

吳茱萸 물 추출물이 급성역류성 식도염에 미치는 효과

김대준, 노성수^{1*}

대구한의대학교 한의과대학 한방내과학, 1 : 한의과대학 본초약리학교실

Effect on Acute reflux Esophagitis by Evodiae Fructus Aquous Extract

Dae Jun Kim, Seong Soo Roh^{1*}

Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University,
1 : Department of Herbology

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate effect of evodiae fructus on acute reflux esophagitis rat induced by pylorus and forestomach ligation operation.

Methods : Twenty-four laboratory rats were divided four groups and each group had six rats : normal intact group, acute reflux esophagitis (RE) control group, two experiment RE group treated extract of evodiae fructus 600 mg/kg (EEF600) and 300 mg/kg (EEF300). All rats was fasted for 18 hr but free water, we induced RE by pylorus and forestomach ligation operation. Intact group and RE control group rats were orally administered a distilled water and two experiment groups were orally administered with EEF 600 mg/5ml/kg and 300 mg/5ml/kg. One hour after, rats were anesthetized, intact group was cut the abdomen open and sutured with 2.0 silk thread, RE control group and EEF group were cut the abdomen open, ligated pyloric canal and forestomach with 2.0 silk thread and sutured. Six hour after the operation, rats were sacrificed, collected bloods in the abdominal vein, dissected a esophagus and stomach. The stomach was washed a 1 ml PBS and the esophagus was cut longitudinally and pictured a inner mucosa area to research damages in esophagus.

Results : The esophagic tissue damage percentage of reflux esophagitis rat was increased compared to that of normal intact group. But esophagic damage percentage of EEF 600 were significantly decreased compared to that of RE control group. But there was no difference on gastric juice pH between control RE, alpha-tocopherol administration rat group and EEF administration rat group. In esophagus of RE control rat, gastric damage occurred severely and injury percentage of mucosa were increased, but EEF 600 mucous inflammatory damage percentage was significantly compared to that of RE control group. Proinflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in serum on RE control group were markedly grew than those of intact rat, those of vehicle group treated with EEF 600 and EEF 300 were remarkably decreased compared to production of proinflammatory cytokine of RE control group. In microscopic observation, intact group rat had no hyperemia, mucous injury and exclusion, ulcer and edema. But it could showed mucosa damages, submucosa edema and ulcer in RE control. However, administration of EEF 600 and EEF 300 made esophagus have less inflammation and injury by gastric acid.

Conclusions : The results suggest that antiinflammatory Effect of EEF could attenuate the severity of reflux esophagitis and prevent the esophageal mucosal damage, and validate its therapeutic use in esophageal reflux disease.

Key words : Evodiae Fructus, reflux esophagitis, TNF-alpha, IL-1beta, Pylorus and forestomach ligation

*교신저자 : 노성수, 대구한의대학교 본초약리학교실.
· Tel : 053-819-1459, · Fax : 053-819-1752, · E-mail : ddede@dhu.ac.kr.
· 접수 : 2011년 12월 17일 · 수정 : 2012년 1월 5일 · 채택 : 2012년 1월 13일

서론

吳茱萸는 운향과에 속한 낙엽관목 혹은 소교목인 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth., 石虎 *E. rutaecarpa* Benth var. *officinalis* Hunang 혹은 毛脈吳茱萸 *E. rutaecarpa* Benth var. *bodinieri* Huang의 미성숙 과실로 8~10월에 녹색색이 되고 심피가 갈라지기 전에 채취하여 微火로 焙乾한다¹⁾.

性味는 熱하고 辛苦하며 有毒하여 肝·脾·胃·腎經에 귀경하여 散寒止痛, 降逆止嘔, 助陽止瀉의 效能으로 厥陰頭痛, 寒疝腹痛, 寒濕脚氣, 經行腹痛, 脘腹脹痛, 嘔吐炭酸, 五更泄瀉, 外治口瘡, 高血壓에 응용되고 있다¹⁾. 특히 肝胃不和로 인한 嘔吐炭酸에 사용되는데, 吞酸 증상은 바로 위산이 역류되는 현상에 가까운 증상으로 판단된다.

吳茱萸의 화학성분으로 항암효능이 있는 evodimine²⁾, 항염작용이 있는 dehydroevodiamine, evodiamine, rutaecarpine, synephrine³⁾, 8종의 quinolone alkaloids⁴⁾ (1-methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone, 1-methyl-2-[(Z)-6-undecenyl]-4(1H)-quinolone, 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone, evocarpine, 1-methyl-2-[(6Z,9Z)-6,9-pentadecadienyl]-4(1H)-quinolone, dihydroevocarpine, 1-methyl-2-[(Z)-10-pentadecenyl]-4(1H)-quinolone and 1-methyl-2-[(Z)-6-pentadecenyl]-4(1H)-quinolone), wuzhuyuamide-I, 5-hydroxyrutaecarpine, 14-formyldihydroxyrutaecarpine⁵⁾ 등이 분석되어 보고되었다.

吳茱萸의 약리효능으로 소화기능에 미치는 실험결과, 물 추출물을 생쥐에 복강주사하면 소화관내 charcoal의 통과를 저해한다⁶⁾. 위장관 전이시간 시간연장 효과는 evodiamine의 혈장 CCK 농도 증가와 연관되어 있으며 특히 CCK1 receptor를 활성화시키는 것으로 보고되어 있다⁷⁾. 진통작용이 있으며 이는 감각신경 탈감작에 의한 것으로 보고되어 있으며⁸⁾, 말초혈관 확장을 통해 혈압을 강하시키며^{9,10)}, 자궁수축 효과¹¹⁾, 항암작용¹²⁾, 치매 억제 효과¹³⁾, 면역억제효과¹⁴⁾, 지사작용¹⁵⁾, 항알러지 효과¹⁶⁾, 항산화 효능을 통한 알코올성 숙취 제거 및 알코올 대사 촉진¹⁷⁾ 및 항산화 효능을 통한 피부 콜라겐 파괴로 생성되는 피부주름을 개선시킨다는¹⁸⁾ 연구가 진행되었다.

그러나 아직까지 급성 역류성 식도염에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 보이지 않으며, 위산 역류로 인한 식도점막의 보호기작으로 항산화 효과가 보고되었는데, 吳茱萸의 항산화 효능과 본초학적 효능인 吞酸 증상에 응용되는 측면에서 유효할 것으로 판단되었다. 이에 날문과 대만 부위를 결찰시켜 역류성 식도염을 유발시킨 랫트에 미치는 영향을 알아보고자 위분비량, 위산 pH, 위와 식도의 점막 손상여부, 혈청 내 염증성 싸이토카인의 분석결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 SLC (Japan)에서 분양받은 7주령의 랫트를

2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2℃, 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 갈습 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 시료

본 실험에 사용한 吳茱萸 (*Evodiae Fructus*)는 옴니허브 (영천) 제약회사에서 구입한 것을 대구한의대학교 한의과대학 본초학교실에서 관능검사상 약전에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

吳茱萸 (*Evodiae Fructus*) 200 g에 증류수 1,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 감압 추출장치로 농축하였다. 위 과정을 3회 반복하였고, 3회 농축한 것을 모아서 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 吳茱萸 추출물 (38 g, extract of *Evodiae Fructus*)을 제조하였으며 수율은 19%였다. 이를 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 증류수에 희석하여 실험시에 사용하였다.

2) 역류성 식도염 랫트 모델

실험동물인 7주령의 랫트는 일본 SLC에서 공급 받아 실험 당일까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., Korea)와 물을 충분히 공급하고 온도 22 ± 2℃, 습도 40 ± 5%, 12시간-12시간 (light-dark cycle)의 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 수술 전 24시간 절식한 후, Zoletile mixture (Vibrac, France)을 25 mg/kg 복강주사하여 마취하였다. 마취한 뒤, 2센티 정도 개복을 하였고, 대만부위를 실크실로 묶었으며, 인접한 날문부위를 다른 실크실로 묶었다. 수술 후 봉합을 하고 회복 챔버에 머무르게 한 후 케이지로 이동시켰다.

3) 시료 투여

랫트는 6마리씩을 한 군으로 하여 개복수술만 하고 봉합한 정상군 (Intact), 치료제를 처리하지 않은 대조군 (reflux esophagitis control; RE), α-tocopherol (30 mg/kg) 처리군 (PC), 吳茱萸 추출물 투여군 (Extract of *evodiae fructus*; EEF 600 mg/kg, 300 mg/kg)으로 나누어 약물 투여를 시작하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 수술 전 1회 각각 매일 경구 투여하였고, α-tocopherol군은 α-tocopherol을 30mg/kg농도로 corn oil(Sigma, USA), EEF 처리군은 수술 1시간 전 5 ml/kg 용량으로 구강 투여하였다.

4) 위내용물 양 (Gastric volume)의 측정

유문 및 전위부 결찰 수술 6시간 후, 정상 대조군을 제외한 모든 실험동물에서 결찰한 위부분을 적출한 다음 PBS 1

ml로 위내부를 세척하였으며, 이를 수집하여 5분간 2000 g에서 원심분리한 다음, 부피를 측정하였다.

5) 위산의 pH 측정

수집된 위 내용물은 pH paper (MFRS Toshniwal, instrument manufacturing limited, Ajmer, India)를 이용하여 측정하였다. 측정지를 뽑아서 위 내용물이 담긴 튜브에 살짝 담근 다음 빼내어 측정색상표와 대조하여 pH값을 측정하였다.

6) 위점막 및 식도점막 손상 측정

유문 및 전위부 결찰 수술 6시간 후, 식도를 분리하였고 수술용 가위를 이용하여 식도를 세로로 절단하였다. 절단된 식도 내부는 적당량의 PBS로 세척한 후 깨끗한 부직포 위에 전개했으며 이를 광학 디지털 카메라 (Canon, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., 한국) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정하였다.

7) 혈청 내 싸이토카인 측정

부검시, 복부정맥에서 5 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취하였으며, 이를 15 ml 튜브에 옮긴 다음 원심분리기 (한일, 한국)를 이용하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리한 튜브의 상층액은 맑은 옅은 황색으로 이를 에펜돌프 마이크로 피펫을 이용하여 1.5 ml 마이크로 튜브에 옮겨 담은 후 -80℃ 냉동 보관하였다. 측정된 싸이토카인은 TNF- α , IL-1 β 로, 분석은 Multi-Analyte ELISArray® Kit (Milipore (Rockford, IL, USA)를 이용하여 실험매뉴얼에 따라 수행하였으며, 분석 기기는 luminex (Awareness Technology Inc., Pal City, FL, USA)를 이용하여 490 nm 파장으로 측정하였다.

8) 조직학적 분석

랫트에서 위, 식도를 분리하였으며 이를 10% phosphate-buffered formalin에서 하루 이상 고정하였다. 12시간 이상 흐르는 물에서 formalin을 세척한 후 70% ethanol에서 1시간, 80% ethanol에서 1시간, 90% ethanol에서 1시간, 100% ethanol에서 1시간씩 단계적으로 탈수시켰다. Xylen에 1시간씩 3번의 투명과정 후 paraffin에 1시간씩 2번 침투과정을 실시한다. 포매과정(embedding)을 거쳐 약 3 μ m의 두께로 박절 (paraffin-section)하여 slide 위에 조직을 얹고 건조시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. Slide의 물기를 없애고 mounting medium (Sigma, MO, USA)을 떨어뜨린 후 조직과 cover glass 주위에 공기가 생기지 않도록 주의하면서 cover glass를 덮어 영구보존할 수 있도록 하였다. 조직의 사진촬영과 위 식도 점막의 손상 분석은 I-Solution lite 프로그램 (Innerview Co., 한국)을 이용하였다.

9) 통계처리

모든 수치는 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one

way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검증을 실시하여 실험군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U test 를 실시하여 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 평가하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 위 내용물 양 측정

역류성 식도염 수술을 시행 한 후, 증류수만 투여한 대조군은 2.83 \pm 1.51 ml/kg이었고, alpha-tocopherol 투여군은 2.04 \pm 0.42 ml/kg, EEF 600 mg/kg 투여군은 2.96 \pm 0.61 ml/kg, EEF 300 mg/kg 투여군은 2.55 \pm 0.35 ml/kg 으로 각각 감소되었다. 따라서 항산화제인 alpha-tocopherol 투여군의 위 내용물 양은 증류수만 투여한 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고, EEF 투여군은 유의성 있는 차이가 없었다 (Fig. 1).

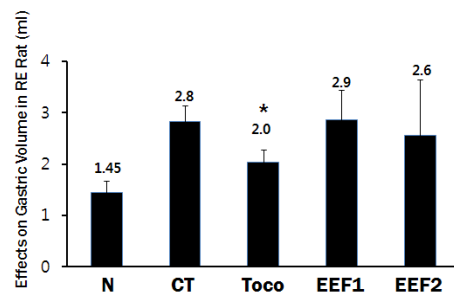


Fig. 1. Effects on gastric volume in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We washed a stomach with 1 ml PBS by micropipet and the gastric contents were collected. Gastric contents were centrifuged 3000 rpm for 5 min, examined volumes of gastric contents. N : Normal intact rats. CT : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). Toco : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats ; * p<0.05 compared to control rat group.

2. 위산 pH 측정

역류성 식도염 수술을 시행 한 후, 증류수만 투여한 대조군의 위산 pH는 3.13 \pm 0.35이었고, alpha-tocopherol 투여군은 3.29 \pm 0.49, EEF 600 mg/kg 투여군은 3.33 \pm 0.38, EEF 300 mg/kg 투여군은 3.83 \pm 0.35로 유의성 있는 변화가 없었다 (Fig. 2).

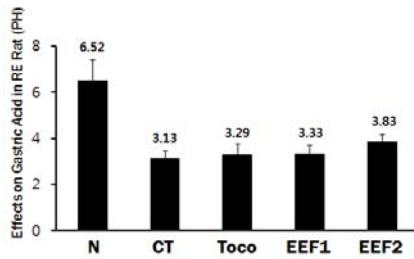


Fig. 2. Effect on gastric acid pH in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We washed a stomach with 1 ml PBS by micropipet and the gastric contents were collected. Gastric contents were centrifuged 3000 rpm for 5 min, examined volumes of gastric contents. The pH of collected gastric juice was also measured using pH paper (MFRS Toshniwal, instrument manufacturing limited, Ajmer, India). We measured a volume of gastric juice obtained from rats of each groups and an aliquot was used for determination of acid concentration. N : Normal intact rats. CT : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). Toco : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats ; * p(0.05 compared to control RE rat group).

3. 식도 조직 손상도 측정

역류성 식도염 수술을 시행하지 않는 정상랫트의 식도에 대한 육안적 손상 검사결과 점막의 손상이 발견되지 않았으나, 수술 후 증류수를 구강투여한 대조군은 식도 점막이 위산에 의해 손상을 받아 발적, 충혈, 염증이 발생되었으며 손상부위 비율이 $54.6 \pm 11.4\%$ 로 분석되었으며, alpha-tocopherol을 구강투여한 실험군은 $35.2 \pm 9.5\%$ 로 유의성있게 감소되었으며, EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 각각 39.2 ± 9.8 , 37.3 ± 13.9 로 600 mg/kg 투약군에서 유의성있게 손상정도가 감소되었다 (Fig. 3, Fig. 4).

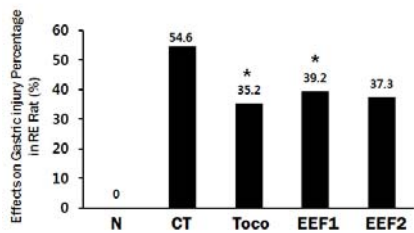


Fig. 3. Effect on gastric injury in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We collected a stomach and esophagus, took a picture with 1 ml PBS by micropipet and the gastric contents were collected. Gastric contents were centrifuged 3000 rpm for 5 min, examined volumes of gastric contents. The pH of collected gastric juice was also measured using pH paper (MFRS Toshniwal, instrument manufacturing limited, Ajmer, India). We measured a volume of gastric juice obtained from rats of each groups and an aliquot was used for determination of acid concentration. N : Normal intact rats. C : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). T : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2 : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats ; * p(0.05 compared to control RE rat group).

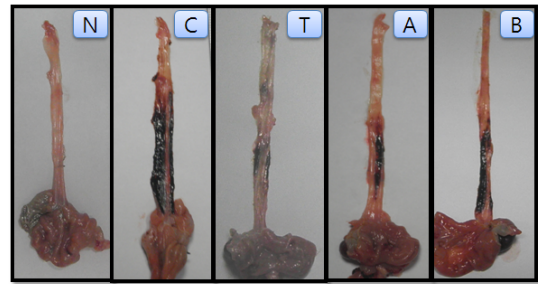


Fig. 4. Effect of gastric injury in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. N : Normal intact rats, C : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water, T : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). A : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). B : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg).

4. 식도점막의 조직학적 분석

식도 조직슬라이드를 현미경으로 분석한 결과, 정상군의 식도조직은 점막층, 점막하층, 근육층의 손상이 발생되지 않았으나 RE대조군의 식도점막층은 거의 탈락이 되어 있었고, 점막하층의 출혈과 부종이 발견되었다. 그러나 alpha-tocopherol약물투여군과 EEF 구강투여군에서는 대조군에 비해 점막층의 탈락률이 현저히 감소되었다 (Fig. 5).

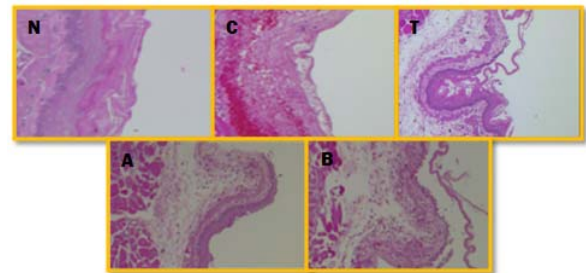


Fig. 5. Effect on esophageal mucosa injury in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We collected a stomach and esophagus, took a picture with 1 ml PBS by micropipet and the gastric contents were collected. Gastric contents were centrifuged 3000 rpm for 5 min, examined volumes of gastric contents. The pH of collected gastric juice was also measured using pH paper (MFRS Toshniwal, instrument manufacturing limited, Ajmer, India). We measured a volume of gastric juice obtained from rats of each groups and an aliquot was used for determination of acid concentration. N : Normal intact rats, C : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). T : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). A : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). B : Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg).

5. 위 점막의 조직학적 분석

위 조직 슬라이드를 이미지로 캡처한 다음 분석할 결과, 정상군의 위 점막 손상은 보이지 않았고, 대조군의 위 점막에는 출혈이 진행된 것을 확인하였다. 그러나 alpha-tocopherol 약물과 EEF를 투여한 실험군의 출혈 정도는 대조군에 현저히 감소되었다 (Fig. 6)

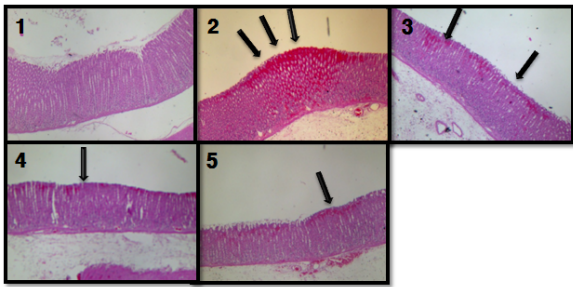


Fig. 6. Effect on gastric damage in reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. 1: Normal intact rats. 2: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). 3: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). 4: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). 5: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg).

6. 혈청 내 TNF- α 분석

부검시 복부 정맥에서 혈액을 채취하여 원심 분리 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 이용하여 TNF- α ELISA 실험 분석 결과, 정상군의 혈청 내 TNF- α 분비량은 0.4 ± 0.2 pg/ml이었으며, RE 대조군의 TNF- α 발현량은 13.4 ± 0.8 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol 약물 투여군과 EEF를 구강투여한 실험군은 TNF- α 의 발현량이 각각 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 7)

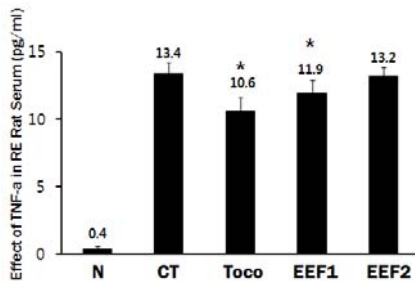


Fig. 7. Effect on tumor necrosis factor(TNF)- α in serum of reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We collected hole blood from abdominal vein by 5 ml syringe at sacrifice. Collected blood was centrifuged at 3,000rpm for 15 min. TNF- α cytokine was measured by commercial ELISA kit as manual protocol, and analyzed in 490 nm of luminex device. N: Normal intact rats. CT: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). Toco: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats; * p<0.05 compared to control RE rat group.

7. 혈청 내 IL-1beta

혈청 내 IL-1beta 분비량 측정 결과, 정상군의 혈청 내 IL-1beta 분비량은 26 ± 2.4 pg/ml이었으며, RE 대조군의 IL-1beta 발현량은 53.8 ± 4.6 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol 약물 투여군은 IL-1beta 분비량은 37.1 ± 3 pg/ml로 유의성있게 대조군보다 감소되었으

며, EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군은 각각 43.5 ± 3.3 pg/ml, 47.3 ± 3.4 pg/ml로 600 mg/kg 투약군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 8).

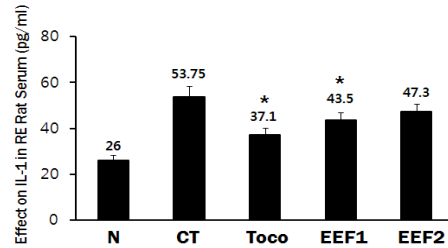


Fig. 8. Effect on interleukin (IL)-1beta in serum of reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We collected hole blood from abdominal vein by 5 ml syringe at sacrifice. Collected blood was centrifuged at 3,000rpm for 15 min. IL-1beta cytokine was measured by commercial ELISA kit as manual protocol, and analyzed in 490 nm of luminex device. N: Normal intact rats. CT: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). Toco: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats; * p<0.05 compared to control RE rat group.

8. 혈청 내 IL-6

혈청 내 IL-6 분비량 측정 결과, 정상군의 혈청 내 IL-6 분비량은 14.9 ± 1.9 pg/ml이었으며, RE 대조군의 IL-6 발현량은 40.2 ± 3.2 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol 약물 투여군은 IL-6 분비량은 36.3 ± 4.1 pg/ml로 유의성있게 대조군보다 감소되었으며, EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군의 IL-6 분비량은 각각 37.2 ± 3.8 pg/ml, 39.0 ± 3.4 pg/ml로 600 mg/kg 투약군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 9).

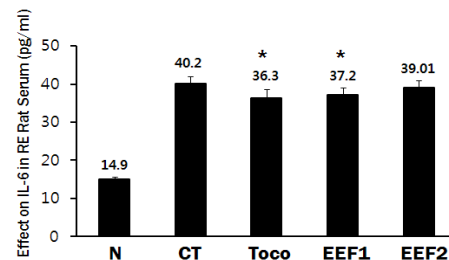


Fig. 9. Effect on interleukin (IL)-6 in serum of reflux esophagitis rat treated with alpha-tocopherol and extract of evodiae fructus. We collected hole blood from abdominal vein by 5 ml syringe at sacrifice. Collected blood was centrifuged at 3,000rpm for 15 min. IL-6 cytokine was measured by commercial ELISA kit as manual protocol, and analyzed in 490 nm of luminex device. N: Normal intact rats. CT: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with distilled water (30 mg/kg). Toco: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with α -tocopherol (30 mg/kg). EEF1: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (600 mg/kg). EEF2: Control rat operated pylorus and forestomach ligation treated with extract of evodiae fructus (300 mg/kg). Values are expressed Mean \pm SD of six rats; * p<0.05 compared to control RE rat group.

결론 및 고찰

위식도역류 질환 (Gastroesophageal reflux disease ; GERD)는 위의 내용물이 들문을 넘어 식도 내로 역류하여 위산에 의한 강한 산성이 식도 점막을 손상시켜 역류식도염이 발생하는 것이다. 주된 증상은 가슴쓰림이며 가슴을 마치 얻어 맞은 것 같다고 표현하기도 한다. 이비인후과 영역에서는 인후두부의 이상감각이나 목쉰소리, 호흡기 영역에서는 천식 형태의 발작이나 원인불명의 만성 기침이 GERD의 증상으로 나타난다¹⁹⁾.

발병원인으로 식도하부 조임근 (LES)의 기능저하가 가장 큰 원인이다. 그 밖에 식도의 꿈틀운동 저하로 인해 식도내 산성물질이 정체하게 되어 식도점막을 손상시키거나 위산분비 증가로 강한 산성 물질이 점막에 대한 자극을 증가시키기도 하며, 위의 내용물이 정체되지 않고 원활하게 작은창자로 보내진다면 식도로 역류하는 기회가 적어지므로 위의 꿈틀운동 저하로 인해 GERD 발병 가능성이 높다. 또한 중력에 의해 옆으로 누울 경우, 취침시에 역류가 빈번하게 발생하며 비만, 변비로 인한 복압의 상승도 원인이 될 수 있다.

역류에 대한 진단검사는 식도내압측정과 24hrs ambulatory pH monitoring 검사가 있다. 식도내압측정으로 LES 압력의 저하를 확인하고, 24hrs ambulatory pH monitoring으로 위 내용물이 역류하는지 알 수 있다. 식도 내시경으로 식도점막에 발적, 미란, 궤양이 관찰되면 역류성 식도염을 의심할 수 있다¹⁹⁾.

치료는 첫째로 생활습관의 개선으로, 금연금주, 취침 전 음식섭취 금지, 베개를 높이고, 변비 비만을 해소하거나 혈압약, 심장약을 확인하여 복용해야 하는데, 이는 칼슘길항제와 nitrite제는 LES pressure를 내려주기 때문이다. 둘째로 약물요법이며 위산분비를 억제하기 위해 H₂-수용체 차단제, 양성자펌프 억제제 (Proton pump inhibitor ; PPI)를 복용하며 항콜린제는 위산분비를 억제시키나 LES압력을 저하시키므로 사용하지 않는다. 셋째 외과요법으로 Nissen fundoplication 수술을 실시한다. 이것은 식도 하부 주변에 위바닥 부위를 전체적으로 휘감아 붙여 봉합하는 방법이다¹⁹⁾.

H₂ 차단제는 cimetidine, ranitidine, famotidine, nizatidine을 사용하는 것이 증상개선에 효과적이며, 일반적으로 PPI 투여가 증상개선에 보다 효과적으로 omeprazole, lansoprazole, pantoprazole, esomeprazole, rabeprazole을 8주간 투여하게 되면 미란성 식도염 환자의 약 90%에서 치유가 된다. 위식도 역류질환은 만성 질환이므로 장기간 유지요법이 가끔 필요하며 치료를 중지했을 경우 약 80%까지 증상이 재발한다. PPI의 부작용은 경미한 것으로 알려져 있으며 적극적인 산분비억제는 고가스트린혈증을 유발할 수 있으나, 유암종 혹은 가스트린종의 발생을 증가시키지 않는다. PPI는 비타민B12와 칼슘의 흡수를 저해시키고 장기간의 PPI 치료는 골반골절의 위험성을 증가시킨다²⁰⁾.

吳茱萸에 대한 기존연구로 전 등²¹⁾이 항균작용에 대한 연구를, 정 등²²⁾이 고혈압 동물 모델에 미치는 영향을, 김 등²³⁾이 자율발고혈압 랫트에 미치는 영향을, 이²⁴⁾가 우울증에 미치는 연구를, 서 등²⁵⁾이 吳茱萸의 독성에 관한 서지학적 연구를, 노 등²⁶⁾이 吳茱萸 방향성분의 약리적 효능 연구를, 강²⁷⁾이 갑상선기능저하 동물 모델에 미치는 영향에 대한 연구

를, 이²⁸⁾가 吳茱萸의 항산화 효능 연구를, 이²⁹⁾가 吳茱萸의 항염증에 대한 연구를, 차³⁰⁾가 吳茱萸약침의 항암효능에 대한 연구를 발표하였다. 그러나 아직까지 吳茱萸가 급성 역류성 식도염에 미치는 영향에 대한 연구는 수행되지 않았다. 특히 이²⁹⁾가 발표한 연구는 오수유메탄을 분획이 혈관내피세포에 미치는 항염증 작용을 발표한 것으로 본 연구의 급성역류성 식도염에 대한 오수유의 항염증 기전 연구와는 다르다.

임상적으로 응용하기 위한 치료약물 연구로 식도염에 염증을 완화시켜줄 수 있는 약물을 사용할 수 있으며, 이에 대한 항염증 효능을 가진 약물에 대한 연구가 진행되고 있다.

이에 저자는 항산화 효능과 항염증 작용이 있는 吳茱萸가 급성 역류성 식도염에 미치는 약리효능을 알아보기 위해, 동물 모델을 이용하여 그 영향을 알아보고자 하였다.

Gastric volumn 측정 결과, intact 랫트군의 gastric volumn은 1.3±0.3 ml이고, RE 대조군의 gastric volumn은 3±0.3 ml로 유의성 있게 증가되었으며, alpha-tocopherol 투여군의 gastric volumn은 2.2±0.3 ml로 RE 대조군의 gastric volumn에 비해 유의성 있게 감소되었다. 그러나 EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군의 gastric volumn은 각각 2.2±0.6 ml, 2.6±1.3 ml로 대조군보다 감소되었으나 유의성은 없었다 (Fig. 1).

위산 pH 측정 결과, intact 랫트군의 gastric acid의 pH는 6.5±0.9이고, RE 대조군의 gastric acid의 pH는 3.1±0.3로 유의성있게 증가되었으며, alpha-tocopherol 투여군의 gastric acid pH는 3.3±0.5로 RE 대조군과 유의성 있는 차이는 없었다. 또한 EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군의 gastric acid pH는 각각 3.3±0.4, 3.1±0.4로 대조군, alpha-tocopherol 투여군과 유의성있는 차이가 없었다 (Fig. 2).

위 실험 결과 약물투여군과 대조군의 gastric volumn과 gastric acid pH가 별다른 차이점이 보이지 않았다. 이는 약물 투여로 인해 위 분비가 저해되지 않는다는 것을 의미하며 아울러 위산의 pH 변화가 없기 때문에 위산이 역류하여 위와 식도 자극에 약물투여군과 대조군이 별다른 차이가 없다는 것을 의미한다.

부검 후 식도와 위를 적출하고, 식도는 세로로 수술용 가위를 이용하여 절단하였다. 절개한 식도를 적당량의 생리식염수로 세척하고 깨끗한 부직포위에 전개한 다음 식도 내면을 펼치고 광학디지털카메라로 촬영하였다. 촬영된 사진은 이미지 분석 프로그램을 이용하여 식도의 전체 면적(mm²)과 염증, 발적, 충혈이 일어난 부위 (mm²)를 측정하였다. 분석은 전체 식도면적 중 병변부위의 면적에 대한 비율을 백분율로 분석하였다.

식도의 육안적 관찰 분석 결과, intact 정상군의 랫트 식도는 점막의 발적, 염증, 궤양 등이 유발되지 않았다. RE 대조군의 경우 식도의 손상이 심하기 진행(55±11.4%)되었으며, alpha-tocopherol약물인 alpha-tocopherol은 35±9.4%, EEF 추출물을 600 mg/kg과 300 mg/kg으로 구강투여한 실험군은 각각 39.1±9.7%, 37±13.9%로 유의성있게 식도 손상이 감소되었다 (Fig. 3, Fig. 4). 이는 위산이 대조군과 약물 투여군의 pH가 같음에도 불구하고 EEF 투여로 인해 식도의 점막 손상 감소되었음을 보여준다. 위산에 의한 식도 염

증 보호 효과는 항산화, 항염증으로 유추할 수 있으며, 이를 알아보기 위해 혈청 내 염증성 사이토카인을 측정하였다.

최근 연구에 의하면 만성 역류성 식도 점막 염증에서 COX-2 단백질 발현이 증가되며, 이는 혈청 내 IL-1beta와 TNF-alpha와 같은 proinflammatory cytokines의 증가가 동반된다고 하였다^{31,32}.

혈청 내 TNF-alpha 분비량 측정 결과, 정상군의 혈청 내 TNF-alpha 분비량은 0.4 ± 0.2 pg/ml이었으며, RE 대조군의 TNF-alpha 발현량은 13.4 ± 0.8 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol약물 투여군과 EEF를 구강투여한 실험군은 각각 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 7).

IL-1은 국소적으로나 전신적으로 표적세포를 다른 사이토카인과 함께 활성화시키며 거의 대부분 열, 염증과 혈액동학적 쇼크를 유발시킨다^{33,34}. IL-1은 중성구와 단핵구 chemotatic 사이토카인 (IL-8, IL-9)의 유전자 발현과 대식세포 염증성 단백질의 유전자 발현을 증가시킨다³⁵. 이어서 중성구의 염증조직으로 이주를 자극하게 된다.

혈청 내 IL-1beta 분비량 측정 결과, 정상군의 혈청 내 IL-1beta 분비량은 26 ± 2.4 pg/ml이었으며, RE 대조군의 IL-1beta 발현량은 53.8 ± 4.6 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol약물 투여군은 IL-1beta 분비량은 37.1 ± 3 pg/ml로 유의성있게 대조군보다 감소되었으며, EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군은 각각 43.5 ± 3.3 pg/ml, 47.3 ± 3.4 pg/ml로 600 mg/kg 투약군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 8).

TNF-alpha와 IL-6는 수술로 유발된 식도염에서 2배 이상의 증가가 관찰되며, 급성 역류성 식도염의 염증이 억제되면 혈청 내 분비량이 유의성있게 감소된다. IL-6는 전염증성 사이토카인이면서 항염증성 사이토카인이 된다. 발열과 급성기의 반응의 가장 중요한 매개체 중에 하나로, 이는 T 세포와 대식세포에서 면역반응에 의해 분비되는데, 염증 동안이나 외상후에 분비되며 떠나 다른 조직을 염증으로 유도한다.

혈청 내 IL-6 분비량 측정 결과, 정상군의 혈청 내 IL-6 분비량은 14.9 ± 0.7 pg/ml이었으며, RE 대조군의 IL-6 발현량은 40.2 ± 1.9 pg/ml로 유의성있게 증가되었다. 반면에 alpha-tocopherol약물 투여군의 IL-1beta 분비량은 36.3 ± 1.6 pg/ml로 유의성있게 대조군보다 감소되었으며, EEF를 600 mg/kg과 300 mg/kg 농도로 구강투여한 실험군은 각각 37.2 ± 1.6 pg/ml, 39 ± 3.4 pg/ml로 600 mg/kg 투약군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 9).

위 조직의 손상 여부를 알아보고자 현미경 이미지 분석을 실시한 결과, 정상군의 위점막 손상은 전혀 보이지 않았으나, 급성적으로 역류성 식도염을 유발시킨 대조군은 점막층의 출혈을 볼 수 있었다. 이는 위산에 의한 위보호가 약해져서 손상을 가져온 것으로 판단된다(Fig. 5, Fig. 6). 그러나 alpha-tocopherol약물을 구강투여한 실험군과 EEF를 구강투여한 실험군의 위점막의 출혈 정도가 약해진 것을 볼 수 있었다. 이는 대조군의 위산 pH와 약물투여군의 pH 차이가 없었기 때문에 (Fig. 2), 약물에 의한 위보호 효과가 증진되었다고 판단되며 mucin의 분비량, hexose 발현량, sialic acid 분석을 통해 이에 대한 연구는 차후에 진행될 필요가 있다.

감사의 말씀

이 논문 또는 저서는 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 2011-0030124)

참고문헌

1. The whole country a college of Oriental medicine. The joint textbook publish commission compilation. Herbalogy. seoul : younglimsa. 2007 : 379-380.
2. 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.
3. 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.
4. Chuang WC, Chu CY, Sheu SJ. Determination of the alkaloids in *Evodiae Fructus* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996 ; 727(2) : 317-323.
5. Zhao MY and Yang XW. Optimization of the Extraction Conditions and Simultaneous Quantification by RP-LC of Six Alkaloids in *Evodiae Fructus*. *Chromatographia*. 2008 ; 67(7-8) : 543-550.
6. Yu LL, Liao JF, Chen CF. Effect of the crude extract of *Evodiae Fructus* on the intestinal transit in mice. *Planta Medica*. 1994 ; 60 : 308-312.
7. Wu CL, Hung CR, Chang FY, Lin LC, Pau KY, Wang PS. Effect of evodiamine on gastrointestinal motility in male rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2002 ; 457 : 169-176.
8. Kobayashi Y. The nociceptive and anti-nociceptive Effect of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa* in mice. *Planta Med*. 2003 ; 69 : 425-428.
9. Wong KK. Lack of calcium-antagonist activity of dehydroevodiamine on the chronotropic and ionotropic activities of mouse isolated atria. *Planta Medica*. 1996 ; 62 : 246-249.
10. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Shamb Andrew YC, Chen Chieh-Fu. The mechanism of the vasodilator Effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *European Journal of Pharmacology*. 1994 ; 257(1-2) : 59-66.
11. King CL, Kong YC, Wong NS, Yeung HW, Fong HS, Sankawa U. Uterotonic effect of *Evodiae rutaecarpa* alkaloids. *Journal of Natural Products*. 1980 ; 43 : 577-582.

12. Cho-Hwa Liao¹, Shiow-Lin Pan¹, Jih-Hwa Guh², Ya-Ling Chang¹, Hui-Chen Pai¹, Chun-Hung Lin¹ and Che-Ming Teng. Antitumor mechanism of evodiamine, a constituent from Chinese herb *Evodiae fructus*, in human multiple-drug resistant breast cancer NCI/ADR-RES cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* (May 2005) 26 (5) : 968-975.
13. Wang HH, Chou CJ, Liao JF, Chen CF. Dehydroevodiamine attenuates beta-amyloid peptide-induced amnesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2001 ; 413 : 221-225.
14. Jin HZ, Lee JH, Lee D, Lee HS, Hong YS, Kim YH, Lee JJ. Quinolone alkaloids with inhibitory activity against nuclear factor of activated T cells from the fruites of *Evodia rutaecarpa*. *Bio Pharm Bull.* 2004 ; 27 : 926-928.
15. Yua LL, Liaoa JF, Chenb CF. Anti-diarrheal effect of water extract of *Evodiae fructus* in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2000 ; 73(1-2) : 39-45
16. Matsuda H, Yoshikawa M, Ido Y, Kuwazima H, Tanaka T, Iinuma M, Kubo M. Anti-allergic Activities of 70% Methanol Extract of *Evodiae Fructus* (Fruits of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and Its Components. *Nat Med.* 1998 ; 52(6) : 470-476.
17. Cho MH, Shim SM, Lee SR, Mar WC, Kim GH. Effect of *Evodiae fructus* extracts on gene expressions related with alcohol metabolism and antioxidation in ethanol-loaded mice. *Food and Chemical Toxicology.* 2005 ; 43(9) : 1365-1371.
18. Baek SM, Paek SH, Jahng Y, Lee YS, Kim JA. Inhibition of UVA irradiation-modulated signaling pathways by rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, in human keratinocytes. *Eur J Pharmacol.* 2004 ; 498 : 19-25.
19. Lee YC. Step to internal Medicine. Seoul : Jungdam Publishing, INC. 2008 : 63-65.
20. Anthony Fauci, Eugene Braunwald, Dennis Kasper, Stephen Hauser, Dan Longo, J. Jameson, Joseph Loscalzo. The Korean Internal Medicine. Harrison's Principles of Internal Medicine 17th edition Vol2. Seoul : MIP. 2010 : 2233-2234.
21. 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.
22. Jung SY, Lee SY, You TM, Anh MR, Choi HJ, Jung MW, Ryu HM, Yang JS. Studies on the Effect of *Evodiae Fructus* on the Cardiovascular System in N-nitro-L-arginine Methyl Ester-induced Hypertensive Wistar Rats. *YAKHAK HOEJI (藥學會誌).* 1999 ; 43(3) : 397-403.
23. Kim JI, Choi KH, Jung SY, Yim HK, Jung MW, Park YJ, Kang JH. Effect of *Evodiae Fructus* on the Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biomolecules & Therapeutics.* 2000 ; 8(4) : 305-310.
24. Lee TH. Effect of *Evodiae Fructus* Fractionation on the depression. *Korean journal of herbology.* 1998 ; 13(1) : 139-145.
25. Bu Il Seo, Seong Soo Roh, Jong Dae Kim. Philological Study on poisoning of *Evodiae Fructus*. *The Journal of East-West Medicines.* 2008 ; 33(2) : 15-24.
26. Roh YK(盧永根), Jung JC(鄭址昌), Ko GC(高啓昌), Han DS(韓大燮). Pharmacologic-Action of Essential Substance Obtained from Fruits of *Evodia rutaecarpa*. *Korean journal of pharmacology.* 1980 ; 16(1) : 57-63.
27. Kang CH. The Effect of *Evodiae fructus* on Thyroid function and Histological modification in Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl,2-thiouracil). Graduate School Kyunghee University. 2008.
28. Lee HJ. Anti-oxidative activity of *evodiae fructus* MeOH extract. Graduate School Jungang University. 2006.
29. Lee YT. Anti-inflammatory Effect of *Evodiae Fructus*. Graduate School Dongguk University. 2008.
30. Cha KB. The Experiment Report about the effect on the Anti-cancer of Herbal-acupuncture with *Evodiae Fructus* Infusion Solution. Graduate School Daejeon University. 2006.
31. Eksteen JA, Scott PA, Perry I, et al. Inflammation promotes Barrett's metaplasia and cancer : a unique role for TNF-alpha. *Eur J Cancer Prev* 2001 ; 10 : 163-164.
32. Fitzgerald RC, Abdalla S, Onwuegbusi BA, et al. Inflammatory gradient in Barrett's oesophagus implications for disease complications. *Gut* 2002 ; 51 : 316-322.
33. Akira S, Hirano T, Toga T And Kishimoto, T. Biology of multifunctional cytokines : IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.* 1990 ; 4 : 2860-2867.
34. Dinarello CA. The pro-inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 1991 ; 163 : 1177-1184.
35. Oppenheim JJ, Matsushima K, Yoshimura T, Leonard EJ and Neta R. Relationship between interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF), and a neutrophil attracting peptide (NAP-1). *Agents and Actions.* 1989 ; 16 : 134-140.