



Original Article / 원저

역류성 식도염에 대한 螃蟹 열수추출물의 보호효과

남현화¹, 서윤수¹, 송준호¹, 이아영¹, 노푸름¹, 문병철^{1*}, 이지혜^{1,2*}

¹한국한의학연구원 한약자원연구센터

²세명대학교 한의과대학

Crab Water Extract Ameliorates Reflux Esophagitis in Rats

Hyeon-Hwa Nam¹, Yun-Soo Seo¹, Jun-Ho Song¹, A Yeong Lee¹, Pureum Noh¹,
Byeong Cheol Moon^{1*}, Ji Hye Lee^{1,2*}

¹Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental
Medicine

²College of Korean Medicine, Semyung University

ABSTRACT

Objectives: In this study, we aim to demonstrate an effect of crab water extract (CWE) on reflux esophagitis (RE) using lipopolysaccharide (LPS)-induced Raw 264.7 cell and rat model.

Methods: To investigate on LPS-induced Raw 264.7 cell, CWE was co-treated with LPS. CWE suppressed Nitric Oxide (NO) production which increased by LPS treatment. Also, CWE showed no cytotoxicity at the concentrations range from 500 $\mu\text{g/ml}$ to 2000 $\mu\text{g/ml}$. Next, to investigate the protective effects of CWE on RE rat model, eighteen rats were divided in to three groups: sham group, reflux esophagitis group, and reflux esophagitis pre-treated with 100 mg/kg CWE 1 h before surgery. RE was induced by a pylorus and forestomach ligation operation and all rats were sacrificed after 4 h 30 min from surgery.

Results: In gross examination, the CWE administration attenuated esophageal mucosal injury upon histological evaluation of reflux esophagus of rats. The CWE downregulated the expression levels of proteins related to inflammation, such as COX-2 and TNF- α in the esophagus tissue. In addition, the CWE suppressed the NF- κB and I κB - α activation.

Conclusions: Based on these findings, we concluded that CWE could possess protective effect against damage to the esophagus due to reflux esophagitis.

Key words : anti-inflammation, crab, NF- κB , reflux esophagitis.

I. 서론

역류성 식도염은 식도로 역류한 위 내용물로 인해 염증이 유발된 것으로, 전 세계 인구 중 40%가 평생 한번은 경험하는 소화기계의 대표적인 질환이다¹⁾. 가슴앓이(heart burn)와 산 역류(acid regurgitation)가 대표적인 임상 증상으로 관찰되며²⁾, 이 외에도 흉통, 후두염, 치아의 부식 등의 비정형적인 증상이 관찰되기도 한다³⁾. 또한 식도 내벽 조직에 손상이 발생하므로 적절한 치료가 이루어지지 못하고 만성화되는 경우에는 협착, 바렛 식도, 식도암 등의 합병증 위험이 증가하기도 한다⁴⁾.

역류성 식도염의 치료에 사용하는 약물로는 양성자펌프 억제제(PPIs), 히스타민-2 수용체 길항제(H₂RA), 제산제 등이 있다⁵⁾. 하지만 이와 같은 약물치료에도 20~30%의 환자에서는 치료 효과가 관찰되지 않는다는 보고가 있고⁶⁾, 빈번한 재발이나^{7, 8)} 부작용^{9,10)} 등의 한계점이 있어 이를 해결하기 위한 대응책이 요구된다.

역류성 식도염은 나타나는 임상증상을 토대로 한의학의病症 중 吞酸, 嘈雜, 吐酸, 噎膈, 胸痺 등에 대응된다. 기본적으로 胃氣虛逆, 肝胃不和, 痰濕鬱阻 등으로辨證되어 健脾胃降逆氣, 舒肝和胃降逆, 清化濕痰, 和胃降逆 등의 治法이 치료에 주로 활용된다.¹¹⁾

게는 식용으로 사용되는 대표적인 수산물로 단백질, 키틴, 카르티노이드, 셀레늄 등 다양한 영양성분을 지니고 있으며 최근 식품 뿐 아니라 약용자원으로서도 주목을 받고 있다¹²⁾. 한의학에서는 일찌감치 게의 의약적 가치를 인지하고 한약자원으로 사용해왔다. 《東醫寶鑑》湯液篇 蟲部門에 蟹는 ‘主胸中熱結. 治胃氣消食. 療漆瘡. 治產後肚痛, 血不下’을 主治한다는 기술에서 게의 한의학적 효능을 알 수 있다. 고문헌에서 게를 종류에 따라 蝸蟬, 擁劍, 蟻蝓, 螃蟹 등으로 구분하고 있는데, 그 중 螃蟹는 ‘治反胃噎膈’의 효능이 있어 소화기계 질환의 치료에 사용했다는 기록을 찾아볼 수 있다¹³⁾.

따라서 본 연구는 螃蟹 추출물이 治反胃噎膈의 효능을 통해 역류성 식도염의 개선에 효과를 나타낼 것으로 기대하고 역류성 식도염을 유발한 동물모델에서 螃蟹 열수 추출물의 효능을 알아보려고 실시되었다.

II. 연구 방법

1. 추출물 제조

본 연구에 사용된 螃蟹는 2019년 광주 및 나주지역 수산시장에서 방게류로 유통되는 것을 포장단위로 구매하여 시료로 사용하였다. 구매한 시료는 1차적으로 미토콘드리아 COI (mtDNA cytochrome c oxidase subunit I) 유전자 분석을 통해 염기서열을 확보하였으며, BLAST 검색 후 GenBank database에 보고된 염기서열과 비교 하였다. 염기서열 비교 분석을 통해 해당 시료를 방게속(*Helice*)에 속하는 방게 *Helice tridens* (De Haan, 1835)와 갈게 *Helice tientsinensis* Rathbun, 1931로 종을 확정하여 실험에 사용하였으며, 증거표본으로 제작하여 한국한의학연구원 한약자원연구센터에 보관하고(Voucher number: 2-19-0516), 해당 염기서열은 NCBI Gene Bank에 등록하였다(OM095413, OM095414).

동결건조 후 분쇄한 螃蟹 시료 636 g에 증류수 6 L를 넣고 100 ± 2°C에서 3시간 동안 환류 추출하고 여과한 후 감압농축기로 농축하였다. 농축물을 동결건조하여 열수 추출물 96.36 g을 수득하였으며(수득률 15.15%, w/w) 한약자원센터 추출물은행에 보관하고(Voucher number: 3-19-0140), 이 중 일부를 실험에 사용하였다.

2. 세포생존율 및 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

Raw 264.7 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)는 10% Fetal Bovine Serum (FBS)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. Raw264.7 세포를 96 well plate에 1 × 10⁶ cell/well의 농도로 분주하고, 500, 1000, 2000 µg/ml 농도의 螃蟹 열수추출물 처리 1시간 후에 1 µg/ml의 LPS를 세포에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포생존율은 Cell counting Kit-8를 이용하여 측정하였으며, NO 생성량은 Griess 반응을 이용하여 측정된 뒤, sodium nitrate를 사용하여 작성한 표준곡선을 통해 계산되었다.

*Corresponding author : Ji Hye Lee. College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Republic of Korea.

Tel : +82-43-649-1697, Fax : +82-43-649-1702, E-mail : leejh@semyung.ac.kr

*Corresponding author : Byeong Cheol Moon. Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 11 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea.

Tel : +82-61-338-7100, Fax : +82-61-338-1735, E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

•Received : January 25, 2022 / Revised : January 28, 2022 / Accepted : February 8, 2022

3. 실험동물

Sprague Dawley (SD) rat을 두얼바이오테크 (Seochogu, Seoul, Korea)에서 구입하여 1주일동안 사육실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 동물은 conventional system으로 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기(light-dark cycle)는 12시간 주기로 조절하여 사육하였다. 고형사료와 물은 자유 섭취하게 하였고 모든 사육기자재는 멸균하여 사용하였다. 실험은 미국국립보건원 (National Institutes of Health)의 규정에 따라 수행하였고, 전북대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 실험을 진행하였다(CBNU 2020-010).

SD rat은 각각 6마리씩 정상군, 대조군, 螃蟹 열수추출물 투여군으로 나누어 실험에 사용되었으며 螃蟹 열수추출물 투여군은 역류성 식도염 유발 1시간 전에 螃蟹 열수추출물 100 mg/kg을 경구투여하였고, 정상군과 대조군에는 생리식염수를 투여하였다. 수술 18시간 전부터 절식하였고, 호흡마취 후 개복하고 유문과 전위부를 3.0 실크사로 각각 결찰한 뒤 복막과 피부를 봉합하였다. 수술 4시간 30분 뒤 부검을 통해 식도를 적출하여 분석에 사용하였다.

4. 식도 점막 손상도 측정

부검을 통해 얻은 식도 조직은 세로로 절단한 후 생리식염수로 세척하였다. 이후 조직의 내부가 보이도록 전개한 뒤 광학디지털카메라를 이용하여 촬영하고, image J 프로그램을 이용하여 손상된 조직의 면적을 측정하였다. 식도 점막 손상도는 식도 전체면적과 손상 부위 면적을 이용하여 다음의 식을 통해 계산하였다.

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

5. 조직학적 분석

식도 조직은 적출 즉시 10% 중성포르말린으로 고정하고, 이후 일반적인 조직 포매 방법을 통하여 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블록을 5 μm 두께로 박절하여 Hematoxylin & Eosin 염색하고, 광학현미경(Leica DM 2500)을 사용하여 촬영한 뒤 image analysis program (i-solution DT)을 통해 분석하였다.

6. Western blot assay

적출한 식도에 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 0.1 M DTT, 1.5 M sucrose, protease inhibitor cocktail 로 이루어진 조직 lysis buffer를 첨가하여 tissue grinder로 분쇄하였다. 분쇄액을 30분간 ice 상에서 반응시키고 원심분리를 통해 세포질을 포함한 상등액을 분리하였다. 이후 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 첨가해 재부유 시킨 뒤 원심분리를 통해 핵을 포함하고 있는 상등액을 얻고, 단백질 정량 후 샘플로 만들어 사용하였다. SDS-PAGE을 통해 단백질을 분리하고 100 V에서 75분간 transfer 하였고 일차항체는 PBST에 1:1000으로 희석하여 4°C overnight 반응시킨 후 이차항체는 1:10000으로 실온에서 2시간 반응 후 Bio-Rad imaging software (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)를 이용하여 band image를 수집하였다.

7. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 실험군 간의 통계적 유의성은 ANOVA one-way 방법을 이용하였으며, Duncan's multiple range test 법에 따라 p<0.05 수준에서 통계적 유의성을 검정하였다.

III. 결과

1. 세포생존율 측정

螃蟹 열수추출물의 세포독성을 평가하기 위해 Raw 264.7 세포에 처리하고 세포생존율을 측정하였다. 실험 결과, 螃蟹 열수추출물은 2000 μg/ml의 농도까지 Raw 264.7 세포에 대한 유의미한 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1A).

2. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포에 LPS를 처리한 결과, NO 생성량이 유의하게 증가하였다. 반면 LPS 처리구와 비교하였을 때 螃蟹 열수추출물 500, 1000, 2000 μg/ml 처리구에서 각각 8%, 13%, 47%의 농도 의존적인 NO 생성 억제 효과를 보였다 (Fig. 1B)

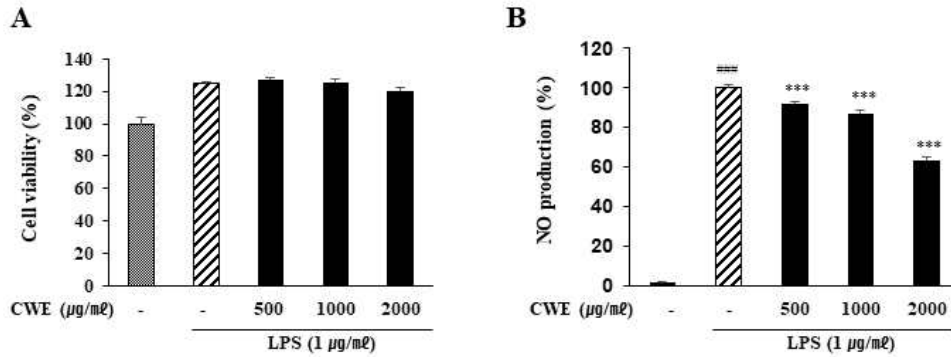


Fig. 1. Cell viability (A) and NO production (B) of CWE in RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with CWE (500, 1000, 2000 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) for 24 h. ###P<0.001 vs normal cells; ***P<0.001 vs LPS-treated cells.

3. 식도 점막 손상도 측정

정상군에서는 식도 점막의 손상이 관찰되지 않았으나, 대조군에서는 위 내용물의 역류로 인한 손상이 관

찰되었다. 반면, 螃蟹투여군에서는 대조군에 비해 점막의 손상도가 42% 개선된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

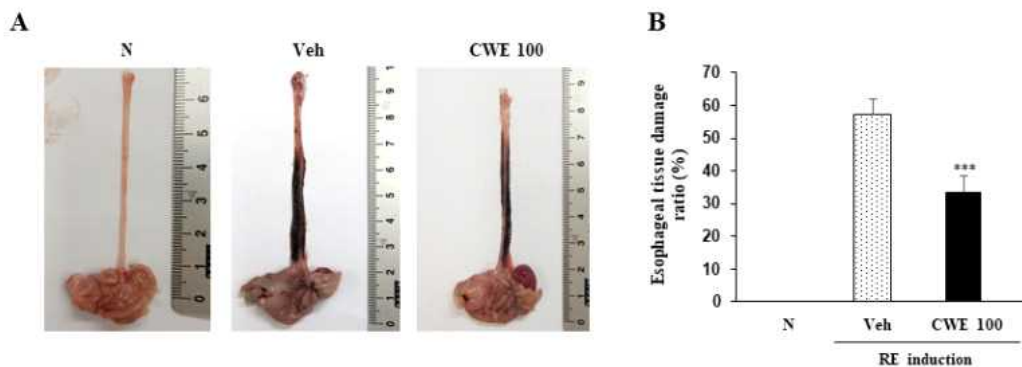


Fig. 2. Effects of CWE on esophagus tissues in rats induced reflux esophagitis. Image of esophageal damages (A) and the damage ratio (B) were investigated in different three group: N, normal group; Veh, reflux esophagitis group; CWE 100, reflux esophagitis + CWE 100 mg/kg group. ***P<0.001 vs Veh group.

4. 조직병리학적 검사

정상군에서는 식도 점막에서의 조직학적 변화가 관찰되지 않았으나, 역류성 식도염이 유발된 대조군에서는 염증 세포의 침착과 함께 식도 상피의 광범위한 탈락이

나타났다. 螃蟹투여군에서는 대조군과 비교하여 식도 상피의 탈락정도가 감소된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

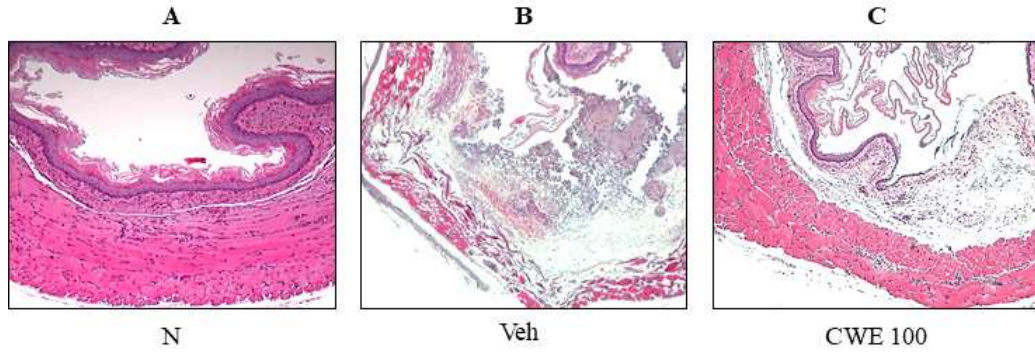


Fig. 3. The histological change evaluation in different group: (A) N, Normal group; (B) Veh, reflux esophagitis group; (C) CWE 100, esophagitis + CWE extract 100 mg/kg group.

5. 염증성 단백질 및 염증성 사이토카인 발현량 변화

대조군에서는 COX-2 및 TNF- α 의 발현량이 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나, 螃蟹 열수추출물을 경구 투여한 결과 COX-2의 발현은 대조군에 비해 33%, TNF- α 의 발현량은 대조군에 비해 23% 감소한

결과를 보였다 (Fig. 4). 또한 대조군에서는 핵 내 p-NF- κ B p65의 발현량이 정상군에 비해 유의하게 증가하였는데, 이는 螃蟹 열수추출물 투여군에서 34% 가량 감소하는 결과를 보였다 (Fig. 5).

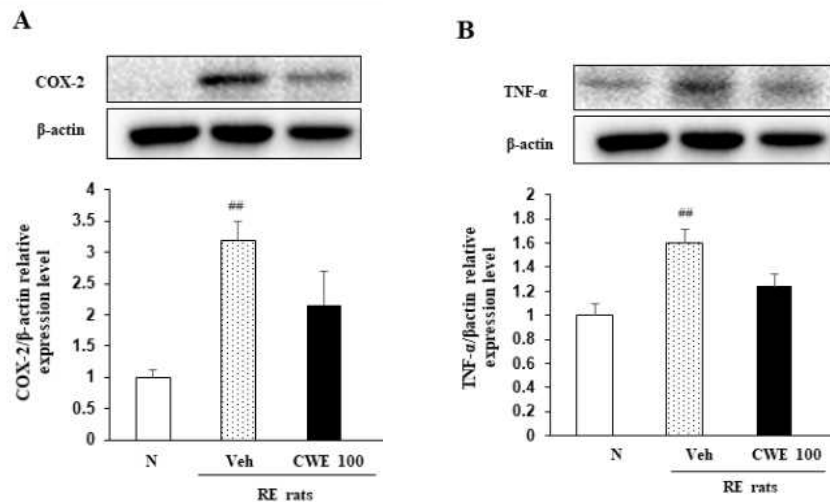


Fig. 4. Inhibition effects of CWE on the expression of COX-2 protein (A) and TNF- α cytokine (B) in esophagus tissues. N, normal group; Veh, reflux esophagitis group; CWE 100, reflux esophagitis + CWE 100 mg/kg group. ##P<0.01 VS normal group.

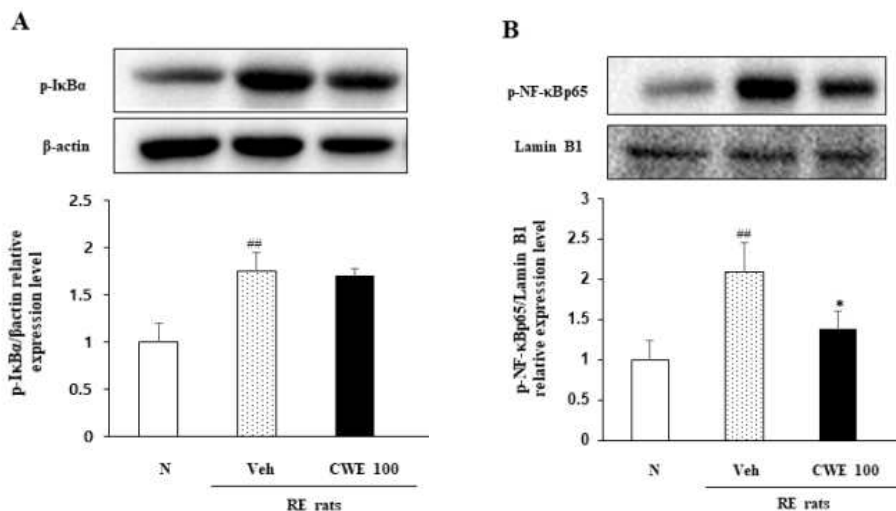


Fig. 5. Inhibition effects of CWE on the expression of p-IκBα (A) and p-NF-κBp65 (B) in esophagus tissues. N, Normal group; Veh, reflux esophagitis group; CWE 100, reflux esophagitis + CWE 100 mg/kg group. ##P<0.01 vs normal group and *P<0.05 vs vehicle group.

IV. 고찰

게, 새우 등의 갑각류의 껍질이나 근육 등에 분포되어 있는 키틴, 키틴산 등의 성분은 혈장내의 콜레스테롤과 트리글리세리트를 낮추는 효과를 가지고 있으며, 성인병 예방, 항균작용, 항산화, 항암 등의 효능이 보고됨에 따라, 최근 게의 약용적 가치가 주목을 받고 있다. 그러나, 기능성 소재로 이용되고 있는 수산물 자원 유래 성분에 대한 다양한 효능연구는 활발하게 진행되고 있으나, 식품이나 약용으로 이용되고 있는 원재료 추출물의 약용적 가치를 입증하기 위한 실험적 연구는 미비한 실정이다¹⁴⁻¹⁷. 《東醫寶鑑》에 螃蟹가 反胃 및 噎膈에 효과가 있다고 기술된 것을 통해 한의학에서 예로부터 게를 한약자원으로서 사용해왔음을 알 수 있다¹³. 따라서 본 연구에서는 역류성 식도염에 대한 螃蟹 추출물의 효능을 확인하고자 실시되었다.

동물실험에 앞서 Raw 264.7 세포에서 螃蟹 열수추출물의 세포독성 및 항염증 효과를 측정하였다. Raw 264.7 세포에 螃蟹 열수추출물을 농도별로 처리하고 세포생존율을 측정한 결과, 2000 μg/ml의 농도까지 유의미한 세포독성이 관찰되지 않았다. 과도한 NO의 생성은 염증반응의 원인이 될 뿐 아니라 조직의 손상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다¹⁸. LPS의 처리군에서 정상군에 비교하여 NO의 생성량의 유의미하게 증가되

었으나, 螃蟹 열수추출물 처리군에서 농도 의존적으로 유의하게 억제되어 螃蟹 열수추출물에 항염증 효과가 있음을 확인하고 동물실험을 진행하였다.

실험에는 위장을 부분적으로 결찰하여 위산 및 위 내용물이 식도로 역류하도록 유도한 동물 모델을 사용하였다. 식도로 역류된 위산 및 위 내용물은 식도 조직의 손상 및 세포 사멸을 초래하여 역류성 식도염 유발의 원인이 된다¹⁹. 실험 결과, 대조군에서 위 내용물 역류로 인한 식도 점막의 손상이 관찰되었으며, 조직학적 분석을 통해 점막 상피의 파괴와 염증 세포의 침윤과 같은 조직의 손상을 확인할 수 있었다. 반면, 螃蟹물투여군에서는 식도 손상도가 유의하게 감소하고 식도 상피의 탈락 등 조직학적 변화 역시 대조군에 비해 개선되어, 螃蟹 열수추출물의 식도 조직 손상에 대한 보호 효과를 확인할 수 있었다.

IκB-α에 의해 매개되는 NF-κB는 면역 및 염증 반응에 중요한 역할을 하는 전사인자이다²⁰. IκB-α와 NF-κB의 인산화는 COX-2와 TNF-α와 같은 염증성 단백질의 분비를 촉진시켜 식도 조직의 염증을 악화시키는 것으로 알려져 있다²⁰⁻²². 본 실험 결과, 역류성 식도염으로 인해 NF-κB의 인산화가 증가하였으며, COX-2와 TNF-α의 발현량 역시 정상군에 비해 유의미하게 증가하였다. 螃蟹 열수추출물의 투여는 NF-κB의 인산화를 유의미하게 억제하였으며, COX-2와

TNF- α 의 발현을 감소시키는 경향을 나타내었다.

V. 결론

본 연구는 역류성 식도염에 대한 螃蟹 열수추출물의 보호효과를 확인하고자 실시되었다. 螃蟹 열수추출물의 투여는 역류성 식도염으로 인한 조직의 손상을 개선하였으며 NF- κ B의 인산화 및 COX-2와 TNF- α 와 같은 염증성 인자의 발현을 억제하였다. 실험 결과를 통해 역류성 식도염 보호소재로서의 螃蟹의 가능성을 확인하였다.

감사의 글(acknowledgements)

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

References

1. M. Alzubaidi, S. Gabbard. GERD: diagnosing and treating the burn. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2015;82(10):685-92.
2. Kellerman R, Kintanar T. Gastroesophageal reflux disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2017;44(4):561-73.
3. Hom C, Vaezi MF. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology Clinics*. 2013;42(1):71-91.
4. 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.
5. Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Lee KJ, Lee JS, Park HJ, Shin IS, Lee SH, Han SY. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. *Korean Journal of Gastroenterology*. 2012;60(4):202-4.
6. E. Savarino et al.. A review of pharmacotherapy for treating gastroesophageal reflux disease (GERD). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2017;18(13):1333-43.
7. Eslami L, Nasser-Moghaddam S. Meta-analyses: does long-term PPI use increase the risk of gastric premalignant lesions? *Archives of Iranian medicine*. 2013;16(8):449-58.
8. Subramanian CR, Triadafilopoulos G. Refractory gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology report*. 2015;3(1):41-53.
9. C. P. Gyawali. Proton pump inhibitors in gastroesophageal reflux disease: friend or foe. *Current Gastroenterology Reports*. 2017;19(9):46.
10. M. I. Yasawy, M. A. Randhawa. GERD is becoming a challenge for the medical profession: is there any remedy? *Hepato-Gastroenterology*. 2014; 61(134):1623-6.
11. Textbook Compilation Committee of College of Korean Medicine. Department of Gastroenterology. Seoul: KOONJA; 2008, p. 314-8.
12. Cho YI, No HK, SP Meyers. Physicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agric. Food Chem*. 1998;46(9):3839-43.
13. Heo Jun. Donguibogam. 1613. Donguibogam with Korean translation. publishing company of Donguibogam, 2010
14. Kim JN, Chang IY, Kim HI, Yoon SP. Long-term effects of chitosan oligosaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Islets*. 2009;1(2):111-6.
15. Rezakhani L, Khazaei MR, Ghanbari A, Khazaei M. Crab shell extract induces prostate cancer cell line (Lncap) apoptosis and decreases nitric oxide secretion. *Cell J*. 2017;19(2):231.
16. Yen MT, Yang JH, Mau JL. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym*. 2008;74(4):840-4.
17. Sarbon NM, Sandanamsamy S, Kamaruzaman SF, Ahmad F. Chitosan extracted from mud crab (*Scylla olivacea*) shells: physicochemical and antioxidant properties. 2015;52(7):4266-75.
18. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1991;6:3051-64.
19. 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 cytokinemediated mechanism rather than caustic acid injury. *Gastroenterology*. 2009;137:1776-84.
20. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease. *J Clin Invest*. 2001;107:3-6.
 21. Akanda MR, Park BY. Involvement of MAPK/NF- κ B signal transduction pathways: *Camellia japonica* mitigates inflammation and gastric ulcer. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:1139-46.
 22. 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;62:1-11.