

애엽 추출물의 항위궤양에 대한 기전

황귀서* · 이정석 · 윤여표

*경원대학교, 충북대학교

A Mechanism of Gastric Antiulceration by the Extract of *Artemisiae asiatica*

Gwi Seo Hwang*, Jung Suk Lee and Yeo Pyo Yun

*Kyungwon University, Chungbuk National University

Abstract: In oriental medicine, *Artemisiae asiatica* (AA) has been used as analgesic, antiinflammatory agent, and coagulatory agent. Furthermore, eupatilin, a kind of flavonoids, is known as the active principle component of AA. This study was undertaken to determine the gastric antiulceration of AA and to elucidate its mechanism. AA showed the inhibitory effect on gastric ulceration induced by EtOH/HCl and aspirin. To elucidate its mechanism, the effect of AA on lipidperoxide level in gastric mucosa, microsomal lipidperoxidation, iron-dependent lipidperoxidation, and neutrophil activation were examined. It is suggested that the antiperoxidative and antineutrophil activity of AA play important roles as a possible mechanism. These results suggest that AA might have gastric antiulceration activity due to antilipidperoxidative and antineutrophil activity.

I. 서 론

위염 및 위궤양은 알코올의 섭취, 흡연 등 다양한 약물에 노출되는 경우에도 발생하거나 악화될 수 있는 질환으로, 특히 비스테로이드성 항염증약(NSAID, Nonsteroidal antiinflammatory drug)을 만성적으로 사용하는 류마티스성 관절염 환자, 기타 염증 환자에게서 빈발한다. NSAID계 약물은 위장 장애를 유발하는 대표적인 약물로서 이들에 의해서 유발된 위궤양은 기존의 궤양치료제(H₂ 길항제, Proton-Pump 저해제 및 제산제)로는 치료가 어려우며, Prostaglandin 제제들이 치료목적에 적용되고 있다.^{1,2)} NSAID에 의한 위궤양 또는 위장점막 손상 등의 작용기전은 아직 확실하게 규명되지 않았지만, 자유 라디칼들에 의한 위점막 세포의 장애 및 여러 혈구 세포들의 기능 변화에 의한 위점막 혈류량 감소와 혈관 내피세포의 손상이 상호 연관성을 가지고 진행된다고 보고되고 있다.³⁾ 허혈성 재관류(Ishemia-Reperfusion)시 일어나는 백혈구의 침윤은 모세혈관내에 백색의 혈전생성을 유발할 수 있으며, NSAID계 약물을 투여한 후에도 관찰된다.^{4,5)} 이는 혈관내에 호중구가 활성화되어 혈관 내피세포에 침착되는 것으로, 모세혈관 폐쇄와 혈관 내피세포의 손상 등을 유발하는데, 이 과정에 호중구의 염증성 매개체인 LTB₄ 또는 PAF 등이

관여한다.^{6,19)} Prostaglandin의 일종인 PGE₂와 Leukotriene 억제제, Leukotriene 수용체 길항약 등은 이 과정을 억제하며, 또한 호중구 항체(Neutralizing antiserum)의 투여 또는 CD₁₈ 항체 투여 등도 NSAID에 의한 위궤양을 억제하는 것으로 보고되고 있다.^{7,8)}

최근 NSAID 약물이 일으키는 위장장애의 주된 원인의 하나로 산소 라디칼이 관여하며, 그 주요 인자로 Superoxide 등이 보고되고 있다. Superoxide(O₂⁻), Hydrogen Peroxide(H₂O₂), Hydroxyl Radical(OH[·]) 등은 체내에 침투한 Bacteria, Fungi류의 사멸, 표식된 표적세포의 파괴, 백혈구에서 분비한 주화성 물질, 단백질해효소 등의 저해제를 불활성화시키는 데 관여한다고 보고되어 있으며, 호중구를 비롯한 백혈구의 활성화, 혈관내피세포의 자극에도 생성된다. 활성인자로는 Virus, Bacteria, Phagocytic particle 등과 체내에서 유래한 Leukotriene, Interleukin, 화학물질로는 FMLP, Concanavalin A, PMA 등이 있다. 위장관 점막 손상에 관여하는 Superoxide 등은 NADPH를 생성시키는 HMP shunt 과정중에 생성될 수 있는 것으로 혈관 내피세포에서는 Xanthine oxidase에 의해 생성되며, 백혈구 내에서는 NADPH-oxidase계에 의해 생성된다.^{10,11,31)} Superoxide anion은 Superoxide dismutase(SOD)에 의해 Hydrogen peroxide가 되

며, 다시 Catalase 작용을 거치면 물로 변한다.^{11,12)} 이런 활성화된 라디칼 종류들은 점막 투과도를 증가시키고, 점막 혈관에서의 혈류량도 감소시켜 위장 질환을 악화시키는 것으로 보고되어 있다.^{13,14)} Indomethacin에 의해 유발된 위점막 손상은 항산화효소인 SOD나 Catalase의 투여로 억제되는데, 호중구의 활성화와 관련하여도 설명되어지고 있다.^{15,16)} 혈관 내피세포에서 분비되는 PGE, PGI는 호중구의 활성화과정, 분비, 이동 및 혈관벽에 대한 부착을 억제하고, LTB₄의 생성을 억제한다.^{17,18)} NSAID는 Cyclooxygenase를 억제하여 Prostaglandin류의 생성을 차단하므로, 자극된 호중구의 활성화와 혈관벽 부착을 증가시킬 수 있으며, 그 과정에서 활성산소의 유리에 의한 위점막의 손상을 유발할 수 있다.²¹⁾

Flavonoid 화합물은 천연식물에 다양하게 존재하며 현재까지 4,000종 이상의 유도체가 알려져 있으며, 다양한 생물활성들이 보고되었다. 항균작용, 항바이러스작용, 혈관계 조절작용, 강간작용, 항염증 및 항알러지작용, 항암작용, 면역조절작용 등이 밝혀졌고, 그 작용기전이 활발히 연구되고 있다.²²⁻²⁸⁾ Flavonoid 유도체들은 이밖에도 호중구의 Cytokinesis 및 가수분해 효소들의 분비를 조절하고, 항산화작용을 보이며, 라디칼 포획자로 작용하여, 항염증작용 및 항돌연변이작용을 하고 있으며, Cytotoxic T-cell의 생성 및 그들의 사멸작용을 저해하는 작용도 갖고 있다. 또한 최근에 보고된 것과 같이 Flavonol 유도체들은 DNA의 나선 구조에 끼어들거나, DNA Topoisomerase를 저해하는 등의 활성도 보이고 있다.^{29,30)} 특히, 염증 및 면역조절작용의 매개자로 작용하며, 혈관 및 혈구에 다양한 활성을 가지는 Prostaglandin, Leukotriene의 생성을 조절하는 작용으로 많은 연구가 행해지고 있다.

쑥은 예로부터 잎이 떡을 비롯한 음식물에 첨가되어 식용으로 사용되고 있는 식물이다. 이 식물의 증은 매우 다양한데, 한방에서 애엽은 소염 및 진통완화의 목적으로 사용되었으며, 혈액응고약으로도 사용되었다. 그 성분으로, Cineol, Thujone, Sesquiterpene과 다양한 Flavonoid 성분을 함유하고 있으며, 주성분으로는 eupatiline이 알려져 있다.⁹⁾ 저자 등은 애엽 추출물이 항산화작용을 포함한 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 추정하였고, 그 중 항궤양 효과에 대한 실험을 행하여 유의한 결과를 얻었다. 본 연구에서는 애엽의 항궤양작용의 기전을 알아보기 위하여, 위장점막의 과산화지질, 마이크로솜 지질과산화, 철의존성 지질과산화, 호중구의 활성화에 미치는 영향 등에 대하여 실험을 행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Sprague-Dawley 웅성 랫드(체중 200g 내외)를 Charles River 회사로부터 구입하여 1주일간 사육장에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 애엽의 추출과 분획분리

애엽(*Artemisia asiatica*) 2.4 kg을 추출조에 넣고 70% MeOH 6 L를 넣은 다음, 4시간 동안 끓인 다음 은시여과하여 여액을 받은 후, 잔사에 다시 70% MeOH 6 L를 넣어 전술한 것과 동일하게 조작하여 나온 여액을 합하여 감압 농축하였다. 얻어진 MeOH 분획에 9배의 H₂O를 첨가하여 현탁시킨 후, 분액 깔대기에 5등분하여 넣고, n-Hexane을 동량 넣어 30분씩 3회 진탕하여 Hexane층을 분리하였다. 잔사에 다시 CHCl₃을 넣고 30분씩 3회 진탕하여 CHCl₃층을 분리한 후, 얻은액에 Sod. sulfate. anhydrous(Na₂SO₄)를 넣어 혼입된 물층을 제거하고, 다시 여과하고 감압 농축하여 CHCl₃ 분획을 얻었다. 이 분획을 다시 CHCl₃으로 녹인 후, 여과와 감압 농축을 시행한 후 동결 건조하고, 실험시 용액으로 조제하여 사용하였다.

3. EtOH/HCl 위궤양 유발

위염 및 위궤양을 유발시키기 위해 랫드를 24시간 절식시킨 후, 약물을 투여하였으며, 1시간 후 150 mM HCl로 희석시킨 60% EtOH를 랫드 1마리당 (200g 기준) 1.5 ml씩 경구투여 하였다. 1시간 후 Ether 마취로 치사시키고 위장을 적출하였다. 적출된 위장의 유문부를 통하여 1% Formalin을 10~15 ml씩 주입하고 난 후 1시간 정도 Formalin액에 담가두었다. 위장의 Larger Curvature를 절개하여 위장 내용물을 깨끗이 씻어낸 다음, 현미경을 이용하여 10배율로 관찰하고, 발생된 궤양의 면적을 측정하였다.

4. ASA 위궤양 유발

HCl-EtOH 모델과 같은 방법으로 절식시킨 후, 랫드에 약물을 투여하였으며, 1시간 후 Ether로 마취한 후 개복하여 Pylorus sphincter를 실로 완전히 묶었다. 실로 묶은 즉시 1% CMC(Carboxymethyl cellulose)에 녹인 ASA를 투여하고, 7시간 후에 위장을 적출하였다. 다음 조작들은 HCl-EtOH에 명시된 방법으로 실험을 행하여 궤양면적을 비교하였다.

5. 위점막의 지질과산화에 대한 영향

24시간 절식시킨 랫드에 애엽 추출물 또는 Eupatilin 현탁액(5% HPMC)을 경구투여하고, 30분 후 위점막 손상을 유발시키기 위해 80 mg/kg의 DDC 용액을 피하주사하고 1 ml의 0.1 N HCl 용액을 경구투여하였다. 대조군에는 애엽 추출물 대신 5% HPMC 용액을 투여하였다. 투여 5시간 후 마취사시키고 개복하여 위를 적출하였다. 적출된 위의 antrum 부위 점막을 유리칼을 이용하여 긁어 모은 후 1.15% KCl, 30% TCA, 0.75% TBA 용액을 각각 300 μ l씩 가한 다음, 수욕상에서 15분간 100°C로 가열한 후 원심분리하였다. 상등액을 취하여 535 nm에서 Spectrophotometer를 사용하여 UV 흡광도를 측정하였다.^{43,44)}

6. 간 마이크로솜 분획 조제 및 과산화 반응

SD계 랫드(7-8주령)를 단두 치사하고 개복한 후 간동맥으로 생리식염수를 주입하여 혈액을 제거후 간을 분리하였다. 분리한 간을 생리식염수로 씻고 잘게 절개한 다음 다시 세척하여 남아있는 혈액을 제거하고, homogenation buffer I(10 mM Tris-HCl, 0.3 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)을 넣은 후 균질화하였다. 균질화한 액을 원심분리(17,000g, 20 min, 4°C)하여 상등액을 취하였고 이를 다시 초원심분리 하였다(110,000g, 1 hr, 4°C). 침강물을 Homogenation buffer II(10 mM Tri-HCl, 0.3 mM sucrose, pH 7.4)으로 두번 세척하고 0.1 mM Sodium Phosphate Buffer에 재현탁시켜 -80°C 냉동고에 보관하였다.⁴⁵⁾ 간 마이크로솜 분획의 과산화반응은 NADPH/FeCl₃/ADP로 유도하였다. 마이크로솜분획에 NADPH 1.8 mM/FeCl₃ 120 M/ADP 102 mM을 가하고 37°C에서 30분간 incubation 시킨 후, 5 M HCl, 30% TCA, 0.75% TBA용액을 각각 300 μ l씩 가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 15분간 수욕상에서 100°C로 가열한 다음, 원심분리(1500g, 10분)하여 상등액을 취하고 535 nm에서 Spectrophotometer를 사용하여 UV 흡광도를 측정하였다.

7. 뇌 Homogenate 조제 및 철 의존성 과산화반응

SD계 랫드(7-8주령)를 단두 치사시켜 뇌를 분리하고 냉각된 Homogenation Buffer II를 이용하여 세척한 후, 잘게 자른 다음 Homogenizer를 사용하여 균질화하였다. 균질화한 액을 원심분리(2500 rpm, 10 min, 4°C)하여 상등액을 취하였고, 이를 다시 원심분리 하였다(16000 rpm, 30 min, 4°C). 침강물(Synaptosomal Fraction)에 생리식염수를 가한 후, homogenizer를 사용하여 현탁시키고 다시 세척하였다. 침강물을 생리식염수에 현탁시키고 실험전까지 얼음상에 보관하

였다. Brain Homogenate의 과산화반응은 Fe³⁺로 유도하였다. Brain Homogenate에 2 mM FeCl₃을 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 5 M HCl, 30% TCA, 0.75% TBA 용액을 각각 30 μ l씩 가하여 반응을 중지시켰다. 이 반응액을 100°C에서 15분간 가열하여 발색시킨 다음 원심분리하고(1500g, 10분), 상등액을 취하여 535 nm에서 Spectrophotometer를 사용하여 UV흡광도를 측정하였다.⁴⁶⁾

8. 호중구중의 Chemiluminescence 측정

12%(w/v) Sodium Casein 용액 20 ml을 SD계 랫드(7-8주령)에 복강내로 투여하여 호중구의 증식과 활성화를 유도하였다. 투여 20시간 후 Ether로 마취하고 개복하여 복강내 삼출액을 취하였다. 삼출액을 모아 여과하고 200 Mesh의, 그 여액을 원심분리(200×g, 5분)하였다. 원심분리한 침강물을 DPBS로 2번 세척하였다. 세포 침강물을 1 ml의 생리식염수에 현탁시키고 10 ml의 멸균 증류수를 가하여 10초간 혼합 후 즉시 10 ml의 0.18% NaCl 용액을 가하여 적혈구를 제거하였다. 세포용액을 다시 원심분리(200×g, 5분)하고, RPMI1640 용액에 재현탁시킨 다음 37°C에서 2시간 배양하였다. 배양액을 다시 원심분리하여 얻은 세포 침강물을 0.1% BSA함유 HBSS에 현탁시켜 호중구 활성화반응에 사용하였다.⁴²⁾ 호중구의 확인은 Wright's staining을 이용하였으며 Trypan Blue exclusion test로 생존율을 확인하였다. Chemiluminescence는 Luminol을 사용하여 Microplate Scintillation counter인 Topcount로 측정하였다. 반응액은 0.2% BSA가 포함된 HBSS 용액에 호중구(최종농도; 1×10⁷ cells/ml), FMLP (최종농도; 10 μ M), 여러가지 농도의 애엽추출물 또는 Eupatilin과 Luminol(최종농도 0.07 mM)을 가한 다음, 37°C에서 반응시키면서 Chemiluminescence를 측정하였다.⁴²⁾ 측정결과는 CPM(maximal counts per min)으로 나타내었다.

III. 결 과

1. 위궤양에 미치는 영향

60%의 EtOH-HCl을 투여 하여 궤양을 유발시킨 경우, 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 위체부(Body)와 위하부(Antrum)에 선명한 점막손상과 출혈이 관찰되었다. Pylorus-ligation한 랫드에 Aspirin을 투여한 경우, 7시간 후 관찰시에 위장내에 많은 양의 위액이 발견되었으며, 위저부(Fundus)에도 출혈 흔적이 많이 생성되었다. AAE(*Artemisiae argyi extract*)를 투여한 경우 고용량 저용량에서 모두 뚜렷한 궤양 억제 작용을 나타내었다. AAE를 투여하고 1시간 후 위를 절개

하였을 때 위 내부에 고형 상태의 약물이 남아있었으므로 AAE의 항궤양효과가 단순한 물리적 위점막 보호작용에 의한 것인지 아니면 전신혈로 흡수된 약물의 효과 인지 여부를 알아보기 위하여 고용량을 복강 투여하였다. 그 결과 복강 투여시에도 경구투여시와 비슷한 수준의 억제효과를 보였다. 대조군으로 사용한 Sucralfate나 Cimetidine도 우수한 억제효과를 나타내었다

2. 위점막의 과산화물 축적에 미치는 영향

AAE가 위궤양을 억제하는 작용이 있음을 확인하고, 그 작용기전 중 일부를 밝히는 일환으로 상처가 유발됐던 위하부 점막에서의 지질 과산화물 형성에 DDC와 HCl을 동시투여하고 난 후, 1, 3, 5, 7시간 후에 랫드를 치사시켜 TBA와 반응할 수 있는 MDA를 측정한 결과, 5시간 후에 최대값을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 약물을 투여 후 DDC-HCl을 투여하고, 다시 5시간 후에 랫드를 치사시켜 지질 과산화물량을 측정한 결과 AAE는 현저한 억제 작용을 나타냈으며, 고용량(100 mg/kg)에서 저용량(30 mg/kg)보다 더 효과적이었다. 또한 비교군으로 사용한 SOD, Rebamipide들도 지질 과산화물의 생성을 억제하였다(Fig. 4).

3. 간 마이크로솜에서의 지질과산화 반응

초원심분리기를 이용하여 랫드의 간에서 마이크로솜을 얻었다. 얻어진 마이크로솜을 완충용액에 현탁시킨 현탁액(Protein 2 mg/ml)에 NADPH/FeCl₃/ADP를 첨가하여 과산화 반응을 유도하였다. *In vitro*에서 AAE를 처리하였을 때, 지질 과산화반응이 억제되었는데 용량이 증가함에 따라 억제 정도 증가하였다(Fig. 5).

4. 철의존성 지질 과산화 반응

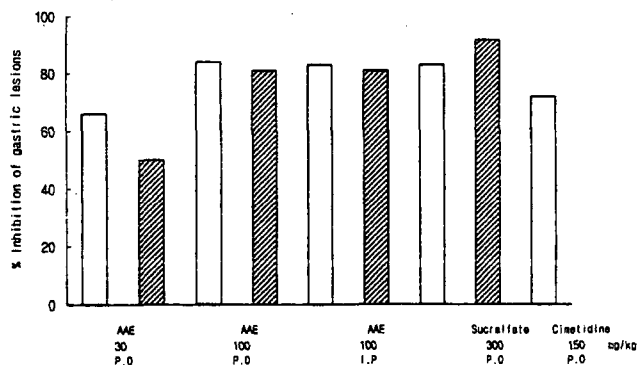


Fig. 1. Effect of AAE (Artemisiae extract) on ASA induced ulcer (■) and on acidified EtOH induced gastric lesions (□) in rats (n=10).

뇌 Homogenate에 FeCl₃로 유발시킨 지질 과산화반응을 AAE가 현저히 억제하였다(Fig. 6). 비교군으로 사용한 같은 농도의 alpha-Tocopherol 보다 더 강력하였다.

5. 호중구의 활성화에 의한 Chemiluminescence에 변화에 미치는 영향

위궤양 발생시 호중구의 이동 및 혈관내 침착이 유발되는데, 이 호중구의 활성화 과정에 Hydroperoxide가 형성된다. Luminol을 이용하여 측정한 결과, 애엽 중의 Flavonoid인 Eupatilin은 극히 저농도에서도 현저한 억제효과를 보였으며, 애엽 추출물도 유의한 억제 효과를 보였다(Fig. 7).

IV. 고찰

NSAID는 위장장애를 유발하는 대표적인 약물로 류마티스

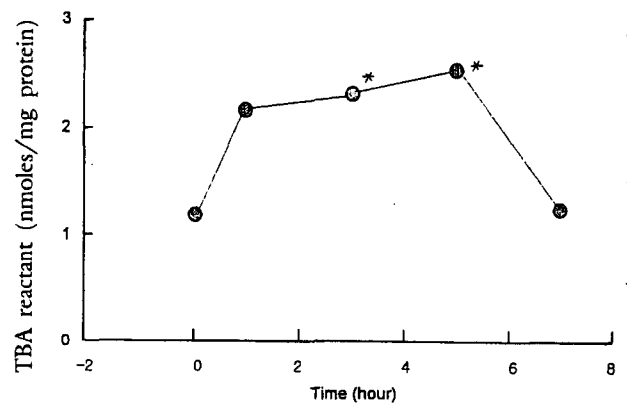


Fig. 2. Time course of TBA reactants formation in DDC-induced gastric antral lesion. Rats were sacrificed 1, 3, 5 and 7 h after treatment with DDD (9.8 g/kg, s.c.) and 0.1 N HCl (1 ml/rats, p.o.) TBA reactants level was determined (n=5). *p<0.05 compared with control value (0 h).

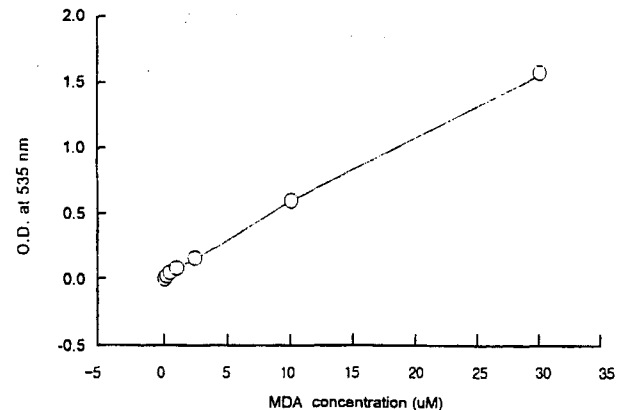


Fig. 3. Calibration curve of malondialdehyde. Malondialdehyde concentration was determined by thiobarbituric acid methods.

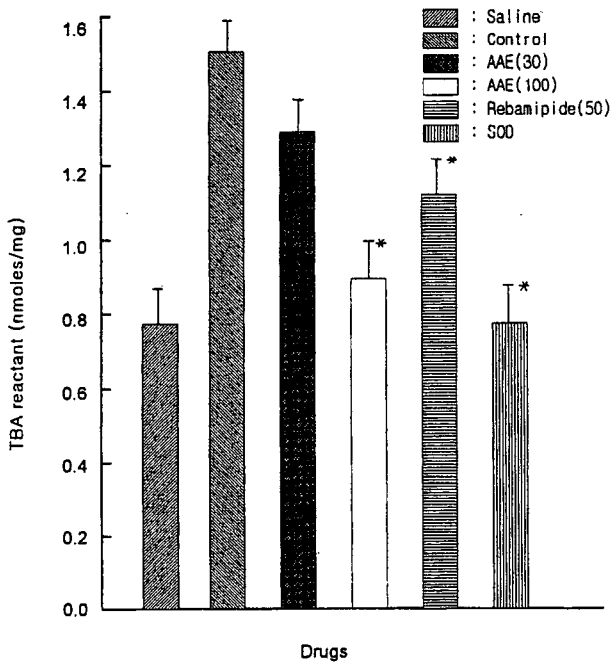


Fig. 4. *in vivo* effect of AAE on the lipid peroxide concentration in the antral mucosa.

* $p < 0.05$ compared with control value.

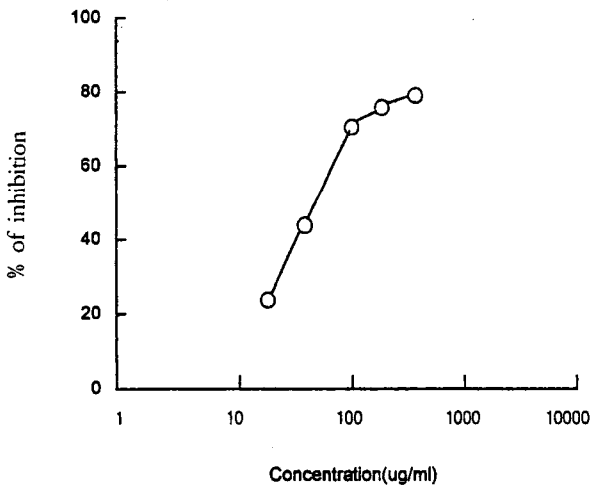


Fig. 5. Effect on microsomal lipid peroxidation.

Oxidation in liver microsomal fraction was induced by NADPH/FeCl₃/ADP. Lipid peroxide level was determined by thiobarbituric acid method.

성 환자와 같이 만성적으로 투여하는 환자에게서 빈발한다. NSAID계 약물투여 후 일어나는 현상을 보면 위점막혈류량 감소와 혈관내피세포의 손상이 나타나는데, 이는 혈관 내피세포에 호중구가 침착되어, 모세혈관 폐쇄와 혈관 내피세포 손상에 의해 유발되는 것으로 이러한 호중구 침착에는 염증성 매개체인 LTB₄ 또는 PAF의 생성결과로 알려져 있다. 실제적으로 임상적인 관찰에서 ASA 투여 20분후에 백혈구의

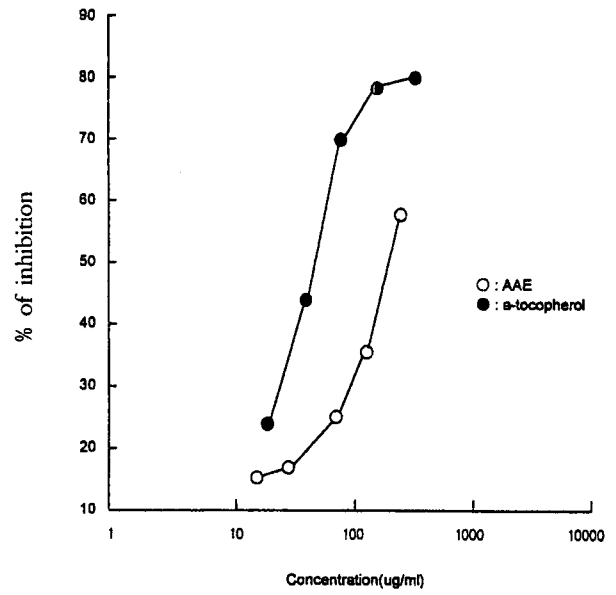


Fig. 6. Inhibition of iron-dependent lipid peroxidation.

Oxidation in brain homogenate was induced by 2 mM FeCl₃. Lipid peroxide level was determined by thiobarbituric acid method.

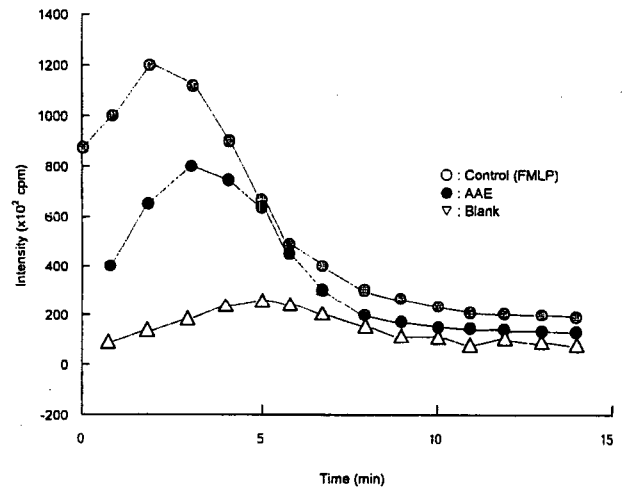


Fig. 7. Time-dependent changes of chemiluminescence in rat peritoneal neutrophils stimulated by FMLP.

침윤이 일어나 모세혈관벽과 후모세관정맥에서 백색의 혈전들이 축적되었으며, 이는 PGE₂와 Leukotriene 저해제나 leukotriene 수용체 길항제의 투여로 억제되었고, *In vitro*에서는 HUVEC(Human umbilical vein endothelial cells)에 사람 호중구의 침착이 NSAID계 약물에 의해 촉진되며 이는 NSAID에 의한 LTB₄ 생성의 증가 또는 백혈구 침착에 관여하는 당단백질(CD11_b/CD18)의 생성촉진에 기인된다고 보고되고 있다. 동물성계양 모델에서도 위와 같은 추론을 뒷받침하는 결과들이 보고되고 있다. 즉 Indomethacin 투여에 의해 유발된 위점막손상은 랫드 호중구의 항혈장의 투여 또는

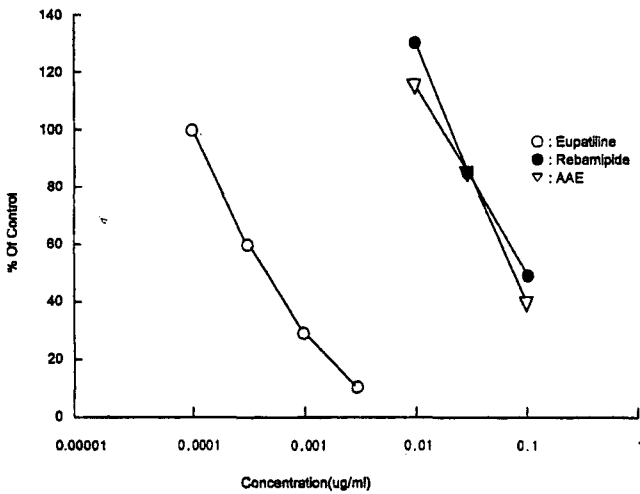


Fig. 8. Effect of eupatiline and Artemisiae extract (AAE) on luminol-dependent chemiluminescence in rat peritoneal neutrophils stimulated by FMLP.

CD₁₈ 항체의 투여로 억제되었고,^{7,8)} 또한 항산화효소인 SOD 나 Catalase의 사용으로도 억제되었다.^{15,16)} 이와 같이 최근의 보고들은 NSAID계 약물이 일으키는 위장장애의 주된 원인의 하나로 산소 라디칼의 관여를 보고하고 있으며, Cytoprotection 효과를 나타내어 항궤양효과를 나타내는 Prostaglandin과 같은 Prostaglandin류의 기전도 호중구와 관련하여 설명되고 있다. 즉, Prostaglandin류들은 호중구 기능 억제제이며, LTB₄ 생성 억제제이므로 NSAID의 투여는 위점막내의 내인성 방어인자인 Prostaglandin의 감소를 가져와 궤양을 유발한다.^{12,13)}

랫드에서의 위장 궤양 발생은 ASA와 HCl를 동시에 투여하는 방법, indomethacin을 반복적으로 투여하는 방법, Indomethacin과 DOG(2-Deoxy glucose)를 병용 투여하는 방법, 국소빈혈 유발 후 HCL과 Indomethacin을 투여하는 방법등이 쓰인다. 위장점막에 상처를 유발하는 이 과정은 여러 작용기전을 가진 약물들에 의해 억제될 수 있다고 보고되고 있다.³⁾ D-Mannitol은 Hydroxyl radical의 포획자로 작용할 수 있고, SOD, Catalase, DMSO 등의 작용기전은 Hydroxyl radical이나 Superoxide anion의 생성을 억제할 수 있기 때문에 혈소판 응집을 억제하고, 호중구 등 혈구세포의 혈관내벽에 대한 부착능을 억제하는 것으로 보고되어 있다. 또한, 시호(*Bupleurum falcatum*)으로부터 분리한 polysaccharide류도 HCl/EtOH로 유도한 위궤양 억제 효과를 나타내고 있는데, 이 작용도 위점막 표면에 도달하여 분비작용을 억제하는 것을 포함하여, 주로 산소 라디칼의 제거능에 기인한다고 알려져 있다.³⁹⁾

본 연구에서는, HCl/EtOH 투여법과 ASA를 이용하여 위

장장애를 유발할 수 있었으며, 애엽 추출분획은 경구 및 복강 내 주사시에 위궤양을 현저히 억제하였다(Fig. 1). 따라서, 그 작용기전을 밝히기 위하여, 이미 위궤양 발생에 관여하는 것으로 보고된 산소 라디칼의 작용 결과물을 측정하였다. 애엽 추출물을 랫드에 투여한 경우 과산화지질의 지표물인 MDA의 생성량이 저하되었다(Fig. 2, 3). 이러한 결과는, 애엽추출물에 의한 항 위궤양 효과와 상관성이 있을 것으로 보이며, 지질 과산화물 형성의 억제는 마이크로솜의 과산화과정과 철 의존성 지질 과산화 과정을 모두 억제하는 것으로 보여진다(Fig. 5, 6). 지질 과산화물의 생성 저하는 Superoxide anion이나 Hydroxyl radical 생성이 억제되었다는 것을 의미하며, 따라서 라디칼의 작용에 의해 유발되는 세포의 기능이 억제될 가능성을 시사한다. 호중구는 면역반응에 관여하는 세포로서, Leukotriene B₄, FMLP 등 주화성 물질에 의해 활성화 될 수 있고, 혈관내피세포에 부착되거나 지질 과산화물에 의한 세포막의 자극에 의해서도 활성화 될 수 있다.^{37,38)} 호중구의 활성화 과정에는 다양한 생화학적 반응이 수반된다. 이런 반응에는 Inositol phosphate 대사과정, Arachidonic acid 대사과정, Calcium의 세포내로의 유입과 세포 기관내로의 흡수등이 포함된다. 활성화된 호중구는 Lysosomal 효소, 자유 라디칼 등을 분비하는데, 이 과정에는 PKC(Protein kinase C)에 의한 인산화 반응이 수반된다. 따라서, 강력한 발암촉진제인 PMA 등에 의해서도 활성화 될 수 있다. FMLP와 LTB₄는 강력한 주화성 물질이며, 호중구 세포막상의 G Protein과 연결된 수용체에 작용한다. 이 G Protein은 Adenylate cyclase와 연결되어 있어서 세포내 cAMP 농도를 조절한다.⁴¹⁾ PGE₁은 G protein 연결 Adenylate cyclase의 활성화를 통해 cAMP 농도를 증가시키며, Forskolin은 Adenylate cyclase의 Catalytic subunit 결합하여 cAMP농도를 높인다. PGE₁과 PGI₂는 FMLP가 유도한 백혈구의 주화성을 억제하고, Superoxide의 생성과 혈관벽에의 부착능도 억제하였다. 따라서, NSAID에 의해 유발된 위궤양을 억제한다고 보고되었다. PGE₂는 호중구의 Lysosomal enzyme의 유리, Superoxide anion의 생성을 억제할 수 있어 위궤양을 감소시킬 수 있는데, 이러한 작용은 PLA₂(Phospholipase A₂)에 의한 Arachidonic acid 대사과정의 억제하고, PLC에 의해 생성되는 IP₃, DAG 생성 억제를 통해 이루어진다. NSAID는 Arachidonic acid 대사과정을 억제하여, 주요 대사물인 PGE₂ 생성이 억제된다. 따라서, 호중구의 활성화를 억제하는 PGE₂의 생성이 저해되어 위궤양이 악화된다고 알려져 있다.

결론적으로, 애엽 추출물은 FMLP로 자극된 호중구의 활성산소류에 의한 Chemiluminescence 생성을 억제하였고, 지

질의 과산화과정을 다양하게 억제하여 위궤양의 발생을 억제하였다. 그러나, 세포의 작용에 여러가지 생화학적인 인자들이 관여하는 것을 고려하면, 연구를 더 진행시켜야 정확한 작용기전을 알아낼 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

애엽 추출물이 위장궤양에 미치는 영향 및 작용기전에 대하여 실험한 결과,

1. EtOH-HCl 및 ASA투여로 유발된 위점막 손상을 억제하였다.

2. ASA로 유도된 위점막에서의 과산화지질 형성을 감소시켰다.

3. 세포 마이크로솜 지질과산화 및 철의존성 지질과산화를 억제하였다.

4. 호중구의 활성화를 억제하였다.

따라서, 애엽 추출물은 호중구의 활성화를 억제하여 혈관내 침착을 저해하고, 세포막 손상과 호중구의 활성화에 관여하는 것으로 알려진 과산화지질의 생성을 억제하여, NSAID계 약물 및 Alcohol에 의한 위점막 손상을 감소시키는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Fries, J. F., Miller, S. R. and Spitz, B. W.: Toward an epidemiology of gastropathy associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use. *Gastroenterology* 96: 647-655, 1989.
- Kainoh, M. and Nishio, S.: Prostacyclin and betaprost sodium as suppressors of activated rat polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 39: 477-484, 1990.
- Yoshikawa, T., Ueda, S., Naito, Y., Takahashi, S., Oyama, H., Morita, Y., Yoneta, T. and Kondo, M.: Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia-reperfusion in rats. *Free Rad. Res. Comm.* 7: 285-291, 1989.
- Perry, M. A., Wadhwa, S., Parks, D. A., Pickard, W. and Granger, D. N.: Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the rat stomach. *Gastroenterology* 9: 362-367, 1986.
- Piham, G., Regillo, C. and Szabo, S.: Free radicals and lipid peroxidation in ethanol aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* 32: 1395-1401, 1987.
- Kapui, J., Boer, K., Rozsa, I., Blasko, K. and Hermecz, I.: Investigations of Indomethacin-induced Gastric Ulcer in Rats. *Arzneim-Forsch.*, 43: 767-771 (1993)
- Wallace, J. L., Arfors, K. E. and Mcknight, W.: A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology* 100: 878-883, 1991.
- Masahiko Hirota, Masayasu Inoue, Yukio Ando, and Yoshimasa Morino: Inhibition of Stress-induced Gastric Mucosal Injury by a long Acting Superoxide Dismutase that circulate Bound to Albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 269-273, 1990.
- 鄭普燮, 生藥大事典, 1014pp, 永林社
- Light, D. R., Walsh, C., O'callaghan, A. M., Goetzl, E. J. and Tauber, A. I.: Characteristics of the co-factor requirements for the superoxide-generating NADPH-oxidase of human polymorpho nuclear leukocytes, *Biochemistry* 20: 1468-76, 1981.
- Alfred, I. Tauba, Doreen, B. Brettler and Peter, M. Blumberg: Relation of human Neutrophil phorbol ester Receptor occupancy and NADPH-oxidase activity. *Blood*, 60: 333-339, 1982.
- Robert, I. Lehrer and Lenore Cohen: Receptor-mediated Regulation of superoxide production in human neutrophils stimulated by phorbol Myristate Acetate. *J. Clin. Invest.* 68: 1314-1320, 1981.
- Takeuchi, K., Ueshima, K., Hironaka, Y., Fujioka, Y., Matsumoto, J. and Okabe, S.: Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats. *Digestion* 49: 175-184, 1991.
- Salim, A. S.: Role of Oxygen-Derived Free Radicals in the Mechanism of Chronic Gastric Ulceration in the Rat: Implications for Cytoprotection. *Digestion*, 43: 113-119, 1989.
- Hirota, M., Inoue, M., Ando, Y. and Morino, Y.: Inhibition of stress-induced gastric mucosal injury by a long acting superoxide dismutase that circulates bound to albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 280: 269-273, 1990.
- Oshima, A., Asayama, K., Sakai, N. and Kitajima, M.: The Role of Endogenous Free Radical Scavenger on Tissue Recovery in the Experimental Ulcer Model. *J. Clin. Gastroenterol.*, 12: 58-64, 1990.
- Davies, G. R., Simmonds, N. J., Stervens, T. R., Grandison, K., Blake, D. R. and Rampton, D. S.: Mucosal reactive oxygen metabolite production in duodenal ulcer disease. *Gut.*, 33: 1467-1472, 1992.
- Wallace, J. L., Keenan, C. M. and Granger, D. N.: Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *J. Physiol.* 259: G462-G467, 1990.
- Pamblad, J., Malmsten, C. L., Uden, A. M., Radmark, O., Engstedt, L. and Samulesson, B.: Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis

- and adherence. *Blood* 58: 658, 1981.
20. Malmsten, C. L., Palmblad, J., Uden, A. M., Radmark, O., Engstedt, L. and Samulsson, B.: Leukotriene B₂; a highly potent and stereospecific factor stimulating migration of polymorphonuclear leukocytes. *Acta physiol. Scand.* 110: 449, 1980.
 21. Wallace, J. L. and Granger, D. N.: Pathogenesis of NSAID gastropathy: are neutrophils the culprits? *TIPS* 13: 129-131, 1992.
 22. Amellal, M., Bronner, C., Briancon, F., Haag, M., Anton, R. and Landry, Y.: Inhibition of mast cells histamine release by flavonoids and bioflavonoids., *Planta Med.*, 16-20, 1985.
 23. Cassady, J. M., Baird, W. M. and Chang, C. J.: Natural Products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents., *J. Nat. Prod.* 53: 23-41, 1990.
 24. Che, C. T.: Plants as a sources of potential antiviral agents. *Economic and Medicinal plant Research*, 5: 167-251, 1991.
 25. Chu, S. C., Hsieh, Y. S. and Lin, J. Y.: Inhibitory effect of flavonoids on moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J. Nat. Prod.*, 55: 179-193, 1992.
 26. Gabor, M.: Antiinflammatory and antiallergic properties of flavonoids. in: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. 213: 471, 1986.
 27. Middleton, E. and Kandaswami, C.: Effects of flavonoids on immune response and inflammatory cell functions. *Biochem. pharmacol.*, 43: 1167-1179, 1992.
 28. Welton, A. F., Hurley, J. and Will, P.: Flavonoids and arachidonic acid metabolism In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II*, 301-312, 1988.
 29. Yamashita, Y., Kawada, S. Z. and Nakano, H.: Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. pharmacol.*, 39: 737-744, 1990.
 30. Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T. and Monden, Y.: Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 157: 183-189, 1988.
 31. Grisham, M. B., Hernandez, L. A. and Granger, D. N.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am. J. Physiol.* 251: G567-574, 1986.
 32. Granger, D. N., McCord, J. M., Panks, D. A. and Hallmarth, M. E.: Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the rat intestine., *Gastroenterology*, 90: 80-84, 1986.
 33. Gryglewski, R. J., Szezeklik, A. and Wandzilak, M.: Prostacyclin and iloprost on generation of superoxide anions by human PMN stimulated by zymosan or FMLP. *Biochem. Pharmacol.* 36: 4209-4212, 1987.
 34. Flick, M. R., Hoeffel, J. and Staub, N. C.: Superoxide dismutase prevents increased lung vascular permeability after air emboli in anesthetized sheep., *Federation Proc.* 40: 405, 1981.
 35. Freeman, B. A., Cunningham, M. K. and Panus, P. C.: Extracellular release of superoxide and hydrogen peroxide by vascular endothelium. *Federation Proc.* 46: 971, 1987.
 36. Selvaraj, P. M., Goodwin, J. D. and Ryan, U. S.: Superoxide anion release by pulmonary endothelium: response to phorbol ester and Ca inophore. *Federation Proc.* 46: 400, 1987.
 37. Rimele, T. J., Strum, R. J. and Adams, L. M.: Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 102-111, 1988.
 38. Borregaard, N. and Clark, R.: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation., *J. Cell Biol.* 97: 52-61, 1983.
 39. Matsumoto, T., Moriguchi, T. and Yamada, H.: Role of polymorphonuclear leucocytes and oxygen derived free radicals in the formation of gastric lesions induced by HCl/ethanol, and a possible mechanism of protection by anti-ulcer polysaccharide. *J. Pharm. Pharmacol.* 45: 535-539, 1993.
 40. Braugher, J. M., Duncan, L. A. and Chsae, L. A.: The Involvement of Iron in Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 261: 10282-10289 1986.
 41. Takenawa, T., Ishitoya, J. and Nagai, Y.: Inhibitory effect of prostaglandin E₂, forskolin, and dibutyryl cAMP on arachidonic acid release and inositol phospholipid metabolism in guinea pig neutrophils. *J. Biol. Chem.* 261: 1092-1098, 1986.
 42. Lawrence, R., Frederick, W. and Henderson, S.: Mechanism of the Luminol dependent Chemiluminescence of Human Neutrophils. *J. of Immunology*, 129: 1589-1593 (1992)
 43. Asakawa, T. and Matsushita, S.: Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids*, 15: 137-140, 1979.
 44. Ernster, L. and Nordenbband, K.: Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Emzymol*, 92: 574-580.
 45. Buege, J. A. and Aust, J.: Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Emzymol*, 30: 302.