

川練子が 만성 역류성 식도염 흰쥐에 미치는 효과

이진아[#], 신미래, 최정원, 노성수^{*}

대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Effect of Toosendan Fructus on Chronic Acid Reflux Esophagitis Rats

Jin A Lee[#], Mi-Rae Shin, Jeong Won Choi, Seong-Soo Roh^{*}

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

ABSTRACT

Objective : Reflux esophagitis (RE), one of gastroesophageal reflux disease (GERD), is a disease that causes inflammation due to reflux of stomach contents such as stomach acid and pepsin due to the unstable gastroesophageal sphincter, and is currently increasing worldwide. The currently used treatment for reflux esophagitis has various side effects. Therefore, in this study the effect of Toosendan Fructus extract on chronic acid reflux esophagitis in rats was evaluated in order to find a new treatment material for reflux treatment.

Methods : After inducing reflux esophagitis through surgery, the group was separated and the drug was administered for 2 weeks; Normal rats (Normal, n=8), chronic acid reflux esophagitis rats (Control, n=8), Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats (TF, n=8). After, we were taken esophageal tissue and esophageal mucosa damage was identified, and analyzed the expression of NADPH oxidase, AP-1/MAPK-related proteins, and tight junction proteins by western blot in esophageal tissue.

Results : Toosendan Fructus administration significantly protected the esophageal mucosal damage of reflux esophagitis. Also, Toosendan Fructus significantly reduced the expression of NADPH oxidases (NOX2 and p22^{phox}) and AP-1/MAPK-related proteins (c-Fos, c-Jun, p-p38, p-ERK, and p-JNK). In addition, it significantly increased the expression of tight junction proteins (Occludin, Claudin-3, and Claudin-4).

Conclusions : These results suggest that Toosendan Fructus reduced damage to the esophageal mucosa by protecting the esophageal mucosa by upregulating tight junctions proteins as well as inhibiting the AP-1/MAPK pathway through reducing NADPH oxidases expression.

Key words : Chronic acid reflux esophagitis, Toosendan Fructus, inflammation, tight junction

I. 서 론

위식도 역류질환 (Gastroesophageal reflux disease; GERD) 중 하나인 역류성 식도염 (Reflux esophagitis; RE)은 불안정한 위-식도 괄약근으로 인해 위산과 펩신 등 위 속 내용물이 역류하여 염증을 일으키는 질환으로써 위벽세포에서 분비되는 위산과 동반한 산화적 스트레스로 인해 식도 점막과

점액층에 물리적 손상이 생겨 일어난다고 알려져 있다¹⁻³⁾. 우리나라에서 역류성 식도염은 1990년대까지만 하더라도 주요 관심 질환에 포함되지 않았으나 고열량 및 서구화 식습관, 지나친 음주, 비만 인구 증가 등으로 최근 전 연령대에서 발병률이 증가하고 있으며, 서양의 경우에도 5% 이상의 유병률을 보이고 있다^{3,4)}.

*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 : 24 March 2021 · Revised : 12 April 2021 · Accepted : 25 May 2021

역류성 치료를 위하여 생활습관의 교정을 권하고 있으나 일부 환자에게서만 증상의 호전이 나타날 뿐 대부분의 경우 약물을 사용한 치료가 필요한 실정이다⁵⁾. 주요 치료제로 위장관 운동 촉진제, 제산제 및 위산 분비 억제제 등의 약물이 많이 사용되고 있으나 역류성 식도염의 특성상 약해진 하부식도 괄약근이 쉽게 개선되지 않아 약물 복용을 중단할 경우 여러 부작용이 나타나며, 재발률이 50~80%에 이르는 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 따라서 장기간 복용에도 부작용이 적게 나타나며 역류성 식도염을 효과적으로 개선시킬 수 있는 새로운 기전의 치료제 개발이 필요한 실정이다.

川練子 (Toosendan Fructus)는 멀구슬나무과 (Meliaceae)에 속하는 낙엽관목인 천련 (*Melia toosendan* Sieb. er Zucc.)의 열매로써 예로부터 한의학에서는 濕熱을 제거하고 痛症을 緩和한다고 알려져 있으며, 脾胃氣滯, 肝氣鬱滯 등이 병증을 치료에 사용되어 왔다^{8,9)}. 川練子の 약리작용으로는 항산화 및 항염증 효과¹⁰⁾, 항당뇨 효과⁹⁾, 암세포 자멸 효과¹¹⁾, 항균 효과⁸⁾ 등이 많은 연구를 통해 알려졌다. 또한, 선행 연구에서 檳榔子和 川練子 복합물이 만성 역류성 식도염에서 Nrf2와 NF- κ B pathway를 통해 식도 점막의 염증을 완화시키는 것으로 밝혀졌다¹²⁾.

이에 본 연구에서는 항염증 및 항균 효과가 있다고 알려져 있는 川練子를 이용하여 만성 역류성 식도염에서 식도 점막의 손상 여부를 확인하였고, 염증의 경로 중 하나인 AP-1/MAPK pathway의 단백질 발현 및 식도의 기능과 관련된 tight junction 단백질의 발현을 확인하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에서 사용한 川練子는 용기한약국 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격법에 맞추어 관능검사 후, 약전규격에 적합한 것만을 정산하여 사용하였다. 川練子 200 g을 분쇄하여 DW 2,000 mL 첨가한 후 열탕 추출기에서 2시간 추출 하였으며, 얻어진 추출물은 감압 추출장치로 농축 후, 동결 건조기를 이용해 완전 건조시켜 파우더를 얻었다 (yield; 12%). 파우더는 실험 전까지 -80°C에서 보관하였으며, 실험 직전 DW에 녹여 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, naringin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, diethylene glycol는 Alfa Aesar (Lancashire, UK)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, NADPH oxidase 2 (NOX2), p22^{phox}, phospho-p38 MAPK (p-p38), extracellular signal-regulated kinase (ERK),

phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), c-Jun N-terminal Kinase (JNK), phospho-c-Jun N-terminal Kinase (p-JNK), Occludin, Claudin-3, Claudin-4, Histone, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, CA, USA)로부터 구입하였다. p38 MAPK (p38), c-Jun 및 c-Fos는 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 2차항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, LA, USA)에서 구입하여 사용하였다. ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였으며, 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3) 실험동물

SD 흰쥐 5주령 수컷 (130~150 g)을 대한바이오링크 (음성, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용 하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22 \pm 2°C, 습도 50 \pm 5%, 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 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. 본 실험은 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (DHU2021-011)을 받아 진행하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법¹³⁾을 이용하여 측정하였다. 시료 10 μ L와 DW 790 μ L, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ L, 20% sodium carbonate 150 μ L를 혼합하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 UV 분광광도계 (Infinite M200, Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량을 측정하기 위하여 시료 100 μ L와 diethylene glycol 1 mL, 1 N NaOH 10 μ L를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁴⁾. 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

2) 만성 역류성 식도염 유발 및 처치

수술 전 18시간 동안 절식하였으며, 37.5 mg/kg의 Zoletil® 50 (Vibrac, France)을 복강주사하여 마취한 뒤 수술을 진행하였다. 제모기로 복부털을 제거하여 복간 정중부를 2 cm 정도 개방하여 위저부 (Fundus)를 블랙 실크(2-0)실로 묶고, 날문

부 (pylorus)에는 latex ring(18-Fr Nelaton catheter, 2 mm in thickness)을 끼워 나일론 (5-0)실로 묶은 후 복막과 피부를 봉합하였다¹⁵⁾. 감염을 줄이기 위해 수술 후 3일간 항생제 (Gentamicin sulfate)와 항염증제 (Dexamethasone)를 피하주사 하였으며, 수술 24시간 후 물을 공급해주었고, 수술 48시간 후부터 사료를 공급해 주었다. 1주일간 회복기를 거친 후, 아무런 처치를 하지 않은 정상군 (Normal), 만성 역류성 식도염 유발 후 DW를 투여한 대조군 (Control), 만성 역류성 식도염 유발 후 川練子 추출물 200 mg/kg를 투여한 군 (TF) 총 3그룹으로 무작위 분류하였으며, 모든 그룹은 매일 일정한 시간에 몸무게 및 사료 섭취량을 측정하였고, 川練子 추출물을 DW에 녹여 14일간 1일 1회씩 경구투여 하였다.

3) 식도 점막 손상 확인

적출한 식도를 수술용 가위를 이용하여 세로로 절단하였다. 절단된 식도 내부를 saline으로 세척한 후 고정하여 광학 디지털 카메라 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도 점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., 성남, 한국) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정 후, 아래 식을 이용하여 손상 면적을 나타내었다.

$$\text{식도 손상 비율 (\%)} = \frac{\text{식도 손상 면적}}{\text{식도 전체 면적}} \times 100$$

4) 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 cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 조직 분쇄기 (tissue grinder) (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μL의 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 첨가해 재부유시킨 후 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 식도 조직 세포질의 NOX2, p22^{phox}, p38, p-p38, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, Occludin, Claudin-3, Claudin-4, β-actin 단백질과 핵에서의 c-Jun, c-Fos, Histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 12 μg의 단백질을 10-12% SDS polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL)

용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., 서울, 한국)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

5) 통계분석

*In vitro*의 수치는 mean±SEM으로, *in vivo*의 수치는 mean±SD로 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 유의성을 p<0.05 유의수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

본 실험에서 사용한 川練子 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과, 총 폴리페놀 함량은 4.05 ± 0.12 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 2.15 ± 0.06 mg/g으로 나타났다 (Table 1).

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

Sample	Total Polyphenol (mg/g)	Total Flavonoid (mg/g)
Toosendan Fructus	4.05 ± 0.12	2.15 ± 0.06

All values are expressed mean±SEM of three replications

2. 식도점막 손상도 측정

식도 점막의 손상 정도를 육안으로 관찰한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 Normal군에서는 식도 점막의 손상이 발견되지 않았으나, 만성 역류성 식도염 유발 후 DW를 처리한 Control군에서는 식도의 하부에서 큰 궤양이 발견되었으며, 식도 중앙부에서 발적 및 궤양을 확인하였다. 반면에 TF군에서는 Control군 대비 식도의 병변이 53% 감소하여 식도 점막의 발적 및 궤양이 크게 개선된 것을 확인하였다 (Fig. 1).

3. 체중변화 및 식이섭취량

실험 기간 동안의 체중변화 및 식이섭취량을 확인한 결과, 실험 전 Control군과 TF군 유의성은 나타나지 않았다. 14일 후, Control군의 체중은 19.53 ± 13.65 g 증가한 반면 TF군에서는 39.40 ± 20.96 g 증가하여 Control군보다 체중이 크게 증가하였으며, 식이섭취량 또한 Control군에 비하여 TF군에 높게 나타났다 (Table 2).

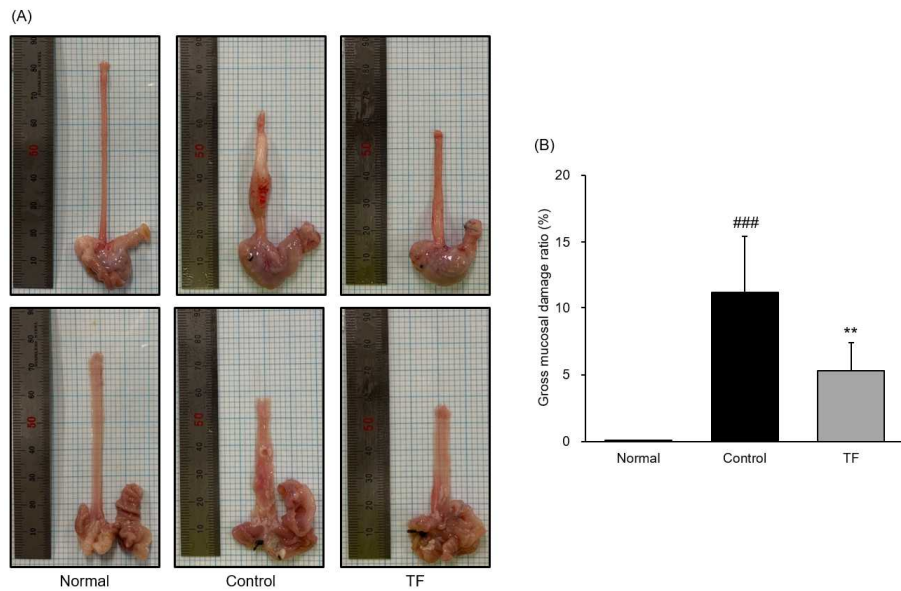


Fig. 1. Surgical induction of chronic acid reflux esophagitis.

A representative gross image; (A), esophageal ulcer ratio; (B). All data are expressed means \pm SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: ###p < 0.001 vs. Normal group, **p < 0.01 vs. Control group.

Table 2. Changes in Body Weight and Food Intake

	Body weight (g)			Food intake (g/day)
	Initial	Final	Change	
Normal	265.78 \pm 16.52	359.11 \pm 26.92	93.34 \pm 25.27	11.74 \pm 1.92
Control	146.67 \pm 8.04 ^{###}	166.20 \pm 17.09 ^{###}	19.53 \pm 13.65 ^{###}	5.89 \pm 1.33 ^{###}
TF	145.89 \pm 16.21	185.29 \pm 24.03	39.40 \pm 20.96	7.39 \pm 1.96*

Data are presented as mean \pm SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: ###p < 0.001 vs. Normal group, *p < 0.05 vs. Control group.

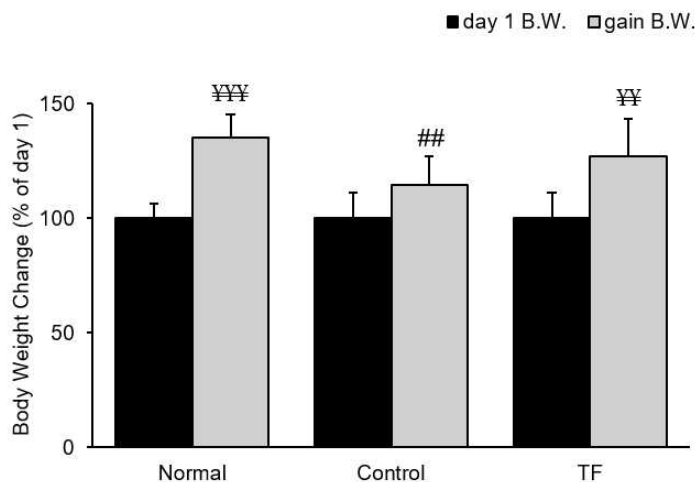


Fig. 2. Body weight change.

All data are expressed means \pm SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: ##p < 0.01 vs. Normal group, YYp < 0.01, YYYp < 0.001 vs. 1 day.

4. 식도 조직 내 NADPH 단백질 발현량 분석

식도 조직 내에서 NADPH 단백질인 NOX2와 p22^{phox}의 발현을 확인하였다. Normal군 대비 Control군에서 NOX2의 발현은 43% (p<0.001) 크게 증가하였으며, p22^{phox}의 발현은 21% (p<0.01) 유의하게 증가하였다. 반면에 Control군 대

비 TF군에서는 NOX2의 발현이 19% (p<0.001) 유의하게 감소하였으며, p22^{phox}의 발현 또한 15% (p<0.01) 유의하게 감소하여 Normal군과 비슷한 수치를 나타냈다 (Fig. 3).

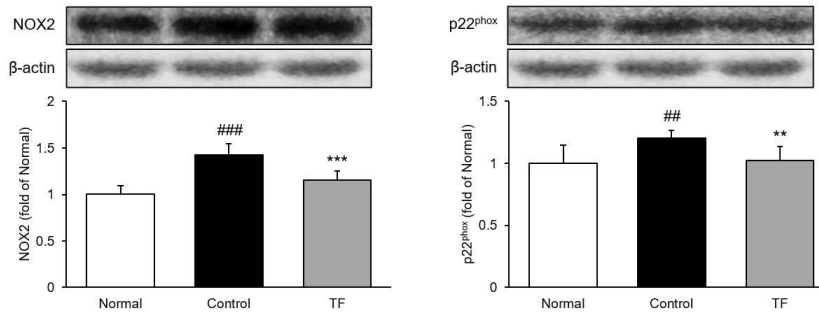


Fig. 3. Expression of NADPH oxidase proteins in esophagus.

All data are expressed means±SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: #p < 0.01, ###p < 0.001 vs. Normal group, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. Control group.

5. 식도 조직 내 AP-1/MAPK 단백질 발현량 분석

식도 조직 내에서 AP-1 단백질인 c-Fos, c-Jun와 MAPK 단백질인 p-p38, p-ERK 및 p-JNK 단백질 발현을 확인하였다. c-Fos와 c-Jun의 발현은 Normal군 대비 Control군에서 40% (p<0.01) 이상 크게 증가한 반면 Control군 대비 TF군에서는 30% (p<0.01) 이상 유의하게 감소하여 Normal군과 비슷한 수치를 나타냈다. 또한, p-p38의 발현은 Normal군

대비 Control군에서 88% (p<0.001) 유의하게 증가한 반면 Control군 대비 TF군에서 35% (p<0.01) 유의하게 감소하였으며, Normal군 대비 Control군에서 p-ERK 26% (p<0.01), p-JNK (p<0.001) 유의하게 증가하였고, Control군 대비 TF군에서 p-ERK 22% (p<0.01), p-JNK 27% (p<0.001) 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

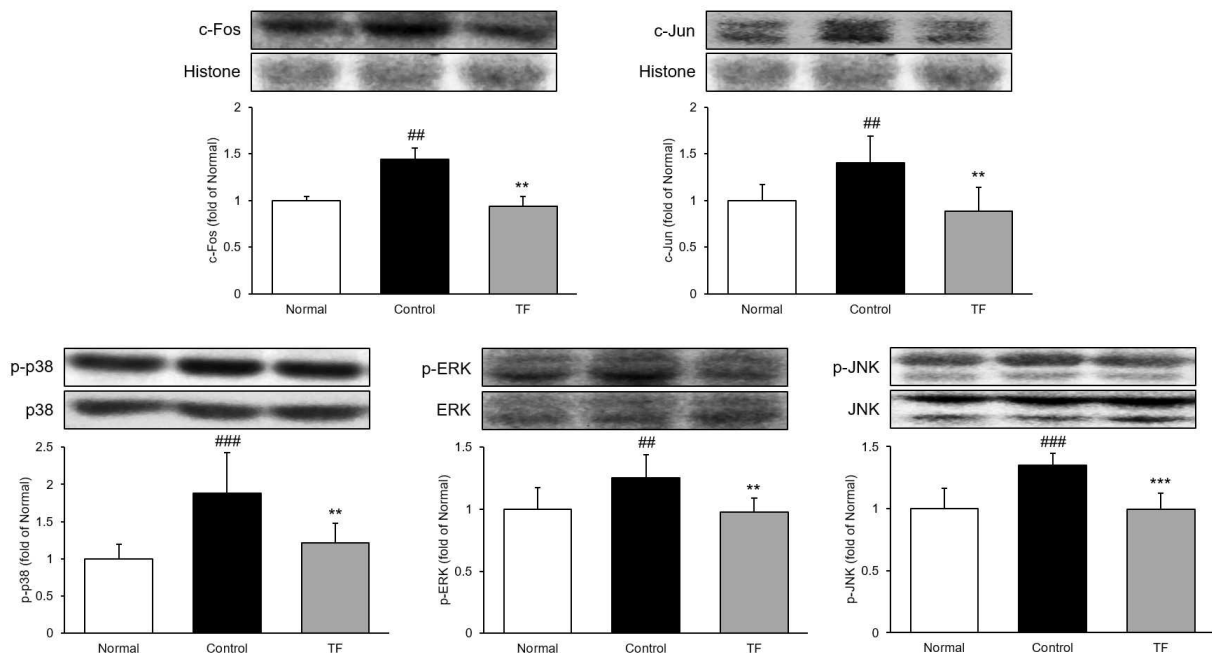


Fig. 4. Expression of AP-1/MAPK proteins in esophagus.

All data are expressed means±SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: #p < 0.01, ###p < 0.001 vs. Normal group, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. Control group.

6. 식도 조직 내 tight junction 단백질 발현량 분석

식도 조직 내에서 tight junction 단백질인 Occludin, Claudin-3 및 Claudin-4의 발현을 확인하였다. Normal군 대비 Control군에서 Occludin과 Claudin-4의 발현은 약 20% ($p < 0.01$) 유의하게 감소하였으며, Claudin-3의 발현은 41%

($p < 0.001$) 유의하게 감소하였다. 반면 Control군 대비 TF군에서는 Occludin 30% ($p < 0.001$), Claudin-3 32% ($p < 0.01$), Claudin-4 23% ($p < 0.01$) 유의하게 증가하였다 (Fig. 5).

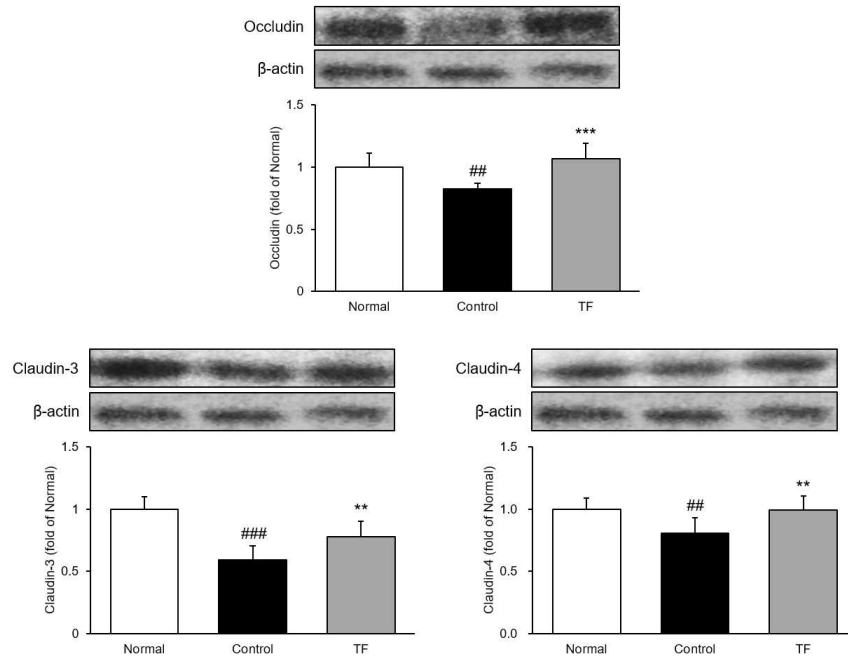


Fig. 5. Expression of tight junction proteins in esophagus.

All data are expressed means \pm SD (n=8). Normal rats; Normal, chronic acid reflux esophagitis rats; Control, Toosendan Fructus 200 mg/kg body weight/day-treated chronic acid reflux esophagitis rats; TF. Significance: ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Normal group, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Control group.

IV. 고찰

역류성 식도염 (Reflux esophagitis; RE)은 불안정한 위-식도 괄약근으로 인해 위산과 펩신 등 위 속 내용물이 역류하여 염증을 일으키는 질환으로써 최근 서구화된 식습관 및 지방식으로 비만 인구가 증가로 인해 역류성 식도염 환자도 매년 증가되고 있는 추세이다^{1,16}. 역류성 식도염 주요 치료제로는 제산제 및 위산 분비 억제제가 있으며, 이러한 약물들은 여러 부작용이 나타나고 있을 뿐 아니라 복용을 중단 할 경우 재발률이 높게 나타나고 있어 부작용이 적으면서 역류성 식도염을 효과적으로 개선할 수 있는 치료제 개발이 필요한 실정이다^{6,7}. 이에 본 연구에서는 항염증 및 항균 효과가 있다고 알려진 川練子를 이용하여 역류성 식도염에 대한 효능을 평가하였다.

수술을 통해 역류성 식도염을 유발한 rat에게 2주간 川練子 추출물을 경구투여한 후, 식도 조직을 적출하여 육안으로 관찰한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 Normal군에서는 식도 점막의 손상이 발견되지 않았으나 만성 역류성 식도염을 유발한 후 DW를 경구투여한 Control군에서는 식도 하부 전체에서 궤양이 발견되었을 뿐 아니라 식도 중앙부에서도 발적 및 궤양을 확인하였으며, 川練子 추출물 투여를 통해 식도 점막의 발적 및

궤양이 크게 개선된 것을 확인하였다 (Fig. 1). 川練子 추출물을 투여한 TF군에서 Control군에 비해 체중이 크게 증가하였으며, 식이섭취량 또한 Control군에 비해 TF군에서 높게 나타났다 (Fig. 2, Table 2). 川練子 추출물을 투여를 통해 역류성 식도염이 개선됨으로써 식이 섭취가 증가하고, 그에 따라 체중 또한 증가되어진 것으로 판단된다.

NADPH oxidase (NOX)는 외부의 다양한 자극에 의해 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)를 발생시키는 효소로서 NOX 복합체는 gp91^{phox} (NOX2), p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} 등으로 이루어져 있으며, 외부의 자극에 의해 활성화 되면 ROS를 만들어낸다^{17,18}. NOX에 의해 생성된 ROS는 산화적 스트레스를 유발하게 되며, 이렇게 유발된 산화적 스트레스는 염증과 밀접한 관련이 있을 뿐 아니라 다양한 질환을 유발하는 기초적인 기전이 된다고 알려져 있다¹⁹. 본 실험에서는 식도 조직 내 NOX2 및 p22^{phox}의 발현을 확인하였으며, 그 결과 역류성 식도염에 의해 증가된 NOX2 및 p22^{phox}의 발현이 川練子 추출물을 경구투여함으로써 NOX2 및 p22^{phox}의 발현이 유의하게 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 3).

이는 川練子 추출물이 산화적 스트레스를 유발하는 NADPH oxidase의 발현을 조절하는 것으로 사료된다.

MAPK는 염증에 관여하는 경로 중 하나로 ERK, JNK, p38 등의 신호전달경로를 가지고 있으며, 염증성 사이토카인의 발현을 조절한다²⁰⁾. ERK는 세포의 성장과 밀접한 관계가 있어 과발현 될 경우 세포의 암을 유발하는 원인이 되며, JNK 및 p38은 대부분의 염증, 스트레스, 세포 사멸과 밀접한 관련이 있어 MAPK의 활성을 조절하는 것이 염증 반응을 조절하기 위한 핵심요소로 인식되고 있다^{21,22)}. 본 실험에서는 역류성 식도염 rat에게 川練子 추출물을 투여함으로써 전사조절인자인 c-Fos, c-Jun 및 MAPK 인자의 발현을 유의하게 억제하였으며, 이러한 결과는 川練子 추출물이 MAPK 경로를 억제함으로써 식도 점막의 손상을 감소시키는 것으로 판단된다 (Fig. 4).

밀착연접 단백질이라 불리는 tight junction 단백질은 세포와 세포 사이의 결합을 연계하는 단백질 복합체로써 세포간의 부착, 세포 주위 공간을 통한 이동 및 물질이동, 세포 내 신호전달, 생물학적 장벽 등의 기능을 가진다^{23,24)}. Tight junction 중 가장 일찍 발견된 Occludin은 그 발현 정도가 생물학적 기능성과 높은 관련이 있는 것으로 알려져 있다²³⁾. 식도염에서 식도 점막의 손상이 야기되면 상피 및 내피 결합조직에서 tight junction의 손상을 발생시키며, 이는 tight junction 단백질의 감소를 유도한다⁷⁾. 본 실험에서 川練子 추출물의 투여는 역류성 식도염으로 인해 감소된 Occludin, Claudin-3 및 Claudin-4의 발현을 유의하게 증가시켰으며, 이는 川練子 추출물이 식도 점막의 결합조직을 보호함으로써 식도의 기능의 개선에도 효과를 나타내는 것으로 판단된다 (Fig. 5).

V. 결 론

본 연구에서는 항염증 및 항균효과가 있다고 알려져 있는 川練子が 만성 역류성 식도염에서 나타내는 염증 완화 및 식도 점막 보호 효과를 확인하였다. 수술을 통해 역류성 식도염을 유발한 후 川練子 추출물을 경구투여 하였으며, 식도 조직 내 NADPH oxidase, MAPK 단백질 및 tight junction 단백질의 발현을 분석하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 川練子 추출물은 식도 점막의 발적 및 궤양을 효과적으로 개선시켰다.
2. 川練子 추출물은 NADPH 단백질인 NOX2와 p22^{phox} 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.
3. 川練子 추출물은 AP-1/MAPK 관련 단백질인 c-Fos, c-Jun, p-p38, p-ERK 및 p-JNK의 발현을 유의하게 감소시켰다.
4. 川練子 추출물은 tight junction 단백질인 Occludin,

Claudin-3 및 Claudin-4 단백질 발현을 유의하게 증가시켜 식도 조직의 결합조직 내 손상을 억제하였다.

이상의 결과로부터 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 川練子는 NADPH oxidase의 발현을 감소시킴으로써 AP-1/MAPK 경로를 억제하였으며, tight junction 관련 단백질의 발현을 조절하여 식도 점막의 손상을 억제하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 (No. 2017R1A2B2006858 and No. 2019R1I1A1A01064068)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Lee JA, Shin MR, Lee JH, Roh SS. Effect of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus Mixture on Esophageal Mucosa in Chronic Reflux Esophagitis. *Kor J Pharmacogn.* 2020 ; 51(4) : 349-59.
2. Nam HH, Ryu SM, Yang SG, Kim WJ, Moon BC, Seo YS. The Anti-inflammatory Effects of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) in Reflux Esophagitis Model. *Korean J Org Agric.* 2021 ; 29(1) : 85-96.
3. Lee JA, Park HJ, Kim SH, Kim MJ, Kim KJ, Shin MR, Roh SS. Evaluation of Evodiae Fructus Extract on the Chronic Acid Reflux Esophagitis in Rats. *Kor J Herbol.* 2019 ; 34(2) : 15-23.
4. Nam HH, Seo YS, Lee JH, Seo YH, Yang SG, Moon BC, Kim WJ, Nan L, Choo BK, Kim JS. Effect on rat model of reflux esophagitis treated with *Charybdis japonica* extract. *Kor J Herbol.* 2020 ; 35(4) : 17-23.
5. Jang MY, Lim SW. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *Korean J Orient Int Med.* 2013 ; 34(4) : 362-74.
6. Lee JY, Seo BI, Roh SS. Improving effect of *Artemisiae Capillaris Herba* extract in reflux esophagitis rats. *Kor J Herbol.* 2016 ; 31(6) : 37-44.
7. Lee JA, Shin MR, Lee SN, Park SA, Park HJ. Effect of a Mixture of *Rhei Rhizoma* and *Scutellariae Radix* Extract on Acute Reflux Esophagitis Rats. *Kor J Herbol.* 2020 ; 35(6) : 43-53.
8. Lee HA, Kim OJ. In vitro and in vivo antibacterial activity of *Meliae fructus* extract against *Helicobacter pylori*. *Korean J Vet Res.* 2012 ; 52(2) : 105-13.
9. Kim OK, Leem HJ, Je JM, Lee GM. The Effect of *Meliae toosendan fructus* Ethanol Extract on Blood

- Glucose, Lipid metabolism, Carbohydrate Methabolism Related Enzyme Activities and Antioxidative Effect in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J of Korean Oil Chemists' Soc.* 2014 ; 31(2) : 277-84.
10. Yi HS, Heo SK, Yun HJ, Kim BW, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Melia Toosendan in Mouse Macrophage Cells. *Kor J Herbol.* 2008 ; 23(4) : 121-34.
 11. Yoon WK, Kim DC. Toosendan Fructus Induces Apoptotic Cell Death in MCF-7 Cell, Via the Inhibition of Bcl-2 Expression. *J Korean Obstet Gynecol.* 2008 ; 21(3) : 18-33.
 12. Shin MR, Lee JA, Kim MJ, An HJ, Roh SS. The protective effect of Areca Semen and Toosendan Fructus mixture in a chronic model of reflux esophagitis. *Kor J Herbol.* 2020 ; 35(1) : 57-68.
 13. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. *J Biol Chem.* 1912 ; 12 : 239-43.
 14. 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. *J Sci Food Agric.* 1994 ; 64 : 155-61.
 15. 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.
 16. Shin MH, Kim ES, Lee YS. Suppressive Effects of Ulmi Pumilae Cortex Extracts on the Reflux Esophagitis in Rat. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2016 ; 30(4) : 257-65.
 17. Lee SH, Song YS, Lee SY, Ki m SY, Ko KS. Protective Effects of Akebia quinata Fruit Extract on Acute Alcohol-induced Hepatotoxicity in Mice. *Korean J Food Sci Technol.* 2014 ; 46(5) : 622-9.
 18. Lee SS. Role of Reactive Oxygen Species in Allergic Rhinitis. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* 2012 ; 55 : 541-5.
 19. Jeon SH, Kim BK. The protective effects of polyphenol-rich black chokeberry against oxidative stress and inflammation. *Korean J Food Sci Technol.* 2020 ; 52(2) : 138-43.
 20. Kim MK, Kim DY. Anti-inflammatory effect of barley leaf ethanol extract in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage. *Korean J Food Preserv.* 2015 ; 22(5) : 735-43.
 21. Yoon JH, Lee WJ. The Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in the Induction of MUC 8 Gene Expression in Normal Human Nasal Epithelial Cells. *Korean J Otolaryngol.* 2000 ; 43 : 719-23.
 22. Kim TY. Effect of Gagam-Danguieumja through Regulation of MAPK on LPS-Induced Inflammation in RAW 264.7 Cells. *Korean J Orient Int Med.* 2013 ; 34(4) : 339-48.
 23. Kim JS, Jang HS. The Expression Pattern of the Tight Junction Protein Occludin in the Epidermal Context When Comparing Various Physical Samples. *Korean J Clin Lab Sci.* 2015 ; 47(4) : 267-72.
 24. Shin DY, Yoon MK, Choi YW, Gweon OC, Kim JI, Choi TH, Choi YH. Effects of Aged Black Garlic Extracts on the Tight Junction Permeability and Cell Invasion in Human Gastric Cancer Cells. *Kor J Life Sci.* 2010 ; 20(4) : 528-34.