

역류성 식도염 유발 생쥐의 半夏瀉心湯 투여 효과에 대한 실험 연구

장명웅, 임성우

동국대학교 한의과대학 일산한방병원 한방내과

Experimental Study for Effect of *Banhasasim-tang* on Mice with Reflux Esophagitis

Myeong-woong Jang, Seong-woo Lim

Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Guk University, Il-san Oriental Medicine Hospital

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to investigate the inhibitory effect of *Banhasasim-tang* on early reflux esophagitis by control of gastric peristalsis and the lower esophageal sphincter in mice.

Methods : Experimental mice were classified into three groups. The normal group were mice with no inflammation. The control group were mice with gastroesophageal reflux elicited by alcohol. The sample group were mice administered *Banhasasim-tang* after gastroesophageal reflux elicitation. We observed morphological change and production of ghrelin, substance P, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in gastroesophageal junction mucosa. In addition, we examined change of epithelial junction in esophageal mucosa and change of lower esophageal sphincter distribution.

Results : The migration of inflammation-related cells in lamina propria of gastroesophageal junction decreased more in the sample group than in the control group. The positive reaction of ghrelin, substance P, and iNOS significantly decreased more in the sample group than in the control group ($p < 0.05$). Injury of the epithelial junction in the esophageal mucosa and outer oblique layer in the lower esophageal sphincter were significantly mitigated by *Banhasasim-tang* administration in the sample group ($p < 0.05$).

Conclusions : According to the above results, it is supposed that *Banhasasim-tang* inhibits early reflux esophagitis by controlling not only gastric peristalsis and acid secretion through ghrelin, and substance P but also the lower esophageal sphincter through iNOS.

Key words : *Banhasasim-tang* (*bànxiàxièxīn-tāng*), reflux esophagitis, ghrelin, substance P, nitric oxide, lower esophageal sphincter

1. 서 론

위식도 역류질환(gastroesophageal reflux disease, GERD)은 위 내용물이 식도로 역류하여 불편한 증상을 유발하거나 이로 인하여 합병증을 유발하

는 질환으로, 이 중에서 역류에 의하여 식도에 궤양이나 미란 등의 형태학적 병변이 일어난 상태를 역류성 식도염(reflux esophagitis)이라고 칭한다. 이때 불편한 증상이란 위식도 역류와 관련된 증상들이 삶의 질에 나쁜 영향을 줄 때를 의미하며, 합병증에는 식도염으로 인한 합병증 혹은 역류에서 기인된 천식, 흡인성 폐렴과 후두염을 포함한다. 전형적인 증상은 가슴쓰림(heartburn)이나 산 역류(acid regurgitation)이며, 흉통, 만성 기침, 쉼 목소리, 천식, 목 이물감 등 비전형적 증상을 나타내기도 한다¹.

· 교신저자: 임성우 경기도 고양시 일산동구 식사동 814번지
동국대학교 한의과대학 일산한방병원 한방내과
TEL: 031-961-9043 FAX: 031-961-9049
E-mail: omdlsw@naver.com

· 이 논문은 2014년도 동국대학교 대학원 한의학과 석사학위 논문임.

발병 원인으로 하부식도조임근(lower esophageal sphincter, LES)의 이완과 낮은 압력 등에 의한다고 알려져 있으며², 치료는 생활습관의 개선, 위산 분비를 억제하기 위한 H₂ 수용체 길항제, 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor, PPI) 등의 약물요법, 외과요법 등이 있다¹. 일부 환자에서 생활 습관 개선만으로 증상이 호전되기도 하지만 대부분 위산 분비 억제 치료가 필요하며, 약물치료 중단 후에는 재발률이 높아 재발 방지를 위해 장기간 치료가 이루어진다¹.

역류성 식도염은 한의학적으로 “吞酸”, “吐酸”, “胸痺”, “噎膈” 등의 범주에 포함되며, 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆 등으로 辨證하여 각각 舒肝和胃降逆, 清化濕痰 和胃降逆, 健脾胃 降逆氣의 治法을 활용한다².

半夏瀉心湯은 《傷寒論》³에 최초로 수록되어 心下痞滿不痛, 乾嘔, 嘔吐, 腸鳴下痢를 치료하는 대표적인 處方으로 인식되어 왔으며⁴, 급·만성 위장관 카타르, 발효성 설사, 급성 위장관염 등에 많이 사용되고 있다⁵. 최근 임상 연구에서半夏瀉心湯이 기능성 소화불량증의 증상 개선에 유효한 것으로 알려져 있으며⁶, 임상에서는 기능성 소화불량증 뿐만 아니라 위식도 역류질환에도 적극적으로 활용되고 있다.

지금까지 국내에서는 실험적으로 역류성 식도염 모델에 있어 二陳湯 加味方^{7,8}, 金銀花 물 추출물⁹, 吳茱萸 물 추출물¹⁰ 등 한약의 치료 효과에 관한 몇몇 연구 보고들이 있다. 일본에서는 반복적으로 재발하는 위식도 역류질환에 六君子湯을 제시한 연구를 비롯하여 六君子湯의 약리작용에 대한 집중적인 연구들이 있으며¹¹, 중국에서도 주로 환자-대조군 연구를 통해 한약 또는 중서결합치료와 양약 간의 치료율을 비교하는 연구들이 진행되고 있다¹². 그러나 현재 역류성 식도염에 대한半夏瀉心湯의 빈번한 임상 활용에도 불구하고, 그 효능이 체계적으로 검토된 문헌은 드물며, 역류성 식도염 환자를 대상으로 한 국내 임상 연구 또한 아직까

지 보고되지 않았다.

알코올은 하부식도조임근압을 감소시켜 위식도 역류를 조장하고, 원위부 식도의 꿈틀운동을 억제하여 식도 청소능을 감소시키며, 또한 위산 분비를 증가시켜 역류성 식도염을 잘 일으키는 것으로 알려져 있는데^{13,14}, 실험적으로 알코올 유도 역류성 식도염 모델에 대한 연구도 이루어지지 않았다.

半夏瀉心湯을 투여함으로써 위꿈틀운동, 위산 분비, 하부식도조임근의 조절에 관여한다고 밝혀진 인자들의 변화와 더불어 위식도 연결부, 식도의 조직학적 변화를 확인하는 것은 역류성 식도염에 대한 효과를 입증하는 실험적 근거를 마련할 수 있을 것이다.

이에 저자는 알코올 처리를 통해 초기 역류성 식도염이 유발된 생쥐를 대상으로半夏瀉心湯의 효과를 규명하기 위해 위식도 연결부에서의 ghrelin, substance P, 그리고 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 생성과 식도 점막상피 이음(junction), 하부식도조임근 분포 등의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험 동물

오리엔트(한국)에서 분양받은 태령 6주 된 ICR 수컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 30 g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 알코올을 투여하지 않은 건강한 군(정상군), 알코올 투여 후 역류성 식도염을 유발한 군(대조군), 그리고 역류성 식도염 유도 후半夏瀉心湯 추출액을 투여한 군(실험군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

2)半夏瀉心湯의 제조

동국대학교 한방병원 원내 處方集에 근거하여 Table 1의 조성으로 준비된半夏瀉心湯(*Banhasasintang*, BT) 2첩을 각각 증류수 1000 ml에 넣고 2

시간 동안 전탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50 ml으로 감압·농축하였다.

본 실험에 사용된 약제는 동국대학교 일산한방병원에서 구입하여 정선한 것이다. 處方 내용과 1첩 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition and Amount of *Banhasasim-tang*.

Herb	Scientific name	Amount (g)
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	12
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	6
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	6
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	6
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	6
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	2
Total amount		44

2. 실험 방법

1) 역류성 식도염 유발

역류성 식도염을 유발하기 위해 0.9% NaCl이 포함된 50% ethyl alcohol(Sigma, USA)을 10 ml/kg/day씩 5일 동안 대조군과 실험군에 구강 투여하였다.

2)半夏瀉心湯 투여

半夏瀉心湯을 실험군에 알코올 투여 후 3일 동안 2.5 ml/kg/day 용량으로 구강 투여하였다.

3) 조직포본 제작

半夏瀉心湯 처리 3일 후 sodium pentobarbital 용액으로 마취한 후 vascular rinse와 10% 중성 포르말린 용액(neutral buffered formalin, NBF)으로 심장관류 고정을 실시하였다. 위 들문(cardiac part)과 하부식도(lower esophagus)가 포함된 위식도 연결부(gastroesophageal junction, GEJ)를 적출한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속 절편으로 제작되었다. 일반적인 형태 변화를 관찰하기 위해 연속 절편을

hematoxylin과 eosin에 염색한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 위식도 연결부 내 위꿈틀운동 인자 변화 관찰

(1) Ghrelin 생성 변화 관찰

위꿈틀운동과 위산 분비에 관여하는 호르몬인 ghrelin의 분포 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 proteinase K(20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal rabbit serum(DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti Ghrelin(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG(1:200, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex(ABC) kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충 용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하였다.

(2) Substance P 생성 변화 관찰

위꿈틀운동에 관여하는 신경 펩티드인 substance P의 점막고유층(lamina propria) 내 분포를 조사하기 위해 goat anti-mouse substance P(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

(3) iNOS 생성 변화 관찰

하부식도조임근의 이완에 관여하는 NO(nitric oxide) 분비 효소인 iNOS의 점막고유층 내 분포를 조사하기 위해 mouse anti-mouse iNOS(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

5) 식도 변화 관찰

(1) 식도 점막상피의 이음 변화 관찰

점막상피 첨단부(apical surface) 내의 세포 사이 이음 변화를 관찰하기 위해 phloxine-tartrazine 염

색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액에 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 하부식도조임근의 분포 변화 관찰

위식도 연결부 내 하부식도조임근의 분포 변화를 조사하기 위해 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색법을 실시하였다. 우선 Weigert's iron hematoxylin에서 20분 동안 핵 염색한 다음 Van Gieson's 염색 용액에서 5분간 평활근에 대한 염색을 실시하였다.

한편 하부식도조임근 내 바깥비스듬층(outer oblique layer)의 변화를 조사하기 위해 mouse anti mouse β -actin(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)을 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

6) 영상 분석과 통계 처리

면역조직화학적 염색 결과의 수치화를 위해 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)를 이용한 영상 분석(image analysis)을 실시하였고, 분석 결과는 Sigma Plot 2000(Sigma)로 통계 처리하였다. 한편 본 실험의 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA) test(SPSS ver. 17.0, SPSS, USA)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 위식도 연결부 변화

1) 일반적 형태

알코올을 투여한 대조군의 위식도 연결부 내 점막고유층에서는 염증 관여 세포의 이주(migration)가 증가한 반면, 半夏瀉心湯을 처리한 실험군에는 대조군에 비해 염증 관여 세포의 이주 감소가 관찰되었다. 한편, 식도 입구의 직경은 실험군이 대조군에 비해 짧았다(Fig. 1).

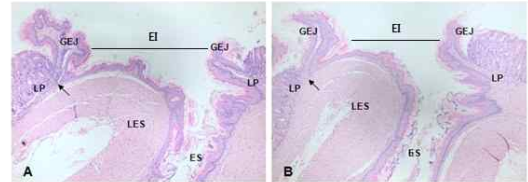


Fig. 1. The mitigative effect of alcohol-induced damage of gastroesophageal junction by BT.

A : The migration of inflammation-related cells (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse.

B : The migration of inflammation-related cells (arrow) were noticeably decreased in lamina propria of mouse treated with BT than only alcohol treated mouse and diameter of esophageal inlet was shorter. (H & E, x40)

BT : *Banhasasim-tang*, GEJ : gastroesophageal junction, LP : lamina propria, LES : lower esophageal sphincter, ES : esophagus, EI : esophageal inlet

2) Ghrelin 생성 감소

알코올 처리 후 위꿈틀운동과 위산 분비의 증가에 관여하는 ghrelin 양성반응 세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응 세포의 세포질에서 강하게 양성반응을 보였다. 대조군은 정상군에 비해 ghrelin 양성반응이 524% 증가하였다. 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 ghrelin 양성반응이 69% 감소하였다(Table 2, Fig. 2).

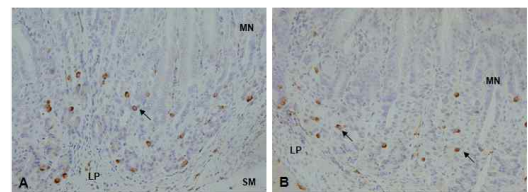


Fig. 2. The regulation effect of ghrelin production by BT.

A : The ghrelin positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse.

B : The ghrelin positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria of mouse treated with BT than only alcohol treated mouse. (Ghrelin immunohistochemistry, x200)

BT : *Banhasasim-tang*, MN : mucosa neck, SM : submucosa, LP : lamina propria

3) Substance P 생성 감소

알코올 처리 후 위꿈틀운동의 증가에 관여하는 신경 펩티드인 substance P 양성반응 세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응 세포의 세포질 가장자리에서 강하게 양성반응을 보였다. 대조군은 정상군에 비해 substance P 양성반응이 351% 증가하였다. 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 substance P 양성반응이 56% 감소하였다 (Table 2, Fig. 3).

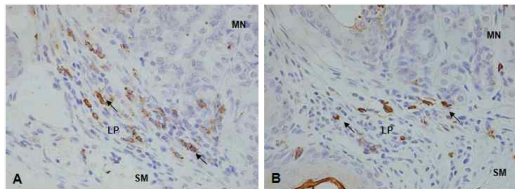


Fig. 3. The regulation effect of substance P production by BT.

A : The substance P positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse.
 B : The substance P positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria of mouse treated with BT than only alcohol treated mouse. (Substance P immunohistochemistry, x200)
 BT : *Banhasasim-tang*. MN : mucose neck, SM : submucosa, LP : lamina propria

4) iNOS 생성 감소

알코올 처리 후 NO 분비 효소인 iNOS 양성반응 세포의 분포는 점막고유층에 증가하였으며, 양성반응 세포의 세포질 가장자리에서 강하게 양성반응을 보였다. 대조군은 정상군에 비해 iNOS 양성반응이 1169% 증가하였다. 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 iNOS 양성반응이 77% 감소하였다 (Table 2, Fig. 4).

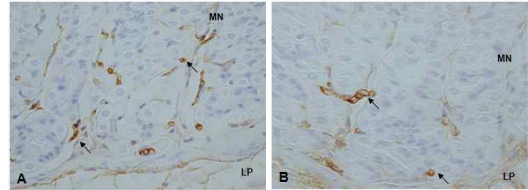


Fig. 4. The regulation effect of iNOS production by BT.

A : The iNOS positive reaction (arrow) were increased in lamina propria of only alcohol treated mouse.
 B : The iNOS positive reaction (arrow) were significantly decreased in lamina propria of mouse treated with BT than only alcohol treated mouse. (iNOS immunohistochemistry, x200)
 iNOS : inducible nitric oxide synthase, BT : *Banhasasim-tang*. MN : mucose neck, LP : lamina propria

Table 2. The Image Analysis for Regulation of Gastric Motility and LES Relaxation by BT.

Objective	Group		
	NOR	CON	SAM
Ghrelin	9925±514	61968±897	19147±856*
Substance P	9386±633	42369±882	18498±696*
iNOS	5315±160	67474±613	15579±897*

image analysis for 10,000,000 particles/range of intensity : 80~100

LES : lower esophageal sphincter, BT : *Banhasasim-tang*, iNOS : inducible nitric oxide synthase, NOR : no treated mouse, CON : gastroesophageal reflux evoked mouse, SAM : *Banhasasim-tang* treated mouse with gastroesophageal reflux

* : $p < 0.05$ compared with CON

2. 식도 변화

1) 점막상피의 이음 유지

알코올을 투여한 대조군의 식도 점막상피의 첨단부에서 점막세포 사이 이음이 손상되어 세포 사이 간극을 확인할 수 있었다. 이에 반해 半夏瀉心湯을 처리한 실험군에는 점막세포 사이 이음 손상을 관찰할 수 없었다 (Fig. 5).

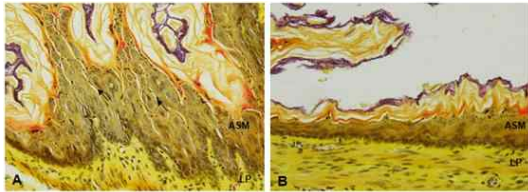


Fig. 5. The mitigative effect of alcohol-induced damage of esophageal mucosa by BT.

A : The intercellular space of mucosa cell (arrow) were cracked in apical surface of alcohol treated mouse.
 B : The intercellular space of mucosa cell were disappeared in mouse treated with BT.
 (Phloxine-tartrazine, x400)
 BT : *Banhasasim-tang*. ASM : apical surface of mucosa, LP : lamina propria

2) 하부식도조임근의 분포 회복

알코올을 투여한 대조군의 하부식도조임근 중 속돌림층(inner circular layer)에 비해 바깥비스듬층이 얇아졌는데(Fig. 6A), 실험군은 대조군에 비해 바깥비스듬층이 두꺼운 것으로 관찰되었다(Fig. 6B).

한편, 하부식도조임근 중 바깥비스듬층에서 강한 양성반응을 보이는 β-actin이 알코올 투여 후 감소하였는데, 대조군은 정상군에 비해 β-actin 양성반응이 78% 감소하였다. 이에 반해 실험군에서는 대조군에 비해 β-actin 양성반응이 235% 증가하였다(Table 3, Fig. 6C, 6D).

Table 3. The Image Analysis for Change of LES Distribution by BT.

Objective	Group		
	NOR	CON	SAM
β-actin	15776±787	3443±146	11536±622*

image analysis for 10,000,000 particles/range of intensity : 80~100

LES : lower esophageal sphincter, BT : *Banhasasim-tang*, NOR : no treated mouse, CON : gastroesophageal reflux evoked mouse, SAM : *Banhasasim-tang* treated mouse with gastroesophageal reflux

* : $p < 0.05$ compared with CON

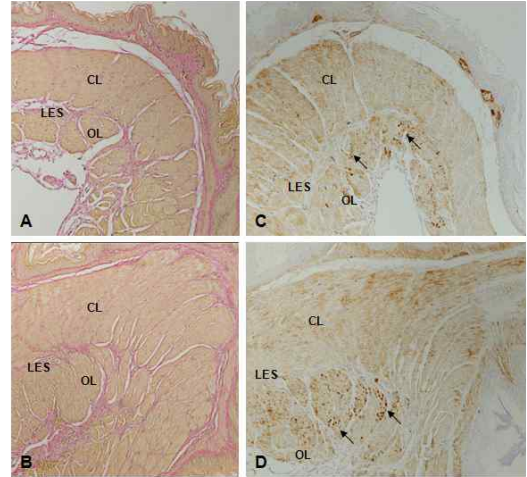


Fig. 6. The repair effect of lower esophageal sphincter by BT.

A : The outer oblique layer of lower esophageal sphincter were diminished in only alcohol treated mouse.
 B : The outer oblique layer of lower esophageal sphincter were enlarged in mouse treated with BT than only alcohol treated mouse.
 (Van Gieson's picric acid-fuchsin, x100)
 C : The β-actin positive reaction (arrow) were decreased in outer oblique layer of only alcohol treated mouse.
 D : The β-actin positive reaction (arrow) were significantly increased in outer oblique layer of mouse treated with BT than only alcohol treated mouse. (β-actin immunohistochemistry, x100)
 BT : *Banhasasim-tang*, LES : lower esophageal sphincter, CL : inner circular layer, OL : outer oblique layer

IV. 고찰

위식도 역류질환은 위 내용물이 식도로 역류되어 특징적인 가슴쓰림이나 산 역류를 나타내는 질환으로, 과거에는 내시경 검사, pH 감시, Bernstein 검사 등의 객관적 방법으로 진단하였다¹. 그러나 최근 Montreal 정의 및 분류에서는 위 내용물의 역류로 인한 증상과 합병증을 포괄하는 정의로 더욱 확장되었다¹.

최근 서구화된 식생활과 보건위생 향상에 따라 국내에서 이 질환은 급격하게 증가하고 있다. 조사하는 방법에 따라 차이가 있지만, 검진 수신자 연구에서 주 1회 이상 증상을 기준으로 한 유병률은 1998년 3.4%에서 2003년 13.2%, 2005년 이후 5~29.2%의 분포를 보여 흔한 소화기 질환 중의 하나로 인정되고 있다¹⁵.

위식도 역류질환 중 위산이나 펩신의 역류에 의하여 식도에 궤양이나 미란 등 식도 상피의 형태학적 병변이 일어난 상태를 역류성 식도염이라고 칭하는데, 속쓰림과 상복부 통증 등 다양한 임상 증상과 점막의 변화를 가져온다¹.

위식도 역류 방지 기전을 파괴시키는 중요한 원인으로서는 해부학적 결손 없이 수시로 일어나는 하부식도조임근의 일시적인 이완 현상(transient lower esophageal sphincter relaxations, tLESR), 열공 헤르니아(hiatal hernia) 같은 해부학적 결손, 하부식도조임근의 낮은 압력 등이 있으며, 이외에도 하부식도조임근의 짧은 길이나 미성숙, 중력과 연동운동에 의한 식도 체부의 청소 기능의 감소, 위 배출 시간의 지연 등이 있다. 이 중 하부식도조임근의 기능 저하가 가장 중요한 원인으로, 하부식도조임근은 횡격막(crural diaphragm)과 함께 주요 항역류 장벽을 구성하는데, 삼킴 없이도 자발적으로 하부식도조임근의 압력이 하강하여 열리는 일과성 하부식도조임근 이완이 위식도 역류의 주요 기전으로 받아들여지고 있는 것이다².

역류성 식도염의 치료 목적은 증상을 완화시키고 식도 점막의 손상을 치유하며, 협착, Barrett 식도 및 식도선암 등의 합병증을 예방하는 것으로, 이는 역류 물질의 양과 산도를 줄이고, 역류 물질이 식도 점막에 접촉하는 시간을 최소화함으로써 달성될 수 있다. 이를 위해서는 일과성 하부식도조임근 이완과 같은 병태생리를 교정해 주는 것이 중요하지만 아직까지 만족스러운 방법이 없는 상태로, 현재 가장 많이 사용되는 방법은 H₂ 수용체 길항제나 양성자 펌프 억제제를 통해 위산의 분비

를 억제하여 증상을 없애고 식도 점막 손상을 치유하는 것이다¹. 양성자 펌프 억제제는 H₂ 수용체 길항제보다 우수하여 역류성 식도염의 일차 치료제로 사용되고 있지만¹, 장기간 유지요법에 따른 골절, 폐렴, 장관 내 감염의 위험도 증가, clopidogrel과 같은 약제들과의 상호작용에 대한 우려가 있다. 또한, 미란성 식도염, Barrett 식도와 같은 심각한 위식도 역류질환 환자에게는 고용량이 필요하고, 일부 비미란성 위식도 역류질환 환자에서 치료에 불응성인 지속적 증상 호소가 있을 수 있으므로, 다른 대안적 치료법이 필요한 실정이다¹⁶.

한의학적으로는 나타나는 증상에 근거하여 “吞酸”, “吐酸”, “胸痺”, “噎膈” 등의 病證에서 그 유사성을 찾을 수 있다. 辨證은 크게 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆의 3가지로 분류되어 각각 舒肝和胃降逆, 清化濕痰 和胃降逆, 健脾胃 降逆氣의 治法을 통해 四逆散 合 小半夏湯 加減, 溫膽湯 加味, 香砂六君子湯 合 旋覆代赭湯 加減 등을 사용한다². 일본에서는 주로 六君子湯에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있는데, 六君子湯이 식도의 청소능과 운동능, 그리고 위산이나 담즙산에 대한 과민성을 개선시키는 등의 약리작용을 가지므로 위식도 역류질환의 치료에 유용하다고 밝혔다¹¹. 현재 양성자 펌프 억제제에 불응성인 위식도 역류질환(PPI-refractory GERD)에는 표준 용량 두 배의 양성자 펌프 억제제 장기간 유지요법이 권고되고 있는데, 일본에서 이들을 대상으로 한 최근의 무작위 비교 연구에서 표준 용량의 양성자 펌프 억제제와 六君子湯의 병용요법이 표준 용량 두 배의 양성자 펌프 억제제와 유사한 임상적 효과를 보였다고 발표한 바 있다¹¹. 중국에서는 이미 역류성 식도염에 대해 증례 보고, 문헌 고찰, 환자-대조군 연구 등 다양한 연구가 진행되고 있는데, 많은 환자-대조군 연구들에서 한약이 양약과 효과가 비슷하거나 높게 측정되었으며, 중서결합치료와 비교하였을 때는 중서결합치료가 한약보다 치료율이 높거나 같다는 결과를 보였다¹². 최 등¹²은 이러한 중국 논문들을

중심으로 역류성 식도염에 대한 최신 치료 경향의 분석에서 초기 病證인 肝胃不和를 가장 중요한 辨證으로 판단하였으며, 左金丸 加減, 旋覆代赭湯 加減, 半夏瀉心湯 加減, 四逆湯 加減, 降逆湯 加減 등을 사용할 수 있다고 제시하였다. 즉, 주로 肝胃不和의 관점에서 憂愁, 思慮, 悲哀 등의 정신적 요인에 의한 脾胃 손상으로 보아 치료를 하며, 이의 대표적인 處方에 半夏瀉心湯이 속한다.

《傷寒論》³에 최초로 수록된 半夏瀉心湯은 半夏를 君藥으로 乾薑, 黃芩, 人蔘, 黃連, 甘草, 大棗의 약물로 구성되어 있다. 味甘性溫한 人蔘, 甘草, 大棗는 滋補하는 약물로 脾胃에 歸經하여 中氣를 補益하고, 乾薑은 辛溫하여 溫中祛寒하며, 半夏의 辛味와 苦味는 痞滿을 제거하여 嘔逆을 멈추고, 소량의 黃連과 黃芩은 苦寒한 性味로 挾雜된 胃熱을 삭히고 燥濕시키므로, 임상적으로 心下痞로 인한 胃脘痛, 惡心과 속쓰림, 嘔逆, 嘔吐 등에 응용할 수 있다⁴.

半夏瀉心湯이 위장관에 미치는 영향에 대한 국내 연구에서도 위액 분비 및 총산도 억제¹⁷, 항케양¹⁸, 위 배출능 증가 및 위 운동능 촉진 효능¹⁹, doxorubicin에 의해 유발된 毒性에 대한 효과²⁰가 있음이 알려져 있다. 몇몇 임상 연구들에서 半夏瀉心湯이 기능성 소화불량증의 증상 개선에 유효하다고 보고하였는데⁶, 이미 임상에서 半夏瀉心湯은 기능성 소화불량증을 비롯한 위식도 역류질환, 과민성 대장증후군과 같은 소화기의 기능성 질환과 위장관염 등에 폭넓게 활용되고 있다. 그러나 앞서 밝혀진 半夏瀉心湯의 약리작용이 역류성 식도염에 半夏瀉心湯이 왜 효과적인지 그 상세한 기전을 설명해주기에는 아직 부족하며, 체계적인 임상 연구도 아직까지 보고되지 않아 임상적인 증거를 제시하는 데에도 불충분함이 있다.

지금까지 동물 모델을 이용한 역류성 식도염의 실험 연구에서는 흰쥐의 유문(pylorus) 및 전위(forestomach) 부위 결찰 수술을 통해 내인성 산을 역류시키는 방법²¹과 고양이의 식도에 외인성 염산

을 3~4일간 관류시키는 방법²²이 다용되고 있다. 알코올은 하부식도조임근의 압력과 식도의 운동능, 청소능을 감소시켜 위식도 역류를 잘 유발하고^{13,14}, 20% 이상의 농도에서는 식도 점막의 심한 손상이 발생하므로, 알코올 투여도 동물 모델에서 식도염의 효율적인 유도에 널리 사용된다²³. 기존 한의학계의 실험 연구들에서는 결찰 수술로 유발된 역류성 식도염 모델을 이용하였는데, 二陳湯 加味方을 투여한 실험에서 황 등⁷은 위액 분비 측면에서 역류성 식도염에 효과적임을 입증하였고, 박 등⁸은 항산화 효과에 의한 역류성 식도염 억제제를 보고하였다. 이 등⁹과 김 등¹⁰은 각각 金銀花 물 추출물과 吳茱萸 물 추출물이 효과가 있음을 보고하였다.

그러나 역류성 식도염의 높은 유병률에 비해 국내에서는 이의 한의학적 치료에 관한 연구가 소수에 불과하고, 아직까지 알코올 유도 역류성 식도염 모델을 이용하여 半夏瀉心湯의 효과에 대해 면역조직화학적 방법으로 관찰한 국내 실험 연구는 보고된 바가 없다. 또한 앞서 보고된 연구들은 주로 위액 분비 억제, 위식도 점막 보호, 항산화, 항염증 효과 측면에서 역류성 식도염에 대한 處方 및 本草의 효과를 살폈을 뿐, 위식도 역류 발생의 주요 기전인 하부식도조임근 이완에 대한 억제 효과를 관찰한 실험은 없었다.

이에 저자는 半夏瀉心湯의 알코올로 유발된 역류성 식도염에 대한 치료 효과를 규명하기 위하여 생쥐를 대상으로 아무 처치도 받지 않은 정상군과 알코올을 구강 투여하여 역류성 식도염을 유발한 군(대조군), 역류성 식도염 유발 후 半夏瀉心湯 추출액을 투여한 군(실험군)으로 나누어, 위식도 연결부의 형태학적 변화와 더불어 위궤물운동, 위산 분비, 하부식도조임근의 조절에 관여하는 ghrelin, substance P, iNOS의 생성 변화를 관찰하였고, 식도 점막상피의 이음 변화, 하부식도조임근의 분포 변화를 관찰하였다.

역류성 식도염의 조직병리학적 소견은 국소 궤양, 염증세포 침윤, 출혈, 점막의 국소적 탈락과 함

게 점막하 조직층의 부종성 변화가 주 특징이다²⁴. 본 연구 결과에서도 위식도 연결부의 점막고유층을 조직학적 염색으로 관찰하였을 때, 대조군의 경우 염증 관여 세포의 이주가 증가한 형태를 나타내고 있었다. 그러나 半夏瀉心湯 추출액을 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 염증 관여 세포의 이주 감소로 염증이 완화되었으며 고유의 형태로 회복되고 있었으므로, 추출액에 의해 조직의 형태적 변화가 억제됨을 알 수 있다. 한편, 대조군에 비해 실험군에서 식도 입구의 직경이 좁아진 소견을 보였는데, 半夏瀉心湯 투여가 하부식도조임근의 이완을 억제하여 위 내용물이 위에서 식도로 통하는 내강을 좁힘으로써 항역류 환경을 마련해주는 것으로 보인다.

위꿈틀운동, 위산 분비, 하부식도조임근의 조절에 관여하는 인자들의 변화를 확인함으로써 半夏瀉心湯이 역류성 식도염의 발병 억제에 효과적인 근거를 구체적으로 검증하고자 면역조직화학적 방법을 이용하여 위식도 연결부에서의 ghrelin, substance P, iNOS 생성 변화를 관찰하였다.

Ghrelin은 성장호르몬(growth hormone)의 분비를 강력하게 자극하는 최근에 발견된 생리적 펩티드 호르몬으로, 위장의 기저부에 위치한 위저선(oxyntic gland)의 점막하층에 존재하는 X/A-like cell에서 대부분 합성된다²⁵. 위 기능과 연관해서는 위꿈틀운동을 증가시키고 위산 분비를 촉진하지만, 아직 명확한 기전은 밝혀지지 않았다²⁶. Ghrelin이 위장에 많이 분포한다는 사실은 ghrelin의 질병 연관이 아직은 뚜렷하게 밝혀져 있지 않지만, 각종 위장 질환의 중요한 병태생리에 직간접적으로 관여하고, 치료를 위한 중요한 단서를 제공해 줄 수 있음을 의미한다²⁷.

본 연구에서 알코올 처리 후 대조군은 위식도 연결부의 점막고유층에서 ghrelin 양성반응 세포가 정상군에 비해 524% 증가하였다. 이에 반해 半夏瀉心湯 추출액을 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 ghrelin 양성반응이 69% 감소하였다. 半夏瀉

心湯 추출액 투여가 위 점막의 ghrelin을 감소시킴으로써 알코올과 같은 유해자극으로 인해 비정상적으로 항진된 위꿈틀운동을 다시 정상화시키고 위산 분비 억제에 영향을 끼치는 것으로 보인다. 이 등¹⁹은 半夏瀉心湯이 미주신경(vagus nerve)을 포함한 cholinergic pathway의 흥분을 통한 간접적인 작용에 의해 위 배출을 촉진시킨다고 하여 위꿈틀운동에 대한 상반된 연구 결과를 보고하였다. 최근의 여러 연구에 의하면 위장관에 작용하는 많은 물질들이 보고되었으며 ghrelin이 위 운동에 영향을 미치는 기전이 명확히 밝혀지지 않았기에, 향후 추가적인 약리작용 연구를 통해 半夏瀉心湯이 ghrelin을 매개로 위장관에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 위산은 역류성 식도염의 중요한 유발인자 중 하나로, 본 실험에서는 위산 분비도 및 pH 등을 직접 측정하지 않았지만, 半夏瀉心湯이 ghrelin의 증가에 의한 위산 분비 항진을 억제함으로써 역류성 식도염에 효과를 나타낼 것으로 추측된다.

Tachykinin류는 짧은 신경성 펩티드류로서 carboxyl terminal에 공통의 아미노산 서열을 가지며, 주로 평활근의 수축을 위주로 한 생물학적 활성을 갖는다. 대표적인 종류로 substance P, neurokinin-A(NKA), neurokinin-B(NKB) 등이 있다. 그 중 substance P는 neurokinin(NK)1 수용체에 작용하며, 장관에서는 근육층, 근육 신경층, 점막하 신경층과 점막에서 발견된다. 장관의 콜린성 운동신경에서 합성되며, 아세틸콜린(acetylcholine)과 NK2 수용체에 작용하는 NKA와 더불어 장관에서는 흥분성 신경전달물질로 알려져 있다²⁸. 따라서 substance P의 감소는 흥분성 신경 활동도를 저하시켜 위장관 운동을 감소시킨다.

본 연구에서 알코올 처리 후 대조군은 위식도 연결부의 점막고유층에서 substance P 양성반응 세포가 정상군에 비해 351% 증가하였다. 이에 반해 半夏瀉心湯 추출액을 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 substance P 양성반응이 56% 감소하

여, 半夏瀉心湯 투여에 의한 위 점막 내 substance P의 감소도 항진된 위꿈틀운동의 안정화에 영향을 끼칠 것으로 사료된다. 한편 김 등²⁹은 substance P를 흰쥐에 정맥 주사한 후에 위산의 분비가 유의하게 증가되었다고 보고하였다. 본 실험에서 半夏瀉心湯에 의한 substance P의 감소가 위산 분비 억제에도 관여할 것으로 기대할 수 있는데, substance P와 위산 분비의 관계에 대한 더 많은 실험적 뒷받침이 필요할 것으로 보인다.

식도의 연동운동은 중추신경과 밀초신경의 지배를 받는데, 아세틸콜린은 대표적인 흥분성 신경전달물질이고, 산화질소(NO)는 위장관 내에서 비아드레날린성, 비콜린성 신경섬유로부터 분비되는 중요한 억제성 신경전달물질이다. 비아드레날린성, 비콜린성 신경 자극에 의해 근신경총 신경세포 내의 산화질소 합성효소(NOS)에서 NO가 분비되면 guanylate cyclase가 활성화되고 세포 내 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)가 증가되면서 위장관 내 평활근이 이완된다. 이는 식도와 하부식도조임근에 풍부하게 존재하면서 하부식도조임근의 이완에 작용하고, 하부식도조임근 압을 감소시키며, 식도 체부의 수축력을 감소시키는 것으로 알려져 있다³⁰.

본 연구에서 알코올 처리 후 대조군은 위식도 연결부의 점막고유층에서 iNOS 양성반응 세포가 정상군에 비해 1169% 증가하였다. 반면에 半夏瀉心湯 추출액을 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 iNOS 양성반응이 77% 감소하였다. 이를 통해 半夏瀉心湯이 NO 합성을 억제함으로써 위식도 역류의 가장 중요한 원인인 하부식도조임근 이완의 빈도를 감소를 감소시키며, 따라서 역류성 식도염의 발병을 억제할 수 있을 것으로 보인다.

식도 점막의 저항력은 상피세포의 통합성(integrity)이 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데, 위식도 역류질환자의 식도 상피세포 조직을 채취하여 전자현미경으로 관찰한 결과 세포 사이 간격이 확장된 소견이 발견되었다³¹. 상피세포 간극의 확장은 전자현미경 상에서 상피세포 간격이 0.47~2.4 μm

이상인 경우로, 광학현미경 상에는 불규칙한 세포 간격, 세포막의 불균일한 분리와 세포간 접촉반(desmosome)의 이완과 탈락이 관찰되는데, 역류질환에서 식도 점막의 초기 손상을 증명하는 기준이 된다³².

본 연구에서도 초기 역류성 식도염 유발 모델에서의 식도 점막 손상 소견을 확인하기 위해 광학현미경으로 식도 점막상피 침단부 내의 상피세포 사이 이음 변화를 관찰하였다. 또한 평활근으로 이루어진 하부식도조임근의 손상 소견을 확인하기 위하여 Van Gieson's picric acid-fuchsin 염색과 β-actin 면역조직화학적 염색을 통해 바깥비스듬층과 속돌림층의 분포 변화를 관찰하였다. 알코올만 투여한 대조군의 경우 점막 상피세포 사이 이음이 손상되어 간극을 나타내고 있었고, 평활근 중 바깥비스듬층이 손상되어 얇아졌으며, β-actin 양성반응도 정상군에 비해 78% 감소된 소견을 보였다. 이에 반해 실험군에서는 半夏瀉心湯 투여로 인해 이음 손상이 완전히 회복되었음을 확인할 수 있었고, 대조군에 비해 바깥비스듬층도 다시 두꺼워지고 β-actin 양성반응이 235% 증가하여 평활근의 손상이 회복되고 있음을 알 수 있다. 이를 통해 半夏瀉心湯은 초기 역류성 식도염 발병에서의 식도 점막과 하부식도조임근의 손상을 회복시키는 효과가 있음을 확인하였다.

이상의 실험 결과에서 半夏瀉心湯은 알코올에 의해 실험적으로 유발된 초기 역류성 식도염에 대해서 위식도 연결부 점막의 염증을 완화시키고, 식도 점막과 하부식도조임근의 손상을 치료하는 효과가 있었다. 그 기전은 半夏瀉心湯이 위식도 연결부 점막 내의 ghrelin, substance P를 감소시켜 위꿈틀운동의 조절과 위산 분비의 억제에 관여하고, NO 합성을 감소시켜 하부식도조임근의 수축 조절에 영향을 미치기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 역류성 식도염을 비롯한 위식도 역류와 관련된 소화기 질환에서 半夏瀉心湯 활용을 적극적으로 고려할 수 있을 것으로 기대하는 바이다. 향후에도

위장관에 작용하는 여러 호르몬, 신경전달물질 등 인자들 간의 상호관계와 소화기계 기능에 영향을 미치는 명확한 기전을 밝히는 기초 실험 연구를 통해 半夏瀉心湯이 위꿈뜰운동, 위산 분비와 하부 식도조임근 수축·이완 등의 조절에 어떻게 관여하는지 구체적으로 규명하는 연구가 필요하리라 본다. 나아가 半夏瀉心湯의 농도별 효과의 차이나 현재 표준 치료법으로 제시된 양성자 펌프 억제제와 같은 양성 대조군의 비교 연구, 역류성 식도염 환자를 대상으로 한 임상 연구 등을 통해 그동안 이미 임상 경험에서 半夏瀉心湯이 역류성 식도염에 대해 가졌던 유효성의 객관적인 근거를 확고히 마련해야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

半夏瀉心湯의 역류성 식도염에 대한 억제 효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 알코올 처리를 통해 초기 역류성 식도염이 유발된 생쥐에 半夏瀉心湯 처리 후 위식도 연결부 점막에서의 형태학적 변화, ghrelin, substance P, iNOS 생성과 식도 점막상피의 이음 변화, 하부식도조임근의 분포 변화를 관찰하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 위식도 연결부 내의 점막고유층에서 실험군은 대조군에 비해 염증 관여 세포의 이주가 감소하였다.
2. 위식도 연결부 내의 점막고유층에서 실험군은 대조군에 비해 위꿈뜰운동 및 위산 분비를 촉진하는 ghrelin의 생성이 유의성 있게 감소하였다.
3. 위식도 연결부 내의 점막고유층에서 실험군은 대조군에 비해 위꿈뜰운동을 촉진하는 substance P의 생성이 유의성 있게 감소하였다.
4. 위식도 연결부 내의 점막고유층에서 실험군은 대조군에 비해 하부식도조임근의 이완에 관여하는 NO 분비 효소인 iNOS의 생성이 유의성 있게 감소하였다.

5. 식도 점막상피 침단부에서 실험군은 대조군에 비해 점막 상피세포 사이의 이음 손상이 회복되었다.
6. 하부식도조임근에서 실험군은 대조군에 비해 바깥비스듬층의 손상이 유의성 있게 회복되었다.

이상의 결과로 半夏瀉心湯은 ghrelin, substance P의 감소를 통한 위꿈뜰운동 조절 및 위산 분비 억제와 iNOS의 감소를 통한 하부식도조임근 수축 조절을 함으로써 초기 역류성 식도염 유발을 억제하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Jeon SW, Cho YK, Lee KJ, et al. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. *Korean J Gastroenterol* 2012;60(4):195-218.
2. 진국한의과대학 비계내과학교실. 脾胃內科學. 서울: 군자출판사; 2008, p. 314-8.
3. 張仲景. 傷寒論. 서울: 대성문화사; 1993, p. 112-3, 116-7.
4. 한의과대학 방제학교수 共編著. 方劑學. 서울: 영림사; 2006, p. 162-3.
5. Naito T, Itoh H, Yasunaga F, Takeyama M. Hange-shashin-to raises levels of somatostatin, motilin, and gastrin in the plasma of healthy subjects. *Biol Pharm Bull* 2002;25(3):327-31.
6. Park JW, Ko SJ, Han GJ, Yeo IK, Ryu BH, Kim JS. The effects of banha-sasim-tang on dyspeptic symptoms and gastric motility in cases of functional dyspepsia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, and two-center trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:265035.
7. 황지영, 김대준, 변준석. 역류성 식도염에 대한 二陳湯加味方 효과 연구. 동의생리병리학회지

- 2009;23(5):1073-9.
8. 박경, 광민아, 김대준, 변준석. 二陳湯加味方の 항산화 효과를 통한 역류성 식도염 억제 효과. 동의생리병리학회지 2010;24(3):416-25.
 9. 이영준, 박지하, 노성수. 역류성 식도염 랫트에 미치는 金銀花 물 추출물의 치료 효과. 동의생리병리학회지 2010;24(6):970-5.
 10. 김대준, 노성수, 吳茱萸 물 추출물이 급성 역류성 식도염에 미치는 효과. 대한본초학회지 2012;27(1):51-8.
 11. Tominaga K, Arakawa T. Kampo medicines for gastrointestinal tract disorders: a review of basic science and clinical evidence and their future application. *J Gastroenterol* 2013;48(4):452-62.
 12. 최가영, 신승호, 김병우, 이선주, 오현석, 한인식, 등. 역류성 식도염의 변증과 처방에 관한 문헌적 고찰 - 중국 논문 중심으로. 대한한방내과학회지 2011;32(1):75-86.
 13. Peterson WL, Barnett C, Walsh JH. Effect of intragastric infusions of ethanol and wine on serum gastrin concentration and gastric acid secretion. *Gastroenterology* 1986;91(6):1390-5.
 14. Teyssen S, Singer MV. Alcohol-related diseases of the oesophagus and stomach. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(4):557-73.
 15. Cho YK, Kim GH, Kim JH, Jung HY, Lee JS, Kim NY. Diagnosis of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Korean J Gastroenterol* 2010;55(5):279-95.
 16. Han SH, Hong SJ. Transient lower esophageal sphincter relaxation and the related esophageal motor activities. *Korean J Gastroenterol* 2012;59(3):205-10.
 17. 박동원. 半夏瀉心湯, 生薑瀉心湯, 甘草瀉心湯 및 半夏瀉心湯 保險역기스의 효능에 관한 실험적 비교연구. 경희의학 1989;5(1):57-67.
 18. 한이수, 최준혁, 임성우. 흰쥐의 급성 십이지장 손상에 대한 半夏瀉心湯의 방어효과에 관한 연구. 대한한의학회지 2002;23(3):188-99.
 19. 이준석, 윤상협, 김진성, 류봉하. 흰쥐의 위 배출능에 대한 半夏瀉心湯의 효능. 대한한방내과학회지 2006;27(2):471-9.
 20. 신민규, 황희정, 김상찬, 변준석. 半夏瀉心湯이 Doxorubicin에 의해 유발된 독성에 미치는 영향. 대한한의학회지 2003;24(1):41-53.
 21. Nakamura K, Ozawa Y, Furuta Y, Miyazaki H. Effects of sodium polyacrylate (PANa) on acute esophagitis by gastric juice in rats. *Jpn J Pharmacol* 1982;32(3):445-56.
 22. Biancani P, Barwick K, Selling J, McCallum R. Effects of acute experimental esophagitis on mechanical properties of the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* 1984;87(1):8-16.
 23. Siegmund SV, Haas S, Singer MV. Animal models and their results in gastrointestinal alcohol research. *Dig Dis* 2005;23(3-4):181-94.
 24. Kuroiwa Y, Okamura T, Ishii Y, Umemura T, Tasaki M, Kanki K, et al. Enhancement of esophageal carcinogenesis in acid reflux model rats treated with ascorbic acid and sodium nitrite in combination with or without initiation. *Cancer Sci* 2008;99(1):7-13.
 25. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Saganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141(11):4255-61.
 26. Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(6):595-601.
 27. Murray CD, Kamm MA, Bloom SR, Emmanuel AV. Ghrelin for the gastroenterologists: history and potential. *Gastroenterology* 2003;125(5):1492-502.

28. Lecci A, Tramontana M, Giuliani S, Maggi CA. Role of tachykinin NK1 and NK2 receptors on colonic motility in anesthetized rat: effect of agonists. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75(6):582-6.
29. Kim CS, Park SM, Park BG, Seo SC, Kim MS. An experimental study on the effects of substance P on gastric secretion in rats. *Korean J Gastroenterol* 1982;14(2):13-6.
30. Preiksaitis HG, Tremblay L, Diamant NE. Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* 1994;39(4):770-5.
31. Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux - damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996;111(5):1200-5.
32. De Hertogh G, Ectors N, Van Eyken P, Geboes K. Review article: the nature of oesophageal injury in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24(Suppl2):17-26.