

## 만성 역류성 식도염 모델에서 檳榔와 黃連 복합물의 보호 효과

이세희<sup>1</sup>, 이진아<sup>1</sup>, 신미래<sup>1</sup>, 이지혜<sup>2</sup>, 노성수<sup>1</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, <sup>2</sup>한국한의학연구원 한약자원연구센터

### The Protective Effect of Arecae Semen and Coptidis Rhizoma in a Chronic Reflux Esophagitis Rat Model

Se Hui Lee<sup>1</sup>, Jin A Lee<sup>1</sup>, Mi-Rae Shin<sup>1</sup>, Ji Hye Lee<sup>2</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

<sup>2</sup>Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

#### ABSTRACT

**Objective:** Chronic reflux esophagitis (CRE), characterized by esophageal mucosa ulcer, is caused by continuous backflow of gastric acid and consequent inflammation due to unstable gastroesophageal sphincter. The aim of the present study was to clarify the effect of an Arecae Semen and Coptidis Rhizoma mixture (AC-mix) on CRE.

**Methods:** CRE was surgically induced in SD rats with three experimental groups used: normal; CRE control; and CRE treatment (200 mg/kg AC-mix). Blood and esophageal tissue were collected after two weeks of drug administration. The anti-oxidant activity of the AC-mix was measured by total polyphenol and total flavonoid contents as well as by radical scavenging activity with protein levels evaluated using western blotting.

**Results:** CRE damage to the esophageal mucosa was significantly reduced in the AC-mix group as compared with the controls, and administration of the AC-mix was seen to inhibit NF- $\kappa$ Bp65 activity. Consequently, the inactivation of NF- $\kappa$ Bp65 significantly inhibited inflammatory mediators such as COX-2 and iNOS. Moreover, the anti-oxidant enzyme HO-1 significantly increased through activation of the Nrf2-Keap1 pathway. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), which can break down collagen from the basement membrane and extracellular matrix, was decreased following AC-mix treatment, and elevated levels of MMP-2 were regulated by its tissue inhibitor.

**Conclusions:** These results show that AC-mix can alleviate esophageal mucosa ulcer through inhibition of the NF- $\kappa$ Bp65 inflammatory pathway and enhancement of the anti-oxidant Nrf2-Keap1 pathway.

**Key words:** Areca Semen and Coptidis Rhizoma Mixture, chronic reflux esophagitis, esophageal mucosa ulcer, anti-oxidant, anti-inflammatory

## 1. 서 론

위식도 역류질환(Gastroesophageal reflux disease,

GERD)은 위식도 괄약근의 불안정한 조절 장애로 산이 역류하여 염증을 유발하는 위장 질환으로 알려져 있으며<sup>1</sup>, 이 중 역류성 식도염(Reflux esophagitis, RE)은 위 내시경 검사를 통해 식도 점막의 궤양 및 미란의 결손이 나타나는 경우를 말한다<sup>2</sup>. 주로 위 내용물이 식도로 역류하여 생기는 점막 손상, 속쓰림 및 흉통과 같은 증상이 나타나며, 비정형적으로 흉통, 연하 곤란, 만성 기침 및 인후통을 동반

· 투고일: 2021.02.16, 심사일: 2021.04.01, 게재확정일: 2021.04.05  
· Corresponding author: Seong-Soo Roh College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, Republic of Korea  
TEL: +82-53-770-2258 FAX: +82-53-768-6340  
E-mail: ddede@dhu.ac.kr

하기도 한다<sup>3</sup>. 韓醫學에서 역류성 식도염은 “吐酸”, “吞酸”, “噎膈”, “胸痞” 등에 포함되며, 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆 등으로 변증하여 치법으로는 和胃降逆, 降逆氣, 舒肝和, 胃降逆, 健脾胃, 清化濕痰을 활용하는 것으로 보고되어있다<sup>4</sup>.

최근 역류성 식도염을 포함한 위식도 역류질환의 역학 연구에 따르면 북아메리카 18.1-27.8%, 유럽 8.8-25.9%, 중동 8.7-33.1%로 높은 발병률을 보였으나 아시아는 2.5-7.8%로 위식도 역류질환의 발병률이 낮은 것으로 나타났다. 그러나 최근 서구화된 식습관, 스트레스 및 수면 부족 등과 같은 요인들로 인해 아시아 역시 발병률이 점점 증가하는 추세를 보이고 있다<sup>5</sup>. 역류성 식도염을 일으키는 원인과 영향인자는 여러 가지로 제시되었는데 주로 하부식도 괄약근의 조절 장애 및 압의 저하 등이 중요한 원인으로 작용하며 이외에 병증을 악화시키는 요인으로 과도한 식이섭취, 음주, 흡연, 부적절한 체중관리 및 과도한 스트레스 등의 생활습관들이 제시되어 있다<sup>6</sup>. 이처럼 역류성 식도염은 삶의 질을 저하시키기 때문에 전 세계적으로 많은 관심이 집중되고 있는 것으로 보인다.

역류성 식도염의 치료에 있어 주로 사용되고 있는 약물로는 히스타민 길항제(H2RA, histamine type 2 receptor antagonist)와 양성자 펌프 억제제(PPI, proton pump inhibitor)가 있다. 이 약물들은 위산 분비를 억제하는 약물로, 위 점막의 벽 세포에 존재하는 효소의 작용을 억제하여 산 분비량을 줄여 증상을 완화시키며, 손상된 식도 점막을 치유케 하고 합병증을 방지하는 역할을 하는 걸로 알려져 있다. 그러나 최대 40-60%에 이르는 환자의 경우 장기간 억제제를 투여했음에도 불구하고 증상의 완전한 소실이 이루어지기 어려우며 오히려 부작용을 일으키거나 압, 협착 및 Barrett식도와 같은 합병증이 발생하기도 한다<sup>7-11</sup>. 따라서 역류성 식도염의 증상을 효과적으로 개선시키면서 장기적으로 안전하게 사용할 수 있는 천연 치료제의 개발이 무엇보다 필요하다.

檳榔(빈랑, *Areca catechu* L.)은 종려과(Palmae)에 속하는 빈랑나무의 성숙과실을 건조한 것으로 종자에는 0.3-0.7%의 여러 alkaloid가 포함되어 있으며, alkaloid의 주성분은 arecoline, arecolidine, guvacoline, guvacine 등이 있다. 또한 위장보호, 항염증, 항진균 및 항바이러스 효능이 있으며, 위장의 연동 촉진과 소화액 분비 효과에 대한 다양한 연구가 이뤄지고 있다<sup>12</sup>.

黃連(황련, *Coptis deltoidea* C.Y. Cheng et Hsiao)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 여러해살이 초본 식물의 뿌리를 제거한 뿌리줄기로, 주요성분인 berberine 외에도 coptisine, jatrorrhizine, worenine, columbainine, palmatine, magnoflorine 등의 성분을 함유하고 있다<sup>13</sup>. 또한 기억장애 개선, 염증성 단백질로 알려진 iNOS, COX-2 및 TNF- $\alpha$ 의 생성 저해, 체장세포에서의 세포사멸 억제와 같은 다수의 항염증 효과 연구와 항산화 효능 연구가 지속적으로 보고되고 있다<sup>14</sup>.

항염증의 효능으로 주로 알려진 檳榔과 黃連은 복합물로서 만성 역류성 식도염 동물 모델에 이용한 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 檳榔과 黃連이 들어간 導滯湯, 芍藥湯 및 莎芎散 같은 처방에서 비율을 조사하였으며, 복합물을 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 식도 점막 보호에 미치는 영향을 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

본 실험에서 사용한 檳榔과 黃連은 옹기한약국(대구, 한국)에서 구입한 것을 생약 규격집에 맞추어 관능검사하여, 약전규격에 적합한 것만 정선한 후 사용하였다. 檳榔과 黃連을 각각 200 g을 분쇄한 후 2,000 mL를 가하여 열탕 추출기에서 2시간씩 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압 추출장치로

농축 후, 동결 건조기를 이용해 완전 건조시켜 檳榔 파우더(수율, 7.5%; 수분함량, 8.257%M)와 黃連 파우더(수율, 14%; 수분함량, 10.112%M)를 얻어 -80 °C에서 냉동 보관하였으며, 실험 직전에 檳榔과 黃連이 導滯湯, 芍藥湯, 莎芎散<sup>16</sup>의 처방에서 주로 사용되는 1:2.5의 혼합비율로 빈랑자 파우더와 황련 파우더를 혼합하여 증류수에 녹인 후 사용하였다.

## 2) 시 약

본 실험에 사용된 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, naringin, diethylene glycol, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare(Buckinghamshire, IL, UK)에서 구입하였고, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), kelch-like ECH-associated protein 1(Keap1), heme oxygenase-1(HO-1), phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65(NF-κBp65), inducible nitric oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), matrix metalloproteinase-2(MMP-2), tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinases-2(TIMP-2), histone, β-actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)에서 구입하였다. 마취제는 Virbac(Carros, France)에서 구입한 Zoletil과 rompun(Bayer Korea Ltd, 서울, 한국)을 혼합하여 사용하였다. ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare로부터 구입하였으며, 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific(Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 3) 실험 동물

5주령(130-150 g)의 SD rat 수컷을 대한바이오(음성, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, conventional system으로 온도(22±2 °C), 습도(50±5%), 명암주기(light:dark cycle) 12시간의 동물 사육실 조건에서 고형사료(Zeigler Bros, Inc., PA, USA)와 물을 충분히 공급하였다. 또한, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적 관리를 위하여 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인(DHU2020-024)을 얻어 동물관리 규정을 준수하여 동물 실험을 시행하였다.

## 4) 실험기기

본 실험에서 deep-freezer(Sanyo Co., Japan), Sensi-Q2000 Chemidoc(Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea), 열탕추출기(Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea), vortex mixer, 감압 추출장치(N-1100, Eyela, Japan), 동결 건조기(FreeZone 1, Labconco, MO, France), rotary vacuum evaporator (Buchi B-480, Switzerland), 냉장고속원심분리기(Mega17R, Hanil Scientific Inc., Seoul, Korea), Microplate reader(Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland), 전자체중계(CAS, Gyeonggi, Korea), tissue grinder (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA), 광학 디지털 카메라(DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)를 사용하여 실험을 진행하였다.

## 2. 방법

### 1) Total polyphenol 및 total flavonoid 함량 측정

Total polyphenol 함량은 total phenolic compound 정량법에 의해 측정하였다<sup>15</sup>. 시료 10 μL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μL, 증류수 790 μL를 잘 혼합한 후 실온에서 1분 동안 반응시켜 20% sodium carbonate 150 μL를 첨가하였다. 그리고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 Microplate reader를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하였으며 시료의 total polyphenol 함량을 산출하였다.

Total flavonoid 함량은 Lister 등의 방법에 의해 측정하였다<sup>16</sup>. Diethylene glycol 1 mL, 시료 추출물 100 µL 및 1 N NaOH 10 µL를 잘 혼합시켜 37 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 Microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 물질로 naringin을 사용하여 표준 검량선을 구하였으며 시료의 total flavonoid 함량을 산출하였다.

2) DPPH radical 소거 활성 측정

추출한 시료의 DPPH free radical 소거능 측정은 Blois방법에 의해 측정하였다<sup>17</sup>. 60 µM DPPH 용액 100 µL와 시료를 농도별로 희석한 용액 100 µL를 혼합하여 암소 상태에서 30분간 방치한 다음 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 본 실험에서 L-ascorbic acid는 양성대조물질로 사용하였다. IC<sub>50</sub> 값은 free radical 농도를 절반으로 감소시킬 때 필요한 시료의 양으로 나타내었으며, IC<sub>50</sub> 값은 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

DPPH radical scavenging activity(%)

$$= [1 - (\frac{OD_{sample}}{OD_{control}})] \times 100$$

OD<sub>sample</sub> : Absorbance of sample

OD<sub>control</sub> : Absorbance without sample

3) ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS free radical 소거능은 Re 등의 방법으로 측정하였다<sup>18</sup>. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM potassium persulfate를 잘 혼합한 다음 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS+을 형성시켰으며, 415 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02이 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. 희석된 용액 95 µL에 시료 5 µL를 가하여 15분 동안 방치한 후 Microplate reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 본 실험에서 L-ascorbic acid는 양성대조물질로 사용하였다. IC<sub>50</sub> 값은 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

ABTS radical scavenging activity(%)

$$= [1 - (\frac{OD_{sample}}{OD_{control}})] \times 100$$

OD<sub>sample</sub> : Absorbance of sample

OD<sub>control</sub> : Absorbance without sample

4) 만성 역류성 식도염 유발, 동물 처치

24시간 절식 후 Zoletile mixture를 0.75 mg/kg 복강 주사하여 마취한 다음 수술을 진행하였다. 제 모기로 복부 털을 제거하고 복간 정중부를 약 2 cm 개방하여 블랙 실크(1-0)실로 대만부위(limiting ridge)를 묶고, 날문부위에는 latex ring(18-Fr Nelaton catheter, 2 mm in thickness)을 끼워 나일론(5-0)으로 묶은 후, 피부와 복막을 봉합하였다. 수술 후 감염 방지를 위해 3일 동안 소염제(Dexamethasone)와 항생제(Gentamicin sulfate)를 희석하여 피하주사 하였으며, 수술 24시간 뒤 물을, 48시간 뒤에는 사료를 공급해주었다. 1주일 동안의 회복기가 지난 후에 처치를 하지 않은 정상군(Normal), 만성 역류성 식도염 유발 후 증류수를 경구 투여한 대조군(Control), 만성 역류성 식도염 유발 후 檳榔와 黃連 복합물 200 mg/kg 경구 투여군(AC-mix)으로 총 3그룹 무작위 분류하였으며, 모든 군은 매일 일정한 시간에 체중과 식이 섭취량을 측정하였고, 약물 투여는 14일 동안 1일 1회 진행하였다. 본 실험에서 경구투여 농도는 기존 연구 중 만성 역류성 식도염 동물 모델에서의 추출물 농도를 참고하여 실험을 진행하였다<sup>19</sup>.

5) 식도 육안적 관찰

식도 조직을 분리한 후 수술용 가위를 이용하여 식도를 세로로 절단하였으며, 절단된 식도 내부는 적당량의 NaCl(0.9%)로 세척한 후 깨끗한 모눈종이 위에 전개하여 광학 디지털 카메라를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도 점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., Gyeonggi, Korea) 프로그램을 이용하여 식도의 손상 부위 면적을 측정한 후, 식도 전체 면적과 비교하여 아래의 식을 이용하여 비율(%)로 표시하였다.

The gross mucosal damage ratio(%)

$$= [\text{width of area with esophageal mucosal injury (mm}^2\text{)}/\text{width of total area of esophagus(mm}^2\text{)}] \times 100$$

## 6) 식도 조직 Western blotting

식도 조직에서 세포질을 얻기 위하여 0.1 M DTT, 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5의 5 mM Tris-HCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4의 100 mM Tris-HCl를 첨가한 buffer A를 추가하고 tissue grinder로 분쇄한 뒤 NP-40(10%) 용액을 첨가하였다. Ice 위에서 30분 동안 정지시킨 다음 12,000 rpm, 2분 조건으로 원심분리 하여 세포질을 포함한 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위하여 NP-40(10%)를 추가한 buffer A로 2회 헹구고 buffer C(50 mM HEPES, 50 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA) 100 µL를 첨가해 채부유시킨 다음 10분 간격으로 vortex를 3회 반복하였다. 그리고 12,000rpm, 10분, 4 °C 조건에서 원심분리 한 다음 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 각각 냉동 보관(-80 °C)하였다. 세포질의 Keap1, HO-1, iNOS, COX-2, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, β-actin 단백질과 핵에서의 Nrf2, NF-κBp65, histone 단백질 발현 측정을 위해 10 µg의 단백질을 SDS polyacrylamide gel(8-12%)을 이용하여 전기연동한 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 미리 준비한 membrane에 각각 1차 antibody를 처리하여 4 °C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 antibody에 적합한 2차 antibody(PBS-T로 1:3000로 희석)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 membrane을 노출시킨 다음 Sensi-Q2000 Chemidoc에 감광시켜 단백질 발현을 확인하였으며 ATTO Densitograph Software(ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 해당 band를 정량하였다. 각 그룹의 단백질 수준은 정상군의 단백질 수준으로 나누어 상대적 비로 나타내었다.

## 7) 통계분석

*In vitro*의 수치는 평균과 표준오차(mean±SEM)로, *in vivo*의 수치는 평균과 표준편차(mean±SD)로 표시하였으며, SPSS(Version 25.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성은 P<0.05일 경우 유의성이 있다고 판정하여 나타냈다.

## III. 결 과

## 1. Total polyphenol 및 total flavonoid 함량 측정

AC-mix 추출물의 total polyphenol와 total flavonoid 함량을 측정한 결과, total polyphenol 함량은 154.44±0.81 mg/g으로 나타났으며, total flavonoid 함량은 127.13±0.21 mg/g으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of AC-mix Extract

Sample name	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg NE/g)
AC-mix	154.44±0.81	127.13±0.28

AC-mix : Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract

All values are expressed mean±SEM of three replications.

## 2. DPPH 및 ABTS free radical 소거 활성 측정

DPPH 및 ABTS free radical 소거법을 이용하여 AC-mix 추출물의 항산화능을 측정하였으며, 실험의 정확성을 확인하기 위하여 양성대조군으로는 L-ascorbic acid을 사용하였다. AC-mix 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, IC<sub>50</sub> = 9.90±0.16 µg/mL로 나타났으며, ABTS radical 소거 활성은 IC<sub>50</sub> = 17.16±0.19 µg/mL로 나타냈다(Fig. 1).

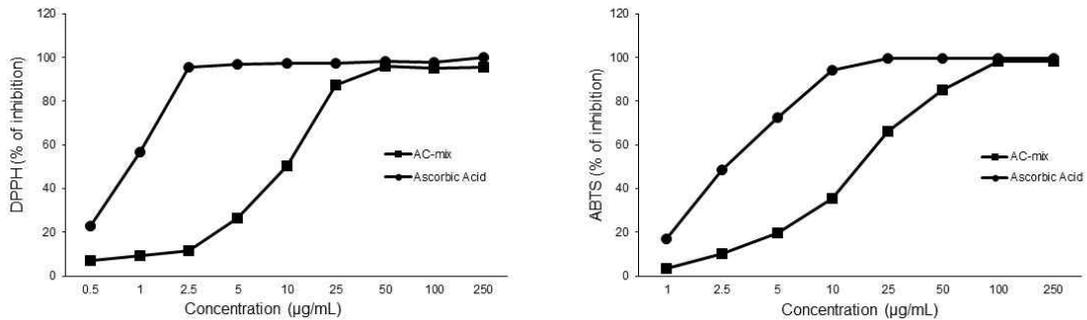


Fig. 1. Scavenging activity (IC50) of AC-mix on DPPH and ABTS free radical.

AC-mix : Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract  
 All values are expressed mean±SEM of three replications.

### 3. 식도 조직의 점막 손상도 측정

식도 조직에서 점막 손상 정도를 확인한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 정상군의 식도 점막은 손상이나 궤양이 발견되지 않았고, 만성 역류성 식도염을 유발한 후 증류수를 투여한 대조군의 점막

손상 면적은 7.16±1.10%로 식도의 중간과 하단 부위에서 점막 손상과 궤양이 발견되었다. AC-mix 투여군은 식도의 하단 부위에 점막 손상과 궤양이 발견되었지만 점막 손상 면적이 2.62±1.37%로 대조군에 비하여 현저히 감소한 것으로 나타났다(Fig. 2).

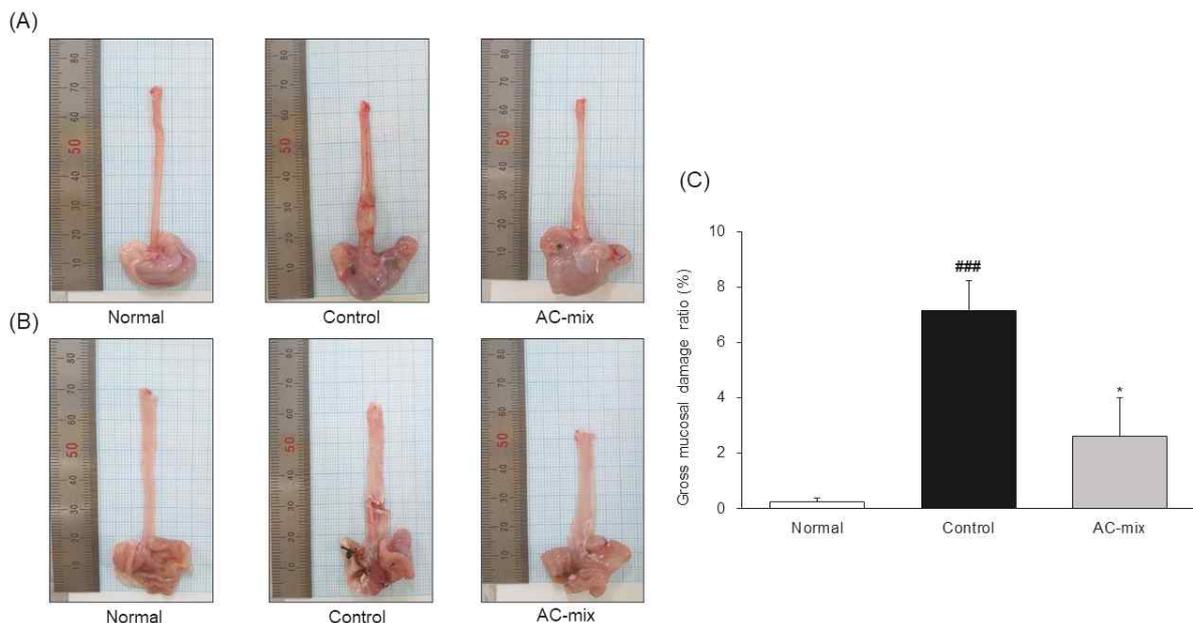


Fig. 2. The gross mucosal injury evaluation in esophagus tissue.

A representative gross image after surgical induction: (A), the opened gross mucosal injury: (B), gross mucosal injury ratio: (C). Normal: normal rats, Control: chronic reflux esophagitis control rats, AC-mix: Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: ### $p < 0.001$  vs. Normal and \* $p < 0.05$  vs. Control.

4. 식도 조직 내 항산화 단백질 발현량 분석

식도 조직에서 western blot을 통해 항산화 관련 단백질인 Nrf2, Keap1 및 HO-1의 발현을 확인한 결과, Nrf2의 경우 정상군에 비하여 대조군은 약 1.47배 유의적으로 낮게 나타났으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.35 유의적으로 높게 나타났다. Keap1의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 약

1.23 유의적으로 높게 나타났으나, 대조군에 비하여 AC-mix 투여군은 약 1.25배 유의적으로 감소하였다. 또한, HO-1은 정상군에 비하여 대조군은 약 1.72배 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.65배 유의적으로 증가하였다(Fig. 3).

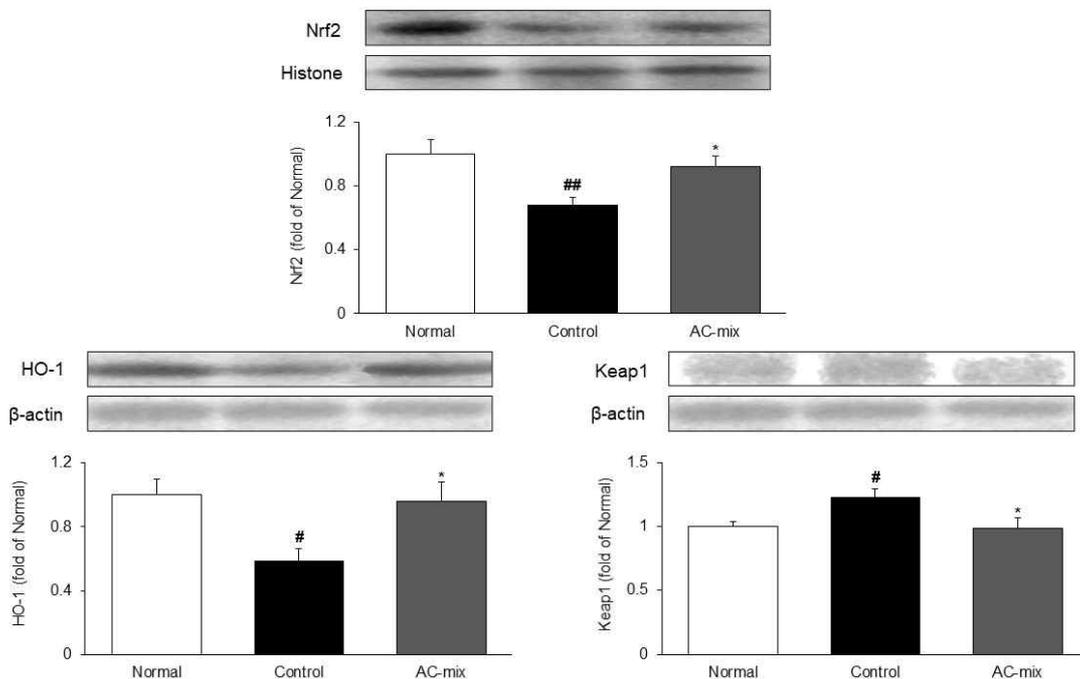


Fig. 3. Effects of AC-mix on Nrf2, Keap1, and HO-1 antioxidant related protein expression.

Normal: normal rats, Control: chronic reflux esophagitis control rats, AC-mix: Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: #p<0.05, ##p<0.01 vs. Normal and \*p<0.05 vs. Control.

5. 식도 조직 내 염증성 단백질 발현량 분석

1) 염증성 전사인자 발현량 분석

식도 조직 내에서 western blot을 통해 염증성 전사인자인 NF-κBp65의 발현을 측정된 결과, NF-κBp65는 정상군에 비하여 대조군은 약 1.33배 유의적으로 높게 나타났으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.18배 유의적으로 감소하였다(Fig 4).

2) 염증성 매개인자 발현량 분석

식도 조직 내에서 western blot을 통해 염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2의 발현을 확인한 결과, iNOS는 정상군에 비하여 대조군은 약 1.44배 유의성 있게 높게 나타났으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.32배 유의성 있게 감소하였다. COX-2의 경우 정상군에 비하여 대조군은 약 1.18배 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.19배 유의적으로 감소하였다(Fig. 5).

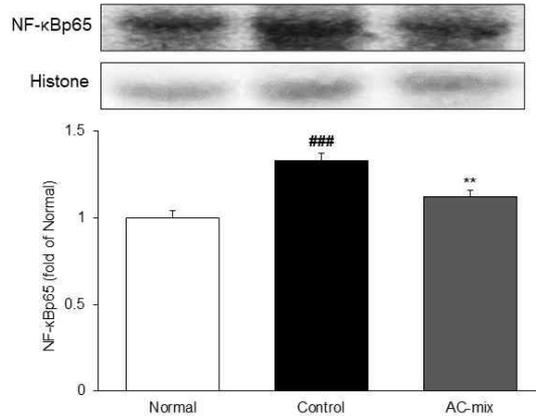


Fig. 4. Effects of AC-mix on NF-κBp65 inflammation related protein expression.

Normal: normal rats, Control: chronic reflux esophagitis control rats, AC-mix: Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: <sup>###</sup> $p < 0.001$  vs. Normal and <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs. Control.

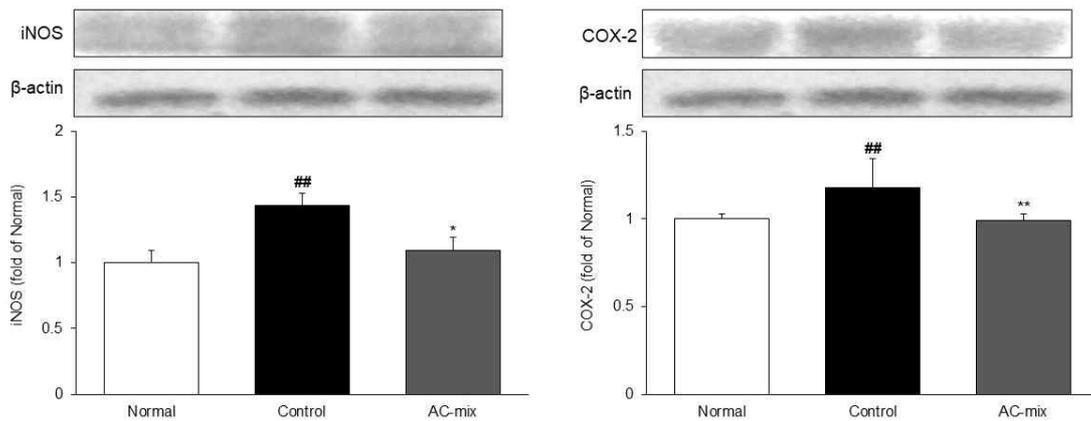


Fig. 5. Effects of AC-mix on iNOS and COX-2 inflammation related protein expressions.

Normal: normal rats, Control: chronic reflux esophagitis control rats, AC-mix: Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. Normal and <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs. Control.

## 6. MMPs 및 TIMPs 발현량 분석

식도 조직 내에서 western blot을 통해 기질 금속단백분해효소인 MMP-2와 기질 금속단백분해효소 억제자인 TIMP-1 및 TIMP-2의 발현을 확인한 결과, MMP-2는 정상군에 비하여 대조군은 약 1.16배 유의적으로 높게 나타났으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.10배 유의적으로 감소하

였다. TIMP-1의 경우, 정상군에 비하여 대조군은 약 1.53배 감소하였으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.47배 증가하여 정상군의 수치와 비슷하였다. TIMP-2는 정상군에 비하여 대조군은 약 1.20배 유의성 있게 감소하였으나, 대조군 대비 AC-mix 투여군은 약 1.21배 증가하여 정상군의 수치와 비슷하였다(Fig. 6).

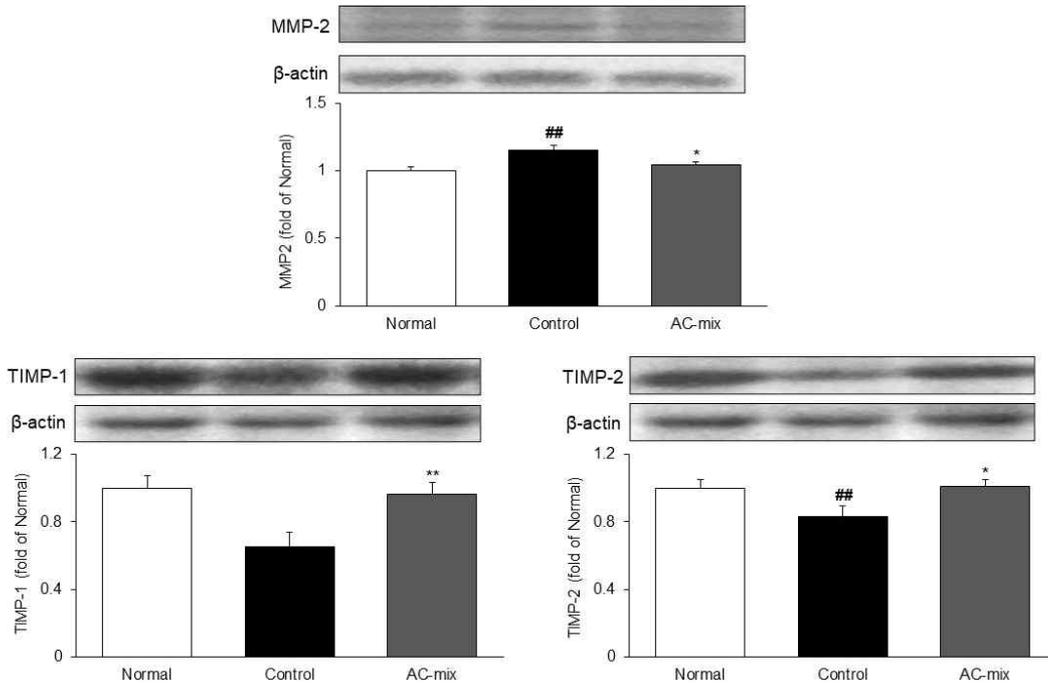


Fig. 6. Effects of AC-mix on MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 protein expressions.

Normal: normal rats, Control: chronic reflux esophagitis control rats, AC-mix: Areca Semen and Coptidis Rhizoma mixture extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: ## $p$ <0.01 vs. Normal and \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. Control.

#### IV. 고찰

역류성 식도염(Reflux esophagitis, RE)은 위 내용물이 식도로 역류하여 식도점막의 미란의 결손 및 궤양이 나타나는 비교적 흔한 위장질환 중의 하나로 정의되어있다. 전형적인 증상으로는 위산의 역류와 흉부 작열감이 가장 특이도가 높다고 알려져 있으며, 흉통, 인후 이물감, 만성 기침 등의 다양한 증상이 나타난다<sup>20</sup>.

최근 역류성 식도염에 관한 많은 연구에서 식도점막의 손상이 산화적 스트레스(Oxidative stress, OS)와 밀접한 관련이 있음이 보고되었는데, OS는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 과다 생성으로 유발되며, 체내 여러 물질과 반응하여 세포와 조직에 손상을 유도하거나 발암, 세포 독성 및 돌연변이 등을 초래하고 손상을 유발하며 각종

질병과 염증과 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 이유로 역류성 식도염의 증상이 심화되는 것으로 알려져 있다. 반면, 항산화제 투여에 의해 OS를 억제시켰을 경우 식도 점막의 손상을 개선시킨다는 연구 결과가 보고되어 있다<sup>21,22</sup>.

본 연구는 만성 역류성 식도염 증상 개선을 위한 유효한 효과를 나타낼 수 있는 천연 치료제 개발을 위한 연구로서 진행하였으며 빈랑 추출물과 황련 추출물의 복합물인 AC-mix의 in vitro 항산화능을 측정하였고 그 결과를 토대로, in vivo 실험을 통해 AC-mix가 만성 역류성 식도염 동물 모델에 미치는 효능을 평가하였다. 만성 역류성 식도염을 유발한 후 14일간 AC-mix를 경구 투여하여 육안적 손상면적, western blot을 통한 식도 조직 내 염증성 전사인자, 염증성 매개인자를 포함한 단백질, 항산화 관련 인자와 기질 금속단백분해효소의

발현을 측정하였다.

AC-mix의 항산화능을 확인하기 위해 *in vitro* 실험을 통해 total polyphenol과 total flavonoid 함량, DPPH, ABTS free radical 소거능을 확인하였다. Total polyphenol 함량은  $154.44 \pm 0.81$  mg GAE/g으로 나타났으며, total flavonoid 함량은  $127.13 \pm 0.21$  mg NE/g으로 나타났다. 또한, DPPH free radical 소거능의  $IC_{50}$ 은  $9.90 \pm 0.16$   $\mu$ g/mL, ABTS free radical 소거능의  $IC_{50}$ 은  $17.16 \pm 0.19$   $\mu$ g/mL로 높은 항산화능을 나타냈다. DPPH, ABTS free radical 소거능이란 radical을 50% 감소시키는 시료의 농도를  $IC_{50}$  값으로 나타낸 것으로 값이 낮을수록 높은 항산화능을 가지고 있음을 판단한다(Table 1, Fig. 1). 이를 통해 AC-mix의 처치는 우수한 항산화 효과를 보일 것으로 판단되어진다.

만성 역류성 식도염을 유발한 동물 모델에 AC-mix를 14일의 기간 동안 투여한 후 식도 조직을 적출하여 육안적으로 관찰한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 정상군은 식도 점막의 손상이 나타나지 않았으나 만성 역류성 식도염을 유발한 대조군에서는 식도 점막 손상과 궤양이 뚜렷하게 나타나 실험 모델이 잘 유발되어진 것으로 나타났다. AC-mix 투여군의 경우 대조군 대비 식도 점막의 손상이 현저하게 감소되었기에 식도 점막 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 2).

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)는 다양한 독성 물질과 발암 물질로부터 여러 세포 보호 유전자의 발현을 증가시켜 항암, 신경 보호, 항염증 반응 등과 같은 다양한 측면에서 세포와 조직 보호의 핵심 요소라고 알려져 있다<sup>23</sup>. Nrf2는 세포질에서 Nrf2-Keap1 복합체로 위치하다가 활성 산소종이나 친전자성 물질의 신호에 의해 단백질을 분해시키는 세포 내 단백질 분해 경로인 ubiquitin proteasome pathway를 통해 빠르게 분해된다<sup>24</sup>. 안정화된 Nrf2는 핵 내로 전이되어 antioxidant response element(ARE)와 결합함으로써 항산화 효소의 발현을 조절하며, 이러한 항산화 효소들은 활성산소

의 생성을 억제시켜 세포와 조직을 보호하게 된다<sup>25</sup>. Heme oxygenase-1(HO-1)은 핵 내로 이동한 Nrf2가 ARE와 결합하였을 시 조절되는 항산화 효소 중 하나이며, 산화적 바이오마커인 ROS와 산화 스트레스에 대한 보호 작용을 하고 세포와 조직의 항염증성 활성화에 기여한다<sup>26</sup>. 또한 HO-1의 산물인 bilirubin에 의해 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킨다는 연구도 보고되어 있다<sup>27</sup>. Western blot을 통해 Nrf2, Keap1 및 HO-1의 발현량을 측정된 결과, Nrf2와 HO-1는 대조군 대비 AC-mix 투여군에서 유의적으로 높게 나타났고, Keap1은 AC-mix 투여군의 수치가 정상군의 수치와 비슷하게 감소하였다. 이와 같은 결과로 AC-mix의 투여로 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 Nrf2-Keap1 항산화 경로를 통해 손상된 식도 점막의 보호 효과가 있다고 사료된다(Fig. 3).

Phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65(NF- $\kappa$ Bp65)는 핵 내 전사요소로서, Rel gene family의 핵 단백질이며 세포질에서는 I $\kappa$ B와 접합되어 불활성인 형태로 존재한다. NF- $\kappa$ Bp65는 산화적 스트레스 등의 자극에 의해 I $\kappa$ B가 인산화되어 분리되면 NF- $\kappa$ Bp65는 핵 안으로 이동하여 염증 관련 유전자들의 핵심적인 전사 조절의 역할을 하면서 염증반응을 촉진한다. 따라서, NF- $\kappa$ Bp65 활성을 저해했을 시 염증반응 억제되는 것으로 잘 알려져 있다<sup>28</sup>. Western blot을 통해 NF- $\kappa$ Bp65의 발현량을 측정된 결과, AC-mix 투여군에서 유의적으로 감소하였다(Fig. 4).

Inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)는 염증성 매개인자로, 활성화된 NF- $\kappa$ Bp65의 유도에 의해 생성되어진다. 염증반응의 지표물질인 nitric oxide(NO)는 iNOS에 의해 합성되고, 감염 및 외상 등에 의해 생긴 염증이 발현되면 COX-2의 작용으로 인해 다양한 염증반응의 매개체를 생성하게 된다<sup>29,30</sup>. 다량의 NO 생성은 염증반응과 염증매개체의 생합성을 촉진하고 염증을 심화시켜 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등

을 일으킨다고 알려져 있다<sup>31,32</sup>. Western blot을 통해 iNOS와 COX-2의 단백질 발현량을 측정한 결과, AC-mix 투여군의 수치는 정상군의 수치와 비슷하게 감소하는 것을 나타냈다. 이러한 결과로 AC-mix가 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 NF- $\kappa$ Bp65의 경로를 불활성화 시켜 염증성 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시킴으로써 손상된 식도 점막을 보호한다고 사료된다(Fig. 5).

Matrix metalloproteinases(MMPs)는 기질단백분해효소로서, 피부결합의 조직성분인 collagen의 분해 및 변형의 원인으로 작용하며 MMPs 중 MMP-2는 1차에 분해된 콜라겐 조각을 더 잘게 분해하며 피부 노화를 촉진하는 과정에서 주요 역할을 한다<sup>33,34</sup>. 또한, MMPs의 활성을 조절하는 인자인 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1과 TIMP-2는 MMPs와 각각 결합하여 재형성 간 균형과 세포 간 기질의 파괴를 조절한다고 알려져 있다<sup>35</sup>. Western blot을 통해 MMP-2, TIMP-1 및 TIMP-2의 단백질 발현량을 측정한 결과, AC-mix 투여에 의해 MMP-2는 유의성 있게 감소하는 것을 나타냈으나, 감소된 TIMP-1과 TIMP-2의 발현량은 정상군의 수치와 비슷하게 증가하였다(Fig. 6). 이를 통해 AC-mix가 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 대표적인 세포외기질인 콜라겐을 분해하는 MMP-2 단백질을 감소시키고 이를 억제하는 TIMP-1과 TIMP-2 단백질을 증가시켜 손상된 식도 점막의 보호 효과가 있다고 판단된다. 이러한 결과는 檳榔과 黃連 복합물이 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 항산화 인자와 염증인자를 조절하여 식도손상을 완화시킬 뿐만 아니라 기질 단백분해효소의 발현을 조절함으로써 식도 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

기존 연구들 중 황련 열수 추출물 또는 다른 복합물의 만성 역류성 식도염에 대한 효능은 항산화 인자와 염증성 관련 단백질을 중점으로 확인되었다<sup>36,37</sup>. 따라서 본 연구에서는 염증성 단백질과 체내 결합 조직과 관련된 세포 외 기질 단백질의 연

관성을 알아보기 위해 실험을 추가적으로 진행하였으며, 염증성 관련 단백질과 세포 외 기질 단백질의 조절로 만성 역류성 식도염 동물 모델 식도의 결합 조직 내 손상을 억제함을 확인할 수 있었다. 추후 檳榔과 黃連의 1:2.5 비율 외 다른 복합비로의 추가 실험이 요구되며, 본 연구를 통해 추가 실험 또한 만성 역류성 식도염 동물 모델에 긍정적인 효과가 있을 것이라 판단되어진다.

## V. 결론

본 연구에서는 檳榔과 黃連 복합물의 항산화 활성을 확인하였으며, 이를 토대로 만성 역류성 식도염을 유발한 동물 모델에서 AC-mix를 14일간 투여한 후 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. *In vitro*를 통해 AC-mix의 항산화능을 확인한 결과, total polyphenol(154.44±0.81 mg GAE/g)과 total flavonoid(127.13±0.21 mg NE/g)는 높은 함량을 보여주었으며, DPPH(IC<sub>50</sub>=9.90±0.16 µg/mL)와 ABTS(IC<sub>50</sub>=17.16±0.19 µg/mL) 분석에서 뛰어난 radical 소거능을 보여주었다.
2. 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 식도 육안적 관찰 결과, AC-mix의 투여로 식도 점막 궤양이 개선된 것을 확인하였다.
3. AC-mix의 투여는 Nrf2-Keap1 항산화 경로를 통해 항산화 단백질인 HO-1의 발현을 유의적으로 증가시켰다.
4. AC-mix의 투여는 NF- $\kappa$ Bp65 활성을 억제하였으며, NF- $\kappa$ Bp65로 유도되어지는 염증성 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현을 유의적으로 감소시켜 Normal군의 수치와 비슷한 수치를 나타냈다.
5. AC-mix의 투여는 MMP-2의 발현을 감소시키고, TIMP-1과 TIMP-2의 단백질 발현을 유의적으로 증가시켰다.

이 결과를 종합하였을 때 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 檳榔과 黃連 복합물의 투여는 Nrf2-Keap1의 항산화 경로를 통해서 항산화 관련 단백질 발현을 증가시켰으며, 염증 경로인 NF-κBp65 활성을 억제하여 염증성 매개인자의 발현을 억제시킬 뿐만 아니라 이를 통해 기질 단백분해효소의 발현을 조절함으로써 식도 점막 보호 효과를 보인 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 한국연구재단에서 시행한(NRF-2017R1A2B2006858), (No. 2018R1A5A2025272)과 (No. 2019R1I1A1A01064068)의 지원을 받아 수행되었습니다.

### 참고문헌

1. Jeon SG, Rhee PL. Prevalence, Clinical Manifestations, and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease in Korea. *The Korean Journal of Gastroenterology* 2002;39(6):393-401.
2. Lee SH. A Comparative Study on the Effects of Pinellia ternata, Zingiber officinale and Sobanhatang on Reflux Esophagitis. *Sangji University Graduate School* 2017.
3. Kethman W, Hawn M. New Approaches to Gastroesophageal Reflux Disease. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2017;16(6):1544-52.
4. Jang MW, Lim SW. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *The journal of internal Korean medicine* 2013;34(4):362-74.
5. Sandhu DS, Fass R. Current Trends in the Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gut Liver* 2017;12(1):7-16.
6. Jang HJ. Clinical characteristics of gastroesophageal reflux disease and the risk factors for erosive esophagitis. *Gyeongsang National University Graduate School* 2009.
7. Castell DO, Murray JA, Tutuian R, Orlando RC, Arnold R. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease - oesophageal manifestations. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2004;20(9):14-25.
8. Colin-Jones DG. Histamine-2-receptor antagonists in gastroesophageal reflux. *Gut* 1989;30(10):1305-8.
9. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *American Journal Gastroenterol* 1999;94(6):1434-42.
10. Klinkenberg-Knol EC, Jansen JMBJ, Festen HPM, Meuwissen SG, Lamers CB. Double-blind multicentre comparison of omeprazole and ranitidine in the treatment of reflux esophagitis. *Lancet* 1987;329(8529):349-51.
11. Spechler SJ. Comparison of medical and surgical therapy for complicated gastroesophageal reflux disease in Veteran. *The New England Journal of Medicine* 1992;326:786-92.
12. Lee KS, Kim SH, Chun SH, Park SS, Park CS, Shin YS. Antimicrobial Activity of Areca catachu L. Extract of against Intestinal Pathogens. *The Korean Society of Food Science and Nutrition* 1998;11(1):36-40.
13. Kim SH, Roh SS, Lee JA, Shin MR, Lee AR, Koo JS, et al. Improving Effects on Rats with Chronic Acid Reflux Esophagitis Treated of Coptidis Rhizoma Extract. *The Korea Journal of Herbology* 2019;34(1):117-24.
14. Kim BW. Effects of Hwangryeun Extract on the Recovery of Liver Function in CCl4-exposed Rat. *Journal of Physiology & Pathology in Korean*

- Medicine* 2011;25(6):1020-5.
15. Go YJ, Kim YE, Kim HN, Lee EH, Cho EB, Akhmadjon S, et al. Inhibition effect against elastase, collagenase, hyaluronidase and anti-oxidant activity of thinning Green ball apple. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry* 2020; 63(1):43-50.
  16. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the science of food and agriculture* 1994;64(2):155-61.
  17. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
  18. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;26(9-10):1231-7.
  19. Lee JA, Park HJ, Kim SH, Kim MJ, Kim KJ, Shin MR, et al. Evaluation of Evodiae Fructus Extract on the Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats. *Kor J Herbol* 2019;34(2):15-23.
  20. Han CH, Lee JS, Lim HH, Oh YS, Yoon YK, Kim SG, et al. The Significance of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) Symptoms in Patients with Reflux Esophagitis. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2000;6(2):196-205.
  21. Giri AK, Rawat JK, Singh M, Gautam S, Kaithwas G. Effect of lycopene against gastroesophageal reflux disease in experimental animals. *BioMed Central Complement Altern Med* 2015;15:110.
  22. Choi SY, Kim JH, Lee JM, Lee SH, Cho EJ. Protective effect of Acer okamotoanum from oxidative stress in C6 glial cells. *Journal of applied biological chemistry* 2017;60(2):141-7.
  23. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes & Development* 2013;27(20):2179-91.
  24. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2005;7(3-4):385-94.
  25. Lim JS. Expression of Nrf2 Transcription Factor in Rat Kidney. *Chonnam National University Graduate School* 2009.
  26. Li L, Grenard P, Nhieu JT, Julien B, Mallat A, Habib A, et al. Heme oxygenase-1 is an antifibrogenic protein in human hepatic myofibroblasts. *Gastroenterology* 2003;125(2):460-9.
  27. Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimizuka K, et al. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 2004; 127(2):595-606.
  28. Lee HS. Suppressive effect of chlorella on oxidative stress and NFkB activity. *Inje University Graduate School* 2003.
  29. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294(5548):1871-5.
  30. Shon DH, Choi DW, Kim MH. Improvement of anti-inflammation activity of Gardeniae fructus extract by the treatment of  $\beta$ -Glucosidase. *Korean Society of Food Science and Technology* 2012; 44(3):331-6.
  31. Hippeli S, Elstner EF. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radical Research* 1999;31(1):81-7.
  32. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, et al. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of

- nitric oxide synthase. *Journal of Experimental Medicine* 1993;178(2):749-54.
33. Kim JO, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, et al. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *Journal Ethnopharmacol* 2011;137(1):427-33.
34. Hwang YP, Choi JH, Kim HG, Choi JM, Hwang SK, Chung YC, et al. Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor NF $\kappa$ B/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts. *Nutrition Research* 2012;32(6):428-38.
35. Johnson MD, Kim HR, Chesler L, Tsao-Wu G, Bouck N, Polverini PJ. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *Journal of Cellular Physiology* 1994;160(1):194-202.
36. Kim SH, Roh SS, Lee JA, Shin MR, Lee AR, Koo JS, et al. Improving Effects on Rats with Chronic Acid Reflux Esophagitis Treated of *Coptidis Rhizoma* Extract. *Kor J Herbol* 2019;34(1):117-24.
37. Kim MY, Shin YO, Lee JY, Lee AR, Shin SH, Kwon OJ, et al. Improving Effect of a Combined Extract of *Rhei Rhizoma* and *Glycyrrhizae Rhizoma* through Anti-oxidative Stress in Reflux Esophagitis rats. *Kor J Herbol* 2015;30(4):37-44.