인진호 추출물의 급성역류성 식도염 유발 흰쥐에 대한 개선 효과

이주영[#], 서부일, 노성수^{*}

대구한의대학교 한의과대학 본초학교실

Improving effect of Artemisiae Capillaris Herba extract in reflux esophagitis rats

Joo Young Lee[#], Bu Il Seo, Seong-Soo Roh^{*}

Department of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objective : This study aimed to evaluate the protective effect of Artemisiae Capillaris Herba (AC) in reflux esophagitis (RE) rats.

Methods : The AC was measured antioxidant activity through *in vitro* experiments, such as total polyphenol and flavonoid contents, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity. Base on the results, we had conducted *in vivo* experiments. Rats were divided normal, control, AC treatment 50 mg/kg BW (AC50), and AC treatment 100 mg/kg BW (AC100) groups. AC were orally administered 2 h before the induction of RE. RE was induced by tie the pylorus and the transitional junction between the forestomach and the corpus in Sprague-Dawley rats. The rats were sacrificed 5 h after the surgery. We analyzed the expression of inflammatory related markers by western blot and observed the production of reactive oxygen species (ROS) and hematoxylin-eosin staining.

Results : The IC₅₀ of AC for DPPH and ABTS were showed 12,60 and 33,32 $\mu\text{g/ml}$ respectively. In the RE rat, AC decreased inflammatory related markers, such as phosphorylated inhibitor of $\kappa\text{B}\alpha$, nuclear factor-kappa B, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and tumor necrosis factor alpha. Also, AC reduced the increased reactive oxygen species in serum. The anti-inflammatory effect of AC appeared to be partially mediated through the inhibition of ROS. Also, AC markedly ameliorated esophageal mucosa damage via the inhibition of protein expression related to inflammation.

Conclusions : Therefore, these results suggest that AC would be used as a therapeutic material in protection and/or treatment for reflux esophagitis.

Keywords : Artemisiae Capillaris Herba, anti-oxidation, anti-inflammation, reflux esophagitis

I. 서 론

소화불량, 속쓰림, 가슴답답함, 목이물감 등은 역류성 식도염의 주된 증상이다¹⁾. 역류성 식도염 (Reflux esophagitis; RE)의 원인은 위 내용물이 식도로 넘어오는 것을 방지하는 하부식도 괄약근의 기능저하, 하부식도 괄약근의 압력을 떨어

뜨리는 카페인이 다량 함유된 음식 섭취, 위산 분비가 많아져 위의 압력을 높이는 과식이나 폭식의 잘못된 식습관, 위 배출능의 저하, 흡연, 위산과다를 유발하는 스트레스 등이 있다²⁻⁴⁾.

이에 대한 치료방법에는 기본적으로 생활습관 교정 및 위산 분비를 억제하는 여러 가지 약물을 사용한다⁵⁾. 흔히 사용되는 약물로는 omeprazole이나 rabeprazole과 같은 양성자 펌프

*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 : Joo Young Lee, 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 : jyhappy0130@hanmail.net

· Received : 10 October 2016 · Revised : 31 October 2016 · Accepted : 16 November 2016

억제제 (proton pump inhibitor; PPI)이다⁶⁾. 이는 위산 분비를 줄임으로써 역류가 일어나더라도 증상이 발생하지 않고 식도 병변이 진행되는 것을 막아준다^{7,8)}. 이외에 하부식도 괄약근의 운동성을 조절하는 약물들도 양성자 펌프 억제제들과 함께 사용한다. 그러나 약 복용 중단 시 50% 이상의 역류성 식도염 재발을 보인다⁹⁾.

역류성 식도염의 식도와 위 점막 손상은 위산뿐 아니라 세포내 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의해 발생하는 것으로 보고되어 있으며, 산화적 스트레스는 생체 내 항산화제에 의해 제거 되지만 외부로부터 항산화 물질의 충분한 섭취에 의해서도 예방과 감소 효과를 보인다¹⁰⁻¹²⁾. 또한 항산화 물질은 염증성 질환에도 효과적인 것으로 알려져 있다¹³⁾.

인진호 (茵陳蒿, *Artemisia capillaris* Herba; AC)는 국화과 (Compositae)에 속한 사철쭉 (*Artemisia capillaris* Thunb.)과 비쭉 (*A. scoparia* Waldst. et Kit.)의 전초이며 주로脾, 胃, 肝, 膽, 膀胱經에 작용한다¹⁴⁾. 인진호는 알칼리성 식품으로 칼륨, 칼슘, 철분 같은 무기질이 풍부하며, 비타민류, 정유류, alkaloids, flavonoid 등이 함유되어 있다¹⁵⁾. 선행 연구로 간 기능 보호¹⁶⁾, 항균¹⁷⁾, 항암¹⁸⁾, 항염증¹⁵⁾, 항비만¹⁹⁾, 항산화¹⁸⁾ 등이 보고되어 있으나 인진호의 역류성 식도염 개선 효과에 대한 연구에 대해서는 이루어지지 않고 있다.

따라서 항염증 효과와 항산화 효과를 가진 인진호가 식도 점막에서 발생하는 염증과 산화스트레스에 대해 유효할 것으로 사료되었다. 이에 본 연구에서는 인진호 추출물의 항산화 활성을 측정하고 역류성 식도염 동물 모델을 이용하여 개선 효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

모든 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 (DHU2016-070)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 7주령 수컷을 대한바이오 (Chungcheongbuk-do, Korea)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가) (Samyang corporation, Seoul, Korea)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 시료

본 실험에 사용한 인진호는 옴니 허브 (Daegu, Korea)에서 구매하여 사용하였다.

3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고,

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dithiothreitol (DTT)는 Sigma Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Phosphorylated inhibitor of $\kappa\text{B}\alpha$ (p-I $\kappa\text{B}\alpha$), nuclear factor- κB (NF- κB), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), histone, β -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Protease inhibitor mixture, DMSO, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 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

500 g의 한약재를 10배수의 정제수를 넣어 100°C 에서 2시간 가열하여 추출한다. 열수 추출물을 여과 후에 감압 농축기 (Buchi B-4580, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 동결 건조하여 (FD5508, IlShin, Korea) 추출물 파우더를 -80°C 에 보관하여 사용하였다.

2) Total polyphenol 함량 측정

페놀성 물질이 phosphomolybic acid와 반응하여 청색을 나타내는 Folin-Denis 법²⁰⁾을 이용하여 측정하였다. 각 시료 25 μl (1 mg/ml)과 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μl 를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨다. 그 후 10% sodium carbonate 500 μl 를 더하여 30°C 에서 90분 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도 (Multiscan spectrum, Thermo Scientific, MA, USA)를 측정하였다. Total polyphenol 함량은 gallic acid (Sigma Aldrich, MO, USA)를 표준물질로 이와 같은 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

3) Total flavonoid 함량 측정

Total flavonoid의 함량 측정은 Davis법을 변형한 방법²¹⁾에 따라 측정하였다. 추출한 시료 300 μl 에 diethylene glycol 600 μl 를 잘 섞어준 후, 이 혼합물에 1 N NaOH 6 μl 를 가하여 37°C 에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 total flavonoid 함량은 naringin (Sigma Aldrich, MO, USA)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

4) DPPH radical 소거 활성 측정

Hatano 등²²⁾의 방법으로 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. DPPH는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 양성대조군으로는 L-ascorbic acid를 사용하

였다. 각 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l와 0.2 mM DPPH 용액 100 μ l를 혼합하여 37℃에서 30분간 암소 상태에서 반응시켰다. 이 반응액을 사용하여 540 nm에서 흡광도를 사용하여 측정된 후, 전자공여능은 식(a)에 따라 계산하여 산출하였다.

$$\text{식(a) DPPH Radical scavenging activity (\%)} = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100,$$

OD_{control} : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도,

OD_{sample} : 시료가 들어간 경우 흡광도.

5) ABTS radical 소거 활성 측정

Martins 등²³⁾의 방법으로 ABTS radical소거 활성을 이용하여 항산화효과를 측정하였다. 실험에 사용된 ABTS와 potassium persulfate는 Sigma-Aldrich에서 구매하였고, 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간이상 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 이 되게 absolute ethanol로 희석하였다. 희석된 용액 900 μ l에 시료 100 μ l를 가하여 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 식(b)에 따라 계산하여 산출하였다.

$$\text{식(b) ABTS Radical scavenging activity (\%)} = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100,$$

OD_{control} : 시료가 들어가지 않은 경우(대조군) 흡광도,

OD_{sample} : 시료가 들어간 경우 흡광도.

6) 급성 역류성 식도염 유발

실험동물은 군당 6마리씩 4그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험 전날까지 고형사료와 물을 충분히 공급하였으며 수술 24시간 전 절식하였다. 수술 당일 인진호 추출물을 각각 50, 100 mg/kg 용량으로 단회 경구투여 하고 2시간 후 Zoletile mixture (Vibrac, France) 7.5 mg/kg를 복강주사하여 마취하였다. 복부를 2 cm 정도 개복을 하여, 위조직의 대만부위 및 인접한 날문부위를 실크실로 묶은 후 복막과 피부를 봉합하였다. 수술 후 회복 챔버에 머무르게 한 뒤 케이지로 이동시켰다²⁴⁾.

7) 식도 점막 손상 측정

수술 5시간 후, 식도를 분리하였고 수술용 가위를 이용하여 식도를 세로로 절단하였다. 절단된 식도 내부는 적당량의 0.9% NaCl로 세척한 후 깨끗한 부직포 위에 전개했으며 이를 광학 디지털 카메라 (Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도점막 측정은 iSolution lite (Innerview Co., Korea) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정하였다.

8) 혈청 내 ROS 측정

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. ROS 측정은 Ali 등²⁵⁾의 방법을 이용하여

시행하였다. 혈청과 25 mM 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩 35분간 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

9) Western blot

식도 조직의 세포질을 얻기 위해 100 mM 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (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 dithiothreito (DTT), protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 (12,000 rpm, 20 min, 4℃)하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 μ l의 buffer C (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 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80℃에서 냉동 보관하였다. 식도 조직의 세포질의 p-I κ B α , iNOS, COX-2, TNF- α , β -actin 및 핵의 NF- κ Bp65, histone의 발현을 측정하기 위하여 7-10 mg의 단백질을 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하여 정량하였다.

10) 조직학적 분석

식도 조직을 적출한 다음 조직을 절단하고, 10% 중성포르말린에 18 시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4 μ m의 절편을 제작하였다. 이후 Hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하고, 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

11) 통계분석

모든 수치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Tukey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 각 군의 평균 차이에 대한 통

계적 유의성을 5% 수준에서 검증하였다. *In vitro*의 수치는 excel를 사용하여 분석하였다.

III. 결 과

1. Total polyphenol 및 total flavonoid 함량

본 실험에서는 인진호 열수추출물에 존재하는 total polyphenol 함량은 gallic acid를 기준물질로, total flavonoid 함량은 naringin을 기준물질로 하여 측정하였다. 그 결과 66.33 mg/g으로 높은 total polyphenol 함량과 75.25 mg/g으로 total flavonoid의 높은 함량을 보였다 (Table 1).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of AC

Sample	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
AC ¹⁾	66.33 ± 0.36 ²⁾	75.25 ± 0.13

¹⁾AC: Artemisiae Capillaris Herba

²⁾All values are mean ± SD of three replications

2. DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 효과

DPPH 및 ABTS radical 소거능을 이용하여 AC의 항산화 효능을 측정하였다. DPPH radical 소거능 측정 결과, positive control인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.30 ± 0.05 µg/mL을 나타냈으며 AC는 12.60 ± 0.52 µg/mL의 값을 나타내었다. ABTS radical 소거능 측정 결과, L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.20 ± 0.02 µg/mL을 나타냈으며 AC는 33.32 ± 0.18 µg/mL의 값을 나타내었다 (Table 2).

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of AC

Sample	IC ₅₀ values of DPPH radical scavenging activity (µg/mL)	IC ₅₀ values of ABTS radical scavenging activity (µg/mL)
L-ascorbic acid	1.30 ± 0.05 ¹⁾	3.20 ± 0.02
AC ²⁾	12.60 ± 0.52	33.32 ± 0.18

¹⁾All values are mean ± SD of three replications

²⁾AC : Artemisiae Capillaris Herba

IC₅₀ : The half maximal inhibitory concentration

3. 식도 점막 손상도 변화

정상군에서는 식도 점막 손상이 발견되지 않았으나, 급성 역류성 식도염을 유발한 대조군은 정상군에 비해 손상 부위 면적이 446 ± 77 (AU)로 높게 나타났다. AC50군은 240 ± 41 (AU)로 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며, AC100군은 150 ± 81 (AU)의 손상도를 보여 대조군에 비해 식도 점막 손상에 유의성 있는 개선효과를 보였다 (Fig. 1).

4. 혈청 내 ROS 측정

혈청을 이용하여 ROS를 측정한 결과, 대조군 (25143.3 ± 2338.0 fluorescence/min/mL)은 정상군 (4170.7 ± 1230.3)

에 비해 유의성 있게 증가하였으며 AC50군 (17718.7 ± 2417.5)과 AC100군 (20553.3 ± 3410.9)은 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다 (Fig. 2).

Fig. 1. The gross esophageal evaluation

All values are mean ± SD (n=6)

(A) N ; Normal rat,

(B) Con ; reflux esophagitis rat,

(C) AC50 ; reflux esophagitis rat treated with AC 50 mg/kg body weight,

(D) AC100 ; reflux esophagitis rat treated with AC 100 mg/kg body weight,

(E) The gross mucosal injury area in esophagus of rat.

ND : Not detected

Fig. 2. Effect of AC on oxidative stress biomarker level of serum in reflux esophagitis rats.

All values are mean ± SD (n=6)

N ; Normal rat,

Con ; reflux esophagitis rat,

AC50 ; reflux esophagitis rat treated with AC 50 mg/kg body weight,

AC100 ; reflux esophagitis rat treated with AC 100 mg/kg body weight

Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test

5. 식도 조직의 염증 인자 발현

식도 조직에서 western blot을 실시하여 염증성 매개인자인 p-IκBα와 NF-κBp65의 발현을 확인하였다. 그 결과 p-IκBα의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.13)에 비해 대조군에서 1.46

± 0.27 로 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.05$), 대조군과 비교하여 AC50군 (1.18 ± 0.28)은 감소하는 경향을 나타냈으며, AC100군은 1.02 ± 0.16 으로 유의한 감소를 보였다 ($p < 0.05$). NF- κ Bp65는 대조군 (1.18 ± 0.14)과 비교하여 AC50군에서 1.00 ± 0.18 로 감소하였으며 AC100군은 0.91 ± 0.09 로 통계적으로 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3). 또한 COX-2, iNOS 그리고 TNF- α 발현을 측정 한 결과, COX-2의 경우 정상군(1.00 ± 0.25)에 비해 대조군 (1.40 ± 0.21)에서 유의성있게 증가하였으며 ($p < 0.05$), 대조군과 비교하였을 때 AC50군 (1.19 ± 0.21)과 AC100군 (1.11 ± 0.18)에서 감소하는 경향을 보였다. iNOS의 발현을 확인한 결과 AC50군 (1.20 ± 0.36)과 AC100군 (1.08 ± 0.19)은 대조군 (1.32 ± 0.41)과 비교하여 감소하는 경향을 나타내었다. TNF- α 의 발현 정상군 (1.00 ± 0.21)과 대조군 (1.64 ± 0.40) 사이에 통계적인 유의성이 있으며, AC100군 (1.11 ± 0.38) 또한 대조군 사이에 유의성 있는 감소를 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

Fig. 3. Expression of inflammatory factors in esophagus
(A) p-I κ B α ; phosphorylated inhibitor of κ B α ,
(B) NF- κ Bp65; nuclear factor-kappa Bp65
All values are mean $\pm$ SD (n=6)
N ; Normal rat,
Con ; reflux esophagitis rat,
AC50 ; reflux esophagitis rat treated with AC 50 mg/kg body weight,
AC100 ; reflux esophagitis rat treated with AC 100 mg/kg body weight
Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test

Fig. 4. Expression of inflammatory factors in esophagus
(A) western blot analysis of COX-2, iNOS, TNF- α , b-actin and histone expression,
(B) COX-2; cyclooxygenase-2, (C) iNOS; inducible nitric oxide synthase, (D) TNF- α ; tumor necrosis factor alpha
All values are mean $\pm$ SD (n=6)
N ; Normal rat,
Con ; reflux esophagitis rat,
AC50 ; reflux esophagitis rat treated with AC 50 mg/kg body weight,
AC100 ; reflux esophagitis rat treated with AC 100 mg/kg body weight
Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test

6. 식도 점막의 조직학적 분석

식도 조직 고정 후 H&E염색을 실시하여 조직사진을 얻었다. 역류성 식도염을 유발시킨 대조군의 식도 조직은 염증세포의 침윤과 출혈에 의해 점막층(M)이 탈락하고 점막하층(S)의 부종 등의 심각한 손상이 나타났다(Fig. 5B). 그러나 AC100군

(Fig. 5D)에서는 대조군에서 보이지 않았던 점막층이 관찰되었고 점막하층의 두께가 얇아진 것으로 보아 조직학적 변화가 현저히 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 5).

Fig. 5. Esophagus histological analysis in reflux esophagitis rats
(A) N ; Normal rat,
(B) Con ; reflux esophagitis rat,
(C) AC50 ; reflux esophagitis rat treated with AC 50 mg/kg body weight,
(D) AC100 ; reflux esophagitis rat treated with AC 100 mg/kg body weight,
M ; mucosa layer,
S ; submucosa layer (original magnification $\times 200$)

IV. 고 찰

본 연구는 역류성 식도염의 새로운 치료 방법을 개발하기 위한 연구로 *in vitro* 실험을 통해 인진호 추출물의 항산화능을 측정하였으며, 역류성 식도염에 대한 효과를 확인하기 위하여 동물 모델에 인진호 추출물을 투여한 후 산화적 스트레스 소거능, 염증성 관련 인자, 식도 점막 손상 부위 및 식도의 조직학적 변화를 관찰하였다.

Total polyphenol은 항암 효과 및 항산화 활성을 가지며 함량이 증가할수록 항산화 활성이 증가하는 것으로 알려져 있으며^{26,27)} total flavonoid 또한 total polyphenol과 마찬가지로 높은 항산화 활성을 가지며 항바이러스, 항염증, 항암 효과가 있는 것으로 보고되어 있다²⁸⁻³¹⁾. DPPH 및 ABTS radical 소거능은 항산화 활성이 높을수록 소거활성이 증가되는데 이는 높은 항산화 활성을 가지는 total polyphenol, total flavonoid와 상관관계를 갖는 것으로 알려져 있다^{32,33)}.

인진호 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 total polyphenol, total flavonoid, DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 측정 결과 total polyphenol과 total flavonoid의 함량은 각각 66.33 mg/g과 75.25 mg/g을 나타내었으며, DPPH 및 ABTS radical 소거능의 IC₅₀ 값은 $12.60 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ 과 $33.32 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이러한 결과들로 인진호 추출물이 높은 항산화 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

인진호 추출물을 역류성 식도염 동물 모델에 투여한 후 혈

청 및 식도를 분석하였다. 식도를 육안으로 관찰한 결과, 정상군에서는 식도 점막의 손상이 보이지 않았으나 대조군에서는 출혈 및 발적의 심한 손상이 뚜렷이 관찰되었다. 이미지 분석 프로그램을 이용하여 식도 점막의 손상 부위를 측정한 결과, 대조군은 정상군에 비해 손상 부위의 면적이 높게 나타났다. AC투여군은 대조군과 비교하여 농도의존적인 감소를 보였다. 이는 조직학적 분석과 일치하는 결과를 보인다.

생체 내 과잉 생산된 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의해 산화적 스트레스가 발생하며 이로 인해 체내 방어시스템인 항산화 체계의 균형이 깨지면서 다양한 질병이 발생한다³⁴⁻³⁶⁾. 혈청을 이용하여 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS를 측정한 결과 정상군에 비해 대조군은 높은 산화적 스트레스를 보였으며, AC투여군은 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 감소를 보였다. 이것으로 인진호 추출물이 산화적 스트레스 조절을 통해 식도 손상의 개선 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

NF- κ B는 세포의 생존과 죽음, 면역 반응 등 광범위하게 작용하는 전사인자로서 세포질에 I κ B α 와 결합하여 있지만 대식세포에서 분비하는 cytokine인 TNF- α , nitrite, lipopolysaccharide (LPS), ROS 등의 자극에 의해 활성화되면 I κ B α 의 인산화에 의해 분리되어 핵 내로 이동한다³⁷⁻⁴⁰⁾. 그 결과 iNOS와 COX-2를 활성화 시켜 염증반응을 촉진시킨다^{37,41)}.

식도 조직에서 western blot을 실시하여 염증성 매개인자인 p-I κ B α 와 NF- κ Bp65의 발현을 측정한 결과 AC100군에서 유의한 감소가 나타났으며, 이로 인해 염증성 사이토카인인 COX-2, iNOS, TNF- α 발현 또한 현저히 감소하였다. 이러한 결과를 통해 인진호 추출물이 항염증 효과가 있는 것으로 사료된다.

이상의 연구결과들을 종합해보면, 인진호 추출물은 항산화 효과를 가지며 역류성 식도염을 유발시킨 동물모델에서 ROS와 염증 억제를 통해 역류성 식도염의 개선 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결 론

인진호 추출물의 역류성 식도염에 대한 개선 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인진호 추출물은 total polyphenol과 total flavonoid를 각각 66.33 mg/g과 75.25 mg/g 함유한다.
2. 인진호 추출물의 DPPH 및 ABTS radical 소거능의 IC₅₀ 값은 $12.60 \pm 0.52 \mu\text{g/ml}$ 과 $33.32 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
3. 인진호 추출물은 역류성 식도염 동물 모델에서 식도 조직의 육안적, 조직학적 손상을 감소시켰다.
4. 인진호 추출물은 역류성 식도염 동물 모델에서 혈청의 ROS를 유의하게 감소시켰다.

5. 인진호 추출물은 역류성 식도염 동물 모델에서 식도 조직 내 p-IkB α 와 NF- κ Bp65의 발현을 유의하게 감소시켰다.
6. 인진호 추출물은 역류성 식도염 동물 모델에서 식도 조직 내 TNF- α 는 유의성 있는 감소를 보였지만 COX-2와 iNOS는 감소하는 경향만 보였다.

따라서 인진호 추출물의 투여가 역류성 식도염 개선에 효과가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Kahrilas PJ, Quigley EM. Clinical esophageal pH recording: a technical review for practice guideline development. *Gastroenterology*. 1996 ; 110 : 1982-96.
2. Cho YS, Choi MG, Jeong JJ, Chung WC, Lee IS, Kim SW, Chung IS. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Asan-si, Korea. *The American journal of gastroenterology*. 2005 ; 100: 747-53.
3. Ahtaridis G, Snape WJ, Cohen S. Lower esophageal sphincter pressure as an index of gastro esophageal acid reflux. *Dig Dis Sci*. 1982 ; 26 : 993-8.
4. Lanas A, Royo Y, Orte GOJ, Molina M, Saintz R. Experimental esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits mimicking human reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 1999 ; 116 : 97-107.
5. Jung HY. Pharmacological treatment for reflux esophagitis. *J Korean Med Assoc*. 2011 ; 54(1) : 88-91.
6. Hom J. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clin Ther*. 2000 ; 12 : 889-897
7. Spechler SJ. Comparison of medical and surgical therapy for complicated gastroesophageal reflux disease in Veteran. *N Eng J Med*. 1992 ; 326(12) : 786-792.
8. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol*. 1999 ; 94(6) : 1434-42.
9. Badillo R, Francis D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2014 ; 5(3) : 105-12.
10. Pereria RS. Regression of gastroesophageal reflux disease symptoms using dietary supplementation with melatonin, vitamins and aminoacids: comparison with omeprazole. *J Pineal Res*. 2006 ; 41 : 195-200.
11. Malferteiner P, Hallerback B. Clinical manifestations and complications of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Int J Clin Pract*. 2005 ; 59 : 346-55.
12. Rao CV, Vijayakumar M. Effect of quercetin, flavonoids and alpha-tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2008 ; 589 : 233-8.
13. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 90 : 7915-22.
14. Lee SJ. Studies on the origin of korean folk medicines (1). *Kor J Phamacognosy*. 1975 ; 6(2) : 75-93.
15. Kim JS, Kim KL. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of *Artemisia Capillaris* Extract. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2015 ; 13(6) : 805-12.
16. Yu KH, Lee SY, Yang HM, Ham YA, Lee SU, Chae SW, Lee YJ. Effects of the *Artemisia capillaris* Extract on the Hepatotoxicity in Ethanol-induced Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2013 ; 42(10) : 1560-6.
17. Oh MH, Kim KY. Effect of *Artemisia capillaris* Extract on Intestinal Microflora In vitro and In vivo. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2010 ; 39(11) : 1587-94.
18. Jung MJ, Yin Y, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and Anticancer Activities of Extract from *Artemisia Capillaris*. *Kor J Pharmacogn*. 2008 ; 39(3) : 194-8.
19. Kim HT, Kim DD, Ku SK, Kim JW, Jang KH, Oh TH, Lee KW. Anti-Obestic Effects of *Artemisia capillaris* Herba, *Artemisia capillaris* Stem Aqueous Extracts on the High Fat Diet Supplied Mice. *J Vet Clin*. 2010 ; 27(4) : 348-65.
20. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*. 1998 ; 46 : 4113-7.
21. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JRL. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J Science Food and Agric*. 1994 ; 64 : 155-61.
22. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects if tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull*. 1989 ; 37 : 2016-21.
23. Martins JLR , Rodrigues ORL, da Silva DM, Galdino PM, de Palula JR, Romao W. (2014) Mechanisms involved in the gastro protective activity of *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent on gastric lesions in mice. *J Ethnopharmacol*. 2014 ; 155 : 1616-24.
24. Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol*. 1999 ; 34(10) : 948-53.

25. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992 ; 13 : 637–48.
26. Lu Y, Foo LY. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem*. 2000 ; 68 : 81–5.
27. Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 1999 ; 28 : 1310–5.
28. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010 ; 2 : 1231–46. (2010)
29. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002 ; 13 : 572–84.
30. Williams RJ, Spencer JP, Rice–Evans C. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic Bio Med*. 2004 ; 36 : 838–49.
31. Sohn HY, Ryu HY, Jang YJ, Jang HS, Park YM, Kim SY. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2008 ; 36 : 195–200.
32. Rice–Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci*. 1997 ; 2 : 152–9.
33. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2012 ; 44 : 337–42.
34. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010 ; 49 : 1603–16.
35. Ungvari Z, Sonntag WE, Csiszar A. Mitochondria and aging in the vascular system. *J Mol Med*. 2010 ; 88 : 1021–7.
36. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Bio chem Biophys*. 2009 ; 46 : 421–40.
37. Lee S, Shin S, Kim H, Han S, Kim K, Kwon J, Kwak JH, Lee CK, Ha NJ, Yim D, Kim K. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. *J Inflamm (Lond)*. 2011 ; 8(1) : 16.
38. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1994 ; 12 : 141–79.
39. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol*. 1998 ; 8(3) : 107–11.
40. O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*. 1997 ; 20(6) : 252–8.
41. Weisz A, Cicatiello L, and Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon- γ , bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochemical Journal*. 1996 ; 316 : 209–15.