

위염 동물모델과 위 벽세포에서 히스타민 경로를 통한 매스티검 (Chios Mastic Gum)의 위산 분비 억제효과 및 기전 연구

남다운¹ · 김옥경¹ · 심태진² · 이점균³ · 황권택⁴

¹경희대학교 임상영양연구소, ²(주)진용
³헬스밸런스(주), ⁴남부대학교

Inhibitory Effects of Chios Mastic Gum on Gastric Acid Secretion by Histamine-Related Pathway in a Rat Model and Primary Parietal Cells

Da-Eun Nam¹, Ok Kyung Kim¹, Tae Jin Shim², Jum Kyun Lee³, and Kwon-Tack Hwang⁴

¹Department of Medical Nutrition, Kyung Hee University

²Jinyong Co. Ltd.

³Health Balance Co. Ltd.

⁴Department of Food and Nutrition, Nambu University

ABSTRACT The object of this study was to investigate the inhibitory effects of chios mastic gum (MG) on gastric acid secretion in an ethanol-induced SD rat model and primary parietal cells. Rats were randomly divided into four groups: Vehicle (normal group), Control (treated with ethanol), MG50 (treated with ethanol and mastic gum at 50 mg/kg b.w), MG100 (treated with ethanol and mastic gum at 100 mg/kg b.w). Groups treated with both MG50 and MG100 showed attenuation of gastric mucosal injury, sub-epithelial loss, hemorrhaging, and gastric juice secretion. We also examined the acidity of gastric juice during gastric injury. Oral administration of both MG50 and MG100 significantly decreased acidity of gastric juice by % and %, respectively. To examine the stimulatory factors related to gastric acid secretion, mRNA expression levels of H2r, M3r, CCK2r, and H⁺/K⁺ ATPase were measured by real-time PCR. Compared with a vehicle group, mRNA expression levels of H2r, CCK2r, and H⁺/K⁺ ATPase clearly increased in the control group. However, levels of H2r, CCK2r, and H⁺/K⁺ ATPase slightly but significantly decreased in MG-treated groups compared with control. Blood level of histamine significantly decreased in MG-treated groups, which indicates the involvement of MG on in histamine-related acid secretion. To identify the mode of action of MG in regulating histamine-related pathways, intracellular level of cAMP and mRNA levels of H2r, M3r, CCK2r, and H⁺/K⁺ ATPase were measured in primary parietal cells. While mRNA levels of M3r and CCK2r remained unchanged, levels of H2r and H⁺/K⁺ ATPase significantly decreased upon MG treatment. Subsequently, intracellular levels of cAMP decreased. These results suggest that mastic gum has the ability to inhibit gastric acid secretion by regulating a histamine-related pathway.

Key words: mastic gum, gastric acid, histamine, cAMP, proton pump

서 론

위염은 위 점막 염증성 질환을 총칭하는 것으로 *Helicobacter pylori* 균 감염, NSAID(non-steroid anti-inflammatory drugs), 스트레스, 알코올 등에 의해 위 점막을 보호하는 방어인자와 손상시키는 공격인자 사이의 균형이 깨져 발생이 된다(1,2). 최근 5년간 실시된 국민건강영양조사의 자료를 분석한 결과에 따르면 위 점막 염증성 질환에 대한 진료환자가 연 평균 4.9% 증가하였으며, 20대 여성에서 더

높은 빈도로 발생한 것으로 나타났다. 특히 한국인에서 맵고 짠 자극적인 음식을 선호하는 식습관, 스트레스, 과도한 음주 문화, 약물 오남용, 국물요리를 함께 섭취하는 식습관 등으로 인해 위 장관의 염증성 질환 발생이 빈번하고 만성적으로 발생하는 것으로 나타났다(3-5). 위 점막을 손상시키는 공격인자의 하나인 알코올 과다 섭취는 위장의 출혈과 염증 발생을 유발시켜 급성위염을 일으킬 수 있다(6,7). 이러한 알코올의 자극은 위장에 직접적인 손상을 일으키게 되며, 따라서 높은 농도의 알코올 처리는 동물을 이용한 위염, 위산 분비 및 위점막 손상 유발 모델에서 널리 사용되고 있다(8).

위산 분비의 대표적인 세 가지 경로로 histamine에 의한 histamine 2 receptor(H2r) 발현, acetylcholine에 의한

Received 12 August 2014; Accepted 14 August 2014

Corresponding author: Kwon-Tack Hwang, Department of Food and Nutrition, Nambu University, Gwangju 506-706, Korea
E-mail: hwangskt@nambu.ac.kr, Phone: +82-62-970-0174

muscarinic acetylcholine receptor M3(M3r) 활성화 그리고 gastrin에 의한 cholecystokinin 2 receptor(CCK2r) 활성화가 있다. 위의 점막에 존재하는 위 벽세포(parietal cell)에서 히스타민, 아세틸콜린, 가스트린 자극에 의해 H2r, M3r 그리고 CCK2r이 활성화되면서 세포 내 cAMP와 Ca²⁺ 농도가 증가하고, 세포막에 존재하는 proton pump인 H⁺/K⁺ ATPase를 활성화시킨다. 이로 인해 결국 HCl 분비가 증가되면서 위장 점막의 손상을 가중시키는 것으로 알려져 있다(9-12). 이렇듯 위염 또는 위궤양과 같은 위장 질환에서는 과도한 위산 분비에 의한 위 점막의 손상을 최소화하기 위하여 제산제, 산 분비 억제제, H2 수용체 길항제 또는 proton pump 억제제 등을 약물로 사용하고 있다(13). 그러나 이러한 약물만으로 근본적인 원인에 대한 치료를 할 수 없으며 만성적인 약물 복용으로 인한 부작용 및 장기복용 부담 등이 문제점으로 나타나면서 최근에는 식품 및 천연물 소재의 생체 방어증진 물질에 대한 관심이 높아지고 있다.

매스틱 검(mastic gum)은 위나 장 등의 소화기관에 미치는 긍정적 효과가 뛰어나고, 그 외 구강 건강, 항산화, 항염증 등의 다양한 기능성을 가지는 것으로 알려져 있다(15-20). 특히 *H. pylori* 균의 저해활성 및 염증성 사이토카인 감소 등에 의한 위장 점막의 손상을 유의적으로 감소시키는 것으로 알려져 있다(21,22). 또한 동물에서 aspirin, phenylbutazone, reserpine, cold stress에 의한 위장 점막 손상으로부터 보호 효과가 있으며, 위 염증 및 궤양 정도를 유의적으로 감소시키는 데 효과적인 것으로 보고되고 있다(23). 이러한 매스틱 검의 위장 보호 효과에 대한 연구 결과를 바탕으로, 매스틱 검이 알코올로 유도한 위 손상에 대한 위산 분비 억제 및 위장 점막 보호 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 매스틱 검을 이용한 위장 점막의 손상과 관련된 메커니즘 규명 연구가 미미한 실정이며, 따라서 본 연구에서는 매스틱 검의 투여가 알코올 처리로 유도된 위 점막 손상 동물모델에서 위액 분비, 위 점막 손상, 위산 분비 촉진 인자 발현 변화에 미치는 영향을 관찰하고, 매스틱 검의 처리에 따라 parietal cell에서 관련 수용체 발현 및 cAMP 농도 변화를 관찰하여 매스틱 검의 위산 분비 억제를 통한 위장 보호 기전을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

키오스 매스틱 검(Chios mastic gum: manufactured by The Chios Gum Mastic Growers Association)은 (주)진용(수원, 한국)으로부터 분말형태로 공급받아 실험에 사용하였다. 세포 실험을 위한 실험재료의 준비는 분말형태의 매스틱 검을 0.2% ethanol(Merk, Darmstadt, Germany)에 녹여 사용하였으며, 동물실험에 사용된 매스틱 검은 CMC 0.5% 용액에 분말 그대로 첨가 후 용해하여 사용하도록 하였다.

실험동물 및 처치

본 연구에 사용한 실험동물은 경희대학교 동물실험윤리위원회(KHUASP(SE)-14-002)의 승인을 받아 진행하였다. (주)대한바이오링크(충북 음성군, 한국)로부터 공급받은 250 g 내외의 7주령 SD rat 수컷을 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 23±3 °C, 습도 50±5%에서 light cycle은 12시간으로 유지하였다. 순화기간 중 건강하다고 판단된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다.

군 분리는 정상 대조군(Vehicle), 알코올성 위 자극 시험 대조군(Control), 매스틱 검(MG) 50 mg/kg 투여군(MG50), 매스틱 검 100 mg/kg 투여군(MG100)의 총 4군으로 군당 SD rat 8마리씩 구성하여 실험을 진행하였다. Vehicle 그룹은 0.5% CMC를, control 그룹은 0.5% CMC와 40% 에탄올을, MG50과 MG100 그룹은 7일 동안 시험물질과 40% 에탄올을 1 mL씩 경구 투여하여 위를 자극시켰다. 실험 24시간 이전에 모든 식이공급을 중단하여 위를 비우도록 하였으며 실험 당일에 70% 알코올에 150 mM HCl을 첨가하여 1 mL씩 경구 투여한 후 1시간 뒤 희생시켰다.

위 점막 손상 면적 측정

70% 알코올에 150 mM HCl을 첨가하여 1 mL씩 경구 투여한 다음 1시간 뒤 희생시킨 후 회복하여 방혈한 다음 위를 적출하였다. 적출한 위는 대만부를 따라 절개한 후 식염수에 씻어 면봉으로 잘 펴서 핀으로 고정한 뒤 사진 촬영을 하였다. 촬영한 사진은 이미지 프로그램(AxioVs V 4.8.2, Axiovision, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 위 손상 부위 및 위 전체 면적을 측정하였고 Ulcer Index(%)=(손상 면적/전체 면적)×100으로 계산하였다.

위액 분비량 측정

적출한 위를 사진 촬영 전 유문부를 조금 절개하여 15 mL 튜브에 위액을 수집하여 3,000 rpm에 20분 centrifuge 한 후 상층액을 수집하여 위액량(mL)을 측정하였다.

위액 산도(acidity & pH) 측정

위액 분비량 측정이 끝난 후 상층액 1 mL를 수집하고 0.5% dimethylaminobenzene alcohol 용액 및 1% phenolphthalein alcohol 용액을 각각 2~3방울씩 가한다. 이때 위액이 붉은색을 나타내면, burette을 이용하여 0.1 N NaOH 용액을 첨가하여 장미 색조가 나타날 때까지의 적정값을 총산도로 하여 mEq/L로 표시한다. Acidity의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Acidity} = (\text{Volume of NaOH} \times \text{Normality of NaOH} \times 100) / 0.1(\text{meq}^{-1}/100 \text{ g})$$

Table 1. Primer set sequence used for real-time PCR

Sequence name	Forward sequence	Reverse sequence	NCBI reference
GAPDH	TGG CCT CCA AGG AGT AAG AAA C	CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT	BC087743.1
Muscarinic acetylcholine receptor (M3r)	GCC TGG GTC TCT TAA TTC CTA TCA	ATG GGA TCT GGA TGG ACA CTT T	M16407.1
Histamine receptor H2 (H2r)	CCA TCC TGT ACG CTG CTC TCA	TGC GAA CTT GCA GTG GAA GA	NM_012965
Cholecystokinin 2 receptor (CCK-2r)	GCG GAA ACG TGC TCA TCA T	GGC GTT GGT GAC CGT TCT T	NM_013165
H ⁺ /K ⁺ ATPase	TGA CGG TGT CTC ATC TAT GGT TTG	ACG TTT GCC CTG ACT GGT CTT	NM_012509.1

Real-time polymerase chain reaction에 의한 유전자 발현 측정

적출한 실험동물의 위에서 점막 부분을 분리한 뒤 수거하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Germantown, MD, USA)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Singapore, Singapore)을 이용하여 5 µg의 total RNA에 5×iScript select reaction mix를 4 µL, Oligo(dT) Primer set 2 µL(Table 1), RNA sample 5 µL, Nuclease-Free Water 8 µL를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1 µL를 넣어 pipette으로 up & down 하여 골고루 섞어주었다. 95°C에서 10분간 hot start 한 후 95°C에서 15초간, 60°C에서 15초, 72°C에서 15초간 35 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다.

혈장에서 histamine 측정

동물에서 매스틱 검 투여에 따른 histamine 저해활성을 측정하기 위해 실험동물에서 분리한 plasma를 이용하여 histamine을 측정하였다. 측정을 위해 SPI-BIO(New South Wales, Australia)의 histamine enzyme immunoassay kit (Bertin Pharma, Bretonneux, France)을 이용하여 SPI-BIO의 protocol을 따라서 실험을 하였으며, ELISA reader (Molecular Devices, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

위 벽세포 분리 및 배양

위 벽세포 분리를 위한 실험동물은 Nakada 등(24)의 방법에 의해 수행하였다. 먼저 250 g 내외의 7주령 SD rat 수컷을 경추 탈골하여 70% 알코올로 피부를 소독하여 절개한 후 위 조직을 분리하였고, 이후 위 조직은 phosphate buffer saline(Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) 용액에서 보관하여 clean bench로 옮긴 후 phosphate buffer saline 용액에서 1회 세척하였다. DMEM(Hyclone Laboratories)에 20 mM HEPES와 5 M cimetidine을 첨가하

고, collagenase(Worthington type 4) 1 mg/mL와 BSA 1 mg/mL 농도로 첨가하여 30분간 37°C에서 보관하였다. 이렇게 얻어진 세포 부유액을 nylon mesh(0.2 mm)를 이용하여 filter 한 뒤에 15분간 원심분리 하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 40 µm pore size cell strainer(BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 여과한 후 1,600 rpm으로 10분간 원심분리를 2회 진행하였다. 이렇게 분리된 세포는 Complete Medium[DMEM/F-12(GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA), 20 mM HEPES, 0.2% BSA, 10 mM glucose, 1 insulin-transferrin-selenium-A(GIBCO), 1 mM glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, 400 µg/mL gentamicin sulfate, 15 mg/mL geneticin, pH 7.4]을 첨가하여 다시 1,600 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 이렇게 분리된 세포가 “collagenase-isolated cells”이며, 이 세포는 matrigel(Corning, Steuben County, NY, USA)로 coating 한 plate에 넣고 37°C, 5% CO₂의 조건 하에서 배양하였다.

위 벽세포에서 cAMP level 측정

Matrigel plate에서 배양한 세포를 24시간 동안 안정화시킨 후, 매스틱 검을 histamine 0.1 mM과 함께 30분 동안 처리한 다음 media를 제거한 후 scraper를 이용해 세포를 분리해 내었다. Pipette을 이용하여 suspension 한 뒤 10분간 원심분리 하고 그 상층액을 사용하였다. 측정을 위해 cAMP direct immunoassay kit(Biovision, Milpitas, CA, USA)을 이용하여 Biovision의 protocol을 따라서 실험을 하였으며, ELISA reader(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다.

위 벽세포에서 유전자 발현 측정

Matrigel plate에서 배양한 세포를 24시간 동안 안정화시킨 후, 매스틱 검을 histamine 0.1 mM과 함께 30분 동안 처리한 후 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit(QIAGEN, Germantown, MD, USA)로 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출하고 cDNA의 합성을 위해 iScript Select cDNA Synthesis Kit(BIO-

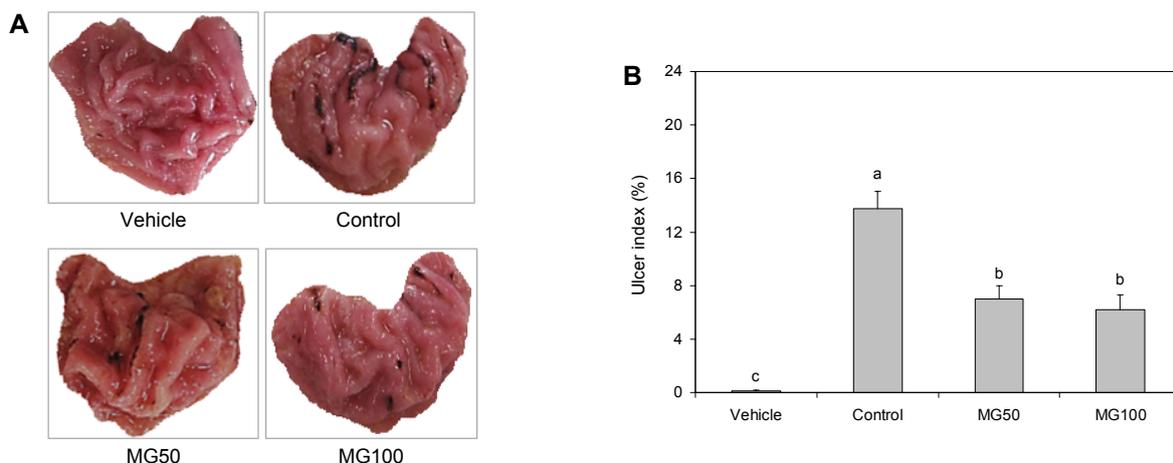


Fig. 1. Effect of mastic gum (MG) on gastric mucosal damage (A) and ulcer index (B) (% , gastric lesion/ total area×100) in rats treated by ethanol. Vehicle (normal group), Control (treated by ethanol), MG50 (ethanol and pretreatment of MG 50 mg/kg b.w), MG100 (ethanol and pretreatment of MG 100 mg/kg b.w) groups. The results are presented means±SD. Different letters (a-c) show a significant difference at $P<0.05$ as determined by one-way ANOVA.

RAD)을 이용하여 5 µg의 total RNA에 5×iScript select reaction mix를 4 µL, Oligo(dT) Primer set 2 µL(Table 1), RNA sample 5 µL, Nuclease-Free Water 8 µL를 각각 넣고 마지막에 iScript Reverse Transcriptase 1 µL를 넣어 pipette으로 up & down 하여 골고루 섞어주었다. 95°C에서 10분간 hot start 한 후 95°C에서 15초, 60°C에서 15초, 72°C에서 15초간 35 cycling으로 PCR을 수행한 후 마지막으로 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C 15초간 polishing step을 거쳐 PCR 분석을 시행하였다. 반응에 사용한 primer는 Table 1에 제시하였다.

통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 20.0(IBM, Cambridge, MA, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군 간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인하였으며 $P<0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결 과

위 점막 손상 및 형태학적 변화

위 점막 손상에 대한 형태학적인 변화를 살펴본 결과 vehicle 처리군에서는 위 점막 손상이 관찰되지 않은 반면, control 그룹에서는 위 점막의 손상과 점막 출혈을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 이에 따라 control 그룹에서의 위 점막 손상면적은 전체 면적의 $13.75±1.31\%$ 를 차지하였다(Fig. 1B). 매스틱 검을 투여한 그룹(MG50, 100)에서 control 그룹에 비하여 위 점막 손상과 출혈이 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 1A). 위 손상 면적은 매스틱 검 50 mg/kg 투여한 MG50 그룹에서 $6.98±0.98\%$, 매스틱 검 100 mg/kg 투여

한 MG100 그룹에서는 $6.18±1.14\%$ 로 나타났으며 control 그룹과 비교하여 손상 면적이 유의적으로 감소된 것을 확인하였다($P<0.05$)(Fig. 1B).

위액 분비량 변화

위액 분비량 측정 결과 vehicle 처리군에서는 $0.15±0.03$ mL로 위액이 소량 분비되었으나 control 그룹에서는 위 점막 손상으로 위액 분비량이 증가하여 $0.73±0.06$ mL로 측정되었다. 이는 정상 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 매스틱 검 50 mg/kg을 투여한 MG50 그룹의 위액 분비량은 $0.23±0.07$ mL, 매스틱 검 100 mg/kg을 투여한 MG100 그룹은 $0.25±0.05$ mL로 측정되었다. 따라서 이러한 결과로 매스틱 검의 투여에 따라 위액 분비량이 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$)(Fig. 2).

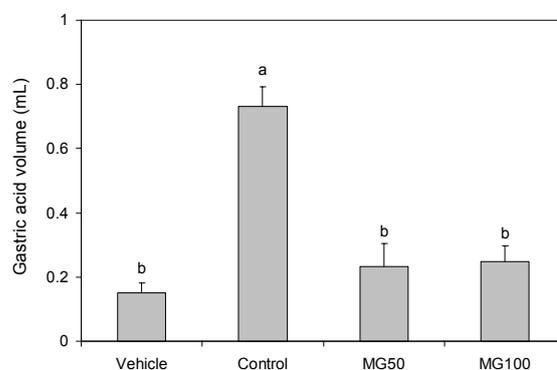


Fig. 2. Effect of mastic gum (MG) on gastric acid volume in rats treated by ethanol. Vehicle (normal group), Control (treated by ethanol), MG50 (ethanol and pretreatment of MG 50 mg/kg b.w), MG100 (ethanol and pretreatment of MG 100 mg/kg b.w) groups. The results were presented means±SD. Different letters (a,b) show a significant difference at $P<0.05$ as determined by one-way ANOVA.

Table 2. Histopathological score index of gastric inflammation

Score 0	No inflammatory response in mucosa and submucosa
Score 1	Mild infiltration of neutrophils in submucosa and lower mucosa but no gastric epithelial change
Score 2	Moderate infiltration of neutrophils and macrophages in mucosa as well as submucosa and focal necrosis of gastric epithelia
Score 3	Severe infiltration of neutrophils and macrophages in mucosa and submucosa, and multifocal necrosis of gastric epithelia
Score 4	Severe infiltration of neutrophils and macrophages in mucosa and submucosa, and massive necrosis of the great part of gastric epithelia
Score 5	Severe infiltration of neutrophils and macrophages in mucosa, submucosa, and muscle layer, massive necrosis of all part of gastric epithelia, and presence of edema, erosion, and ulcer

위 조직의 병리학적 변화(염증지수)

위 조직의 병리학적 상태를 수치화 후 평가하는 지표를 이용하여(Table 2) 위 조직의 병리학적 이상소견을 점수화한 결과에서 vehicle 처리군에서는 특이할 만한 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았으나 control 그룹은 3.92 ± 0.92 로 유의적으로 가장 높았다($P < 0.05$). 매스틱 검 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여한 군은 각각 2.33 ± 0.88 및 2.08 ± 0.92 로 측정되었다. Control 그룹과 비교하였을 때 매스틱 검을 투여한 모든 그룹에서 점수가 유의적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다($P < 0.05$)(Table 3).

위액 산도 변화

위장 점막에 손상을 주는 위액의 산도와 pH 변화를 확인한 결과 총산도의 경우 vehicle 처리군 30.67 ± 3.06 molar equiv. $L^{-1}/100$ g, control 그룹 79.33 ± 7.02 molar equiv. $L^{-1}/100$ g으로 정상 대조군에 비해 control 그룹의 총산도가 유의적으로 증가한 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 반면 매스틱 검 50 mg/kg을 투여한 MG50 그룹은 52.67 ± 5.73 molar equiv. $L^{-1}/100$ g으로 유의적으로 감소하였으며, 특히 매스틱 검 100 mg/kg을 투여한 MG100 그룹에서 총산도 37.33 ± 7.02 molar equiv. $L^{-1}/100$ g으로 vehicle 처리군과 유의적인 차이가 없을 정도로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Table 3). pH 측정 결과에서도 역시 vehicle 처리군에서 3.81 ± 0.03 , control 그룹 2.31 ± 0.07 로 나타나 control군의 pH가 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. MG50 그룹 및 MG100 그룹에서는 각각 2.88 ± 0.05 와 3.06 ± 0.52 로 control군에 비해 유의적으로 pH가 증가하였으며, 특히

MG100 그룹에서 가장 효과적으로 pH가 증가하였음을 확인하였다(Table 3).

실험동물 혈장에서 histamine 농도와 위 점막의 H2 수용체 발현 변화량 측정

위장 점막에 손상을 주는 위액 분비와 관련된 인자인 histamine과 그로 인해 영향을 받는 H2 수용체 유전자의 발현 변화량을 확인하였다. 먼저 histamine의 경우 vehicle 처리군에 비해 control 그룹에서 3.46 ± 0.40 nM로 control 그룹의 혈장에서 histamine의 농도가 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 반면 매스틱 검 50 mg/kg을 투여한 MG50 그룹은 2.63 ± 0.38 nM, MG100 그룹은 2.03 ± 0.31 nM로 control군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며, 매스틱 검을 투여한 모든 그룹에서 histamine 농도가 효과적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 3A). H2r의 발현량 조사 결과 vehicle 처리군 0.31 ± 0.01 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.15 로 control군의 H2r 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인하였다($P < 0.05$). 반면 MG50 그룹은 0.37 ± 0.10 , MG100 그룹은 0.42 ± 0.01 로 시험대조군에 비해 유의적으로 H2 수용체 발현이 감소한 것으로 나타났으며, 매스틱 검을 투여한 모든 그룹에서 효과적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 3B).

실험동물 위 점막의 유전자 발현 변화량 측정

위장 점막에 손상을 주는 위액 분비와 관련된 유전자의 발현 변화량을 real-time PCR을 이용하여 확인하였다. 먼

Table 3. Effect of mastic gum (MG) on histopathological score of gastric inflammation and ulcerogenic effects (pH and acidity) in rats in rats treated by ethanol

Group	Alcohol treatment	Histopathological score	pH	Total acidity (Molar equiv. $L^{-1}/100$ g)
Vehicle	-	0.0	3.81 ± 0.03^a	30.67 ± 3.06^c
Control	+	3.92 ± 0.92^a	2.31 ± 0.07^c	79.33 ± 7.02^a
MG50	+	2.33 ± 0.88^b	2.88 ± 0.05^b	52.67 ± 5.73^b
MG100	+	2.08 ± 0.92^b	3.06 ± 0.52^b	37.33 ± 7.02^c

Vehicle (normal group), Control (treated by ethanol), MG50 (ethanol and pretreatment of MG 50 mg/kg b.w), MG100 (ethanol and pretreatment of MG 100 mg/kg b.w) groups. The results were presented means \pm SD. Different superscript letters (a-c) in a column show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

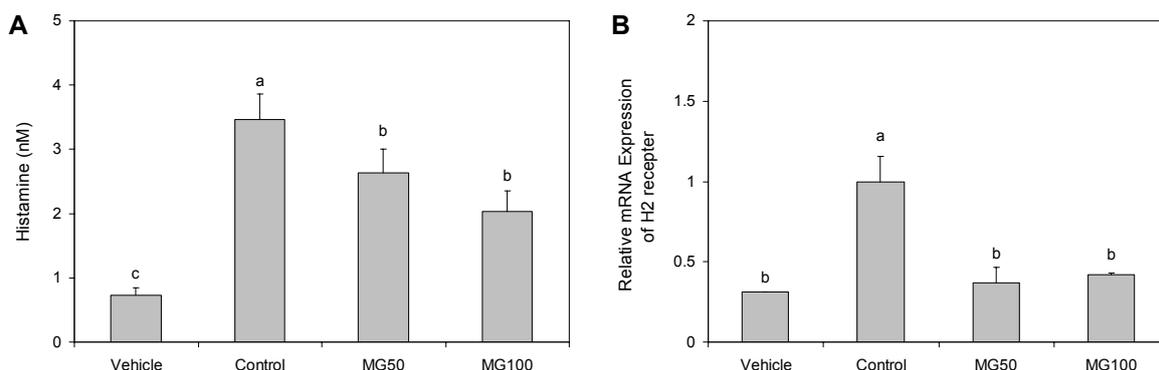


Fig. 3. Effect of mastic gum (MG) on plasma histamine (A) and H2 receptor (B) expression in rats treated by ethanol. Vehicle (normal group), Control (treated by ethanol), MG50 (ethanol and pretreatment of MG 50 mg/kg b.w), MG100 (ethanol and pretreatment of MG 100 mg/kg b.w) groups. The results were presented means±SD. Different letters (a-c) show a significant difference at $P<0.05$ as determined by one-way ANOVA.

저 CCK2r의 유전자 발현 변화량에서는 vehicle 처리군 0.27 ± 0.01 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.14 로 control군의 CCK2r 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P<0.05$). 반면 MG50 그룹은 0.38 ± 0.15 , MG100 그룹은 0.44 ± 0.08 로 control군에 비해 유의적으로 그 발현이 감소한 것으로 나타났으며, 매스틱검을 투여한 모든 그룹에서 효과적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$)(Fig. 4A). 위산 분비 증가와 관련 있는 M3r에서도 vehicle 처리군 0.56 ± 0.01 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.22 로 control군의 M3r 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P<0.05$). 매스틱 검 투여 그룹에서는 MG50 그룹이 0.89 ± 0.14 , MG100 그룹은 1.03 ± 0.06 으로 시험대조군과 유의적인 차이는 나타나지 않은 것으로 나타났다(Fig. 4B). 위산 분비에서 중요한 역할을 하는 H^+/K^+ ATPase 발현량에서도 역시 vehicle 처리군 0.70 ± 0.01 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.01 로 control군의 H^+/K^+ ATPase 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P<0.05$). 또한 매스틱 검 투여 그룹에서는 MG50 그룹은 0.76 ± 0.01 , MG100 그룹은 0.83 ± 0.01 로 control군에 비해 유의적으로 발현이 감소한 것으로 나타났다($P<0.05$)(Fig. 4C).

위 벽세포에서 유전자 발현 변화량 측정

Histamine으로 자극한 위 벽세포에서 매스틱 검 처리에 따른 위산 분비 관련 유전자 발현의 변화량을 측정하였다. 먼저 CCK2r의 유전자 발현 변화량에서는 vehicle 처리군 0.77 ± 0.09 에 비해 histamine 처리한 control 그룹에서 1.00 ± 0.18 로 CCK2r 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P<0.05$)(Fig. 5A). 매스틱 검 $5 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 세포에서 0.92 ± 0.09 , 매스틱 검 $10 \mu\text{g/mL}$ 처리 세포에서 0.94 ± 0.15 , 매스틱 검 $20 \mu\text{g/mL}$ 처리 세포에서 1.04 ± 0.11 로 나타났으나 control 그룹 사이에 유의성은 나타나지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 5A). 또한 M3r에서도 vehicle 처리군의 0.65 ± 0.17 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.15 로 유전자 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가하였으나, 매스틱 검 처리 세포에서 control 그룹과 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 5B). Histamine에 의해 가장 직접적으로 영향을 받는 H2r의 발현량 변화에서는 vehicle 처리군의 0.32 ± 0.07 에 비해 control 그룹에서 1.00 ± 0.13 으로 H2r 발현이 통계적으로 유의성 있게 증가한 것으로 확인되었다($P<0.05$). 반면 매스틱 검 $5 \mu\text{g/mL}$ 를 처리한 세포에서 0.77 ± 0.09 , 매스틱 검 $10 \mu\text{g/mL}$ 처리 세포에서 0.61 ± 0.11 , 매스틱 검 $20 \mu\text{g/mL}$ 처리 세포에서 0.57 ± 0.17 로 나타나 유의적으로 발현이 감소

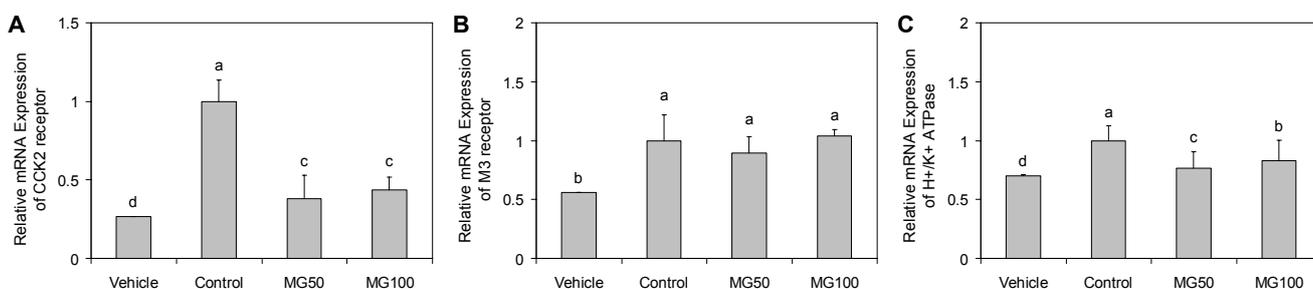


Fig. 4. Effect of mastic gum (MG) on CCK2 receptor (A), M3 receptor (B), and H^+/K^+ ATPase (C) expression in rats treated by ethanol. Vehicle (normal group), Control (treated by ethanol), MG50 (ethanol and pretreatment of MG 50 mg/kg b.w), MG100 (ethanol and pretreatment of MG 100 mg/kg b.w) groups. The results were presented means±SD. Different letters (a-d) show a significant difference at $P<0.05$ as determined by one-way ANOVA.

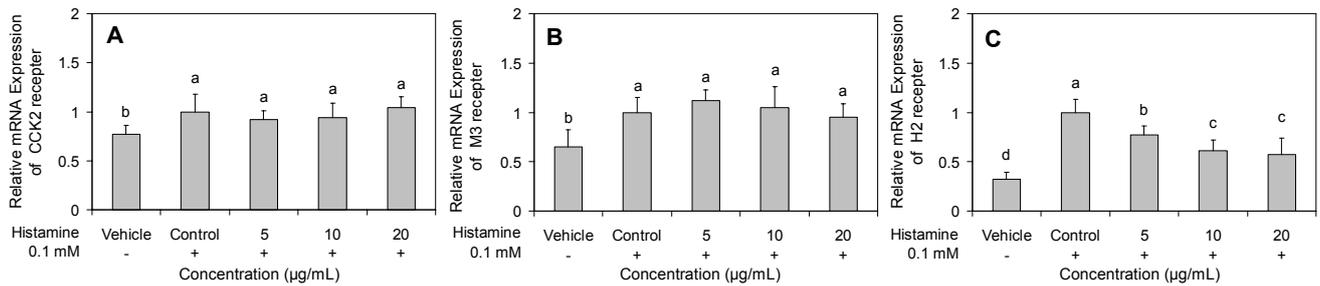


Fig. 5. Effect of mastic gum (MG) on CCK2 receptor (A), M3 receptor (B), and H2 receptor (C) expression in primary cultured parietal cells. Vehicle (normal group), Control (0.1 mM histamine-treated group), 5 (histamine and treatment of MG 5 µg/mL), 10 (histamine and treatment of MG 10 µg/mL), 20 (histamine and treatment of MG 20 µg/mL). The results were presented means±SD. Different letters (a-d) show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

한 것을 확인하였으며, 특히 매스틱 검 처리에 따라 농도 의존적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 5C).

위 벽세포에서 cAMP level 및 H^+/K^+ ATPase 발현량 측정

Histamine으로 자극한 위 벽세포에서 매스틱 검 처리에 따른 cAMP 농도 변화량과 그에 따른 H^+/K^+ ATPase 발현량 변화를 측정하였다. 먼저 세포 수준에서 cAMP level을 측정된 결과, vehicle 처리군 74.8 ± 16.7 fmol/mg protein에 비해 control 그룹에서 158.5 ± 17.4 fmol/mg protein으로 cAMP level이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다($P < 0.05$). 반면 매스틱 검 5 µg/mL를 처리한 세포에서 134.1 ± 10.6 fmol/mg protein, 매스틱 검 10 µg/mL 처리 세포에서 108.6 ± 17.4 fmol/mg protein, 매스틱 검 20 µg/mL 처리 세포에서 110.7 ± 14.3 fmol/mg protein으로 histamine으로 자극시킨 세포에 비해 유의적으로 그 발현이 감소한 것으로 나타났으며, 매스틱 검 처리에 따라 농도 의존적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$)(Fig. 6A). cAMP 농도에 의해 영향을 받는 H^+/K^+ ATPase 발현 변화량을 측정된 결과, vehicle 처리군 0.44 ± 0.07 에 비해 histamine으로 자극시킨 control 그룹에서 1.00 ± 0.12 로 유전자 발현량이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다($P < 0.05$). 반면 매

스틱 검 5 µg/mL를 처리한 세포에서 0.84 ± 0.07 , 매스틱 검 10 µg/mL 처리 세포에서 0.71 ± 0.11 , 매스틱 검 20 µg/mL 처리 세포에서 0.68 ± 0.15 로 시험대조군에 비해 유의적으로 그 발현이 감소한 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 앞선 cAMP level 측정 결과와 비슷한 양상으로 농도 의존적으로 감소한 것으로 확인되었다(Fig. 6B).

고 찰

위 점막 염증성 질환은 한국사회에서 가장 흔한 질환으로 위의 모든 부분에서 병변이 일어날 수 있으며 지속될 경우 만성 위염, 위궤양, 위암으로까지 진행할 수 있는 질병이다. 스트레스와 과음이 가장 큰 원인으로 나타나며, 이전 연구 결과들을 살펴보면 알코올 과다 섭취가 위장의 출혈 및 위 점막 손실을 일으켜 급성 및 만성 위염이 발생하는 것으로 나타났다. 또한 이러한 자극이 위산 분비를 더욱 증가시키고 위 내부 pH 증가와 위산에 의한 위장 점막의 손상을 심화시키는 것으로 알려져 있다(20,21). 이번 연구에서 알코올로 위를 자극한 동물의 위산 분비와 위 점막 조직 손상에 매스틱 검 투여에 대한 효과를 확인하기 위하여 위 점막 조직의 형태학적, 병리학적 변화, 위산 분비량 및 위액의 산도를 측

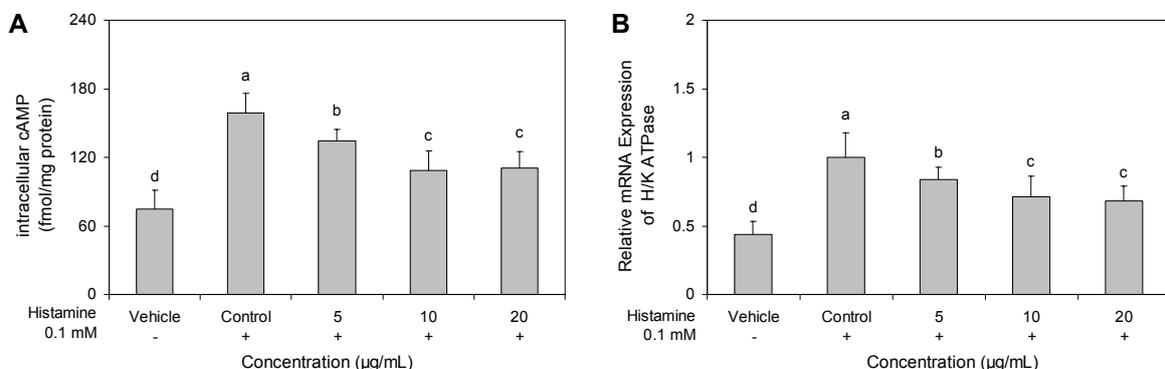


Fig. 6. Effect of mastic gum (MG) on intracellular cAMP level (A) and H^+/K^+ ATPase (B) expression in primary cultured parietal cells. Vehicle (normal group), Control (0.1 mM histamine-treated group), 5 (histamine and treatment of MG 5 µg/mL), 10 (histamine and treatment of MG 10 µg/mL), 20 (histamine and treatment of MG 20 µg/mL). The results were presented means±SD. Different letters (a-d) show a significant difference at $P < 0.05$ as determined by one-way ANOVA.

정하였다. 실험 결과, 알코올로 위를 자극한 동물의 위 점막 조직이 현저히 손상되어 ulcer index(손상 면적)가 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, 위액 분비량 및 위액 산도 역시 유의적으로 높아진 것으로 나타나 알코올의 영향으로 위액 분비 증가와 위 점막 조직 손상이 심화된 것을 확인할 수 있었다. 반면 매스틱 검을 투여한 그룹에서는 control군과 비교하여 유의적으로 ulcer index가 낮아졌고 위액 분비량과 위액 산도 역시 유의적 감소를 보였으며, 이러한 결과는 알코올로 위를 자극한 동물 모델에서 매스틱 검 투여에 따라 위 점막의 보호 효과가 나타난 것으로 생각된다. 특히 실험농도인 50 mg/kg 투여 그룹과 100 mg/kg의 매스틱 검을 투여한 그룹에서 모두 유의적으로 효과가 나타났으며, 이는 이전 실험 결과와 동일한 것으로 확인되었다(25,26).

최근 여러 연구에서 위산 분비 증가와 관련하여 위 점막 조직의 수용체 활성이 위의 pH를 증가시키고 위 병변을 일으키는 중요한 인자로 작용한다고 보고되고 있다. 위산 분비는 스트레스 등의 다양한 원인에 의해 히스타민, 아세틸콜린, 가스트린 분비가 증가되고 관련 수용체인 H2r, M3r 및 CCK2r이 증가되면서 더욱 심화된다(27,28). Histamine에 의해 H2r이 증가되면 세포 내 cAMP 농도가 증가하게 되고, 또한 M3r과 CCK2r에 의해 세포 내 Ca²⁺ 농도가 증가한다. 결국 위 벽세포의 H⁺/K⁺ ATPase를 활성화시켜 HCl 분비가 활발히 진행되면서 위산 자극에 의한 위 점막 손상이 심화된다(29). 그러므로 수용체 활성을 조절하는 것이 위 조직의 손상을 치료하고 보호하는 데 중요한 역할을 하고, 이와 관련된 약물을 치료에 사용하고 있다(13). 이번 연구에서 실험동물의 혈장에서 histamine 농도를 측정된 결과 알코올로 위를 자극시킨 동물의 혈장 histamine 농도가 정상 대조군에 비하여 유의적으로 높아진 반면, 매스틱 검 투여 그룹에서는 control 그룹과 비교하여 혈장 histamine 농도가 유의적으로 낮아진 것을 확인하였다. Histamine 분비에 의해 조절되는 H2r의 유전자 발현량을 비교한 결과에서도 역시 혈장 histamine 농도와 비슷한 양상으로 매스틱 검 투여 그룹에서 그 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이러한 실험 결과는 앞서 확인한 위 점막 조직의 손상, 위액 분비량 및 위액 산도를 확인한 결과와 일치하였으며, 이는 매스틱 검의 투여가 histamine 분비를 조절함으로써 위산 분비 증가와 관련된 H2r의 발현에도 영향을 미쳐 결국 위산 분비를 감소시키고 위 점막 조직의 보호 효과가 나타난 것으로 생각된다.

위산 분비와 관련된 다른 수용체의 발현을 확인하기 위해 위염이 유발된 실험동물의 위 점막 조직에서 유전자 발현 정도를 비교하였다. 그 결과 알코올로 위를 자극한 동물의 위 조직의 CCK2r 및 H⁺/K⁺ ATPase의 발현 정도가 정상 대조군에 비하여 유의적으로 높아져 알코올에 의한 위 점막의 손상에 영향을 준 것을 확인하였다. 반면 매스틱 검을 투여한 모든 실험군(MG50, MG100)에서 위산 분비 관련 수용체의 발현이 유의적으로 감소하여 위 점막 손상에 대한

보호 효과가 나타난 것을 확인하였다.

이전 연구 결과에서는 매스틱 검 및 그 추출물에 의하여 pyloric 균, aspirin 등의 약물에 의한 위궤양 및 위염에서 개선 작용을 나타내었으며, 염증 관련 인자인 iNOS, COX-2 등의 발현을 억제하는 등 위장 점막 보호 효과를 나타낸 것으로 보고하였다(23,30). 이로써 매스틱 검의 항염증 활성을 증명한 바 있으며, 매스틱 검의 기능성분에 대한 연구를 통해 resin 등 풍부한 식이섬유가 염증 억제 및 위 점막의 보호 활성을 나타낸 것으로 보고하였다(30,31). 따라서 이번 연구에서 알코올로 위를 유발시킨 동물에서 매스틱 검의 치료로 인하여 위 손상을 감소시킨 결과는 매스틱 검의 점막 보호 활성 및 위산 분비 억제 활성으로 인한 결과로 예상할 수 있다.

동물실험 결과를 바탕으로 세포 수준에서 위산 분비와 관련된 기전적 연구를 추가적으로 진행하였다. 동물의 위 조직에서 분리한 parietal cell에서 histamine 자극에 의한 수용체 발현을 확인하였으며, 실험 결과 H2r과 H⁺/K⁺ ATPase는 정상세포에 비해 histamine으로 자극한 세포에서 발현량이 유의적으로 증가하였고, 반면 매스틱 검 처리에 따라 농도 의존적으로 H2r과 H⁺/K⁺ ATPase의 발현을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났다. 그러나 M3r 및 CCK2r의 발현에서는 histamine으로 자극한 세포와 매스틱 검을 처리한 세포 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 이는 수용체의 특성에 따른 것으로 보인다. CCK2r과 M3r에서는 각각 gastrin과 acetylcholine에 의한 자극에 더욱 민감하게 반응할 것으로 생각되며, 이러한 부분은 추후 실험을 통해 확인되어야 할 것이다. Histamine 자극에 따른 세포 내 cAMP 농도 변화를 측정된 결과에서 histamine 자극에 의해 높아진 세포 내 cAMP 농도가 매스틱 검의 처리에 따라 유의적으로 감소한 것으로 나타났으며, 세포 수준에서 H⁺/K⁺ ATPase 발현 변화량과 비슷한 결과가 나타났음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 histamine에 의해 위산 분비와 관련된 인자의 활성이 조절되며, 매스틱 검이 이러한 인자의 발현 증가에 대한 자극을 감소시켜 결국 위산 분비를 저해하는 효과가 나타난 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과를 살펴보면 매스틱 검의 위산 분비 억제 및 위장 점막 보호 효능이 나타난 것으로 생각되는데, 이러한 효능은 식이섬유가 풍부한 매스틱 검의 물질적 특성을 고려할 때 직접적 조절 효과라고 할 수 있는 결과는 아직 확실치 않지만 최소한 간접적인 조절 효과가 함께 작용했을 것으로 보인다. 즉 풍부한 식이섬유가 위장 점막을 덮어 보호함으로써 자극이 감소하게 되고, 이러한 자극 감소는 histamine 분비를 감소시켜 결국 위산의 생성 및 분비가 줄어들어 위 점막 조직을 자극으로부터 보호하는 효과를 더욱 증가시키는 것으로 생각된다. 따라서 매스틱 검 섭취 시 위산 분비 억제 및 점막 보호 활성 효능을 지니는 기능성 소재로써 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다.

요약

본 연구는 위 벽세포 *in vitro* 실험모델과 알코올로 위를 자극한 *in vivo* 실험모델을 이용하여 매스틱 검의 위산 분비 억제 및 위장 점막 보호 효과를 확인하고자 하였다. 위 조직의 병리학적인 관찰을 통하여 효과를 관찰한 결과 알코올로 위를 자극한 군에서 위 점막 조직의 손상과 표면 상피세포의 손실을 관찰할 수 있었으나, 매스틱 검 50 및 100 mg/kg 투여한 군에서 모두 control 그룹과 비교했을 때 손상이 회복되었음을 확인할 수 있었다. 위액 분비량 및 위액 산도를 비교한 결과에서도 알코올의 자극으로 인하여 증가한 위액 분비량과 위액 산도를 매스틱 검이 유의적으로 감소시켰음을 확인할 수 있었다. 혈장 histamine 농도와 그로 인해 영향을 받은 H2r 발현량 변화로 위산 분비 관련 인자를 확인한 결과에서도 매스틱 검을 투여한 그룹에서 유의적으로 그 농도가 감소한 것을 확인하였다. 또한 위 벽세포에서 위산 분비 증가와 관련된 수용체인 CCK2r과 H⁺/K⁺ APTase 발현 변화도 역시 매스틱 검의 투여가 효과적으로 발현을 억제한 것으로 나타났다. 이러한 동물실험 결과를 바탕으로 세포 수준에서의 기전 규명을 위한 연구를 추가적으로 진행하였으며, 세포 내 cAMP 농도, H⁺/K⁺ APTase 및 H2r의 발현 변화를 관찰한 결과 매스틱 검의 처리가 효과적으로 이들의 발현을 감소시켰음을 확인하였다. 따라서 매스틱 검의 위산 분비 억제 및 점막 보호 활성 효과는 형태학적 및 병리학적 관찰, histamine 분비 억제, 수용체 발현 억제효과 등으로 확인한 결과, histamine을 통한 위산 분비 경로를 조절함으로써 위산 분비 및 위장 점막 손상에 대해 보호 효과를 나타내었으며 이는 이전 실험 결과들과 동일한 농도에서 효과가 나타났음을 확인하였다.

REFERENCES

- Kay HH, Grindle KM, Magness RR. 2000. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 182: 682-688.
- Bilici D, Süleyman H, Banoğlu ZN, Kiziltunç A, Avcı B, Ciftçioglu A, Bilici S. 2002. Melatonin prevents ethanol-induced gastric mucosal damage possibly due to its antioxidant effect. *Dig Dis Sci* 47: 856-861.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284: 1328-1333.
- Kim JH, Kim HY, Kim NY, Kim SW, Kim JG, Kim JJ, Roe IH, Seo JK, Sim JG, Ahn H, Yoon BC, Lee SW, Lee YC, Chung IS, Jung HY, Hong WS, Choi KW. 2001. Sero-epidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic people in South Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 16: 969-975.
- Kim MS, Kim N, Kim SE, Jo HJ, Shin CM, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Kim JM, Jung HC. 2013. Long-term follow-up *Helicobacter pylori* reinfection rate and its associated factors in Korea. *Helicobacter* 18: 135-142.
- Bujanda L. 2000. The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 95: 3374-3382.
- Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. 1985. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 88: 228-236.
- Liu ES, Cho CH. 2000. Relationship between ethanol-induced gastritis and gastric ulcer formation in rats. *Digestion* 62: 232-239.
- Chew CS. 1991. Intracellular mechanisms in control of acid secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 7: 856-862.
- Mårdh S, Song YH, Carlsson C, Björkman T. 1987. Mechanisms of stimulation of acid production in parietal cells isolated from the pig gastric mucosa. *Acta Physiol Scand* 131: 589-598.
- Chew C. 1993. Peptidergic regulation of gastric acid secretion. In *Gastrointestinal Regulatory Peptides*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany. p 199-252.
- Helander HF, Keeling DJ. 1993. Cell biology of gastric acid secretion. *Baillieres Clin Gastroenterol* 7: 1-21.
- Uedo N, Takeuchi Y, Yamada T, Ishihara R, Ogiyama H, Yamamoto S, Kato M, Tatsumi K, Masuda E, Tamai C, Yamamoto S, Higashino K, Iishi H, Tatsuta M. 2007. Effect of a proton pump inhibitor or an H2-receptor antagonist on prevention of bleeding from ulcer after endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer: a prospective randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 102: 1610-1616.
- Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr J Pharm Pharmacol* 2: 22-28.
- Giaginis C, Theocharis S. 2011. Current evidence on the anticancer potential of chios mastic gum. *Nutr Cancer* 63: 1174-1184.
- Kaliora AC, Stathopoulou MG, Triantafyllidis JK, Dedoussis GV, Andrikopoulos NK. 2007. Alterations in the function of circulating mononuclear cells derived from patients with Crohn's disease treated with mastic. *World J Gastroenterol* 13: 6031-6036.
- Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM, Eslami SH. 2010. Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 14: 765-769.
- Takahashi K, Fukazawa M, Motohira H, Ochiai K, Nishikawa H, Miyata T. 2003. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. *J Periodontol* 74: 501-505.
- Triantafyllou A, Chaviaras N, Sergentanis TN, Protopapa E, Tsaknis J. 2007. Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *J Ethnopharmacol* 111: 43-49.
- Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S, Dikalov S. 2011. Anti-inflammatory activity of chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutr J* 10: 64.
- Kottakis F, Kouzi-Koliakou K, Pendas S, Kountouras J, Choli-Papadopoulou T. 2009. Effects of mastic gum *Pistacia lentiscus* var. Chia on innate cellular immune effectors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21: 143-149.
- Al-Said MS, Ageel AM, Parmar NS, Tariq M. 1986. Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol* 15: 271-278.

23. Al-Habbal MJ, Al-Habbal Z, Huwez FU. 1984. A double-blind controlled clinical trial of mastic and placebo in the treatment of duodenal ulcer. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11: 541-544.
24. Nakada SL, Crothers JM Jr, Machen TE, Forte JG. 2012. Apical vacuole formation by gastric parietal cells in primary culture: effect of low extracellular Ca^{2+} . *Am J Physiol Cell Physiol* 12: 1301-1311
25. Gioxari A, Kaliora AC, Papalois A, Agrogiannis G, Triantafillidis JK, Andrikopoulos NK. 2011. *Pistacia lentiscus* resin regulates intestinal damage and inflammation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Med Food* 14: 1403-1411.
26. Papalois A, Gioxari A, Kaliora AC, Lymperopoulou A, Agrogiannis G, Papada E, Andrikopoulos NK. 2012. Chios mastic fractions in experimental colitis: implication of the nuclear factor κ B pathway in cultured HT29 cells. *J Med Food* 15: 974-983.
27. Chen D, Zhao CM. 2010. Complexity of gastric acid secretion revealed by targeted gene disruption in mice. *Curr Pharm Des* 16: 1235-1240.
28. Schubert ML. 2007. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 595-601.
29. Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Hoshino H, Mutoh H, Ishino Y, Watanabe E, Satoh K, Sugano K. 2006. *Helicobacter pylori* eradication induces marked increase in H^+/K^+ -adenosine triphosphatase expression without altering parietal cell number in human gastric mucosa. *Gut* 55: 152-157.
30. Chadzopulu A, Koukoulia A, Theodosopoulou E, Adraniotis J. 2011. Unique mastic resin from chios. *Prog Health Sci* 1: 131-136.
31. Zhou L, Satoh K, Takahashi K, Watanabe S, Nakamura W, Maki J, Hatano H, Takekawa F, Shimada C, Sakagami H. 2009. Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In Vivo* 23: 583-589.