

흰쥐의 급성 위점막 손상에서 黃蓮湯이 apoptosis 관련단백질 및 성장인자 발현에 미치는 영향

김 범 회*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 동의대학교 한의학연구소

The Protective Effects of *Hwangyeon-tang* on Acute Gastric Ulcer induced by HCl/EtOH solution in Rats

Bum Hoi Kim*

College of Oriental Medicine, Dong-Eui University
Research Institute of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Abstract

The apoptotic process of gastric mucosa triggered by induction of proapoptotic gene expression, such as Bax. Stress-inducing factors may affect Bcl-2/Bax ratio and thus the rate of apoptosis through modulation of the expression of both proteins depending upon the experimental model. TGF- β is believed to be essential in wound healing for regulation of cell growth and differentiation and is known to be involved in tissue repair and remodeling. The polypeptide growth factors, such as vascular endothelial growth factor(VEGF), regulate essential cell functions involved in tissue healing including cell proliferation, migration, and differentiation.

The purpose of this study was to investigate whether the oral administration of *Hwangyeon-tang* (HYT) would have protect effects on gastric ulcer in rat. Sprague-Dawley rats (n=40) were randomly divided into 4 groups; Normal, Saline, Cimetidine and HYT group. The saline, cimetidine and HYT extract were orally administrated to each group and gastric ulcer was induced with HCl/EtOH solution. After 1 hour, the stomachs were collected for histological observation and immunohistochemistry. In Results, the wound healing of gastric ulcer was promoted by HYT and the significant alterations of BAX/Bcl-2, TGF- β 1 and VEGF proteins in gastric mucosa were observed. These results suggest that *Fritillaria ussuriensis* extract promotes wound healing and has protective effects on gastric ulcer in rats.

· 접수: 2011년 12월 13일 · 수정접수: 2012년 2월 3일 · 채택: 2012년 2월 3일

* 교신저자: 김범회, 부산광역시 부산진구 양정2동 산45-1 동의대학교 한의과대학
전화: 051-850-7411, 전자우편: bume@deu.ac.kr

Key words : Gastric ulcer, *Hwangyeon-tang*, BAX, Bcl-2, TGF- β 1, VEGF

I. 서론

소화성 궤양은 세계인구의 4~5%가 일생동안 한번 이상 경험하게 되는 흔한 소화기질환으로 위궤양, 십이지장궤양 등으로 분류하며, 과거에는 중년 이상의 연령층에서 주로 발병하였으나 최근에는 문화의 발달, 복잡한 사회생활, 스트레스 등 여러 요인이 원인이 되어 연령층이 10대까지 낮아지고 있는 추세이다.¹⁾ 소화성궤양의 주요 발병원인으로는 위산과 펩신 등의 공격인자와 점막 방어 인자들 사이의 불균형, *Helicobacter pylori* 감염, 비스테로이드계 항염증소염제(NSAID) 약물의 과다복용, 불규칙한 식습관, 흡연, 음주, 외상, 정신적·육체적 스트레스 등으로 알려졌다.²⁾ 위궤양은 산-펩신의 위액에 노출되는 부위의 위점막, 점막하 조직 및 근육층까지 침범되는 국한된 조직의 상실을 의미하는 것으로 한의학적으로는 胃脘痛 吞酸, 吐酸, 嘈雜, 噯氣, 嘔吐, 胃痛, 心下痛 등의 범주에 속한다.^{3, 4)}

위점막에는 자체적인 방어기전이 존재하는데 세포독성을 가진 요소들과 세균 및 다양한 온도와 pH, 삼투압농도에도 정상적인 점막기능을 유지하도록 해주는 여러 인자들이 존재한다.⁵⁾ 정상 상태에서 위점막은 pre-epithelial factor, 상피장벽, submucosal acid sensor, 끊임없는 세포재생, 위점막의 미세혈관을 통한 지속적인 혈액의 흐름 및 nitric oxide(NO)와 같은 내인성 방어가스 등의 방어기전에 의해 보호 받는다.⁶⁾ 이러한 방어기전은 다양한 유해인자로부터 위점막이 잘 견딜 수 있게 만들어 주는데 방어기전이 유해인자에 견디지 못할 경우 조직 괴사(tissue necrosis)와 세포자연사(apoptotic cell

death)에 의해 위궤양을 포함한 위점막 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 궤양의 치유는 체계적인 회복과정에 따라 진행되는데, 염증기, 세포증식기, 재상피화기, granulation tissue 형성기, 혈관형성기, 조직 재구조화 등을 거치게 되며, 이러한 모든 과정은 cytokine과 growth factor의 조절에 의해 이루어진다.⁸⁾

황연탕(黃連湯)은 장중경의 <傷寒論>에 최초로 기록되어 있으며, 주로 급·만성위염, 소화성궤양, 만성설사, 담낭염 등에 활용되어 왔다.⁹⁾ 황연탕에 대한 실험적 연구로는 CCl₄로 유도된 간중독 흰쥐에 황연탕의 독성완화 및 보호 효과가 보고되었으며,¹⁰⁾ LPS로 염증을 유발시킨 흰쥐에 내소황연탕이 항염증작용이 있음이 보고되었다.¹¹⁾ 본 연구에서는 흰쥐에 HCl·EtOH 경구투여로 유발된 급성 위점막 손상에 황연탕이 미치는 효과를 검증하고, 세포자연사의 지표인 BAX, Bcl-2의 발현 및 TGF- β 1, VEGF 등의 성장인자 발현변화를 측정하여 그 기전을 밝히고자 한다.

II. 실험방법

1. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코(경기도, 대한민국)에서 구입한 10주령, 약 250g 전후의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 40마리를 사용하였다. 흰쥐는 온도 21~23℃, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2. 약물의 제조와 실험군의 분리

황연탕 5첩 분량인 270g을 증류수 2L와 함께 round flask에 담고 냉각기를 부착한 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과액을 감압 농축하여 동결건조시켜 물추출액기스 55.8g을 얻었다. 투여량은 1일 인체투여량에 준하여 흰쥐 체중 100g당 47.8mg을 음용수에 녹여 경구 투여하였으며, 양성 대조약물로는 cimetidine(100mg/kg, 1mL)을 사용하였다.

실험군의 분리는 흰쥐를 무작위로 10마리씩 나누어 HCl·EtOH를 주입하기 30분전 황연탕 추출물을 경구 투여한 HYT군과, 동일량의 생리식염수를 투여한 Control군, cimetidine을 투여한 Cimetidine군, 그리고 아무런 처치도 가하지 않고 생리식염수를 경구 투여한 Normal군으로 분리하였다.

3. HCl·EtOH에 의한 급성 위점막 손상 유발

HCl·EtOH에 의한 급성 위점막 손상 유발은 Mizui 등의 방법을 사용하였다.¹²⁾ 요약하면, 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 황연탕 추출물, 생리식염수, cimetidine 약물을 각각 경구 투여하고 30분 뒤에 HCl·EtOH(60% EtOH + 150mM HCl) 1ml을 경구 투여하여 위손상을 유발하였다. 위손상을 유발시킨 흰쥐를 절식, 절수 하에 1시간 동안 방치한 뒤 ether로 희생하여 위를 적출하였다.

4. 위손상의 평가

각각의 적출된 위는 유문부를 결찰하고 위내에 2% formalin 용액 10mL을 넣어 10분간 고정한 후 대만부(greater curvature)를 절개하여 PBS로 위내 잔류물을 제거하고 먼저 육안으로 관찰한 후, 위점막 표면을 디지털 카메라로 촬

영하였다. 촬영 시에는 편차를 최대한 줄이기 위하여 카메라의 위치를 고정시킨 채 시행하였다. HCl·EtOH에 의한 급성 위점막 손상의 경우 전체 손상 길이(total lesion length)는 손상 부위의 전체길이를 mm 단위로 표시하였다.¹³⁾

5. 위점막 손상의 억제율

HCl·EtOH에 의한 급성 위점막 손상에서의 억제효과는 측정된 손상길이를 다음과 같은 식으로 계산하여 억제율(%)로 나타냈다.¹⁴⁾

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{Control군의 손상길이} - \text{Sample군의 손상길이}}{\text{Control군의 손상길이}} \times 100$$

6. 해부조직학적 관찰

해부조직학적 염색을 위해 위조직을 4% formalin에 48시간 동안 고정시키고 50, 80, 95 및 99.9%의 EtOH에 순차적으로 담귀서 탈수시킨 후, xylene으로 행구고 paraffin으로 포매하였다. 위조직을 5 μ m 두께의 절편으로 자르고 hematoxylin-eosin (H&E) 염색법으로 염색한 후, 현미경으로 통해 관찰하였다.

7. Immunohistochemistry

면역조직화학염색방법은 자유부유법(free-floating)을 사용하였다. Primary antibody는 anti-BAX(ab7977, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; ABcam), anti-Bcl-2(sc-783, 1:200 dilution, rabbit polyclonal; Santacruz), anti-TGF- β 1(ab9758, 1:100 dilution, rabbit polyclonal; ABcam) 및 anti-VEGF(ab46154-100, 1:100 dilution, rabbit polyclonal; ABcam)로 PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시켰다. 이후 조직을 PBS로 씻어내고, avidin-biotin immunoperoxidase의 방법

(ABC Vectastain Kit)에 따라 각각 1시간씩 반응시켰다.

8. 양성반응 세포의 관찰

면역조직화학법으로 염색된 BAX, Bcl-2, TGF-β1 및 VEGF의 발현은 CCD카메라가 장착된 광학현미경을 사용하여 관찰하였으며 각 지표의 발현 정도는 양성반응 세포수를 측정하여 비교하였다. 양성반응 세포수 측정을 위하여 각각의 영상을 영상분석시스템에 저장하고 Infinity Capture imaging software(ver.3, Lumenera, Canada)를 사용하여 양성반응 세포수를 측정한다. 다음 일정면적(10⁵ μm²)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

9. 통계학적 분석

측정된 모든 자료는 정규성 검정을 거친 후, student's t-test를 사용하여 P<0.05 및 P<0.01의 유의수준으로 검증하였다.

III. 결과

1. 급성 위손상의 육안적 평가

각각의 약물을 경구 투여하고 30분 뒤에 HCl·EtOH을 투여하여 위손상을 유발시킨 뒤, 1시간 후 흰쥐를 희생하고 위를 적출하였다. 위점막을 육안으로 관찰하고 디지털카메라로 촬영한 결과, Control군의 위점막에서 손상이 뚜렷이 관찰되었는데, 검붉은 출혈성 손상이 선형의 형태로 나타났다(Figure 1B). 반면에 Cimetidine군과 HYT군에서는 출혈성 점막손상이 현저히 감소되었음이 확인되었다(Figure 1C, D).

2. 위점막 손상길이

선형으로 발생된 위점막 손상부위를 디지털카메라로 촬영하여 길이를 측정한 결과 Control군은 9.3±1.2mm, Cimetidine군은 4.8±0.9mm, 그리고 HYT군은 6.0±0.8mm로 Cimetidine군

Table 1. Herbal Composition of *Hwangyeon-tang*

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Weight
當歸	<i>Angelica Gigantis Radix</i>	10g
乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	8g
白芍藥	<i>Paeonia Radix</i>	6g
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	6g
白蒺藜	<i>Tribulus terrestris</i>	6g
防風	<i>Ephedrae Herba</i>	6g
何首烏	<i>Polygonum multiflorum</i>	4g
荊芥	<i>Schizonepeta tenuifolia Briq.</i>	3g
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	3g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2g
total		54g

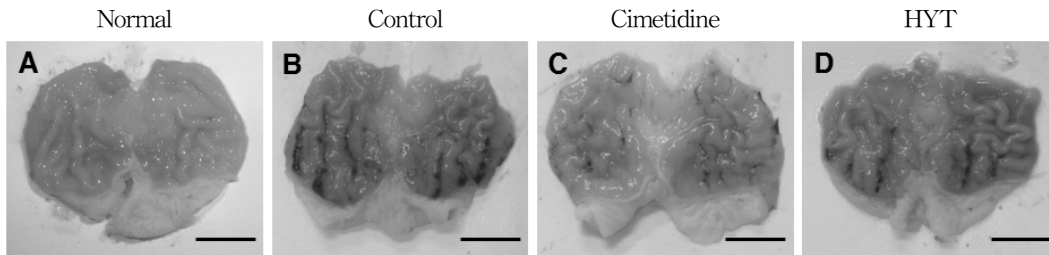


Figure 1. Gross appearance of HCl · EtOH induced acute gastric ulcer. The significant linear hemorrhages were observed in rats of Control, Cimetidine and HYT group(B). The hemorrhages were reduced in Cimetidine and HYT groups compared to Control group(C, D). scale bar = 1cm.

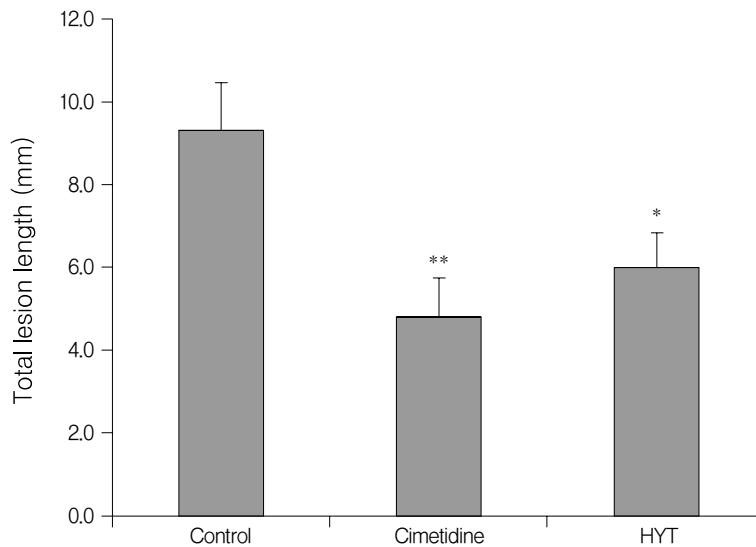


Figure 2. Total lesion length induced by HCl · EtOH solution. The lesion lengths of Cimetidine and HYT group were significantly decreased compared to Control group. Mean \pm S.E. (*: $P < 0.05$ vs. Control, **: $P < 0.01$ vs. Control)

($P < 0.01$)과 HYT군($P < 0.05$) 모두 Control군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었는데, Cimetidine군이 HYT군에 비해 감소율이 더 높았다. 위의 측정된 값으로 억제율을 계산해보면 Cimetidine군은 48.4%, HYT군은 35.5%의 억제율을 나타내었다(Figure 2).

3. 조직학적 관찰

$5\mu\text{m}$ 로 두께로 절편된 위점막 조직을 H&E 염색을 통해 관찰한 결과 Normal군과 비교하여 Control군에서 점막 손상이 뚜렷이 관찰되었다(Figure 3B). Cimetidine군과 HYT군에서는 점막의 손상이 Control군에 비해 감소되었는데, Cimetidine군이 HYT군에 비해 상대적으로 점막손상이 적은 편이었다(Figure 3C, D).

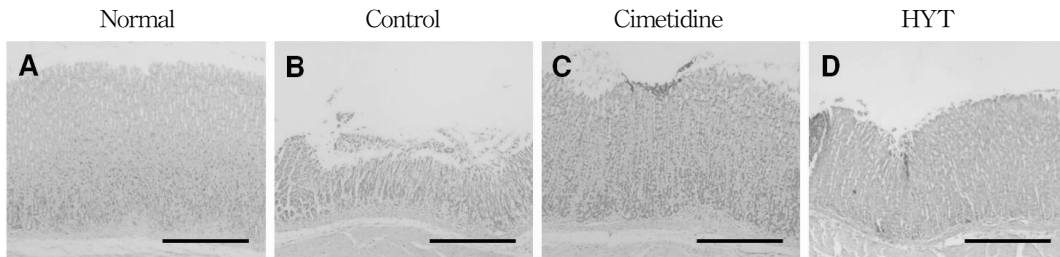


Figure 3. Light microscopic images of HCl · EtOH induced ulcers in rats. The rats of Control group showed loss of mucosa exposing the muscularis mucosa (B arrows). Whereas, the mucosal loses were decreased compared to Control group in Cimetidine (C) and HYT (D) group. scale bar = 200 μ m. Magnification : 40 X

4. BAX/Bcl-2의 발현

1) BAX

BAX 단백질의 발현은 Control군에서는 위 점막 부위에서 뚜렷이 관찰되었다. 일정면적($10^5\mu\text{m}^2$)에 대한 BAX 양성 세포 수를 측정된 결과, Normal군의 경우 4.2 ± 1.3 개, Control군 66.5 ± 5.9 개, Cimetidine군 39.8 ± 6.7 개, HYT군의 경우 45.1 ± 7.1 개로 관찰되어, Cimetidine군과 HYT군에서 Control군에 비해 발현세포 수가 상대적으로 감소된 양상이었다(Figure 4).

Control군에 비교한 BAX발현의 감소율은 Cimetidine군에서 40.2% HYT군에서는 32.2%를 나타내었다.

2) Bcl-2

Bcl-2 단백질의 경우 Normal군에서는 발현이 거의 관찰되지 않았으며, Control군, Cimetidine군과 HYT군에서는 발현이 관찰되었다. Control군에서는 발현이 아주 미약하였으며, Cimetidine군과 HYT군에서는 상대적으로 발현이 증가하였는데 Cimetidine군에서 더욱 뚜렷이 관찰되었다. Bcl-2 양성 세포 수를 측정된 결과, Control군의 경우 0.9 ± 0.4 개, Control군은 7.8 ± 1.2 개,

Cimetidine군은 12.2 ± 1.6 개, HYT군의 경우 11.7 ± 1.4 개로 관찰되었다(Figure 4).

Control군에 비교한 Bcl-2 발현의 증가율은 Cimetidine군에서 56.4% HYT군에서는 50.0%를 나타내었다.

5. TGF- β 1

일정면적($10^5\mu\text{m}^2$)에 대한 TGF- β 1의 양성반응 세포 수를 측정된 결과, Normal군의 경우 23.8 ± 3.9 개, Control군의 경우 158.7 ± 15.8 개, Cimetidine군은 262.1 ± 16.9 개, HYT군의 경우 238.7 ± 18.0 개로 Cimetidine군과 HYT군 모두에서 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다(Figure 5).

Control군에 비해 Cimetidine군에서 65.2%, HYT군의 경우는 50.4%의 증가율을 나타냈다.

6. VEGF

위점막(mucosa)과 점막하 혈관(submucosal vessel)에서의 VEGF의 발현을 관찰한 결과, Normal군에서는 위점막과 점막하 혈관 모두에서 VEGF의 발현이 거의 관찰되지 않았으며, Control군에서는 발현이 약한 편이었다. 반면, Cimetidine군과 HYT군에서는 위점막과 점막하

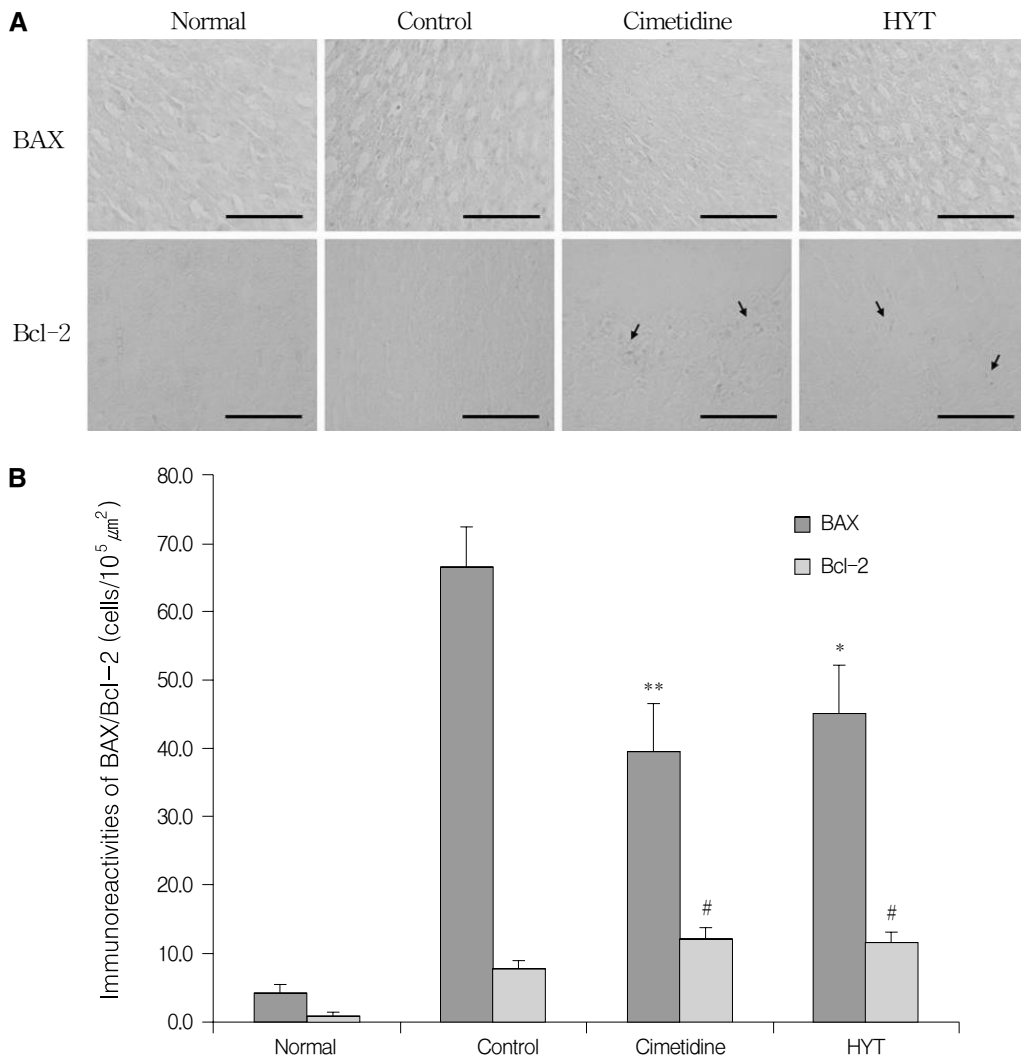


Figure 4. Immunohistochemical staining of BAX and Bcl-2 proteins in HCl · EtOH induced ulcers of rats. The increased level of BAX protein was observed in the Control group. Whereas, the expressions of BAX protein in Cimetidine and HYT group were decreased to compared with Control group. Bcl-2 expression of Control group was hardly observed and the expressions of Bcl-2 protein in Cimetidine and HYT group were increased to compared with Control group. scale bar = 100μm. Magnification : 100X

혈관에서의 VEGF의 발현이 현저히 증가하였다 (Figure 6A, B).

위 점막에서의 일정면적(10⁵μm²)에 대한 VEGF 양성반응 세포 수를 측정한 결과, Normal군의

경우 0.6±0.3개, Control군의 경우 7.7±1.5개, Cimetidine군 16.0±1.8개, HYT군의 경우 15.3±1.9개로 관찰되었다(Figure 6B).

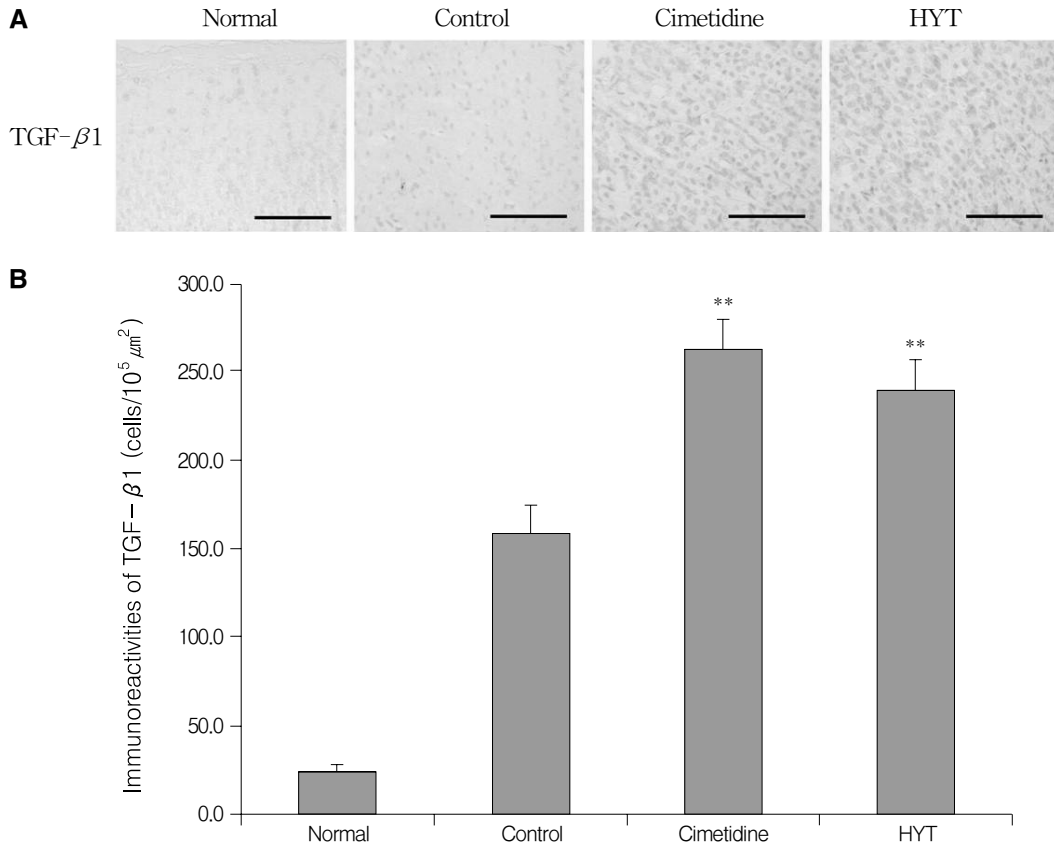


Figure 5. Immunohistochemical staining of TGF-β1 proteins in HCl · EtOH induced ulcers of rats. The TGF-β1 positive cells were increased in Cimetidine and HYT group compared to Control group (B, C arrow). The expressions of TGF-β1 in Cimetidine group were more significant than those of HYT group. scale bar = 100μm. Magnification : 100X

IV. 고 찰

위점막은 끊임없이 많은 해로운 요소와 물질에 노출되어 있다. 위점막 손상은 이러한 해로운 물질들이 정상적인 점막방어기전을 파괴하거나 점막방어기전이 손상되었을 때 발생한다. 본 실험에서 급성적인 위점막 손상 유발물질로 HCl · EtOH를 사용한 것은 무수 EtOH를 산성화함으로써 위손상의 정도를 높이기 위함

이었으며, 60% EtOH를 사용하였을 때 가장 손상이 크다는 보고가 있었기 때문이다.¹²⁾ HCl · EtOH로 유발되는 위손상은 위점막 장벽(gastric mucosal barrier)의 직접적인 자극에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ 동물실험 모델에서 HCl과 EtOH를 함께 투여하면, 위벽에 출혈을 동반한 손상이 나타나며 위점막의 지질 과산화 반응을 촉진시키는 것으로 알려졌다.¹⁶⁾ 현재 소화성 궤양의 치료에는 약물요법으로써 제산제, 항콜린작용약물, 신경안정제, H₂수용체 길항제 등이 사용되고 있으며,¹⁷⁾ 이 중 H₂수용

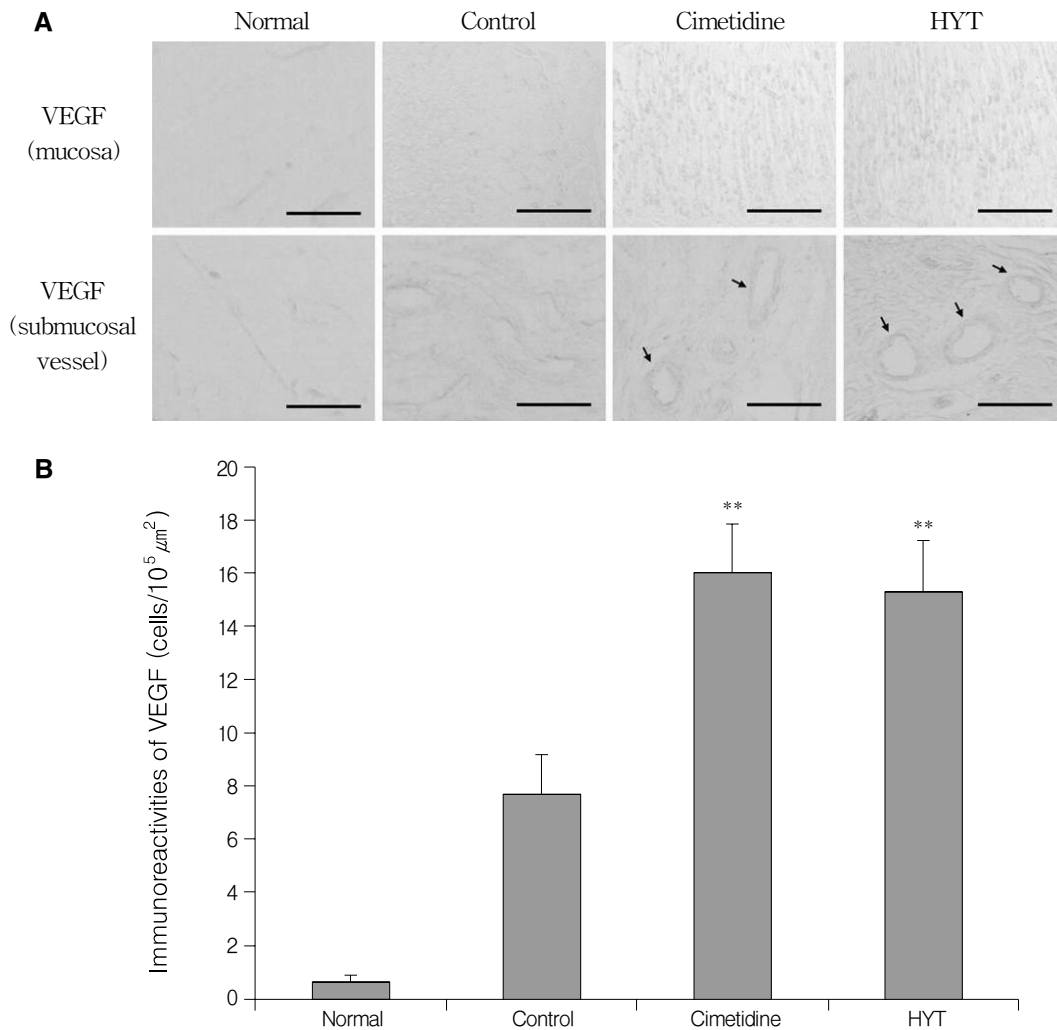


Figure 6. Immunohistochemical staining of VEGF proteins in HCl · EtOH induced ulcers of rats. The expressions of VEGF in submucosa and submucosal vessel were slightly observed in the Control group. The increased levels of VEGF protein were observed in Cimetidine and HYT group. scale bar = 100μm. Magnification : 100X

체 길항제로써 임상에서는 cimetidine, ranitidine 등이 많이 사용되고 있다. 따라서 본 실험에서도 위궤양 치료의 양성대조군으로써 cimetidine을 사용하였다.

본 실험에서 HCl · EtOH를 경구투여하여 위점막 손상을 일으키기 전, 생리식염수, 황연탕

추출물을 각각 전처리한 이유는 급성 위궤양에 대한 황연탕의 예방의학적 효과를 검증하기 위함이었다. 그 결과, 위점막의 육안적 관찰에서 생리식염수를 투여한 Control군에서는 검붉은 출혈성 점막손상이 뚜렷이 관찰되었으나, 황연탕 추출물을 투여한 HYT군에서는 출혈성

점막손상이 현저히 감소되었으며, 손상길이에 서도 Control군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다. 또한 H&E 염색을 통한 조직학적 검사에서도 HYT군에서는 점막상피의 손상이 Control군에 비해 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 황연탕이 급성 위점막 손상에 보호작용을 가지고 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

위궤양을 포함한 위점막 손상은 necrosis와 더불어 apoptosis에 의해 유발되는 것으로 알려졌다는데, 본 실험에서는 황연탕의 위점막 방어 기전에서의 apoptosis에 미치는 영향을 밝히기 위하여 Bcl-2 family의 발현을 관찰하였다. 위점막이 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 세포증식과 세포사멸의 비율이 일정하게 조절되어야 한다. Apoptosis에 의한 세포사멸에 있어 Bcl-2 family의 역할이 중요한데, pro-apoptosis 단백질인 BAX가 apoptosis를 유발하는 반면, anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 것으로 알려졌다.¹⁸⁾ 즉, apoptosis의 조절에 있어 Bcl-2와 BAX 단백질의 비율이 중요한데, stress를 유발하는 조건들에 의해 Bcl-2와 BAX의 비율이 영향을 받게 되고 apoptosis가 유발되는 것으로 알려졌다.¹⁹⁾ 위점막 손상의 치유에 있어서도 위점막의 Bcl-2 발현증가에 의해 apoptosis가 약화되면서 회복이 되었음이 관찰되었는데,²⁰⁾ 이전 연구를 통해 실험적인 위점막 손상 유발 4시간 후에 Bcl-2의 발현이 감소하고 BAX의 발현이 증가됨이 보고되었다.²¹⁾ 본 실험에서 BAX와 Bcl-2 단백질의 발현을 면역조직화학염색법으로 관찰한 결과, HCl·EtOH로 유발된 급성 위점막 손상의 경우, Control군에서 위 점막 손상 주변부위의 BAX 발현이 뚜렷이 관찰되었으나 Bcl-2의 발현은 미약하였다. 반면, HYT군에서는 BAX의 발현이 Control군에 비해 상대적으로 감소되었으며, Bcl-2의 발현은 증가하였다. 따라서, 위점막 손상에 대한 황연탕의 보호효과는 BAX/Bcl-2 비율의 조절을 통한 apoptosis의 과정의

억제에 의한 것이라 할 수 있다.

세포성장과 분화에 관련된 많은 cytokine 가운데 TGF- β (Transforming growth factor beta)가 주목받고 있는데, TGF- β 는 다양한 세포에서 여러 기능을 수행하기 때문이다. TGF- β 는 상처치유에서 필수적이며 세포성장과 분화의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 조직의 재생과 remodeling에 관여하는 것으로 알려졌다.^{22, 23)} 동물실험이나 세포실험에서 myofibroblast의 분화를 유발할 수 있는 다양한 물질 중에서 TGF- β 가 가장 강력한 인자로 알려져 있다.²⁴⁾ 특히 TGF- β 1은 monocyte, neutrophil, T cell에 강한 화학주성을 가지고 있다.²⁵⁾ 즉, TGF- β 는 상처치유에 있어서 여러 기능을 가진 중요한 매개체로써 세포의 증식, 분화, 이동 및 생존에 있어 다양한 경로를 조절하는 기능을 하는데,²⁶⁾ cell proliferation, migration, capillary tubule formation, 및 ECM deposition을 조절함으로써 angiogenesis의 주요 조정자로서의 역할을 한다.

임상적인 관찰에서도 궤양 치유과정에서 TGF- β 가 발현되며 TGF- β 가 부족한 경우 궤양이 잘 낫지 않은 것으로 밝혀졌는데,²⁷⁾ 위궤양 환자의 위점막에서의 TGF- β 와 그 수용체를 면역조직화학염색법으로 관찰한 결과, 위궤양이 호전된 환자의 경우 TGF- β 와 그 수용체들이 위점막에서 풍부하게 발견되었다. 이와는 대조적으로 고질적인 궤양을 가진 환자에게는 TGF- β 와 그 수용체의 발현이 뚜렷하지 못하게 나타났다.²⁸⁾

본 실험에서 면역조직화학염색법으로 TGF- β 1의 발현을 관찰한 결과, 일정면적($10^5 \mu\text{m}^2$)에 대한 TGF- β 의 양성반응 세포 수의 비교에서 Cimetidine군과 HYT군 모두에서 Control군에 비해 유의성 있는 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 황연탕 추출물이 TGF- β 단백질의 발현을 촉진시켜 위점막 손상에 대한 보호효과를 가지고 있음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

위궤양과 십이지장 궤양 모두 소화성궤양의 범주에 속한다. 그러나, 병리학적으로는 차이점이 있다. 십이지장 궤양의 경우 산분비나 *Helicobacter pylori*(*H. pylori*) 감염이 주요 원인이 된다.²⁹⁾ 반면, 위궤양의 경우는 산분비와 *H. pylori* 감염이 궤양의 발생에 직접적인 원인이 되지는 않는다. 대신에, 위장 운동성의 저하 또는 위점막 혈류의 이상 등의 인자들이 관여한다.³⁰⁾ 위각(gastric angle)에 고질적인 궤양이 다발하는 이유가 이 부위 근육조직에 혈류의 흐름이 상대적으로 느려지기 때문이라는 연구결과가 있다.³¹⁾

앞서 언급하였듯이 위점막은 일반적으로 광범위한 외부적인 손상에 항상 노출되어 있으며 조직회복을 위한 효과적인 방어기전을 보유하고 있다. 위점막 손상의 회복은 2가지 기전에 의해 일어난다. 첫째, 손상부위를 둘러싸고 있는 상피세포의 이동에 의해 점막의 회복 또는 재생피화가 빠르게 일어나며, 세포 분화에 의해 손실된 세포들이 대체된다. 둘째, 점막의 혈류증가와 관련이 있는데, 점막의 혈류는 손상에 대한 점막의 보호에 있어 중요한 역할을 담당한다.³²⁾

이전 연구를 통해 위장에 적절한 혈류가 유지되는 한 유해한 환경에 노출되어도 위점막은 손상을 거의 입지 않는 것으로 밝혀졌다.³³⁾ 반면에, 위점막 혈류의 감소는 심각한 위손상으로 이어졌다. 즉, 상피조직구조의 회복과 더불어 새로운 혈관이 생성되어 위점막과 결합 조직세포 등의 복구를 위해 충분한 산소와 영양분을 공급해야 한다. 이러한 복잡한 과정은 각기 다른 세포들 사이의 긴밀한 협조가 요구되며 여러 가지 인자들에 의해 조절된다. 특히 근래 성장인자의 역할에 대한 연구가 주목받고 있다. 성장인자는 세포의 증식, 이동, 분화를 포함하는 조직의 회복과정에서 필수적인 세포기능을 조절하는 능력이 있는 것으로 알려져 있으며, 많은 연구를 통해 궤양치료의 과정 중에 성장인자의 그 수용체들이 발현됨이 관

찰되었고 외부적인 성장인자의 투여가 회복기전을 촉진하는 것으로 밝혀졌다.³⁴⁾

Vascular endothelial growth factor(VEGF)는 6-kDa homodimeric glycoprotein으로 angiogenesis의 가장 강력한 자극인자이다.³⁵⁾ VEGF는 macrophages, smooth muscle cells, fibroblasts, megakaryocytes, neoplastic cell 등의 다양한 세포유형으로부터 생성된다.³⁶⁾ 이전의 연구를 통해 위점막 손상의 치유에 있어서의 VEGF의 역할이 밝혀졌는데, 예를 들어 인간에서 위궤양 주변부에 VEGF의 발현이 관찰되었으며,³⁷⁾ 흰쥐에서 위궤양 치유를 촉진하는 성장인자에 노출된 fibroblast에서 VEGF의 발현이 증가되었다는 보고³⁸⁾와 흰쥐에서 위궤양 유발 후에 신생혈관생성의 증가와 동시에 VEGF의 발현이 관찰되었다는 보고가 있었다.³⁹⁾ 즉, 위궤양에서의 VEGF의 치료효과는 신생혈관 생성과 granulation tissue의 형성을 자극함으로써 일어나는 것으로 알려졌다.⁴⁰⁾ 본 실험에서는 VEGF의 발현을 위장의 점막부위와 점막하 혈관에서 관찰한 결과, Control군에서는 발현이 아주 미약한 반면, HYT군에서는 VEGF의 발현이 현저히 증가하였다. 이러한 결과는 황연탕이 apoptosis의 억제뿐만 아니라 VEGF의 발현을 증가시킴으로써 손상부위의 신생혈관형성을 자극하여 산소, 영양분을 적절히 공급함으로써 위점막 손상의 회복을 촉진하는 것이라 할 수 있다.

V. 결론

흰쥐에 HCl·EtOH를 경구투여하여 급성 위점막손상을 일으키고 황연탕의 효과를 검증한 결과, 황연탕 추출물을 경구투여한 실험군에서 위점막 출혈증상과 조직학적 손상이 감소되었으며, 손상길어도 유의성 있게 감소되었다. 또한, BAX/Bcl-2 단백질 비율의 변화를 유도하여 apoptosis를 억제하고, TGF- β 1 단백질의 발현

을 증가시켜 손상된 조직의 재생을 촉진할 뿐 아니라 VEGF의 발현 증가를 유도하여 위점막 부위로의 신생혈관 생성을 촉진하여 위점막 손상에 보호효과가 있는 것으로 관찰되었다. 결론적으로, 황연탕은 흰쥐에서 HCl·EtOH로 유발된 위점막 손상에 있어서 예방적 보호효과를 가진 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 원영준, 나명순, 이명렬. 질경이가 실험적으로 유발된 흰쥐의 위염 및 위궤양에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 2004; 33(4): 659-667.
2. Halter F, Schmassmann A, Tarnawski A. Healing of experimental gastric ulcers. Interference by gastric acid. Dig Dis Sci. 1995; 40(11): 2481-2486.
3. 李乾枸. 中醫胃腸病學 中國醫藥科技出版社 (河北) 1993: 448, 450
4. 危北海. 中醫脾胃學說應用研究. 北京出版社 (北京) 1994: 203, 208
5. Wallace JL, Granger DN. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. FASEB J. 1996; 10(7): 731-740.
6. Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. Gastroenterology. 2008; 135(1): 41-60.
7. Szabo I, Tarnawski AS. Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications. J Physiol Pharmacol. 2000; 51(1): 3-15.
8. Konturek SJ. Role of epidermal growth factor in gastroprotection and ulcer healing. Scand J Gastroenterol. 1988; 23(2): 129-133.
9. 시수도명. 새한방처방해설. 구분홍 역, 보건신보(서울), 1985: 584-587.
10. 고원도, 박현준, 윤병국, 정성이, 박선동. 황연탕이 CCl4로 유도된 간중독 흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999; 14(2): 61-70.
11. 안종현. 내소황연탕의 소염효과에 관한 실험적 연구. 경원대학교대학원 석사논문. 2004.
12. Mizui T, Doteuchi M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. Jpn J Pharmacol. 1983; 33(5): 939-945.
12. Okabe S, Roth JL, Pfeiffer CJ. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing. Am J Dig Dis. 1971; 16(3): 277-284.
13. Jeong CS. Effect of butanol fraction of Panax ginseng head on gastric lesion and ulcer. Arch Pharm Res. 2002; 25(1): 61-66.
14. Kurebayashi Y, Ikeda T, Osada Y. Cytoprotective action of cetraxate against HCl ethanol-induced gastric lesion in rats. Jpn J Pharmacol. 1988; 46(1): 17-25.
15. Seiki M, Ueki S, Tanaka Y, Soeda M, Hori Y, Aita H, Yoneta T, Morita H, Tagashira E, Okabe S. Studies on anti-ulcer effects of a new compound, zinc L-carnosine(Z-103). Nippon Yakurigaku Zasshi. 1990; 95(5): 257-269.
16. Ito M, Shii D, Segami T, Kojima R, Suzuki Y. Preventive actions of N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc (Z-103) through increases in the activities of oxygen-derived free radical scavenging enzymes in the gastric mucosa on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats.

- Jpn J Pharmacol. 1992;59(3):267-274.
17. Szabo S, Vincze A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol Paris*. 2000;94(2):77-81.
 18. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Pajdo R, Konturek JE, Kwiecien´ S. Apoptosis in gastric mucosa with stress-induced gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:211-225.
 19. Maroto R, Perez-Polo JR. BCL-2-related protein expression in apoptosis: oxidative stress versus serum deprivation in PC12 cells. *J Neurochem*. 1997;69(2):514-523.
 20. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Ernst H. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;7(10):933-937.
 21. Cantarella G, Di Benedetto G, Martinez G, Loreto C, Clementi G, Cantarella A, Prato A, Bernardini R. Amylin prevents TRAIL-mediated apoptotic effects of reserpine in the rat gastric mucosa. *Peptides*. 2009;30(8):1466-1472.
 22. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . *Expert Rev Mol Med* 2003;5:1-22.
 23. Zavadil J, Bottinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-5774.
 24. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122(1):103-111.
 25. Ludviksson BR, Gunnlaugsdóttir B. Transforming growth factor- β as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand J Immunol*. 2003;58(2):129-138.
 26. Li, M.O., Sanjabi, S., Flavell, R.A. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455-471.
 27. Tominaga K, Arakawa T, Kim S, Iwao H, Kobayashi K. Increased expression of transforming growth factor- β during gastric ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:616-625.
 28. Shih SC, Chien CL, Tseng KW, Lin SC, Kao CR. Immunohistochemical studies of transforming growth factor- β and its receptors in the gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *J Formos Med Assoc* 1999;98:613-620
 29. Lam SK. Pathogenesis and pathophysiology of duodenal ulcer. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori* induced duodenal ulcer disease: An overview. *Clin Gastroenterol*. 1984;13:447-472
 30. Fisher RS, Cohen S. Pyloric-sphincter dysfunction in patients with gastric ulcer. *N Engl J Med*. 1973;288:273-276
 31. Valle JD, Chey WD, Scheiman JM. Acid Peptic Disorders. In: Yamada T, Alpers DH, Kaplowitz N, Laine L, Owyang C, Powell DW. *Textbook of Gastroenterology*. 4th edition, Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins 2003:1322-1328
 32. Takahashi M, Kawabe T, Ogura K, Maeda

- S, Mikami Y, Kaneko N, Terano A, Omata M. Expression of vascular endothelial growth factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. *Biochem Biophys Res Commun* 1007: 234: 493-498.
33. Miyake T, Suzaki T, Oishi M. Correlation of gastric ulcer healing features by endoscopy, stereoscopic microscopy, and histology, and a reclassification of the epithelial regenerative process. *Dig Dis Sci*. 1980; 25(1): 8-14.
34. Tarnawski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci*. 2005; 50: 24-33.
35. Szabo S, Vincze A. Growth factors in ulcer healing: lessons from recent studies. *J Physiol Paris*. 2000; 94: 77-81.
36. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*. 1992; 3: 211-220.
37. Takahashi M, Kawabe T, Ogura K, Maeda S, Mikami Y, Kaneko N, Terano A, Omata M. Expression of vascular endothelial growth factor at the human gastric ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980; 234: 493-498.
38. Takahashi M, Maeda S, Ogura K, Terano A, Omata M. The possible role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric ulcer healing: effect of sofalcone on VEGF release in vitro. *J Clin Gastroenterol*. 1998; 27: 178-182.
39. Suzuki N, Takahashi S, Okabe S. Relationship between vascular endothelial growth factor and angiogenesis in spontaneous and indomethacindelayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol*. 1998; 49: 515-527.
40. Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, Levin E, Hagar J, Iaquinto G. Vascular approach to gastroduodenal ulceration: new studies with endothelins and VEGF. *Dig Dis Sci*. 1998; 43(9): 40-45.