

## 위궤양 유발 마우스모델에서 薑黃 추출물의 위 보호 효과

오민혁<sup>1#</sup>, 김민주<sup>1#</sup>, 신미래<sup>1</sup>, 박해진<sup>2</sup>, 서부일<sup>1</sup>, 노성수<sup>1\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

2 : 대구한의대학교 산학협력단 DHU 바이오융복합시험센터

### Gastroprotective Activity of Curcuma Longae Rhizoma against Gastric Ulcer in Mice

Min Hyuck Oh<sup>1#</sup>, Min Ju Kim<sup>1#</sup>, Mi-Rae Shin<sup>1</sup>, Hae-Jin Park<sup>2</sup>, Bu-Il Seo<sup>1</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1\*</sup>

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

2 : DHU Bio Convergence Testing Center, Republic of Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : The objective of this study was to evaluate the gastric protective effect of Curcuma Longae Rhizoma (CLR) in 150 mM HCl/60% ethanol induced gastric ulcer (GU) in mice.

**Methods** : Forty ICR mice were divided into five groups (n=8/Group): Nor group; Normal, Veh group; GU control, SC group; GU + sucralfate 10 mg/kg, CL; GU + CLR 30% ethanol extract 100 mg/kg, CH group; GU + CLR 30% ethanol extract 200 mg/kg. Then, mice were orally administered with 150 mM HCl/60% ethanol and caused GU. After 1 hr, mice were sacrificed, and blood and stomach tissue were collected.

**Results** : CLR showed significance scavenging effects in 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activities (DPPH IC<sub>50</sub>; 78.18 ± 0.60 µg/ml, ABTS IC<sub>50</sub>; 55.91 ± 1.86 µg/ml). CLR significance reduce inflammatory-related factors such as cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 1 beta (IL-1β), and interleukin-6 (IL-6) via nuclear factor kappa B (NF-κB) inactivation. In addition, the activation of nuclear factor erythroid2-related factor 2 (Nrf2) significantly led to up-regulation of anti-oxidant enzymes including factors heme oxygenase-1 (HO-1), super oxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2).

**Conclusions** : Our discovery provides that CLR possesses anti-oxidant and anti-inflammatory effects. Hence, CLR may ameliorate the development of gastric ulcer though the inhibition of NF-κB inflammatory pathway and the elevation of Nrf2 anti-oxidant pathway.

**Key words** : Curcuma Longae Rhizoma, Gastric ulcer, anti-oxidant, anti-inflammatory.

## I. 서론

위장관(Gastrointestinal tract)의 기관 중 위는 분문부, 기저부 및 유문부 세 부분으로 이루어져 있으며<sup>1)</sup> 이 중 기저

부에 위치한 점막층(mucosal layer)은 식이성 단백질 및 세균 항원으로 대표되는 다양한 항원 물질에 지속적으로 노출되어 있다<sup>2)</sup>. 위점막의 염증성 손상은 위 점막을 보호하는 방어인자(defense factor)와 손상시키는 공격인자(offense factor) 사

\*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Min Hyuck Oh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : gjo53@naver.com

Min Ju Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com

· Received : 01 April 2020 · Revised : 15 May 2020 · Accepted : 25 May 2020

이의 균형이 항염증제, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 담즙, 산, 알콜 같은 다양한 인자에 의해 깨지면서 발생하게 된다<sup>1)</sup>.

전 세계적으로 약 10%의 사람들이 소화성 궤양으로 고통 받고 있으며 유병률이 증가함에 따라 소화성 궤양은 전 세계에서 가장 심각한 위장관 질환 중 하나로 급부상하고 있다<sup>3)</sup>.

많은 연구에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 위궤양의 발병에서 중요한 요인으로 보고되어 있다<sup>4)</sup>. ROS에는 슈퍼옥사이드 이온(superoxide anion,  $O_2^-$ ), 과산화수소(Hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ), 그리고 하이드록시 라디칼(hydroxyl radical,  $OH^-$ )이 해당한다. 정상적인 상태에서는 산화 작용이 유해한 작용을 끼치지 않지만 산화적 스트레스가 발생했을 시 과도한 ROS가 발생하여 체내의 항산화 체계의 불균형이 이루어지게 되어 이로 인해 위궤양과 같은 인체에 해로운 질환을 발생시키게 된다.

현재 위궤양 치료를 위해 cimetidine, famotidine, ranitidine, nizatidine 등과 같은  $H_2$ -receptor antagonist와 omeprazole, lansoprazole, pantoprazole, rabeprazole 등과 같은 proton pump inhibitors(PPIs)가 주로 처방되고 있다<sup>5-6)</sup>. 하지만 이러한 치료제는 위장 장애를 일으키거나, 발진, 가려움, 두드러기 등의 부작용뿐만 아니라 일부 위궤양 및 만성 난치성 위염에 대해서는 치료의 한계를 보이는 경우가 발생하고 있다<sup>7-8)</sup>. 따라서 약물의 부작용은 낮으면서 안전하게 사용할 수 있는 제제의 개발이 시급하다.

생강과(Zingiberaceae)에 속해있는 薑黃(*Curcuma Longae Rhizoma*)은 강황(*Curcuma longa*)의 뿌리줄기를 건조한 것<sup>9)</sup> 원산지는 인도이고 동남아시아지역에서 재배되는 다년생 식물이다. 강황은 카레와 같은 향신료식품 또는 황색염료로 쓰이고 한의학에서 강황은 破血行氣, 通經止痛의 효능이 있어 風濕痺痛, 關節不利, 活血祛瘀藥, 혈액순환에 쓰인다<sup>10-11)</sup>. 강황에 함유 되어 있는 성분으로는 curcumin과 그 유도체인 demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin 등 curcuminoid 색소성분, turmerone, zingiberene, ar-turmerone 등 휘발성 정유성분이 있다<sup>9, 12-15)</sup>. 그 중 주요 성분인 curcumin은 항염, 항산화, 항균작용, 항암, 항돌연변이, 혈중지질 강하, 간 보호, 소화기 및 심혈관계에 대한 작용으로 보호 작용 등과 같은 약리 효능이 알려져 있다<sup>16-17)</sup>.

현재, 강황의 위궤양 동물 모델에서의 위점막 손상에 대한 억제 기전 연구는 미흡하다. 이에 본 연구자는 염산-에탄올로 유발이 된 급성 위궤양 동물모델을 이용하여 강황의 위점막 보호 효능을 평가하였고, 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

ICR 마우스 6주령 수컷 40마리를 오리엔트(경기, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건으로는 conventional system으로

온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ , 명암주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며 사료와 물을 충분히 공급하였다. 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee:IACUC)의 승인(승인번호:DHU 2020-013)을 받았다.

#### 2) 시료

본 실험에 사용한 강황(*Curcuma Longae Rhizoma*)은 용기한약국(대구, 한국)에서 구입하였고 생약규격집에 맞추어 관능검사를 하였으며 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, IL, UK)에서 구입하였고, Phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B( $p-I\kappa B\alpha$ ), inhibitor of nuclear factor kappa B( $I\kappa B\alpha$ ) phosphorylation of nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa B$ ), inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6), nuclear factor erythroid2-related factor 2(Nrf2), heme oxygenase-1(HO-1), glutathione peroxidase-1/2(GPx-1/2), super oxide dismutase(SOD), Histone,  $\beta$ -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, protease inhibitor mixture, DMSO, ethylene diaminetetra acetic 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 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

강황 200 g을 분쇄한 후, 10배의 용량의 30% ethanol을 이용해 24시간 동안 상온 추출하였으며 얻어진 강황 30% ethanol 추출물을 여과한 후 감압농축기로 농축하고, 이를 다시 동결건조기로 건조하여 강황 분말을 얻었으며 수득률은 7.1%였다.

#### 2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

전자공여능(electron donating ability)은 DPPH free radical 소거법으로 측정되었다<sup>18)</sup>. DPPH는 시료 중에 함유된 항산화(라디칼 소거능) 물질의 양을 측정할 때 사용된다. DPPH 용액은 보라색(deep violet)이며, 시료 중에 있는 항산화 물질과 결합해 중화(환원)가 되면 용액은 투명해진다. 시료 100  $\mu\text{l}$ 과

60  $\mu$ M DPPH용액을 100  $\mu$ l 넣어 혼합 후, 실온에서 30분 반응시켰다. 이 반응액을 540 nm에서 흡광도를 사용해 측정 후, 전자공여능은 아래 식에 의해 계산하여 산출하였다.

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

$OD_{\text{control}}$  : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도  
 $OD_{\text{sample}}$  : 시료가 들어간 경우 흡광도

### 3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성을 사용하여 항산화효과를 측정하였다<sup>19)</sup>. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 증류수에 녹인 후 12시간동안 차광하여 반응시켰다. 이 반응액을 415 nm에서 ethanol을 이용하여 흡광도  $0.70 \pm 0.02$ 로 보정하였으며 ABTS 95  $\mu$ l에 시료 5  $\mu$ l를 첨가하고 15분동안 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 아래 식에 의해 계산하여 산출하였다.

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

$OD_{\text{control}}$  : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도  
 $OD_{\text{sample}}$  : 시료가 들어간 경우 흡광도

### 4) 위궤양 손상 유발 및 동물 처치

실험동물은 군당 8마리씩 5그룹으로 구분하여 실험을 실시하였다. 실험 전날까지 고형사료(NIH-41, Zeigler Bros, Inc., USA)와 물을 충분히 공급하였으며 24시간 전부터 절식을 하였다. 실험 전, 정상군(Nor)은 아무런 처치를 하지 않았으며, 위궤양 대조군(Veh)은 증류수를 경구투여 하였고, sucralfate (10 mg/kg body weight) 투여군 및 강황 30% ethanol 추출물 (100 mg/kg, 200 mg/kg body weight)을 각 농도에 맞게 경구 투여한 후, 1시간 30분 방치 하였다. 그 다음 위궤양 손상을 유발하기 위하여 150 mM HCl/60% ethanol을 각 0.5 ml 씩 경구 투여하였고 1시간 30분후 회복하여 위 조직을 적출하였다<sup>20)</sup>.

### 5) 육안 및 현미경적 관찰

적출한 위 조직을 고정한 후 광학 디지털 카메라(Sony, Tokyo, Japan)를 사용하여 촬영을 실시하였다. 손상된 위점막 측정은 I-Solution lite(Innerview Co., 한국) 프로그램을 사용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정 한 다음, 위 전체 면적과 비교를 한 후 아래 비율 식으로 표시하였다.

$$\text{Ulcer index(\%)} = \text{위 손상 면적} / \text{위 전체면 적} \times 100$$

### 6) Western blot

위조직의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT 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 원심분리하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100  $\mu$ l의 buffer C(50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF 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-I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ , iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, HO-1, SOD, GPx-1/2,  $\beta$ -actin 및 핵의 NF- $\kappa$ B, Nrf2, histone 단백질의 발현을 측정하기 위하여 10  $\mu$ g의 단백질을 10~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 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 희석)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc(Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 해당 단백질 발현을 확인한 후, 발현된 band를 ATTO Densitograph Software(ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다. 각 그룹의 단백질 수준은 정상군의 단백질 수준으로 나누어 상대적 비로 나타내었다(represented as 1).

### 7) 통계분석

*In vitro*에서는 mean  $\pm$  SEM로 표시하였다. *in vivo*에서는 mean  $\pm$  SD 로 표시하였으며, SPSS(25.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 least-significant differences(LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 자료의 통계적 유의성을 검증하였고, 대조군과 투여군 사이에  $p$ -value < 0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

## III. 결 과

### 1. DPPH 라디칼 소거 활성 효과

항산화 효능을 평가하기 위해 실시한 DPPH 라디칼 소거능 측정에서 ascorbic acid의 IC<sub>50</sub>값은  $1.48 \pm 0.05 \mu$ g/ml로 나타난 반면, 강황 30% ethanol 추출물은 IC<sub>50</sub>  $78.18 \pm 0.60 \mu$ g/ml의 DPPH 라디칼 소거능이 보였다(Fig. 1).

### 2. ABTS 라디칼 소거 활성 효과

ABTS 라디칼 소거 활성 효과 측정 실험에서는 ascorbic acid 및 강황 30% ethanol 추출물의 IC<sub>50</sub>값이 각각  $3.41 \pm 0.03 \mu$ g/ml,  $55.91 \pm 1.86 \mu$ g/ml로 나타나 강황 30% ethanol 추출물은 우수한 항산화효과가 있음을 확인하였다(Fig. 1).

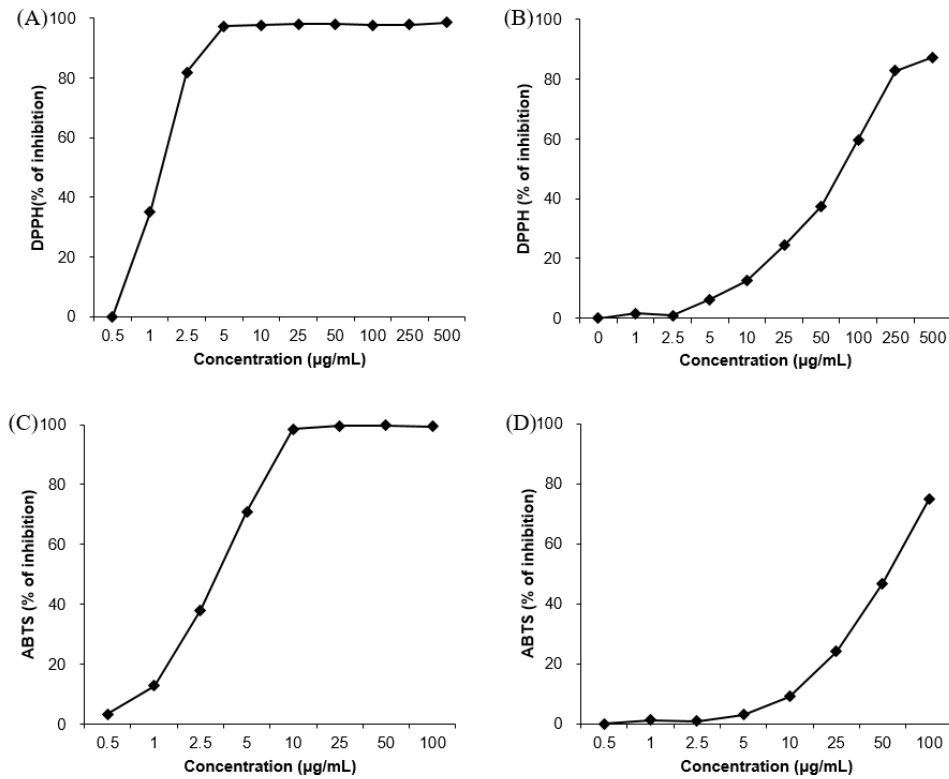


Fig. 1. Antioxidant activity of CLR. DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid,(A); DPPH radical scavenging activity of CLR,(B); ABTS radical scavenging activity of ascorbic acid,(C); ABTS radical scavenging activity of CLR,(D); CLR scavenged DPPH and ABTS effectively at DPPH and ABTS Assays.

### 3. 위점막 손상도 변화

정상군의 위점막 손상 검사 결과, 점막의 손상이 발견되지 않았으나 대조군은 위점막이 150 mM HCl/60% ethanol에 의해 손상을 받아 출혈, 발적 및 부종이 발생하였고, 손상 부위 면적 비율은  $52.07 \pm 3.68\%$  ( $p < 0.001$ )로 정상군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. CL 투여군은  $16.94 \pm 0.93\%$  ( $p < 0.001$ ), CH 투여군은  $5.81 \pm 0.45\%$  ( $p < 0.001$ )로 유의성 있게 위점막 보호효과를 나타내었으며 CH 투여군의 경우 양성 대조군인 SC 투여군  $13.80 \pm 1.10\%$  ( $p < 0.001$ )보다 더 효과적으로 개선되었다(Fig. 2).

### 4. 위 조직의 염증성 매개인자 및 사이토카인 발현

#### 1) 염증성 단백질 p-IκBα와 NF-κB 발현량 분석

위 조직에 있는 염증성 단백질인 p-IκBα의 NF-κB를 측정하였다. NF-κB의 발현은 정상군( $1.00 \pm 0.06$ )에 비해 대조군  $1.57 \pm 0.20$  ( $p < 0.001$ )은 증가하였으며, CL 투여군  $1.35 \pm 0.18$  ( $p < 0.05$ )에서는 유의성 있게 감소했으며 SC 투여군  $1.16 \pm 0.22$  ( $p < 0.001$ ) 및 CH 투여군  $1.24 \pm 0.17$  ( $p < 0.001$ )에서는 유의성 있게 감소하였다. p-IκBα의 발현은 정상군( $1.00 \pm 0.14$ )에 비해 대조군  $1.42 \pm 0.18$  ( $p < 0.001$ )은 유의성 있게 증가하였고 SC 투여군  $1.11 \pm 0.13$  ( $p < 0.001$ ), CH 투여군  $1.19 \pm 0.14$  ( $p < 0.01$ )은 유의성 있게 감소되었으나 CL 투여군( $1.26 \pm 0.14$ )에서는 감소하는 경향만 보였다(Fig. 3).

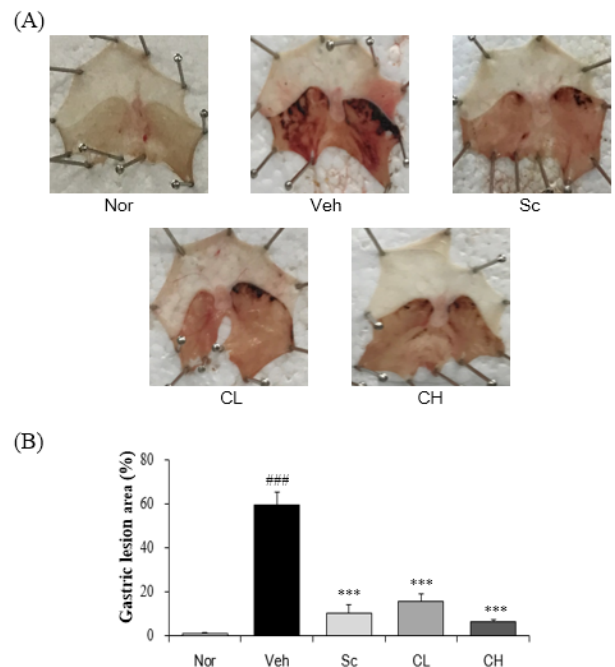


Fig. 2. Effects of CLR on the histopathological change stomach tissues of gastric lesion mice. The opened gross gastric lesion; (A), Ratio of damaged area per total gastric area;(B). All data are expressed mean  $\pm$  SD(n=8). Significance: ###  $p < 0.001$  vs. Normal mice, \*\*\*  $p < 0.001$  vs. GU control mice, Nor : Normal mice; Veh : GU control mice; Sc : mice treated with Sucralfate 10 mg/kg; CL : mice treated with CLR 100 mg/kg; CH : mice treated with CLR 200 mg/kg.

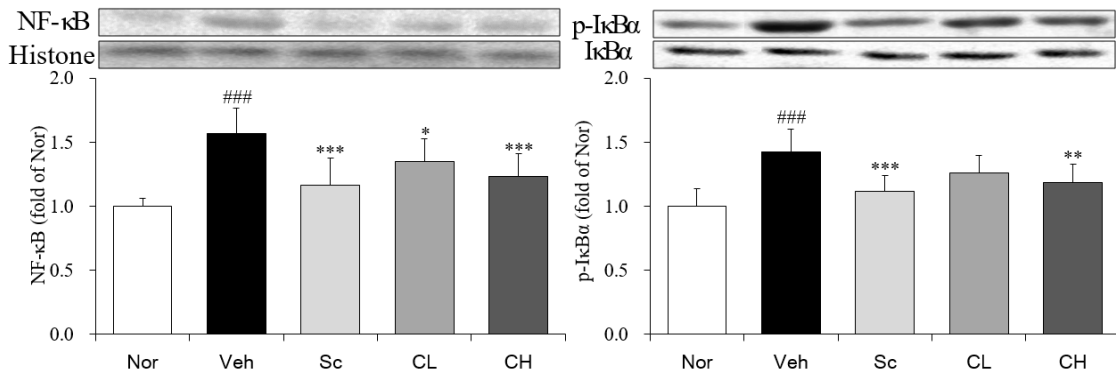


Fig 3. Expression of Inflammatory mediators in stomach.

All data are expressed mean ± SD(n=8). Significance: ###*p* < 0.001 vs. Normal mice, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 vs. GU control mice. Nor : Normal mice; Veh : GU control mice; Sc : mice treated with Sucralfate 10 mg/kg; CL : mice treated with CLR 100 mg/kg; CH : mice treated with CLR 200 mg/kg.

(2) 염증성 단백질 COX-2, iNOS, TNF-α, IL-1β 및 IL-6 발현량 분석

염증성 매개인자인 COX-2, iNOS와 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-1β, IL-6의 발현을 확인한 결과, COX-2의 발현은 정상군(1.00 ± 0.12)에 비해 대조군 1.68 ± 0.14(*p* < 0.001)은 유의성 있게 증가하였으나 양성대조군인 SC 투여군 1.12 ± 0.11(*p* < 0.001), CL 투여군 1.30 ± 0.09(*p* < 0.001) CH 투여군 1.23 ± 0.10(*p* < 0.001) 모두에서 유의성 있게 감소하였다.

iNOS의 경우 정상군(1.00 ± 0.07)에 비해 대조군 1.40 ± 0.20(*p* < 0.001)이 증가하였으며 SC 투여군 1.08 ± 0.16(*p* < 0.01)과 CH 투여군 1.08 ± 0.18(*p* < 0.01)에서 유의성 있게 감소하였으나 CL 투여(1.25 ± 0.20)은 감소하는 경향만 나타났다.

TNF-α의 발현은 정상군(1.00 ± 0.22)보다 대조군 1.46 ± 0.13(*p* < 0.001)에서 유의성 있게 증가하였으나, SC 투여군 1.16 ± 0.09(*p* < 0.01)과 CH 투여군 1.23 ± 0.15(*p* < 0.01)에서 유의성 있게 감소하였고 CL 투여군(1.30 ± 0.13)에서는 감소하는 경향만 나타났다.

IL-1β의 발현은 정상군(1.00 ± 0.07)보다 대조군 1.36 ± 0.09(*p* < 0.001)에서 현저하게 증가하였으나, SC 투여군 1.03 ± 0.10(*p* < 0.001), CL 투여군 1.20 ± 0.12(*p* < 0.01) 및 CH 투여군 1.06 ± 0.14(*p* < 0.001) 모두에서 유의성 있게 감소하였다.

IL-6의 발현은 정상군(1.00 ± 0.15)에 비해 대조군 1.49 ± 0.15(*p* < 0.001)에서 유의성 있게 증가하였으나, SC 투여군 1.12 ± 0.12(*p* < 0.001), CL 투여군 1.26 ± 0.12(*p* < 0.01) 및 CH 투여군 1.17 ± 0.13(*p* < 0.001) 모두에서 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

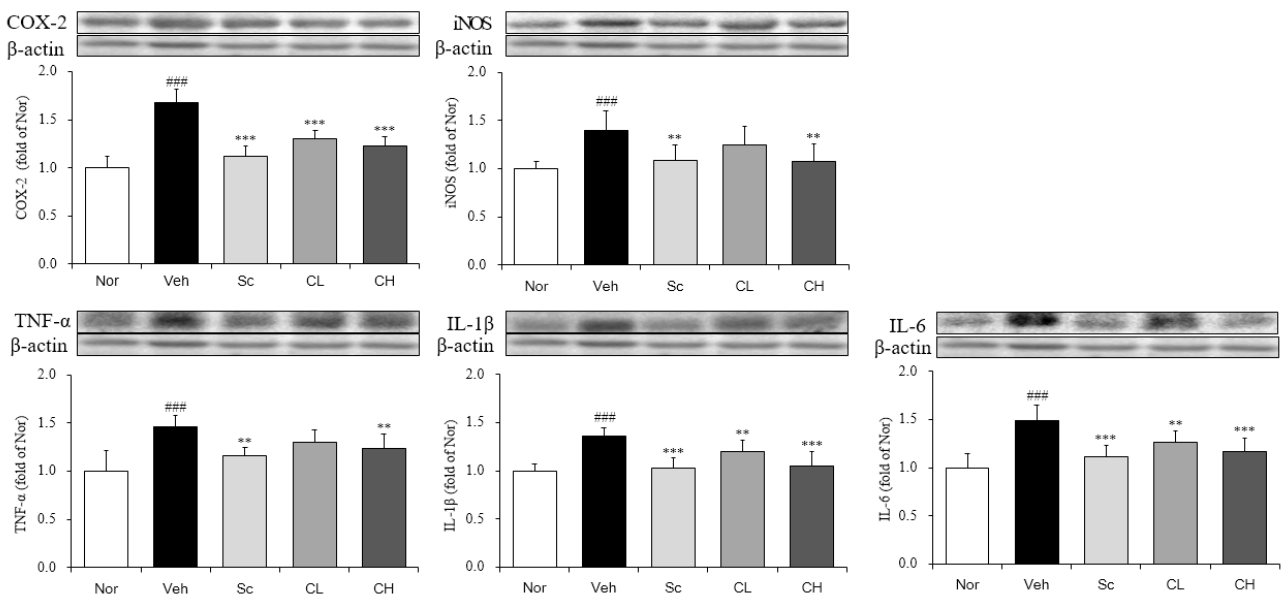


Fig 4. Expression of inflammation-related proteins in stomach.

All data are expressed mean ± SD(n=8). Significance: ###*p* < 0.001 vs. Normal mice, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 vs. GU control mice. Nor : Normal mice; Veh : GU control mice; Sc : mice treated with Sucralfate 10 mg/kg; CL : mice treated with CLR 100 mg/kg; CH : mice treated with CLR 200 mg/kg.

## 5. 항산화 단백질 발현량 분석 Nrf2, HO-1, SOD 및 GPx-1/2

Nrf2, HO-1, SOD 및 IL-6의 발현을 확인한 결과, Nrf2의 발현은 정상군( $1.00 \pm 0.13$ )에 비해 대조군  $0.38 \pm 0.02$  ( $p < 0.001$ )은 유의성 있게 감소하였으나 양성대조군인 SC 투여군  $0.59 \pm 0.06$  ( $p < 0.001$ ), CL 투여군  $0.50 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ ) 및 CH 투여군  $0.58 \pm 0.08$  ( $p < 0.001$ ) 모두에서 유의성 있게 증가하였다.

HO-1의 경우 정상군( $1.00 \pm 0.11$ )에 비해 대조군  $0.56 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ )이 감소하였으나 SC 투여군  $0.90 \pm 0.11$  ( $p < 0.05$ ), CL 투여군  $0.88 \pm 0.08$  ( $p < 0.05$ ), CH 투여군

$0.98 \pm 0.09$  ( $p < 0.01$ ) 모두에서 유의성 있게 증가하였다.

GPx-1/2의 발현은 정상군( $1.00 \pm 0.09$ )보다 대조군  $0.66 \pm 0.09$  ( $p < 0.001$ )에서 현저하게 감소하였으나, SC 투여군  $0.82 \pm 0.08$  ( $p < 0.01$ ), CL 투여군  $0.79 \pm 0.06$  ( $p < 0.05$ ), CH 투여군  $0.84 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ ) 모두에서 유의성 있게 증가하였다.

SOD의 발현은 정상군( $1.00 \pm 0.08$ )보다 대조군  $0.72 \pm 0.07$  ( $p < 0.01$ )에서 현저하게 감소하였으나 SC 투여군  $0.90 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ ), CH 투여군  $0.87 \pm 0.09$  ( $p < 0.01$ )에서 유의성 있게 증가하였고 CL 투여군( $0.81 \pm 0.12$ )에서는 증가하는 경향만 보여주었다(Fig. 5).

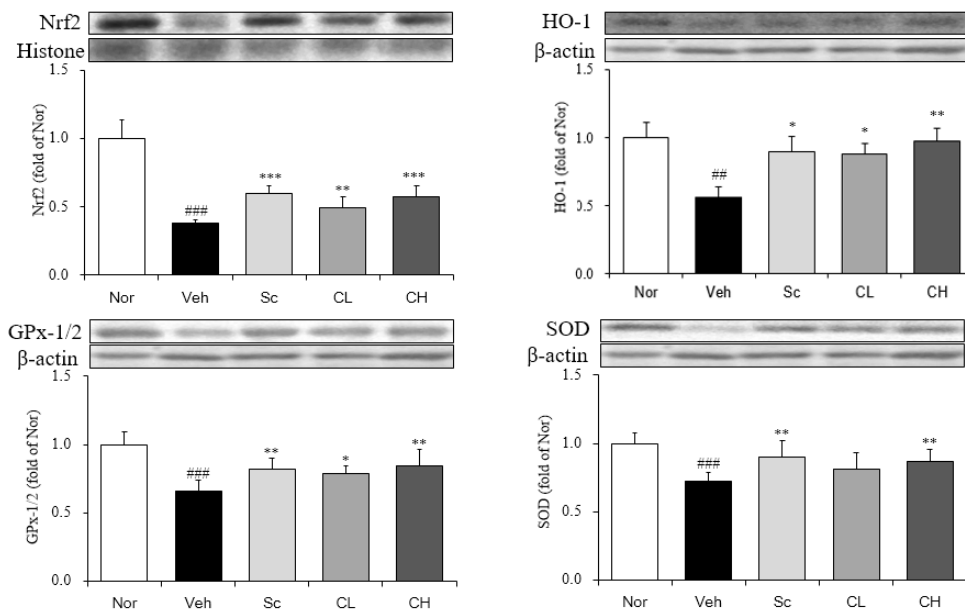


Fig. 5. Expression of anti-oxidant enzyme in stomach. All data are expressed mean  $\pm$  SD (n=8). Significance: ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs. Normal mice, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. GU control mice. Nor : Normal mice; Veh : GU control mice; Sc : mice treated with Sucralfate 10 mg/kg; CL : mice treated with CLR 100 mg/kg; CH : mice treated with CLR 200 mg/kg

## IV. 고찰

위궤양(gastric ulcer)이란 상부소화관에서 손상을 받아서 그로 인해 발생한 결손이 위점막근층 이하까지 침범한 질병으로, 체내 위산의 분비와 관련이 있는 공격인자 또는 위장 점막의 방어력과 관련이 있는 방어인자가 상대적으로 균형이 깨졌을 때 발병이 된다<sup>21)</sup>.

최근에는 위염, 위궤양 치료제의 부작용에 의하여 화학적으로 제조된 위염, 위궤양 치료제의 주성분을 천연물 추출을 통하여 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>22-23)</sup>.

따라서 본 연구에서는 실험적 위궤양 모델에서 강황 30% ethanol 추출물의 위점막 손상 억제 효과 및 관련 기전을 밝히고자 하였다.

강황 30% ethanol 추출물의 항산화 효능 평가를 하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정 결과, IC<sub>50</sub>값이 각각  $78.18 \pm 0.60$   $\mu$ g/ml,  $55.91 \pm 1.86$   $\mu$ g/ml로 뛰어난 항산화

효능을 나타냈다.

본 실험에서는 150 mM HCl/60% ethanol을 이용하여 위궤양을 유발한 후, 항산화 효능이 뛰어난 강황을 이용하여 위궤양 개선 효과를 확인하고자 동물 실험을 실시하였고, 위 조직을 적출하여 관련 인자들을 평가하였다. 적출한 위의 염증, 출혈 및 발적 부위를 측정된 결과, 정상군에서는 손상부위가 나타나지 않았고 위점막 손상 대조군에서는 심한 위점막 손상을 나타냈다. 강황 30% ethanol 추출물의 투여는 유의성 있는 개선 효과를 보였으며, 특히 강황 30% ethanol 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 양성대조군인 sucralfate 10 mg/kg 투여군보다 뛰어난 억제효과를 보였다.

NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ Ba는 세포질 내에서 서로 복합체를 형성하고 있는데 I $\kappa$ Ba가 인산화 되어 p-I $\kappa$ Ba가 되면 NF- $\kappa$ B가 핵으로 이동하게 되어 전사됨으로써 염증성 매개물질인 COX-2, iNOS의 발현을 증가시키고 염증성 사이토카인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 합성을 촉진시키게 된다.

실험적 위궤양 동물 모델에서 NF- $\kappa$ B의 활성화는 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 염증성 단백질의 발현을 증가한다고 보고되어 있다<sup>21)</sup>. 우리의 연구에서도 유사한 결과를 보였다. 반면 강황 30% ethanol 추출물의 투여는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 활성을 감소시켰고, 이는 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 발현을 억제시켜 결과적으로 위 점막 염증적 손상을 방지한 것으로 나타났다.

Nrf2는 핵에서 전사를 하여 항산화인자(HO-1, SOD, GPx-1/2)를 유도한다. 대조군에서와 다르게 강황 30% ethanol 추출물의 투여는 Nrf2의 활성을 증가시켰다. 이는 항산화관련 효소인 HO-1, SOD, GPx-1/2의 발현을 유의성 있게 증가하였고 또한 자유기 제거 실험을 통해 항산화 효능이 있다는 것을 알 수 있었으며 그 결과 손상된 위 점막을 보호하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 강황 30% ethanol 추출물은 Nrf2의 활성을 통한 뛰어난 항산화 효과를 발휘하였으며 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 감소시켜 위점막을 보호하는 것으로 보여진다.

본 연구를 통해 급성 위궤양 유발 동물모델에서의 강황 30% ethanol 추출물에 대한 위궤양 억제 연구를 수행한 결과로는 강황은 항산화 및 항염증 효과로 인해 급성 위궤양에서 우수한 억제 효능을 보인다고 판단되어지며, 위 점막 보호 활성을 갖는 천연물 신약 개발 및 건강기능성 식품 개발에 기본 자료로 사용될 수 있을 것으로 판단이 된다.

## V. 결 론

HCl/ethanol 투여로 위궤양을 유발시킨 마우스에 대한 강황 30% ethanol 추출물의 경구 투여가 항산화 및 항염증 효과를 통한 위점막 손상 억제에 미치는 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 통해 강황 추출물의 항산화 활성을 측정된 결과로는 뛰어난 라디칼 소거능을 나타냈다.
2. 강황 추출물의 투여는 위궤양이 유발된 마우스에서 위 점막 조직의 손상을 유의성 있게 감소시켰다.
3. 강황 30% ethanol 추출물의 투여는 위궤양이 유발된 마우스의 위 조직에서 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화를 감소시켰고 NF- $\kappa$ B의 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제시켰다.
4. 강황 추출물의 투여는 위궤양이 유발된 마우스의 위 조직에서 염증성 단백질인 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6의 발현을 유의성 있게 감소시켰다.
5. 강황 추출물의 투여는 위궤양이 유발된 마우스의 위 조직에서 항산화 단백질인 Nrf2의 활성화를 통해 HO-1, SOD 및 GPx-1/2의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.

이 결과 강황 30% ethanol 추출물은 급성 위궤양 유발 발생에 의한 위점막 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

## References

1. Banks WJ. Applied veterinary histology, 2nd ed, Philadelphia : William & Wilkins Baltimore, 1986 ; 393-6.
2. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice, Clin Exp Immunol, 2006 ; 146(2) : 312-22
3. Qian Y, Zhang J, Fu X, Yi R, Sun P, Zou M, Long X, Zhao X. Preventive Effect of Raw Liubao Tea Polyphenols on Mouse Gastric Injuries Induced by HCl/Ethanol via Anti-Oxidative Stress, Molecules, 2018 ; 23(11): pii : E2848.
4. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. Role of oxidative stress in stomach disorders, J Clin Biochem Nutr, 2011 ; 50(1) : 35.
5. Mark F, Michael EB. Histamine2-receptor antagonists-Standard therapy for acid-peptic diseases, N Engl J Med, 1990 ; 323 : 1672-80.
6. Bell NJ, Hunt RH. Progress with proton pump inhibition, Yale J Biol Med, 1992 ; 65(6) : 649-57.
7. 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.
8. 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.
9. Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative Study of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities between Curcumae longae Radix and Curcumae longae Rhizoma, Kor J Herbology, 2010 ; 25(1) : 83-91
10. Herbal medicine editorial committee of Korean medicine college. Herbal medicine, Seoul: Younglimsa, 2011 ; 454-5.
11. Chae YA, Kim SM, Kim KS, Yu CY, Yang DC, Song CK, Kang JH. Introduction to medicinal plant science, Seoul, Hyangmunsa, 2007 : 50-3.
12. Tang W, Eisenbrand G. In Chinese drugs of plant origin: Chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, Berlin : Springer-Verlag, Germany, 1992 ; 401-15.
13. Péret-Almeida L, Cherubino APF, Alves RJ, Dufossé L, Glória MBA. Separation and determination of

- the physicochemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Res Int.* 2005 ; 38(8-9) : 1039-44.
14. Li S, Yuan W, Deng G, Wang P, Yang P, Aggarwal BB. Chemical composition and product quality control of turmeric(*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops.* 2011 ; 2 : 28-54.
  15. Hu Y, Kong W, Yang X, Xie L, Wen J, Yang M. GC-MS combined with chemometric techniques for the quality control and original discrimination of *Curcuma longae* rhizome: Analysis of essential oils. *J Sep Sci* 2014 ; 37(4) : 404-11.
  16. Ammon HPT, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 1991 ; 57(1) : 1-7.
  17. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer.* 2005 ; 41(13) : 1955-68.
  18. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958 ; 26 : 1199-200.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Jainu M, Devi CSS. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: possible mechanism for the inhibition of acid formation. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 104(1-2) : 156-163.
  22. Lee JA, Kim SH, Kim MJ, Ahn HJ, Park HJ, Lee WR, Roh SS. Protective Effects of *Chrysanthemi Indici* Flos Extract and Flaxseed Oil Mixture on HCl/ethanol-induced Acute Gastric Lesion Mice. *Kor J Herbol.* 2018 ; 33(6) : 19-28.
  23. Kim SH, Lee JA, Lee AR, Shin MR, Park HJ, Roh SS. Protective Effect of *Gardenia* Fruit Ethanol Extract in HCl/Ethanol-Induced Acute Gastritis. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019 ; 48(2) : 198-205.