

급성 위염 유발 마우스 동물 모델에서 枸杞子 에탄올 추출물의 위점막 손상 보호 효과

이아름^{1#}, 이주영¹, 김민영¹, 신미래¹, 신성호¹, 서부일¹, 권오준², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학 교실, 2 : 대경지역사업평가원 경북지역산업평가단

Protective Effects of a *Lycium chinense* Ethanol Extract through Anti-oxidative Stress on Acute gastric lesion mice

AhReum Lee^{1#}, JooYoung Lee¹, MinYeong Kim¹, Mi-Rae Shin¹,
SungHo Shin¹, Bull Seo¹, OJun Kwon², Seong-Soo Roh^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Regional Program Evlution, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Gastric lesions affect many people around the world and their development are results of the imbalance between destructive and protective factors in the gastric mucosa. *Lycium chinense* has been widely used as a traditional Korean medicine, it was recently reported that they have potent anti-inflammatory effects in chronic hepatitis models. Therefore, this study aimed to investigate the anti-inflammatory activity of *Lycium chinense* extract (LCE) on HCl-Ethanol induced gastric lesion mice.

Methods : The ICR mice were divided randomly into five groups of six animals each. Group A was normal mice, and group B was treated orally with 0.5 ml 150 mM HCl-60% Ethanol. Mice in group C and D were pre-treatment of LCE (100 mg/kg and 200 mg/kg bodyweight, p.o before HCl/ethanol treatment) and group E was orally administered sucralfate (10 mg/kg).

Results : 150mM HCl/60% ethanol-induced gastric mucosal injury mice were ameliorated mucosal damage upon histological evaluation by treatment of LCE. Pre-treatment of LCE attenuated reactive oxidative species (ROS) and produces peroxynitrite (ONOO⁻) in stomach tissues. As results of stomach protein analyses, LCE effectively reduce inflammatory-related factors such as cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-6 (IL-6) in gastric lesion mice. In addition, nuclear factor kappa B (NF- κ B) and inhibitor of phosphorylation of nuclear factor kappa B (p-I κ B) were down-regulated in LCE-administrated gastric lesion mice.

Conclusions : Our discovery supports that the therapeutic activity of LCE ameliorate the development of gastric lesion via suppressing the oxidative stress and gastric partial inflammation induced by 150 mM HCl/60% ethanol.

Key words : *Lycium chinense*, Gastric lesions, anti-oxidative stress, anti-inflammation.

서론

주요 소화기관인 위는 크게 분문부, 기저부 및 유문부로

나누어지며, 기저부는 점막층, 점막하층, 근육층 및 장막층으로 구분된다. 점막층은 다시 상피와 점막고유판, 점막근육판의 세층으로 나누어진다. 그 중 위점막은 공격인자에 항상 노

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-819-1752 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : AhReum Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : rmi2222@naver.com

· Received : 18 October 2015 · Revised : 11 November 2015 · Accepted : 11 November 2015

출되어 있어 손상 받기 쉽다¹⁾.

공격인자에는 히스타민, 위산, 펩신, 가스트린 분비 및 벽세포 증가 등의 내인성 공격인자와 Helicobacter pylori 감염, 비스테로이드성 소염 진통제(Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 약물 과다복용과 불규칙한 식습관, 음주, 스트레스 등의 외인성 공격인자가 대표적이다. 위점막이 정상적인 상태에서는 공격인자들로부터 고유의 방어기전을 통해 보호되나, 공격인자가 강해지거나 방어인자가 약해지면 위점막의 손상이 발생되어 발적, 부종, 출혈 등의 증상이 나타난다. 이러한 증상은 '위염'이라고 하며, 점막근육판 이상으로 손상이 진행된 상태를 '위궤양'이라고 한다²⁾.

대표적인 위염 및 위궤양 치료제는 위산분비 억제 효능을 가진 H₂-receptor antagonist와 proton pump inhibitor (PPI) 류의 약물이며 충분히 그 효과가 입증되었다^{3,4)}.

H₂-receptor antagonist 약물로는 cimetidine, ranitidine, famotidine, nizatidine 등이 있고 PPI 약물로는 omeprazole, pantoprazole, lansoprazole, rabeprazole 등이 있으며, 이들 약물은 임상적으로 우수한 치료 효과를 보이고 있지만 소화기계의 위장 장애를 일으키거나, 발진, 두드러기, 가려움 등의 부작용 뿐 아니라 일부 만성 난치성 위염 및 위궤양에 대해서는 치료의 한계를 보이는 경우가 있다⁵⁻⁷⁾.

따라서 위염 치료효율을 높이고 동시에 부작용을 낮추기 위해서는 위점막 손상 유발인자인 위산을 지속적으로 억제함과 동시에 위점막을 보호하는 것이 중요하다. 또한 장기간 약물을 복용할 시에는 부작용이 있는 위산 억제제만 복용하는 것 보다 위점막 보호제를 함께 복용하는 것이 바람직하다.

위점막 보호제로서는 stillen, sucralfate, teprenone 등의 약물이 개발되었으나 일반적으로 속효성이 적고 두통, 불면, 식욕부진 등의 부작용이 있으며 복용량이 많은 단점이 있어서 개량된 약물의 개발이 필요하다.

枸杞子(*Lycium chinense*)는 가지과에 속하는 낙엽성 활엽 관목으로 성질은 차고 성미는 쓰고 달며 간과 신장에 작용하여 시력을 개선하고 몸이 허약하여 생기는 병을 다스린다. 주요 성분으로는 베타인 (betaine), 제아잔틴 (zeaxanthin), 카로틴 (carotene) 등이 함유되어 있으며, 이에 관한 연구로는 항산화효과⁸⁾, 혈당강화작용^{9,10)}이 보고되었을 뿐 아니라, 유해 산소 및 알코올의 해독¹¹⁾, 제아잔틴 성분의 간 보호 효과¹²⁾에 대해 보고되었다. 또한 『東醫治療經驗集成』에枸杞子로 만성 위축성 위염 환자 20례를 치료한 증례가 있을 정도로, 임상에서 위염에 다용되는 단미약물이다¹³⁾.

그러나, 아직까지 항산화능과 항염증 효능을 가진枸杞子가 에탄올-염산으로 유발된 위염 동물 모델에 대한 위점막 손상 억제 기전 연구가 이루어지지 않았다. 이에 본 연구자는 급성 위염 동물모델을 이용하여 조직학적 관찰, 산화적 스트레스 소거능, 웨스턴 분석을 통해枸杞子의 효능을 평가하였고, 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

ICR 마우스 6주령 수컷 30마리를 오리엔트(경기, 한국)에서

구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22 ± 2℃, 습도 50 ± 5%, 명암주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 시료

본 실험에 사용한枸杞子(*Lycium chinense*)는 용기한약국(대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사하여 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa Bα (p-IκBα), inhibitor of nuclear factor kappa B (IκBα) phosphorylation of nuclear factor-kappa B (NF-κB), Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), Histone, β-actin 과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Protease inhibitor mixture, DMSO, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다.

또한 Sucrose octasulfate-aluminum complex(Sucralfate)는 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

枸杞子 450 g을 분쇄한 후, 10배의 용량의 30% Ethanol을 이용하여 24시간 동안 상온 추출 하였다. 얻어진枸杞子 추출물을 감압여과 한 후, 농축액을 동결 건조하여 33.0% 수율로 얻어진 분말을 -20℃에서 보관하였다.

2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

전자공여능 (electron donating ability)은 DPPH free radical 소거법으로 측정되었다¹⁴⁾. DPPH는 프리라디칼(free radical)이며, 용액은 보라색 (deep violet)이다. 시료 중에 있는 항산화 물질과 결합하여 중화(환원)가 되면 용액은 투명하게 변한다. 따라서 DPPH는 시료 중에 포함된 항산화(라디칼 소거능) 물질의 양을 측정하는데 사용된다.

시료 100 μl과 60 μM DPPH용액(dissolved in Ethanol)을 100 μl 넣고 혼합한 후, 실온에서 30분간 반응시켰다. 이

반응액을 사용하여 540nm에서 흡광도를 사용하여 측정 한 후, 전자공여능은 식(a)에 의해 계산하여 산출하였다.

식(a)

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \left\{ \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right\} \times 100$$

OD_{control} : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도

OD_{sample} : 시료가 들어간 경우 흡광도

3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성을 이용하여 항산화효과를 측정하였다¹⁵⁾. 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 12시간동안 차광하여 반응시켰다. 이 반응액을 734 nm에서 Ethanol을 이용하여 흡광도 0.70 ± 0.02로 보정하였다. ABTS 95 µl에 시료 5 µl를 첨가하고 15분동안 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 식(b)에 의해 계산하여 산출하였다.

식(b)

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \left\{ \frac{OD_{control} - OD_{sample}}{OD_{control}} \right\} \times 100$$

OD_{control} : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도

OD_{sample} : 시료가 들어간 경우 흡광도

4) 위점막 손상 유발 및 동물 처치

실험동물은 군당 6마리씩 5그룹으로 구분하여 실험을 실시하였다. 실험 전날까지 고행사로 (항생제 무첨가, 삼양사로 Co, Korea)와 물을 충분히 공급하였고 위점막 손상 유발 실험 24시간 전부터 절식 하였다. 실험 전, 정상군(Nor)은 아무런 처치를 하지 않았으며, 위점막 손상 대조군(Veh)은 증류수를 경구투여하였고, 枸杞子 30% 에탄올 추출물(100mg/kg, 200mg/kg body weight) 및 sucralfate(10mg/kg body weight)투여군은 각 농도에 맞게 경구 투여 한 후, 1시간 방치 하였다. 그 다음 위점막 손상을 유발하기 위하여 150mM HCl/60% ethanol을 각 0.5ml 씩 경구 투여하였고 한 시간 후 회복하여 위 조직을 적출하였다¹⁶⁾.

5) 조직학적 관찰

적출한 위 조직을 고정된 다음, 광학 디지털 카메라 (Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 위점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., 한국) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정 한 후, 위 전체 면적과 비교하여 비율로 표시하였다.

6) 위 조직 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

위 조직 내 산화적 스트레스를 ROS 및 ONOO⁻를 이용하여 측정하였다. 위 조직은 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 분쇄한 후 ROS를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합하였다. 그 다음 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 486 nm에서 30분간 측정 한 산출 값을 계산하였다.

ONOO⁻는 DHR123 buffer(rodamin buffer, 5 mM DTPA, 10mM DHR123)와 분쇄한 위 조직을 혼합한 후, 37°C에서

5분간 교반하였다. 그 다음 emission wavelength of 535 nm와 excitation wavelength of 480 nm에서 측정 한 값을 계산하여 나타내었다.

ROS 및 ONOO⁻의 실험방법은, 각각 Ali et al 과 Kooy et al의 방법을 이용하여 시행하였다^{17,18)}.

7) Western blot

위의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, and 1.5 M sucrose, and then 0.1 M DTT and protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 µl의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 위 조직의 세포질의 p-IκBα, IκBα, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, β-actin 및 핵의 NF-κB, Histone 단백질의 발현을 측정하기 위하여 10 µg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 GE Healthcare (Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

8) 통계분석

모든 수치는 mean ± standard error (Mean ± S.E)로 표시하였으며, SPSS (18.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 각 자료의 통계적 유의성을 검증 하였고, 대조군과 투여군 사이에 p-value < 0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

결 과

1. DPPH 라디칼 소거 활성 효과

항산화 효능을 평가하기 위해 실시한 DPPH 라디칼 소거능 측정에서 ascorbic acid의 IC₅₀값은 1.43 ± 0.07 µg/ml로 나타난 반면, LCE 30% 에탄올 추출물은 IC₅₀ 164.80 ± 2.4 µg/ml의 DPPH 라디칼 소거능이 보였다(Fig. 1).

2. ABTS 라디칼 소거 활성 효과

ABTS 라디칼 소거 활성 효과 측정 실험에서는 ascorbic acid 및 LCE 30% 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값이 각각 2.20 ± 0.02 μg/ml, 107.87 ± 0.63 μg/ml로 나타나 LCE 30% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 항산화효과가 있음을 확인하였다(Fig. 1).

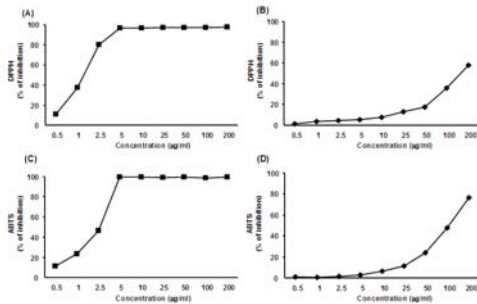


Fig. 1. Antioxidant activity in vitro. DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid ;(A), DPPH radical scavenging activity of LCE ;(B), ABTS radical scavenging activity of ascorbic acid ;(C), ABTS radical scavenging activity of LCE ;(D) LCE scavenged DPPH and ABTS effectively and IC₅₀ of DPPH and ABTS radical scavenging activity of LCE were 164.80 ± 2.4 μg/ml and 107.87 ± 0.63 μg/ml.

3. 위점막 손상도 변화

아무런 처치를 하지 않은 정상군인 마우스의 위점막 손상 검사 결과, 점막의 손상이 발견되지 않았으나 위염 유발 전 증류수를 처리한 대조군은 위점막이 150 mM HCl/60% ethanol에 의해 손상을 받아 출혈, 발적 및 부종이 발생하였고, 손상 부위 면적 비율은 68.17 ± 9.88%로 정상군에 비하여 매우 높게 나타났다. LCE100 투여군은 27.87 ± 8.18%, LCE200 투여군은 21.87 ± 2.08% (*p* < 0.001)로 농도 의존적으로 위점막 보호효과를 나타내었으며 LCE200 투여군의 경우 양성 대조군인 SC10 투여군(21.27 ± 3.73%)와 유사하게 손상정도가 감소되었다(Fig. 2).

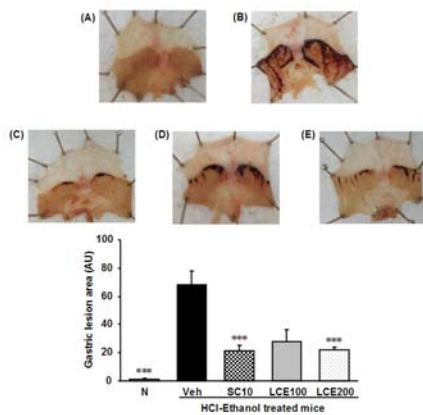


Fig. 2. Effects of LCE100, LCE200 on the histopathological change stomach tissues of gastric lesion mice. All data are expressed means ± SEM, n=6 mice per group. Significance: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. treated gastric lesion mice. Normal mice; Nor, Vehicle gastric lesion mice; Veh, SC 10mg/kg body weight gastric lesion mice; SC10, LCE 100mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE100, LCE 200mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE200.

4. 위 조직의 산화적 스트레스 바이오마커 변화

부검 후 분쇄한 위 조직을 이용하여 산화적 스트레스의 마커인 ROS를 측정된 결과, 대조군 (393 ± 46 fluorescence / ml/mg protein)은 정상군 (310 ± 13 fluorescence/ml /mg protein (*p* < 0.001))에 비해 수치가 증가하였고, 양성대조군인 SC10 투여군 (300 ± 19 fluorescence/ml/mg protein)에서는 유의성 있게 감소하였으며 LCE100 투여군 (358 ± 33 fluorescence/ml/mg protein) 및 LCE200 투여군 (309 ± 19 fluorescence/ml/mg protein)에서는 농도 의존적으로 감소하였으나 유의성은 없었다.

ONOO⁻는 대조군 (325 ± 26 fluorescence/mg protein)에 비하여 SC10 투여군 (262 ± 18 fluorescence/mg protein(*p* < 0.05))에서는 유의성 있게 감소하였고, LCE100 투여군 (273 ± 4 fluorescence/mg protein(*p* < 0.05)) 및 LCE200 투여군 (247 ± 15 fluorescence/mg protein(*p* < 0.01))에서 또한 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

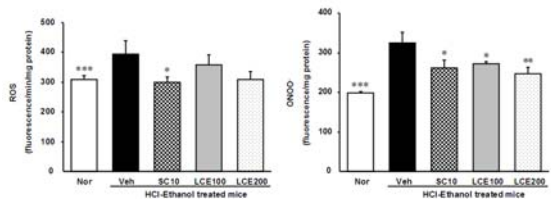


Fig. 3. Oxidative stress biomarker in stomach tissues. Oxidative stress biomarker reactive oxygen species(ROS) and produces peroxynitrite(ONOO⁻) in stomach tissues. All data are expressed means ± SEM, n=6 mice per group. Significance: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. treated gastric lesion mice. Normal mice; Nor, Vehicle gastric lesion mice; Veh, SC 10mg/kg body weight gastric lesion mice; SC10, LCE 100mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE100, LCE 200mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE200.

5. 위 조직의 염증성 사이토카인 및 매개인자 발현

1) IκB-α, p-IκBα, NF-κB 염증성 단백질 발현량 분석
위 조직에서 염증성 매개인자인 IκB-α, p-IκBα 및 NF-κB를 측정하였다. 대조군 (0.51 ± 0.06)은 정상군 (1.00 ± 0.10(*p* < 0.001))에 비해 IκBα 발현이 감소하였고, SC10 투여군 (0.92 ± 0.10(*p* < 0.01))에서는 유의성 있게 증가 하였으며 LCE100 투여군 (0.78 ± 0.06(*p* < 0.05)) 및 LCE200 투여군 (0.80 ± 0.05(*p* < 0.05))에서 또한 유의성있게 증가 하였다.

p-IκBα의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.06(*p* < 0.01))에 비하여 대조군 (1.77 ± 0.25)은 유의성 있게 증가하였고 SC10 투여군 (1.01 ± 0.12(*p* < 0.01))은 유의성 있게 감소하였으며, LCE100 투여군 (1.13 ± 0.14(*p* < 0.01))은 감소하였으나 유의성이 없었고 LCE200 투여군 (1.09 ± 0.13 (*p* < 0.01))은 SC10투여군과 유사하게 감소하였다.

NF-κB의 발현은 대조군 (1.43 ± 0.14)에서 정상군 (1.00 ± 0.09(*p* < 0.05))에 비해 증가하였고, LCE100 투여군 (1.18 ± 0.10)에서는 유의성 있게 감소하였으며 SC10 투여군 (0.88 ± 0.14(*p* < 0.01)) 및 LCE200 투여군 (0.99 ± 0.15(*p* < 0.05))은 정상군과 유사하게 감소하였다(Fig. 4).

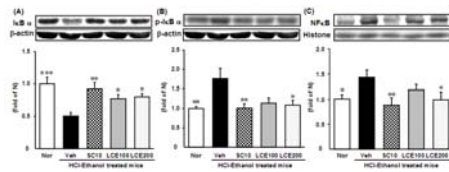


Fig 4. Expression of inflammation-related proteins in stomach. All data are expressed means±SEM, n=6 mice per group. Significance: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs. treated gastric lesion mice.

Normal mice; Nor, Vehicle gastric lesion mice; Veh, SC 10mg/kg body weight gastric lesion mice; SC10, LCE 100mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE100, LCE 200mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE200, inhibitor of nuclear factor kappa B(κ B α); (A), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B(κ B α); (B), nuclear factor-kappa B(NF- κ B); (C)

2) COX-2, iNOS, TNF- α 및 IL-6 염증성 단백질 발현량 분석

또한 염증성 매개인자인 COX-2, iNOS, TNF- κ B, IL-6의 발현을 확인한 결과, COX-2의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.08 ($p < 0.001$))에 비해 대조군 (1.52 ± 0.06)은 유의성 있게 증가하였으며 양성대조군인 SC10 투여군 (1.17 ± 0.09 ($p < 0.01$))에서는 감소하였고, LCE100 투여군 (1.37 ± 0.10) LCE200 투여군 (1.25 ± 0.10 ($p < 0.05$))에서도 농도 의존적으로 감소하였다.

iNOS의 경우 정상군 (1.00 ± 0.02 ($p < 0.001$))에 비해 대조군(1.71 ± 0.19)이 증가하였으며 SC10 투여군 (1.09 ± 0.06 ($p < 0.001$))에서는 유의성 있게 감소하였고, LCE100 투여군 (1.28 ± 0.06 ($p < 0.01$)) 및 LCE200 투여군 (1.12 ± 0.12 ($p < 0.01$))에서 유의성있게 감소하였다.

TNF- α 의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.11 ($p < 0.001$))보다 대조군 (2.44 ± 0.26)에서 크게 증가하였으며, SC10 투여군 (1.80 ± 0.11 ($p < 0.05$)) 및 LCE100 투여군 (2.10 ± 0.245), LCE200 투여군 (1.89 ± 0.11 ($p < 0.05$))에서는 유의성 있게 감소하였다.

IL-6의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.10 ($p < 0.001$))에 비해 대조군 (1.78 ± 0.14)에서 유의성 있게 증가하였으며, SC10 투여군 (1.32 ± 0.12 ($p < 0.05$))에서는 유의성 있게 감소하였으나 LCE100 투여군 (1.75 ± 0.155) 및 LCE200 투여군 (1.59 ± 0.125)에서 유의성은 없었고 농도 의존적으로 감소하는 경향만 보였다(Fig. 5).

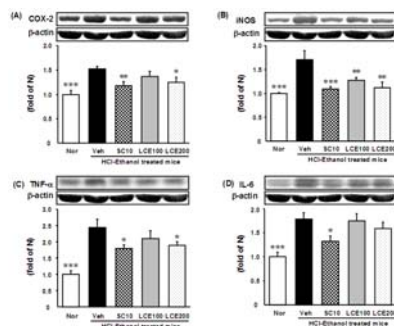


Fig 5. Expression of inflammation-related proteins in stomach. All data are expressed means±SEM, n=6 mice per group. Significance: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ vs. treated gastric lesion mice.

Normal mice; Nor, Vehicle gastric lesion mice; Veh, SC 10mg/kg body weight gastric lesion mice; SC10, LCE 100mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE100, LCE 200mg/kg body weight gastric lesion mice; LCE200, inflammation-related proteins cyclooxygenase-2 (COX-2); (A), inducible nitric oxide synthase (iNOS); (B), Tumor necrosis factor α (TNF- α); (C), interleukin-6 (IL-6); (D)

고찰

'위염'은 위점막이 위산, 알코올, 각종 약물 등에 의하여 손상되어 출혈, 발적 및 염증을 보이는 형태를 말한다. 발표된 논문에서 따르면 위염은 산화적 스트레스가 중요한 원인이 된다고 알려졌다¹⁹⁾. 위에서 발생된 자유라디칼은 여러 효소 반응을 통해 신속하게 제거되지만 과량의 자유라디칼은 독성을 일으키고 위점막에 손상을 주게 된다²⁰⁾.

이에 본 연구는 枸杞子 추출물의 항산화 효능을 통한 위점막 손상 억제 효과를 연구하여 이를 위점막 보호제로서 활용하고자 실시하였다.

枸杞子 30% 에탄올 추출물의 항산화 효능을 평가하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정된 결과, IC₅₀ 값이 각각 $164.80 \pm 2.4 \mu\text{g/ml}$, $107.87 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이로서 항산화 효과를 충분히 가지는 것을 확인하였으며, 위점막 손상 동물모델에 효과가 있을 것으로 예상되었다.

부검 후 적출된 위를 촬영하고 이미지 분석 프로그램을 활용하여 위의 전체면적 및 염증, 발적, 출혈 부위를 측정된 결과, 정상군에서는 손상부위가 나타나지 않았으며 위점막 손상 대조군에서는 심한 손상을 나타내었다. 하지만 枸杞子 30% 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 개선효과를 보였으며, 특히 枸杞子 30% 에탄올 추출물 200mg/kg 투여군에서는 양성대조군인 sucralfate 10mg/kg 투여군과 유사한 효과를 보였다.

위 조직을 분쇄하여 ROS 및 ONOO⁻를 측정된 결과 대조군에서는 높은 산화적 스트레스를 보였고, 枸杞子 30% 에탄올 추출물 투여군에서는 농도 의존적으로 감소하는 결과를 나타내어 위점막 손상 보호효과는 산화적 스트레스를 억제함으로써 나타나는 것으로 유추할 수 있었다.

뿐만 아니라 위 조직에서 염증성 사이토카인 및 매개인자를 분석한 결과 NF κ B의 발현을 현저히 감소시켰고, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6 및 p-I κ B α 를 억제하여 위점막 손상을 막는 것으로 나타났다. 또한 I κ B α 의 발현에서도 양상이 일치함을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해보면 枸杞子 30% 에탄올 추출물은 항산화 효과를 충분히 가지고 있으며, 급성 위염 유발 동물 모델에서 산화적 스트레스를 억제하여 NF κ B의 발현을 감소시킨다. 또한 NF κ B를 통하여 발현되는 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6를 효과적으로 저해시킴으로서 위점막을 보호하는 것으로 보여진다(Fig. 6).

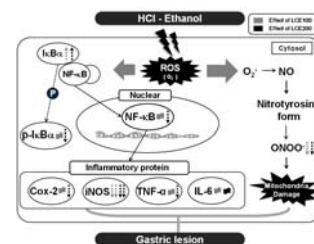


Fig. 6. Possible mechanism of LCE in the gastric lesion mice.

결론

위점막 손상을 유발시킨 마우스에 대한 枸杞子 30% 에탄

을 추출물의 경구 투여가 항산화 효과를 통한 위점막 손상 억제에 미치는 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 枸杞子 30% 에탄올 추출물의 섭취는 150mM HCl/60% ethanol로 유발된 위점막 손상 마우스에서 위 조직의 육안적 손상을 농도 의존적으로 감소시켰다.
2. 枸杞子 30% 에탄올 추출물의 섭취는 150mM HCl/60% ethanol로 유발된 위점막 손상마우스에서 조직의 ROS 및 ONOO⁻를 양성대조군인 sucralfate와 유사하게 감소시켰다.
3. 枸杞子 30% 에탄올 추출물의 섭취는 150mM HCl/60% ethanol로 유발된 위점막 손상 마우스에서 조직의 I κ B α 를 증가시켰고 이에 맞게 p-I κ B α , NF- κ B의 발현 또한 유의하게 감소시켰다.
4. 枸杞子 30% 에탄올 추출물의 섭취는 150mM HCl/60% ethanol로 유발된 위점막 손상 마우스에서 조직에서 염증성 매개인자인 COX-2, iNOS, TNF- α 를 유의하게 감소시켰으며, IL-6는 감소하는 경향만 보였다.

따라서 枸杞子 30% 에탄올 추출물의 투여가 급성 위염 유발 마우스 모델에서 위점막 손상 억제에 효과가 있다고 사료된다.

References

1. Banks WJ. Applied veterinary histology, 2nd ed, William & Wilkins Baltimore. 1986 : 393-6.
2. Shay J, Komarov SA, Fels SS, Merance D, Gruenstein M, Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rats. J Gastroenterol. 1945 ; 5 : 43-61.
3. Mark F, Michael EB. Histamine2-receptor antagonists-Standard therapy for acid-peptic diseases. N Engl J Med. 1990 ; 323 : 1672-80.
4. Bell NJ, Hunt RH. Progress with proton pump inhibition. Yale J Biol Med. 1992 ; 65 : 649-57.
5. Berardi RR, Savitsky ME, Nostrant TT. Maintenance therapy for prevention of recurrent peptic ulcers. Drug Intell Clin Pharm. 1987 ; 21(6) : 493-501.
6. Fullarton GM, McLauchlan G, Macdonald A, Crean GP, McColl KE. Rebound nocturnal hypersecretion after four weeks treatment with an H2 receptor antagonist. Gut. 1989 ; 30(4) : 449-54.
7. Szabo S, Bynum TE. Alternatives to the acid-oriented approach to ulcer disease: does 'cytoprotection' exist in man? A new classification of antiulcer agents. Scand. J Gastroenterol. 1988 ; 23(1) : 1-6.
8. Qian JY, Liu D, Huang AG. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. Food Chem. 2004 ; 87(2) : 283-8.
9. Hwang EY, Hong JH, Choi JH, Lee EJ, Lee IS. Study on Anti-obesity and Hypoglycemic Effects of *Lycium chinense* Mill Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009 ; 38(11) : 1528-34.
10. Kim KS, Shim SH, Jeong GH, Cheong CS, Ko KH, Park JH, Kim BK. Anti-diabetic activity of constituents of *Lycium fructus*. J Appl Pharmacol. 1998 ; 6 : 378-82.
11. Yoon CG, Kim HH, Chae SN, Oh MJ, Lee GH. Hepatic oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats fed diets supplemented with *Lycium chinense* ethanol extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2001 ; 30(4) : 668-72.
12. Kim HP, Kim SY, Lee EJ, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1997 ; 97(3) : 301-14.
13. Donguichilyokyunghumjipsung Compilation Committee. Donguichilyokyunghumjipsung. Seoul : Yeogang publishing house. 2001
14. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958 ; 26 : 1199-200.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 ; 26(9-10) : 1231-7.
16. Martins JLR, Rodrigues ORL, da Silva DM, Galdino PM, de Palula JR, Romao W, da Costa HB, Vaz BG, Ghedini PC, Costa EA. Mechanisms involved in the gastro protective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. J Ethnopharmacol. 2014 ; 155(3) : 1616-24.
17. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology. 1992 ; 13(3) : 637-48
18. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrodamine 123. Free Radic Biol Med. 1994 ; 16(2) : 149-56.
19. Thomson A, Hemphill D, Jeejeebhoy KN. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. Dig Dis. 1998 ; 16(3) : 152-8.
20. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 ; 280(4) : C719-41.