

BJS-Mix001이 Indomethacin 유발 랫트 위점막 손상에 미치는 영향

임소연 · 변준석 · 김대준 · 곽민아*

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Protective Effects of BJS-mix001, in Indomethacin induced Gastric Damages in Rats

So-Yeon Lim, Joon-Seok Byun, Dae Jun Kim, Min-A Kwak*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University

The object of this study was to observe the gastro protective effects of BJS-mix001, a mixed herbal formula consisted of 4 herbal drugs *Pinelliae Rhizoma* : *Coptidis Rhizoma* : *Massa Medicata Fermentata* : *Ostreae Testa* = 1 : 1 : 1 : 1 (g/g) mixtures, which were main component of oriental medicine for treating various digestive diseases, in indomethacin induced gastric damages in rats. Three different dosages of BJS-mix001 (200, 100 and 50 mg/kg) were once orally administered 30 min before indomethacin treatment. Six hrs after indomethacin treatment, changes on the gross lesion scores, fundic histopathology, MPO activity and anti oxidant activities were observed. The results were compared with omeprazole, antioxidant and proton pump inhibitor 10 mg/kg and DA-9601, a standardized extract of the herb *Artemisia asiatica* 100 mg/kg treated group, respectively. As results of all three different dosages of BJS-mix001 in the indomethacin induced gastric damaged rats, significant decreased gastric damages were detected as compared with the indomethacin treated control rats. BJS-mix001 also strengthened the antioxidative defense systems - decreased the level of lipid peroxidation and catalase activity but increased the level of superoxide dismutase and glutathione contents. BJS-mix001 showed similar gastro protective effects as compared with equal dosage of DA-9601, and BJS-mix001 50 mg/kg showed slighter effects as compared with omeprazole 10 mg/kg, in the present study. The results obtained in this study suggest that BJS-mix001 showed favorable effects in the indomethacin induced gastric damages mediated by strengthening of the antioxidative defense systems.

Key words : BJS-mix001, Indomethacin, Gastric Damages

서 론

위궤양으로 대변되는 위 점막 손상은 다양한 원인 즉, 스트레스, 흡연, 알코올, 영양결핍, 감염 및 비스테로이드성 항염제 (nonsteroidal anti inflammatory drugs; NSAIDs)의 남용에 의해 유발되는 매우 흔한 질병으로, 사회적 문제로 대두되고 있다¹⁾.

현재 새로운 신약의 개발에도 불구하고, 아스피린과 인도메타신 등의 비스테로이드성 항염제에 의한 위장관 독성은 연간 4~8% 정도로 매우 높은 것으로 알려져 있으며²⁾, 고령의 비스테

* 교신저자 : 곽민아, 대구시 수성구 상동 대구한의대 부속한방병원 3내과

· E-mail : nari003@hanmail.net, · Tel : 053-770-2124

· 접수 : 2012/01/20 · 수정 : 2012/02/17 · 채택 : 2012/02/20

로이드성 항염제 사용자에서 이전의 소화성 궤양의 병력을 가지고 있는 경우 치사성 부작용 (fatal complication)의 발현이 1,000명 당 한 명으로 매우 높은 것으로 알려져 있다³⁾. 현재 이들 비스테로이드성 항염제에 의해 유발되는 위궤양 치료를 위해 misoprostol과 같은 다양한 항궤양제가 개발되어 왔으나, 개발된 각 약제는 다양한 부작용을 초래하므로⁴⁾, 부작용이 적고 비용이싼 항궤양제의 개발이 절실히 요구 되고 있다⁵⁾.

半夏 (*Pinella Rhizoma*; *Pinellia ternate*), 黃蓮 (*Coptidis Rhizoma*, *Coptis japonica*), 神麩 (*Massa Meicata Fermentata*) 및 牡蠣 (*Ostreae Testa*, *Ostrea gigas*)는 소화기계 질병에 사용하는 처방의 구성 약제로⁶⁾ 이들 약제의 복합처방은 비스테로이드성 항염제에 의해 유발되는 위궤양을 위시한 각종 소화기 궤양에

유효한 효과를 나타낼 것으로 판단되어, 본 연구에서는 반하:황련:신곡:모려 1:1:1:1 복합처방 (BJS-mix001)이 indomethacin으로 유발된 위 점막 손상에 대한 보호효과를 확인하기 위하여, indomethacin(25 mg/kg) 투여 30분전 BJS-mix001을 200, 100 및 50 mg/kg의 농도로 각각 경구투여하고, indomethacin 투여 6시간 후 모든 실험동물을 희생하여, 출혈성 위궤양 병소의 면적 (lesion score; mm²/gastric mucosa), 위조직내 Myeloperoxidase (MPO) 함량 및 항산화 방어 시스템 (지질과산화, glutathione, catalase 및 superoxide dismutase (SOD))의 변화를 조직병리학 적 변화와 함께 관찰하였으며, 실험결과는 항산화 효과가 있는 PPI 계열인 Omeprazole 10 mg/kg 및 DA-9601 100 mg/kg 투여군과 각각 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험약제

본 실험에 사용된 한약재는 약업사 (Omni herb, Youngcheon, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 본 실험에 사용된 BJS-mix001의 조성은 Table 1과 같다. 선정된 반하, 황련, 신곡 및 모려를 각각 1:1:1:1(12:12:12:12 g/g)의 비율 (총량 48 g)로 취하여, 정제수 2,000 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (PVTFD10A; ilShin Lab., Seoul, Korea)를 사용하여 동결 건조시켜 총 8.98 g, (수율 약 18.71%)의 연갈색의 물 추출 물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 BJS-mix001은 -20℃의 냉 장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매 인 증류수에 20 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다. 한편 indomethacin, omeprazole은 sigma (MO, USA), DA-9601은 동아제약 (Yongin, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Composition of BJS-mix001 Used in This Study

Herbs	Scientific name	Korean name	Amounts (g)
Pinella Rhizoma	Pinellia ternate (THUNB.) BREIT.	半夏	12
Coptidis Rhizoma	Coptis japonica (THUNB.) MAKINO	黃連	12
Massa Meicata Fermentata		神麩	12
Ostreae Testa	Ostrea gigas Thunberg	牡蠣	12
Total	4 types		48

2. 실험동물 및 사양관리

56마리의 수컷 Sprague-Dawley 랫트 (6-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간동안 온도 (20-25℃)와 습도 (30-35%)가 조절된 사육실에서 랫트용 polycarbonate 사육상자에 5마리씩 수용하여 사육하였다.

명암 주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으

며, 사료 (Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다. 이중 48마리는 indomethacin 투여로 위 점막 손상을 유발하였으며, 나머지 8마리는 정상 대조군으로 사용하였다. 모든 실험동물은 24시간 절식을 실시한 다음 약물을 투여하였으며 (이 기간에도 음수는 자유롭게 공급하였다), picric acid로 개체를 식별하였다. 본 실험에 사용된 모든 실험동물은 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals'에 준하여 취급하였다⁷⁾.

3. 실험군 분리 및 약물의 투여

실험동물은 군당 8마리씩 Table 2에 기록한 7그룹으로 구분하였다. 즉, 매체인 멸균증류수 투여 후 indomethacin 대신 멸균 증류수를 투여한 정상 대조군 (정상 대조군; intact control), 멸균 증류수 투여 후 indomethacin으로 위점막 손상을 유발한 케양 대조군 (IND 대조군; IND control), 각각 omeprazole, DA-9601 및 3용량 (200, 100 및 50 mg/kg)의 BJS-mix001 투여 후 indomethacin으로 위점막 손상을 유발한 실험군의 7 군으로 구분하여 실험하였다(Table 2).

BJS-mix001, omeprazole 및 DA-9601은 각각 멸균 증류수에 용해시켜 동물 체중 kg당 10 ml의 용량으로 금속제 Sonde가 부착된 3 ml 주사기를 이용하여 indomethacin 투여 30분 전 강제 경구 투여하였다. Omeprazole 및 DA-9601은 각각 indomethacin 유발 위 점막 손상에 확실한 효과를 나타내는 용량으로 알려진 10 mg/kg⁸⁾ 및 100 mg/kg⁹⁾ 을 투여 용량으로 설정하였다.

Table 2. Experimental Design Used in This Study

Groups		Test article/Dose (mg/kg/day)
Control	Intact	Distilled water administered rats
	Indomethacin	Distilled water and indomethacin treated rats
Reference	Omeprazole	Omeprazole 10 mg/kg and indomethacin treated rats
	DA-9601	DA-9601 100 mg/kg and indomethacin treated rats
BJS-mix001	200	BJS-mix001 200 mg/kg and indomethacin treated rats
	100	BJS-mix001 100 mg/kg and indomethacin treated rats
	50	BJS-mix001 50 mg/kg and indomethacin treated rats

4. 위 점막 손상의 유발

모든 실험동물은 24시간 절식시킨 다음, Omeprazole, DA-9601 및 3용량의 BJS-mix001 투여 30분 후, Guidobono¹⁰⁾의 방법에 따라, indomethacin 25 mg/kg 을 멸균증류수에 용해시켜, 단회 경구 투여하여, 위 점막 손상을 유발하였다. 한편 정상 대조군에서는 indomethacin 대신 동일한 용량의 멸균 증류수를 동일한 방법으로 투여하였다.

5. 위 육안 병소의 측정

Suleyman 등¹¹⁾의 방법에 따라, indomethacin 투여 6시간 후 모든 실험동물은 경추탈골로 희생하여, 위를 적출한 다음, 대만 부를 절개하여 펼치고 10% neutral buffered formalin에 24시간 고정된 다음, 투명한 grid (area: 1mm²)를 점막에 겹쳐, 출혈성 위점막 병소의 총 면적을 mm² 단위로 각각 측정하였다.

6. 위 MPO 활성의 측정

Morais¹²⁾의 방법에 따라, 위 점막을 분리하여 얼음으로 냉각한 10 mL의 KCl(100 g/L; pH 7.4; Sigma, MO, USA) 용액에서 homogenize하여 사용하였으며, 위 homogenate 내 MPO의 함량은 Bradley¹³⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, homogenate를 3회 정도 냉동과 해동을 반복한 다음 1500×g으로 4℃ 조건하에서 10분간 원심분리한 다음 100 ml의 상층액을 취하여, 10 mM/L 인산완충액 (phosphate buffer; pH 6.0) 1.9 ml과 0.0005% (w/v) hydrogen peroxide (Merk, CA, USA)가 포함된 1.5 mM/L o-dianisidine hydrochloride (Sigma, MO, USA) 1 ml을 첨가한 다음 흡광도 450 nm에서 UV-vis spectrophotometer (UV 3600, Shimadzu Scientific Instruments, CO, USA)를 이용하여 μM/minute/mg tissue 단위로 측정하였다.

7. 지질 과산화의 측정

지질과산화는 Ohkawa¹⁴⁾ 등의 방법에 따라, 준비된 위 homogenate 내의 malondialdehyde (MDA) 함량을 thiobarbituric acid (Sigma, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉, homogenate 0.5 ml을 80 g/L의 sodium lauryl sulfate (Sigma, MO, USA), 1.5 ml 의 200 g/L acetic acid (Merck, CA, USA), 1.5 ml의 8 g/l2-thiobarbiturate 및 0.3 ml의 멸균증류수가 함유된 용액 0.2 ml에 혼합시키고, 혼합액을 98℃로 1시간 동안 가온 한 다음 냉각하고, 5 ml의 n-butanol : pyridine (15 : 1) (Merck, CA, USA)을 첨가하고, 1분간 진탕 혼합하였다. 이후 4000 rpm으로 30분간 원심분리한 다음, 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하여, 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma, MO, USA)를 이용하여 작성한 standard curve와 비교하여, MDA nM/g tissue 단위로 측정하였다.

8. GSH 함량의 측정

Sedlak과 Lindsay¹⁵⁾의 방법에 따라, 적출한 위를 20 mM EDTA (Sigma, MO, USA) 및 0.2 mM sucrose (Merck, CA, USA)가 포함된 2 ml의 50 mM Tris - HCl buffer (pH 7.5)에 homogenize 즉시 25% trichloroacetic acid (Merck, CA, USA) 0.1 ml에 침전시킨 다음, 4200 rpm으로 4℃ 조건하에서 40분간 원심분리하여, 침전물을 제거하였다. 이후 상층액에서 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (Sigma, MO, USA)를 이용하여, 412 nm에서 흡광도를 측정하여, nM/mg tissue 단위로 GSH 함량을 측정하였다.

9. Catalase 활성의 측정

Catalase의 존재하에서 과산화수소 H₂O₂의 분해를 240 nm에서 흡광도를 측정하여, Catalase의 활성을 측정하였다(16). Catalase 활성을 pH 7.8, 온도 25℃하에서 1 nM의 H₂O₂를 분당 분해하는데 필요한 효소의 양으로 정의하고, mM/min/mg tissue 단위로 평가하였다.

10. SOD 활성의 측정

SOD의 활성은 Sun¹⁷⁾의 방법에 준하여, nitroterazolium blue (Sigma, MO, USA)과 반응시킨 xanthine 및 xanthine oxidase에 의해 formazan dye 형성을 기준으로 하여, 과산화 자유기 생산량을 560 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하고, mM/min/mg tissue 단위로 측정하였다.

11. 조직병리학적 관찰

일부 위 분문 조직을 적출한 다음 세포로 절단하고, 10% 중성포르말린에 18시간 이상 고정시킨 후, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4 μm의 절편을 제작하였다. 이후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하고, 광학현미경 하에서 관찰하였다. 한편 위점막의 손상, 부종 및 출혈과 같은 조직 변성소견을 기초하여, 4 단계의 등급 즉, 0: 정상, 1: slight - 점막 표면 손상, 2: moderate - 점막 중중도 손상 및 부종, 3: severe - 점막 전체 손상으로 구분하여, semiquantitative scoring 을 실시하였다.

또한 이전의 Ku 등¹⁸⁾의 방법에 준하여, 위점막 손상의 침습율 [(손상 점막의 두께/전체 위점막 두께) × 100, %]과 궤양 병소 주변의 평균 점막 두께를 각각 CCD image analyzer (DMI 300, DMI, Korea)를 이용하여 측정하였다.

EQUATION [1]. Invasive Percentages of Lesions (%)

$$= (\text{Length of lesions on the crossly trimmed fundic walls} / \text{total thickness of crossly trimmed fundic walls}) \times 100$$

12. 통계처리

다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U (MW) tset 를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

또한 indomethacin에 의한 위 점막 손상 정도를 파악하기 위하여 정상 대조군과 IND 대조군과의 percent change를 아래의 공식 [2]을 이용하여 측정하였으며, 투여 물질의 약효를 좀더 명확히 하기 위하여 투여군과 IND 대조군과의 percent change를 아래의 공식 [3]를 이용하여 각각 측정하였다.

EQUATION[2]. Percentage Changes as Compared with Intact Control (%)

$$= ((\text{Data of IND control} - \text{Data of intact control}) / \text{Data of intact control}) \times 100$$

EQUATION[3]. Percentage Changes as Compared IND Control (%)

$$= ((\text{Data of administered groups} - \text{Data of IND control}) / \text{Data of IND control}) \times 100$$

결 과

1. 위 육안 병소의 변화

모든 indomethacin에 의한 위 점막 손상 유발군에서는 출혈성 궤양 소견이 위점막 전체에 걸쳐, 산재되어 관찰되었으며, IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위 육안병소 면적의 증가가 인정되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위 육안 병소 면적의 감소가 각각 인정되었다 (Fig 1, 2). IND 대조군에서는 위 점막 손상부위 면적이 정상 대조군에 비해 652.12%의 변화를 나타내었나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -32.23, -45.92, -62.59, -45.33 및 -25.69%의 변화를 나타내었다.

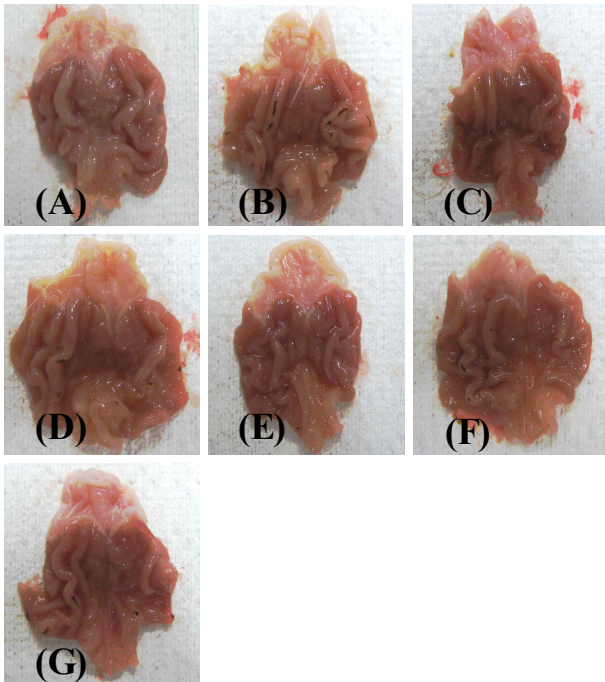


Fig. 1. Representative gross observations of the fundic mucosa. Intact control rat (A). Indomethacin control rat (B). Omeprazole 10 mg/kg treated rat (C). DA-9601 100 mg/kg treated rat (D). BJS-mix001 200 mg/kg treated rat (E). BJS-mix001 100 mg/kg treated rat (F). BJS-mix001 50 mg/kg treated rat (G)

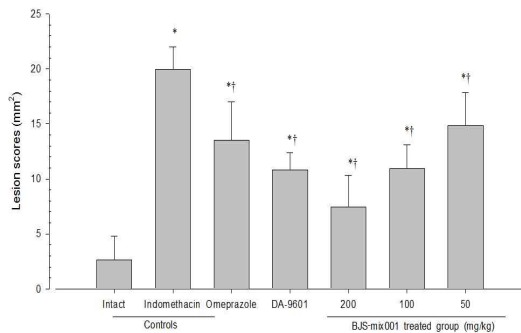


Fig. 2. Changes on the gastric lesion scores. Values are expressed mean \pm SD of eight rats. * $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. † $p < 0.01$ as compared with indomethacin control by LSD test.

2. MPO 함량의 변화

IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 MPO 활성의 증가가 관찰되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 MPO 활성의 감소가 각각 관찰되었다 (Fig. 3). IND 대조군에서는 위내 MPO 활성이 정상 대조군에 비해 274.66%의 변화를 나타내었나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -28.90, -49.93, -58.78, -49.15 및 -26.16%의 변화를 나타내었다.

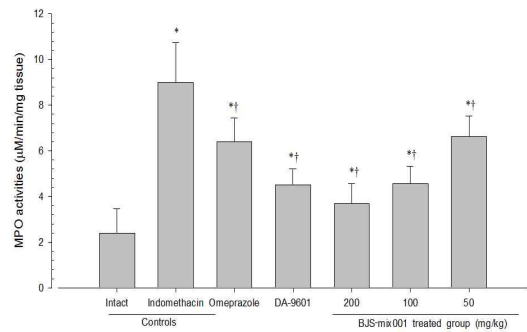


Fig 3. Changes on the gastric MPO activities. Values are expressed mean \pm SD of eight rats. * $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. † $p < 0.01$ as compared with indomethacin control by LSD test.

3. 지질 과산화의 변화

IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 MDA 함량의 증가, 즉 지질과산화의 증가가 관찰되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 MDA 함량의 감소가 각각 관찰되었다 (Table 3). IND 대조군에서는 위내 MDA 함량이 정상 대조군에 비해 515.20%의 변화를 나타내었나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -26.75, -50.67, -63.60, -44.24 및 -20.79%의 변화를 나타내었다.

4. GSH 함량의 변화

IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 GSH함량의 감소가 관찰되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 GSH함량의 증가가 각각 관찰되었다 (Table 3). IND 대조군에서는 위내 GSH함량이 정상 대조군에 비해 -51.12%의 변화를 나타내었나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 26.78, 46.74, 60.54, 42.01 및 22.13%의 변화를 나타내었다.

5. Catalase 활성의 변화

IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 catalase 활성의 증가가 관찰되었으나,

omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 catalase 활성의 감소가 각각 관찰되었다(Table 3). IND 대조군에서는 위내 catalase 활성이 정상 대조군에 비해 129.34%의 변화를 나타내었으나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -26.02, -43.82, -50.18, -40.39 및 -22.94%의 변화를 나타내었다.

6. SOD 활성의 변화

IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위내 SOD 활성의 감소가 관찰되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 위내 SOD 활성의 증가가 각각 관찰되었다(Table 3). IND 대조군에서는 위내 SOD 활성이 정상 대조군에 비해 -49.77%의 변화를 나타내었으나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 30.52, 53.86, 61.40, 45.42 및 24.60%의 변화를 나타내었다.

Table 3. Changes on the Antioxidative Defense Systems

Groups	Antioxidative defense systems			
	Lipid peroxidation (nM of MDA/g tissue)	Glutathione (nM/mg tissue)	Catalase (nM/min/mg tissue)	Superoxide dismutase (nM/min/mg tissue)
Controls				
Intact	2.48±0.67	3.41±0.85	76.25±8.61	138.63±17.82
Indomethacin	15.23±3.35*	1.67±0.33§	174.88±13.70*	69.83±13.56*
Omeprazole 10 mg/kg	11.15±2.07*†	2.11±0.30§¶	129.38±21.23*†	90.88±10.06*†
DA-9601 100 mg/kg	7.51±1.62*†	2.45±0.38 ¶	98.25±17.19*†	107.13±12.31*†
BJS-mix001 200 mg/kg	5.54±1.66*†	2.68±0.38¶	87.13±7.38†	112.38±16.64†
100 mg/kg	8.49±1.74*†	2.37±0.33§¶	104.25±12.61*†	101.25±10.66*†
50 mg/kg	12.06±2.08*†	2.04±0.20§¶	134.75±17.92*†	86.75±6.41*†

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. * $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. † $p < 0.01$ and ‡ $p < 0.05$ as compared with indomethacin control by LSD test. § $p < 0.01$ and ¶ $p < 0.05$ as compared with intact control by MW test. ¶ $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ as compared with indomethacin control by MW test

7. 조직병리학적 변화

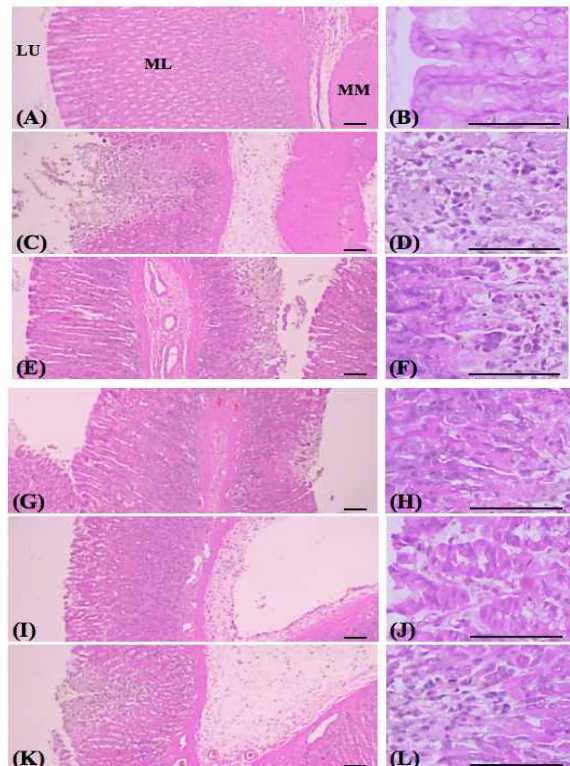
IND 대조군에서는 국소적인 표면 상피의 탈락, 괴사 및 염증세포 침윤과 같은 전형적인 위궤양 소견이 관찰되었으나, omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여에 의해 이러한 위궤양 소견은 현저히 억제되었다(Fig. 4). 또한 IND 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위점막 손상의 침습율, 궤양 주변 평균 점막 두께 및 semiquantative score의 증가가 각각 인정되었다. BJS-mix001 50 mg/kg 투여군에서 궤양 주변 평균 점막 두께가 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 모든 omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001 투여군에서는 IND 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$) 위점막 손상의 침습율, 궤양 주변 평균 점막 두께 증가 및 semiquantative score의 감소가 각각 관찰되었다(Table 4). IND 대조군에서는 위점막 손상의 침습

율이 정상 대조군에 비해 3710.55%의 변화를 나타내었으나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -47.99, -59.40, -73.85, -52.71 및 -42.46%의 변화를 나타내었다. IND 대조군에서는 궤양 주변 평균 점막 두께가 정상 대조군에 비해 -54.84%의 변화를 나타내었으나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 26.88, 44.51, 59.06, 37.48 및 18.13%의 변화를 나타내었다. IND 대조군에서는 semiquantative score가 정상 대조군에 비해 633.33%의 변화를 나타내었으나, omeprazole, DA-9601, BJS-mix001 200, 100 및 50 mg/kg 투여군에서는 IND 대조군에 비해 각각 -31.82, -45.45, -59.09, -40.91 및 -27.27%의 변화를 나타내었다.

Table 4. Changes on the Fundic Histomorphometrical Analyses

Groups	Fundic Histomorphometrical measurement		
	Semiquantative scores (Max = 3)	Invaded % of lesions into the gastric mucosa	Mean gastric mucosa thicknesses (mm)
Controls			
Intact	0.38±0.52	2.09±1.57	2.25±0.23
Indomethacin	2.75±0.46*	79.45±5.50*	1.01±0.14*
Omeprazole 10 mg/kg	1.88±0.64*†	41.32±3.58*†	1.29±0.16*†
DA-9601 100 mg/kg	1.50±0.53*†	32.26±5.08*†	1.47±0.23*†
BJS mix001 200 mg/kg	1.13±0.35*†	20.78±3.51*†	1.61±0.25*†
100 mg/kg	1.63±0.52*†	37.57±5.87*†	1.39±0.14*†
50 mg/kg	2.00±0.76*†	45.72±5.50*†	1.20±0.13*

Values are expressed as mean ± S.D. of eight rats. * $p < 0.01$ as compared with intact control by LSD test. † $p < 0.01$ as compared with indomethacin control by LSD test



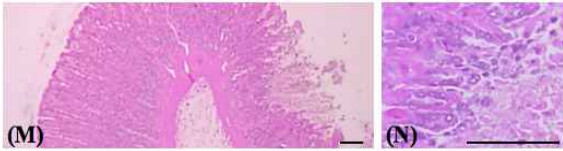


Fig 4. Microscopic appearance of fundic damages. Intact control rat (A, B). Indomethacin control rat (C, D). Omeprazole 10 mg/kg treated rat (E, F). DA-9601 100 mg/kg treated rat (G, H). BJS-mix001 200 mg/kg treated rat (I, G). BJS-mix001 100 mg/kg treated rat (K, L). BJS-mix001 50 mg/kg treated rat (M, N). LU, lumen; ML, mucosa layer; SL, submucosa layer; MM, muscle layer. All hematoxylin eosin stain. Scale bars = 200 μm

고찰

위궤양은 다양한 원인에 의해 유발되며, 십이지장 궤양과 더불어, 산과 pepsin을 포함한 위액에 노출된 부위에서 병리적 급성 미란과 표재성 궤양의 병변이 형성되므로 통칭 소화성 궤양으로 불리고 있으며, 최근 위궤양과 항산화 방어 시스템의 장애가 밀접히 관련되어 있다고 알려져 있다^{19,20}. 위 점막 손상은 신체 특히 위점막을 구성하고 있는 다양한 방어인자들이 여러 가지 원인에 영향을 받아 유발되며²¹, 현재 활성 산소류 (reactive oxygen species; ROS)에 의한 지질 과산화 등 항산화 방어 시스템의 장애가 유력한 병인으로 부각되고 있으며¹⁹, 실제로 다양한 항산화제들의 위점막 손상에 대한 보호효과가 잘 알려져 있다²⁰.

위궤양은 한의학에서 吞酸, 吐酸, 嘈雜에 해당한다^{1,22}. 半夏, 黃蓮, 神麩 및 牡蠣는 소화기계 질병에 사용해진 처방의 구성 약재로¹, 半夏는 燥濕化痰, 消痞散結, 降逆止嘔하는 효능이 있고, 黃蓮은 清熱燥濕, 瀉火解毒, 清心除煩, 清熱明目, 厚腸止痢 등의 효능이 있으며, 神麩는 消食和胃한 효능이 있다²³. 또한 牡蠣는 平肝潛陽, 軟堅散結 및 收斂固澀의 효능이 있고²⁴, 除酸效果가 뛰어난 것으로 알려져 있다²³.

본 연구에서는 반하:황련:신곡:모려 1:1:1:1 복합처방인 BJS-mix001이 indomethacin으로 유발된 위 점막 손상에 대한 보호효과를 항산화 효과가 있는 PPI 계열인 omeprazole 10 mg/kg 및 DA-9601 100 mg/kg 투여군과 각각 비교 관찰하였다.

최근 장기 복용에도 별 다른 부작용을 초래하지 않는 동아시아 제약 (Yongin, Korea) 애엽 추출물 (*Artemisia asiatica* extract; DA-9601; StillenTM)과 같이 강력한 항산화 효과를 나타내는 천연물 유래의 항궤양제의 개발이 진행되고 있다^{4,25}. 또한 omeprazole은 대표적인 proton pump inhibitor (PPI) 제제로, 현재 역류성 식도염을 포함한 다양한 궤양 치료제 개발의 대조약물 (reference drug)로 이용되고 있으며²⁶⁻²⁹, 비스테로이드성 항염제로 유발된 궤양에서도 효과가 이미 검증된 바 있으며^{26,30}, 근래에 들어 유리 활성산소 제거에 의한 항산화 효과 역시 밝혀져 있다^{31,32}.

Indomethacin은 비스테로이드성 항염제 중 비교적 강한 위 점막 손상을 유발하는 것으로 알려져 있으며¹¹, 일반적으로 prostaglandin의 합성을 억제하여, 위 점막에 궤양 병소를 유발한다³³.

본 실험에서는 이전의 방법들^{10,11}에 따라, BJS-mix001을 전 투여한 다음, indomethacin으로 위점막 손상을 유발하고, 항궤양

효과를 육안병소 면적, 위 점막의 조직병리, MPO 활성 및 항산화 방어 시스템의 변화를 평가하였다.

실험결과를 살펴보면 위점막에 형성된 궤양병소의 면적 변화는 약물의 효과를 나타내주는 직접적인 변화의 지표⁸⁻¹¹로 형성된 궤양 병소의 면적이 작을 수록, 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 간주한다. 본 실험의 결과에서도 indomethacin 투여에 의해, 육안적인 궤양병소의 증가가 BJS-mix001 투여에 의해 용량 의존성으로 감소되었으며, 이러한 출혈성 육안 병소의 감소는 BJS-mix001의 항궤양 효과를 나타내는 직접적인 증거로 추정된다.

MPO는 호중구에 의해 분비되는 효소로, 위 점막 조직내 MPO의 활성 증가는 다양한 위 점막 손상 시, 위 점막내 호중구의 증가를 나타내는 지표로 이용되고 있으며³³, 비스테로이드성 항염제에 의한 위 점막 손상 시에도, 유발된 궤양 병소에 호중구의 침윤으로 인한 MPO 활성의 증가가 잘 알려져 있다³⁴. 본 실험의 결과 omeprazole, DA-9601 및 모든 BJS-mix001투여군에서 indomethacin에 의해 유발된 위 조직내 MPO 활성을 현저히 억제하였다. 이러한 결과는 BJS-mix001의 항염효과를 나타내는 직접적인 증거로 추정된다.

MDA의 증가는 indomethacin을 포함한 비스테로이드성 항염제에 의한 위 점막 손상의 주요 원인으로 알려져 있으며³⁵, 지질과산화의 결과 형성된 독성 산물이 주변 조직을 파괴하는 것으로 알려져 있다³⁶. 본 실험의 결과에서도 indomethacin 투여에 의해 유의성 있는 위점막 내 MDA 함량의 증가가 유발되었으나, 모든 BJS-mix001투여군에서 MDA 함량의 증가가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 BJS-mix001의 항산화 효과를 나타내는 증거로 추정된다.

Catalase는 과산화수소를 수소로 바꾸어 주는 중요한 효소로³⁷, indomethacin 유발 위 점막 손상에서, 현저한 catalase 활성의 증가가 알려져 있다³⁸. 본 실험의 결과에서도 indomethacin 투여에 의해 유의성 있는 위점막 내 catalase 활성의 증가가 유발되었으나, 모든 BJS-mix001투여군에서 catalase 활성의 증가가 현저히 억제되었다. 이러한 결과는 BJS-mix001의 항산화 효과를 나타내는 증거로 추정된다.

SOD는 항산화 방어 system에서 중요한 위치를 차지하는 대표적인 효소이며, GSH는 대표적인 내인성 항산화제로, 비스테로이드성 항염제에 의한 위 점막 손상시 현저한 SOD 활성 및 GSH 함량의 감소가 알려져 있다^{25,38}. 본 실험의 결과에서도 현저한 SOD 활성 및 GSH 함량의 감소가 indomethacin 투여에 의해 유발되었다. Indomethacin 투여에 의해 ROS가 형성되면, 대표적인 내인성 항산화 효소인 SOD가 활성화되고, GSH가, ROS에 의한 위 점막 손상에 대항하는 것으로 알려져 있으며³⁹, 이차적인 SOD활성의 감소 및 GSH의 소모는 현저한 위 점막 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다¹¹. 본 연구에서 인정된 BJS-mix001 투여군에서 나타난 SOD활성 및 GSH 함량의 증가는 BJS-mix001의 항산화 효과를 나타내는 증거로 판단된다.

Indomethacin에 의한 위 점막 손상은 조직병리학적으로 현저한 국소적인 표면 상피의 탈락, 괴사 및 염증세포 침윤을 동반

한 전형적인 위궤양 소견이며⁴⁰⁾, 약물 투여 후 이러한 조직병리학적 궤양 병소의 정도와 수적 감소는 약물의 항궤양 효과를 보여주는 직접적인 증거로 활용되고 있다.

본 연구에서도 IND 대조군에서 육안적인 위 점막 병소와 잘 일치되어, 현저한 표면 상피의 탈락, 괴사 및 충혈 소견이 조직병리학적으로 관찰되었으며, 유의성 있는 병변 침습 비율 및 semiquantative score의 증가가 점막 층 두께의 유의성 있는 감소와 함께 관찰되었다.

모든 BJS-mix001 투여군에서 이러한 조직병리학적 궤양병소의 유의성 있는 감소가 관찰되었다.

이상의 결과에서 반하:황련:신곡:모려 1:1:1:1 복합처방인, BJS-mix001은 항산화 효과를 통해, indomethacin으로 유발된 위점막 손상에 대해 매우 양호한 효과를 나타내는 것으로 관찰되었으며, 동일한 용량의 DA-9601과 유사한 항궤양 효과를 나타내었으며, BJS-mix001 50 mg/kg은 omeprazole 10 mg/kg에 비해 다소 낮은 효과를 나타내었다.

결 론

본 연구에서는 반하:황련:신곡:모려 1:1:1:1 복합처방(BJS-mix001)의 위점막 보호 효과를 indomethacin으로 유발된 위점막 손상 모델을 이용 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

모든 용량 BJS-mix001 투여에 의해 유의성 있는 위육안 병소 면적의 감소가 관찰되었다. 모든 용량 BJS-mix001 투여에 의해 유의성 있는 위내 MPO 활성의 감소가 관찰되었다. 모든 용량 BJS-mix001 투여에 의해 유의성 있는 MDA 함량 및 Catalase 활성의 감소가 관찰되었다. 모든 용량 BJS-mix001 투여에 의해 유의성 있는 GSH 함량 및 SOD 활성의 증가가 관찰되었다. 모든 용량 BJS-mix001 투여에 의해 조직병리학적 궤양병소가 현저히 감소되었다.

참고문헌

- Alqasoumi, S., Al-Sohaibani, M., Al-Howiriny, T., Al-Yahya, M., Rafatullah, S. Rocket "Eruca sativa": a salad herb with potential gastric anti ulcer activity. *World J Gastroenterol* 15(16):1958-1965, 2009.
- Griffin, M.R., Scheiman, J.M. Prospects for changing the burden of nonsteroidal anti inflammatory drug toxicity. *Am J Med* 110(1A):33S-37S, 2001.
- Bhattacharya, S., Chaudhuri, S.R., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, S.K. Healing properties of some Indian medicinal plants against indomethacin induced gastric ulceration of rats. *J Clin Biochem Nutr* 41(2):106-114, 2007b.
- Miederer, S.E. Will anti-ulcer drugs differ only in their side effects? *Fortschr Med* 104(3):918-920, 1986.
- Yesilada, E., Gurbuz, I. A compilation of the studies on the antiulcerogenic effects of medicinal plants. In: *Recent*

Progress in Medicinal Plants, vol. II: Phytochemistry and Pharmacology (Singh S, Singh VK, Govil JN, eds). SCI Tech Publishing LLC, Houston pp 111-174, 2003.

- 鞠潤範, 金相贊, 朴宣東, 朴性奎, 徐富一, 徐榮培, 申舜植, 李尙仁, 李長泉, 李棣熙, 鄭宗佶, 朱榮丞, 崔湖榮. 方劑學. 서울, 圖書出版 永林社, pp 1-620, 2008.
- Department of Health, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) pp 85-23, 1985.
- Mori, J., Hayashi, T., Iwashima, M., Matsunaga, T., Saito, H. Effects of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum* and a new chromene derivative converted from the plastoquinones on acute gastric lesions in rats. *Biol Pharm Bull* 29(6):1197-1201, 2006.
- 오태영, 류병권, 박정배, 이상득, 김원배, 양중익, 이은방. 애엽추출물, DA-96의 실험적 위궤양 모델에 대한 항궤양 효과 및 기전 연구. *응용약물학회지* 4(2):111-121, 1996.
- Guidobono, F., Pagani, F., Ticozzi, C., Sibilia, V., Pecile, A., Netti, C. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. *Br J Pharmacol* 120(4):581-586, 1997.
- Suleyman, H., Cadirci, E., Albayrak, A., Polat, B., Halici, Z., Koc, F., Hacimuftuoglu, A., Bayir, Y. Comparative study on the gastroprotective potential of some antidepressants in indomethacin induced ulcer in rats. *Chem Biol Interact* 180(2):318-324, 2009.
- Morais, T.C., Pinto, N.B., Carvalho, K.M., Rios, J.B., Ricardo, N.M., Trevisan, M.T., Rao, V.S., Santos, F.A. Protective effect of anacardic acids from cashe (*Anacardium occidentale*) on ethanol induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact* 183(1):264-269, 2010.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78(3):206-209, 1982.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358, 1979.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25(1):192-205, 1968.
- Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press Inc. pp 67-86, 1974.
- Sun, Y., Larry, W.O., Ying, L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34(3):497-500, 1988.
- Ku, S.K., Seo, B.I., Park, J.H., Park, G.Y., Seo, Y.B., Kim, J.S., Lee, H.S., Roh, S.S. Effect of Lonicerae Flos extracts on

- reflux esophagitis with antioxidant activity. *World J Gastroenterol* 15(38):4799-4805, 2009.
19. Kwiecień, S., Brzozowski, T., Konturek, P.C.h., Konturek, S.J. The role of reactive oxygen species in action of nitric oxide donors on stress induced gastric mucosal lesions. *J Physiol Pharmacol* 53(4):761-773, 2002.
 20. Oyagi, A., Ogawa, K., Kakino, M., Hara, H. Protective effects of a gastrointestinal agent containing Korean red ginseng on gastric ulcer models in mice. *BMC Complement Altern Med* 10: 45, 2010.
 21. Mizui, T., Sato, H., Hirose, F., Doteuchi, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 41(6):755-763, 1987.
 22. 김상찬, 이동언, 권영규. 順氣和中湯이 indomethacin으로 유발된 위궤양에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 17(2):326-337, 2003.
 23. 김동현, 김형민, 류중훈, 엄재영, 김상찬, 양재하, 조민경, 임종필, 홍승현. *한방약리학*, 서울, 신일상사, pp 1-827, 2010.
 24. Hong, M.W. Pharmaceutical investigation of fossil shell *Crassostrea gravitesta eoilensis*. *Korean J Pharmacog* 4(1):9-17, 1973.
 25. Oh, T.Y., Ryu, B.K., Ko, J.I., Ahn, B.O., Kim, S.H., Kim, W.B., Lee, E.B., Jin, J.H., Hahm, K.B. Protective effect of DA-9601, an extract of *Artemisiae Herba*, against naproxen induced gastric damage in arthritic rats. *Arch Pharm Res* 20(5):414-419, 1997.
 26. Agbaje, E.O. Gastrointestinal effects of *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in animal models. *Nig Q J Hosp Med* 18(3):137-141, 2008.
 27. McKeage, K., Blick, S.K., Croxtall, J.D., Lyseng-Williamson, K.A., Keating, G.M. Esomeprazole: a review of its use in the management of gastric acid related diseases in adults. *Drugs* 68(11):1571-1607, 2008.
 28. Onasanwo, S.A., Singh, N., Olaleye, S.B., Mishra, V., Palit, G. Anti ulcer & antioxidant activities of *Hedranthera barteri* (Hook F.) Pichon with possible involvement of H⁺, K⁺ ATPase inhibitory activity. *Indian J Med Res* 132: 442-449, 2010.
 29. Sumbul, S., Ahmad, M.A., Asif, M., Saud, I., Akhtar, M. Evaluation of *Myrtus communis* Linn. berries (common myrtle) in experimental ulcer models in rats. *Hum Exp Toxicol* 29(11):935-944, 2010.
 30. Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.D., Toma, W., de Paula, A.C., de Almeida, A.B., Brasil, D.D., Muller, A.H., Brito, A.R. Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biol Pharm Bull* 23(12):1465-1469, 2000.
 31. Bicakci, U., Tander, B., Ariturk, E., Aydin, B.K., Aydin, O., Eren, R.R.Z., Bernay, F. Effects of omeprazole and gentamicin on the biochemical and histopathological alterations of the hypoxia/reoxygenation induced intestinal injury in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 21(10):800-805, 2005.
 32. Rao, C.V., Vijayakumar, M. Effect of quercetin, flavonoids and alpha-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur J Pharmacol* 589(1-3):233-238, 2008.
 33. Kataoka, H., Horie, Y., Koyama, R., Nakatsugi, S., Furukawa, M. Interaction between NSAIDs and steroid in rat stomach: safety of nimesulide as a preferential COX-2 inhibitor in the stomach. *Dig Dis Sci* 45(1):1366-1375, 2000.
 34. Whittle, B.J. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti inflammatory COX-2 inhibitors. *Eur J Pharmacol* 500(1-3):427-439, 2004.
 35. Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N., Cross, C.E. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem J* 277(Pt1):133-138, 1991.
 36. Freeman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47(5):412-426, 1982.
 37. Cheeseman, K.H., Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49(3):481-493, 1993.
 38. Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., Kazaz, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 103(1):59-65, 2006.
 39. El-Missiry, M.A., El-Sayed, I.H., Othman, A.I. Protection by metal complexes with SOD mimetic activity against oxidative gastric injury induced by indomethacin and ethanol in rats. *Ann Clin Biochem* 38(Pt6):694-700, 2001.
 40. Graziani, G., D'Argenio, G., Tuccillo, C., Loguercio, C., Ritieni, A., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, C., Fogliano, V., Romano, M. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. *Gut* 54(2):193-200, 2005.