

## 대황 감초 복합추출물의 항산화 효과를 통한 역류성 식도염 개선 효과

김민영<sup>1#</sup>, 신유옥<sup>1</sup>, 이주영<sup>1</sup>, 이아름<sup>1</sup>, 신성호<sup>1</sup>, 권오준<sup>2</sup>, 서부일<sup>1</sup>, 노성수<sup>1\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 대경지역사업평가원 경북지역산업평가단

### Improving Effect of a Combined Extract of Rhei Rhizoma and Glycyrrhizae Rhizoma through Anti-oxidative Stress in Reflux Esophagitis rats

MinYeong Kim<sup>1#</sup>, YuOck Shin<sup>1</sup>, JooYoung Lee<sup>1</sup>, AhReum Lee<sup>1</sup>,  
SungHo Shin<sup>1</sup>, OJun Kwon<sup>2</sup>, Bull Seo<sup>1</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1\*</sup>

1 : College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea

2 : Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : The present study was designed to evaluate the anti-inflammatory and anti-oxidative stress activities through regulation of Nrf2-mediated genes by Rhei rhizoma and Glycyrrhiza rhizoma combined extract (RGE) in reflux esophagitis.

**Methods** : The antioxidant activity of RGE in vitro was measured in terms of radical scavenging capacity such as DPPH and ABTS. RGE was administered at 350 mg/kg body weight prior to induction of reflux esophagitis. Reflux esophagitis was induced that tied the pylorus and the transitional junction between the forestomach and the corpus in Sprague-Dawley rats.

**Results** : RGE scavenged DPPH and ABTS effectively and IC<sub>50</sub> of RGE each were 4.9 µg/ml and 45.6 µg/ml. Our results show that RGE administration markedly ameliorated mucosal damage upon histological evaluation. In serum and esophagus tissue, RGE significantly suppressed the oxidative stress biomarkers. Reflux esophagitis induced rats exhibited down-regulation of antioxidant-related proteins in the esophagus; however, the levels with treatment of RGE were significantly higher than those of vehicle reflux esophagitis rats. RGE treatment caused significant reductions in activation of NF-κB transcription factor. Thus, RGE significantly exhibited potent anti-inflammatory activities by suppressing the protein expression levels of pro-inflammatory proteins such as COX-2 and iNOS and inflammatory cytokines such as TNF-α in the esophagus tissue.

**Conclusions** : Reflux esophagitis caused considerable levels of oxidative stress in the esophageal mucosa and the administration of RGE reduced the esophageal mucosa damage through the regulation of Nrf2 and NF-κB pathways. Our findings can be considered as supplementary therapy in the prevention or treatment of reflux esophagitis.

**Key words** : Rhei Rhizoma, Glycyrrhiza Rhizoma, gastroesophagea reflux disease, oxidative stress, anti-inflammation, antioxidation

#### 서론

위식도역류질환 (Gastroesophageal reflux disease)은 속쓰림, 더부룩함, 구토, 오심, 가슴통증, 연하통증 등과 같은 다

양한 임상증상을 보이는 질환으로 고열량식과 고지방식과 같은 서구화된 식습관, 비만 및 노령인구의 증가, 음주와 흡연, 과도한 스트레스, 불규칙한 식생활 습관 등의 다양한 요인으로 발생하며 국내에서도 점차 증가하는 추세이다<sup>1)</sup>. 국민건강보험

\*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea  
· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-819-1752 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : MinYeong Kim, College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : oo9199@naver.com

· Received : 16 June 2015 · Revised : 14 July 2015 · Accepted : 20 July 2015

공단의 통계에 따르면 위식도역류질환으로 진료받은 환자 수가 2013년에 351만명으로 2009년 256만명 대비 37%가 증가하였다<sup>2)</sup>. 위식도역류질환 중 위산이나 위 내용물이 식도로 역류하여 식도 점막에 발적, 미란, 궤양 등의 점막 손상을 야기하였을 때 역류성 식도염 (Reflux esophagitis)이라고 한다.

역류성 식도염의 치료는 일반적으로 생활습관의 조절이 가장 기본적인 치료법이며, 약물요법으로는 위산의 영향을 최소화시키는 제산제, H<sub>2</sub> 수용체 차단제 및 양성자펌프억제제 (PPI)와 같은 약물이 사용되고 있다<sup>3)</sup>. 그러나 40-60%에 이르는 환자의 경우 충분한 기간의 산분비 억제제의 투여에도 불구하고 높은 재발률, 불안정한 점막 회복, 지속적인 증상, 식도협착, 폐질환, 바렛 식도나 식도암 등의 합병증이 발생한다<sup>4)</sup>.

최근 식도의 점막 손상이 산역류보다도 산화적 스트레스가 중요한 영향을 준다는 보고가 있다<sup>5)</sup>. 과도한 자유라디칼의 형성에 의한 산화적 스트레스는 백혈구를 활성화시키고 superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and hydroxyl radical (•OH) 같은 활성산소종 (Reactive oxygen species)을 형성하며 조직의 손상을 증가시킨다<sup>6)</sup>. 또한, 항산제 및 자유라디칼 소거제 투여로 과도한 활성산소종에 의한 점막 손상이 감소됨이 보고되고 있다<sup>5)</sup>.

대황(Rhei Rhizoma)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속한 다년생 초목인 금문대황 (*Rheum palmatum* L.), 당고특대황 (*R. tanguticum* Maxim, et Balf.), 혹은 약용대황(*R. officinale* Baill.)의 뿌리와 뿌리줄기를 건조한 것으로 積聚腹痛, 血熱吐衄, 跌打損傷, 상부소화기 출혈 등에 사용할 수 있다<sup>7-9)</sup>. 대황에 대한 실험적 연구로는 항혈전<sup>10)</sup>, 항암<sup>11)</sup>, 신경보호효과<sup>12)</sup>, 고지혈증<sup>13)</sup>, 위점막 보호효과<sup>7)</sup>, 항산화효과<sup>14)</sup>가 있는 것으로 보고되고 있다.

감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 콩과에 속하는 다년생 초본 식물로, 뿌리를 건조하여 사용하는 전통약재로 해독작용에 의한 만성간염, 항당뇨<sup>15)</sup>, 항염증 효과에 의한 항궤양 효과<sup>16,17)</sup>, 궤양성 대장염 억제 효과<sup>18)</sup>, 항산화 효과<sup>19)</sup> 등이 알려져 있다.

이와 같이 선행 연구에 의해 대황과 감초가 위점막보호, 항산화 효과 등이 보고 되었으므로, 이를 기반으로 대황과 감초를 복합하여 만든 대황 감초 복합 추출물(RGE)이 항산화 효과를 통한 역류성 식도염에서의 항염증 효과가 예상되어 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

모든 실험은 대구한의대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 (DHU2013-037)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 7주령 수컷 24마리를 샴타코 (오산, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22 ± 2°C, 습도 50 ± 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, 삼

양사, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다. 실험군은 총 3개의 군으로 정상군 (Normal), 역류성식도염을 유발하고 증류수를 처리한 대조군 (reflux esophagitis control ; Vehicle), 역류성식도염을 유발하고 대황감초 복합 추출물을 350 mg/kg으로 처리한 약물투여군 (RGE)으로 각각 6마리씩 나누어서 사용하였다.

#### 2) 시료

본 실험에 사용한 대황과 감초는 용기한약국 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사하여 약전규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

#### 3) 시약

Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little, Chalfont, UK)에서 구입하였고, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), NF-κB inhibitor alpha (IkBa), nuclear factor-kappa B (NF-κBp65), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), Inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), Histone, β-actin 과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Protease inhibitor mixture DMSO, solutionethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)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

대황 15 g과 감초 15 g에 증류수 300 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 감압 추출장치로 농축한 후 동결 건조기를 이용하여 완전 건조시켜 대황과 감초 추출물 (5.93 g)을 제조하였으며 수율은 19.8%였다. 이를 냉동 (-80°C) 보관하면서 실험 직전에 증류수에 희석하여 사용하였다.

#### 2) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 진한 보라색의 화합물이다. 그러나 radical 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 탈색됨으로 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있다. 이 radical에 의한 소거활성은 지질과산화 억제활성을 비롯한 항산화 활성과 상관관계를 보이므로 항산화제 검색에 널리 이용되고 있다. 각 시료용액 0.1 ml에 60 μM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.1 ml를 넣고 교반한 후 실온에서 30분간 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

3) ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거활성을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 7mM ABTS와 2.45 potassium persulfate를 증류수에 녹인 다음 16시간 차광하여 반응시켜 ABTS 라디칼을 형성시켜 stock solution을 제조 하였다. 이 solution을 증류수를 이용하여 735nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS working solution을 제조하였다. Working solution 95 $\mu$ l 와 시료 5 $\mu$ l를 첨가하여 암실에서 15분간 반응시킨 후 734nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS 라디칼 소거활성을 통한 항산화 효과를 확인하였다.

4) 역류성식도염 유발

실험전날까지 고형사료 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co., korea) 와 물을 충분히 공급하였고 수술 24시간 전부터 절식한 후, Zoletile mixture (Vibrac, France)을 25 mg/kg 복강주사하여 마취하였다. 마취한 뒤, 2 cm 정도 개복을 하고, 대만부위를 실크실로 묶고, 인접한 날문부위를 다른 실크실로 묶은 후 복막과 피부를 봉합하였다<sup>20)</sup>.

5) 식도점막 손상 측정

유문 및 전위부 결찰 수술 6시간 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 I-Solution lite (Innerview Co., 한국) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정하였다.

6) 혈청 및 식도조직 내 산화적 스트레스 바이오마커 측정

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm 10분 원심 분리하여 혈청을 얻었고 식도조직은 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)를 이용하여 분쇄하였다. ROS를 측정하기 위하여 25 mM DCFH-DA를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission wavelength of 530 nm 와 excitation wavelength of 485 nm를 이용하여 30분간 측정한 산출 값을 계산하였다. 식도조직으로 ONOO<sup>-</sup>, TBARS 를 측정하기 위하여, 각각 Kooy et al<sup>21)</sup> 과 Mitsuru et al<sup>22)</sup>의 방법을 시행하여 측정하였다.

7) Western blot

식도의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, and 1.5 M sucrose, and then 0.1 M DTT and protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm 으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100  $\mu$ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10 분마다 voltex를 3번 하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 10분 간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80 $^{\circ}$ C

에서 각각 냉동 보관하였다. 식도조직의 세포질의 HO-1, I  $\kappa$ B $\alpha$ , iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-6,  $\beta$ -actin 및 핵의 NF- $\kappa$ B p65, Nrf2, Histone, 단백질의 발현을 측정하기 위해 10  $\mu$ g의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane 으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody 를 처리하여 4 $^{\circ}$ 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 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 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)프로그램을 사용하여 정량하였다.

8) 통계분석

모든 수치는 mean  $\pm$  standard error (Mean  $\pm$  S.E)로 표시하였으며, SPSS (18.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 각 자료의 통계적 유의성을 검증 하였고, 대조군과 투여군 사이에 p-value < 0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

결 과

1. DPPH 라디칼 소거 활성 효과

실험에 사용된 RGE의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 농도 의존적으로 DPPH 소거능이 증가하였다. DPPH 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 4.88  $\pm$  0.23  $\mu$ g/ml이다(Fig. 1).

2. ABTS 라디칼 소거 활성 효과

실험에 사용된 RGE의 항산화 활성을 확인하기 위해 ABTS 소거능을 측정한 결과 농도 의존적으로 ABTS 소거능이 증가하였다. ABTS 소거능을 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었을 때 45.55  $\pm$  2.10  $\mu$ g/ml이다(Fig. 1).

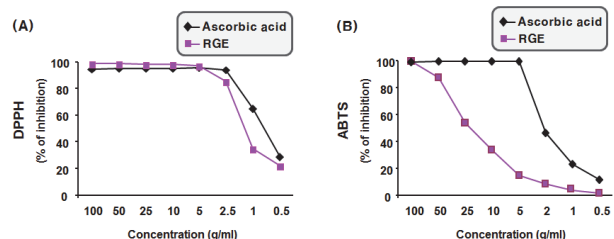


Fig. 1. Antioxidant activity in vitro. DPPH radical scavenging activity of RGE;(A), ABTS radical scavenging activity of RGE;(B). RGE scavenged DPPH and ABTS effectively and IC<sub>50</sub> of DPPH and ABTS radical scavenging activity of RGE were 4.9  $\mu$ g/ml and 45.6  $\mu$ g/ml.

### 3. 식도 점막 손상도 변화

역류성 식도염 수술을 시행하지 않는 정상군인 흰 쥐의 식도에 대한 점막 손상 검사 결과 점막의 손상이 발견되지 않았으나, 수술 전 증류수를 처리한 대조군은 식도 점막이 위산에 의해 손상을 받아 발적, 충혈, 염증이 발생하였고, 손상 부위 면적 비율은  $47.8 \pm 0.03\%$ 로 분석되었다. RGE를 경구투여한 실험군은  $26.3 \pm 0.07\%$  ( $p < 0.01$ )로 대조군에 비해 유의성 있게 손상정도가 감소되었다(Fig. 2).

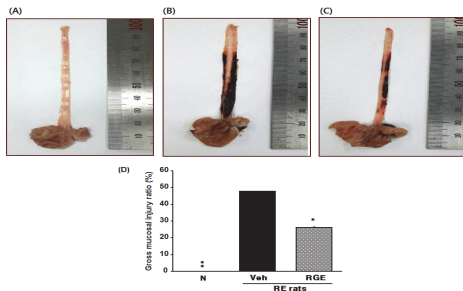


Fig. 2. The gross esophageal evaluation. Normal rats;(A), Vehicle-treated RE rats;(B), RGE administration RE rats;(C), gross mucosal injury ratio;(D) \*\* significant : \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs. vehicle-treated RE rat values.

### 4. 혈액의 산화적 스트레스 바이오마커 변화

부검 시 심장에서 채취한 혈액을 원심 분리 후 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 이용하여 산화적 스트레스의 마커인 ROS를 측정된 결과 대조군( $8032 \pm 217$  fluorescence/min/ml)은 정상군( $3693 \pm 344$  fluorescence/min/ml ( $p < 0.01$ ))에 비해 수치가 증가하였고, RGE 투여군( $5652 \pm 525$  fluorescence/min/ml ( $p < 0.05$ ))의 흰쥐에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

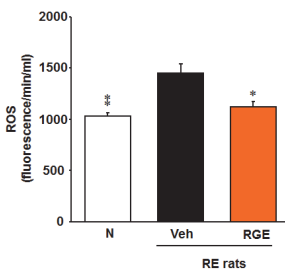


Fig. 3. Oxidative stress biomarker in serum. Oxidative stress biomarker reactive oxygen species(ROS) in serum. Normal rats;(N), Vehicle-treated RE rats;(Veh), RGE administration RE rats;(RGE). \*\*\* significant : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle-treated RE rat values.

### 5. 식도 조직의 산화적 스트레스 바이오 마커 변화

부검 후 분쇄 한 식도 조직에서 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS와 ONOO<sup>-</sup>, TBARS를 측정된 결과 ROS의 값은 정상군( $3693 \pm 344$  fluorescence/min/mg protein ( $p < 0.001$ ))에 비해 대조군( $8032 \pm 217$  fluorescence/min/mg protein)에서 수치가 증가하였고, RGE 투여군( $5652 \pm 525$  fluorescence/min/mg protein ( $p < 0.01$ ))의 흰쥐에서는 대

조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 조직에서의 ONOO<sup>-</sup>의 값 역시 정상군( $189.8 \pm 6.5$  fluorescence/mg protein ( $p < 0.01$ ))에 비해 대조군( $234.2 \pm 8.8$  fluorescence/mg protein)에서 유의성 있게 증가하였다. RGM 투여군( $209.1 \pm 4.4$  fluorescence/mg protein ( $p < 0.05$ ))에서는 ONOO<sup>-</sup>의 수치가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. TBARS는 정상군( $0.65 \pm 0.03$  nmol/mg protein ( $p < 0.001$ ))에서 대조군( $2.03 \pm 0.09$  nmol/mg protein)에 비해 유의성 있게 증가하였으며, RGE의 투여군( $1.08 \pm 0.04$  nmol/mg protein ( $p < 0.001$ ))에서는 유의성 있게 감소하였다(Table 1).

Table. 1. Oxidative stress biomarker in Esophagus.

Group	ROS (fluorescence/min/mg protein)	ONOO <sup>-</sup> (fluorescence/mg protein)	TBARS (nmol/mg protein)
Normal rats	3693 ± 344 <sup>a</sup>	189.8 ± 6.5 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.03 <sup>c</sup>
RE rats			
Veh	8032 ± 217	234.2 ± 8.8	2.03 ± 0.09
RGE	5652 ± 525 <sup>a</sup>	209.1 ± 4.4 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.04 <sup>c</sup>

Oxidative stress biomarker reactive oxygen species(ROS), peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in Esophagus. Normal rats;(N), Vehicle-treated RE rats;(Veh), RGE administration RE rats;(RGE). <sup>a,b,c</sup>significant : <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$  <sup>c</sup> $p < 0.001$ vs. vehicle-treated RE rat values.

### 6. 식도조직의 항산화 단백질 발현

식도 조직에서 western bolt을 실시하여 항산화 효소인 Nrf2와 HO-1를 측정하였다. 그 결과 Nrf-2의 발현은 대조군( $0.25 \pm 0.03$ )은 정상군( $0.42 \pm 0.07$  ( $p < 0.05$ ))에 비해 감소하였고, RGE 투여군( $0.48 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ ))에서는 유의성 있게 증가하였다. HO-1의 발현 역시 대조군( $0.39 \pm 0.05$ )이 정상군( $0.93 \pm 0.05$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 감소하였으나 RGE 투여군( $1.15 \pm 0.09$  ( $p < 0.001$ ))에서는 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4).

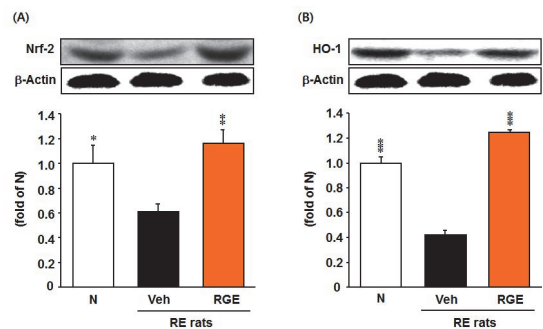


Fig. 4. Expression of anti-oxidant enzyme in Esophagus. Anti-Oxidant enzyme nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2);(A), and heme oxygenase-1 (HO-1);(B) expression levels in the esophagus. Normal rats;N, Vehicle-treated RE rats;Veh, RGE administration RE rats;RGE. \*\*\* significant :  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle-treated RE rat values.

### 7. 식도조직의 염증성 사이토카인 및 매개인자 발현

식도조직에서 western bolt을 실시하여 염증의 매개인자인 IκBα와 NF-κB p65를 측정하였다. 그 결과 대조군( $0.13 \pm 0.00$ )은 정상군( $0.36 \pm 0.02$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 IκBα의 발



현이 감소하였고, RGE 투여군( $0.26 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ))에서는 유의성 있게 증가하였다. 또 NF- $\kappa$ Bp65의 발현은 대조군( $0.70 \pm 0.03$ )에서 정상군( $0.33 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 증가 하였지만 RGE 투여군( $0.36 \pm 0.07$  ( $p < 0.001$ ))에서는 정상군 가까이 감소하였다(Fig. 5). 또한 대조군의 식도조직에서 COX-2, iNOS와 TNF- $\alpha$  IL-6의 발현을 확인한 결과, 대조군( $0.38 \pm 0.03$ )에서의 COX-2의 발현은 정상군( $0.20 \pm 0.02$ ( $p < 0.001$ ))에 비해 크게 증가하였으나 RGE 투여군( $0.26 \pm 0.00$  ( $p < 0.001$ ))에서는 유의성 있게 감소하였다. iNOS의 발현은 정상군( $0.42 \pm 0.02$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 대조군( $0.63 \pm 0.01$ )에서 크게 증가하였고 RGE의 투여군( $0.47 \pm 0.04$  ( $p < 0.001$ ))에서는 유의성 있게 감소하였다. TNF- $\alpha$ 의 발현은 대조군( $0.43 \pm 0.02$ )이 정상군( $0.24 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 유의성있게 증가하였으나 RGE를 투여그룹( $0.34 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ ))에서는 유의성 있게 감소하였다. IL-6의 경우, 대조군( $1.30 \pm 0.08$ )에서는 정상군( $0.84 \pm 0.06$  ( $p < 0.001$ ))에 비해 유의성 있게 증가하였으나 RGE 투여군( $1.20 \pm 0.12$ )에서는 감소하는 경향만 보였다(Fig. 6).

## 고찰

역류성 식도염 (Reflux esophagitis)은 일반적으로 위식도 역류질환으로 언급되고 있으며 위의 내용물이 식도내로 유입되어 가슴 쓰림과 상복부 통증 등 다양한 증상과 점막의 손상을 야기시킴으로 인해서 경제적 손실뿐만 아니라 삶의 질을 저하시키는 질환으로 대표될 수 있다<sup>23</sup>. 우리나라는 서구에 비해 매우 낮은 유병률을 보였지만<sup>24</sup> 최근에 우리나라도 그 빈도가 증가하고 있고 이 질환에 대한 관심이 증가하면서 더욱더 진단율도 높아지고 있다<sup>2</sup>.

역류성 식도염은 식도하부 조임근 (LES)의 기능저하가 가장 큰 원인이다. 그러므로 식도 내 산성 물질이 정체하게 되어 식도점막을 손상시키거나 위산반비증가로 강한 산성 물질이 점막에 대한 자극을 증가시키기도 한다. 또한, 중력에 의해 옆으로 누울 경우, 취침 시에 역류가 빈번하게 발생하며 비만, 변비로 인한 복압의 상승도 원인이 될 수 있다<sup>25</sup>. 최근연구에 의하면 역류성 식도염은 산화적 스트레스가 주요한 원인이 된다고 알려졌다<sup>5</sup>. 자유라디칼의 형성에 의해서 발생한 산화적 스트레스가 조직의 손상을 증가시키고, 이러한 산화적 스트레스의 감소는 점막의 손상이 감소된다고 보고되고 있다<sup>7</sup>.

대황은 변비, 황달, 위장 질환과 궤양 등에 사용되고, 기존의 연구에 의해 항혈전, 항종양, 항산화효과가 있다고 알려져 있다<sup>10,11,14</sup>. 특히 대황의 성분인 piceatannol은 Nrf2의 신호를 통한 HO-1의 발현 증가로 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>26,27</sup>. 감초는 항당뇨<sup>15</sup>, 항염증 효과<sup>16</sup>, 항산화 효과<sup>19</sup> 등이 있다고 알려져 있다. 그러나 아직까지 대황과 감초의 혼합물이 역류성 식도염에 미치는 영향에 대한 연구는 수행되지 않았기 때문에 본 연구에서는 대황 감초 복합추출물을 이용하여 역류성 식도염에서 항산화효과를 통한 항염증효과를 검토하였다.

대황과 감초의 복합 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH 와 ABTS radical 소거 활성법을 이용하여 활성을 측정한 결과, IC<sub>50</sub>의 값이 각각  $4.88 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ 와  $45.55 \pm 2.10 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이러한 결과를 보았을 때 RGE는 DPPH와 ABTS radical 소거를 통한 우수한 항산화 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었으며, 항산화 활성이 역류성 식도염으로 인한 조직 손상 억제에 도움이 될 것으로 생각 된다<sup>28,29</sup>.

부검 후 적출된 위와 식도를 촬영하고 이미지 분석 프로그램을 이용하여 식도의 전체면적과 염증, 발적, 충혈부위를 측정하였다. 식도의 점막 손상 분석 결과 정상군에서는 염증, 발적, 충혈부위가 나타나지 않았으며, 역류성 식도염 대조군의 경우 심한 손상을 나타내었다. 하지만 RGE 투여군에서는 염증, 발적, 충혈부위가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다.

식도의 염증 보호효과는 항산화, 항염증 효과에 의해 나타나는 것으로 유추할 수 있는데, 이를 알아보기 위해 혈액과 조직에서 산화적 스트레스의 바이오마커인 ROS, ONOO<sup>-</sup>, TBARS를 측정하였다<sup>30</sup>. 혈액에서 측정한 ROS는 역류성 식도염 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가하였고, RGE의 투여군에서는 그 수치가 유의하게 감소하였다. 식도 조직에서도 ROS를 측정한 결과 정상군에 비하여 역류성 식도염 대조군에서 유의하게 증가하였고, RGE의 투여군에서는 유의

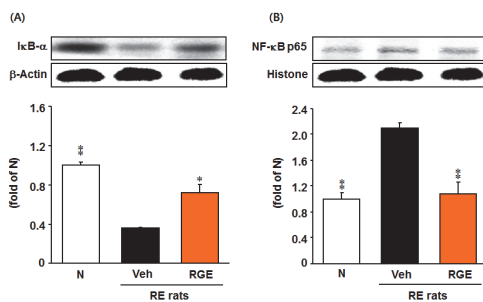


Fig. 5. Expression of inflammation-related proteins in Esophagus. inflammation-related proteins NF- $\kappa$ B inhibitor alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ );(A), nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65);(B) expression levels in the esophagus. Normal rats;N, Vehicle-treated RE rats;Veh, RGE administration RE rats;RGE. \*, significant :  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated RE rat values.

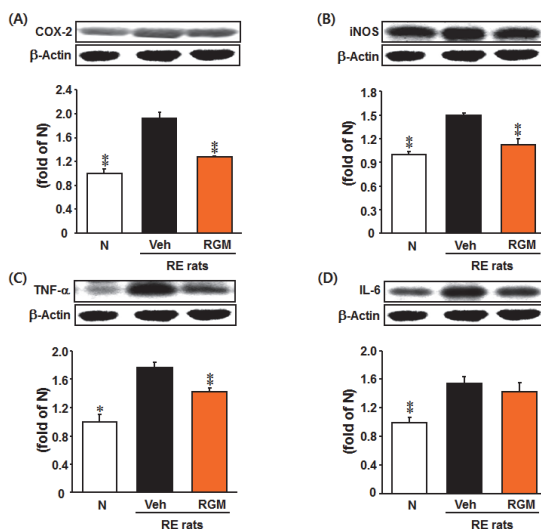


Fig. 6. Expression of inflammation-related proteins in Esophagus. inflammation-related proteins cyclooxygenase-2 (COX-2);(A), inducible nitric oxide synthase (iNOS);(B), Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ );(C), significant :  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  vs. vehicle-treated RE rat values.

하게 감소하였다. 식도조직에서 측정된 ONOO<sup>-</sup> 또한 역류성 식도염 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였고 RGE 투여군에서는 유의하게 감소하였다. 식도조직에서 TBARS도 측정하였는데, 역류성 식도염의 대조군에서는 정상군에 비하여 약 3.2배 유의성 있게 증가하였고, RGE 투여군에서는 대조군에 비해 50%의 감소효과가 보여졌다. 이러한 연구의 결과는 역류성 식도염에서 산화적 스트레스로 식도조직의 손상을 야기하지만, RGE의 투여로 유의성 있게 감소한 산화적 스트레스가 식도 손상의 개선효과를 확인 할 수 있었다.

식도조직에서 항산화 효과를 나타내는 단백질을 측정하기 위해 western bolt을 실시하였다. Nrf-2는 HO-1과의 경로를 통해 체내에서 활성화 되어 glutathione, SOD, Catalase 등을 합성시켜서 산화적 스트레스를 줄이게 된다<sup>31,32</sup>. 세포 내에서 ROS의 증가는 NF- $\kappa$ B나 AP-2의 전사의 활성을 도와 각종 염증 인자의 발생에 주요한 역할을 하는데, Nrf-2의 발현이 증가하면 항산화 인자들의 발현 증가를 통한 항산화 효과가 염증성 인자들의 활성을 막아 항염증 효과를 나타낸다<sup>33</sup>. 식도에서의 항산화 효과가 NF- $\kappa$ B 등 염증성 인자들의 전사 억제를 통하여 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다고 보고되어 있다<sup>34,35</sup>. 따라서 본 실험에서는 식도조직의 Nrf-2 단백질의 표현이 역류성 식도염 대조군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, RGE 투여군에서는 유의성 있게 증가하였다. HO-1 단백질 역시 RGE 투여군에서 역류성 식도염 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이를 통하여 RGE의 투여는 효과적으로 산화적 스트레스를 감소하고 Nrf-2와 HO-1의 증가를 나타내었고, 그 결과 식도 조직의 점막 손상을 현저하게 억제하는 것으로 보여진다.

NF- $\kappa$ B는 면역기능<sup>36</sup>과 세포사<sup>37</sup> 등 다양한 세포활동을 조절하는 전사인자로 알려져 있다. NF- $\kappa$ B의 발현은 염증성 질병이나 암의 발생에 중요한 역할을 하는데 I $\kappa$ B $\alpha$ 는 이러한 NF- $\kappa$ B와 결합하여 NF- $\kappa$ B가 핵안으로 이동하는 것을 막아 활성을 억제한다<sup>38</sup>. 본 실험에서 웨스턴 블롯을 통해 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B p65의 발현을 측정된 결과 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현이 대조군에 비해 RGE 투여군에서 유의성 있게 증가하였고, NF- $\kappa$ B의 발현은 RGE 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과를 통해 RGE는 식도조직에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현의 감소를 막아 NF- $\kappa$ B p65의 활성 억제를 통해 염증억제 효과를 보였다.

NF- $\kappa$ B p65는 TNF- $\alpha$ 와 IL-6와 같은 인자의 전사를 촉진시키고<sup>39</sup>, COX-2나 iNOS와 같은 염증성 사이토카인의 발현을 조절한다<sup>40</sup>. 인체가 염증성 자극에 노출되면 TNF- $\alpha$ 의 발현이 나타나고, TNF- $\alpha$ 는 각종 염증과 세포독성이 나타난다<sup>37</sup>. IL-6는 TNF- $\alpha$ 와 함께 T 세포의 분화를 자극하고, 염증반응을 촉진하는 사이토카인으로 알려져 있다<sup>41</sup>. COX-2는 PGE<sub>2</sub>를 형성시켜 염증반응이나 종양생성에 중요한 역할을 한다<sup>40</sup>. 또한, iNOS는 NO의 대량 생성에 의해 발현되어 세포 내에서 염증매개물질로 작용한다<sup>42</sup>. 본 실험에서 웨스턴 블롯을 통한 NF- $\kappa$ B 관련 사이토카인의 발현을 측정된 결과 RGE 투여군에서는 COX-2와 iNOS의 발현이 유의성 있게 감소하였고, TNF- $\alpha$ 의 표현도 RGE 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 하지만 IL-6의 표현은 감소하는 경향을 보였다. 따라서 RGE의 투여는 식도 조직에서 염증성 사이토카인의 감소를 통한 역류성 식도염의 개선효과가 보여

진다.

대황감초 혼합 추출물을 역류성 식도염 유발모델에 투여한 결과 식도에서 산화적 스트레스를 억제하는 Nrf-2와 HO-1의 발현 증가를 통하여 NF- $\kappa$ B p65 발현을 현저히 감소시킨다. 또 RGE의 투여는 NF- $\kappa$ B p65를 통하여 발현되는 TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, iNOS의 발현을 효과적으로 저해시킴으로 역류성 식도염의 개선시킬 수 있음을 의미한다(Fig. 7).

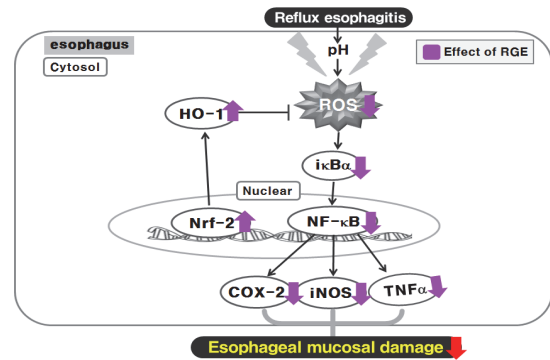


Fig. 7. Possible mechanism of RGE in the Reflux esophagitis of rats.

## 결론

역류성 식도염을 유발시킨 흰쥐에 대황과 감초의 복합 추출물의 투여가 항산화 효과를 통한 항 염증작용 및 식도 조직의 손상 억제에 미치는 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직의 육안적인 손상을 유의적으로 감소시켰다.
2. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 혈액의 ROS를 유의적으로 감소시켰다.
3. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 ROS, ONOO<sup>-</sup>, TBARS를 유의적으로 감소시켰다.
4. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 Nrf-2와 HO-1의 유의성 있는 발현의 증가를 나타내었다.
5. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B p65의 유의성 있는 발현의 억제를 나타내었다.
6. 대황과 감초의 복합 추출물의 섭취는 역류성 식도염 유발 흰쥐에서 식도 조직 내에서 COX-2와 iNOS, TNF- $\alpha$ 의 유의성 있는 발현의 억제를 나타내었지만, IL-6는 감소하는 경향만 보였다.

따라서 대황과 감초의 복합 추출물의 투여가 역류성 식도염의 개선에 효과가 있다고 사료된다.

## 감사의 글

이 연구결과는 2013년도 보건복지부 한의약선도기술개발사업 한의씨앗 (과제번호: HI13C0542)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Jeon SG, Rhee PL. Prevalence, Clinical Manifestations, and Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease in Korea. *Korean J Gastroenterol*. 2008 ; 51(6) : 331-7.
2. National Health Insurance Service. 『Stmach-reflux esophagitis disease』, improve by the correct eating habits. Retrieved May. 05, 2015, from <http://www.nhis.or.kr/bbs7/boards/B0039/13739>.
3. Jung HY. Pharmacological treatment for reflux esophagitis. *J Korean Med Assoc*. 2011 ; 54(1) : 88-91.
4. Badillo R, Francis D. Diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2014 ; 5(3) : 105-12.
5. Lee JS, Oh TY, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Kim HJ, Hahm KB. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutat Res*. 2001 ; 480-481 : 189-200.
6. Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Cho SW, Lee KM, Hahm KB. Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats. *Gut*. 2001 ; 49(3) : 364-71.
7. Kim BH. Effects of Rhei Rhizoma on Gastric Ulcer in Sprague-Dawley Rats. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2011 ; 5(1) : 71-7.
8. Lee SN, Kim HK, Seo BL. A philological study on poisoning of Rhei Radix et Rhizoma(大黃). *J East-West Med*. 2012 ; 37(3) : 13-24.
9. The whole country a college of Oriental medicine. The joint textbook publish commission compilation. *Herbology*. Seoul : Younglimsa, 1995 : 242-3.
10. He ZH, He MF, Ma SC, But PP. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. *J Ethnopharmacol*. 2009 ; 121(2) : 313-7.
11. Huang Q, Lu G, Shen HM, Chung MC, Ong CN. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med Res Rev*. 2007 ; 27(5) : 609-30.
12. Myung SH, Kim YS. Anti-Oxidative and Neuroprotective Effects of Rhei Rhizoma on BV-2 Microglia Cells and Hippocampal Neurons. *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2005 ; 19(3) : 647-55.
13. Son YJ, Kim YS, Lee YJ. The Effects of Rhei palmati Radix and Rhei undulati Radix on the Blood Lipids and Enzymes of Hypercholesterolic Rats. *Kor J Herbol*. 1999 ; 14(1) : 61-8.
14. Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T. Direct scavenging of nitric oxide by traditional crude drugs. *Phytomedicine*. 2000 ; 6(6) : 453-63.
15. Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, Takahashi K, Kawada T, Nakagawa K, Kitahara M. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 2003 ; 133(11) : 3369-77.
16. Hong JS, Kang BG, Jang YS, Kim SH, Wang Z, Park YH, Park JH and Lim SS. Studies on Standardization of Licorice Based on Its Active Components with On-line HPLC Bioassay System. *Korean J Plant Res*. 2014 ; 27(5) : 401-14.
17. Park BH. Pharmacological and Physiological activities of *Glycyrrhizae Radix*. Ewha Womans University. 1983.
18. Lee KH, Rhee KH. Anti-Inflammatory Effects of *Glycyrrhiza glabra* Linne Extract in a Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Mouse Model. *Korean J Food Nutr*. 2010 ; 23(4) : 435-9.
19. Woo KS, Hwang IG, Noh YH, Jeong HS. Antioxidant Activity of Heated Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) Extracts in Korea *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007 ; 36(6) : 689-95.
20. 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.
21. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1994 ; 16(2) : 149-56.
22. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978 ; 86(1) : 271-8
23. Altomare A, Guarino MP, Cocca S, Emerenziani S, Cicala M. Gastroesophageal reflux disease: update on inflammation and symptom perception. *World J Gastroenterol*. 2013 ; 19(39) : 6523-8.
24. El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 ; 63(6) : 871-80.

25. Kim DJ, Roh SS. Effect on Acute reflux Esophagitis by Evodiae Fructus Aquous Extract. *Kor J Herbol.* 2012 ; 27(1) : 51–8.
26. Wung BS, Hsu MC, Wu CC, Hsieh CW. Piceatannol upregulates endothelial heme oxygenase-1 expression via novel protein kinase C and tyrosine kinase pathways. *Pharmacol Res.* 2006 ; 53(2) : 113–22.
27. Lee HH, Park SA, Almazari I, Kim EH, Na HK, Surh YJ. Piceatannol induces heme oxygenase-1 expression in human mammary epithelial cells through activation of ARE-driven Nrf2 signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2010 ; 501(1) : 142–50.
28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 ; 26(9–10) : 1231–7.
29. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009 ; 57(5) : 1768–74.
30. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond).* 2006 ; 30(3) : 400–18.
31. Dreger H, Westphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S, Stangl K. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2009 ; 83(2) : 354–61.
32. Qiu L, Song Z, Setaluri V. Oxidative stress and vitiligo: the Nrf2-ARE signaling connection. *J Invest Dermatol.* 2014 ; 134(8) : 2074–6.
33. Kim J, Cha YN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res.* 2010 ; 690(1–2) : 12–23.
34. Lee JS, Oh TY, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Kim HJ, Hahm KB. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutat Res.* 2001 ; 480–481 : 189–200.
35. Yoshida N. Inflammation and oxidative stress in gastroesophageal reflux disease. *J Clin Biochem Nutr.* 2007 ; 40(1) : 13–23.
36. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994 ; 12 : 141–79.
37. 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.
38. 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.
39. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS Jr. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol.* 1993 ; 13(6) : 3301–10.
40. 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-kappa B pathways. *J Inflamm (Lond).* 2011 ; 8(1) : 16.
41. Gi Y. Effects on Squalene about secretion of TNF-alpha & IL-6 by Glycerol-induced acute-renal failure in mice kidney. Chosun university. 2006.
42. Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC, Grimm EA. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res.* 2000 ; 6(12) : 4768–75.