

왕우렁이 추출물의 역류성 식도염 억제 효과*

남현화*** · 류승목**** · 양선규***** · 김옥진***** · 문병철***** · 서윤수**

The Anti-inflammatory Effects of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) in Reflux Esophagitis Model

Nam, Hyeon Hwa · Ryu, Seung Mok · Yang, Sungyu · Kim, Wook Jin · Moon, Byung Cheol · Seo, Yun-Soo

Reflux esophagitis (RE) is a common gastrointestinal disease observed at all ages, which seriously affects the quality of life. In this study, we investigated the anti-inflammatory effects of *Pomacea canaliculata* extract (PCE) using the experimental RE rat model. RE was induced by a surgical procedure. The rats were randomly divided into 4 groups: normal group, RE group, PCE group (RE treated with PCE, 100 mg/kg), positive control group (RE treated with ranitidine, 40 mg/kg). We performed the histological examination and measured the expression of tight junction complex and inflammatory mediators using western blot analysis. The phenotypes of RE were attenuated by PCE treatment. PCE administration significantly reduced esophageal mucosal damage and protected tight junction confirmed by claudin-5. Furthermore, PCE treatment reduced inflammatory reaction by inhibiting the expression of COX-2 and TNF- α . PCE treatment, also, reduced translocation of NF- κ B into nuclear and I κ B- α phosphorylation at the same time. Our findings indicate that PCE has the potential as a novel therapeutic agent to inhibit RE by protecting mucosal damage and regulating inflammatory reactions mediated by NF- κ B signaling.

Key words : anti-inflammation, claudin-5, NF- κ B, *Pomacea canaliculata*, reflux esophagitis

* 본 연구는 한국한의학연구원 '지속가능한 한약표준자원 활용 기술' (KSN2012320) 사업 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

** Corresponding author, 한국한의학연구원 한약자원연구센터 선임연구원(sys0109@kiom.re.kr)

*** First author, 한국한의학연구원 한약자원연구센터 박사후연구원

**** 한국한의학연구원 한약자원연구센터 선임연구원

***** 한국한의학연구원 한약자원연구센터 기술연구원

***** 한국한의학연구원 한약자원연구센터 책임연구원

I. 서 론

최근 경제수준의 향상과 건강에 대한 사회적 관심이 높아짐에 따라 삶의 질의 향상에 집중하는 웰빙 트렌드가 사회적 현상으로 거론되고 있다(Lee and Lee, 2016). 이러한 사회적 트렌드에 맞추어 친환경 농법을 이용한 유기농 식품에 대한 수요 역시 증가하고 있다(Bae, 2006). 벼농사의 경우 제초제등의 화학적 약물 대신 우렁이, 오리, 기계제초, 쌀겨 등의 다양한 생물과 유지자원을 잡초관리에 주로 활용하고 있다. 특히 우렁이를 이용한 농법은 수중의 잡초를 뜯어먹는 습성을 이용한, 벼의 유기농 재배에서 가장 많이 사용하는 방법이다.

왕우렁이(Golden Apple Snail, *Pomacea canaliculata*)는 사과우렁이과(*Ampullariidae*)에 속하는 연체동물로서 열대지방에서 주로 서식하는 것으로 보고되어 있다(Liu et al., 2018). 1983년 식용을 목적으로 국내에 도입되었으며, 1992년부터 잡식성의 왕성한 식성을 이용해 친환경농법에 활용된 것으로 추정된다(Lee et al., 2002). 왕우렁이 생산 농가에서는 소비촉진을 위해 왕우렁이를 이용한 음식의 조리법을 개발하고 각종 식품의 형태로 판로를 개척하고 있으나, 소비촉진 및 농가의 소득창출을 기대하기 어려운 실정이다.

역류성 식도염은 전 연령대에서 관찰되는 대표적인 상부 위장관 질환으로 위산과 펩신 등의 위 내용물의 반복적인 역류에 의해 식도점막에 염증이 발생하는 질환이다(DeMeester et al., 1979). 이는 하부 식도 괄약근(lower esophageal sphincter)의 기능 약화와 식도 청소능의 저하에 의해 발생한다(Watson and Peters, 2005; Osdchuk et al., 2019). 이러한 지속적인 위 내용물의 역류는 만성적인 식도염, 흡인성 폐렴, 식도협착, 바렛 식도 등의 질환을 유발한다(Biancani et al., 1997). 위벽세포에서 분비되는 위산과 동반되는 산화적 스트레스는 점막과 점액층의 물리적 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Rao and Vijayakumar, 2008). 또한 COX를 비롯한 염증성 매개인자의 과발현이 조직의 손상과 역류성 식도염의 발병에 밀접하게 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(Pawlik et al., 2011).

본 연구에서는 왕우렁이의 기능성 소재로의 활용 가능성을 확인하고 부가가치 창출을 위해 실험동물에서 유도된 역류성 식도염에 대한 왕우렁이 추출물의 유효성을 평가하였으며, 식도 점막 보호효과와 염증 억제효과를 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

왕우렁이는 전남 나주시의 양식장에서 구매하였으며 한국한의학연구원 양선규 박사의 형태감별 후 DNA 바코드 염기 서열 분석을 통해 해당 종을 확정하여 실험에 사용하였다.

동정표본(accession number: 2-19-0397)은 한국한의학연구원 한약자원연구센터 한약표준표본관(Index Herbariorum Code : KIOM)에 보관하였다. 동결건조를 통하여 건조된 왕우렁이(1070 g) 원물을 잘게 파쇄하여 증류수 10 L에 3시간 동안 환류 추출하였으며, 얻어진 추출액을 여과한 후 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 최종 추출물은 동결건조를 통해 분말화(141 g, 수율: 13.2%)하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물

Sprague Dawley (SD) 랫드를 대한바이오링크(Chungcheongbuk-do, Korea)에서 구입하였으며, 1주일간의 순화 후 실험에 사용하였다. 표준 고체 식이와 물을 자율식으로 공급하였으며, 랫드를 6마리씩 정상군(normal group), 역류성 식도염 유도군(RE group), 역류성 식도염 유도 및 왕우렁이 추출물 투여군(PCE 100 group, 100 mg/kg), 역류성 식도염 유도 및 대조약물 투여군(R40 group, ranitidine, 40 mg/kg, Sigma-Aldrich, USA)으로 나누어 실험을 진행하였다. 모든 실험은 전북대학교의 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(CBNU 2020-010).

3. 역류성 식도염의 유도

역류성 식도염의 유도를 위해 수술 18시간 전부터 절식상태를 유지하였으며, 호홉마취(Isotroy, TroiKaa, Gujarat, India) 후 개복하여 유문부와 전위부를 결찰하여 위 내용물과 위산의 역류를 유도하였다. 왕우렁이 추출물과 대조약물은 수술 1시간 30분 전 경구로 공급되었으며, 수술 4시간 30분 후 희생하여 실험을 진행하였다. 희생된 랫드에서 식도를 분리하여 세로로 절단 후 0.9% NaCl로 세척하여 전개한 뒤 광학디지털 카메라(EOS 5D Mark IV, Canon, japan)를 이용하여 촬영하였으며, 식도 점막의 손상도는 Image J 프로그램을 이용하여 계산하였다.

4. 조직병리학적 분석

랫드의 수집된 식도 조직을 10% 포르말린에 고정시키고 탈수와 투명화 한 후 파라핀 포매를 진행하였다. 응고된 파라핀 블록은 마이크로톰(Leica, Nussloch, Germany)으로 5 μ m 섹션으로 절단 하였으며, hematoxylin & eosin으로 염색하였다. 염색된 조직은 디지털 광학현미경으로 촬영하여 조직병리학적 분석을 진행하였다.

5. Western blot assay

랫드로부터 수집된 식도 조직을 NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 세포질과 핵의 용해액을 획득하였다. 획득한 용해액은 bradford assay를 이용하여 단백질을 정량하고 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE gel로 분리한 후 니트로 셀룰로스 막으로 옮겼다. 단백질을 5% skim milk를 이용하여 blocking한 후 1차 항체와 함께 4°C에서 overnight 반응시켰다. 세척 후, 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 반응시킨 후 ECL을 사용하여 ChemiDoc (Bio-RAD, CA, Hercules, CA)을 통해 검출하였고 이미지 분석프로그램을 사용하여 반응 강도를 정량하였다.

6. 통계처리

모든 실험 결과값은 평균 ± 표준 오차를 나타내었으며 통계처리는 SPSS v12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 각 그룹 간의 차이는 ANOVA 분석 및 LSD 사후분석을 실시하였고 P<0.05일 경우 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

Ⅲ. 결 과

1. 식도 점막 손상도 측정

역류성 식도염에 대한 왕우렁이 추출물의 보호효과를 확인하기 위해 식도 점막의 손상을 확인하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 정상군에서는 식도 점막에서의 변화가 관찰되지 않았으며, 역류성 식도염이 유도된 실험군에서는 위산 및 위 내용물 역류에 인한 조직의 탈락, 출혈 등의 검게 변색된 점막의 손상이 관찰되었다. 식도염 유도군에 비해 대조약물 투여군에서는 90%의 손상 감소율을 나타냈으며, 왕우렁이 추출물을 투여한 실험군에서 손상된 점막의 영역이 49% 감소했으며, 유의적인 보호효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

2. 식도점막의 조직병리학적 분석

조직병리학적인 분석을 진행한 결과, 정상군에서는 조직학적 변화가 관찰되지 않았으나, 수술로 유도된 역류성 식도염 대조군의 점막조직에서는 위 내용물 및 위산의 역류로 상피와 소섬유성 결합조직층의 괴사와 광범위한 탈락, 염증세포의 침윤이 확인되었다(Fig. 2).

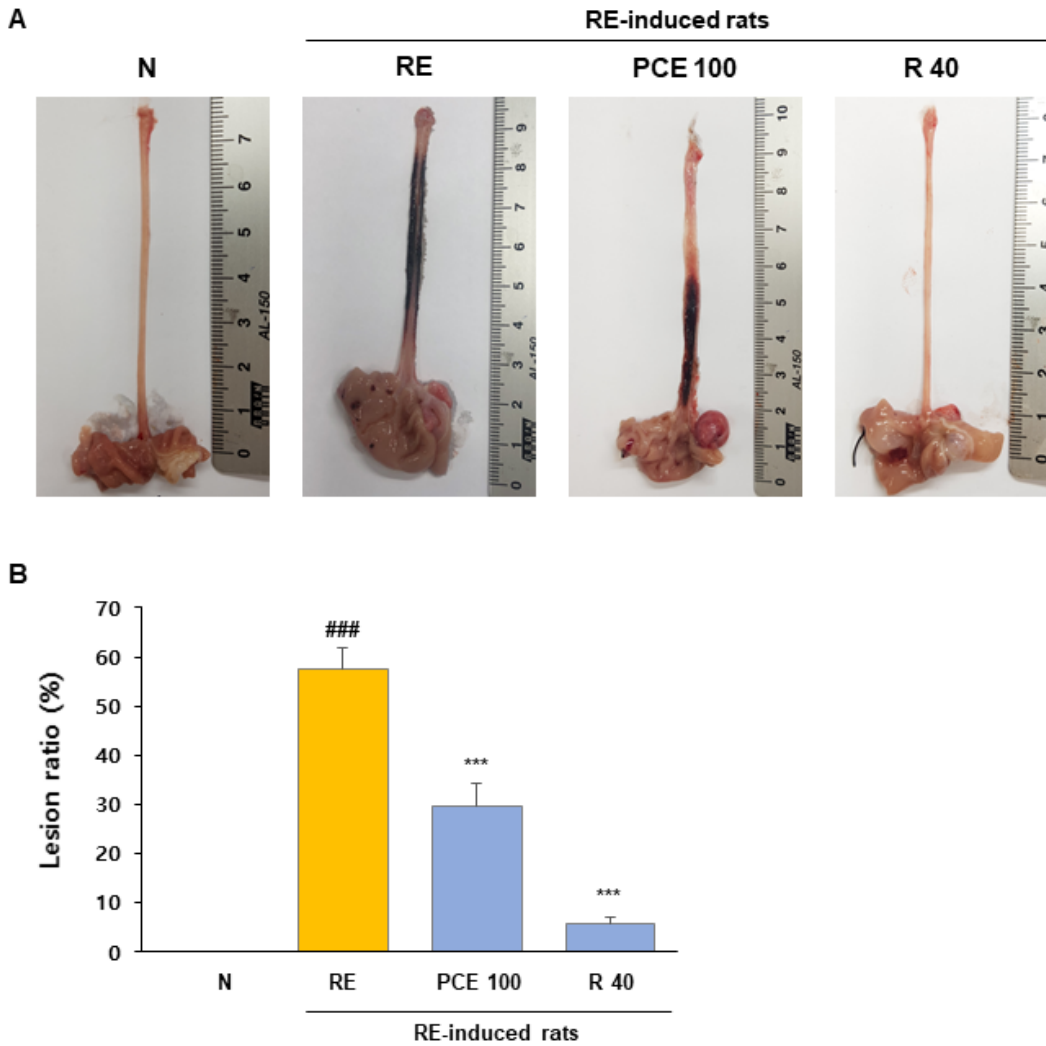


Fig. 1. Effects of PCE on esophagus tissues of rats induced esophagitis. (A) Morphologic changes and (B) lesion ratio (%) in esophageal mucosa of reflux esophagitis induced rats. The gross esophageal evaluation in different group: N, Normal group; RE, induced esophagitis group; PCE100, induced esophagitis + PCE 100 mg/kg group; R40, induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg.

P < 0.001 vs normal group; *** P < 0.001 vs RE group.

왕우렁이 추출물을 투여한 실험군에서는 대조약물 투여군에서와 유사하게 점막조직의 탈락 및 염증세포의 침윤이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

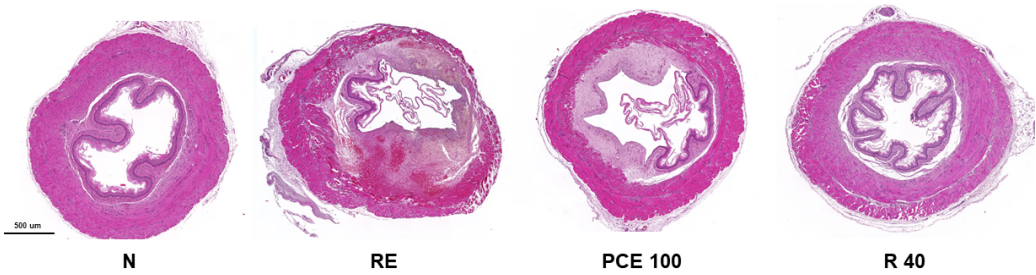


Fig. 2. Histopathological changes of esophageal mucosa in reflux esophagitis rats by staining hematoxylin & eosin. The histological change evaluation in different group: N, Normal group; RE, induced esophagitis group; PCE100, induced esophagitis+PCE 100 mg/kg group; R40, induced esophagitis+ranitidine 40 mg/kg.

3. Claudin-5 (tight junction protein) 발현량 변화

Claudin-5는 장관조직의 tight junction의 지표로서 역류 유도로 인한 조직의 손상을 확인하기 위한 지표로서 사용하였다. 질환유도군에서는 위산에 의한 조직 상피의 손상으로 claudin-5의 발현량이 40% 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 왕우렁이 추출물 투여 시 claudin-5의 발현량이 질환군 대비 18% 증가한 것으로 보아 추출물에 의해 점막조직의 tight

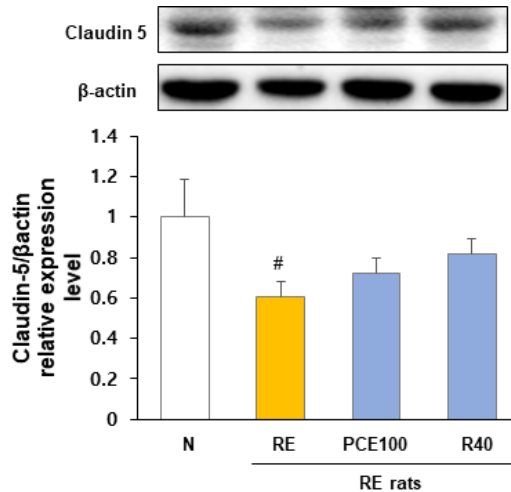


Fig. 3. The PCE improved claudin-5 protein expression level in reflux esophagitis rats. N, Normal group; RE, induced esophagitis group; PCE100, induced esophagitis + PCE 100 mg/kg group; R40, induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg.

P < 0.05 vs normal group.

junction이 보호되는 것을 확인할 수 있었으나 추출물 투여군과 대조약물 투여군 모두에서 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

4. 염증성 단백질 및 사이토카인 발현량 변화

위산과 펩신의 분비와 함께 염증매개인자의 과발현이 역류로 인한 식도조직의 손상과 역류성 식도염의 발병과정에 밀접하게 연관되어 있음이 보고되어 있다(Pawlik et al., 2011). 왕우렁이 추출물의 식도 점막 보호효과와 염증매개인자의 연관성을 확인하기 위해 대표적 염증매개인자인 COX-2와 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현량을 확인하였다(Fig. 4). 정상군과 비교하여 질환유도군에서 COX-2와 TNF- α 의 발현량이 현저하게 증가하였으며, 왕우렁이 추출물 투여 후 COX-2 발현량과 TNF- α 발현량이 각각 47%, 26% 감소하였다.

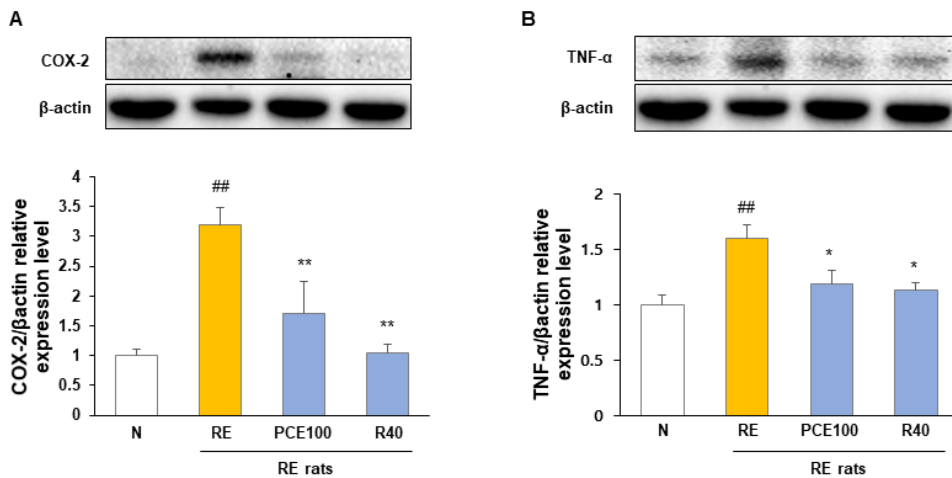


Fig. 4. Inhibition effects of PCE on the expression of (A) COX-2 protein and (B) TNF- α cytokine in esophagus tissues. N, Normal group; RE, induced esophagitis group; PCE100, induced esophagitis + PCE 100 mg/kg group; R40, induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg.

^{##} P < 0.01 VS normal group; ^{*} P < 0.05 and ^{**} P < 0.01 VS RE group.

5. p-I κ B α , p-NF- κ B 활성화 정도 측정

역류성 식도염에 대한 왕우렁이 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위해 COX-2와 TNF- α 의 상위 조절인자인 NF- κ B에 대한 왕우렁이 추출물의 효과를 확인하였다(Fig. 5). 역류성 식도염 유도군에서 위 내용물의 역류로 인해 I κ B α 의 인산화와 p-NF- κ B의 핵 내 이동

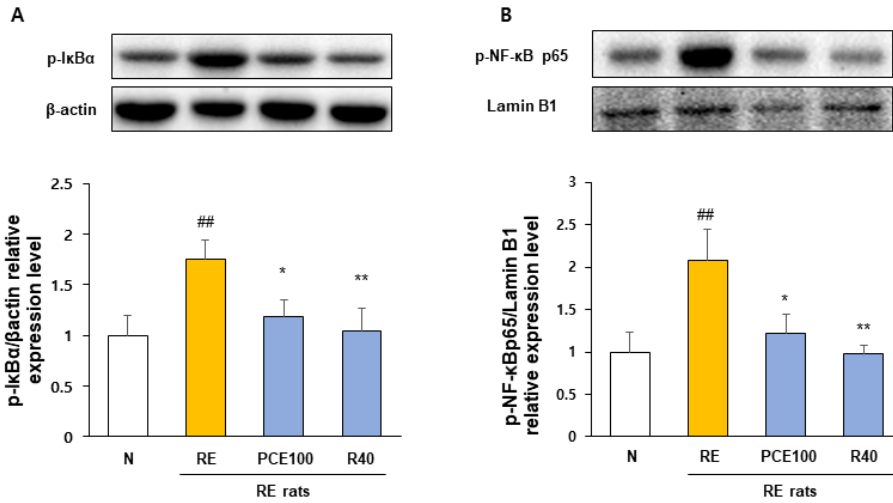


Fig. 5. Inhibition effects of PCE on the expression of (A) p-IκBα and (B) p-NF-κBp65 in esophagus tissues. N, Normal group; RE, induced esophagitis group; PCE100, induced esophagitis + PCE 100 mg/kg group; R40, induced esophagitis + ranitidine 40 mg/kg. ## P < 0.01 vs normal group; * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs RE group.

이 증가하는 것을 확인하였다. 왕우렁이 추출물을 투여한 경우 p-IκBα의 발현량이 33% 감소하였으며, 대조약물 투여군은 40% 정도의 억제활성을 나타내었다. p-NF-κB의 핵 내 이동을 측정한 결과, 왕우렁이 추출물 투여 후 질환유도군 대비 42%의 억제효과를 나타내었으며, 대조약물 투여군은 50%이상의 억제효과를 나타내었다.

IV. 고 찰

현대의학의 꾸준한 발전에도 불구하고 역류성 식도염은 여전히 삶의 질 저하와 사회적 비용을 야기하는 질환으로 남아있다(Altomare et al., 2013). 역류성 식도염은 위 운동장애, 식도점막의 과민성 및 방어 기전의 약화 등으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 속 쓰림과 상복부의 통증 등의 증상과 점막의 변화를 야기한다(Singh et al., 2012). 역류성 식도염의 주요 원인으로는 하부식도 조임근의 일시적 이완이나 압력의 감소, 열공 헤르시아와 같은 해부학적 결손, 식도 체부의 청소능 저하, 위 배출시간의 지연 등이 있으며, 이 중 일시적 또는 반복적인 하부식도 기능 저하로 인한 위 내용물의 역류가 가장 중요한 요인으로 받아들여지고 있다(Jung et al., 2012). 역류성 식도염 치료는 증상의 완화와 식도 점막의 손상을 치유하고 그로 인한 합병증을 예방하는 것을 목적으로 하며, 임상적으로는 위산의 분

비를 조절을 위한 H_2 수용체 길항제나 양성자 펌프 억제제가 많이 사용되고 있으나 장기간 사용 시 pH 증가로 인한 살균작용 억제, 소화 불량, 치료효과 감소 등의 다양한 부작용을 동반하므로 이를 최소화 할 수 있는 대안적 치료소재 개발이 필요한 실정이다(Jang and Lim, 2013; Jabri et al., 2018).

왕우렁이는 1983년 논 잡초방제와 식용을 목적으로 국내에 도입되었으며, 최근 벼농사에 유기농법을 적용하는 농가가 많아지면서 왕우렁이의 생산이 증가함에 따라 왕우렁이의 판로 개척에 대한 관심 또한 증가하고 있다. 본 연구에서는 수술적 방법을 통해 유도한 역류성 식도염 모델에서의 식도 점막의 조직병리학적인 관찰과 염증성 인자의 분석을 통해 왕우렁이 추출물의 항염증 효과를 확인하였다.

역류성 식도염 유발 동물모델에서 대조군의 식도 점막 관찰 결과, 역류성 식도염의 임상적 조직병리 소견과 유사한 점막조직의 괴사와 탈락, 염증세포의 침윤, 출혈 등의 변화가 관찰되었다. 그러나, 왕우렁이 추출물을 투여한 실험군에서는 위 내용물의 역류로 인한 조직의 침식면적이 현저하게 감소하였으며, 조직의 괴사와 염증세포의 침윤 역시 완화된 것을 확인할 수 있었다.

장관의 상피조직은 외부의 항원, 미생물 생성물, 독소 등의 체내 유입을 막는 보호막의 역할을 한다. 상피세포와 내피세포에서 발견되는 tight junction은 세포간의 접합 복합체로서 상피와 내피의 이러한 기능적 장벽 형성에 주요한 역할을 함으로서 세포간의 공간을 통한 세포 및 용질의 통과를 조절한다(Wu et al., 2018). Tight junction은 claudin family, occludin, junctional adhesion molecules, tricellulin의 4가지 세포막 단백질로 구성되어 있으며, 이중 claudin-5가 장벽의 기능에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Okimoto et al., 2018). 역류성 식도염 모델에서 tight junction의 변화를 확인하기 위해 claudin-5의 변화를 확인한 결과, 위 내용물의 역류로 인해 손상이 일어난 조직에서 claudin-5의 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 소화기 점막 tight junction의 붕괴는 소화기 면역계에 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다(Castoldi et al., 2015). 역류성 식도염 모델에서 감소한 claudin-5의 발현량이 왕우렁이 추출물 투여군에서 회복되는 양상을 보였으며, 이를 통해 왕우렁이 추출물이 소화기 장벽에 대한 보호효과가 있음을 확인하였다.

식도 점막조직에서의 COX-2의 과발현은 역류성 식도염, Barrett 식도염, 식도암 등 다양한 질환의 발생과 진행에 있어 밀접하게 연관되어 있으며, COX-2 억제제의 투여가 산과 펩신에 의해 유발된 점막조직의 손상이 억제하는 것으로 알려져 있다(Souza et al., 2000; Buttar et al., 2002). 이전의 보고와 유사하게 역류성 식도염이 유발된 실험쥐에서 COX-2의 발현과 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현량이 증가하였으며, 왕우렁이 추출물 투여 후 유의적으로 감소됨을 확인할 수 있었다. NF- κ B는 COX-2의 발현을 조절하는 상위인자로서 다양한 염증성 질환의 주요 타겟으로 알려져 있다(Piazuelo et al., 2003). NF- κ B는 세포질 내에 억제 단백질인 I κ B- α 와 결합되어 있으나 자극으로 인해 I κ B- α 가 인산화 되어 세포핵

내로 이동하여 염증반응을 일으키게 된다. 역류성 식도염 모델에서 증가한 NF- κ B와 p-I κ B- α 의 발현 역시 왕우렁이 추출물의 투여를 통해 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 왕우렁이 추출물이 NF- κ B의 조절을 통해 염증 매개인자의 발현을 억제하며 식도점막의 염증반응을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다.

V. 적 요

본 결과를 통해, 왕우렁이 추출물의 역류성 식도염 모델에서 위 내용물의 역류로 인한 조직손상에 대한 보호효과를 확인하였다. 식도 점막의 육안 소견과 조직병리학적 분석 결과 점막의 괴사, 염증세포의 침윤 등의 증상이 완화됨을 확인하였으며, 상피조직의 tight junction을 보호하여 위산과 펩신으로부터 점막을 보호하는 것을 확인하였다. 이러한 왕우렁이 추출물의 식도 보호효과는 NF- κ B 기전의 조절을 통해 점막의 염증반응을 억제하여 나타나는 것으로 생각된다. 이상의 결과를 종합하였을 때, 왕우렁이 추출물이 역류성 식도염 완화를 위한 기능성 소재로서의 가능성을 가지는 것으로 사료된다.

[Submitted, October. 6, 2020; Revised, December. 9, 2020; Accepted, December. 23, 2020]

References

1. Altomare, A., M. P. L. Guarino, S. Cocca, S. Emerenziani, and M. Cicala. 2013. "Gastroesophageal reflux disease: update on inflammation and symptom perception", *World J. Gastroenterol.* 19(39): 6523-6528.
2. Bae, K. G. 2006. Current Situation of Agricultural Organic Products and Organic Processing Food. *Food Sci. & Industry.* 39(3): 35-51.
3. Biancani, P., U. D. Sohn, H. G. Rich, K. M. Harnett, and J. Behar. 1997. Signal transduction pathways in oesophageal and lower oesophageal sphincter circular muscle. *Am. J. Med.* 103, pp. 23S-28S.
4. Buttar, N. S., K. K. Wang, M. A. Anderson, R. A. Dierkhising, R. J. Pacifico, K. K. Krishnadath, and L. S. Lutzke. 2002. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition in Barrett's esophagus epithelium: an in vitro study. *J. Natl. Cancer Inst.* 94(6): 422-429.
5. Castoldi, A., C. Favero de Aguiar, P. M. Moraes-Vieira, and N. Olsen Saraiva Camara.

2015. They must hold tight: junction proteins, microbiota and immunity in intestinal mucosa. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16(7): 655-671.
6. DeMeester, T. R., J. A. Wernly, and G. H. Bryant. 1979. Clinical and in vitro analysis of determinants of gastroesophageal competence. A study of the principles of antireflux surgery. *Am. J. Surg.* 137(1): 39-46.
 7. Jabri, M. A., H. Tounsi, A. Abdellaoui, L. Marzouki, and H. Sebai. 2018. Protective effects of *Artemisia campestris* extract against gastric acid reflux-induced esophageal mucosa injuries. *Pathophysiology.* 25(1): 63-69.
 8. Jang, M. W. and S. W. Lim. 2013. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *Korean J. Orient. Int. Med.* 34(4): 362-374.
 9. Jung, H. K., S. J. Hong, Y. J. Jo, S. W. Jeon, Y. K. Cho, K. J. Lee, J. S. Lee, H. J. Park, E. S. Shin, S. H. Lee, S. U. Han, and Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. 2012. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. *Korean J. Gastroenterol.* 60(4): 195-218.
 10. Lee, D. H. and H. H. Lee. 2016. The effect of food service consumers' organic selection attributes on satisfaction. *Int. J. Cult. Tour. Hosp. Res.* 30(5): 97-109.
 11. Lee, S. B., M. H. Koh, Y. E. Na, and J. H. Kim. 2002. Physiological and Ecological Characteristics of the Apple Snails. *Korean J. Environ. Agri.* 21(1): 50-56.
 12. Liu, C., Y. Zhang, Y. Ren, H. Wang, S. Li, F. Jiang, L. Yin, X. Qiao, G. Zhang, W. Qian, B. Liu, and W. Fan. 2018. The genome of the golden apple snail *Pomacea canaliculata* provides insight into stress tolerance and invasive adaptation. *Gigascience.* 7(9): giy101.
 13. Okimoto, K., M. Arai, H. Ishigami, K. Saito, S. Minemura, D. Maruoka, T. Matsumura, T. Nakagawa, T. Katsuno, M. Suzuki, Y. Nakatani, and O. Yokosuka. 2018. A Prospective Study of Eosinophilic Esophagitis and the Expression of Tight Junction Proteins in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease Symptoms. *Gut Liver.* 12(1): 30-37.
 14. Osadchuk, A. M., I. L. Davydkin, T. A. Gricenko, and M. A. Osadchuk. 2019. Gastroesophageal reflux disease and esophagitis associated with the use of drugs: the modern state of the problem. *Ter. Arkh.* 91(8): 135-140.
 15. Pawlik, M., R. Pajdo, S. Kwicien, A. Ptak-Belowska, Z. Sliwowski, M. Mazurkiewicz-Janik, S. J. Konturek, W. W. Pawlik, and T. Brzozowski. 2011. Nitric Oxide (NO)-releasing Aspirin Exhibits a Potent Esophagoprotection in Experimental Model of Acute Reflux Esophagitis. Role of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines. *J. Physiol. Pharmacol.* 62(1): 75-86.
 16. Piazuelo, E., P. Jimenez, and A. Lanas. 2003. COX-2 Inhibition in Esophagitis, Barrett's

- Esophagus and Esophageal Cancer. *Curr. Pharm. Des.* 9(27): 2267-2280.
17. Rao, C. V. and M. Vijayakumar. 2008. Effect of Quercetin, Flavonoids and Alpha-Tocopherol, an Antioxidant Vitamin, on Experimental Reflux Oesophagitis in Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589(1-3): 233-238.
 18. Singh, P., N. Singh, S. Sengupta, and G. Palit. 2012. Ameliorative effects of *Panax quinquefolium* on experimentally induced reflux oesophagitis in rats, *Indian J. Med. Res.* 135(3): 407-413.
 19. Souza, R. F., K. Shewmake, D. G. Beer, B. Cryer, and S. J. Spechler SJ. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 60(20): 5767-5772.
 20. Watson, T. J. and J. H. Peters. 2005. Lower esophageal sphincter injections for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Thorac. Surg. Clin.* 15(3): 405-415.
 21. Wu, L., T. Oshima, M. Li, T. Tomita, H. Fukui, J. Watari, and H. Miwa. 2018. Filaggrin and tight junction proteins are crucial for IL-13-mediated esophageal barrier dysfunction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 315(3): G341-G350.