

젊은감 진피 복합추출물의 급성 역류성 식도염 개선 효과

권오준^{1#}, 이아름², 노성수^{2*}

1 : 대전지역사업평가원 경북지역산업평가단, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학 교실

Improving Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Combined Extract of Young persimmon fruit and Citrus peel

OJun Kwon^{1#}, AhReum Lee², Seong-Soo Roh^{2*}

1 : Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Regional Program Evlution, Republic of Korea
2 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The present study was conducted to evaluate protective effects of Combined Extract of young persimmon fruit and citrus peel (PCM) in Reflux Esophagitis(RE) rats.

Methods : Twenty-four Sprague-Dawley (SD) rats were divided four groups and each group had six rats ; Normal group, RE control group, RE group treated PCM 50, 100 mg/kg body weight group. Reflux esophagitis was induced that tied the pylorus and fundus in SD rats stomach. PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. We have performed an analysis such as pH of stomach secretion, oxidative stress biomarkers in serum, and western blot.

Results : The increased esophageal mucosa damage by RE was markedly improved by PCM treatment in a dose-dependent manner. Also, the administration of PCM decreased the elevated serum reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite (ONOO⁻) in serum. The protein expressions of anti oxidant such as SOD, catalase, GPx exhibited down-regulation by PCM treatment in tissues. And, PCM effectively reduce inflammatory cytokines such as inflammation-related proteins cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) in RE rats. In addition, NF κ B and p-I κ B α were decreased in PCM-administrated RE rats. But there was no difference on stomach secretion pH between reflux esophagitis rats and PCM administration rat group.

Conclusions : In conclusion, administration of PCM (50, 100 mg/kg body weight) made esophagus have less inflammation and injury by decreased NF κ B path way. These findings suggest that PCM could have Improving effects on reflux esophagitis.

Key words : Young persimmon fruit, Citrus peel, reflux esophagitis, oxidative stress, anti-inflammation.

서론

역류성 식도염 (Reflux esophagitis; RE)은 위산이 식도 내로 역류됨으로 인하여 이물감, 속쓰림, 흉통, 연하통증 등과 같은 다양한 증상을 보이는 질환으로¹⁾ 식도의 부종, 출혈,

점막의 괴사, 박리 등 식도의 형태적 변화를 보이는 경우를 말한다²⁾.

위산이 식도 내로 역류하는 증상은 스트레스, 흡연, 음주, 탄산음료, 위 절제술, 하부식도 괄약근의 이완 등 다양한 원

*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 : O Jun Kwon, Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Gegendal Program Evaluation, 27, Sampung-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38542, Korea

· Tel : +82-53-818-9504 · Fax : +82-53-818-9520 · E-mail : gbria@hanmail.net

· Received : 18 December 2015 · Revised : 21 January 2016 · Accepted : 21 January 2016

인이 복합적으로 작용하며 이에 대한 치료는 보편적으로 위산의 pH (수소이온지수)를 조절하여 식도의 손상을 막는 제산제 (antacid)나 위장관의 운동을 조절하여 위산의 식도 역류를 감소시키는 위장 운동 조절제 (prokinetics)를 많이 사용한다³⁾. 그러나 역류성 식도염은 질환 특성 상 한번 약해진 하부식도 괄약근이 치료를 받더라도 쉽게 개선되지 않아 반복적인 위 내용물 역류로 식도 손상을 주기 때문에 약 복용을 중단하면 1년 이내에 50-80%가 재발한다는 문제점이 있다⁴⁻⁶⁾. 따라서 재발방지를 위한 장기간의 치료가 필요하고 또한 위산의 pH 및 위장관 운동을 조절하는 것 이외에 다른 기전의 치료제 개발이 필요하다.

감 (*Diospyros kaki*)은 알칼리성 과일로 포도당, 과당 등의 당질을 15-16% 이상 함유하고 있으며 떫은 맛을 내는 diospyrin 이라는 탄닌 성분 또한 함유하고 있다. 탄닌 성분은 미숙한 과일일 때는 함량이 높지만 성숙할수록 함량이 줄어든다⁷⁾. 본 실험에 사용한 떫은 감은 발표된 논문을 통해 탄닌성분에 의한 항산화 효과 및 항균효과⁸⁾가 뛰어난 것으로 보고되었다.

진피 (*Citrus peel*)는 운향과에 속한 상록 소고목인 귤나무 (*Citrus unshiu*)의 성숙한 과실의 열매껍질을 건조한 것으로 11월에 채취하여 세척하여 사용한다⁹⁾. 진피의 주요 성분으로는 flavonoid, alkaloid, lignin, monoterpenoid, sesquiterpenoid 등을 함유하고 있으며¹⁰⁾, 선행 연구로는 진피의 항산화 활성¹¹⁾ 염증 억제효과¹²⁾ 등이 보고되었다.

진피는 性味가 溫辛苦하고 脾·肺經에 歸經하여 理氣健脾, 燥濕化痰의 效能으로 胸腹脹滿, 不思飲食, 嘔吐噯逆 및 咳嗽痰多의 證狀에 응용되고 있다. 진피는 濕痰으로 인한 病證에 두루 常用되는 單味藥物로 역류성식도염의 원인이 痰飲 및 氣滯인 증상에 사용될 수 있다¹³⁾.

떫은 감과 진피는 뛰어난 항염증 및 항산화 작용이 보고되었고 역류성 식도염의 원인인 痰飲과 氣滯 증상 개선효과에 진피가 두루 통용됨에도 불구하고 이에 대한 연구는 미비하여 본 실험을 수행하게 되었다. 본 연구자는 떫은감 진피 복합 추출물을 이용하여 급성 역류성 식도염 개선효과에 대해 실험하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 7주령 수컷 24마리를 대한 바이오(충북, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 실험군은 총 4개의 군으로 정상군 (Normal rat; Nor), 급성 역류성 식도염을 유발하고 증류수를 처리한 대조군 (reflux esophagitis rat; Con), 역류성 식도염을 유발하고 떫은감, 진피 복합 추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50), 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (reflux esophagitis

rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100)으로 각각 6마리씩 나누어서 사용하였다.

2) 시료

본 실험은 떫은 감, 진피 복합 추출물을 사용하였다. 떫은 감은 착색 후 15일이 경과한 것을 경상북도 농업기술원 (상주, 한국)에서 구입하였으며, 진피는 (주) MSC (양산, 한국)에서 구입하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), phosphorylation NF κ B inhibitor alpha (p-I κ B α), nuclear factor-kappa B (NF κ B), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase2 (COX2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), SOD, Catalase, GPx, Histone, β -actin과 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, 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

떫은 감과 진피 각각 500 kg을 물을 이용하여 100 $^\circ\text{C}$ 에서 2시간 가열하여 5회 추출하였고, 15시간동안 효소 분해하였다. 다음, 효소를 90 $^\circ\text{C}$ 30분 간 가열하여 불활성화시켰다. Diatomite을 사용하여 여과 한 후 95 $^\circ\text{C}$ 에서 30분 간 살균과정을 거치고 동결건조하여 21%의 수득율로 얻어진 떫은감 진피 복합 추출물 파우더를 -80 $^\circ\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

2) 급성 역류성 식도염 유발

1주일 동안 고행사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하여 실험실 환경에 적응하였다. 수술 24시간 전 절식하였고, 8일차에 역류성 식도염 유발 수술을 진행하였다. 수술 당일 떫은감 진피 복합 추출물을 각 50, 100 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 하고 2시간 후 Zoletile mixture (Vibrac, France) 25 mg/kg를 복강주사하여 마취하였다. 복부를 2 cm 정도 개복을 하여, 위조직의 대만부위 및 인접한 날문부위를 실크실로 묶은 후 복막과 피부를 봉합하였다. 수술 후 회복 챔버에 머무르게 한 뒤 케이지로 이동시켰다¹⁴⁾.

3) 식도점막 손상 측정

수술 6시간 후, 식도 및 위를 분리하였고 수술용 가위를 이용하여 식도를 세로로 절단하였다. 절단된 식도 내부는 0.9

% NaCl로 세척한 후 깨끗한 부직포 위에 전개했으며 이를 광학 디지털 카메라 (Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., 한국) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정하였다.

4) 위 분비물 pH 측정

부검 후 위를 대만부를 따라 절개하여 위 내용물을 수집하였다. pH 측정 전 정확한 측정을 위하여 pH 4와 pH 7의 완충액 (buffer solution)의 순서로 교정한 후 수집한 위 내용물의 pH를 pH 측정기 (Istek Product, Korea)를 활용하여 측정하였다.

5) 혈청 내 ROS 및 ONOO⁻ 측정

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm 10분 원심 분리하여 혈청을 얻었다. ROS 측정은 혈청과 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission wavelength of 530 nm와 excitation wavelength of 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

ONOO⁻는 DHR123 buffer (rodamin buffer, 5 mM DTPA, 10 mM DHR123)와 혈청을 혼합한 후, 37 °C에서 5분간 교반하였다. 그 다음 emission wavelength of 535 nm와 excitation wavelength of 480 nm에서 측정된 값을 계산하여 나타내었다¹⁵⁾.

6) Western blot

식도의 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. 식도조직의 세포질의 p-IκBα, iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6, SOD, Catalase, GPx, β-actin 및 핵의 NFκB, Histone 단백질의 발현을 측정하기 위해 10 μg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 anti body를 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.

7) 통계분석

모든 수치는 평균 ± 표준오차 (Mean ± S.E.M)로 표시하였으며, SPSS (22.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 유의수준 p-value < 0.05에서 검정하였다.

결 과

1. 식도 점막 손상도 변화

아무런 처치를 하지 않은 정상군에 비하여 역류성 식도염을 유발한 대조군의 경우 84.04 ± 8.07%의 높은 식도 점막 손상도를 보였고, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군은 65.90 ± 8.36%로서 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. 또한 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군은 49.16 ± 9.61 (p < 0.01)%의 식도 손상도를 보여 뛰어난 역류성 식도염 개선효과를 보였다 (Fig. 1, 2).

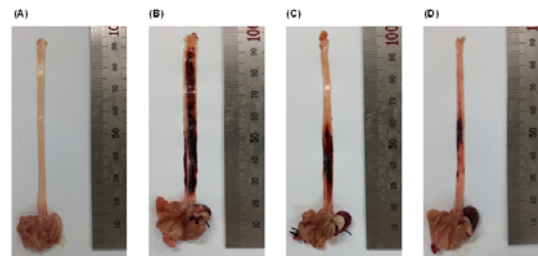


Fig. 1. Effects of PCM extract on optical change of esophagus tissues in rats (A) Normal rat (B) reflux esophagitis rat (C) reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight (D) reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight. PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rat per group.

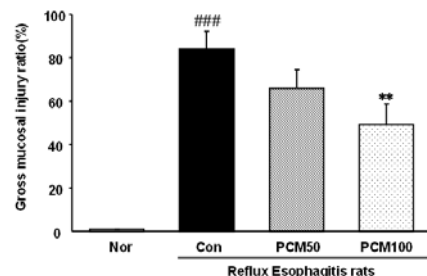


Fig. 2. Effects of PCM50, PCM100 on the gross mucosal injury ratio change esophagus tissues of reflux esophagitis rat. Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50, reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rat per group. Significance: **p < 0.01 vs, reflux esophagitis rat, reflux esophagitis control group significance was compared to Normal group (###p < 0.001)

2. 위 분비물 pH 분석

부검 후 정상군의 위 분비물의 pH를 측정된 결과, 3.30 ± 0.20 으로 측정되었고, 대조군은 2.13 ± 0.05 , 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg, 100 mg/kg 으로 처리한 약물투여군은 각각 2.93 ± 0.24 , 2.94 ± 0.25 의 pH를 나타내어 pH가 증가하는 경향은 있었으나 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 3).

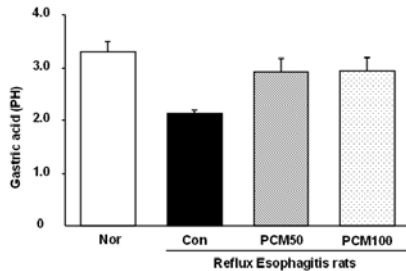


Fig. 3. Effect on gastric acid pH in reflux esophagitis rat treated with PCM.

Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50, reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n = 6 rat per group.

3. 혈청의 ROS 및 ONOO⁻ 측정.

혈청을 이용하여 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정된 결과, 정상군 (232 ± 15.06 fluorescence/min/ml ($p < 0.01$))에 비하여 대조군 (377 ± 34.80)은 유의하게 증가하였고, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (334 ± 31.02) 및 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (279 ± 12.90 ($p < 0.05$))은 발현이 유의성있게 감소하였다.

또한 ONOO⁻ 측정 결과, 정상군 (208 ± 12.67 ($p < 0.001$)) 보다 대조군 (612 ± 43.89)은 크게 증가하였으며 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (540 ± 43.87)은 감소하는 경향이 있었으며 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (369 ± 46.28 ($p < 0.001$))은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

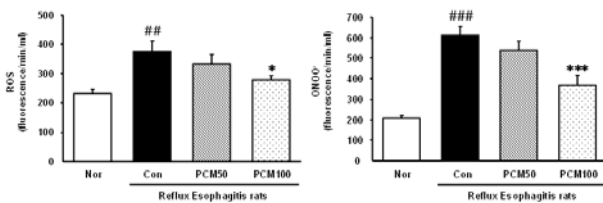


Fig. 4. ROS and ONOO⁻ in serum.

Oxidative stress biomarkers reactive oxygen species(ROS) and peroxynitrite(ONOO⁻) in serum, Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50, reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n = 6 rat per group. Significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. reflux esophagitis rat, reflux esophagitis control group significance was compared to Normal group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4. 식도조직의 SOD, Catalase 및 GPx 단백질 분석

식도 조직에서 western bolt을 실시하여 항산화 관련 단백질인 SOD, Catalase와 GPx를 측정하였다. 그 결과 SOD는 정상군 (1.00 ± 0.11 ($p < 0.05$)) 보다 대조군 (0.79 ± 0.03)은 단백질 발현이 유의성 있게 감소하였다. 대조군에 비하여 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.82 ± 0.04)은 증가하는 경향을 보였으며 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.84 ± 0.06 ($p < 0.05$))은 유의성 있게 높은 발현을 보였다(Fig. 5B).

Catalase에서도 역시 정상군 (1.00 ± 0.14 ($p < 0.01$))에 비하여 대조군 (0.70 ± 0.02)은 단백질 발현이 유의하게 감소하였고, 대조군에 비하여 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.75 ± 0.05)은 증가하는 발현을 보였으며 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.78 ± 0.03 ($p < 0.05$))은 유의성 있게 증가하여 SOD와 같은 양상으로 나타났다(Fig. 5C).

GPx에서는 정상군 (1.00 ± 0.11)에 비하여 대조군 (0.58 ± 0.02 ($p < 0.01$))은 단백질 발현이 크게 감소하였고, 대조군에 비하여 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.64 ± 0.05)은 증가하는 경향을 보였으며 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.86 ± 0.12 ($p < 0.05$)) 또한 유의하게 증가하였다(Fig. 5D).

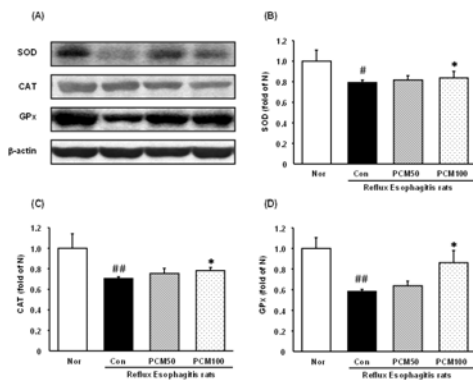


Fig. 5. Expression of anti-oxidant enzyme in esophagus.

Western blot analysis of SOD, CAT, GPx, β -actin expression; (A), SOD; (B), Catalase(CAT); (C), GPx; (D), expression levels in the esophagus, Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50, reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n = 6 rat per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. reflux esophagitis control rat, reflux esophagitis control group significance was compared to Normal group (** $p < 0.01$)

5. 식도조직의 염증성 사이토카인 및 매개인자 발현

식도조직에서 염증성 매개인자인 p-I κ B α 및 NF κ B를 측정하였다. 정상군에서 p-I κ B α 는 1.00 ± 0.15 ($p < 0.05$)로 단백질 발현이 나타났고, 이에 비해 대조군은 1.66 ± 0.16 로 유의하게 증가하였다. 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 및 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군

은 각각 1.38 ± 0.18 , 1.16 ± 0.24 ($p < 0.05$)로 단백질발현이 나타나 감소되었으며, 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군에서 유의성이 나타났다(Fig. 6A).

NF κ B는 정상군에서 1.00 ± 0.13 ($p < 0.01$)으로 발현되었고 대조군은 1.49 ± 0.12 로 나타났다. 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군에서는 1.19 ± 0.09 로 감소되었으며 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군에서는 1.13 ± 0.12 ($p < 0.05$)로 유의하게 감소하였다(Fig. 6B).

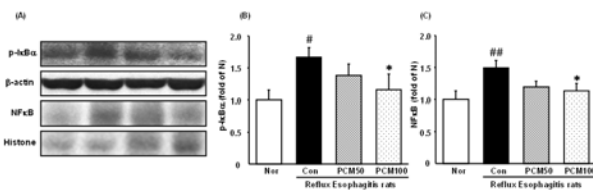


Fig. 6. Expression of inflammation-related proteins in esophagus. Western blot analysis of p-IkBa, NF κ B, β -actin, Histone expression; (A) Phosphorylation inflammation-related proteins NF κ B inhibitor alpha (p-IkBa); (B), nuclear factor kappa B (NF κ B); (C) expression levels in the esophagus. Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, PCM 50 mg/kg body weight reflux esophagitis rat; PCM50, PCM 100 mg/kg body weight reflux esophagitis rat; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n = 6 rat per group. Significance: * $p < 0.05$ vs. induced reflux esophagitis rat, reflux esophagitis control group significance was compared to Normal group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$)

또한 염증성 매개인자인 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6의 발현을 확인한 결과, COX-2의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.18 ($p < 0.05$))에 비해 대조군 (1.35 ± 0.08)은 유의성 있게 증가하였으며, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.13 ± 0.11) 및 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (0.90 ± 0.08 ($p < 0.01$))은 농도의존적으로 감소되었고, 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군에서 유의성이 나타났다(Fig. 7A).

iNOS의 경우 정상군 (1.00 ± 0.18 ($p < 0.01$))에 비해 대조군 (1.71 ± 0.19)은 증가하였으며, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.20 ± 0.06 ($p < 0.05$)) 및 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.17 ± 0.07 ($p < 0.05$)) 모두 유의하게 감소되었다(Fig. 7B).

TNF- α 의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.13 ($p < 0.01$))보다 대조군 (1.63 ± 0.12)에서 유의하게 증가하였고, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.23 ± 0.14)은 감소하는 경향을 보였으며, 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.17 ± 0.17 ($p < 0.05$))은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 7C).

IL-6의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.10 ($p < 0.05$))에 비해 대조군 (1.43 ± 0.17)에서 유의성 있게 증가하였으며, 뿔은감 진피 복합추출물을 50 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.30 ± 0.05) 및 뿔은감 진피 복합추출물을 100 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (1.20 ± 0.09)은 대조군에 비하여 각각 10.00%, 19.16% 감소되었다(Fig. 7D).

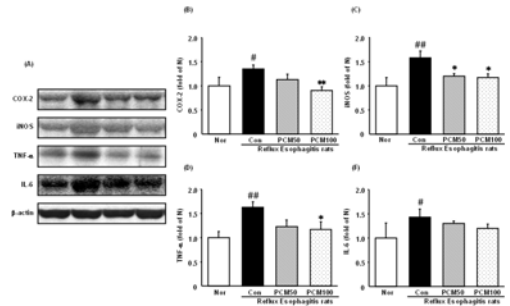


Fig. 7. Expression of inflammation-related proteins in esophagus. Western blot analysis of COX-2, iNOS, IL-6, β -actin expression; (A), inflammation-related proteins cyclooxygenase-2 (COX-2); (B), inducible nitric oxide synthase (iNOS); (C), Tumor necrosis factor- α (TNF- α); (D), interleukin-6 (IL-6); (E), expression levels in the esophagus. Normal rat; Nor, reflux esophagitis rat; Con, reflux esophagitis rat treated with PCM 50 mg/kg body weight; PCM50, reflux esophagitis rat treated with PCM 100 mg/kg body weight; PCM100, PCM was administered at 50, 100 mg/kg body weight 2 hrs prior to induction of RE. After 6 hrs, the effects of PCM treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n = 6 rat per group. Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. reflux esophagitis rat, reflux esophagitis control group significance was compared to Normal group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$)

고찰

역류성 식도염은 위의 내용물이 식도로 역류됨으로서 식도 조직의 손상을 일으키는 질환으로 pH를 조절하거나 위장관의 운동을 조절하는 치료제를 복용함으로써 치료한다. 하지만 한 번 약해진 하부 식도 괄약근은 회복이 쉽지 않아 지속적으로 재발됨으로서 문제가 된다. 이에 따라 위산의 pH를 조절하거나 위장관의 운동을 조절하는 치료제 외의 새로운 치료방법이 필요한 실정이다.

최근, 항산화제가 역류성 식도염에 유효한 효과를 나타낸다는 것이 보고되었으며, 이는 식도에서 발생된 과도한 자유라디칼로 인해 일어나는 식도 점막 손상을 항산화제가 막아줌으로서 증상의 개선효과를 나타내는 것을 말한다¹⁶⁾.

이에 본 연구는 뿔은감 진피 복합추출물의 항산화 효과를 통한 역류성 식도염 개선효과를 연구하여 뿔은감 진피 복합추출물이 역류성 식도염 치료제로서 가지는 가능성을 평가하고자 실시하였다.

급성 역류성 식도염 동물모델에 뿔은감 진피 복합추출물을 단회 투여한 후 부검하여 얻은 혈청 및 식도를 분석하여 그 개선효과를 평가하였다. 부검 후 적출한 위 및 식도를 촬영하고 이미지 분석 프로그램을 통해 식도의 전체 면적 및 염증, 발적, 출혈 부위를 측정하고 정상군에서는 손상부위가 없었으며, 대조군에서는 식도 점막 손상도가 매우 높게 나타났다. 뿔은감 진피 복합추출물 투여군에서는 식도 점막 손상도가 농도의존적으로 감소하였고, 특히 뿔은감 진피 복합추출물 100 mg/kg로 처리한 약물투여군은 유의한 개선효과를 나타내었다.

또한 식도 손상 억제 기전을 밝히기 위하여 수집한 위 내용물의 pH를 측정하고 뿔은감 진피 복합추출물 투여군은 대조군 보다 pH가 증가되었지만 유의한 효과를 얻을 수 없었다. 이는 뿔은감 진피 복합추출물이 위액 분비에 영향을 주지 않고 위산에 변화가 없다는 것을 의미한다.

분리한 혈청에서 항산화 관련 바이오 마커인 ROS 및

ONOO⁻를 측정된 결과 대조군에서는 높은 산화 스트레스를 보였고 뽕은감 진피 복합추출물 투여군에서는 유의하게 감소하였다. ROS의 생성은 세포의 손상을 야기하고 이는 염증발현으로 이어지게 된다¹⁷⁾. 일반적인 자유라디칼의 생성은 여러 효소 반응을 통하여 제거되는데 세포 내의 증가하는 O₂⁻를 SOD가 수거하는 역할을 하고 이 반응에서 생성된 H₂O₂를 Catalase와 GPx가 H₂O로 중화한다¹⁸⁾. 식도조직을 분쇄하여 항산화 효소 단백질인 SOD, Catalase와 GPx의 발현을 측정된 결과, 전체적으로 대조군은 낮은 발현을 보였고 뽕은감 진피 복합추출물 투여군은 유의하게 높은 단백질 발현을 보였다. 이는 뽕은감 진피 복합추출물의 투여가 위산의 pH를 증가시켜 식도의 손상을 억제한다는 것보다 산화 스트레스를 억제함으로써 식도 조직을 보호하는 것으로 유추할 수 있다.

염증성 사이토카인의 발현을 분석한 결과 COX-2, iNOS, TNF- α , IL-6의 발현이 현저히 감소되었고, 이로 인하여 NF κ B의 발현 또한 억제하여 염증이 감소됨을 확인하였으며 p-I κ B α 의 발현 또한 양상이 일치함을 확인하였다. NF- κ B는 면역기능¹⁹⁾과 세포사²⁰⁾ 등 세포활동을 조절하는 전사인자이며, 염증성 질환에 있어 매우 중요한 역할을 한다. I κ B α 는 NF κ B와 결합하여 NF κ B가 핵안으로 이동하는 것을 막아 활성을 억제하며²¹⁾ NF κ B와 I κ B α 는 결합한 후 인산화하여 p-I κ B α 로 나타난다. 즉 NF κ B 및 p-I κ B α 발현의 유의성 있는 감소는 역류성 식도염의 개선효과를 의미하며 이러한 결과는 식도 점막 및 혈청 내 산화스트레스의 감소 결과와 부합된다.

기존 연구 결과, 진피 추출물의 경구투여가 역류성 식도염 모델에서 개선 효과를 보이는 것으로 보고 되었고²²⁾ 뽕은감의 탄닌 성분이 뛰어난 항염증 효과가 있는 것으로 보고 되었으나 뽕은감 진피 복합 추출물의 역류성 식도염 모델 적용 연구는 미비하여 본 실험을 진행하게 되었고 이상의 결과들로 역류성 식도염 동물 모델에서 뽕은감 진피 복합추출물의 경구투여가 항산화효과를 통해 유의하게 염증을 억제함을 확인하였다. 이는 뽕은감 진피 복합추출물이 역류성 식도염 예방 및 개선 한약제제로서의 개발 가능성이 있음을 보여준다.

결론

뽕은감 진피 복합 추출물의 경구 투여가 급성 역류성 식도염 유발 흰쥐의 식도 조직의 손상 억제에 미치는 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직의 육안적인 손상을 유의적으로 감소시켰다.
2. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 위 분비물의 pH 변화에 영향을 주지 않았다.
3. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 혈청의 산화스트레스 바이오마커인 ROS 및 ONOO⁻를 유의하게 감소시켰다.

4. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 항산화와 관련하여 SOD, Catalase 및 GPx 단백질 발현을 유의하게 증가시켰다.
5. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 p-I κ B α 와 NF κ B의 발현을 유의하게 감소시켰다.
6. 뽕은감 진피 복합추출물의 투여는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 COX-2와 iNOS, TNF- α , IL-6의 발현을 유의하게 감소시켰다.

따라서 뽕은감 진피 복합추출물의 투여가 산화스트레스를 억제하여 식도를 보호함으로써 역류성 식도염의 개선에 효과를 보인다고 사료된다.

References

1. Kahrilas PJ, Quigley EM. Clinical esophageal pH recording: a technical review for practice guideline development. *Gastroenterology*, 1996 ; 110 : 1982-96.
2. Park IS, Ham GB, Lim DS. Free acid scavenging and digestive disease diagnosis and treatment, 1993 ; 13(5) : 548-54.
3. Kim JL. Digestive disease. Seoul : Ilchokak, 2000 : 146.
4. Olbe L, Lundell L. Medical treatment of reflux esophagitis. *Hepatogastroenterology* 1992 ; 39(4) : 322-4.
5. Freston JW, Malagelada JR, Petersen H, McCloy RF. Critical issues in the management of gastroesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1995 ; 7 : 577-86.
6. Donnellan C, Preston C, Moayyedi P, Sharma N. Medical treatments for the maintenance therapy of reflux oesophagitis and endoscopic negative reflux disease. *The Cochrane Library*. 2004.
7. Matsuo T, Ito S. The chemical structure of kakin-tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978 ; 42(9) : 1637-43.
8. Seo JH, Jeong YJ, Kim KS. Physiological characteristics of tannins isolated from astringent persimmon fruits. *Korean J Food Sci Technol*, 2000 ; 32(1) : 212-7.
9. The whole country a college of Oriental medicine The joint textbook publish commission compilation. *Herbology*. Seoul : Younglimsa, 2007 : 389-91.
10. Seo BI, Jeong KY. Well-defined galenic pharmacy. Daegu : Daegu hanyu university publishing house, 2007 : 226-7.
11. Hyon JS, Kang SM, Senevirathne M, Koh WJ, Yang TS, Oh MC, Oh CH, Kim SH. Antioxidative

- activities of dried and fresh citrus peels in Jeju. *Korean J Food Cook Sci.* 2010 ; 26(1) : 88-94.
12. Park SH, Yun SH, Kwon YM, Yeom SR, Kwon YD, Shin BC. Anti-Inflammatory Effects of Citrus Unshiu. *J Oriental Rehab Med.* 2005 ; 15(1) : 25-37.
 13. Oriental College textbooks compiled by the National Joint Council. Well-defined galenic pharmacy. 2011 : 390-1.
 14. Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 1999 ; 34(10) : 948-53.
 15. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1994 ; 16(2) : 149-56.
 16. Rao CV, Vijayakumar M. Effect of quercetin, flavonoids and alpha-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008 ; 589 : 233-8.
 17. A Thomson, D Hemphill, KN Jeejeebhoy. Oxidative stress and antioxidants in intestinal disease. *Digestive Diseases.* 1998.
 18. Mladenov M, Gokik M, Hadzi-Petrushev N, Gjorgoski I, Jankulovski N. The relationship between antioxidant enzymes and lipid peroxidation in senescent rat erythrocytes. *Physiol Res.* 2015 ; 64(6) : 891-6.
 19. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994 ; 12 : 141-79.
 20. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol.* 1998 ; 8(3) : 107-11.
 21. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* 1997 ; 20(6) : 252-8.
 22. Lee ST. Effects of Individual Herbal Components of Yijintang-gamibang in the Rat Reflux Esophagitis. *Korean J Orient Int Med.* 2013 ; 34(2) : 165-77.