

## 좌금환이 역류성 식도염 환쥐에 미치는 영향

신민구, 김의수, 김태련, 임현찬, 이영수  
동신대학교 한의과대학 내과학교실

### Effects of *Jwa Kum-Whan* on Reflux Esophagitis in Rats

Min-koo Shin, Eui-su Kim, Tae-ryun Kim, Hyun-chan Lim, Young-su Lee  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study was designed to investigate the effects of *Jwa Kum-Whan* (JKW) on reflux esophagitis in rats.

**Methods:** Forty rats were divided into five groups: a sham group (with no medication and only treated with ventrotomy); a group with reflux esophagitis (RE); a pantoprazole group (treated with 30 mg/kg pantoprazole per day for two weeks); a JKW280 group (treated with 280 mg/kg JKW per day for two weeks); and a JKW560 group (treated with 560 mg/kg JKW per day for 2 weeks). All rats fasted for 24 hrs and then were induced with RE by the oral administration of indomethacin and by a pylorus and forestomach ligation operation. After 8 hrs, the rats were sacrificed. We measured body weight, gastric juice pH, gastric volume, antioxidant activity, and cytokine and made a histologic examination of the esophagus and the stomach.

**Results:** The weights of the rats in each group were not significantly different. The gastric juice pH significantly increased in the JKW560 group and the pantoprazole group compared with the RE group. Gastric volume significantly decreased in the JKW560 group compared with the RE group and the pantoprazole group. SOD activities significantly increased in the JKW280 and JKW560 groups compared with the RE group. Catalase activities significantly increased in the pantoprazole group and the JKW560 group compared with the RE group. TNF- $\alpha$  significantly decreased in the JKW280 and JKW560 groups compared with the RE group. IL-6 significantly decreased in the pantoprazole group and the JKW280 and JKW560 groups compared with the RE group. Histologic examination of the esophagus and the stomach showed significant improvements in the pantoprazole, JKW280, and JKW560 groups compared with the RE group.

**Conclusion:** Based on these results, it is concluded that JKW can prevent reflux esophagitis.

**Key words:** *Jwa Kum-Whan* (Zuojin wan), reflux esophagitis, pantoprazole, gastric volume, catalase, TNF- $\alpha$ , IL-6

### 1. 서론

역류성 식도염은 일반적으로 하부 식도 괄약근 (Lower Esophageal Sphincter)를 통해 식도나 인두

로 위 내용물이 역류하여 일련의 불편한 증상이 발생하거나 식도 조직의 손상 등의 합병증이 유발된 상태를 말한다<sup>1</sup>. 원인은 항역류 벽의 결손으로 인한 하부 식도 괄약근의 기능상실과 위 배출장애, 식도의 연동운동장애 등이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려져 있고<sup>2</sup>, 가슴 쓰림, 산 역류 (acid regurgitation)와 같은 전형적인 증상에서부터 만성기침, 흉통, 쉼 목소리, 목 이물감, 천식 등의 비 전형적인 증상을 나타내고 심할 경우 바렛

- 투고일: 2016.05.27, 심사일: 2016.07.01, 게재확정일: 2016.07.05
- 교신저자: 이영수 광주광역시 남구 월산동 141 동신대학교 광주한방병원.  
TEL: 062-350-7203 FAX: 062-350-7141  
E-mail: hefari92@hanmail.net
- 이 논문은 2016년도 동신대학교 일반대학원 한의학 박사학위 논문임.

식도, 식도암 등의 합병증까지 유발하기도 한다<sup>3</sup>. 우리나라에서는 1990년대까지만 해도 역류성 식도염은 주요 관심질환이 아니었으나 최근 유병률이 점차 증가하고 있는데<sup>4</sup>, 그 원인은 식습관과 생활습관이 점차 서구화가 되고 있고, 비만 인구가 증가했기 때문으로 보고 있다<sup>5</sup>. 역류성 식도염의 치료는 식습관 및 생활습관의 개선<sup>6,7</sup>과 약물 치료, 수술 및 내시경 처치가 적용될 수 있다<sup>8</sup>. 약물은 위산 중화, 항역류 장벽 기능 강화, 위장운동촉진제 등 다양하게 사용하고 있으며, 이러한 약물 및 내과적 치료에 반응하지 않거나 식도주위 헤르니아가 있는 경우에는 외과적 수술 및 내시경 치료를 시행하기도 하지만 치료 효과는 제한적이다<sup>8</sup>.

한의학에서 역류성 식도염은 주로 呑酸, 吐酸, 胸痺, 噎膈 등의 病症과 유사성을 찾을 수 있으며 변증시치에 따라 다양한 처방을 사용하고 있다<sup>9</sup>. 이에 대한 치료 효과를 규명하기 위해 二陳湯加味方, 半夏瀉心湯 등의 복합방<sup>10,11</sup>과 金銀花, 吳茱萸 등의 단미제<sup>12,13</sup>를 이용한 실험적 연구가 보고되고 있다.

左金丸은 朱震亨의 《丹溪心法》<sup>14</sup>에 수록된 肝火를 다스리는 처방으로, 肝鬱化火로 胃失化降하여 된 嘔吐呑酸을 치료한다고 알려져 있다<sup>15</sup>. 또한 최근 중국에서는 역류성 식도염에 左金丸을 다용하고 있음이 보고되고 있으며<sup>16</sup>, 급성 위염<sup>17</sup>, 위암<sup>18</sup>, 십이지장염<sup>19</sup> 등 다양한 연구가 발표되었다.

左金丸은 항산화 및 항균<sup>20</sup>, 항염증<sup>21</sup>, 고지혈증<sup>22</sup>, 장운동 및 위액분비<sup>23</sup>, 간보호<sup>24</sup> 등에 효과가 있다고 실험적으로 밝혀져 있다. 이러한 左金丸의 연구 결과로 미루어 볼 때 역류성 식도염에도 효과가 있을 것으로 사료되지만 현재까지 이에 대한 실험적 연구는 미비한 실정이다. 또한 완고한 위식도역류질환(refractory gastroesophageal reflux disease)은 매우 흔한 질환으로서, 현대 의학의 표준 치료로 시행되는 양성자 펌프 억제제(Proton pump inhibitor, PPI)를 복용해도 치료되지 않는 GERD 환자가 40%까지 이르는 것으로 알려져 있다<sup>25</sup>. 그러므로 한약,

침구 치료 등의 효율적인 보완치료법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이에 저자는 左金丸의 역류성 식도염에 대한 치료 및 억제 효과와 기전을 알아보고자 흰쥐에 左金丸 추출물과 양성 대조군인 Pantoprazole<sup>26</sup>을 투여한 후 indomethacin과 대만부과 날문 결찰 수술로 급성 역류성 식도염을 유도하여 위내용물의 양과 위내 산도, Cytokine 및 항산화 지표와 병태조식학적 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 동 물

본 실험에 사용된 동물은 생후 7주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(체중 200±20 g, (주)샘타코바이오코리아, Korea)를 사용하였으며, 항생제무첨가 사료(삼양프리믹스, 등록성분량 : 조단백질 22.1% 이상, 조회분 8.0% 이하, 조지방 3.5% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상)와 물을 충분히 공급하면서 7일 동안 실험실 환경(실내온도 24±2 °C, 습도 55±5%, 12시간 dark/light)에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 동신대학교 동물실험윤리위원회의 동물실험승인(승인번호 : 2015-10-01-02)을 받아 실시하였다.

#### 2) 약 재

본 실험에 사용된 左金丸은 《丹溪心法》<sup>14</sup>에 준하였으며 동신대학교 부속광주한방병원에서 공급받아 사용하였으며, 구체적인 처방 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Jwa Kum-whan* (JKW)

Herb name	Scientific name	Weight (g)
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	240
吳茱萸	<i>Evodiae Fructus</i>	40
Total amount		280

## 2. 실험방법

### 1) 시료 추출

左金丸 280 g을 1차 증류수 3,000 ml와 함께 약탕기(Daewoong DW-290, Seoul, Korea)에서 2시간 동안 전탕한 다음 추출액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리기(vision, Daejeon, Korea)에서 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 rotary vacuum evaporator(vision, Daejeon, Korea)로 감압 농축하고, 이를 deep freezer(Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)에서 -84 °C로 24시간 동안 얼린 후 freeze dryer(Ilshin, Dongducheon, Korea)로 동결건조하여 33.86 g(수율 약 13.88%)의 건조분말을 얻었으며, 증류수를 이용하여 필요한 농도로 용해시켜 실험에 사용하였다.

### 2) 역류성 식도염 동물 모델 유발

본 실험에서 사용한 역류성 식도염 유발 방법은 역류성 식도염 실험 논문을 참고하였으며<sup>11,27</sup>, 위의 대만(大彎, Greater Curvature)부위와 날문(pylorus) 부위를 결찰하는 방법을 사용하였다.

흰쥐에 사료와 물을 충분히 공급하고 실내온도 24±2 °C, 습도 55±5%, 12시간 dark/light에서 1주간 적응시킨 후 수술 전 24시간 절식시켰다. 위 손상을 가중시키기 위해<sup>28</sup> indomethacin(Sigma, Missouri, USA) 8 mg/kg을 zonde를 이용하여 경구투여한 후 마취제인 isoflurane(Hana Pham, Seoul, Korea)에 2.5%를 O<sub>2</sub> 혼합하여 마취를 시킨 후 복부 중앙을 2 cm 정도 개방하였고, 위의 대만부위를 실크실로 묶었으며, 다시 날문부위를 다른 실크실로 묶은 후 복막과 근육층을 봉합하고 챔버에서 머무르며 회복하게 한 후 case로 옮겼다. 그리고 결찰 수술 6시간 후 흰쥐를 희생시킨 후 역류성 식도염과 관련된 지표를 관찰하였다.

### 3) 실험군 분류

본 실험에서 실험군은 모두 5개 군으로 분류하였으며, 실험동물은 8마리씩 배속하였다. Sham군은 개방한 후 위의 대만부와 날문부를 결찰하지 않고 개방한 부위만 다시 봉합한 군, RE(reflux

esophagitis)군은 대조군으로써 수술하기 2주일 전부터 생리식염수를 투여하고 위의 대만부와 날문부를 결찰한 군, Pantoprazole군은 양성대조군으로써 수술전 2주일 전부터 pantoprazole(Dong-A ST, Seoul, Korea) 30 mg/kg/day을 투여한 후 위의 대만부와 날문부를 결찰한 군, JKW 280군은 수술전 2주일 전부터 左金丸 추출물 280 mg/kg/day을 투여하고 위의 대만부와 날문부를 결찰한 군, JKW 560군은 수술 전 2주일 전부터 左金丸 추출물 560 mg/kg/day을 투여하고 위의 대만부와 날문부를 결찰한 군으로 설정하고 실험을 시작하였다. 左金丸 추출물은 해당 농도를 생리식염수 120 ml에 용해시켜 투여하였다.

### 4) 체중 측정

약물의 투여로 변화하는 체중변화를 관찰하기 위하여 약물 투여하기 직전(1일차), 약물투여 1주 후(7일차), 그리고 약물투여 2주 후(14일차)에 전자저울(CAS, SV-02, Yangju, Korea)을 사용하여 체중을 측정하였다.

### 5) 위내 pH 측정

수집한 위 내용물의 위내 산도를 측정하기 위해 pH paper(Johnson, Oldbury, U.K.)를 이용하여 측정하였고, 측정지를 뽑아서 위 내용물이 담긴 튜브에 담긴 다음 측정색상표와 대조하여 pH값을 기록하였다.

### 6) 위내용물 양(gastric volume)의 측정

흰쥐의 대만부 및 날문부를 결찰한 후 6시간이 지난 다음 동물 마취제인 Zoletile(Virbac, Carros, France) 희석액을 200 g 기준으로 1 ml를 복강주사하여 마취시킨 후 결찰된 위 부분을 적출하였다. 이후 phosphate buffer saline(PBS) 1 ml로 위내부를 세척하고 내용물을 수집하여 5분간 2000 rpm로 원심분리한 후 부피를 측정하였다.

### 7) Cytokine 및 항산화 지표 측정

마취된 흰쥐에서 심장천자를 통해 5 ml 정도의 혈액을 채취하였으며, 이를 튜브에 옮긴 다음 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 튜브의 상층액을

serum separator를 이용하여 1.5 ml 마이크로 튜브에 옮겨 담은 후 -80 °C 냉동 보관하였다. 이 혈청을 시료로 하여 cytokine은 TNF- $\alpha$ (abcam, Cambridge, USA), IL-6(abcam, Cambridge, USA)를 측정하였고, 항산화 지표로는 SOD(Dojindo, Kumamoto, Japan), Catalase(abcam, Cambridge, USA)를 assay kit을 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 수행하였고, 분석기기는 Elisa reader(BioRad, California, USA)를 이용하였다.

8) 병태조직학적 관찰

흰쥐에서 위와 식도 전체를 분리하고 이것을 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정하였다. 멸균된 생리식염수에 하루 이상 담근 후 50% ethanol에서 1시간, 70% ethanol에서 1시간, 80% ethanol에서 1시간, 95% ethanol에서 1시간씩 탈수시켰고, 100% ethanol에서는 1시간씩 3회 정도 반복적으로 탈수시켰다. 그리고 Alcohol:Xylen(1:2비율)에 1시간, Xylene에서 1시간 다시 Xylene에서 1시간 반복한 후 paraffin:Xylene(1:1 비율)에 1시간, paraffin:Xylene(1:2비율)에 1시간, paraffin:Xylene(1:3비율)에 1시간, 다시 paraffin에서 1시간을 침윤시킨다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 6  $\mu$ m의 두께로 박절하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 Hematoxylin(Sigma, Missouri, USA) & Eosin(Sigma, Missouri, USA)으로 염색을 하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium(Sigma, Missouri, USA)을 떨어뜨린 후 조직과 cover glass 주위에 공기가 생기지 않도록 주의하면

서 cover glass를 덮어 영구보존할 수 있도록 하였고 조직의 사진 촬영은 I-Solution lite 프로그램(Innerview, Seongnam, Korea)을 이용하였다.

3. 통계 분석

실험 결과에 대한 분석은 통계 프로그램인 IBM SPSS statistics(IBM, New York, USA)을 사용하였다. 실험 결과값의 표기는 평균과 표준편차(mean $\pm$ SD)로 표기하였다. 평균값의 비교는 일원배치분산 분석(one-way ANOVA)로 검정하였으며, 사후검정은 Tukey test를 이용하였고 p-value가 0.05 미만인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결 과

1. 체중 변화

각각의 군에 약물을 투여하기 전, 약물투여 7일 경과 후 그리고 14일 경과 후 총 3회에 걸쳐 흰쥐의 체중을 측정하였다. 측정 결과, 모든 군 간에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

2. 위산도 측정결과

2주간 약물을 투여하고 위 결찰을 통해 역류성 식도염을 일으킨 후 희생시킨 실험군들의 위내용물 수집하여 pH를 측정한 결과, JKW 560군과 양성대조군인 Pantoprazole군이 대조군인 RE군에 비해 pH값이 유의성 있게(p<0.05) 증가 되었다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. The Effects on Gastric Juice pH in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n=8)	Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560	
Gastric juice (pH)	Mean	3.9	2.0	3.4*	2.7	3.1*
	SD	0.43	0.41	0.49	0.46	0.53

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean $\pm$ SD of eight rats.

\* : Statistically significance compared with RE group (\* : p<0.05).

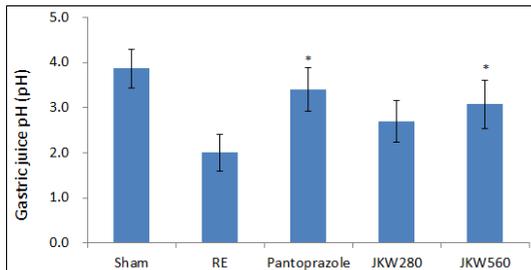


Fig 1. The effects on gastric juice pH in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered

(280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats. \* : Statistically significance compared with RE group (\* : p<0.05).

### 3. 위내용물 양(Gastric volume) 측정 결과

적출한 위를 절개한 후 위를 PBS로 세척하고 내용물을 수집한 후 이의 부피를 측정된 결과, JKW 280군과 JKW 560군이 대조군인 RE군과 양성 대조군인 Pantoprazole군 보다 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다(Table 3, Fig. 2).

Table 3. The Change of The Gastric Volume in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n = 8)		Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560
Gastric volume (mg/kg)	Mean	0.8	1.9	1.5	0.8***	0.6***
	SD	0.29	0.25	0.28	0.29	0.25

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* : p<0.01).

\* : Statistically significance compared with Pantoprazole group (\* : p<0.05).

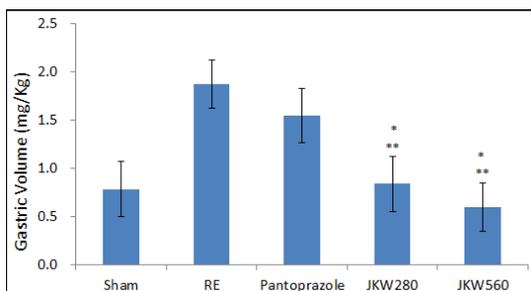


Fig. 2. The change of the gastric volume in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated

group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* : p<0.01).

\* : Statistically significance compared with Pantoprazole group (\* : p<0.05).

### 4. SOD 측정 결과

항산화 지표인 SOD 활성도를 측정된 결과, JKW 280군과 JKW 560군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 증가하였다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. The Change of SOD Activities in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n=8)		Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560
SOD (U/mg)	Mean	93.23	86.56	92.10	94.68**	95.89**
	SD	4.80	3.89	1.81	4.54	4.39

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* ; p<0.01).

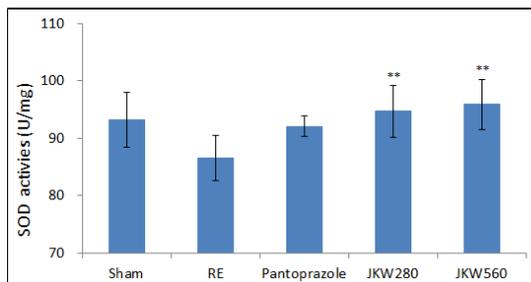


Fig. 3. The change of SOD activities in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group,

JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* ; p<0.01).

#### 5. Catalase 측정 결과

항산화 지표인 catalase의 변화를 측정된 결과, JKW 560군과 양성대조군인 Pantoprazole군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 증가하였다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. The Change of Catalase Activities in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n=8)		Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560
Catalase (U/mg)	Mean	19.63	11.14	18.10**	14.78	17.78**
	SD	2.30	2.86	3.28	0.78	3.34

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* ; p<0.01).

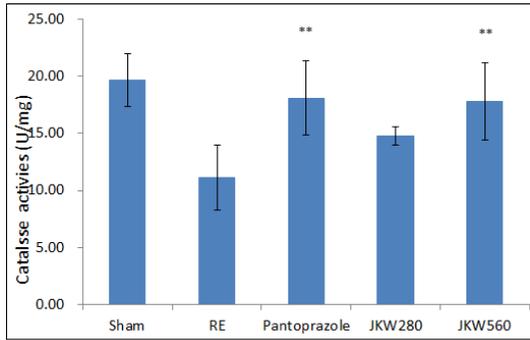


Fig. 4. The change of catalase activities in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered

(30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* : p<0.01).

#### 6. TNF-α 측정 결과

염증과 관련된 cytokine인 TNF-α의 변화를 측정 한 결과, JKW 280군(p<0.01)과 JKW 560군(p<0.05)이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Table 6, Fig. 5).

Table 6. The Change of TNF-α in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n=8)		Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560
TNF-α	Mean	1.527	1.718	1.610	1.586**	1.595*
(pg/ml)	SD	0.132	0.065	0.014	0.014	0.011

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* : p<0.01).

\* : Statistically significance compared with RE group (\* : p<0.05).

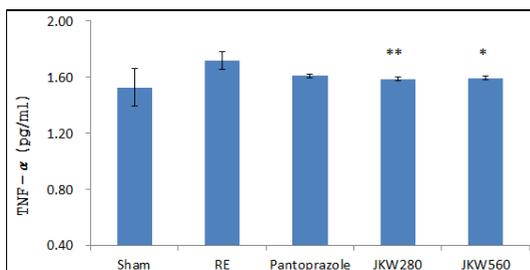


Fig. 5. The change of TNF-α in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered

(280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean±SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* : p<0.01).

\* : Statistically significance compared with RE group (\* : p<0.05).

#### 7. IL-6 측정 결과

염증과 관련된 cytokine인 IL-6의 변화를 측정 한 결과, JKW 280군, JKW 560군, 양성대조군인 Pantoprazole군 모두에서 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다(Table 7, Fig. 6).

Table 7. The Change of IL-6 in Reflux Esophagitis Rats

Characteristics (n=8)		Sham	RE	Pantoprazole	JKW280	JKW560
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Mean	1.690	1.832	1.720**	1.695**	1.677**
	SD	0.029	0.043	0.056	0.052	0.048

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean $\pm$ SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* ; p<0.01).

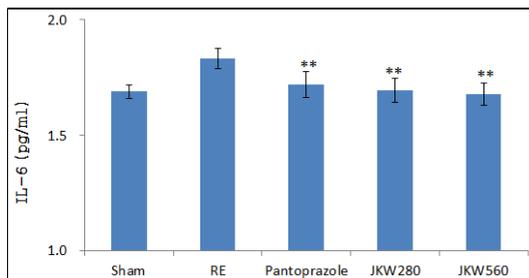


Fig. 6. The change of IL-6 in reflux esophagitis rats.

Sham : only treated ventrotomy group, RE : saline administered and stomach ligation treated group, Pantoprazole : Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW280 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group, JKW560 : *Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group. Values are represented as mean $\pm$ SD of eight rats.

\*\* : Statistically significance compared with RE group (\*\* ; p<0.01).

### 8. 식도 점막 조직학적검사 결과

희생시킨 흰쥐의 식도를 절제한 후 조직 슬라이드를 이미지로 캡처한 다음 관찰한 결과, 식도에서는 RE 군에서는 궤양, 염증세포 침윤, 출혈과 점막의 국소적 탈락과 함께 점막하조직층의 부종성 변화가 보였으며 JKW 280군과 JKW 560군 및 Pantoprazole군에서는 RE군에 비해 궤양, 침윤 및 출혈 등의 현저한 감소가 관찰되었다(Fig. 7).

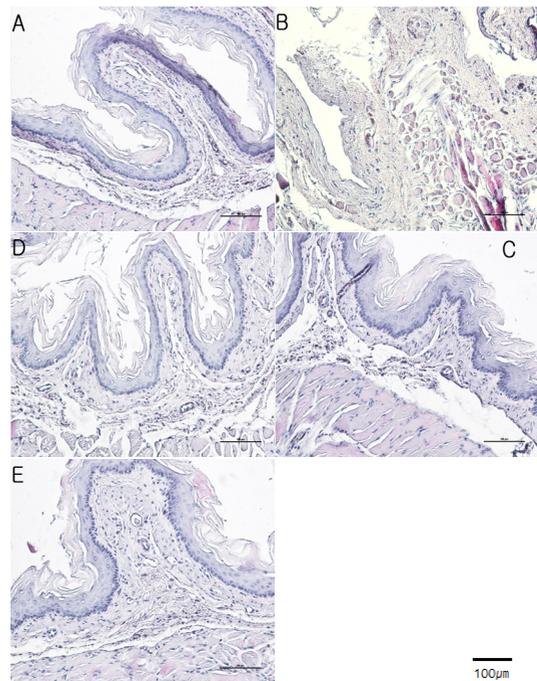


Fig. 7. The effects on esophageal mucosa damage in reflux esophagitis rat (x20).

A : Sham group (only treated ventrotomy group)  
 B : RE group (saline administered and stomach ligation treated group)  
 C : Pantoprazole group (Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)  
 D : JKW280 group (*Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)  
 E : JKW560 group (*Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)

### 9. 위 점막 조직학적 검사 결과

희생시킨 흰쥐의 위를 절제한 후 각각의 조직 슬라이드를 이미지로 캡처한 다음 관찰한 결과, RE 군의 위 점막에서는 광범위한 점막의 탈락과 출혈이 진행되었지만 JKW 280군과 JKW 560군 및 Pantoprazole군에서는 RE 군에 비해 궤양, 침윤 및 출혈 등의 현저한 감소가 관찰되었다(Fig. 8).

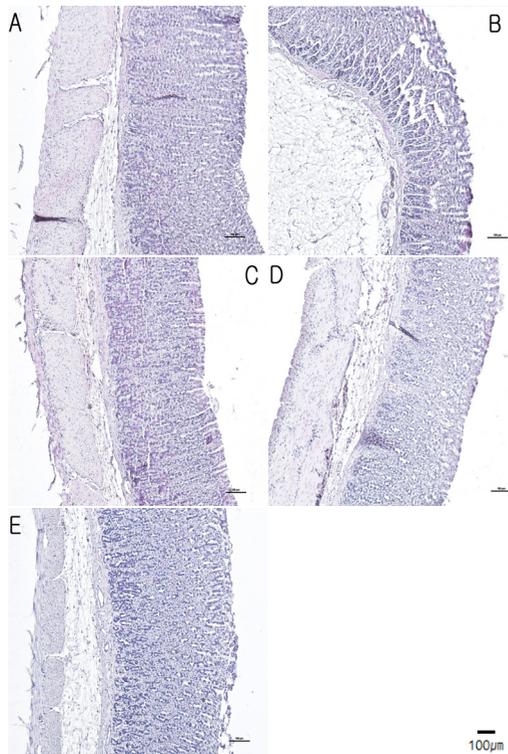


Fig. 8. The effects on stomach mucosa damage in reflux esophagitis rat (x10).

- A : Sham group (only treated ventrotomy group)
- B : RE group (saline administered and stomach ligation treated group)
- C : Pantoprazole group (Pantoprazole administered (30 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)
- D : JKW280 group (*Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (280 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)
- E : JKW560 group (*Jwa Kum-Whan* (JKW) administered (560 mg/kg/day) and stomach ligation treated group)

### IV. 고찰

한의학에서 역류성 식도염은 주로 呑酸, 吐酸, 胸痺, 噎膈 등의 병증으로 보고 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆 등으로 변증하여 각각 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 등의 처방을 응용한다<sup>9</sup>.

左金丸은 《丹溪心法》<sup>14</sup>에 수록된 처방으로 황련과 오수유가 각각 6:1의 비율로 구성되어 있고 “瀉肝火 行濕爲之反佐 開痞結 治肝邪 可助補脾藥” 한다고 하였다.

황련은 미나리아재비과(毛茛科, Ranunculaceae)에 속하는 多年生 草本인 日黃連 *Coptis japonica* Makino, 味連 *C. chinensis* Franch., 三角葉黃連 *C. deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao 또는 雲連 *C. teeta* Wall.의 根莖으로 性은 寒하고 味는 苦하며 淸熱燥濕, 瀉火心煩, 瀉火解毒의 효능이 있어서 濕熱痞滿, 嘔吐吞酸, 瀉痢 등을 치료한다고 하였다<sup>15</sup>. 황련의 실험적 연구로 항균<sup>29</sup>, 항염증<sup>30</sup>, 항산화<sup>31</sup> 등의 효과가 있음이 밝혀졌다.

오수유는 운향과(芸香科, Rutaceae)에 속한 落葉灌木 혹은 小喬木인 오수유 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth, 石虎 *E. rutaecarpa* Benth. var. *officinalis* Hunang 혹은 毛茛吳茱萸 *E. rutaecarpa* Benth. var. *bodineri* Huang의 미성숙 과실로 性은 熱하고 味는 辛苦, 有毒하며 散寒止痛, 降逆止嘔, 助陽止瀉의 효능이 있어서 厥陰頭痛, 寒疝腹痛, 嘔吐吞酸 등을 치료한다고 하였다<sup>15</sup>. 오수유의 실험적 연구로 항산화<sup>32</sup>, 항염증<sup>33</sup>, 항균<sup>34</sup> 등의 효과가 있음이 밝혀졌다.

따라서 황련과 오수유로 구성된 左金丸은 항산화 및 항염증 등의 작용을 통해 역류성 식도염을 억제하는 효과가 있음을 유추 할 수 있고, 최근 중국에서도 역류성 식도염에 左金丸을 사용하는 레가 보이고 있다<sup>16</sup>. 그러나 아직까지 역류성 식도염에 대한 左金丸의 효과에 대한 연구는 보이지 않았다.

이에 저자는 左金丸 1첩 분량(280 g)과 2배 용

량인 2첩 분량(560 g)을 추출하였고, 左金丸의 역류성 식도염 치료 효과를 확인하기 위해 역류성 식도염 실험 논문을 참고하여<sup>11</sup> 흰쥐에게 역류성 식도염을 유발하였으나, 예비 실험 결과 흰쥐의 역류성 식도염 유발 정도가 미흡하여 左金丸의 역류성 식도염의 억제 효과를 확인으로 하였다. 이에 흰쥐의 날문·대만부 결찰하여 식도염을 유발하였고, 위 손상을 가중시키기 위해 indomethacin을 경구 투여 하였다. 그리고 수술 2주전부터 左金丸을 280 mg/kg/day, 560 mg/kg/day씩 경구 투여하였고, 날문·대만부 결찰수술 6시간 후 실험동물을 희생하여 위내 산도, 위 내용물의 양, Cytokine 및 항산화 지표, 병태조직학적 변화를 관찰하였다.

역류성 식도염의 치료에는 비만으로 인한 지속적인 위식도 압력 상승으로 하부 식도 괄약근이 이완될 때 쉽게 위산이 역류할 수 있는 환경이 조성되기 때문에 체중 관리가 중요하다<sup>35,36</sup>. 따라서 체중의 변화를 측정하여 체중 감소 효과가 있는지 살펴보았으나 모든 군 간에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

위산은 역류성 식도염을 유발하는 중요한 인자 중 하나이므로<sup>37</sup>, 역류성 식도염의 치료에 있어 위내 pH 조절이 중요하다<sup>38</sup>. 이에 위내 pH를 측정 한 결과 JKW 560군과 Pantoprazole군에서 대조군에 비해 유의성 있게 pH값이 증가 하였다.

식도의 연동운동이 저하되거나 위마비 또는 위출구 폐쇄 부전으로 위 내용물이 위장 내에 축적되는 것도 위 내용물이 식도로 역류하는 원인 중 하나이다<sup>35,39</sup>. 이에 위 내용물의 양을 측정 한 결과 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군과 Pantoprazole군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

최근 역류성 식도염의 원인 중 하나로 활성 산소가 제시 되었고<sup>40</sup>, 실험을 통해서 항산화제가 역류성 식도염 치료에 효과가 있음이 밝혀졌다<sup>41</sup>. 이에 항산화 방어인자를 관찰하기 위해 항산화 효소(superoxide dismutase, catalase) 및 내인성 항산화제(glutathione), 지질과산화(lipid peroxidation)의 측정으로 평가했다<sup>42</sup>.

실험 결과 SOD 활성도는 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였고, catalase 활성은 JKW 560군과 Pantoprazole군이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 그러나 lipid peroxidation과 Total glutathione은 모든 군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

역류성 식도염은 염증성 cytokine의 증가를 동반하는데, 이런 cytokine은 식도의 운동 이상을 야기한다<sup>43</sup>. 또한 심각한 식도염에서 Anti-TNF- $\alpha$  치료를 한다<sup>44</sup>. 이에 염증과 관련된 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 변화를 측정 한 결과 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 관찰되었고, IL-6의 변화를 측정 한 결과 JKW 280군, JKW 560군, Pantoprazole군 모두에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 관찰되었다.

역류성 식도염은 식도 점막에 발적, 미란, 궤양, 출혈 등을 일으키는데<sup>45</sup>, 식도 및 위점막의 병변은 역류성 식도염 평가에 기본적인 지표로 사용된다<sup>46</sup>. 역류성 식도염으로 인한 식도 점막과 위 점막을 H&E 염색 표시한 후 관찰한 결과, 궤양, 염증세포 침윤, 출혈과 점막의 국소적 탈락, 점막하조직층의 부종성 변화를 보인 대조군에 비해 JKW 280군, JKW 560군, Pantoprazole군에서 모두 궤양, 침윤 및 출혈 등의 현저한 감소가 관찰되었다.

결론적으로 위 내용물 양 감소, 위산 분비 억제, 항산화 작용 및 항염증 작용을 통해 左金丸은 날문·대만부 결찰로 유발된 역류성 식도염 모델에 매우 효과적인 것으로 관찰되었으며, 특히 양성대조군인 pantoprazole군과 유사한 위 손상 억제 효과가 인정되었다. 이는 임상적으로 관해와 악화를 반복하는 역류성 식도염을 左金丸을 활용하여 효과적으로 관리할 수 있을 것으로 판단된다. 다만 기존 연구와 비교해서 pepsin 분비 및 위장 보호 효과와 하부식도괄약근의 수축 조절에 대한 연구, 左金丸의 용량 별 효능 및 그 기전과 화학성분에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단되며, 특히 PPI 제제에 반응하지 않은 역류성 식도 질환에 대해 한의학적

치료에 대한 지속적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

左金丸의 2주간 투여가 날문·대문부 결찰 및 indomethacin 투여로 유도된 식도염 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보기 위하여 체중, 위 산도, 위 내용물의 양, 항산화 지표 및 cytokine, 조직학적 변화를 관찰하였다. 그 결과, 체중은 유의성이 있는 변화는 없었으나, 위 내 pH를 측정된 결과 JKW 560군과 Pantoprazole군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 증가하였고, 위 내용물 양을 측정된 결과 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군인 RE군과 Pantoprazole군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, SOD 활성도를 측정된 결과 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 또한, Catalase 변화를 측정된 결과 JKW 560군과 Pantoprazole군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 증가되었으며, TNF- $\alpha$  변화를 측정된 결과 JKW 280군과 JKW 560군이 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 감소되었고, IL-6 변화를 측정된 결과 JKW 280군, JKW 560군, Pantoprazole군 모두에서 대조군인 RE군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 마지막으로 조직병리학적 변화를 관찰한 결과 JKW 280군, JKW 560군, Pantoprazole군 모두에서 대조군인 RE군에 비해 현저한 조직병리학적 개선 효과가 관찰됨을 볼 수 있었다. 따라서, 左金丸의 항산화와 항염증 효과 및 식도와 위점막의 손상을 억제할 수 있는 실험 결과를 통하여 역류성 식도염의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Kahrilas PJ. GERD pathogenesis, pathophysiology,

and clinical manifestations. *Cleve Clin J Med* 2003;70(suppl 5):4-19.

2. Seo KW, Yoon KY. Surgical Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Korean J Gastroenterol* 2013;61(3):177-9.
3. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101(8):1900-20.
4. Lee KJ. Underlying Mechanisms and Management of Refractory Gastroesophageal Reflux Disease. *Korean J Gastroenterol* 2015;66(2):70-4.
5. Yoo SS, Lee WH, Ha J, Choi SP, Kim HJ, Kim TH, et al. The Prevalence of Esophageal Disorders in the Subjects Examined for Health Screening. *Korean J Gastroenterol* 2007;50(5):306-12.
6. Choi SY. The Role of Diet and Lifestyle Measures in the Pathogenesis and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. *Korean J Gastroenterol* 2001;37(3):224-5.
7. 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.
8. Kim JH, Kim BJ, Kim SW, Kim SE, Kim YS, Sung HY, et al. Current Issues on Gastroesophageal Reflux Disease. *Korean J Gastroenterol* 2014;64(3):127-32.
9. The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. internal medicine of spleen. Seoul: Koonja press; 2008, p. 317.
10. Kim HJ, Lim SY, Kwak MA, Kim DJ, Byun JS. Effects of Yijintang-gamibang on Reflux Esophagitis Induced by Pylorus and Forestomach Ligation in Rat. *Korean J Orient Int Med*

- 2010;31(1):128-41.
11. Jang MW, Lim SW. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *Korean J Orient Int Med* 2013; 34(4):362-74.
  12. Lee YJ, Park JH, Roh SS. Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Lonicerae Flos Extract. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2010;24(6):970-5.
  13. Kim DJ, Roh SS. Effect on Acute reflux Esophagitis by Evodiae Fructus Aquous Extract. *Kor J Herbology* 2012;27(1):51-8.
  14. Ju JH. Dangyeeuijip. Beijing: Inminwisaeng press; 1995, p. 219, 470.
  15. The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. The herbal medicine. Seoul: Younglimsa; 2008, p. 218-9, 379, 380.
  16. Choi GY, Sun SH, Kim BW, Lee SJ, Oh HS, Han IS, et al. Literature Review on Syndrome Differentiation and Herbal Medicine of Reflex Esophagitis -Focusing on Chinese Journals-. *Korean J Orient Int Med* 2011;32(1):75-86.
  17. Wang J, Zhang T, Zhu L, Ma C, Wang S. Anti-ulcerogenic effect of Zuojin Pill against ethanol-induced acute gastric lesion in animal models. *J Ethnopharmacol* 2015;173:459-67.
  18. Peng QX, Cai HB, Peng JL, Yung KL, Shi J, Mo ZX. Extract of Zuojin Pill(左金丸) induces apoptosis of SGC-7901 cells via mitochondria-dependent pathway. *Chin J Integr Med* 2015; 21(11):837-45.
  19. Chen X, Wan ZQ, Han GC, Wang JD, Zhao Z, Zhou P. [Study on efficacy of liujunzi decoction combined with zuojin pills in treating acute radioactive duodenitis and their mechanism]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2014;39(2):278-84.
  20. Jeon SA. Antibiotic, Antioxidant, Whitening effects of Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan. *Graduate School of Wonkwang University* 2014.
  21. Seong MJ. Anti-inflammatory effect of Joakeumwhan. *Graduate School of Wonkwang University* 2008.
  22. Kim YH, Seng NS, Lee YJ. The Effects of Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan on the Hyperlipidemia in Rats. *Kor J Herbology* 2005; 20(2):91-102.
  23. Choi DH, Moon G, Moon SJ. Effects of Joakeumwhan(左金丸) Extract on Motility of Intestine and Gastric Secretion. *The Journal of Wonkwang Oriental Medicine* 2005;3(1): 133-47.
  24. Choi OC, Lai YS, Park SD. Effect of Joagumhwan and its components on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Kor J Herbology* 2004; 19(4):67-79.
  25. Fass R, Gasiorowska A. Refractory GERD: what is it?. *Curr gastroenterol Rep* 2008;10(3): 252-7.
  26. Shukla K, Raj P, Kumar A, Kumar M, Kaithwas G. Effect of Monotherapy and Combination Therapy of Pantoprazole and Aprepitant in Gastric Esophageal Reflux Disease in Albino Rats. *Scientific World Journal* 2014; 2014:1-7.
  27. Choi BH, Kwak MA, Kim DJ, Byun JS. Suppressive Effects of Yijintang-gamibang on Reflux Esophagitis. *J Korean Oriental Med* 2010;31(5):64-81.
  28. Hwang IK. Establishment of Functionality Evaluation System for Health Functional Food on Gastrointestinal Tract. Seoul: Graduate school of Seoul National University; 2003, p. 69-70.
  29. Choi MS. Antimicrobial Effects of Scutellaria baicalensis, Coptis chinensis, and Phellodendron amurense. *Graduate School of Small Business*

- Soongsil University* 2010.
30. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. Anti-inflammatory Effect of Coptidis Rhizoma. *Kor J Herbology* 2009;24(3):79-86.
  31. Kim YJ, Lee MJ, Park JW, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Antioxidant Activity of Water-Extract from Coptis chinensis Franch. *Korean Journal of Life Science* 2000;10(3):241-6.
  32. Lee HJ. Anti-oxidative activity of evodiae fructus MeOH extract. *Graduate school of Chung-ang University* 2007.
  33. Kum SY. Anti-inflammatory and anti-migration effect of methanol extract of Evodia officinalis DODE in HASMC. *Graduate school of Dongguk University* 2009.
  34. Jeon ES, Han MD, Kim HD. Antimicrobial Activity of Streptococcus mutans by Schizandrae fructus and Evodiae fructus extracts. *Journal of Dental Hygiene Science* 2003;3(1):39-44.
  35. Papadakis MA, McPhee SJ, Rabow MW. Current Medical Diagnosis & Treatment. New York: McGraw-Hill Education; 2015. p. 590-5.
  36. Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Med* 1999;106(6):642-9.
  37. DeMeester TR, Wernly JA, Bryant GH, Little AG, Skinner DB. Clinical and in vitro analysis of determinants of gastroesophageal competence: a study of the principles of antireflux surgery. *Am J Surg* 1979;137(1):39-46.
  38. Hunt RH. Importance of pH control in the management of GERD. *Arch Intern Med* 1999;159(7):649-57.
  39. Gaynor EB. Otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 1991;86(7):801-8.
  40. Wetscher GJ, Hinder RA, Bagchi D, Hinder PR, Bagchi M, Perdakis G, et al. Reflux esophagitis in humans is mediated by oxygen-derived free radicals. *Am J Surg* 1995;170(6):552-7.
  41. 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(1):233-8.
  42. Cho SY. Effects of platycodin D on the reflux esophagitis by modulating antioxidant defense systems. *Graduate School of Daegu Haany University* 2014.
  43. Rieder F, Cheng L, Harnett KM, Chak A, Cooper GS, Isenberg G, et al. Gastroesophageal reflux disease - associated esophagitis induces endogenous cytokine production leading to motor abnormalities. *Gastroenterology* 2007;132(1):154-65.
  44. Straumann A, Bussmann C, Conus S, Beglinger C, Simon HU. Anti-TNF- $\alpha$ (infliximab) therapy for severe adult eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(2):425-7.
  45. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine 18th edition. New York: McGraw-Hill Professional; 2011. p. 1906-8.
  46. Nagahama K, Yamato M, Nishio H, Takeuchi K. Essential role of pepsin in pathogenesis of acid reflux esophagitis in rats. *Dig Dis Sci* 2006;51(2):303-9.