서는 HSP70의 면역반응이 거의 나타나지 않았으나, 대조군에서는 점막전체에 걸친 양성반응이 나타났고 실험군에서는 HSP70의 발현이 표층과 중간 부분에서 약하게 나타나, 地榆湯이 HSP70의 과다 발현을 억제하여 항염증 작용에 관여하여 상피세포의 손상을 보호하는 것을 알 수 있었다.

Apoptosis는 단백질 합성과 활성을 위해 에너지가 소모되어 세포가 사멸하는 과정으로, 광학현미경 하에서의 apoptosis의 특징은 세포수축, 세포질과 염색질의 응축, 세포표면 수포현상, 그리고 자연 살해된 세포의 파편 등이다. Apoptotic bodies는 주변세포에 염증 손상 없이 가까이 있는 식세포에 의해 제거된다^{35,36}. 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 apoptosis는³⁷ 세포내·외 신호에 의해 시작되어 일련의 과정을 거쳐 이루어지고, Bcl-2 family protein과 cysteine acid proteases인 caspase들이 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 알려지고 있다^{38,39}. apoptosis 기전의 결합이나 신호 전달의 부적절은 사멸된 세포의 과다증식으로 암이 되기도 한다. 크론병의 육아종성 대장염의 원인일 것으로 생각된다. Bcl-2 family protein은 anti-apoptotic protein과 pro-apoptotic protein으로 구성되어 있으며, 미토콘드리아 막의 투과성과 cytochrome c의 방출을 조절함으로써 apoptosis를 조절한다³⁶. Pro-apoptotic protein인 Bax는 미토콘드리아 막의 투과성을 증가시키고, cytochrome c의 방출을 증가시켜 apoptosis를 유도한다. 반면 anti-apoptotic protein인 Bcl-2는

Box와 결합하여 heterodimer를 형성하여 Bax의 활성을 억제하여 apoptosis를 막는다⁴⁰.

본 연구의 apoptosis를 알아보기 위한 TUNEL 염색 결과, 정상군에서는 점막 표면에 국한된 반응을 나타내고 있었으나, 대조군에서는 표면상피의 탈락 부위나 짓물러지는 부위에서 강한 양성 반응이 나타났으며, 실험군에서는 반응이 현저히 감소되었다. 정상적인 경우 대장의 상피세포는 apoptosis에 의해 상피표면이 탈락되는 것을 확인하였으며, DSS로 인한 대장염 유발이 apoptosis를 촉진시키는 것으로 나타났다. Bcl-2 family protein 혹은 cysteine acid proteases인 caspase에 작용한 것인지는 앞으로 더 연구해야 할 과제이나, DSS에 의해 apoptosis 현상이 유발되며, 地榆湯이 apoptosis 억제 혹은 적절한 조절에 효과적임을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과로 地榆湯은 DSS으로 유발된 대장염의 조직 손상에 대해세포의 재생 및 염증감소에 실험적 유의성을 나타내었으나, 위와 장점막의 궤양 형성을 억제하는 COX-1 발현은 실험적 면역반응 효과가 나타나지 않았다. COX-1의 발현은 위와 장 점막의 염증 반응에 항상 내재하는 것으로, 실질적인 위장 점막의 궤양 예방 효과를 알 수 있으므로, 궤양 치료의 예방적 효과를 위해서 앞으로 지속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

결론

본 연구는 생쥐에서 3% dextran sulfate sodium (mw 40,000)을 5일 동안 음용시켜, 인위적으로 대장염을 유발시킨 후 地榆湯을 투여한 효과를 관찰하였다.

1. 대조군과 실험군에서 정상군에 비해 전체 대장의 길이는 짧아지고 두께는 두꺼워졌는데, 실험군이 대조군보다 정상치에 가까웠다.

2. 조직화학적 염색 결과 선와의 짓무름, 표면상피 탈락, 고유관 내의 염증 세포 침착, 점막근층의 불연속, 점막하 조직에 많은 염증세포관찰, 점

막하 조직의 부종 등은 실험군이 대조군보다 점막 회복 속도가 빨랐다.

3. COX-1 면역조직화학적 염색 결과로, 염증의 진행 정도나 회복 정도에 따른 면역반응의 변화는 관찰할 수 없었다.

4. COX-2 면역조직화학적 염색 결과로, 실험군의 염색 개체 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

5. PNCA 면역조직화학적 염색 결과로, 실험군의 염색 개체 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

6. HSP70 면역조직화학적 염색 결과로, 실험군의 염색 개체 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

7. TUNEL 염색 결과로, 실험군의 염색 개체 수가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

참고문헌

1. 송인성. 한국인의 염증성 장질환. 대한내과학회지. 1999;57(4):661-674
2. 해리슨 내과학 편찬위원회. 해리슨 내과학. 서울. 정담. 1997:1276-1285
3. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 1996 최신지견 내과학 I. 서울. 군자출판사. 1997:420-436
4. 강태희, 원진희. 궤양성 대장염의 한의학적 접근 방식에 관한 연구. 한방성인병학회지. 1999; 5(1):137-162
5. 江楊淸. 中西醫結合內科研究. 北京. 北京出版社. 1997;277-287
6. 윤길영. 동의임상방제학, 서울. 고문사. 1989;84
7. 유기원, 박동원. 지유탕의 항궤양, 보혈효과에 대한 실험적연구 경희의학. 1989;5(4):432-447
8. 김승욱, 임성우. 도적지유탕이 궤양성 대장염 유발 흰쥐에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002; 23(3):200-210
9. 최준혁, 임성우. 사삼맥문동탕이 Indomethacin

- 으로 유발된 mouse의 대장 점막 손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2002;23(4):169-185
10. 안중환 외 4인. 황련해독탕이 DDS로 유발된 흰 쥐의 궤양성 대장염에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2006;27(2):182-195
11. Tiemey LM Jr, Mcphee SJ, Papadakis MA. Current Medical Diagnosis & Treatment. 서울. 한우리. 1999;686-695
12. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer. role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. Blood. 1990;76:655 - 663
13. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology. 1990;98:694-702
14. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. Digestion. 1978;17:135-150
15. Morris GP, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology. 1989;96:795-803
16. Kullmann F, Messmann H, Alt M, Gross V, Bocker T, Scholmerich J, Ruschoff J. Clinical and histopathological features of dextran sulfate sodium induced acute and chronic colitis associated with dysplasia in rat. International Journal of Colorectal Disease. 2001;16(4): 238-246
17. Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M. Hyperexpression of inducible costimulator on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium colitis. Gastroenterology. 2004;19(2):174-181
18. Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. Am J Physiol. 1991; 260:183-193

19. Park IS. Histological study of experimental colitis induced by dextran sulfatae sodium. The Korean J Anat. 2006;39(1):27-33
20. Konturek SJ, Piastucki I, Brzozowski T. et al. Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers. Gastroenterology. 1981;80:4-9
21. Smith WC, Meade EA, Dewitt DL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. Ann NY Acad Sci. 1994;714:136-142
22. Mitchell IA, Larkim S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2 : regulation and relevance in inflammation. Biochem Pharmacol. 1995;50: 1535-1542
23. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of elecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res. 1998;58:409-412
24. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, et al. Induction of cyclooxygenase2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. Gastroenterology. 1997;112:387-397
25. Shigeta J, Takahashi S, Okabe S. Role of cyclooxygenase-2 in the healing of gastric ulcers in rats. J Pharmacol Exp Ther. 1998; 286:1383-1390
26. Takahashi S, Shigeta J, Inoue H, Tanabe T, Okabe S. Localization of cyclooxygenase-1 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. Am J Physiol. 1998;275:1137-1145
27. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. Nat Med. 1999;6: 698-701
28. Welch WJ. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones : their roles in normal and stressed cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1993;339:327-333
29. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins : implications for protein folding and assembly. Science. 1990;248:850-854
30. Fukushima M, Sataka T, Tsuusui K, Arase K, Gomita Y, Asano C. Gradian pattern of stress response to affective cues of foot shock. Physiol Behav. 1981;27:915-920
31. Fuchimoto H, Sataka T, Ogawa N, Gomita Y. Olfactory bulb as aues in the communication of affect between rats. Fukuoka Acta Med. 1973;64:41-46
32. Koh Y, Lim CM, Kim MJ, Shim TS, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Kim WD. Heat shock response decrease endotoxin-induced acute lung injury in rats. Respiriology. 1999;4(4): 325-330
33. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature. 1987;326: 515-517
34. Fairman MP. DNA polymerase δ /PCNA : actions and interactions. J Cell Sci. 1990;95:1-4
35. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407:770-6
36. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature. 2000;407:784-788
37. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407:770-777
38. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. Trends Genet. 1995;11:101-105
39. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. Cancer Immunol Immunother. 2004;53:153 - 159
40. Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. Curr Opin Genet Dev. 1996;6:45-49