

민꽃게 추출물의 역류성 식도염 동물모델에서 유효성 평가

남현화^{1#}, 서운수¹, 이지혜¹, 서영혜¹, 양선규¹
문병철¹, 김옥진¹, 난리², 추병길^{2*}, 김종선^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한약자원연구센터, 2 : 전북대학교 농업생명과학대학

Effect on rat model of reflux esophagitis treated with *Charybdis japonica* extract

Hyeon-Hwa Nam^{1#}, Yun-Soo Seo¹, Ji Hye Lee¹, Young Hye Seo¹, Sungyu Yang¹
Byeong Cheol Moon¹, Wook Jin Kim¹, Li Nan², Byung Kil Choo^{2*}, Joong-Sun Kim^{1*}

1 : Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea

2 : Department of Crop Science & Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : In this study, we investigated the protective effects of *Charybdis japonica* (*C. japonica*) water extract on the acute reflux esophagitis in rat models.

Methods : Twenty rats were divided into four groups for examination: normal control group (n=6), the reflux esophagitis group (n=6), reflux esophagitis treated with positive control group (ranitidine 40 mg/kg, n=6), reflux esophagitis treated with *C. japonica* group (100 mg/kg, n=6). All rats fasted for 18 hr and then were induced with reflux esophagitis by a pylorus and forestomach ligation operation. After 4 hr, the rats were sacrificed. The pro-inflammatory cytokine and proteins expression measured by western bolt assay, and the histopathological analysis of the esophageal mucosa measured by hematoxylin and eosin staining.

Results : *C. japonica* administration significantly was protecting esophageal mucosal damage upon histological analysis of reflux esophagitis in rats. The *C. japonica* treatment confirmed the protection of the reduction of claudin-5, an evaluation index of the damage of tight junctions in the reflux esophagitis. *C. japonica* was also found to inhibit the expression of proteins such as COX-2 and TNF- α in the rat esophagus. *C. japonica* markedly attenuated the activation of NF- κ B and phosphorylation of I κ B α at the same time.

Conclusion : These results indicated that *C. japonica* suppressed the development of esophagitis through the modulation of inflammation by regulating NF- κ B activation. Based on these findings, we concluded that *C. japonica* can prevent reflux esophagitis.

Key words : *Charybdis japonica*, crab, reflux esophagitis, inflammation

*Corresponding author : Joong-Sun Kim, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea,

· Tel : +82-61-338-7111 · E-mail : centraline@kiom.re.kr

Byung Kil Choo, Department of Crop Science & Biotechnology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

· Tel : +82-63-270-2526 · E-mail : bkchoo@jbnu.ac.kr

#First author : Hyeon-Hwa Nam, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea,

· Tel : +82-61-338-7147 · E-mail : hhn@kiom.re.kr

· Received : 22 April 2020 · Revised : 15 May 2020 · Accepted : 25 July 2020

I. 서 론

역류성 식도염은 위 내용물의 역류로 인해 복부 통증 등의 임상 증상과 함께 점막의 변화를 가져오는 질환으로, 염산에 노출 된 시간이 길수록 심한 병변을 보인다. 전형적인 역류성 식도염은 식도의 과다한 산과 펩신의 노출이 주된 원인인 반면 비전형적인 역류성 식도염은 산과 펩신의 노출정도는 정상이나 식도의 감각이 이에 비정상적으로 과민해져 발생하는 것으로 알려져 있다 (DeMeester et al., 1979). 우리나라에서는 1990년대까지만 해도 역류성 식도염은 주요 관심질환에 속하지 않았으나, 점차 서구화 되고 있는 식습관 및 생활습관과 지나친 음주, 비만 인구 증가 등의 원인으로 최근 발병률이 증가하고 있는 질병이다 (Lee et al., 2006; Yoo et al., 2007).

역류성 식도염의 치료는 식습관 및 생활습관의 개선 (Jung et al., 2012)과 약물 치료, 수술 및 내시경 치료가 적용될 수 있다. 약물 치료로는 위산 중화, 항역류 장벽 기능 강화, 위장 운동 촉진제 등 다양하게 사용하고 있으며 (Kim et al., 2014), 이러한 약물 및 내과적 치료에 반응하지 않거나 식도주위 헤르니아가 있는 경우에는 외과적 수술 및 내시경 치료를 시행하기도 하지만 치료 효과는 제한적이다 (Kim et al., 2014). 한의학에서 역류성 식도염은 주로 吞酸, 吐酸, 胸痺, 噎膈 등의 病症과 유사성을 찾을 수 있으며 변증시치에 따라 다양한 처방을 사용하고 있다 (co-text publishing committee).

게는 오래전부터 세계 여러 나라에서 식용으로 이용되어 왔으며, 게 추출물에는 키틴, 단백질, 탄산칼슘염 및 셀레늄 및 카로티노이드 등의 다양한 유용물질을 함유하고 있어 영양학적 가치가 우수하여 식품은 물론 약용으로의 가치도 인정받고 있다 (Cho et al., 1998). 게에 함유된 다양한 성분을 이용한 연구가 진행되고 있으며 항당뇨 (Kim Jin Nam et al., 2009), 항암작용 (Rezakhani et al., 2017; Pegah et al., 2015), 항염증 및 항산화 작용 (Yen et al., 2008)이 보고된바 있다. 동의보감에서는 약재로 게를 해(蟹)라고 하며 그 성질이 차고 맛은 짜며 위기(胃氣)를 다스려 음식이 소화되게 한다고 기록되어 있다 (Heo, c2006). 하지만 아직 게 추출물을 이용한 역류성 식도염 모델에서의 효능 연구는 전무하다. 민꽃게 (*Charybdis japonica*)는 십각목(Decapoda) 꽃게과 (Portunidae)에 속하며 동남아시아에 주로 분포한다. 민꽃게는 단단한 모래 또는 진흙과 같은 미세한 모래 바닥이 있는 강 어귀에 주로 서식하며, 성장과 번식력이 좋고 영양가치가 우수하여 아시아에서 경제적 또는 상업적으로 가치가 높은 품종이다 (Lou et al., 2018; Wu et al., 2017).

본 연구에서는 민꽃게 물추출물을 이용하여 역류성 식도염에서 효능을 검증하고 그 기전을 연구하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

본 연구에 사용된 시료 민꽃게는 서해안 산지로 2019년 6월에 충청남도 보령시에서 구매하였고, 한국한의학연구원 양

신규 박사로부터 형태감별을 거쳐 검증 후, 1차 미토콘드리아 COI (cytochrome c oxidase subunit I) DNA 바코드 염기서열 NCBI Gene Bank 등록 민꽃게 COI 염기서열 비교를 통해 그종을 확정하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 민꽃게 시료는 표본을 제작하여(Voucher number: 2-19-0514) 한국한의학연구원 한약자원연구센터에 보관하였다. 추출은 동결건조하여 분쇄한 민꽃게 시료 1 kg에 증류수 10 L를 넣고 100 ± 2℃에서 3시간 동안 환류 추출하였으며, 얻어진 추출액을 여과한 후 감압농축기로 농축하였다. 그 후 동결건조 과정을 거쳐 추출물 192.03 g을 수득하였고(수득률 19.20%, w/w), 이 중 일부를 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

Sprague Dawley (SD) 랫드 24마리를 한일실험동물센터 (Wanju, Korea)에서 구입하여 1주일 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 동물은 온도 22 ± 2℃, 습도 50 ± 5%, 명암주기(light-dark cycle)는 12시간 주기로 조절하여 사용하였다. 고행사료 (Nestlé e Purina Pet Care Company; Bundang-gu, Seongnam, Korea)와 물은 자유 섭취하게 하였고 모든 사육기자재는 멸균하여 사용하였다. 실험은 미국 국립보건원 (National Institutes of Health)의 규정에 따라 수행하였고, 국제동물복지법에 근거한 전북대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 실험을 진행하였다.

3. 역류성 식도염 유도

실험군은 총 4개의 군으로 정상군(Normal), 역류성식도염 유발 대조군(reflux esophagitis control; vehicle), 역류성 식도염 유발 후 민꽃게 물추출물 100 mg/kg 투여군, 역류성 식도염 유발 후 양성대조 물질 ranitidine 40 mg/kg 투여군 (positive control)은 각각 5마리씩 나누어서 사용하였다. 급성 역류성식도염 유발은 수술 18시간 전부터 고행사료 공급 중단하여 (물 충분히 공급) 절식하였으며 호흡마취 후 2 cm 정도 개복 하고, 유문 및 전위를 각각 3.0 실크실로 묶은 후 복막과 피부를 봉합하였다. 식도 점막 손상 측정은 유문 및 전위부 절찰 수술 4시간 후, 식도를 분리하였고 세로로 절단. 절단된 식도 내부는 0.9% NaCl로 세척하여 전개한 뒤 광학디지털 카메라를 이용하여 촬영하였고 식도 손상도 측정은 image J 프로그램을 이용하여 계산하였다.

4. 조직학적 분석

실험 종료시점에서 실험동물을 호흡마취하고 조직을 적출하였으며, 식도 조직을 10% neutral buffered formalin (NBF)으로 고정하고 수세 후 75%, 95%, 100%의 ethanol 과 xylene으로 탈수와 투명을 거쳐 파라핀에 포매 실시. 파라핀 블록이 실온에 overnight 응고시킨 후 조직을 5 μm 두께로 박절하여 hematoxylin & eosin 조직 염색 방법으로 염색하였다. 염색된 조직은 광학현미경(Leica DM 2500)을 사용하여 image analysis program (i-solution DT)으로 촬영 및 분석하였다.

5. Western blot assay

적출한 식도 조직의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCL(pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail 을 첨가한 세포질 lysis buffer를 넣고 tissue grinder 로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하여 30 분간 ice 위에 반응. 원심분리 후에 세포질을 포함하고 있는 상등액을 분리하고, 핵 추출을 위해 세포핵 lysis buffer(50 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazyl] ethanesulfonic acid(pH 7.9), 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가하여 원심분리 하였고 핵을 포함하고 있는 상등액을 얻어 -80℃에서 보관하여 단백질 정량 후 샘플로 사용하였다. SDS-PAGE을 통해 단백질을 분리하고 100 V에서 75분간 transfer 하였고 일차항체는 PBST에 1:1000으로 희석하여 4℃ overnight 반응시킨 후 이차항체는 1:10000으로 실온에서 2 시간 반응 후 Bio-Rad imaging software (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)를 이용하여 band image를 수집하였다.

6. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 모든 처리군간의 통계적 유의성은 ANOVA one-way로 검정을 실시하여 p<0.05 경우에만 유의차가 있는 것으로 표시하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 식도 점막 손상도 측정

역류가 유도되지 않은 정상군인 랫트에서는 점막 손상이 발견되지 않았으나 대조군에서는 위 내용물 및 위산 역류로 인한 점막 손상으로 조직탈락, 출혈, 염증이 발생하였다(Fig. 1). 민꽃게 물추출물을 경구 투여한 처리군에서는 대조군에 비해 30%의 개선 효과를 확인하였다.

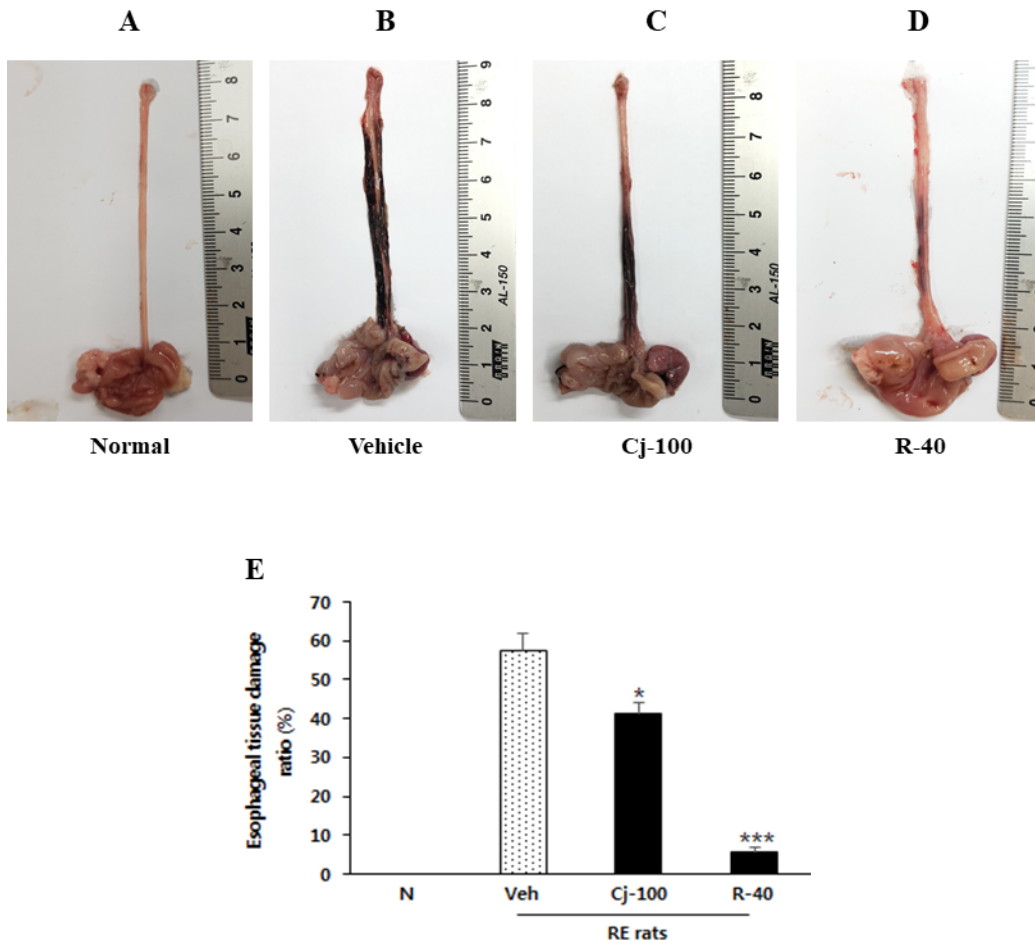


Fig. 1. Effects of *C. japonica* extracts on esophagus tissues of rats induced esophagitis. The gross esophageal evaluation in different group: (A) Normal group; (B) induced esophagitis group; (C) induced esophagitis + *C. japonica* extract 100 mg/kg group; (D) induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg; (E) esophageal tissue damage ratio. *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ vs vehicle group.

2. 조직병리학적 검사

역류가 유도되지 않은 정상군에서는 식도 점막의 조직학적 변화가 관찰되지 않았고, 대조군에서는 염증 세포의 침착과 식도 상피의 광범위한 탈락이 관찰되었다(Fig. 2). 민꽃게 물

추출물을 투여한 처리군에서는 대조군에 비해 식도 점막 상피층의 탈락과 염증세포의 침윤 정도가 감소되었으며 ranitidine을 투여한 양성대조군에서는 정상군과 유사한 식도 점막 구조를 나타내었다.

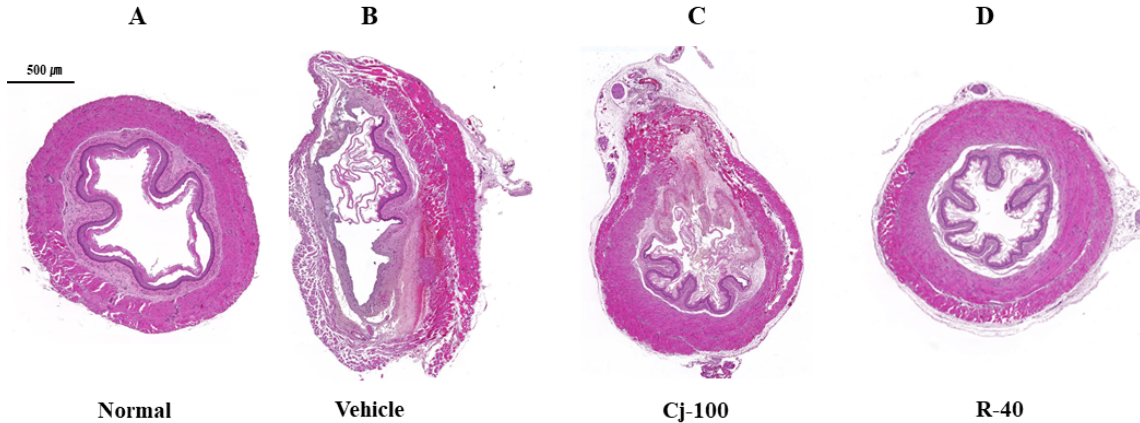


Fig. 2. The *C. japonica* extracts improved esophagus tissues histology in reflux esophagitis rats. The histological change evaluation in different group: (A) Normal group; (B) induced esophagitis group; (C) induced esophagitis + *C. japonica* extract 100 mg/kg group; (D) induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg.

3. Tight junction (claudin-5) 발현량 변화

대조군에서는 위산 역류로 인한 조직이 손상되어 claudin-5의 발현량이 정상군에 비해 32% 감소되었다(Fig. 3). 민꽃게 물추출물을 경구 투여한 처리군에서는 식도 점막 보호 작용으로 인해 claudin-5의 발현량이 대조군에 비해 31% 증가된 것으로 나타났으며 ranitidine를 투여한 대조군에서도 41% 증가하였다.

4. 염증성 단백질 및 염증성 사이토카인 발현량 변화

대조군에서 위 내용물 및 위산 역류로 인한 COX-2 및 TNF- α 의 발현량은 정상군에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 4). 그러나, 민꽃게 물추출물을 경구 투여한 식도 조직에서는 COX-2의 발현량이 대조군에 비해 30% 감소된 것으로 확인되었고 ranitidine를 투여한 식도 조직에서는 대조군에 비해 60% 이상의 억제 활성을 보였다. 민꽃게 물추출물을 경구 투여한 식도 조직에서는 TNF- α 의 발현량이 대조군에 비해 12%의 억제 활성을 보였으며 ranitidine를 투여한 식도 조직에서는 대조군에 비해 14%의 억제 활성을 나타냈다.

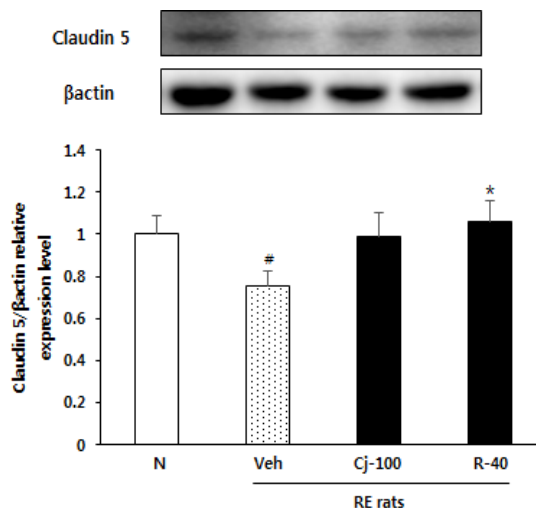


Fig. 3. The *C. japonica* extracts improved claudin-5 protein expression level in reflux esophagitis rats. N-Normal group; Veh-induced esophagitis group; Cj-100-induced esophagitis + *C. japonica* extract 100 mg/kg group; R-40- induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg. # $P < 0.05$ vs normal group; * $P < 0.05$ vs vehicle group.

5. p-I κ B α , p-NF- κ B 활성화 억제 확인

대조군에서 위 내용물 및 위산 역류로 인한 세포질 내 p-I κ B α 의 활성화로 인해 핵 내 p-NF- κ B p65 활성화가 진행되었음을 확인하였다. 민꽃게 물추출물을 투여한 경우 p-I κ B α 의 발현량이 대조군에 비해 20% 억제 활성을 보였고, ranitidine을 투여한 경우 30% 정도의 억제 활성을 보였다. p-NF- κ B p65 발현량을 측정된 결과, 민꽃게 물추출물을 투여한 처리군은 대조군에 비해 43% 억제 활성을 보여 양성대조군은 대조군에 비해 50% 이상의 억제 활성을 보였다(Fig. 5).

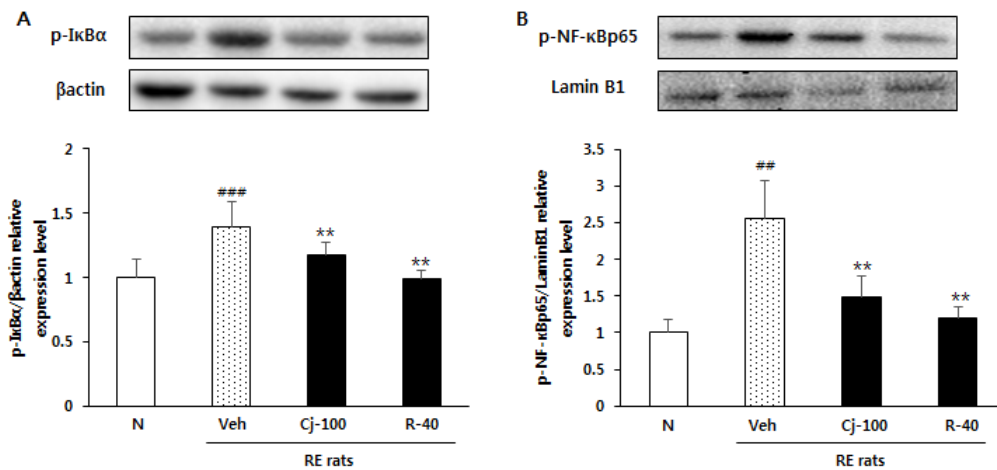


Fig. 5. Inhibition effects of *C. japonica* extracts on the expression of p-IκBα and p-NF-κBp65 in esophagus tissues. N-Normal group; Veh-induced esophagitis group; Cj-100-induced esophagitis + *C. japonica* extract 100 mg/kg group; R-40-induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg. ###*P*<0.001 vs normal group; ##*P*<0.01 and ***P*<0.01 vs vehicle group.

IV. 고찰

역류성 식도염은 하부식도 괄약근의 기능저하로 인한 위 내용물 및 위산의 반복적인 역류에 의해 점막 손상을 일으키며 Barrett식도, 협착, 궤양, 식도암 등의 합병증을 유발하는 질환이다 (Lee and Baik, 2019). 역류성 식도염의 치료를 위한 약물로는 산분비 억제제, H2 수용체 억제제, 프로톤펌프 차단제 (PPIs) 등이 이용되고 있으나 장기 복용 시, 내성으로 인한 치료효과 감소, 마그네슘 결핍 등의 부작용 등으로 인해 안전한 치료제 개발이 요구되고 있는 실정이다 (Kwon et al., 2016; Choo and Roh, 2013).

새우류와 함께 갑각류 중 소비가 높은 수산물 중에 하나인 게는 leucine, arginine 등의 필수 아미노산과 키틴, 탄산칼슘 등의 다양한 성분을 함유하고 있으며 성인병, 간질환 등에 효과가 있고 항암, 항산화, 항염증 작용을 가지고 있다고 알려져 있다 (Kim Jin Nam et al., 2009; Rezakhani et al., 2017; Pegah et al., 2015; Yen et al., 2008). 또한, 게 껍질에서의 키틴과 키토산 제조 및 생리활성 연구가 활발히 이루어지고 있으며 키토산을 포함한 복합물의 위장보호효과에 대한 연구가 보고된 바 있어 위장질환 관련 기능성 식품 및 약용소재로서의 가치가 높을 것으로 사료된다 (Park et al., 2008; Monika et al., 2019; Volod'ko et al., 2014). 본 연구에서는 꽃게과에 속하는 민꽃게 물추출물을 이용하여 역류성 식도염 유발 동물모델에서의 개선효과를 확인하였다.

역류성 식도염은 식도 점막에서 상피 손상 및 세포 사멸을 초래한다 [Rhonda et al., 2009]. 본 연구에서 역류성 식도염 유발 수술 후 식도점막을 관찰한 결과, 위 내용물 및 위산 역류로 인해 식도의 손상이 관찰되었으며 손상 부위의 조직을 분석하였을 때 출혈, 염증 세포 침윤 및 상피 파괴와 같은 조직 손상이 관찰되었으며, 이러한 증상은 Ranitidin 투여에 의해 현저하게 감소됨을 확인하였다. H2 억제제인 Ranitidin의 보호 효과는 이전 발표된 연구 결과에 의해 보고되었으며 본 연구

에서도 양성대조약물로 Ranitidin을 사용하여 평가한 결과 유의적인 개선 효과를 확인하였다 [Akanda and Park 2017]. 민꽃게 물추출물 투여군에서도 식도 침식 면적에 보호효과가 확인되었고, 비록 Ranitidin에 미치지지는 못하지만 유사하게 역류성 식도염 유발 대조군과 비교하였을 때 식도 조직손상에 대한 보호 작용을 나타내었다.

식도염 유발에 의해 손상된 조직에서는 상피 및 내피사이 결합조직의 tight junction의 손상 또한 야기되는데, 이는 세포 결합 단백질인 Claudin의 감소를 유도한다. 특히 Claudin-5는 장 점막 및 위장관 손상시 가장 의미있게 변화하는 단백질로 알려져 있다 (Camire et al., 2015). 역류성 식도염 유발군에서 Claudin-5의 감소가 확인되었으며, 이러한 변화는 조직학적인 변화결과와 일치함을 확인하였다. 특히 이러한 상피 세포 사이의 결합조직의 보호는 소화기계 점막 면역을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 민꽃게 추출물 투여를 통한 식도 점막 보호여부를 확인할 수 있었다. [Castoldi et al., 2015]. 민꽃게 추출물 투여군에서는 식도 조직의 상피와 내피 사이의 결합조직내 손상의 보호와 함께 claudin-5의 감소가 경감됨을 확인함으로써 민꽃게 추출물 투여가 식도염의 상황에서의 상피세포 사이의 결합조직을 보호하고 있음을 확인하였다.

또한, 역류성 식도염은 COX-2와 TNF-α와 같은 염증성 사이토카인 및 효소 등의 염증성 단백질 변화와 식도염의 상호 연관성이 보고된바 있다 (Akanda and Park 2017, Hatwara et al., 2018, Nam et al., 2019). 본 연구에서도 식도염 모델에서 COX-2와 TNF-α의 증가를 확인하였으며, 민꽃게 추출물 투여군과 대조약물은 ranitidin투여군에서 염증성 사이토카인의 유의적인 감소를 확인하였다.

IκB-α는 면역 및 염증 반응을 조절하는 NF-κB의 활성을 매개하는 인자로 염증과 면역에 상호 중요한 역할을 한다 (Baldwin et al., 2001). 특히 식도에서 IκB-α과 NF-κB는 미세환경의 항상성의 유지 및 염증에 중요한 역할을 한다고

보고되었다 (Baldwin et al., 2001). 식도 상피에서 I κ B- α 과 NF- κ B의 인산화는 식도염증을 악화시킨다고 보고되어져 있으며 이로 인해 다양한 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 특히 GM-CSF가 중요한 염증인자로 보고된바 있다 (Tétreault et al., 2016). 본 연구에서도 식도염 동물모델에서 두 인자의 인산화가 증가하는 것을 확인하였으며, 민꽃게 추출물의 투여는 이러한 인자들을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

V. 결 론

민꽃게 추출물의 역류성 식도염 동물모델에서의 보호효과 증증을 위한 연구 수행 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 민꽃게 추출물은 역류성 식도염 유발 대조군과 비교하였을 때, 역류로 인한 육안상의 식도점막 손상을 감소시켰으며, 조직학적 분석결과 출혈 및 상피세포 탈락, 염증세포 침윤 등의 증상을 완화시키는 경향을 보였다.
2. 또한, 세포 결합단백질 발현 분석 결과, 민꽃게 추출물 투여에 의해 식도 조직의 상피와 내피 사이의 결합조직 내 손상의 보호와 함께 claudin-5의 감소가 경감됨을 확인하였다.
3. 식도 조직 내 염증성 단백질 및 사이토카인 발현량을 분석한 결과, 민꽃게 추출물은 역류성 식도염 유발에 의해 발현이 증가된 COX-2, TNF- α , I κ B- α , NF- κ B 인자들을 유의적으로 감소시켰다.

이 연구를 통해 역류성 식도염에 민꽃게 물추출물의 역류성 식도염 동물모델에서의 보호효과를 육안 소견 및 병리조직학적인 검사를 통해 확인하였다. 그리고 식도 상피 결합조직 사이의 tight junction의 보호와 다양한 염증성 인자들의 감소를 확인함으로써 민꽃게 물추출물이 항염증 효과를 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 기전으로 민꽃게 물추출물의 투여에 의한 I κ B- α 과 NF- κ B의 인산화 억제가 하나의 원인임을 확인하였다. 본 연구를 통해 민꽃게 물추출물을 이용한 역류성 식도염 보호 소재로서의 가능성을 확인한 연구 결과로 사료된다.

Acknowledgments

본 연구는 '국가과학기술연구회 핵심연구분야 우수인력 발굴 지원 사업' 및 한국한의학연구원의 '지속가능한 한약표준자원 활용 기술' (KSN2012320) 사업 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Akanda MR, Park BY. Involvement of MAPK/NF- κ B signal transduction pathways: *Camellia japonica* mitigates inflammation and gastric ulcer. *Biomed Pharmacother.* 2017 ; 95 : 1139-1146.
2. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001 ; 107 : 3-6.
3. Camire RB, Beaulac HJ, Willis CL. Transitory loss of glia and the subsequent modulation in inflammatory cytokines/chemokines regulate paracellular claudin-5 expression in endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2015 ; 284 : 57-66.
4. Castoldi A, Favero de Aguiar C, Moraes-Vieira PM, Olsen Saraiva Camara N. They must hold tight: junction proteins, microbiota and immunity in intestinal mucosa. *Curr Protein Pept Sci.* 2015 ; 16(7) : 655-671.
5. Cho, Y. I.; No, H. K. & Meyers, S. P. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agric. Food Chem.* 1998 : 46(9) : 3839-3843.
6. DeMeester TR, Wernly JA, Bryant GH. Clinical and in vitro analysis of determinants of gastroesophageal competence. A study of the principles of antireflux surgery. *American Journal of Surgery.* 1979 ; 137(1) : 39-46.
7. Hatware KV, Sharma S, Patil K, Shete M, Karri S, Gupta G. Evidence for gastroprotective, anti-inflammatory and antioxidant potential of methanolic extract of *Cordia dichotoma* leaves on indomethacin and stress induced gastric lesions in Wistar rats. *Biomed Pharmacother.* 2018 : 103(13) : 317-325.
8. Huxford T, Huang DB, Malek S, et al. The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell.* 1998 ; 95 : 759-770.
9. Kim JN, Chang IY, Kim HI, Yoon SP. 2009. Long-term effects of chitosan oligosaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Islets.* 2009 ; 1(2) : 111-116.
10. Kwon OJ, Choo BK, Lee JY, Kim MY, Shin SH, Seo BI, Seo YB, Rhee MH, Shin MR, Kim GN, Park CH, Roh SS. Protective Effect of *Rhei Rhizoma* on Reflux Esophagitis in Rats via Nrf2-mediated Inhibition of NF- κ B Signaling Pathway. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16(7).
11. Lee SH and Baik TH. A Comparative Study on the Effects of *Pinellia ternata*, *Zingiber officinale* and *Sobanhatang* on Reflux Esophagitis. *J Korean*

- Med, 2019; 40(2) : 17-34.
12. Liu B, Liu W-S, Han B-Q, Sun Y-Y. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *World J Gastroenterol*, 2007 ; 13(5) : 725.
 13. Makalani F, Khazaei Mr, Ghanbari E, Khazaei M, Makalani F, Khazaei M, Ghanbari E, Khazaei M. Crab shell extract improves serum biochemical markers and histological changes of pancreas in diabetic rats. *Int. J. Morphol*, 2017 ; 35(4) : 1437-1443.
 14. Nam HH, Nan L, Park JC, Choo BK. Geraniin ameliorate experimental acute reflux esophagitis via NF- κ B regulated anti-inflammatory activities in rats. *Appl Biol Chem* (2019) 62:13.
 15. Pegah Mirzapur, Zahra Rashidi, Leila Rezakhani, Mozafar Khazaei In Vitro Inhibitory Effect of Crab Shell Extract on Human Umbilical Vein Endothelial Cell In Vitro *Cell Dev Biol Anim*, 2015 ; 51 (1) : 36-41.
 16. Park IW, Kim HS, Choe KH, Choe SN, Kim JB, Lim SH. Food Composition of Crab (*Charybdis japonica*) Preserved in Brine. *Jour. Fish, Mar. Sci. Edu*, 2008 ; 20(1) : 95-106.
 17. Rezakhani L, Khazaei MR, Ghanbari A, Khazaei M. Crab shell extract induces prostate cancer cell line (Incap) apoptosis and decreases nitric oxide secretion. *Cell J*. 2017 ; 19(2) : 231.
 18. Rhonda FS, Xiaofang H, Vivek M, Christopher MS, Susanne WC, Hui YZ, Xi Z, Chunhua Y, Kathy HC, Robert MG, Stuart JS. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology*. 2009 ; 137 : 1776-1784.
 19. Tétreault MP, Weinblatt D, Ciolino JD, Klein-Szanto AJ, Sackey BK, Twyman-Saint Victor C, Karakasheva T, Teal V, Katz JP. Esophageal Expression of Active I κ B Kinase- β in Mice Up-Regulates Tumor Necrosis Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Promoting Inflammation and Angiogenesis. *Gastroenterology*. 2016 ; 150(7) : 1609-1619.
 20. Yen MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym*, 2008 ; 74(4) : 840-844.
 21. Choo BK, Roh SS. Berberine protects against esophageal mucosal damage in reflux esophagitis by suppressing proinflammatory cytokines. *Exp Ther Med*, 2013 ; 6(3) : 663-670.
 22. Heo J. Donguibogam, 1st ed. Yoon SH, Kim HJ, translator. Korea: Publishing company of Donguibogam; c2006 : p. 2082-2103.
 23. Mishra M, Chawla V, Chawla P. Pectin, Beta-Cyclodextrin, Chitosan and Albumin Based Gastroprotective Systems for Piroxicam Maleate: Synthesis, Characterization and Biological Evaluation. *Int J Biol Macromol*. 2019 ; 112 : 127-136.
 24. Stenger Moura FC, Perioli L, Pagano C, Vivani R, Ambrogi V, Bresolin TM, Ricci M, Schoubben A. Soluble Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complexes and Their Gastroprotective Activity. *Carbohydr polym*. 2014 ; 101 : 1087-1093.
 25. Lou F, Yang T, Han Z, Gao T. Transcriptome analysis for identification of candidate genes related to sex determination and growth in *Charybdis japonica*. *Gene*. 2018 ; 677(30) : 10-16.
 26. Wu F, Wang T, Cui S, Xie Z, Dupont S, Zeng J, Gu H, Kong H, Hu M, Lu W, Wang Y. Effects of seawater pH and temperature on foraging behavior of the Japanese stone crab *Charybdis japonica*. *Mar Pollut Bull*, 2017 ; 1201(-2) : 99-108.