

吳茱萸 추출물이 만성 역류성 식도염 흰쥐에 미치는 효능 평가

이진아^{1#}, 박해진^{2#}, 김수현¹, 김민주¹, 김정조¹, 신미래¹, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 의과대학 한방식품조리영양학부

Evaluation of Evodiae Fructus Extract on the Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats

Jin A Lee^{1#}, Hae-Jin Park^{2#}, Soo Hyun Kim¹, Min Ju Kim¹,
Kyeong Jo Kim¹, Mi-Rae Shin¹, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Faculty of Herbal Cuisine and Nutrition, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : Reflux esophagitis (RE) is a disease that caused gastric acid reflux and inflammation due to unstable gastroesophageal sphincter, as increasing worldwide respectively. This study was conducted to evaluate the effect of Evodiae Fructus (EF) extract on chronic reflux esophagitis in rats.

Methods : The EF was measured antioxidant activity, such as total polyphenol and total flavonoid contents, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2, 2'-azinobis-3-ethyl-enzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity. Rats were divided into 3 groups; Nor (normal group), Con (chronic acid reflux esophagitis rats treatment with water), EF (chronic acid reflux esophagitis rat treatment with EF 200 mg/kg body weight group). A surgically-induced chronic acid reflux esophagitis (CARE) model was established in SD rats, and treated with water or EF 200 mg/kg body weight for 14 consecutive days.

Results : Administration of EF to rats of induction of chronic acid reflux esophagitis was found to reduce esophagus tissues injury. Reactive oxygen species (ROS) and produces peroxyxynitrite (ONOO⁻) levels of esophagus tissues were significantly decreased in EF compared to Con group. As results of esophagus protein analyses, EF effectively reduce inflammatory-related factors (NF- κ Bp65, p-I κ B α , iNOS, TNF- α , IL-6), and increase anti-oxidant enzyme (Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2).

Conclusions : These results suggest that EF administration confirmed that decreased esophagus tissues injury, oxidantive stress, anti-inflammation effect, and increased anti-oxidant effect. Therefore, EF was the potential to be used as a natural therapeutic drug.

Key words : Evodiae Fructus, chronic acid reflux esophagitis, oxidantive stress, anti-oxidant, anti-inflammation

I. 서 론

역류성 식도염 (reflux esophagitis; RE)은 불안정한 위-식도괄약근으로 인해 위산이 역류하여 염증이 유발되는 질환으로서, 하부식도 괄약근 (lower esophageal sphincter;

LES)의 일과성 이완 및 결함에 의해 산 역류성 식도 점막 상해로 인해 발병하며, 嘔吐, 胸痛, 惡心 등과 같은 다양한 증상을 보인다. 서양의 경우 5% 이상의 유병률을 보이는 흔한 질병으로, 지금까지 우리나라를 비롯한 아시아 지역은 유병률이 낮지만 고열량식과 고지방식 같은 서구화된 식습관, 음주와

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2350. · Fax : +82-53-768-6340. · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Jin A 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 : tgs02022@naver.com

· Received : 18 December 2018 · Revised : 07 February 2019 · Accepted : 25 March 2019

흡연, 과도한 스트레스 등의 요인으로 국내에서도 점차 증가하는 추세이다¹⁻⁴.

역류성 식도염의 치료방법으로는 수면제 및 칼슘 채널 길항제의 복용을 금하고, 과식을 피하는 등 생활습관 조절이 가장 기본적인 치료방법이며⁵, 그 외에도 위산분비를 억제하기 위한 H₂ 수용체 길항제, 양성자펌프 억제제 (proton pump inhibitor; PPI) 등의 약물요법, 외과요법 등이 있는데, 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 약물요법을 통해 위산의 분비를 억제하여 식도 점막 손상을 치유하여 증상을 없애는 것이다. 양성자 펌프 억제제는 H₂ 수용체 길항제보다 효과가 뛰어나 역류성 식도염의 1차 치료제로 많이 사용되고 있지만⁶, 장기간 사용할 경우 폐렴, 장관 내 감염 위험도 증가, 골절 등과 같은 상호작용에 대한 우려가 있으며⁷, 약물복용을 중단하였을 경우에는 1년 이내에 50~80% 재발하며, 충분한 산분비 억제제의 투여에도 불구하고 불완전한 점막 회복, 식도 협착, Barrett 식도나 식도암 등의 합병증이 발생할 위험이 있다^{8, 9}. 따라서 위장관 운동 및 위산의 pH를 조절하는 것 이외의 재발방지를 위한 다른 기전의 치료제 개발이 필요하다¹⁰.

吳茱萸는 운향과 (Rutaceae)에 속한 吳茱萸 (*Evodia officinalis* DODE)의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 한방에서는 열매를 吳茱萸 (Evodiae Fructus)라고 하며 健胃, 鎮痛 등의 작용을 가지고 있다¹¹. 吳茱萸는 항암효능을 가지는 evodiamine 등의 유효성분과 항염작용을 가지는 dehydroevodiamine, evodiamine, rutaecarpine 등의 유효성분이 함유되어 있고, 정유 성분은 약 2%로 evodene, ocimene 등이 존재한다고 알려져 있으며, 소화기계에서는 방향성 제토작용, 항궤양 작용이 있음이 알려져 있다¹²⁻¹⁴.

吳茱萸의 약리에 대한 연구로는 항염증 효과¹⁵, 신경세포 보호효과¹⁶, 항균작용¹⁷ 등이 알려져 있으며, 선행연구에서 吳茱萸 물 추출물을 급성 역류성 식도염 동물 모델에 경구 투여한 결과 식도 점막 손상을 예방한다고 보고되어 있으나¹⁸, 아직 만성 역류성 식도염에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 보고되지 않았다. 이에 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 식도의 점막 손상여부, 염증성 매개인자 및 염증성 사이토카인과 항산화 관련 인자의 발현 분석결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에서 사용한 吳茱萸는 휴먼허브 (경북, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사 후, 약전규격에 적합한 것만을 정산하여 사용하였다. 吳茱萸 200 g을 분쇄한 후, 2,000 ml을 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압 추출장치로 농축 후, 동결 건조기를 이용해 완전 건조시켜 파우더를 얻었으며 (EF 31.31 g, 15.66%), -80℃에서 보관하였다.

2) 시약

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 (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65), inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (I κ B α), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (p-I κ B α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), super oxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), histone, β -actin 과 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. 2', 7'Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123 (DHR 123)는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare 로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3) 실험동물

SD 흰쥐 5주령 수컷을 오리엔트 (경기, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용 하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 (light : dark cycle)는 12 시간 주기로 조절하였다. 사료 (조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, NIH-41, Zeigler Bros, Inc., USA)와 물을 충분히 공급하였다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호:2018-077)을 받았다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법¹⁹에 의해 측정하였다. 시료 10 μ l에 증류수 790 μ l, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 150 μ l의 20% sodium carbonate를 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV 분광광도계 (Infinite M200, Tecan,

Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정 한 다음, 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구 하고 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Lister 등²⁰⁾의 방법에 의해 구하였 다. diethylene glycol 1 ml와 시료 추출물 100 μ l와 1 N NaOH 10 μ l를 잘 혼합시켜 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin 을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 추출물의 총 플라보 노이드 함량을 산출하였다.

2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

추출한 시료의 free radical 소거능 측정을 위해 Blois법²¹⁾에 의한 DPPH free radical 소거법을 사용하였다. 0.2 mM DPPH 용액 100 μ l와 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l를 혼합하여 30분간 암소상태로 방치한 후 540 nm에서 흡 광도를 측정하였으며, 표준물질으로 L-ascorbic acid를 사용 하였고, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소 시키는데 필요한 시료의 양을 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

추출한 시료의 항산화 효능을 알아보기 위해 ABTS free radical 소거능을 측정하였다²²⁾. 7 mM ABTS용액과 2.4 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소 상태 에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS+을 형성시킨 후 30°C, 415 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02이 되게 ethanol로 희석 하였다. 희석된 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 가하여 15분 동안 방치한 후 30°C, 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물 질로 L-ascorbic acid를 사용하였다.

4) 만성 역류성 식도염 유발 및 동물 처치

수술 전, 24시간 절식 후 Zoletile mixture (Vibrac, France) 을 25 mg/kg 복강주사하여 마취한 뒤 수술을 진행하였다. 제모기로 복부털을 제거하고 복간 정중부를 2 cm 정도 개방 하여 대만부위 (limiting ridge)를 블랙 실크 (1-0)실로 묶 고, 날문부위에는 latex ring (18-Fr Nelaton catheter, 2 mm in thickness)을 끼워 나일론 (5-0)으로 묶은 후, 복막 과 피부를 봉합하였다²³⁾. 감염을 최소화하기 위하여 3일간 항 생제 (Gentamicin sulfate)와 함유증제 (Dexamethasone) 를 희석하여 피하주사 하였다. 수술 24시간 후 물을 공급해주 었으며, 수술 48시간 후 사료를 공급해주었다. 1주일간 회복 기를 거친 후, 아무런 처치를 하지 않은 정상군 (Nor), 만성 역류성 식도염 유발 후 증류수를 투여한 대조군 (Chronic acid reflux esophagitis induced rats; Con), 만성 역류성 식도염 유발 후 200 mg/kg 吳茱萸 물 추출물을 투여한 군 (Chronic acid reflux esophagitis induced rats treated with Coptidis Rhizoma 200 mg/kg body weight; EF) 총 3 그룹으로 실험동물을 무작위로 분류하였으며, 매일 일정한 시 간에 모든 그룹의 몸무게 및 사료 섭취량을 측정하였고, 약물 은 14일간 1일 1회씩 경구 투여하였다.

5) 조직학적 관찰

적출한 식도 조직을 고정한 다음, 광학 디지털 카메라 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였 다. 손상된 식도 점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., Gyeonggido, Korea) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정한 후, 식도 전체 면적과 비교하여 비율로 표시하였다.

6) 산화적 스트레스 바이오마커 측정

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS 값은 1 mM EDTA- 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)와 분쇄한 식도 조직을 혼합한 후, 25 mM DCFH-DA를 첨가하여 형광 광도 계를 이용해 0분부터 매 5분씩 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 값을 계 산하였다.

ONOO⁻는 DHR123 buffer (rodamin buffer, 5 mM DTPA, 10mM DHR123)와 분쇄한 식도 조직을 혼합한 후, 37°C에서 5분간 교반하였다. 그 다음 형광 광도계를 이용해 0분부터 매 5분씩 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 485 nm에서 30분간 측정된 값을 계산하였다. ROS 및 ONOO⁻의 실험방법은 각각 Ali et al과 Kooy et al의 방법^{24, 25)}을 이 용하여 시행하였다.

7) 식도 조직 western blotting

식도의 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 buffer A를 넣고 조직 분쇄기 (tissue grinder) (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 30분간 정치 시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포 함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP- 40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가 해 재부유시킨 후 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 핵을 포함하고 있 는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 위 조직 세포질의 HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2, I κ B α , p-I κ B α , iNOS, TNF- α , IL-6, β -actin 단백질과 핵에서의 Nrf2, NF- κ Bp65, histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 10 μ g 의 단백질을 6-12% SDS polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane 으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody 를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마 다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1 시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리 고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) 용 액 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) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

8) 통계분석

*In vitro*의 수치는 평균과 표준편차로, *in vivo*의 수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS (Version 24.0, 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 유의성을 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

吳茱萸 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 총 폴리페놀 함량은 54.00 ± 0.45 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 44.43 ± 0.75 mg/g으로 높은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 나타냈다 (Table 1).

2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성 측정

吳茱萸 물 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH, ABTS 라디칼 소거능 방법을 통하여 측정하였다. 표준물질으로는 L-ascorbic acid를 사용하였고, 각각의 측정한 결과를 IC_{50} 값으로 나타냈다. DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 표준물질인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 $1.77 \pm$

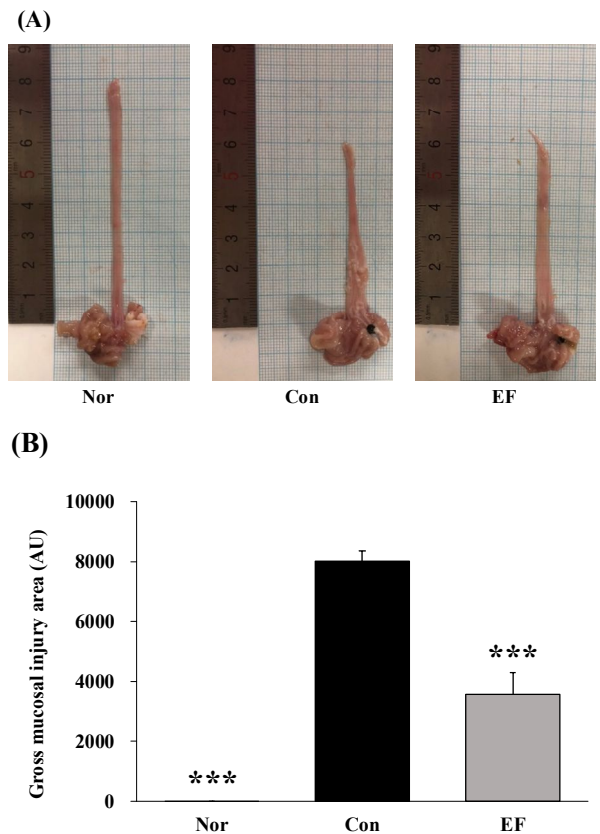


Fig. 1. Surgical induction of chronic acid reflux esophagitis, a representative gross image, and esophageal ulcer ratio. All data are expressed means±SEM (n=6). The opened gross esophageal ulcer; (A), esophageal ulcer ratio in chronic acid reflux esophagitis rats; (B), Normal rats; Nor, chronic acid reflux esophagitis rats; Con, Evodiae Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; EF. Significance: *** $p < 0.001$ vs. control rats.

Table 1. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of Evodiae Fructus

Latin name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Evodiae Fructus	54.00 ± 0.45	44.43 ± 0.75

All values are expressed mean±SD of three replications

Table 2. Scavenging Activity of Evodiae Fructus on DPPH and ABTS Free Radical

	DPPH free radical ($\mu\text{g/ml}$)	ABTS free radical ($\mu\text{g/ml}$)
L-ascorbic acid	1.77 ± 0.01	3.67 ± 0.06
Evodiae Fructus	24.49 ± 0.21	54.59 ± 1.06

All values are expressed mean±SD of three replications

$0.01 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났고, 吳茱萸 추출물의 IC_{50} 값은 $24.49 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났다. ABTS 자유 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 표준물질인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 값은 $3.67 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ 으로 나타났고, 吳茱萸 추출물의 IC_{50} 값은 $54.59 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$ 으로 높은 항산화 활성을 나타냈다 (Table 2).

3. 식도점막 손상도 측정

식도 점막의 손상 정도를 육안으로 관찰한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 정상군의 식도 점막에서는 손상이 발견되지

않았으나, 만성 역류성 식도염 유발 후 증류수를 처리한 대조군에서는 중간 또는 말초 식도에서 병변이나 궤양이 발견되었으며, EF 투여군에서 병변이나 궤양 발병이 현저하게 낮게 나타났다. 대조군의 손상 부위 면적 면적은 8020.28 ± 344.37 (AU)로 높게 나타났고, 정상군에서는 0.73 ± 0.04 (AU) ($p < 0.001$)로 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며, EF 투여군에서 또한 3573.58 ± 725.99 (AU) ($p < 0.001$)로 대조군에 비해 손상 정도가 유의적으로 감소되었다 (Fig. 1).

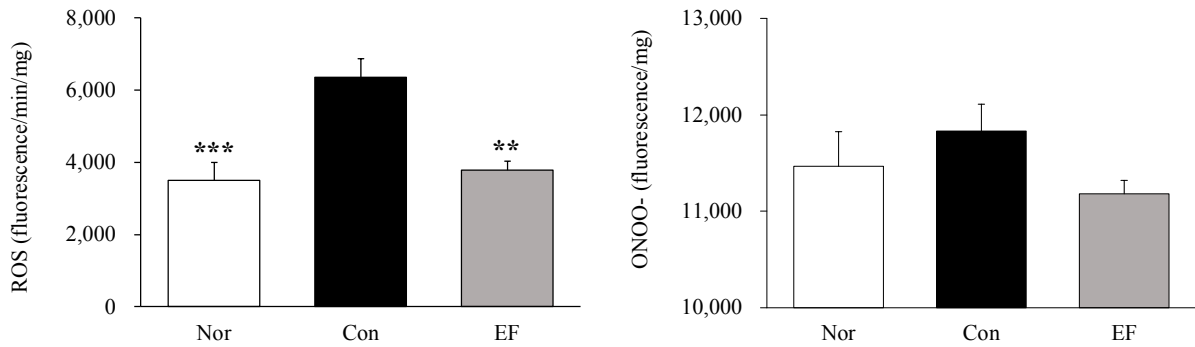


Fig. 2. Oxidative stress biomarker in esophagus tissues. Oxidative stress biomarker reactive oxygen species (ROS) and produces peroxynitrite (ONOO⁻) in esophagus tissues. All data are expressed means±SEM (n=6). Normal rats; Nor, chronic acid reflux esophagitis rats; Con, Evodiae Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; EF. Significance: ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. control rats.

4. 조직 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

본 연구에서는 만성 역류성 식도염 유발 동물 모델의 식도 조직을 이용하여 산화적 스트레스 마커인 ROS와 ONOO⁻를 측정하였다. ROS 측정 결과, 대조군 (6357.47±507.18 fluorescence/min/mg) 대비 정상군 {3491.22±502.66 fluorescence/min/mg (*p*<0.001)}은 유의적으로 낮게 나타났고, EF 투여군 {3780.87±252.74 fluorescence/min/mg (*p*<0.01)}에서 유의적으로 낮게 나타났다. ONOO⁻ 측정 결과, 대조군 (11830.00±282.39 fluorescence/mg) 대비 정상군 (11468.67±356.90 fluorescence/mg)과 EF 투여군 (11181.20±135.58 fluorescence/mg)에서 낮은 경향을 보였다 (Fig. 2).

5. 식도 조직 내 항산화 단백질 발현량 분석

식도 조직을 이용하여 western blot을 실시하여 항산화 관련 단백질인 Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 확인하였다. Nrf2의 경우, 대조군 (0.74±0.07) 대비 정상군 {1.00±0.07 (*p*<0.05)}에서 유의적으로 높게 나타났으며, EF 투여군 {1.00±0.09 (*p*<0.05)}에서 또한 유의적으로 높게 나타났다. HO-1의 발현을 확인한 결과, 대조군 (0.82±0.05) 대비 정상군 (1.00±0.05)에서 증가하는 경향을 나타냈으며, EF 투여군 (0.92±0.09)에서도 증가하는 경향이 나타났다. SOD의 경우, 대조군 (0.81±0.05) 대비 정상군 (1.00±0.08)에서 증가하는 경향이 나타났으며, EF 투여군 {1.02±0.07 (*p*<0.05)}에서는 유의적으로 증가하였다.

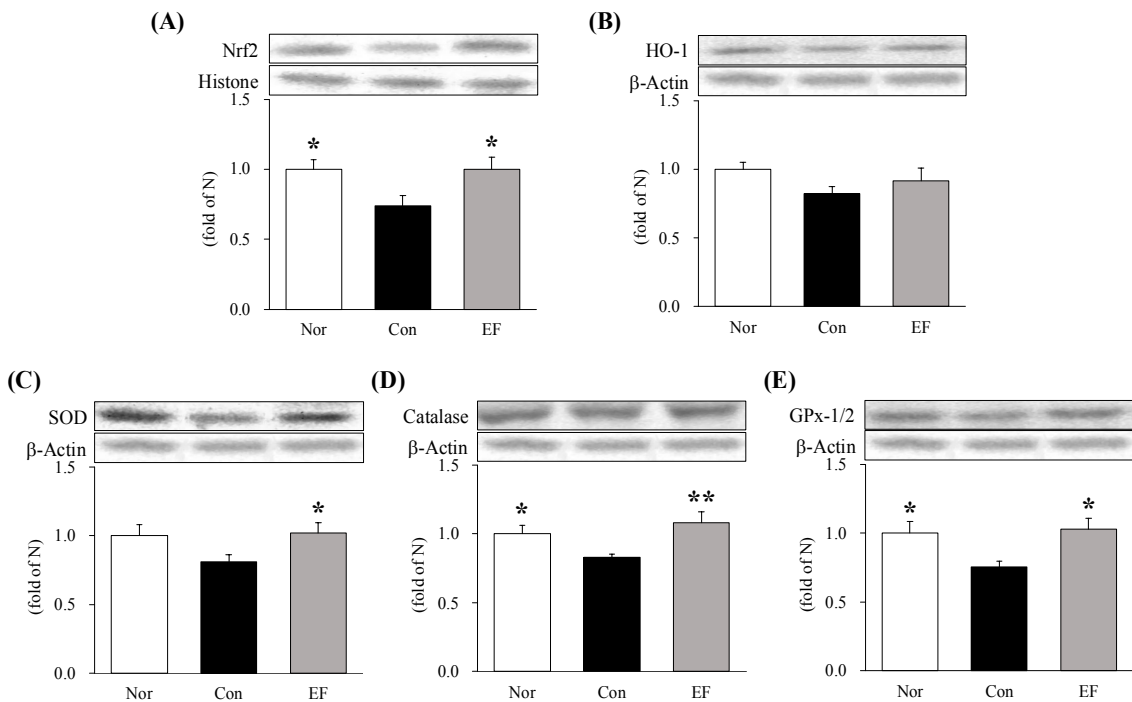


Fig. 3. Expression of anti-oxidant enzyme of esophagus tissues. All data are expressed means±SEM (n=6). Normal rats; Nor, chronic acid reflux esophagitis rats; Con, Evodiae Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; EF, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); (A), heme oxygenase-1 (HO-1); (B), super oxide dismutase (SOD); (C), catalase; (D), glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2); (E). Significance: **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. control rats.

catalase의 발현은 대조군 (0.83 ± 0.02) 대비 정상군 (1.00 ± 0.06 ($p < 0.05$))과 EF 투여군 (1.08 ± 0.08 ($p < 0.01$))에서 유의적으로 높게 나타났다. GPx-1/2 또한 대조군 (0.76 ± 0.04) 대비 정상군 (1.00 ± 0.09 ($p < 0.05$))과 EF 투여군 (1.03 ± 0.08 ($p < 0.05$))에서 유의적으로 높게 나타났다 (Fig. 3).

6. 식도 조직 염증성 단백질 발현량 분석

1) NF- κ Bp65, p-I κ B α 염증성 전사인자 발현량 분석
식도 조직에서 염증성 매개인자인 NF- κ Bp65, p-I κ B α

의 발현을 확인하였다. 그 결과, NF- κ Bp65는 대조군 (1.66 ± 0.09) 대비 정상군 (1.00 ± 0.12 ($p < 0.001$))과 EF 투여군 (1.28 ± 0.08 ($p < 0.05$))에서 유의적으로 감소하였고, p-I κ B α 또한 대조군 (1.81 ± 0.17) 대비 정상군 (1.00 ± 0.05 ($p < 0.001$))과 EF 투여군 (1.26 ± 0.10 ($p < 0.01$))에서 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4).

2) iNOS, IL-6, TNF- α 염증성 사이토카인 발현량 분석
식도 조직에서 염증성 사이토카인인 iNOS, IL-6, TNF- α 의 발현을 확인한 결과, iNOS는 대조군 (2.96 ± 0.22) 대비

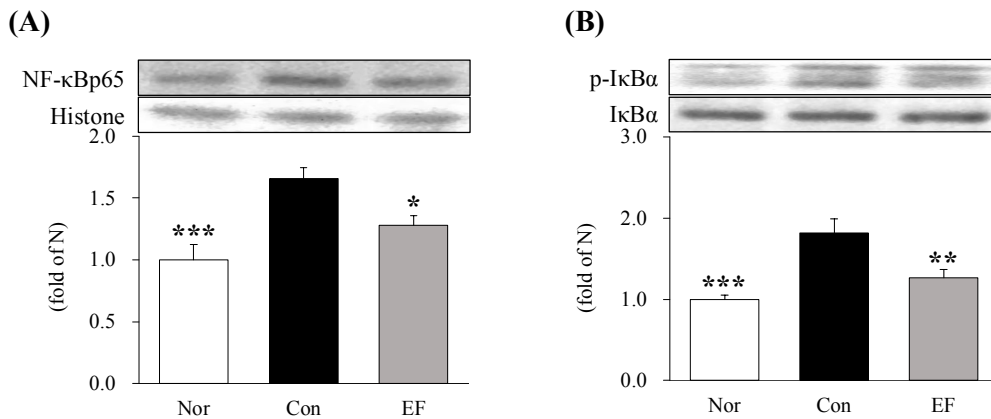


Fig. 4. Expression of inflammation-related proteins of esophagus tissues. All data are expressed means \pm SEM (n=6). Normal rats; Nor, chronic acid reflux esophagitis rats; Con, Evodiae Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; EF, nuclear factor- κ B p65 (NF- κ Bp65); (A), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B (α) (p-I κ B α); (B). Significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control rats.

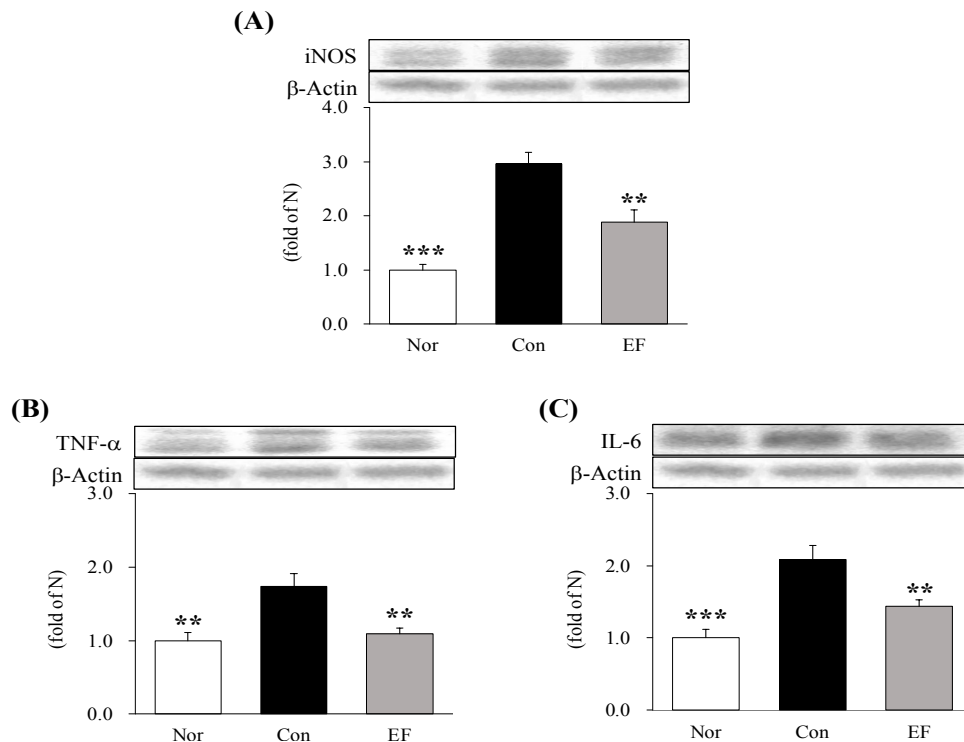


Fig. 5. Expression of inflammatory factors in esophagus tissues. All data are expressed means \pm SEM (n=6). Normal rats; Nor, chronic acid reflux esophagitis rats; Con, Evodiae Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; EF, inducible nitric oxide synthase (iNOS); (A), tumor necrosis factor- α (TNF- α); (B), interleukin-6 (IL-6); (C). Significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control rats.

정상군 $\{1.00 \pm 0.11 (p < 0.001)\}$ 과 EF 투여군 $\{1.89 \pm 0.21 (p < 0.01)\}$ 에서 유의적으로 감소하였고, IL-6는 대조군 (2.09 ± 0.19) 대비 정상군 $\{1.00 \pm 0.12 (p < 0.001)\}$ 과 EF 투여군 $\{1.44 \pm 0.09 (p < 0.01)\}$ 에서 유의적으로 감소하였으며, TNF- α 또한 대조군 (1.74 ± 0.17) 대비 정상군 $\{1.00 \pm 0.11 (p < 0.01)\}$ 과 EF 투여군 $\{1.09 \pm 0.08 (p < 0.01)\}$ 에서 유의적으로 감소하였다 (Fig. 5).

IV. 고찰

역류성 식도염은 하부 식도 괄약근을 통해 인두나 식도로 위 안의 내용물이 역류하여 식도 조직에 손상을 일으키는 등 합병증이 유발된 상태를 말하며, 원인으로는 하부 식도 괄약근의 기능상실과 위 배출장애 및 식도의 연동운동 장애 등이 있고, 가슴 쓰림, 산 역류, 만성 기침, 이물감 등의 증상이 일어난다²⁶⁻²⁸⁾. 본 연구는 만성 역류성 식도염의 치료를 위한 새로운 약물을 개발하기 위한 연구로써 *In vitro* 실험을 통해 吳茱萸 물 추출물의 항산화 활성을 측정하였으며, 이를 토대로 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 2주간 吳茱萸 물 추출물을 투여하여 육안적 손상 면적, 조직 내 산화적 스트레스 바이오마커를 측정하였으며, western blot을 통해 항산화 관련 인자, 항염증 매개인자 및 항염증 사이토카인의 발현을 확인하였다.

吳茱萸 물 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 확인하였다. 吳茱萸 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정된 결과, 총 폴리페놀 함량은 54.00 ± 0.45 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 44.43 ± 0.75 mg/g으로 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 또한, DPPH 자유 라디칼 소거 활성 측정 결과, 吳茱萸 물 추출물의 IC₅₀ 값은 24.49 ± 0.21 μ g/ml로 나타났으며, ABTS 자유 라디칼 소거 활성을 측정된 결과 吳茱萸 추출물의 IC₅₀ 값은 54.59 ± 1.06 μ g/ml로 높은 항산화 활성을 나타냈다 (Table 1, 2).

만성 역류성 식도염 유발 동물 모델에서 吳茱萸 물 추출물을 14일간 투여한 후 식도 조직을 적출하여 육안적으로 관찰한 결과, 정상군은 식도 점막 손상이 나타나지 않았으나 대조군에서는 하부식도의 손상 및 궤양을 확인할 수 있었으며, EF 투여군에서는 대조군에 비하여 식도 점막의 손상이 현저하게 감소되어 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 1).

역류성 식도염의 원인은 산의 역류에 의한 점막 손상이라고 알려져 있었으나, 최근 밝혀진 역류성 식도염의 주된 원인은 산화적 스트레스로, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다²⁹⁾. 조직 내 ROS를 측정된 결과, 대조군에 비해 정상군에서 유의하게 낮게 나타났으며, EF 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 낮게 나타났다. ONOO⁻ 또한 대조군에 비해 정상군과 EF 투여군에서 낮은 경향을 보였다 (Fig. 2).

부검 뒤 얻은 식도 조직을 이용하여 항산화 관련 인자인 Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 확인하였다. Nrf2는 발암과정 및 산화적 스트레스에 대항하여 세포를 보호하는 전사인자로서, 이들은 antioxidant response element

(ARE)와 결합하여 주요한 항산화 효소를 활성화 시키며, 이러한 항산화 효소들은 생성된 활성산소의 생성을 억제시킨다³⁰⁻³³⁾. 실험 결과 Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2는 정상군에 비해 대조군에서 발현이 감소하였으며, EF 투여군에서 발현이 증가하였다 (Fig. 3). 이는 吳茱萸 물 추출물이 만성 역류성 식도염 동물모델에서 항산화 경로를 통해 식도 점막을 보호하는 효과를 가지는 것으로 판단된다.

또한, 염증 매개인자인 NF- κ Bp65와 p-I κ B α 와 염증성 사이토카인 iNOS, IL-6, TNF- α 의 발현을 확인하였다. NF- κ B는 여러 가지 cytokine에 의해 활성화 되는 전사 조절인자로서, 염증 관련 유전자들의 핵심적인 전사 조절의 역할을 하며 다양한 cytokine, 면역 글로불린 등의 전사에 관여한다. 비활성화 상태인 NF- κ B는 inhibitor I κ B와 cytoplasm에 존재하다가 활성화를 일으키는 자극이 가해지면 inhibitor I κ B는 인산화 과정을 거친 후 분해되어 NF- κ B가 핵 속으로 이동한 후, target 유전자들의 전사를 야기한다³⁴⁻³⁷⁾. 실험 결과, 염증성 매개인자인 NF- κ Bp65와 p-I κ B α 의 발현은 대조군에 비해 정상군과 EF 투여군에서 유의성있게 감소하였으며, iNOS, IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인 또한 대조군에 비해 정상군과 EF 투여군에서 유의성있게 감소하였다 (Fig. 4, 5). 이는 吳茱萸 물 추출물이 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 염증성 매개인자와 염증성 사이토카인을 억제함으로써 식도 점막을 보호하는 효과가 있다고 판단된다.

V. 결론

본 연구에서는 吳茱萸 물 추출물의 항산화 활성을 확인하였으며, 이를 토대로 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 吳茱萸 물 추출물을 14일간 투여한 후 식도 조직을 적출하여 산화적 스트레스 바이오 마커, 항산화 관련 인자, 염증성 매개 인자 및 염증성 사이토카인의 발현을 분석하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 吳茱萸 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 총 폴리페놀 함량은 54.00 ± 0.45 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 44.43 ± 0.75 mg/g으로 높은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 나타냈다.
2. DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 통해 吳茱萸 물 추출물의 항산화 활성을 측정된 결과, 뛰어난 소거능을 나타냈다.
3. 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 吳茱萸 물 추출물 투여를 통해 식도 점막 손상 및 궤양의 유의적으로 감소시켰다.
4. 吳茱萸 물 추출물의 투여는 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS, ONOO⁻의 수치를 효과적으로 감소시켜 식도 점막 손상을 억제시킨 것으로 나타났다.
5. 吳茱萸 물 추출물을 투여함으로써 Nrf2와 항산화 효소인 HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 유의적으로 증가시켰다.
6. 吳茱萸 물 추출물을 투여함으로써 I κ B α 의 인산화를 유의적으로 감소시켰으며, NF- κ Bp65의 발현을 유의적으로

감소시켰다.

7. 吳茱萸 물 추출물을 투여함으로써 iNOS, IL-6, TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 유의적으로 감소시켰다.

따라서 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 吳茱萸 물 추출물은 Nrf2, HO-1, SOD, catalas, GPx-1/2 등 항산화 관련 인자와 산화적 스트레스를 감소시키고, 높은 항산화능으로 NF- κ Bp65, p-I κ B α , iNOS, IL-6, TNF- α 등과 같은 염증 관련 인자의 발현을 억제시킴으로써 식도 점막 보호 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구결과는 2017년도 한국연구재단에서 시행한 중견연구지원사업 (NRF-2017R1A2B2006858) 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Ahtaridis G, Snape WJ, Cohen S. Lower esophageal sphincter pressure as an index of gastroesophageal acid reflux. *Digestive Diseases and Sciences*. 1981 ; 26(11) : 993-998.
- 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.
- Cho YS, Choi MG, Jeong JJ., Chung WC, Lee IS, Kim SW, Han SW, Choi KY, Chung IS. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Asan-si, Korea. *The American Journal of Gastroenterology*. 2005 ; 100 : 747-753.
- Vigneri S, Termini R, Leandro G. A comparison of five maintenance therapies for reflux esophagitis. *The New England Journal of Medicine*. 1995 ; 333 : 1106-1110.
- 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.
- Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Jeon SW, Cho YK, Lee KJ. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 2012 ; 60(4) : 195-218.
- Han SH, Hong SJ. Transient lower esophageal sphincter relaxation and the related esophageal motor activities. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 2012 ; 59(3) : 205-210.
- Harris RA, Kuppermann M, Richter JE. Prevention of recurrences of erosive reflux esophagitis: a cost-effectiveness analysis of maintenance proton pump inhibition. *The American Journal of Medicine*. 1997 ; 102(1) : 78-88.
- Badillo R, Francis D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2014 ; 5(3) : 105-112.
- Kwon OJ, Lee AR, Roh SS. Improving Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Combined Extract of Young persimmon fruit and Citrus peel. *The Korea Journal of Herbology*. 2016 ; 31(1) : 25-31.
- Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory Effect of *Evodia Officinalis* DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2008 ; 23(1) : 29-38.
- Kum SY. Anti-inflammatory and anti-migration effect of methanol extract of *Evodia officinalis* DODE in HASMC. Graduate School of Dongguk University. 2008.
- Fei XF, Wang BX, Li TJ, Tashiro S, Minami M, Xing DJ, Ikejima T. Evodiamine, a constituent of *Evodiae Fructus*, induces anti-proliferating Effect in tumor cells. *Cancer Science*. 2003 ; 94(1) : 92-98.
- Ko HC, Wang YH, Liou KT, Chen CM, Chen CH, Wang WY, Chang S, Hou YC, Chen KT, Chen CF, Shen YC. Anti-inflammatory Effect and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells. *European Journal of Pharmacology*. 2007 ; 555(2-3) : 211-217.
- Yun HJ, Heo SK, Lee YT, Park WH, Park SD. Anti-inflammatory Effect of *Evodia Officinalis* DODE in Mouse Macrophage and Human Vascular Endothelial Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 2008 ; 23(1) : 29-38.
- Kim ST, An SH, Kim JD, Kim YG. Original Articles : Protective Effect of MeOH Extract of *Evodia officinalis* on Cyanide-induced Neurotoxicity in Cultured Neuroblastoma Cells. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2003 ; 34(4) : 282-287.
- Jeon ES, Han MD, Kim HD. Antimicrobial Activity of *Streptococcus mutans* by *Schizandrae fructus* and *Evodiae fructus* extracts. *Journal of Dental Hygiene Science*. 2003 ; 3(1) : 39-44.
- Kim DJ, Roh SS. Effect on Acute reflux Esophagitis by *Evodiae Fructus* Aquous Extract. *The Korea*

- Journal of Herbology. 2012 ; 27(1) : 51-58.
19. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. Journal of biological chemistry. 1912 ; 12 : 239-243.
 20. 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 : 155-161.
 21. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature. 1958 ; 181 : 1199-1200.
 22. 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) : 1231-1237.
 23. Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. Establishment of Surgically Induced Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1999 ; 34(10) : 948-953.
 24. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology. 1992 ; 13(3) : 637-648.
 25. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrohodamine 123. Free Radical Biology & Medicine. 1994 ; 16(2) : 149-156.
 26. Kahrilas PJ. GERD pathogenesis, pathophysiology and clinical manifestations. Cleveland Clinic Journal of Medicine. 2003 ; 70(5) : 4-19.
 27. Seo KW, Yoon KY. Surgical Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease. The Korean Journal of Gastroenterology. 2013 ; 61(3) : 177-179.
 28. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. The American Journal of Gastroenterology. 2006 ; 101(8) : 1900-1920.
 29. Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. Free Radical Biology & Medicine. 2001 ; 30(8) : 905-915.
 30. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997 ; 236(2) : 313-322.
 31. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. The Journal of Biological Chemistry. 2000 ; 275(21) : 16023-16029.
 32. Cho HY, Jedlicka AE, Reddy SP, Kensler TW, Yamamoto M, Zhang LY, Kleeberger SR. Role of Nrf2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. American Journal of Respiratory Cell and Molecular. 2002 ; 26(2) : 175-182.
 33. Kim JH, An CW, Kim YJ, Noh YJ, Kim SJ, Hwang IH, Jeon H, Cha DS, Shin TY, Kim DK. Anti-oxidative Effect of Epimedii Herba in Caenorhabditis elegans. Korean Journal of Pharmacognosy. 2017 ; 48(4) : 298-303.
 34. Baldwin AS, Azizkhan JC, Jensen DE, Beg AA, Coodly LR. Induction of NF-kappa B DNA-binding activity during the G0-to-G1 transition in mouse fibroblasts. Molecular and Cellular Biology. 1991 ; 11(10) : 4943-4951.
 35. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: Ten Years After. Cell. 1996 ; 87(1) : 13-20.
 36. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor-kappa B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. The New England Journal of Medicine. 1997 ; 336 : 1066-1071.
 37. French SW, Miyamoto K, Tsukamoto H. Ethanol - induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 1986 ; 10(suppl6) : 13S-9S.