

0.1% Iodoacetamide에 의해 유도된 흰쥐 위염 모델에서 한약처방(JAUN-1)의 유의한 효능규명

한경주 · 구성태 · 황혜숙 · 김유성 · 이지은 · 고미미 · 정봉연¹ · 최선미*

한국한의학연구원 의료연구부, 1: 자운대한의원

Beneficial Effects of Herbal Mixture (JAUN-1) on 0.1% Iodoacetamide-induced Gastritis Rat Model

Kyung-Ju Han, Sung Tae Koo, Hye Suk Hwang, Yu Sung Kim,
Ji Eun Lee, Mi Mi Ko, Bong Yeon Jung¹, Sun Mi Choi*

Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine, 1: Jaundae Oriental Medicine Clinic

To verify the effects of JAUN-1, which is a water-extracted herbal mixture, on gastroenteric disorders induced by 0.1 percent of iodoacetamide (IA) in rats. We divided four groups, Naive + Distilled Water (DW), 0.1% IA + DW, 0.1% IA + Proton pump inhibitor (Lansoprazole, 5 mg/kg) and 0.1% IA + Herbal mixture (JAUN-1, 50mg/kg) and performed following experimental methods to confirm its advantageous effects against ulcerogenic stomach in rats induced by 0.1% IA; cell cytotoxicity, analysis of lesions score, Hematoxylin & Eosin (H&E) stain, RT-PCR for β -actin, COX-1 and COX-2 and evaluation of intestinal prokinetic activity. No cytotoxicity was elucidated at the concentration of 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ and 1 mg/ml JAUN-1 through MTT Assay using by human stomach epithelial AGS cells, respectively. In addition, the JAUN-1 treated group and the lansoprazole treated group significantly decreased in lesions score compared to the DW treated group in the gastritis induced rat model, and results of immunohistochemistry by H&E staining showed that histological recovery in Proton Pump Inhibitor (PPI) and JAUN-1 treated groups rather than the DW administrated group. Another outcome was that β -actin relative COX-2 expression level was significantly promoted in the DW treated group while β -actin relative COX-1 expression level was no meaningful change in this rat model. Finally, intestinal prokinetic activity was recovered from low level of prokinetic activity due to 0.1% IA induced gastritis to the similar level of Normal group. These results suggested that JAUN-1 may have beneficial effects against 0.1% IA-induced gastritis rat model through decreasing lesions score, histological recovery, β -actin relative COX-1, 2 expression level and prokinetic activity.

Key words : Herbal mixture, Iodoacetamide, Proton pump inhibitor, gastritis

서 론

현대사회에 스트레스의 가중, 불규칙적인 식습관, 음주, 흡연 및 NSAIDs (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs)의 남용 등에 따라 위장질환은 지속적 증가하는 질병 중의 하나이다. 현재 임상에서 주로 사용되고 있는 Proton Pump Inhibitor (PPI)는

정확한 기전에 대해서 모호하지만, 위벽세포에서 H⁺/K⁺-ATPase에 대한 억제제를 통해 항 위산 분비효과를 가지고 있다고 알려져 있다.¹⁾ 그러나 PPI계열 약제는 일반적으로 두통, 구역질, 설사, 복통, 피로, 현기증 등의 부작용을 가지고 있다.²⁾ 또한 오랫동안 위장질환은 인류의 사망률과 발병률을 높이는 중요한 요인 중에 하나로 인식되어 왔다. 위장내 혈류와 프로스타글란딘 수준의 감소와 같은 요인들이 위염질환 발생에 중요한 역할을 한다. 현재까지도 위장질환에 대한 치료는 여전히 요원한 상태이기 때문에 새로운 약물의 개발이 시급하다. 다행히 이미 여러 임상에서 적용, 활용되어 최적화된 천연물 약재가 잠재적인

* 교신저자 : 최선미, 대전시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원

· E-mail : smchoi@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9485

· 접수 : 2007/09/28 · 채택 : 2007/10/17

약물 개발의 좋은 자원이 될 가능성이 크고 이를 반영하듯 전통적으로 사용하던 천연물 약재의 위염질환에 대한 효능에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.³⁾ 또한 최근에도 천연물로부터 항위염 신약을 개발하려는 노력이 지속되고 있다.⁴⁾ 이러한 시대적 흐름에 맞추어, 천연물 한약재 자원을 바탕으로 한 위염질환에 대한 효능 있는 한약제제의 발굴이 요구되어진다. 이런 점을 고려해 볼 때, 생체 적합성이 뛰어나고 부작용이 거의 없는 한약제를 이용한 위장질환 개선제의 필요성이 대두된다.

위염이 발생되면 지질의 Arachidonic Acid (AA)가 염증인자인 prostaglandin (PG)을 생성하는데, 이 PG를 생성하는데 Cyclooxygenase (COX) 효소가 중추적인 역할을 한다. COX는 COX-1과 COX-2라는 두 가지 이성질체로 구성되며, COX-1은 정상적인 위점막에서 항상 일정 수준으로 발현되어 있어서 PGs를 생성하는 반면,⁵⁾ COX-2는 다양한 염증유발 자극에 반응하여 빠르게 유도되는 특징을 가지고 있다. 아주 강한 자극이 아니고서는 위점막 표피에 시각적으로 확연히 나타나는 손상을 거의 줄 수 없는데, 이는 위점막의 혈류량 증가와 위산 분비를 감소하는 것을 포함하는 자가 방어기전 때문이다.⁶⁾ 이러한 기능적 변화는 내인성 PGs를 생성하는 COX-1과 COX-2 수준의 변화와 밀접한 관계가 있다. 위염에 대한 COX-2의 위점막 보호 기능에 대해 아직은 불명확하지만, COX-2는 위자극에 의해 쉽게 발현되고 이를 통해 생성된 PGs가 위염 모델에서 위점막 보호에 도움을 주는 것이 가능하다. 위 벽의 손상에 따른 위염질환에서 위장관 운동에 대한 역할은 많은 연구자들에 의해서 제시되어 왔다.⁷⁻⁹⁾ 해로운 화합물에 의한 조직 손상의 결과 위점막 세포에서 독성을 가지는 free radical을 축적하게 된다.¹⁰⁾ Glutathione (GSH)와 같은 내인성 thiols은 이 reactive free radical과 결합할 수 있기 때문에 다양한 위염발병 인자에 의해 생성된 위점막 손상을 조성하는데 방어적인 역할을 수행할 수 있다.^{11,12)} 또한 GSH가 electrophilic 화합물에 의해 위점막으로부터 GSH가 결핍되면 거시적인 위궤양 생성되기 때문에 GSH가 위점막을 보호 그리고 유지하는데 중요한 역할을 수행한다는 반증이 될 수 있다.¹³⁾ Free radical인 Nitric Oxide (NO)는 Nitric Oxide Synthesis (NOS)에 의해 생성되는데 최근에 위장과 소장에서 NO가 nonadrenergic 그리고 noncholinergic neurons의 neurotransmitters 중에 하나임이 밝혀졌다.¹⁴⁾ 또한 NO는 위장관 운동 활성화에 주요한 억제 인자이기 때문에.¹⁵⁾ 위장관 내에서 위점막 보호 효능을 가지는 GSH의 활성을 통해 free radical인 NO와의 결합을 통해 위장관 운동의 활성도를 증가시킬 수 있다.

이번 연구에 사용된 한약재들은 주로 行氣消食, 健脾開胃, 治食積不消, 理氣和胃, 食積氣滯, 治積滯內停, 治肉食積滯, 治寒痰食積 등의 효능을 가지고 있는 것으로 전통적 그리고 보편적으로 알려져 있다. 막힌 기와 食滯를 소통하며, 脾와 胃의 기운을 돕는 효능을 가진 이와 같은 여러 한약재들의 적정 혼합을 통해 부작용이 적고 생체적합성이 높은 위염질환에 유익한 효능을 가지는 한약제제 개발에 도움이 되고자 한다. 따라서 JAUN-1이 위염질환 관련 유익한 효능을 가지는지 평가하기 위해 0.1% IA로

유발된 위염질환 흰쥐 모델에서 MTT Assay를 통해 JAUN-1에 대한 세포독성 검사를 실시한 후, 위를 적출하여 생검으로 위조직의 손상 정도 측정, 조직학적인 H&E 염색, COX 유전자의 발현 그리고 위장관 운동력 측정 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 JAUN-1은 맥아, 호초, 계내금, 정향, 필발, 용뇌 및 박하뇌, 자단향, 빈랑, 향부자, 창출, 건강, 후박, 진피, 신곡, 지실, 산사, 갈근, 목향 그리고 사인 (감을약업사, 서울, 대한민국)을 일정한 비율의 혼합체제로 구성되며 (Table 1), 이 구성물을 증류수에 1시간 정도 담가 세척 후 혼합약재 50 g/L을 약 120℃로 약 2시간가량 열수 추출하였다. 이 후 분무건조기 (SD 1000, EYELA, JAPAN)를 통해 약 9.75%의 수율을 얻었다.

Table 1. The composition of JAUN-1

韓藥名	生藥名	韓藥名	生藥名
麥芽	<i>Hordei Fructus Germinatus</i>	蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>
胡椒	<i>Piperis Nigri Fructus</i>	乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>
鷄內金	<i>Galli Stomachichum Corium</i>	厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>
丁香	<i>Caryophylli Flos</i>	陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>
畢發	<i>Piperis Longi Fructus</i>	神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>
龍腦	<i>Borneolum Syntheticum</i>	枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>
薄荷腦	<i>Menthol</i>	山楂	<i>Crataegi Fructus</i>
紫檀香	<i>Santalini Lignum Rubrum</i>	葛根	<i>Puerariae Radix</i>
檳榔	<i>Areca catechu L.</i>	木香	<i>Aucklandiae Radix</i>
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	砂仁	<i>Amomum xanthioides Wallich</i>

2) 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 ((주)대한바이오링크, 충주, 대한민국) 6주령 (170-190 g)을 사용하였다. 동물은 온도 22±1℃, 상대습도 55±10%의 조건에서 12시간 주야로 주기를 바꿔주면서 한 케이지에 2-3마리씩 자유식이하면서 물을 충분히 공급하며 3일간 사육실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

3) 세포

Human stomach epithelial AGS cells (한국세포주은행, 서울, 대한민국)을 분양받아, RPMI-1640 medium 500 ml with L-Glutamine 25 mM HEPES without Sodium (WelGENE, 대구, 대한민국)에 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, Utah, USA)과 Penicillin G 100 U/ml (SIGMA, Missouri, USA) 그리고 Kanamycin 0.5 ml/L (SIGMA, Missouri, USA)를 첨가한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양시켰다.

2. 방법

1) Cytotoxicity 측정

JAUN-1의 세포독성 측정은 MTT assay로 확인하였다. 배양한 Human stomach epithelial AGS cells을 24 well plate에 분주하고 24시간 배양 후, JAUN-1를 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml 그

리고 1 mg/ml로 투여한다. 다시 각 well에 MTT (5 mg/ml) 100 μ l 씩 첨가하여 2-4시간가량 37°C, CO₂ incubator에서 배양한 후, 500 μ l DMSO를 첨가하여 약 5분간 37°C, CO₂ incubator에서 배양 후 100 μ l씩 96well plate에 옮겨 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

2) Lesions Score 측정

3일간 사육실 환경에 순화 후 위염유발 하지 않고 증류수만 처치한 대조군 (n=3), 위염유발+증류수처치군 (n=7), 위염유발+Lansoprazole처치군 (Proton Pump Inhibitor, PPI 5 mg/kg, n=7)과 위염유발+JAUN-1 (50 mg/kg, n=7)처치군으로 나누고 5일 동안 물과 0.1% Iodoacetamide (IA)를 혼합하여 실험동물에 공급하여 위염을 유발시켰다.¹⁶⁾ 위염 유발 직 후, 24시간, 48시간 그리고 68시간 후에 흰쥐에 증류수, PPI 및 한약재를 설정 농도로 총 4회 경구 투여하였다. 흰쥐는 위염 유발 후 72시간 후에 50 mg/kg Pentobabital ip. (ENTOBAR® inj., 한림 제약주식회사, 용인, 대한민국)로 마취한 후 희생되었으며, 희생되기 24시간 전부터 절식판 케이지를 이용 절식시켰다. 희생된 흰쥐의 위를 적출하기 전 들문부와 날문부를 묶은 후, 5ml PBS (Phosphate Buffer Solution, pH 7.4)를 투여하여 모두 위조직을 동일한 크기로 팽창시킨 후 적출하여, 24시간 동안 PBS에 보관 후 위의 큰 만곡을 따라 절개하여 IMT - iSolution DT version 7.5 (IMT-iSolution Inc., 서울, 대한민국)를 이용하여 Lesions Score를 측정하였다.

3) H&E 염색

위와 같은 방법으로 적출한 위조직을 4% Paraformaldehyde에 고정한 후, 30% Sucrose에서 24시간 보관 후 cryostat (CM-3050 S, Leica Microsystems Ltd., Wetzlar, Germany)로 30 μ m으로 박편하여 슬라이드에 붙인 후, 100% Haematoxylin 용액에 1분 간 담근 후 흐르는 물에 10분간 세척한다. 이 후 100% Eosin 용액에 약 20초간 담근 후 90% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanol에 담갔다 뺀 후, 다시 100% Ethanol에 다섯 번 반복한다. 이후 Xylene에 담갔다 뺀 후, 슬라이드에 고정한다.

4) 유전자 발현 분석

(1) RNA 추출

위와 동일 한 처치를 통해 적출한 각 군 별 위조직을 적출 후, 즉시 액체질소를 넣어 불활성 시킨 후 다음 시험 시까지 -70°C에 보관한다. 이 후 적출한 위조직을 잘게 간 후, 500 mg 위조직 당 1ml RNA-Bee (Tel-Test Inc., Texas, USA)를 섞어 균질화한다. 이 곳에 Chloroform (MP biomedical Inc., California, USA)를 200 μ l 넣고 강하게 약 10-20초 동안 흔들여 준 후, 약 5분간 4°C에서 반응 시킨 후, 13,000rpm, 4°C에서 약 15분간 원심 분리 시킨다. 이 후 조심스럽게 맑은 상층액 약 500 μ l를 수거하여, Isopropanol (MP biomedical Inc., California, USA) 500 μ l과 혼합하고 반응 시킨 후, 위와 동일한 조건에서 5분간 원심 분리하여 RNA를 분리한다. 분리된 RNA를 75% Ethanol로 세척 후 40-50 μ l 0.1% DEPC water를 넣어 준다.

(2) RT-PCR

RNA 정량은 Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000,

NanoDrop, Texas, USA)를 이용하였으며, 3 μ g RNA를 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Asuragen Inc., Texas, USA)를 이용하여 회사에서 제공한 실험 방법에 준하여 역전사 시켜 cDNA를 합성하였다. Housekeeping 유전자인 β -actin (Sense: 5'-TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G-3', Anti-sense: 5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C-3', 514bp) internal control로 사용하여 첫 denature 94°C 5분, denature 94°C 45초, anealing 59.3°C 45초 및 extension 72°C 1분 그리고 마지막 extension 72°C 10분을 28회 반복하여 실시하였고, COX-1 (Sense: 5'-GCC TCG ACC ACT ACC AAT GT-3', Anti-sense: 5'-AGG TGG CAT TCA CAA ACT CC-3', 167bp)과 COX-2 (Sense: 5'-TAC CCG GAC TGG ATT CTA CG-3', Anti-sense: 5'-AAG TTG GTG GGC TGT CAA TC-3', 214bp)를 첫 denature 94°C 5분, denature 94°C 30초, anealing 53.5°C 30초 및 extension 72°C 45초 그리고 마지막 extension 72°C 10분을 30회 반복 실시하여 각 각의 유전자를 증폭한 후 1% agarose gel에 전기 영동하여 ethidium bromide(EtBr, Sigma, Missouri, USA)를 이용하여 염색한 후 UV하에서 확인 하였다.

5) 위장관 운동력 측정

0.1% IA를 통해 위염 유발 후, 위와 같이 총 4회에 걸쳐 Distilled Water (DW), Lasoprazole 그리고 JAUN-1을 처치하였다. 위장관 운동력을 측정하기 위해서 5% Charcoal (Sigma, Missouri, USA)과 10% Tragacanth (Sigma, Missouri, USA)을 증류수와 혼합하여 Charcoal meal을 만들어 희생시키기 한 시간 전에 한 마리당 1 ml의 Charcoal meal를 경구 투여하여, 아래와 같은 방법으로 위장관 운동력을 측정하였다.

$$\text{위장관운동력} = \frac{\text{Charcoalmeal의 이동거리}}{\text{전체소장의 길이}} \times 100$$

6) 통계처리

실험결과는 통계 프로그램 SPSS® for windows (version 11, SPSS, Inc., Chicago, USA)를 사용하여 모든 결과는 평균±표준오차 약물의 농도와 각 군에 따른 지표의 수치를 비교할 경우 oneway ANOVA를 실시하였으며, 유의수준 P value \leq 0.05인 경우 유의성이 있다고 평가하였고, 다중분석은 LSD test를 시행하였다.

결 과

1. Cell toxicity 측정

JAUN-1이 세포독성을 가지는지의 유무를 확인하기 위해 JAUN-1을 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml 그리고 1 mg/ml의 농도로 AGS cells에 전처리 후 그 생존능력을 동량의 증류수를 처치했을 때의 생존율과 비교하였다. 증류수 전처리 군과 비교하여 각 농도별 98.99 \pm 0.01%, 98.56 \pm 0.01%, 99.86 \pm 0.02%, 107.17 \pm 0.02%, 103.56 \pm 0.01%, 108.30 \pm 0.03% 그리고 99.51 \pm 0.04% (Mean \pm SE)의 세포 생존율을 기록하여 (Fig. 1), 상당히 고농도인 1 mg/ml까지 세포 독성이 없는 것을 통해서 JAUN-1의 안정

성을 검증할 수 있었다. 심지어 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 증류수 처치군과 비교하여 통계적으로 유의성이 있는 $p \leq 0.05$ 로 나타나 세포 증식 효능도 있음을 확인 할 수 있다.

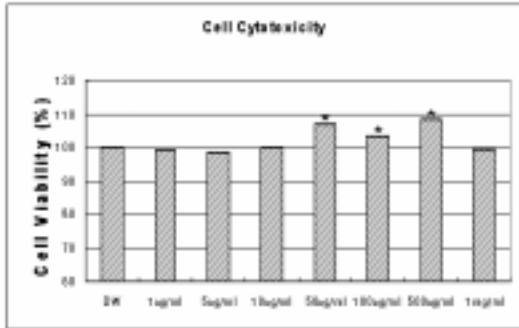


Fig. 1. Analysis of Cell Cytotoxicity for various concentrations of JAUN-1 in AGS cells. There is no noxious cytotoxicity in AGS cells treated by JAUN-1 effects, even this figure shows that cell proliferation occurs at the concentration of 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Data are presented as the mean \pm S.E. *, significant difference from control (DW) at $P \leq 0.05$.

2. Lesions Score

JAUN-1의 위장질환 개선에 관한 효능을 평가하기 위해 0.1% IA로 유발한 위염 모델에서 증류수 처치군, Lansoprazole (Proton Pump Inhibitor) 처치군 그리고 JAUN-1 처치군에 각 그룹당 7마리씩 임의 배정하여 실험을 수행한 결과 위염 유발 후 증류수를 처치한 군과 비교할 때 PPI 처치군은 눈에 띄는 위장 질환 개선효과에 의해 위 손상정도를 많이 회복 시켰지만 통계적 유의수준에는 들지 못한 반면 ($4.04 \pm 1.05, P=0.054$), JAUN-1 처치군은 ($2.85 \pm 0.69, P=0.01$) 통계적으로 유의하게 위염 개선 효능이 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

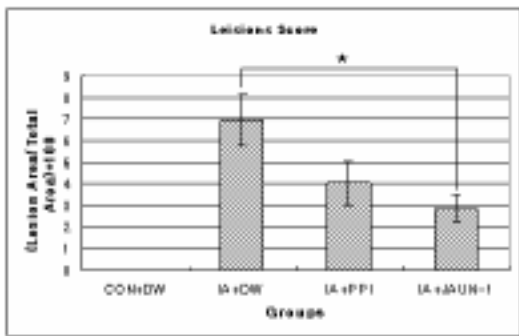


Fig. 2. Analysis of Lesions Score according to groups. Data are presented as the percentage ratio of lesions area to total stomach area. from seven rats. *, significant difference from IA+DW group, at $P \leq 0.05$ (CON: control, DW: distilled water, IA: 0.1% iodoacetamide, PPI(Lansoprazole, 5 mg/kg) and JAUN-1(herbal mixture, 50 mg/kg)).

3. H&E 염색

0.1% IA를 통해 유발된 위염 모델에서 JAUN-1의 조직학적 병소 발생에 따른 효능을 규명하기 위해 H&E staining을 수행하였으며, 그 결과 Fig. 3과 같이 대조군과 비교하여 0.1% IA를 통해 위염이 유발된 조직에서 병소 발생이 확연하게 눈에 띄임을 확인 할 수 있으나, 이에 반해 PPI와 JAUN-1 처치군에서는 발생되었던 병소 부위가 회복되어 있음을 확인 할 수 있다.



Fig. 3. Histological evidence for recovery effects of JAUN-1 and Lansoprazole on gastritis induced rat stomach tissue. A treating naive rat model with distilled water maintained integrity shape, Both C and D showed recovery appearance similar to A rather than B resulted from treating 0.1% iodoacetamide-induced gastritis rat model with lansoprazole (5 mg/kg) and JAUN-1 (50 mg/kg), respectively while B treating 0.1% iodoacetamide-induced gastritis rat model with distilled water showed strong ulcerogenic status.

4. 유전자 발현 분석

염증 유발 시 Prostaglandin E2 (PGE2) 효소의 활성화에 관여하는 COX-1, 2는 서로 다른 양상의 활성을 보이게 되면 양방간의 항상성 유지를 통해 정상적인 생체환경 조성에 공헌한다.

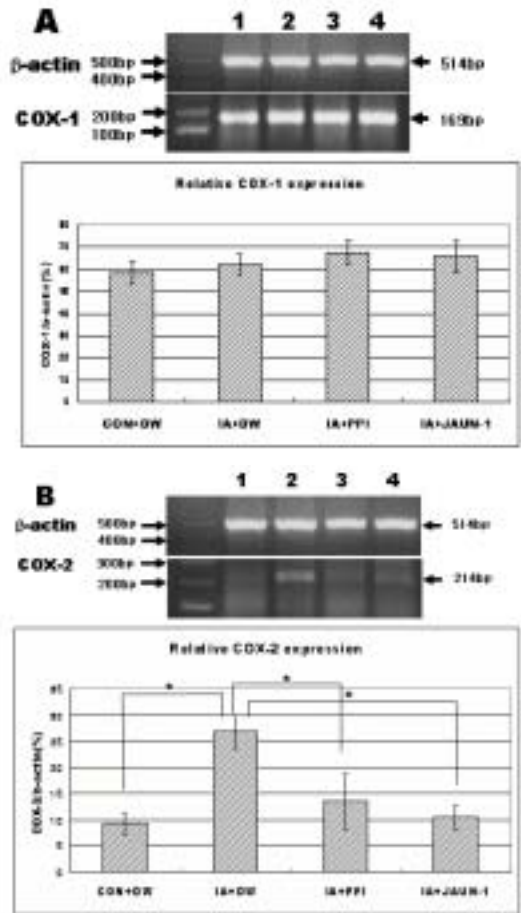


Fig. 4. A; Analysis of relative COX-1 expression for β -actin. There is no significant change of relative COX-1 level in terms of different groups. **B; Analysis of relative COX-2 expression for β -actin.** Data are presented as the percentage ratio of lesions area to total stomach area from seven rats. *, significant difference, at $P \leq 0.05$.

COX-1은 생체 내에 일정한 수준으로 생성되어 있는 반면, COX-2 효소는 염증 유발시 급격히 발현되는 인자이다. 이 두 중요 효소의 발현 양상을 housekeeping gene인 β -actin의 발현량에 따른 COX-1과 COX-2의 상대적 발현비율을 통해 확인하였다. COX-1은 모든 군에서 유의적인 변화 없이 일정 수준의 발현 양상을 보인 반면, β -actin 발현량에 따른 상대적인 COX-2의 발현은 대조군과 비교하여 0.1% IA를 통해 위염 유발 후 증류수만 처치한 군 (26.78 ± 3.09)에서 대조군에 증류수만 처치한 군 (9.31 ± 1.88)보다 약 3배정도의 COX-2 발현량 증가 ($P=0.0013$)를 확인할 수 있으나, PPI와 JAUN-1 처치군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 하지만 위 두군을 위염유발 후 증류수만 처치한 군과 비교해보면 통계적 유의성 있는 결과가 도출된 것을 볼 수 있다. (PPI처치군 $P=0.01$, JAUN-1 처치군 $P=0.0023$)(Fig. 4)

5. 위장관 운동력 측정

0.1% IA에 의해 위염 유발된 흰쥐에 증류수 처치한 군 (72.76 ± 3.48)의 위장관 운동력이 대조군 (81.73 ± 2.75)과 비교하여 감소하였으나 ($P=0.07$), PPI처치군 (86.28 ± 2.15)과 JAUN-1 처치군 (83.89 ± 4.73)은 증류수 처치군에 비해 각각 P 값이 0.084, 0.026으로 유의하게 증가되었음을 확인할 수 있다(Fig. 5).

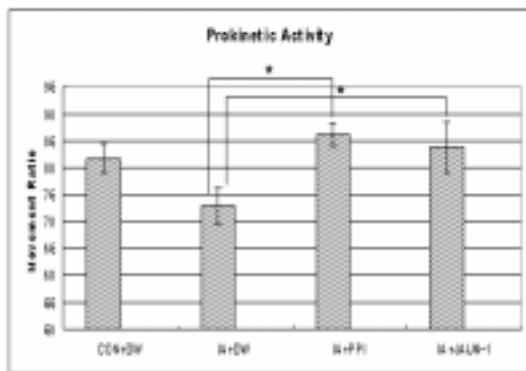


Fig. 5. Analysis of Prokinetic Activity. This figure presents that IA+PPI and IA+JAUN-1 groups have significantly higher prokinetic activity than IA+DW group. Data are presented as the percentage ratio of lesions area to total stomach area, from seven rats. *, significant difference, at $P \leq 0.05$.

고찰 및 결론

비록 현재까지 위염질환에 대해 아직 밝혀지지 않은 부분이 많이 있음에도 불구하고, 위장관 운동 억제, Prostaglandin (PG) 생성, 혈류증가를 통한 방어기전 및 위산의 분비 등에 관한 주요한 생리학적 현상에 대해서는 많은 연구가 진행되어왔다. 우리는 이번 연구에서 0.1% IA를 통해 유발된 위염모델에서 JAUN-1의 위염질환에 대한 유의한 효능을 보이고자 하였다. 세포독성 실험에서 안전성이 검증된 JAUN-1은 위조직 생검 적출을 통해 측정된 Lesions Score에서 Lansoprazole 처치군 보다 우수한 효능을 보이며, 증류수 처치군과 비교하여 통계적으로 유의한 감소율을 보였다(Fig. 2). 이는 위염유발 후 Lansoprazole과 JAUN-1의 처

치를 통해 증류수만 처치한 군과 비교하여 빠른 회복력을 보여 주고 있음을 확인 할 수 있으며, 이는 자가 방어기전의 주요 인자로 알려져 있는 COX-2 효소의 발현을 통한 PGs 생성의 증가를 보다 빠르게 작동시켜 위염을 자극에 반응하는 JAUN-1의 효과로 볼 수 있다. COX의 mRNA 수준의 발현을 통해 효능 검증에서 COX-1은 housekeeping gene인 β -actin처럼 모든 군에서 유의성 없는 비슷한 수준의 발현을 보인 반면, 0.1% IA로 위염유발 후 증류수만 처치한 군에서는 여전히 COX-2의 발현 수준이 PPI처치군과 JAUN-1처치군과 비교하여 2배이상 더 발현되었다 (Fig. 4). 이는 위점막에서 유해 자극에 의해 기인한 위염질환이 회복되지 못하여 지속적인 내인성 PGs의 생성이 요구되는 관계로 COX-2의 수준이 높게 발현되었다 볼 수 있다. 이에 대한 의문은 조직면역염색법을 통한 조직학적 병태의 양상을 통해 보다 확실한 근거가 제시된다(Fig. 3). 대조군에서는 위조직 기저부와 위점막 모두 완전한 상태이나, 위염질환 유발 후 증류수만 처치한 군은 위점막이 괴사되어 있는 것을 확인할 수 있으며 이에 반해 PPI나 JAUN-1 처치군은 괴사되었던 위점막이 다시 회복된 모습을 관찰할 수 있다. 또한 Fig. 5에서 보듯 0.1% IA를 통해 유발된 위염질환 흰쥐의 위장관 운동성이 정상쥐에 비해 통계적 유의성 범위는 아니지만 줄어들었음을 확인할 수 있으나, 위와 같은 형태로 유발된 위염질환 모델에서 Lansoprazole과 JAUN-1를 통해 정상 수준의 위장관 운동성을 보이고 있다. 이는 또한 Lansoprazole과 JAUN-1을 처치하지 않은 군과 비교하여 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 이에 대한 구체적인 기전연구가 아직 수행되지 못했지만, 위염 유발성 화합물에 의해 야기된 위장관 운동성 감소를 JAUN-1의 처치를 통해 Glutathione (GSH)을 발생시켜, 위장관 운동 억제에 주요하게 관여하는 neurotransmitter가 NO와 결합하여, 위장관 운동성이 개선될 수 있으며, 최근 위장관 운동력에 관한 연구에서 위염 유발성 sulfhydryl reagent인 N-ethyl maleimide (NEM), Iodoacetamide (IDA)과 diethyl maleate (DEM)에 의해 감소된 위장관 운동력을 다시 증가시킨 후 NOS 유발 억제제인 NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)와 NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)을 통해 감소되는 것을 볼 때, 위장관 운동력에 NOS가 중요한 역할을 가진다 할 수 있다.¹⁷⁾ 물론, 다른 연구에서는 미주신경의 활성화와 opioid system 그리고 Adrenergic system에 의해 위장관 운동력 감소되는 경우도 있다.¹⁸⁾ 그러나 이는 서로 위염유발 모델이 다르고, 처치하는 방식, 용량, 성분 그리고 결과 확인시점이 다르기 때문에 나타나는 현상으로 생각할 수 있다. 이런 점을 고려해 볼 때, 위염유발 후 JAUN-1처치에 따른 위장관 운동력 증가에 대한 기전을 밝히지 못했지만, NOS와 여러 neurohormone들의 영향에 밀접한 영향을 받을 것으로 생각되어 진다.

0.1% IA를 통해 유발된 위염 모델 JAUN-1의 효능을 평가하기 위해 실시한 이번 연구에서 JAUN-1의 위염질환에 대한 여러 유의한 효능의 기전에 대해 명확하게 밝히지는 못했지만 그 위염질환 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있었으며, 또한 현재 임상에서 위염질환에 대해 주처방되고 있는 양성 대조군인 PPI와의 비교를 통해 그에 못지않은 효능을 지녔음을 확인할 수 있

었다는 점에서 그 의미를 찾고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2007년 한국한의학연구원의 “침구경락 연구거점 기반구축사업(K07120)”의 지원을 받아 수행하였음.

참고문헌

- Nagaya, H., Satoh, H., Maki, Y. Possible mechanism for the inhibition of acid formation by the proton pump inhibitor AG-1749 in isolated canine parietal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 1289 - 1295, 1999.
- Rossi, S. editor. *Australian Medicines Handbook* 2006.
- Schmeda-Hirschmann, G., Yesilada, E. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J Ethnopharmacol* 100: 61-66, 2005.
- Suleyman, H., Demirezer, L.O., Buyukokuroglu, M.E., Akcay, M.F., Gepdiremen, A., Banoglu, Z.N., Gocer, F. Antiulcerogenic effect of *Hippophae rhamnoides* L. *Phytother Res* 15: 625-627, 2001.
- Davies, N.M., Sharkey, K.A., Asfaha, S., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L. Aspirin induces a rapid up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in the rat stomach. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 1101 - 1108, 1997.
- Ferraz, J.G.P., Sharkey, K.A., Reuter, B.K., Asfaha, S., Tigley, A.W., Brown, M.L., McKnight, W., Wallace, J.L. Induction of cyclooxygenase 1 and 2 in the rat stomach during endotoxemia: role in resistance to damage. *Gastroenterology* 113: 195 - 204, 1997.
- Takeuchi, K., Ueki, S., Okabe, S. Importance of gastric motility in the pathogenesis of indomethacin induced gastric lesion in rats. *Dig Dis Sci* 31: 114-1122, 1986.
- Itoh, M., Gulli, P.H. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock induced gastric lesion in the rat. *Gastro-enterology* 88: 1162-1167, 1985.
- Perry, M.A., Wadhwa, S., Parks, D.A., Pickard, W., Granger, D.N. Role of oxygen radicals in ischemia. *Gastroenterology* 90: 362-369, 1986.
- Terano, A., Hiraishi, H., Ofa, S., Shiga, J., Sugimoto, T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *J Gastroentrol* 24: 488-493, 1989.
- Kosower, N.S., Kosower, E.M. Glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54: 109-160, 1974.
- Lash, L.H., Hagen, T.M., Jones, D.P. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4641-4645, 1996.
- Ghanayen, B.I., Boor, P.J., Ahmed, A.E. Acrylonitrile induced gastric mucosal necrosis: role of gastric glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 232: 570-577, 1985.
- Boeckxsstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Bult, H., De Man, J.G., Herman, A.G., van Marcke, Y.M. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation mediated by nitric oxide in the canine ileocolonic junction. *Eur J Pharmacol* 190: 239-246, 1990.
- Stark, M.E., Szurzewski, J.H. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 103: 1928-1949, 1992.
- Kirsty Barnett, Cameron, J., Bell Webb Mcknight, Michael Dickey, Keith, A., Sharkey, John L. Wallace. Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1292-G1297, 2000.
- Maity, S., Ukil, A., Karmakar, S., Datta, N., Chaudhuri, T., Vedasiromoni, J.R., Ganguly, D.K., Das, P.K. Thearubigin, the major polyphenol of black tea, ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 470(1-2):103-112, 2003.
- Yu-Qing Li, Bing Zhu, Pei-Jing Rong, Hui Ben, Yan-Hua Li. Neural mechanism of acupuncture-modulated gastric motility. *World J Gastroenterol* 13(5):709-716, 2007