

# 에탄올 유발 위점막 손상에 대한 황련 물 추출물의 방어효과

변준석\*

대구한의대 한의과대학 비계내과학교실

## Protective Effects of Coptidis Rhizoma on Ethanol-induced Gastric Ulcer in Mice

Joon-Seok Byun\*

3rd Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

The exposure of gastric mucosa to ethanol produces acute ulcers mediated by inflammatory processes, hemorrhagic erosions and increase of reactive oxygen species. The purpose of this study was to assess the effects of Coptidis Rhizoma(CR) aqueous extracts on hydrochloride (HCl)/ethanol induced gastric ulcer in mice as compared with rebamipide (30 mg/kg) and ranitidine (100 mg/kg). Stomach ulcers were induced by oral ingestion of HCl/ethanol. CR extracts (125, 250 and 500 mg/kg) were orally administered, once a day for 7 continuous days, and 1 hr after last 7th treatment of CR extracts stomach ulcers were induced. Effects of CR extracts on HCl/ethanol-induced gastric ulcer were evaluated based on gross and microscopic observations with anti-oxidant activities. All three different dosages of CR extract significantly decreased HCl/ethanol-induced gastric ulcer compared with the HCl/ethanol control mice. CR extracts also strengthened the antioxidative defense systems - decreased the level of lipid peroxidation but increased the level of catalase, superoxide dismutase and nitrate/nitrite compared with the HCl/ethanol control. The effects of CR extract 500 mg/kg were similar to that of 30 mg/kg rebamipide, and CR extract 250 mg/kg showed similar anti-ulcer effects as compared with ranitidine 100 mg/kg. These results suggest that the gastroprotective effects of CR extracts on mice ulcer models can be attributed to its ameliorating effect on oxidative damages.

Key words : Coptidis Rhizoma, ethanol, mice, anti-oxidant activity, gastric ulcer

### 서 론

위궤양(gastric ulcer)은 스트레스, 흡연, 알코올, 영양결핍, 감염 및 비스테로이드성 항염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs:NSAIDs)의 남용에 의해 유발되는 비교적 흔한 질병이다<sup>1)</sup>. 위궤양은 다양한 방어인자들의 영향을 받아 이중 활성 산소류(reactive oxygen species; ROS)에 의한 지질 과산화 등 항산화 방어 system의 장애가 유발되는 것이<sup>2)</sup> 현재 유력한 병인 중 하나로 부각되고 있고, 다양한 항산화제들의 위점막 보호효과가 이미 잘 알려져 있다<sup>3)</sup>.

Rebamipide는 대표적인 ROS scavenger로 다양한 원인에 의한 궤양치료제로 사용되어 오고 있으며, 사이토카인 및

chemokine 형성을 감소시킴으로써 항염 효과 역시 나타내는 것으로 알려져 있고<sup>4)</sup>, Ranitidine은 대표적인 histamine H<sub>2</sub> receptor antagonists로 위궤양 치료제로 사용되어 있으며<sup>5)</sup>, 최근 항산화 효과에 의한 다양한 약리효과가 추가적으로 인정되고 있다<sup>6)</sup>. 따라서 Rebamipide와 Ranitidine은 궤양 치료제 개발 시 대표적으로 이용되는 reference약물이다.

황련(川黃連; Coptidis chinensis Franch, Coptidis Rhizoma)은 미나리아재비과(毛茛科; Ranunculaceae)에 속하는 多年生 草本으로서 중국이 원산이며 주로 산지의 습지에서 서식하며, 가을에 채취하여 鬚根과 泥砂를 제거하고 乾燥하여 사용한다<sup>7-9)</sup>. 황련은 苦寒, 無毒하고 心, 肝, 胃, 大腸經 등에 작용하며, 清熱濕燥, 清心除煩, 火解瀉毒 등의 효능이 있어 濕熱痞滿, 瀉痢, 嘔吐吞酸, 黃疸, 高熱神昏, 心火亢盛, 心煩不寐, 血熱吐衄, 目赤, 牙痛, 消渴, 癰腫疔瘡, 外治濕疹, 濕瘡, 耳道流膿 등의 병을 치료하는데 사용하는 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

\* 교신저자 : 변준석, 대구 수성구 상동 165 대구한의대 부속 대구한방병원  
· E-mail : emdkdj@naver.com, · Tel : 054-271-8005  
· 접수 : 2012/01/09 · 수정 : 2012/02/08 · 채택 : 2012/02/15

황련의 주성분은 isoquinoline 계열 alkaloid인 berberine이며, 기타 coptisine, epiberberlin, feluric acid, magnoflorine, palmatine, worenine 등의 성분을 함유하고 있다<sup>7)</sup>. Berberine은 알칼로이드(alkaloid) 성분으로서 주요 병균에 대한 항균작용<sup>10)</sup>, 항염증<sup>11)</sup>, 항암<sup>12)</sup>, 장운동억제<sup>13)</sup> 및 지혈작용<sup>8)</sup> 등이 있는 것으로 알려져 있으나 현재까지 황련 추출물 자체에 대한 항궤양 효과를 에탄올로 유발된 실험적 위궤양 모델에서 평가한 보고는 찾아볼 수 없다. 따라서 본 연구에서는 황련 물 추출물의 항궤양 효과를 염산/에탄올로 유발된 마우스 위궤양 모델을 이용하여 항산화 효과와 함께 평가하였고, 그 효과를 대표적인 궤양 치료제인 rebamipide (30mg/kg) 및 ranitidine (100 mg/kg)과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 사양관리

56 마리의 수컷 ICR 마우스 (6-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 7일간의 순화과정을 거쳐 실험에 사용하였으며, 순화과정 및 실험 전 기간 동안 온도 (20-25°C)와 습도 (30-35%)가 조절된 사육실에서 polycarbonate 사육상자에 4 마리씩 수용하여 사육하였고, 명암 주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료 (Samyang, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였으며, 모든 실험동물은 picric acid를 이용하여 개체를 식별하였다. 실험동물은 군당 8마리씩 7그룹 - 정상 대조군, 궤양 대조군, rebamipide, ranitidine 및 3 용량 (500, 250 및 125 mg/kg)의 황련 추출물 투여군으로 구분하여 실험을 실시하였다. 본 실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다.

### 2. 황련 추출물

중국산 황련을 지린역 약업사 (옵니허브, Korea)를 통해 구입·정선하여, 대구한의대학교 본초학교실에서 감정한 후 실험에 사용하였다. 선정된 황련 200 mg을 취하여 정제수 200 ml로 가열 추출한 후 (60°C, 3시간, 3 번), 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Rotavapor R144; Büchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압·농축하여, 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer (Freezone 1; Labconco Corp., MO, USA)를 사용하여, 동결 건조시켜 총 38.82 g (수율 19.41%)의 연갈색의 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 황련 추출 동결건조물은 -20°C로 냉동 보관 후 실험에 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 용매인 증류수에 50 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었다.

### 3. 약물의 투여

Rebamipide hydrate 및 ranitidine hydrochloride는 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 각각 확실한 궤양 치료 효과를 나타내는 용량으로 알려진 30 mg/kg<sup>14)</sup> 및 100 mg/kg<sup>6)</sup>을 투여 용량으로 설정하였다. 모든 약물은 멸균

증류수에 용해시켜, 10 ml/kg의 용량으로 존데 (zonde)가 부착된 주사기를 이용하여 매일 1회씩 위궤양 유발 전 7일 동안 강제 경구 투여하였다. 한편 정상 및 궤양 대조군에서는 동일한 용량의 멸균 증류수만을 동일한 기간 동안 동일한 방법으로 투여하였다.

### 4. 체중의 측정

모든 실험동물의 체중을 약물 투여 시작 1일 전, 투여 시작일 및 최종 희생일에 각각 측정하였으며, 사료섭취에 따른 체중 변화를 최소화하기 위해 약물 투여시작일에 모든 실험동물은 18 시간 절식시켰으며, 궤양 유발시에는 24시간 절식을 실시하였다. 또한 실험 시작시의 개체 차이에 의한 체중 변화를 최소화하기 위해 7일간의 약물 투여기간 동안의 체중 변화량인 증체량 (body weight gain)을 산출하였다.

### 5. 위궤양의 유발

최종 약물투여 1시간 후, Oyagi 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 98% 에탄올에 150 mM의 염산 (Merck, CA, USA)이 포함된 염산/에타놀 혼합액을 경구투여하여 위궤양을 유발하였다. 모든 실험동물은 염산/에타놀 혼합액 투여 전 24시간 절식을 실시하였다.

위 육안 병소의 측정: Oyagi 등<sup>14)</sup> 및 Morais 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라, 염산/에타놀 혼합액 투여 1시간 후 모든 실험동물은 경추 탈골로 희생하여, 위를 적출한 다음, 대만부를 절개하여 펼치고 10% neutral buffered formalin에 24시간 고정한 다음, 투명한 grid (area: 1mm<sup>2</sup>)를 점막에 겹쳐, 출혈성 위점막 병소의 총 면적을 mm<sup>2</sup> 단위로 각각 측정하였다.

### 6. 항산화 방어 system의 측정

Morais 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라, 위 점막을 분리하여 얼음으로 냉각 (ice-cold) 한 10 mL의 KCl (100 g/L; pH 7.4; Sigma, MO, USA) 용액에서 homogenize 하여 사용하였다. 이후 단백질 함량은 Lowry<sup>16)</sup>의 방법으로 bovine serum albumin을 standard로 이용하여 측정하였으며, 지질 과산화 정도 (lipid peroxidation)는 Agar<sup>17)</sup> 등의 방법으로 측정하였다. 즉, 준비한 250 µl의 homogenate를 water bath에 37°C 60분간 유지하면서, 35% perchloric acid (Sigma, MO, USA)를 첨가하고 14,000rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 취하여 1.2% thiobarbituric acid (Sigma, MO, USA)를 첨가하고 98°C 조건하에서 30분간 가온 하였다. 상온에서 냉각시킨 다음 532 nm에서 흡광도를 측정하여, 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma, MO, USA)를 이용하여 작성한 standard curve와 비교하여, malondialdehyde (MDA) nM/g tissue 단위로 측정하였다. 또한 catalase 활성 역시 이전의 방법<sup>16)</sup>에 따라, catalase 활성을 pH 7.0, 온도 25°C하에서 1nM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분당 분해하는데 필요한 효소의 양으로 정의하고, mM/min/g tissue 단위로 평가하였고, superoxide dismutase (SOD) 활성은 Beauchamp와 Fridovich<sup>19)</sup>의 방법에 따라, 100nM EDTA (Sigma, MO, USA) 및 13 mM l-methionine (Sigma, MO, USA), 750 µM nitroblue tetrazolium chloride (NBT; Sigma, MO, USA) 및 2 µM riboflavin (Sigma, MO, USA)이 포함된

50mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)에 homogenize 하여 반응시키고, 4°C 조건하에서 10분간 3,600rpm으로 원심분리한 15분 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다. SOD 1 unit는 1분 동안 NBT의 환원을 50% 억제하는 농도로 정의하여, U/g protein 단위로 측정하였다. 또한 위 점막 nitric oxide 함량은 Griess reagent를 사용하여 total nitrate/nitrite 함량으로 측정하였다<sup>20</sup>. 즉, 준비된 위점막 homogenate를 4°C에서 11,000×g으로 15분간 원심분리하고, 상층액을 Griess reagent (0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamide dihydrochloride, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid; all Sigma, MO, USA)와 혼합한 10분 후 540 nm 흡광도를 측정하고, sodium nitrite의 standard curve와 비교하여 nitrate/nitrite μM/g protein 단위로 측정하였다.

7. 조직병리

최종 희생일에 일부 위 부분 조직을 적출한 다음 세로로 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 변성조건을 기초하여, 4 단계의 등급 즉, 0: 정상, 1: slight - 점막 표면 손상, 2: moderate - 점막 중증도 손상 및 부종, 3: severe - 점막 전체 손상으로 구분하여, semiquantitative scoring 을 실시하였다. 또한 이전의 Ku 등<sup>22</sup>의 방법에 준하여, 위점막 손상의 침습을 [(손상 점막의 두께/전체 위점막 두께) ×100, %]과 궤양 병소부위 주변의 평균 점막 두께를 각각 CCD image analyzer (DMI-300, DMI, Korea)를 이용하여 측정하였다.

8. 통계처리

모든 수치는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 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 test를 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.

결 과

1.체중의 변화

7 일간의 약물 전투여 기간 동안 정상 및 궤양 대조군과 비교하여, 의미 있는 체중 및 증체량의 변화는 인정되지 않았다 (Table 1).

2.위 육안 병소의 변화

모든 염산/에탄올 궤양 유발군에서는 출혈성 궤양 소견이 위점막 전체에 걸쳐 관찰되었으며, 궤양 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 위 육안병소 면적의 증가가 인정되었으나, rebamipide, ranitidine 및 모든 황련 추출물 투여군에서는 궤양 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 위 육안병소 면적의 감소가 각각 인정되었다(Fig. 1).

Table 1. Changes on the body weight and gains during CR extracts pretreatment periods in mice

Groups	Body weights			Body weight gains [B-A]
	Before	Start of dosing [A]	At sacrifice [B]	
Controls				
Intact	37.49±1.40	30.68±1.51	38.40±1.99	7.78±1.15
HCl/EtOH	37.64±1.54	30.66±1.48	38.04±1.10	7.38±0.63
References				
Rebamipide	37.56±1.78	30.55±1.80	37.76±1.97	7.21±0.77
Ranitidine	37.54±1.43	30.70±1.47	38.01±1.82	7.31±0.87
CR extracts				
500 mg/kg	37.74±1.61	30.73±1.63	38.53±1.96	7.80±1.24
250 mg/kg	37.65±1.82	30.83±2.14	38.55±1.67	7.73±0.74
125 mg/kg	37.50±1.82	30.51±1.74	38.13±1.63	7.61±0.85

Values are expressed as mean ± S.D. g of eight mice. HCl/EtOH: Hydrochloride/ethanol; CR: Coptidis Rhizoma. Rebamipide and ranitidine were treated as 30 and 100 mg/kg, respectively

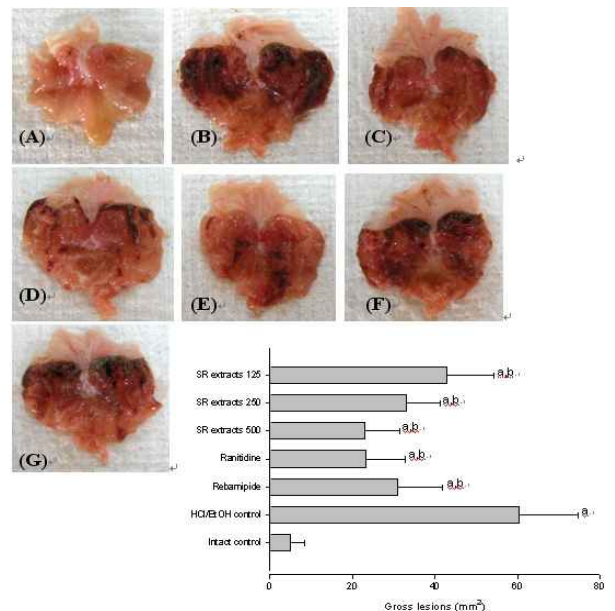


Fig. 1. Representative gross observations of the fundic mucosa in the intact control (A), HCl/EtOH control (B), rebamipide 30 mg/kg (C), ranitidine 100 mg/kg (D), CR extracts 500 (E), 250 (F) and 125 (G) mg/kg treated mice. Note that HCl/EtOH-induced hemorrhagic gastric lesions were markedly inhibited by pre-treatment of rebamipide (30 mg/kg), ranitidine (100 mg/kg) and all three different dosages (500, 250 and 125 mg/kg) of CR extracts, respectively. Values are expressed as mean ± S.D. of eight mice. HCl/EtOH: Hydrochloride/ethanol; CR: Coptidis Rhizoma. a p<0.01 as compared with intact control by LSD test. b p<0.01 as compared with HCl/EtOH control by LSD test.

3. 항산화 방어 system의 변화

궤양 대조군에서는 정상 대조군에 비해 catalase, SOD 및 nitrate/nitrite 함량의 유의성 있는 (p<0.01) 감소와 함께 유의성 있는 (p<0.01) 지질 과산화 (MDA 함량)의 증가 인정되어, 항산

화 방어 system의 현저한 감소가 인정되었다. 한편 이러한 염산/에탄올 투여에 의한 항산화 방어 system의 감소가 세 용량 (125, 250 및 500 mg/kg)의 황련 추출물 투여에 의해 투여 용량 의존적으로 억제되었으며, 유사한 억제효과가 rebamipide (30 mg/kg) 및 ranitidine (100 mg/kg) 투여에 의해서도 각각 인정되었다(Table 2).

Table 2. Changes on the gastric antioxidant defense systems in HCl/EtOH treated rats

Groups	Gastric contents			
	MDA (nM/g tissue)	Catalse (mM/min/g tissue)	SOD (U/g protein)	Nitrate/Nitrite (μM/g protein)
Controls				
Intact	3.31±0.20	1.62±0.31	564.33±87.70	741.79±122.39
HCl/EtOH	4.84±0.71 <sup>a</sup>	0.98±0.15 <sup>e</sup>	321.91±68.08 <sup>g</sup>	233.68±53.22 <sup>g</sup>
References				
Rebamipide	3.44±0.52 <sup>c</sup>	1.63±0.27 <sup>g</sup>	513.72±107.43 <sup>c</sup>	524.30±136.03 <sup>ac</sup>
Ranitidine	3.69±0.36 <sup>c</sup>	1.30±0.16 <sup>fd</sup>	434.38±72.38 <sup>ad</sup>	373.46±74.38 <sup>ac</sup>
CR extracts				
500 mg/kg	3.35±0.34 <sup>c</sup>	1.69±0.32 <sup>g</sup>	525.61±136.79 <sup>c</sup>	528.41±59.89 <sup>ac</sup>
250 mg/kg	3.63±0.36 <sup>c</sup>	1.30±0.06 <sup>fd</sup>	442.54±57.23 <sup>ad</sup>	371.17±55.86 <sup>ac</sup>
125 mg/kg	3.90±0.39 <sup>bc</sup>	1.17±0.10 <sup>eh</sup>	410.63±49.59 <sup>g</sup>	306.45±57.05 <sup>g</sup>

Values are expressed as mean ± S.D. of eight mice. HCl/EtOH: Hydrochloride/ethanol; CR : Coptidis Rhizoma. MDA: malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase. Rebamipide and ranitidine were treated as 30 and 100 mg/kg, respectively. a p<0.01 and b p<0.05 as compared with intact control by LSD test. c p<0.01 and d p<0.05 as compared with HCl/EtOH control by LSD test. e p<0.01 and f p<0.05 as compared with intact control by MW test. g p<0.01 and h p<0.05 as compared with HCl/EtOH control by MW test

4.조직병리학적 변화

궤양 대조군에서는 점막 탈락, 괴사 및 출혈과 같은 전형적인 출혈성 위궤양 소견이 인정되었으나, 이러한 위궤양 소견은 rebamipide, ranitidine 및 모든 황련 추출물 투여에 의해 현저히 억제되었다(Fig. 2). 또한 궤양 대조군에서는 정상 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 위점막 손상의 침습율, 궤양 주변 평균 점막 두께 및 semiquantative score의 증가가 각각 인정되었으나, 모든 투여군에서는 궤양 대조군에 비해 유의성 있는 (p<0.01) 위점막 손상의 침습율, 궤양 주변 평균 점막 두께 및 semiquantative score의 감소가 각각 인정되었다(Table 3).

Table 3. Histomorphometrical changes on the gastric mucosa in HCl/EtOH treated rats

Groups	Histomorphometrical analysis		
	Semiquantative scores (Max = 3)	Invaded % of lesions into the gastric mucosa	Mean gastric mucosa thicknesses (μm)
Controls			
Intact	0.50±0.53	4.63±3.27	1468.09±183.56
HCl/EtOH	2.75±0.46 <sup>a</sup>	85.89±11.21 <sup>g</sup>	625.70±108.56 <sup>g</sup>
References			
Rebamipide	1.88±0.64 <sup>ac</sup>	41.02±6.87 <sup>ef</sup>	960.67±124.61 <sup>ac</sup>
Ranitidine	1.13±0.35 <sup>bc</sup>	22.36±4.68 <sup>ef</sup>	1101.13±143.61 <sup>ac</sup>
CR extracts			
500 mg/kg	1.13±0.34 <sup>bc</sup>	19.41±7.07 <sup>ef</sup>	1171.28±214.95 <sup>ac</sup>
250 mg/kg	1.75±0.46 <sup>ac</sup>	34.97±10.24 <sup>ef</sup>	988.78±150.44 <sup>ac</sup>
125 mg/kg	2.00±0.53 <sup>ac</sup>	53.28±10.12 <sup>ef</sup>	834.48±159.02 <sup>ad</sup>

Values are expressed as mean ± S.D. of eight mice. HCl/EtOH: Hydrochloride/ethanol; CR : Coptidis Rhizoma. Rebamipide and ranitidine were treated as 30 and 100 mg/kg, respectively. a p<0.01 and b p<0.05 as compared with intact control by LSD test. c p<0.01 and d p<0.05 as compared with HCl/EtOH control by LSD test. e p<0.01 as compared with intact control by MW test. f p<0.01 as compared with HCl/EtOH control by MW test

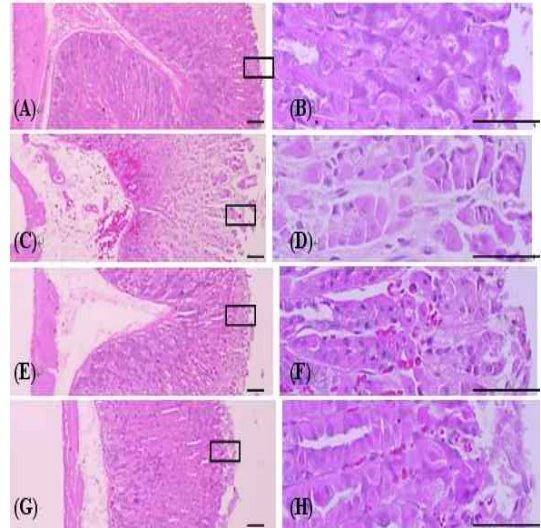


Fig. 2. Representative histopathological profiles of the gastric mucosa in the intact control (A, B), HCl/EtOH control (C, D), rebamipide 30 mg/kg (E, F), ranitidine 100 mg/kg (G, H), CR extracts 500 (I, J), 250 (K, L) and 125 (M, O) mg/kg treated mice. Note that HCl/EtOH-induced ulcerative gastric lesions were markedly inhibited by pre-treatment of rebamipide (30 mg/kg), ranitidine (100 mg/kg) and all three different dosages (500, 250 and 125 mg/kg) of CR extracts, respectively. HCl/EtOH: Hydrochloride/ethanol. CR: Coptidis Rhizoma. Square means enlarged areas: All H&E stain Scale bars = 160 μm.

고찰

위궤양은 십이지장궤양과 더불어 산과 pepsin을 포함한 위액에 노출된 부위에서 병리적 급성미란과 표재성 궤양의 병변이 형성되므로 통칭 소화성 궤양으로 불리고 있으며, 이러한 위궤양은 한의학에서 吞酸, 酸, 嘈雜에 나타나는 증상과 상관성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 본 연구에서는 전통적으로 항염증 약물로 사용되어온 황련 물 추출물의 항궤양 효과를 염산/에탄올로 유발된 마우스 위궤양 모델을 이용하여 항산화 효과와 함께 평가하였고, 그 효과를 대표적인 궤양치료제인 rebamipide (30 mg/kg) 및 ranitidine (100 mg/kg)과 비교하였다.

에탄올은 신체에서 대사되어, superoxide anion과 hydroperoxy free radicals을 생산하며, 그 결과 위점막에서는 출혈성 궤양이 초래되는 것으로 알려져 있어<sup>23)</sup>, 에탄올 유발 위궤양 실험동물 모델은 사람의 궤양성 질환에 대한 치료제 및 병인론 연구에 흔히 이용되고 있다<sup>24)</sup>. 본 연구에서는 산에 대한 노출을 강화시키기 위해, 이전의 방법들<sup>25)</sup>에 따라, 염산을 첨가한 에탄올 혼합물을 이용하여, 마우스에서 위궤양을 유발하고, 황련물 추출물을 7일간 전투여한 다음 항궤양 효과를 육안병소 면적 및 위점막의 조직병리학적 변화를 항산화 방어 system의 변화와 함께 평가한 결과, 황련 추출물 125, 250 및 500 mg/kg은 투여 용량 의존적으로 염산/에탄올로 유발된 위궤양을 현저히 억제하는 것으로 관찰되었으며, 특히 염산/에탄올에 의한 항산화 방어 system의 감소 역시 억제하는 것으로 관찰되었다. 본 실험의 결과 황련 추출물 500 mg/kg은 30 mg/kg 의 rebamipide와 유사한 효과를 나타내었으며, 황련 추출물 250 mg/kg은 ranitidine 100 mg/kg과 유사한 항궤양 효과를 나타내었다.

출혈성 궤양병소의 면적 변화는 후보 약물의 효과를 나타내는 직접적인 변화로 형성된 궤양 병소의 면적이 작을수록, 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 간주한다. 본 실험의 결과에서도 염산/에탄올 투여 시 현저한 출혈성 궤양병소의 증가가 Fig. 1에 서와 같이 유발되었으며, 정상 대조군에 비해 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 현저한 출혈성 병소의 증가가 인정되었다. 한편 이러한 육안적인 출혈성 병소가 황련 추출물 투여에 의해 용량 의존적으로 감소되었으며, 황련 추출물 500 mg/kg은 30 mg/kg 의 rebamipide와, 250 mg/kg은 ranitidine 100 mg/kg과 유사한 출혈성 병소의 감소 효과를 나타내었다. 이러한 출혈성 육안 병소의 감소는 황련 추출물의 항궤양 효과를 나타내는 직접적인 증거로 판단된다.

염산/에탄올 투여 후 조직병리학적으로 현저한 위점막의 탈락, 미란, 충혈을 동반한 전형적인 위궤양 소견이 관찰되며<sup>7</sup>, 약물 투여 후 이러한 조직병리학적 변화의 감소는 후보약물의 항궤양 효과를 보여주는 직접적인 증거로 활용되고 있다. 본 연구에서도, 육안적인 출혈성 병소와 잘 일치되어, 현저한 위점막의 탈락, 미란 및 충혈 소견이 조직병리학적으로 인정되었으나, 육안 출혈병소의 변화와 동일하게, 황련 추출물 투여에 의해 이러한 조직병리학적 궤양병소의 현저한 감소가 인정되었다.

활성산소의 형성에 의한 산화 스트레스가 에탄올에 의한 위점막손상의 병인론에 매우 중요한 위치를 차지하고 있으며, sulfhydryl compounds 및 glutathione과 같은 세포내 항산화제는 위 조직 보호에 매우 중요한 역할을 하고 있다<sup>26</sup>. 또한 에탄올은 사람의 경우, 위점막에서 glutathione과 cysteine의 감소를 초래하여, 위점막 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. 또한 에탄올 투여시 SOD와 catalase 같은 내인성 항산화제의 활성이 현저히 감소하고, 그 결과 free radical들의 축적을 초래하고, 이들 free radical들은 위점막의 손상을 유발한다<sup>28</sup>. 본 연구의 결과, Table 2와 같이, 황련 추출물은 염산/에탄올에 의한 항산화 방어 system의 억제, 즉, 지질 과산화의 증가와 SOD 및 catalase이 활성 감소를 현저히 억제하였다. 따라서 본 실험에서 인정된 황련 추출물의 항궤양 효과는 이미 잘 알려져 있는 황련 추출물의 항산화 효과에 기초하는 것으로 판단된다<sup>29</sup>. Nitric oxide (NO) 역시 위장관 점막의 방어 기전을 담당하는 대표적인 mediator 중 하나<sup>15</sup>, NO-synthase에 의해 생산되고, 위의 혈류와 미세순환을 조절하는 중요한 인자로 알려져 있다<sup>30</sup>. 현재 NO의 분비를 촉진하는 약물들은 에탄올 유발 위궤양에 유효한 효과를 나타내는 반면, NO의 분비를 억제하는 약물들은 에탄올에 대한 위점막의 감수성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며, NO는 지질과 산화를 억제하는 항산화제로서도 작용한다<sup>31</sup>. 본 연구에서도 NO의 분비량을 의미하는 위점막 nitrate/nitrite 함량<sup>15</sup>의 감소가 Table 3에서와 같이 궤양 대조군에서 인정되었으나, 황련 추출물 투여에 의해 이들 nitrate/nitrite 함량의 감소가 투여용량 의존적으로 인정되었다. 본 실험의 결과, 황련 추출물 500 mg/kg은 30 mg/kg 의 rebamipide와, 250 mg/kg은 ranitidine 100 mg/kg과 유사한 항산화 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

이상에서 황련 물 추출물의 7일간 전 투여에 의해, 염산/에

탄올로 유발된 위궤양 병소의 면적과 위점막의 조직병리학적 손상을 투여 용량 의존적으로 억제하였고, 염산/에탄올로 유발된 위궤양시 초래되는 항산화 방어 system의 변화 역시 투여 용량 의존적으로 억제하였으므로, 황련 추출물은 항산화 방어 system의 조절을 통해 위궤양의 예방에 매우 유효한 효과를 나타낼 것으로 판단된다. 염산/에탄올 유발 마우스 위궤양 모델에 대해 황련 추출물 500 mg/kg은 30 mg/kg 의 rebamipide와, 250 mg/kg은 ranitidine 100 mg/kg과 유사한 항궤양 효과를 나타내었다.

## 결론

위점막이 에탄올에 노출되면 활성산소의 증가에 의한 염증 과정의 일환으로 급성 궤양이 초래된다. 따라서 본 연구에서는 전통적으로 항염제로 사용되어온 황련 추출물의 위궤양에 대한 효과를 염산/에탄올로 유발된 마우스 위궤양 모델을 이용하여 rebamipide (30 mg/kg) 및 ranitidine (100 mg/kg)과 비교·평가하였다. 125, 250 및 500 mg/kg의 황련 추출물을 위궤양 유발 전 7일 동안 전 투여하고, 위점막의 육안병소 면적 및 조직병리학적 변화와 함께 항산화 방어 system의 변화에 기초하여 항궤양 효과를 평가한 결과, 황련 추출물은 투여 용량 의존적으로 염산/에탄올로 유발된 위궤양을 현저히 억제하는 것으로 관찰되었으며, 염산/에탄올에 의한 항산화 방어 system의 감소 역시 억제하는 것으로 관찰되었고, 황련 추출물 500 mg/kg은 30 mg/kg 의 rebamipide와, 250 mg/kg은 ranitidine 100 mg/kg과 유사한 항궤양 효과를 나타내었다. 결론적으로 황련 물 추출물은 항산화 방어 system의 조절을 통해 위궤양의 예방에 매우 유효한 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 대구한의대학교 기린연구비 지원에 의한 것임(This research was supported by a grant from Daegu Hanny University Ky-rin Fund, 2010).

## 참고문헌

1. Alqasoumi, S., Al-Sohaibani, M., Al-Howiriny, T., Al-Yahya, M., Rafatullah, S. Rocket. salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. *World J Gastroenterol* 15: 1958-1965, 2009.
2. Mizui, T., Sato, H., Hirose, F., Doteuchi, M. Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci*. 41: 755-763, 1987.
3. 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.



4. Yoshida, N., Yoshikawa, T., Iinuma, S., Arai, M., Takenaka, S., Sakamoto, K., Miyajima, T., Nakamura, Y., Yagi, N., Naito, Y., Mukai, F., Kondo, M. Rebamipide protects against activation of neutrophils by *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci.* 41: 1139-1144, 1996.
5. Grover, J.K., Adiga, G., Vats, V., Rathi, S.S. Extracts of *Benincasa hispida* prevent development of experimental ulcers. *J Ethnopharmacol.* 78: 159-164, 2001.
6. Ahmadi, A., Ebrahimzadeh, M.A., Ahmad-Ashrafi, S., Karami, M., Mahdavi, M.R., Saravi, S.S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H2 receptor antagonists. *Fundam Clin Pharmacol.* 25: 72-79, 2011.
7. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울, 영림사, pp 220-223, 2004.
8. Talhouk, R.S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouniw, Barbour, E.K. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J Med Food.* 10: 1-10, 2007.
9. Xu, J.T., wang, L.Q., Xu, B., Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Research development of *Coptis chinensis*. 26: 704-707, 2004.
10. Hahn, F.E., Ciak, J. Berberine. *Antibiotics.* 3: 577-584, 1975.
11. Akhter, M.H., Sabir, M., Bhide, N.K. Anti-inflammatory effect of berberine in rats injected locally with cholera toxin. *Indian Journal of Medical Research.* 65: 133-141, 1977.
12. Makhey, D., Gatto, B., Yu, C., Liu, A., Liu, L.F., LaVoie, E.J. Protoberberine alkaloids and related compounds as dual inhibitors of mammalian topoisomerase I and II. *Medical Chemistry Research.* pp 51-52, 1995.
13. Ishihara, T., Tanaka, K., Tashiro, S., Yoshida, K., Mizushima, T. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 79: 1622-1633, 2010.
14. 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.
15. 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 cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chem Biol Interact.* 183: 264-269, 2010.
16. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275, 1951.
17. Agar, E., Boşnak, M., Amanvermez, R., Demir, S., Ayyildiz, M., Celik, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat, *Neuroreport.* 10: 1799-1801, 1999.
18. Aebi, H. Catalase. In: Bergmeyer HU (Ed.), *Methods in Enzymatic Analysis.* New York: Academic Press Inc. pp 673-686, 1974.
19. Beauchamp, C., Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 44: 276-287, 1971.
20. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, C.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 10: 131-138, 1982.
21. 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: 4799-4805, 2009.
22. 김상찬, 이동언, 권영규. 順氣和中湯이 indomethacin으로 유발된 위궤양에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 17: 326-337, 2003.
23. Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr.* 133: 1286-1290, 2003.
24. Szabo, S., Brown, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosal lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulfhydryls. *Proc Soc Exp Biol Med.* 185: 493-497, 1987.
25. Lee, B.I., Nugroho, A., Bachri, M.S., Choi, J., Lee, K.R., Choi, J.S., Kim, W.B., Lee, K.T., Lee, J.D., Park, H.J. Anti-ulcerogenic effect and HPLC analysis of the caffeoylquinic acid-rich extract from *Ligularia stenocephala*. *Biol Pharm Bull.* 33: 493-497, 2010.
26. Terano, A., Hiraishi, H., Ota, S., Shiga, J., Sugimoto, T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in rat gastric mucosal injury induced by ethanol. *Gastroenterol Jpn.* 24: 488-493, 1989.
27. Loguercio, C., Taranto, D., Beneduce, F., del Vecchio Blanco, C., de Vincentiis, A., Nardi, G., Romano, M. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. *Gut.* 34: 161-165, 1993.
28. Saravanan, R., Rajendra Prasad, N., Pugalendi, K.V. Effect of Piper betle leaf extract on alcoholic toxicity in the rat brain. *J Med Food.* 6: 261-265, 2003.
29. Schinella, G.R., Tournier, H.A., Prieto, J.M., Mordujovich de Buschiazzo, P., Ríos, J.L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci.* 70: 1023-1033, 2002.
30. Whittle, B.J. Thirteenth Gaddum Memorial Lecture.

Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance. *Br J Pharmacol.* 110: 3-17, 1993.

31. Kawano, S., Tsuji, S. Role of mucosal blood flow: a conceptual review in gastric mucosal injury and protection. *J Gastroenterol Hepatol.* 15: D1-6, 2000.