

Preventive Effect of LS-RUG-com – a Mixture of *Rubus crataegifolius*, *Ulmus macrocarpa*, and *Gardenia jasminoides* – on Gastric Disorders in Animal Models

Young Ik Lee¹, Ahtesham Hussain¹, Md Aziz Abdur Rahman¹, Ho Yong Sohn², Hye Jung Yoon¹ and Jin Sook Cho^{1*}

¹Lee's Biotech Co., #416, C Dong, 17 Techno 4-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34013, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received September 25, 2023 / Revised October 30, 2023 / Accepted November 14, 2023

Rubus crataegifolius (RC), *Ulmus macrocarpa* (UM), and *Gardenia jasminoides* (GJ) are well-known folk medicines in Asia used to treat various gastrointestinal disturbances. The present study evaluated the gastroprotective effect of LS-RUG-com, a mixture of commercially prepared powders of RC, UM, and GJ with a ratio of 3:1:2(w/w/w) against HCl/ethanol-induced gastritis, indomethacin-induced ulcers, and esophageal reflux-induced esophageal mucosal damage and *Helicobacter pylori* infections. In addition, TNF- α and IL-1 β expressions were also determined and measured in esophageal tissue. As to HCl/ethanol-induced gastritis, the LS-RUG-com treatment at a dose of 150 mg/kg showed a remarkable anti-gastritis effect. Regarding indomethacin-induced gastric ulcers, the LS-RUG-com treatment had a significant anti-gastric ulcer effect. Furthermore, in the gastroesophageal reflux disease (GERD) model experiment, the LS-RUG-com treatment resulted in the histological recovery of stomach damage and mucosal injuries. Furthermore, the LS-RUG-com treatment led to an increase in gastric content pH, an increase in mucus protection, and a decrease in gastric pepsin output with a significant decrease in TNF- α and IL-1 β . As to the *Helicobacter pylori* infected animal model, LS-RUG-com had a notable inhibitory effect on *Helicobacter* growth. The use of RC, UM, or GJ in isolation or the LS-RUG-com treatment as whole had good effects in terms of anti-oxidation, anti-neutralization, gastric acid secretion inhibition, and anti-lipid peroxidation, which supported the use of natural products as systemic gastric protective agents. Our results suggest that the LS-RUG-com might be a significant systemic gastro-protective agent that could be utilized for the treatment and/or protection from gastric disturbances and related damage.

Key words : Anti-gastritis, anti-gastric ulcer, anti-*Helicobacter pylori*, gastro-esophageal reflux disease (GERD)

서 론

전 세계 인구의 약 10%가 겪고 있는 소화기 질환은 과도한 스트레스, 음주, 흡연, 잘못된 식습관 등에 의하여 야기되며, 위염, 위궤양, 역류성식도염 및 *Helicobacter pylori* 감염에 의한 위 손상 등으로 다양하게 나타난다[19, 30]. 현재까지 imetidine, famotidine, ranitidine, nizatidine 등과 같은 Histamin 2-receptor antagonist와 omeprazole, lansoprazole, vonoprazan, pantoprazole, rabeprazole 등과 같은

proton pump inhibitors 등의 다양한 관련 의약품들이 개발되어 사용되고 있다[7, 20, 25]. 그러나, 상기의 의약품은 위장장애, 발진 두드러기와 같은 부작용과 약 복용을 중지 1년 내의 재발율이 50~80%에 이르는 등 치료상의 한계로, 안전성과 효과성이 확보된 천연물 기반의 예방, 치료 소재 개발이 필요한 실정이다. 현재까지 천연 소재를 활용하여 위염[3, 13], 위궤양[1, 6, 7], 역류성 식도염[2, 5, 15]에 관한 예방, 치료 소재 개발에 관한 연구가 이루어지고 있으나, 위 손상에 관한 복합적인 예방, 치료 소재 개발은 이루어지지 않고 있다. 본 연구팀은 실험실에서 제조한 국내 자생식물 산딸기(RC : *Rubus crataegifolius*), 유백피(UM : *Ulmus macrocarpa*) 및 치자(GJ : *Gardenia jasminoides*)의 3종 추출물의 혼합물이 위염, 위궤양, 역류성식도염 및 *H. pylori* 제어에 복합적으로 효과적임을 보고한 바 있다[19, 26, 27]. 본 연구에서는 임상치료로 사용된 LS-RUG-com의 위보호 효과를 재검증하는 연구를 실행하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-42-862-5016, Fax : +82-42-862-5017

E-mail : nabucco1@hanmail.net

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

위염은 위 점막에 염증세포의 침윤이 있는 상태를 말하며, 급성 위염과 만성 위염으로 분류한다. 급성 위염은 위산이 과다하게 분비되는 경우 일어나며, 만성 위염은 과도한 stress 등에 의하여 일어난다고 알려져 있다[3]. 위염의 원인으로 위 점막에 대한 공격 인자와 방어 인자 간의 불균형으로 인하여 나타난다는 balance theory가 받아들여지고 있다[12]. 위 내부는 강력한 위산에 잘 견디는 위 점막으로 둘러싸여 있으나, 활성산소로 인한 스트레스는 위 점막 분비량을 감소시킨다[21]. 현재 시판중인 위염 치료제로는 proton pump inhibitor (PPI), H2-receptor antagonist 등이 우수한 효능이 입증되고 있으나[23], 부작용 등으로 인해 안전성이 확보된 천연물을 이용한 위 건강 소재 개발 필요성이 대두되고 있다[3, 20, 25].

한편 위궤양은 위 점막이 헐어서 궤양이 점막뿐 아니라 근육까지 침범한 것을 말하며, 주요 발병원인으로, *H. pylori* 감염, 비스테로이드계 항염증 소염제(non-steroidal anti-inflammation drug, NSAID), 흡연, 스트레스 등이 알려져 있다[12, 14]. 또한, 각종 퇴행성 질환과 심혈관 질환을 예방 및 치료를 위한 진통소염제, 아스피린, 혈액순환 약물도 위궤양의 원인이 됨이 밝혀지고 있다[4, 32]. 자유 래디칼에 의한 위 점막 세포의 장애, 혈구 세포 기능 변화에 의한 위 점막 혈류량 감소와 혈관 내피세포의 손상 등이 위궤양으로 진행되고 악화된다[3, 30].

또한 역류성 식도염은 위에서 분비된 위액을 비롯한 소화효소들이 식도로 역류하여 염증성 질환을 야기하는 것을 말하며, 주요 원인은 소화기관에 음식물이 들어와 거꾸로 역류할 수 없도록 조절하는 괄약근 중 식도와 위를 연결하는 하부 괄약근(lower esophageal sphincter, LES)의 기능이 저하되었을 때 발생한다[2, 5, 9]. 위 식도 역류가 계속 지속되면 식도가 산성 자극을 계속 받게 되고, 식도는 스스로를 산성 자극에 버티게 하게 되어, 상피를 식도 점막이 아닌 위 점막 같은 상피로 바뀌게 된다. 이 과정을 화생(metaplasia)이라고 하며, 이 과정을 통해 상피가 변해서 Barrett 식도(Barrett's esophagus)라고 불리는 조직으로 변하게 된다[26]. 이러한 Barrett 식도의 경우, 식도암(esophageal cancer)이 생길 위험이 상당히 높다고 알려져 있다[8, 10, 18].

본 연구에서는 상업적 시설에서 대량 제조한 RC, UM 및 GJ 추출물 분말과 이의 혼합물인 임상용 복합제제(LS-RUG-com)가 위염, 위궤양 및 역류성식도염 억제 및 항 *Helicobacter pylori*에 미치는 영향을 평가하고자 진행되었으며, 우수한 위장관 질환 억제효과를 확인하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시약

Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, formaldehyde (formalin), HCl, omeprazole, cimetidine, ellagic acid는 Sigma (Sigma Aldrich Inc, MO., USA)에서 구입하였으며 fetal bovine serum (FBS), trypsin EDTA는 GIBCO (Invitrogen Inc., Nr, USA)에서 구입하였다. 이외 사용된 시약들은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

천연물 추출물 및 이를 이용한 임상용 복합제제의 제조

산딸기 미숙과, 유백피 껍질 및 치자 열매는 국내 대건의 한약사에서 구입하여 사용하였으며, 한국생명공학연구원(KRIBB)의 식물분석팀에서 종별 구별을 통하여 유전적 검증을 완료한 시료를 사용하였다. 추출물 제조를 위하여, 산딸기 미숙과와 유백피는 ethanol로 용매 추출하였으며, 치자 열매는 열수 추출을 진행하였다[13]. 실험실용 평가시료의 경우, 추출액은 여과 후 농축하여 최종적으로 동결건조하여 분말로 조제한 후, 산딸기, 유백피, 치자 추출물을 각각 3:1:2(w/w/w) 비율로 혼합하여 제조하였다. 반면 상업적 시설에서 임상용 복합제제(LS-RUG-com) 조제를 위해서는, 산딸기 미숙과, 유백피 및 치자 열매는 위와 동일하게 추출한 후, 추출액에 dextrin을 일정량 첨가하여 분무건조기를 이용하여 분말로 조제하였다. 분무건조는 Fine F&T Co. (충남, 세종, 한국)에서 실시하였으며, 각각의 상업용 분말을 각각 3:1:2(w/w/w) 비율로 혼합, 균질화하여 대량 제조하였다.

HPLC를 이용한 시료의 지표 성분분석

상기 상업용 시설에서 제조한 3종 추출물의 지표성분 함량을 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 측정하였다. RC, GJ 및 UM의 경우 지표물질은 각각 ellagic acid, geniposide, 및 catechin-7-O-β-D-apiofuranoside를 선정하였다. HPLC (Agilent technology 1260 infinity)는 auto sampler (G1329B) 및 UV detector (G1316A)를 부착된 상태이며, column은 reversed phase C18 (4.6X150 mm, 5 μm)를 사용하였다. 이동상으로는 water/acetonitrile의 혼합용매를 사용하였으며 Flow rate는 0.8 ml/min이며 시료 주입량은 10 μl였다. 상세한 HPLC gradient solvent 조건은 기존 보고[10]와 동일하게 사용하였으며, ellagic acid와 geniposide는 254 nm에서 catechin 7-O-β-D-apiofuranoside는 280 nm에서 각각 측정하여, 지표성분의 규격 및 설정 근거로 사용하였다(Fig. 1).

In vitro 실험에 의한 위보호 기전연구

천연소재 3종(RC, UM 및 GJ) 추출물의 위점막 손상시 위내 염증 요인 억제에 의한 위보호 효능을 밝히기 위하여, 3소재의 anti-oxidation, acid-neutralizing, gastric acid secretion inhibition 및 anti-lipid peroxidation 효능을 측정하여, 위보호 기작연구를 시도하였다. 항산화제(anti-oxidant)

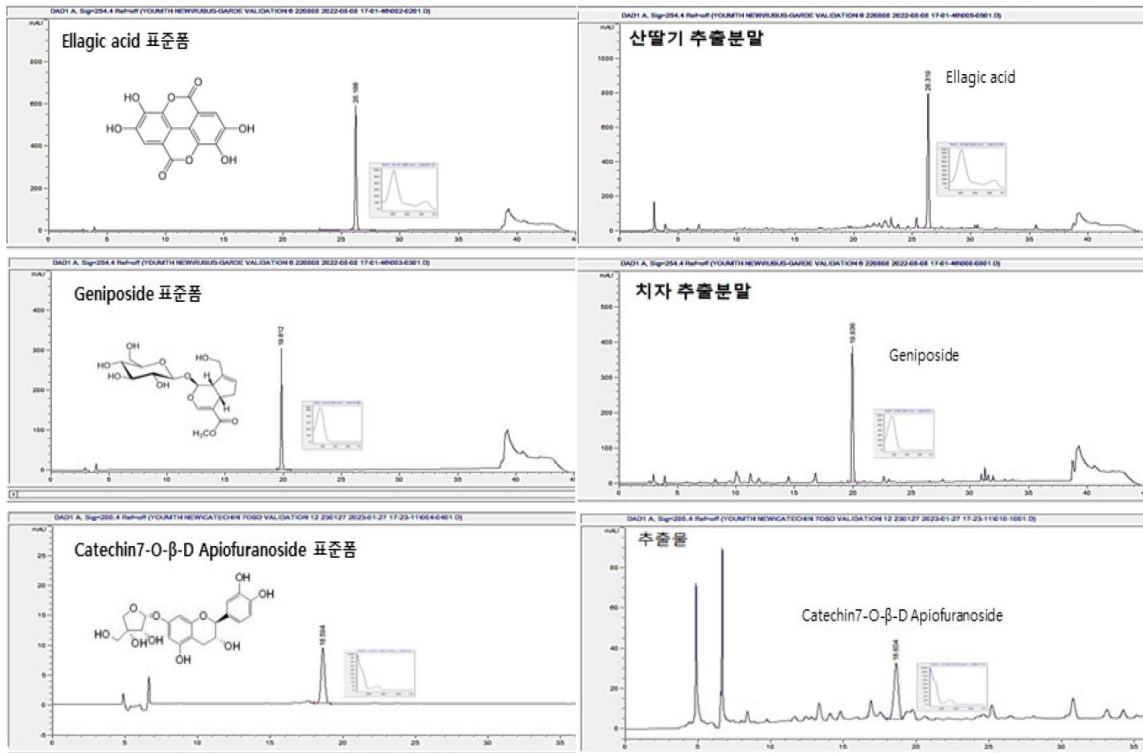


Fig. 1. HPLC-DAD chromatogram for standardization of sample. Ellagic acid and RC extract at 254 nm, geniposide and GJ extract at 254 nm, and C-7-O-β-D apiofuranoside and at 280 nm were used. The content of each substance were ellagic acid (5.25 mg/g), geniposide (23.76 mg/g) and catechin 7-O-β-D apiofuranoside (1.70 mg/g). Three batches of each substance contents (LS-001, LS-002, LS-003) were verified at KFFI (Korea Functional Food Institute/한국기능식품연구원).

는 신체가 비정상환경의 반응으로 일어나는 불안정한 분자인 자유 radical (free radical)에 의한 유발된 세포손상을 예방 또는 지연시킨다. 고로 항산화제는 자유 래디칼 제거제(free radical scavenger)라고 불리운다.

Anti-oxidant (항산화) 효능을 측정

본 연구에서 천연물 소재의 anti-oxidation 효능을 측정하기 위해 DPPH (2, 2-dipheuy-1-picrylhydrazyl) 소거는 Biois 법에 따라 측정을 하였다[1, 2]. 2.4 ml의 0.1 nM ethanol로 용해한 DPPH는 1.6 ml의 천연소재(RC, UM, GJ) extract 농도별로 혼합하였다(0.10, 25, 50, 100, 175, 200 µg/ml). 혼합물을 잘 mix하여 30분간 암실에 보장한 후, Spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정한다. DPPH의 radical scavenging 활성도는 다음 계산법으로 계산하였다.

$$\text{Scavenging activity} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

A₀ : 대조군(blank), A₁ : 시험군(sample)의 흡광도

각 소재의 농도별 DPPH ratio를 계산하여, 각 소재의 농도별 anti-oxidation 비율을 측정하였다(Fig. 2A).

Acid-neutralizing (위산중화능) 효능 측정

임상용 천연물 소재의 위의 위산 중화에 의한 위보호

효능을 검증하기 위해 acid-neutralizing capacity를 측정하였다[3]. 1 g의 각각의 sample에 100 ml의 0.05 M HCL를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양시킨 후, acid-neutralizing capacity (위산중화 효능)는 0.1 M NaOH를 사용하여 측정하였다. 양성 대조군으로 sodium bicarbonate를 사용하였다(Fig. 2B).

위산분비 억제 효능 측정

체내 위점막 세포에 존재하는 Histamine H₂ 수용체 (H₂R)에 의하여 위산 분비가 증가한다. H₂R이 활성화 되면 CAMP가 증가, proton pump가 활성화되어 위액의 산도가 증가한다[4]. 이에 본 연구에서는 천연소재(RC, UM, GJ 및 RUG-com : 150 mg/kg)에 의한 위산의 total acidity (m Eq)를 측정하여 위산 분비 억제 효능을 측정하였다(Fig. 2C).

Anti-lipid peroxidation 효능 측정

임상용 천연물 복합 소재(RUG-com / 5, 10, 50, 150 mg/kg)의 anti-lipid peroxidation을 측정하기 위하여 TBAR (thiobarbituric acid reactive substance) 분석을 실시하였다. Lipid peroxidation은 동식물에서 이루어진 기작으로, 이 과정에서 막의 지질이 파괴되고 괴산화 지질과 isoprostane,

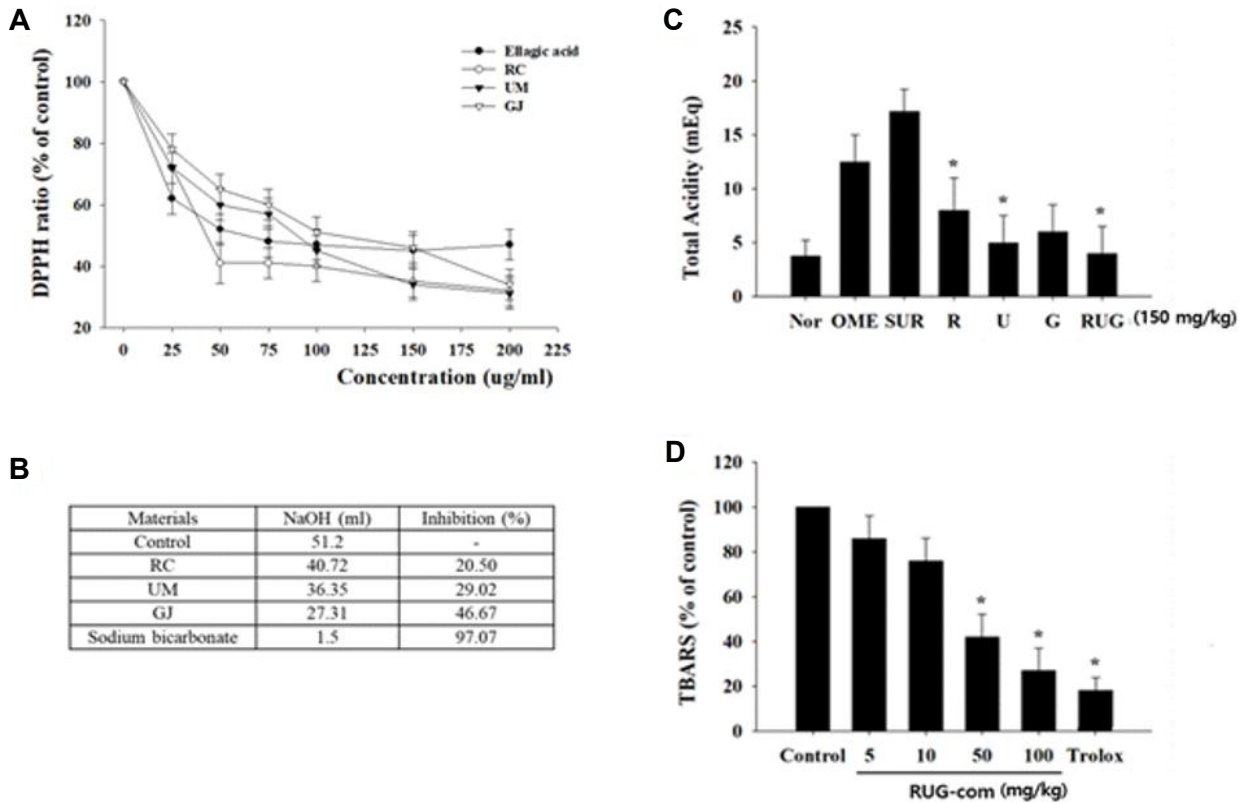


Fig. 2. *In vitro* experiment on gastroprotective effect of natural plants extract verifying (A) anti-oxidation, (B) acid-neutralization, (C) gastric acid secretion inhibition and (D) anti-lipid peroxidation activities (Effect of RUG-com on TBAR content *in vitro* mouse stomach homogenate). **p*<0.05 vs control, n=7 for each groups Each value represents the mean ± SEM.

MDA, 4-HNE와 같은 물질이 생성되며, oxidative stress의 대표적인 biomarker이다. TBARS 측정법은 잘 알려진 lipid peroxidation 분석방법으로 MDA+TBA (thiobarbituric acid) 복합체가 형성되어 이를 측정하므로 lipid peroxidation을 측정한다. 이를 측정하기 위하여 실험 rat의 stomach homogenate를 활용하여 MDA-TBA 결합체를 532 nm에서 측정하여 대조군과의 %를 비교한다. Vitamin E의 유도체인 Trolox를 anti-lipid peroxidation 표준물질로 사용하였다. 본 실험에서는 Oxi-Tec TBARS Assay Kit를 사용하여 측정하였다(Fig. 2D).

HCl-Ethanol 모델을 이용한 위염 억제 활성 평가

위염 억제 활성 평가를 위해 rat을 이용한 HCl-Ethanol 모델[3, 4, 13]을 사용하였으며, Sprague-Dawley rats을 활용하여(200~250 g, Orient Bio Animal Laboratories, Kyunggi-do, Korea)을 1주일간 표준조건 (24 ± 2°C, 45 ± 5% 습도, 12 hr light/dark cycle)에서 7일간 순화시킨 후, 7마리씩 8그룹으로 구분하였다(무처리군, cimetidine 처리군, RC, UM, GJ, RC+UM, RC+GJ 처리군 및 LS-RUG-com (RC+UM+GJ) 처리군). 이후 24시간 절식 후 cimetidine (100 mg/kg) RC, UM, GJ (150 mg/kg) 및 RC+UM, RC+GJ (75+75

mg/kg) LS-RUG-com (RC+UM+GJ/75+25+50/150 mg/kg)을 각각 경구투여 하였으며, 30분 후 HCl/EtOH 용액 (150 mM HCl in 65% ethanol)을 위장관 투여하였다. 이후 1시간 절식, 절수시킨 후 위 적출하여 2% formalin 용액으로 조직을 고정한 후, 위 조직손상 및 위염 발생 정도를 평가하였다[31]. 위염 발생정도는 위점막의 black 및 red line에 의한 lesion index를 UTSCSA Image Tool 3.00으로 측정하여 나타내었다[26, 34]. 모든 동물실험은 동물실험윤리위원회 승인 후 진행하였다(승인번호 : KRIBB-AEC- 14098) (Fig. 3).

Indomethacin 유도성 위궤양 모델을 이용한 위궤양 억제 활성 평가

LS-RUG-com의 위궤양 억제 효능은 indomethacin 유도성 위궤양 모델[6, 11]을 이용하여 평가하였으며, 상기와 동일하게 순화시킨 rat을 7마리씩 8 그룹(무처리군, cimetidine 처리군, RC, UM, GJ 처리군 RC+UM, RC+GJ 처리군 및 LS-RUG-com 처리군)으로 나눈 후, 이후 24시간 절식 후 cimetidine (100 mg/kg), RC (150 mg/kg), UM (150 mg/kg), GJ (150 mg/kg), RC+UM (75+75 mg/kg), RC+GJ (75+75 mg/kg) 및 LS-RUG-com (150 mg/kg) 을 각각 경구

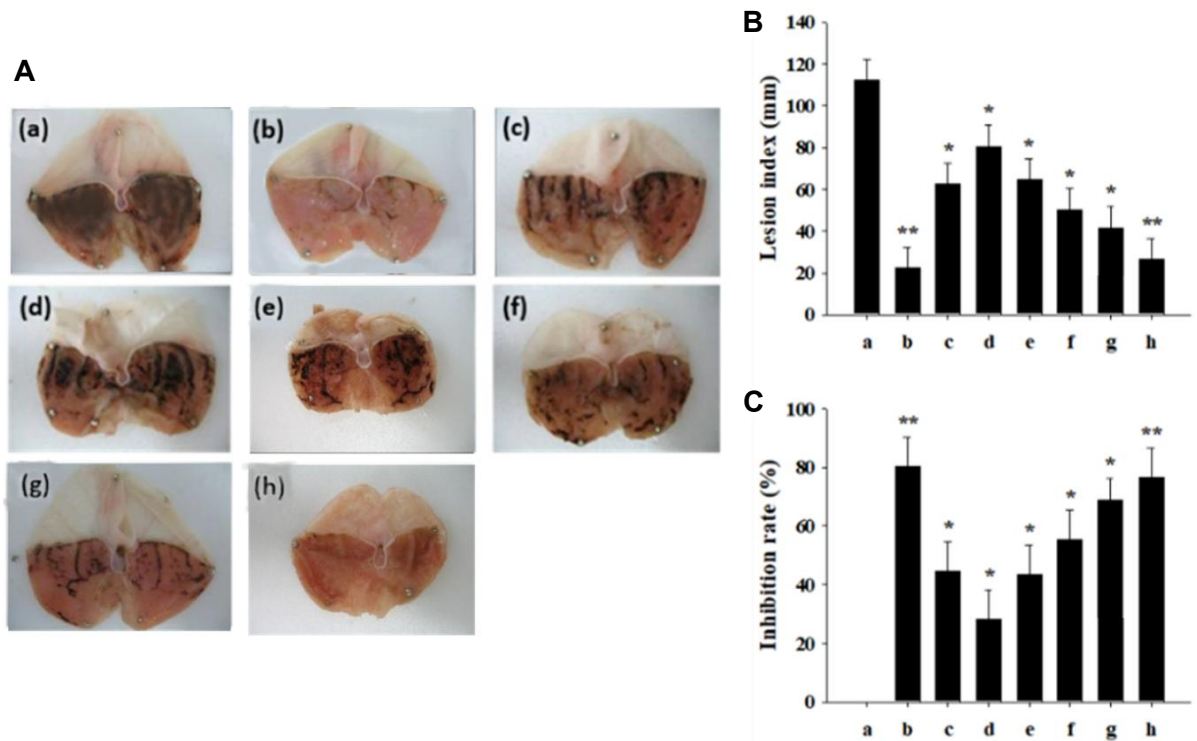


Fig. 3. Inhibitory effect of combined plants extract on HCl-EtOH induced gastritis. (a) HCl-EtOH (b) Cimetidine (100 mg/kg) (c) RC (150 mg/kg), (d) UM (150 mg/kg) (e) GJ (150 mg/kg) (f) RC+UM (75+75 mg/kg), (g) RC+GJ (75+75 mg/kg) (h) RUG-com/RC+UM+GJ (75+25+50 mg/kg), Gastric index (lesion index) was determined using UTSCSA Image Tool 3.0% inhibition gastritis formation of each sample was determined. Each volume represents the mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01 vs control rat.

투여하였으며, 30분 후 indomethacin (30 mg/kg)을 위장관 투여하였다. 1시간 절식, 절수시킨 후, 위 적출을 하여 위궤양 발생을 확인하고 UTHSCSA Image Tool 3.00으로 lesion index를 측정하여 위손상 정도를 측정하였다[25, 32]. Cimetidine은 위점막세포의 히스타민 작용억제, 위산 분비 억제, 위산농도 감소하여 위궤양 억제 효능이 있어 양성 대조군으로 사용하였다(Fig. 4).

유문-전위부 결찰수술 모델을 이용한 역류성 식도염 억제 활성 평가

LS-RUG-com의 역류성 식도염 억제 효능은 유문(pyloric sphincter) 및 전위부(lower esophageal sphincter)를 결찰 수술하여 위의 내용물이 식도로 역류하는 것을 막아주는 괄약근(sphincter)의 이상을 유도하여 확인하였다[2, 22]. 먼저 Rat을 무처리군(normal), 결찰수술만 진행한 처리군(control), omeprazole 처리군(ome 150 mg/kg/day), RC 처리군(150 mg/kg/day), UM 처리군(150 mg/kg/day), GJ 처리군(150 mg/kg/day), RC+UM (75+75 mg/kg), RC+GJ (75+75 mg/kg) 및 LS-RUG-com 처리군(150 mg/kg/day)의 8그룹으로 구분하였다. 순화된 rat에 omeprazole 및 시료들을 5일간 경구 투여한 후, 24시간 절식 후 Zoletil / Rumpum (1:1)

을 사용하여 마취하였고, 이후 위의 2부위(pylorus 및 fore stomach)를 결찰수술하여 역류성 식도염을 유도하였다[27]. 4시간 경과 후 희생하여 위, 위액 및 esophagus tissue를 수집하여 분석하였다. 위액 pH 변화를 분석하기 위해, 적출한 위로부터 위 내용물(gastric content)을 1000 \times g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 pH meter로 측정하였다. 위액의 pepsin 분비량은 rat pepsin ELISA Kit (ATF Scientific Co., USA)을 이용하여 측정하였으며, gastric pepsin output (μ mole/6 hr)로 나타내었다[16-18]. 식도는 10% formalin에 10분간 고정하여 손상정도를 확인하였으며, esophageal mucous protection 정도는 I-solution lite (Innerview Co, Korea) 프로그램을 사용하여, 손상면적과 전체면적을 계산하여, 다음의 식으로 계산하였다[15]. Esophageal mucous protection (%) = (전체면적-손상면적)/전체면적 Omeprazole은 위산분비 억제, 역류성 식도염, 소화성 궤양 치료에 효능이 있어 양성 대조군으로 사용하였다(Fig. 5).

TNF- α 및 IL-1 β 의 단백질 발현 측정

위, 식도 염증의 주요 인자인 inflammatory cytokine 발현을 측정하기 위해, 식도 조직에 100 mM Tris-HCl (pH

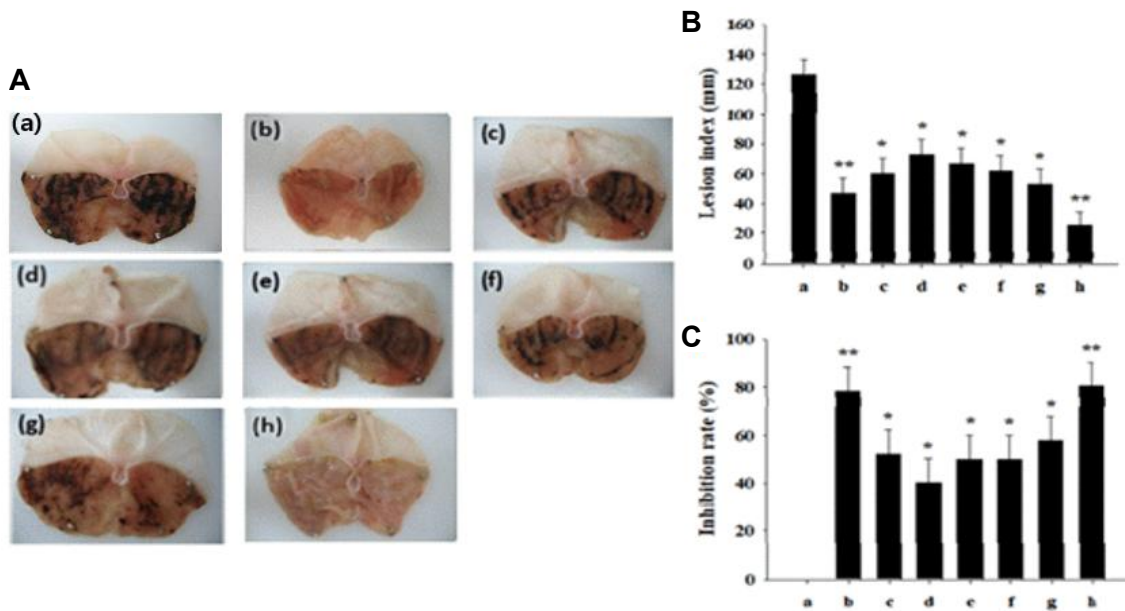


Fig. 4. Inhibitory effect of combined plants extract on indomethacin induced gastric ulcer. (a) HCl-EtOH, (b) Cimetidine (100 mg/kg), (c) RC (150 mg/kg), (d) UM (150 mg/kg), (e) GJ (150 mg/kg), (f) RC+UM (75+75 mg/kg), (g) RC+GJ (75+75 mg/kg), (h) RUG-com/RC+UM+GJ (75+25+50 mg/kg). Gastric ulcer index (lesion index) was determined using UTSCSA Image Tool 3.0% inhibition gastric ulcer formation of each sample was determined. Each volume represents the mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01 vs control rat.

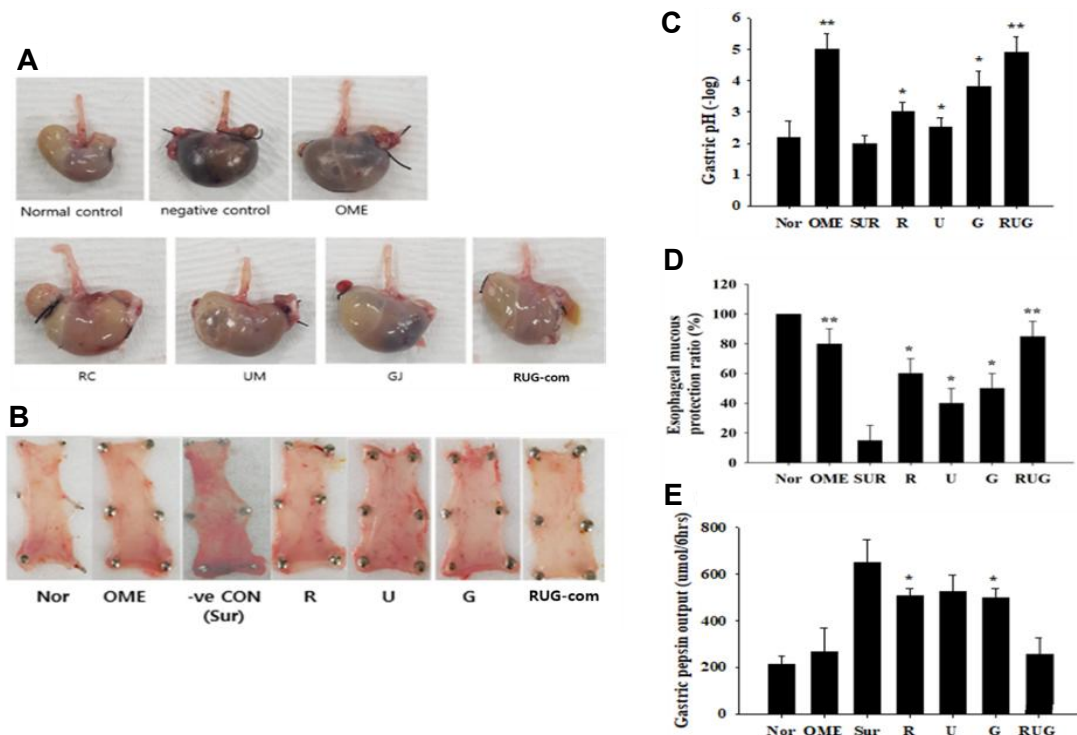


Fig. 5. Effect of R, U, G and RUG-com on gastroesophageal reflux induced esophageal mucosal damage in rats. (A) Preventive effects on stomach changes by natural product extracts treatment on GERD induced rat models. (B) Histological changes of esophagus by natural product extracts on GERD induced rat models. (C) Effects of R, U, G and RUG-com on gastric pH in rats with reflux esophagitis. Values are expressed at the mean \pm SD (9 rats) * p <0.05, vs control rat (Sur). (D) Effects of R, U, G and RUG-com on esophageal mucous protection on GRED induced rat models. (E) Effect of R, U, G and RUG-com on pepsin secretion protection efficiency on GRED induced rat models.

7.4), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 이후 10% NP-40 용액을 첨가하고 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 상등액을 회수하였다[14]. TNF-α 및 IL-1β의 단백질 발현은 TNF-α ELISA kit (Thermo Fisher ELISA Kit) 및 IL-1β ELISA kit (Thermo Fisher ELISA Kit)을 이용하여 제조사의 추천방법으로 측정하였다. 각 그룹의 단백질 수준은 pg/mg-tissue로 나타내었다(Fig. 6).

Helicobacter pylori 억제 효능 검증

4주된 Balb/c mice를 이용하여, 24시간 절식후 *H. pylori*를 경구투여 하였다(0.5 ml, 2×10⁸ CFU/mice, n=7/group). Table 1에서 보는 바와 같이 7 group으로 나누어 실험을 실시하였다. 4주 후부터 RC, UM, GJ, RC+UM, RC+GJ 및 LS-RUG-com을 투여하였으며, *H. pylori* 투여 8주 후 모든 실험 mice를 수술하고 위를 절제하여 *H. pylori* 개체수를 측정하였다(Table1). *H. pylori* 감염 mice의 위 절제 후 위 조직 변화도 H&E staining을 활용하여 측정하였다(Fig. 7).

또한, *H. pylori* 감염 mice의 urease 억제 효과도 확인하였다(Fig. 8). *H. pylori* 감염 mice의 urease 억제 효과를 확인하기 위하여 동물모델로서 C57BL/6 mice를 이용하였다. mice에 1주 동안 헬리코박터균을 경구투여하고, 그 후 3주간 방치하여 감염을 유도하였다. 그 후 4주간 3중 복합식물추출 물을 경구투여 하였다. positive control 군으로는 헬리코박터성 위염에 쓰이는 약제인 antibiotics (omeprazol, clarithromycin, amoxycillin)를 사용하였다. 투여기간이 끝난 후 해부하여 mice의 위를 적출하여 3등분한 뒤 그 중 조직 1개를 Urease 액체배지에 넣고 3시간 뒤 흡광도를 측정하여 urease activity를 확인 하였다.

통계분석

모든 실험결과는 mean ± SD로 표시하였으며, SPSS (22.0 for Windows program)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 자료의 통계적 유의성을 검증하였고, 대조군과 투여군 사이에 p-value<0.05일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

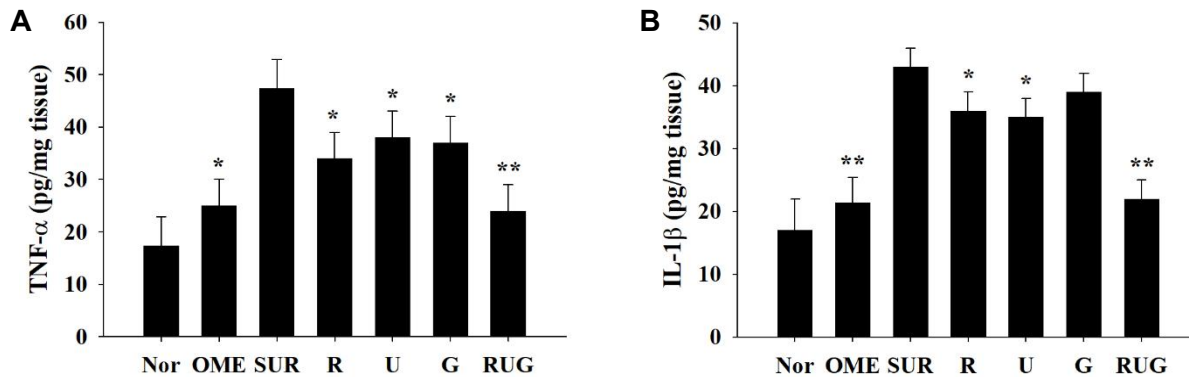


Fig. 6. Effect of R, U, G and RUG-com on TNF-α and IL-1β level in the esophageal tissue in rats. Anti-inflammation indicator TNF-α level was evaluated in the esophageal tissues. (B) The levels of IL-1β on indicator of anti-inflammation was evaluated in the esophageal tissues. Nor; normal group, OME; omeprazole, Sur; control group, R, U, G and RUG-com group. Values are expressed at the mean ± SD (9 rats) *p<0.05, **p<0.01 vs control rat (Sur).

Table 1. Inhibitory growth effect of plant extracts on *Helicobacter pylori* growth in *H. pylori*-infected Balb/c mice

Experiment group	Administration condition	Log10 CFU/stomach
1 negative control 1	-	-
2 negative control 2	<i>H. Pylori</i> infection (8 wks)	8.5×10 ⁶
3 Sample 1	AMX+CLM+OMP	7.5×10 ²
4 Sample 2	RC	8.1×10 ³
5 Sample 3	UM	7.2×10 ⁴
6 Sample 4	GJ	3.6×10 ⁵
7 Sample 5	RC+UM	3.7×10 ³
8 Sample 6	RC+GJ	8.0×10 ³
9 Sample 7	RC+UM+GJ	5.0×10 ³

AMX, ampicillin; CML, clarithromycin; OMP, omeprazole; CFU, colony forming unit; RC, *Rubus crataegifolius*; UM, *Ulmus macrocarpa*; GJ, *Gardenia jasminoides*.

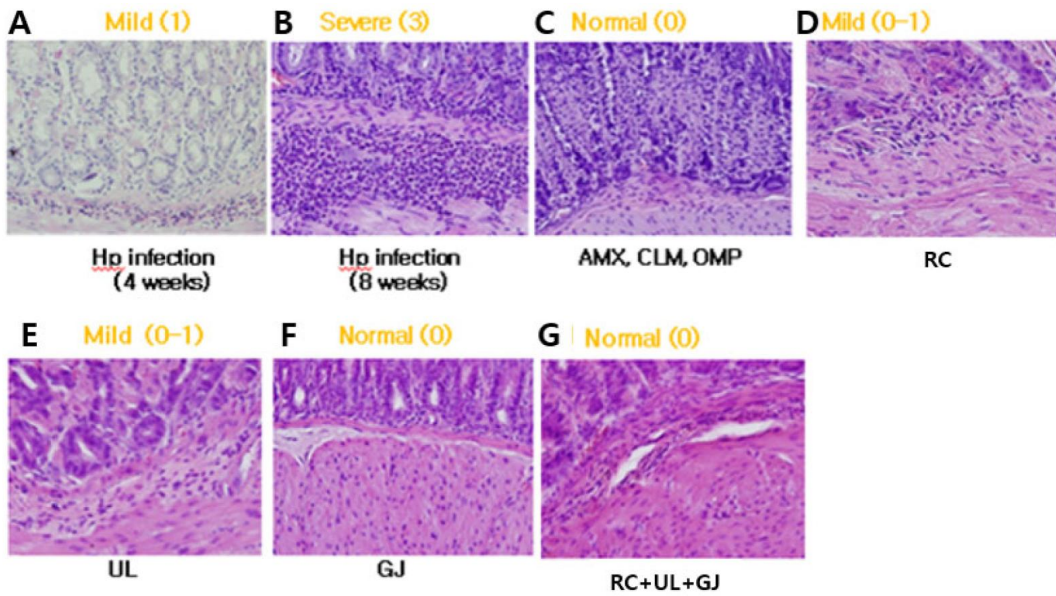


Fig. 7. Histology analysis for H&E staining (magnification ×40). *H. pylori* induced gastric inflammation by increasing immune cells and natural plants extract suppress immune cells in mice stomach. (A) *H. pylori* infected control mice (4 weeks). (B) *H. pylori* infected control mice (8 weeks). (C) Treatment with triple therapy (OAC). Treatment with RC (D), UL (E), GJ (F) and RC+UL+GJ (RUG-com) (G). Histological scoring of inflammation : normal (0), mild (1), moderate (2) and severe (3).

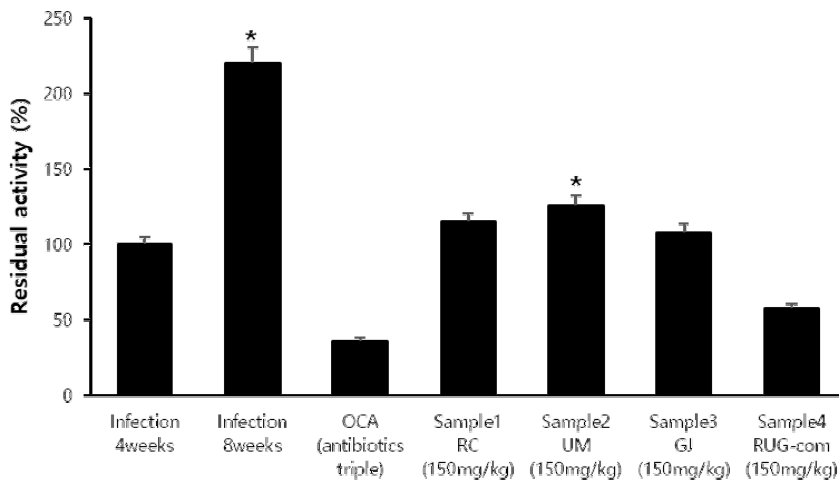


Fig. 8. Effect of RC, UM, GJ and RUG-com extracts on the inhibition of urease activity. Gastric urease are produced by *H. pylori* which cause gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. RUG-com significantly decrease urease activity.

결과 및 고찰

3종 천연물 추출물의 지표성분 정량

미성숙 산딸기, 유백피 껍질, 및 치자 열매 추출물의 지표물질을 각각 ellagic acid, catechin-7-O-β-D-apiofuranoside 및 geniposide로 선정하고 이들의 함량을 HPLC 분석법으로 정량한 결과, 각각 5.25 mg/g, 1.70 mg/g 및 23.76 mg/g으로 확인하였다(Fig. 1). 상기 3종의 지표성분 규격 및 함량은 한국기능식품연구원 시험기관에서 추가로 검증하였다.

천연소재의 *in vitro* 위보호 효능 검증

천연소재 3소재(RC, UM 및 GJ) 추출물의 위점막 손상 시 위내 염증요인 억제에 의한 위 보호 효능을 밝히기 위하여 3소재의 anti-oxidation, anti-neutralizing, total acidity (gastric acid secretion inhibition) 및 anti-lipid peroxidation을 측정하여 위산 분비 억제 효능 검증을 하였다 (Fig. 2A, B, C and D)

Anti-oxidant (항산화) 효능을 측정

본 연구에서는 Anti-oxidant (항산화) 활성을 측정하기 위하여 DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 측정하여

확인하였다(Fig. 2A). 위염 발생 시 증가하는 위내 염증 반응을 줄여줄 수 있는 항산화 활성의 측정을 free radical 인 DPPH를 측정하여 확인하였다. DPPH는 수용성 free radical donor로서 항산화 물질에 작용, free radical을 내어 주어 색깔이 변한다. 항산화능은 neutrophil에서 유래한 ROS에 의한 위점막 손상을 막아준다. 3종의 천연추출물 RC, UM, GJ 모든 추출물에서 75 µg/ml 농도 이상부터 DPPH 저해율이 50%이상 되는 것이 확인되었다. 대표적인 항산화 물질인 ellagic acid보다 좋은 결과를 보이며, 임상용 제조 RC, UM, GJ 모두 DPPH를 저해시킴으로 강력한 항산화 효과를 가지는 것을 알 수 있다.

Acid-neutralizing (위산중화능) 효능 측정

위내의 중화에 의한 위보호 효능을 측정하기 위하여 acid-neutralizing capacity (ANC) 측정실험을 실시하였다(Fig. 2B). 본 연구에서는 위 내에서 과다하게 분비된 위산을 중화시키는 능력을 확인하였다. 항산화 작용은 위 보호에 커다란 역할을 하며 또는 역류성 식도염 보호에 좋은 효능을 보임이 알려지고 있다. 위산중화능 기작은 위액의 HCl을 중화시키므로 pepsin의 활성화를 막으며, pepsin의 활성을 줄이는 효능을 보여 위염의 증상을 막아주는 현상을 보인다. 본 연구에서는 NaOH를 활용하여 위액의 HCl을 중화시키는($\text{HCl} + \text{NaOH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Na}^+ + \text{Cl}^-$ 이온 상태) 천연물(RC, UM, GJ)의 영향에 대한 실험을 실시하였다. GJ추출물이 약 46.67% 제산력을 보이는 것을 확인하였다. RC와 UM은 각각 20.5%, 29.2%의 약한 제산력을 보였다. 따라서 GJ추출물의 강한 제산력으로 위내 과분비된 위산을 중화시켜 위를 보호하는데 큰 역할을 할 것으로 기대된다(Fig. 2B)

위산분비 억제 효능 측정

In vitro 연구에서 천연물 처리에 의한 total acidity를 측정하여 위산 분비 억제 효능 검증하였다(Fig. 2C). 본 연구에서는 RC, UM, GJ 및 혼합시료인 RUG-com의 위액 산도에 미치는 효능을 검증하여, 위산분비 억제에 의한 위 손상을 막아주는 효능을 지님을 증명하였다. 위산은 위염, 위궤양 및 역류성 식도염의 주원인이 되므로 위액의 총 산도를 낮추는 것이 가장 중요하다. 본 연구에서는 위 손상 후 RC, UM, GJ 및 RUG-com에 투입에 따른 조절 효능을 측정하였다. DATA에서 확인할 수 있는 바와 같이 RC, UM, GJ 및 RUG-com에 의한 위액의 총 산도가 대조군에 비해 유의적으로 낮추어 졌음을 알 수 있다. 이제 본 연구에서는 RUG-com의 위액 산도에 미치는 효능을 검증하여, 위산 분비 억제에 의한 위 손상 개선에 기여함을 증명하였다(Fig. 2C).

Anti-lipid peroxidation 효능 측정

천연물 복합소재(임상용)의 anti-lipid peroxidation을 측정하기 위하여 TBAR (thiobarbituric acid reactive substance) 분석을 실시하였다(Fig. 2D). Lipid peroxidation은 세포와 조직에서 산화스트레스(oxidative stress)의 지표로 사용되고 있다. Lipid peroxidation 과정에 막지질이 파괴되고, 과산화지질이 생성되는데, 이러한 과산화 지질은 MDA (malondialdehyde)로 분해되며, MDA는 과산화지질 대표마커로 이용된다. TBAR은 lipid peroxidation screen 방법으로 MDA가 TBA (thiobarbituric acid)와 반응하여 결합하는 MDA-TBA 결합체를 측정함으로써 lipid peroxidation을 측정한다. 본 연구에서는 RC+UM+GJ complex 시료의 농도별에 따라 TBARX가 감소함을 증명하였다(Fig. 2D). *In vitro* 실험에서 임상용 제조 3종 천연추출물의 anti-oxidation activity, anti-neutralizing capacity 및 총산화능(total acidity) 감소 및 anti-gastric acid secretion에 의한 위산 분비 억제 효능 측정을 하였으며, 3종 복합 추출물(RUG-com)의 TBAR 측정에 의한 anti-lipid peroxidation 효능을 측정하였다. 3종 천연 추출물의 위 건강 보호 기능성을 감지하여, 본 실험에서는 3소재의 위건강(위염, 위궤양, 역류성식도염 억제 및 *Helicobacter pylori* 억제) 효능을 검증하는 실험을 실시하였다.

HCl-Ethanol 모델에서의 위염 억제 활성

미성숙 산딸기, 유백피 껌질, 치자 열매 추출물의 동결 건조 분말 및 이들의 혼합물의 위염 억제 효능은 이미 실험실 제조 소재로서 확인한 바 있으므로[26], 임상용 제조 개별소재(RC, UM, GJ) 및 복합제제인 RC+UM, RC+GJ 및 LS-RUG-com의 HCl/Ethanol 모델에서의 위염 억제 활성을 평가하였다. 개별 식물 추출물(RC, UM, GJ) 및 복합 추출물(RC+UM, RC+GJ 및 LS-RUG-com)의 HCl/EtOH 유도 위염 억제 효능은 Fig. 3에 기재되어 있다. HCl/EtOH 투여 후에 위내 표면에 많은 손상이 이루어지며(Fig. 3A (a)), 천연물 투여 시 위 손상이 감소됨을 알 수 있다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 RC, UM, GJ 처리 시 lesion index가 각각 61.23 ± 1.81 , 80.08 ± 2.18 및 62.32 ± 3.15 로 나타났다. 또한 RC+UM 및 RC+GJ 처리 시 52.17 ± 1.87 및 38.78 ± 2.17 로 나타났으나, LS-RUG-com 처리 시 강력한 위염 억제 효능을 보였다(Fig. 3). 실험실 조건에서 제조된 미성숙 산딸기, 유백피 껌질 및 치자 열매 추출물을 각각 3:1:2 (w/w/w)로 혼합하여 150 mg/kg 용량으로 투여한 경우 3종의 시료를 혼합시켰을 때 lesion index가 23.34 ± 0.91 mm로 대조군과 비교 시 79.1%의 위염 억제 활성을 나타냄을 확인하였다. 한편 본 연구의 임상용 복합제제 LS-RUG-com의 경우 HCl/Ethanol 투여에 의한 위 손상을 현저하게 감소시켰으며(Fig. 3A), lesion index는 26.32 ± 1.87 mm를 나타내어 무처리군의 lesion index 112.37 ± 11.20 mm에 비하

여 76%의 강력한 위염 억제 효능을 보이는 것을 알 수 있다(Fig. 3C).

Indomethacin 유도성 위궤양 억제 활성

실험실 규모에서 제조한 미성숙 산딸기, 유백피 껍질 및 치자 열매 추출물을 각각 단일 또는 다양한 조합으로 처리한 경우 위궤양 발생 감소효능을 확인[26] 한 바 있다. 본 연구는 임상용 제조의 개별 식물 추출물(RC, UM, GJ) 및 복합 추출물(RC+UM, RC+GJ 및 LS-RUG-com)의 indomethacin 유도 위궤양 억제 효능은 Fig. 4에 기재되어 있다. Fig. 4A에 나타난 바와 같이, indomethacin 처리 시 위내 표면에 많은 손상이 이루어지며(Fig. 4A (a)), 천연물 투여시 위 손상이 감소됨을 알 수 있다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 임상시료로 제조된 RC, UM, GJ 처리 시 lesion index가 각각 60.01 ± 2.32 , 73.23 ± 1.78 및 64.78 ± 1.78 로 나타났다. 또한 RC+UM, RC+GJ 처리 시 강한 lesion index 저하를 볼 수 있다. 본 실험에서 개별소재 처리 시 항 위궤양의 lesion index가 감소를 보이며 LS-RUG-com 처리 시 강력한 위궤양 억제 효능을 보였다(Fig. 4). 본 연구의 임상용 복합제제 LS-RUG-com의 위궤양 억제활성을 평가하였으며 그 결과 LS-RUG-com 처리는 indomethacin 에 의한 위 손상을 유의미하게 감소시켰으며(Fig. 4A), lesion index는 12.5 ± 16 mm를 나타내어 무처리군의 lesion index 121.72 ± 3.19 mm에 비하여 90.8%의 위궤양 발생 억제 효능을 나타내었다(Fig. 4B). 이러한 효과는 cimetidine (100 mg/kg) 처리군의 lesion index 23.0 ± 1.35 mm, 81.1%의 위궤양 억제활성보다, LS-RUG-com의 위궤양 발생 감소효과가 우수함을 제시하고 있다(Fig. 4).

역류성 식도염 억제 활성

유문-전위부 결찰수술을 통해 역류성 식도염을 유발하고, RUG-com이 역류성 식도염에 미치는 영향을 평가하였다. 역류성 식도염은 위액의 산도 증가, 위액 양의 증가, pepsin 분비 증가 등에 의하여 위식도 염증(esophageal inflammation)이 증가하여 관련 증상을 악화시키는 밝혀지고 있다. Fig. 5A 및 Fig. 5B에서 알 수 있듯이 omeprazole 처리 및 LS-RUG-com 처리 시 위 손상 및 식도 조직 손상이 현저히 감소됨을 확인하였다. 한편 위액 pH 경우, 무처리군(normal), 결찰수술만 진행한 처리군(control), omeprazole 처리군 및 LS-RUG-com 처리군에서 각각 2.2 ± 0.08 , 2.4 ± 0.21 , 4.9 ± 0.36 및 5.0 ± 0.78 를 나타내었다. 반면, RC, UM 및 GJ 단독 처리군에서는 각각 3.0 ± 0.41 , 2.6 ± 0.22 및 3.8 ± 0.28 를 나타내어, 산딸기, 유백피, 치자 단독 처리보다는 LS-RUG-com이 역류성 식도염 모델에서 위산 조절 능력이 우수함을 확인하였다(Fig. 5C). 한편 Esophageal mucous protection ratio 계산 결과, 무처리군에 비해 omeprazole 처리군에서는 $82.0 \pm 1.27\%$ 의 보호효과가 나타났으며,

LS-RUG-com 처리군에서는 $84.0 \pm 1.63\%$ 의 보호효과를 확인하였다(Fig. 5D). 반면 RC, UM 및 GJ 단독 처리군에서는 각각 $62.0 \pm 1.27\%$, $41.0 \pm 1.78\%$ 및 $51.1 \pm 0.72\%$ 의 보호효과를 나타내었다. 이러한 결과는 LS-RUG-com이 역류성 식도염 모델에서 위 및 식도 손상을 효과적으로 방지할 수 있음을 의미하고 있다. 또한 위액의 pepsin 함량을 측정 한 결과 무처리군(normal), 결찰수술만 진행한 처리군(control), omeprazole 처리군 및 LS-RUG-com 처리군에서 각각 20.2 ± 0.78 , 614.0 ± 4.78 , 282.1 ± 5.21 및 402.0 ± 6.32 mole/6 hr를 나타내었다. 반면, RC, UM 및 GJ 단독 처리군에서는 각각 512.2 ± 2.87 , 522.1 ± 0.31 및 510.3 ± 4.78 mole/6hr를 나타내어, 산딸기, 유백피, 치자 단독 처리보다는 LS-RUG-com이 역류성 식도염 모델에서 pepsin 분비를 효율적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 5E).

Esophageal tissue의 TNF- α 및 IL-1 β 의 단백질 발현 측정

상기의 역류성 식도염 유발모델의 식도 조직을 이용하여, 위 식도 염증의 주요 요인인 inflammatory cytokine인 TNF- α 및 IL-1 β 단백질 발현 정도를 측정하였다. 먼저 TNF- α 의 경우, 무처리군(normal), 결찰수술만 진행한 처리군(control), omeprazole 처리군 및 LS-RUG-com 처리군에서 각각 18.2 ± 1.12 , 48.7 ± 0.78 , 26.1 ± 1.26 및 24.7 ± 1.78 pg/mg-tissue을 나타내었다. 반면 RC, UM 및 GJ 단독 처리군에서는 각각 37.2 ± 0.87 , 39.1 ± 2.36 및 38.8 ± 2.78 pg/mg-tissue을 나타내어, 산딸기, 유백피, 치자 단독 처리보다는 LS-RUG-com이 역류성 식도염 모델에서 식도 염증 발생에 주요인자인 TNF- α 단백질 발현을 효율적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 6A). 또한 IL-1 β 의 경우, 무처리군(normal), 결찰수술만 진행한 처리군(control), omeprazole 처리군 및 LS-RUG-com 처리군에서 각각 18.4 ± 1.17 , 42.7 ± 1.87 , 21.8 ± 0.87 및 22.3 ± 0.78 pg/mg-tissue을 나타내었다. 반면, RC, UM 및 GJ 단독 처리군에서는 각각 34.2 ± 0.93 , 33.2 ± 1.62 및 40.2 ± 2.32 pg/mg-tissue을 나타내어, 산딸기, 유백피, 치자 단독 처리보다는 LS-RUG-com이 역류성 식도염 모델에서 IL-1 β 단백질 발현을 효율적으로 억제함을 확인하였다(Fig. 6B). 상기의 결과들은 LS-RUG-com이 위 및 식도의 조직손상 억제 및 위, 식도 염증억제에 효과적으로 작용하여, 위염, 위궤양 및 역류성 식도염의 예방 치료 소재로서 사용 가능성을 제시하고 있다.

복합 천연추출물의 *Helicobacter pylori* 억제 효능

4주된 Balb/c mice를 이용하여, 24시간 절식 후 *H. pylori*를 경구 투여하였다(0.5 ml, 2×10^8 CFU/mice, $n=7$ /group). Table 1에서 보는 바와 같이 7 group으로 나누어 실험을 실시하였다. 4주 후부터 RC, UM, GJ 및 RC+UM, RC+GJ 및 LS-RUG-com를 투여하였으며, *H. pylori* 투여 8주 후 모든 실험 mice를 수술하고 위를 절제하여 *H. pylori* 개체

수를 측정하였다. Table. 1에서 보는 바와 같이 *H. pylori* 감염 Balb/c mice에서 천연물 처리 후 stomach내의 colony forming unit을 조사한 결과, LS-RUG-com / RC+UM+GJ (75+25+50 mg/kg) 처리군에서 CFU가 가장 낮음을 보여 주고 있다. 이러한 이유로 3종 천연 추출물 활용시 일부 위장 장애의 원인이 되는 *H. pylori* 억제로 위보호 효능을 보임을 입증하였다(Table 1). 또한, *H. pylori* 감염 동물모델에서 단일, 복합 천연물 처리시 H&E 염색에 의한 위 조직 변화도 측정하였다(Fig. 7). 본 실험에서는 RF, UL, GJ 추출물이 위에서 inflammation의 원인인 immune cell을 억제 시킴을 예측하였다. 실험결과 RC+UL+GJ의 histology score가 0, 즉, 정상에 가까운 histology를 보였다. GJ 처리결과 거의 정상에 가까운 histology를 보인다. 이 현상은 GJ가 항 헬리코박터 효과보다는 조직 회복 능력이 뛰어난 것을 알 수 있다(Table 1에서 GJ의 항 *Helicobacter* 효능이 약함을 보여주고 있다). *In vitro* 실험의 결과와는 반대로 본 실험에서 GJ의 결과가 CFU 및 inflammatory score에서 낮게 나온 것을 보면, GJ 자체가 직접적인 항 헬리코박터 효과보다는 헬리코박터균에 의해 손상된 위 조직에 직접 작용하여 inflammatory score를 낮추거나, 위 손상 조직의 정상화를 보일 수 있다. 위염과 위궤양의 일차적 발병 인자로 알려진 *H.pylori*의 생육을 억제하고, urease 산물인 암모니아의 축적에 의한 위점막 손상을 완화시킬 목적으로 단일(RC, UM, GJ) 및 복합소재(RUG-com)를 처리, urease 활성도를 측정하였다. *H. pylori*를 4주간 감염시킨 군을 기준으로 하였을 때 8주간 감염시킨 군에서 urease activity가 2배 이상 증가하였으며, 4주간 감염시키고 4주간 약물을 처리하였을 때 urease activity가 크게 감소하는 것을 확인하였다. 3가지 식물 추출물 혼합 투여군에서는 urease activity가 낮은 urease activity 저해를 확인할 수 있었다(Fig. 8).

결론

본 연구에서 사용된 산딸기(RC), 유백피(UM)와 치자(GJ)는 동양사회에서 잘 알려진 여러 종류의 위장장애 치료에 관여하는 민간 의약품 소재로 활용되고 있다. 본 연구에서는 본 식물들의 단일 또는 복합 소재로 사용 시 HCl/EtOH 처리에 의한 위염, indomethacin 처리에 의한 위궤양 및 식도역류, 식도점막 손상에 의한 역류성 식도염을 억제시키는 위보호 효능에 관한 연구이다. 이외에 TNF- α , IL-1 β 및 헬리코박터 억제에 대한 실험을 실시하였다. HCl/EtOH 유도 실험에서 150 mg/kg의 RC+UM+GJ (75:25:50) 복합 소재 처리 시 HCl-EtOH 처리에 의한 위염 유도 rat model에서 76%의 위염 억제 효능을 보였다(lesion index; HCl/EtOH, 112.7 \pm 3.19, RC+UM+GJ; 28.32 \pm 4.36). 역류성 식도염 실험에서는 RC+UM+GJ (RUG-com) 복합소

재 처리군에서 조직학적으로 위손상 및 위점막 손상의 회복을 증명하였다. 이러한 실험으로 RC+UM+GJ/RUG-com (75+25+50 mg/kg) 복합소재가 위식도역류에 대한 점막의 손상을 억제하는 효능을 증명하였다. 또한, rat model에서 위식도 조직에서 항염증 효능을 측정하기 위하여 TNF- α 및 IL-1 β 양이 유의하게 감소하는 것을 증명하였으며, 헬리코박터 감염 Balb/c mice에서 복합소재의 헬리코박터 저해효능도 증명하였다. 또한 복합 천연 소재에 의한 위 조직 변화 및 *H. pylori* 감염 마우스의 urease 억제 효과도 확인하였다. 이외에 복합소재의(DPPH 활용) 항산화 활성, 지질과산화 억제 및 위산의 중화 효능도 밝혔다. 이러한 연구의 입증으로 3종의 천연 복합소재(RC+UM+GJ)는 인체의 위 및 관련 부위의 손상을 처리 및 보호해주는 유의한 위보호 소재임을 증명하였다.

Acknowledgments

This project was supported by Development of Regional Specialized Industries +(R&D)/(S3093558) in ministry of SMEs and startups (MSS).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Alkushi, A. G. R. and Elsayy, N. A. M. 2017. Quercetin attenuates indomethacin-induced acute gastric ulcer in rats. *Folia Morphol.* **76**, 252-261.
2. Bevilacqua, L. A., Obeid, N. R., Yang, J., Zhu, C., Altieri, M. S., Spaniolas, K., Pryor, A. D. 2020. Incidence of GERD, esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal denocarcinoma after bariatric surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* **16**, 1828-1836.
3. Chen, S., Zhao, X., Qian, J., Shi, Y. and Wang, R. 2017. Preventive effect of gardenia jasminoides on HCl/ethanol induced gastric injury in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **133**, 1-8.
4. Choi, W. S., Jang, D. Y., Nam, S. W., Park, B. S., Lee, H. S. and Lee, S. E. 2012. Antiulcerogenic activity of scoparone on HCl/Ethanol-induced gastritis in rats. *Appl. Biol. Chem.* **55**, 159-163.
5. Clarrett, D., M. and Hachem, C. 2018. Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). *Mo. Med.* **115**, 214-218.
6. El-Ashmawy, N. E., Khedr, E. G., El-Bahrawy, H. A. and Selim, H. M. 2016. Gastroprotective effect of garlic in indomethacin induced gastric ulcer in rats. *Nutrition* **32**, 849-854.
7. Fullaton, G., M., McLauchlan, G., Macdonald, A., Crean, G., P. and McColl, K., E. 1989. Rebound nocturnal hyper-

- secretion after four weeks treatment with an H2 receptor antagonist. *Gut* **30**, 449-454.
8. Gyawali, C. P. and Fass, R. 2018. Management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* **154**, 302-318.
 9. Herschcorici, T., Mashimo, H. and Fass, R. 2011. The lower esophageal sphincter *Neurogastroenterol. Motil.* **36**, 819-830.
 10. Jeong, I. D. 2017. A review of diagnosis of GERD. *Kor. J. Gastroenterol.* **69**, 96-101.
 11. Jiang, G. L., Im, W. B., Donde, Y. and Wheeler, L. A. 2009. EP4 agonist alleviates indomethacin-induced gastric lesions and promotes chronic gastric ulcer healing. *World J Gastroenterol.* **15**, 5149-5156.
 12. Jung, J. H., Choi, J., S. and Jeong, C., S. 2014. Inhibitory activities of palmatine from *Coptidis chinensis* against *Helicobacter pylori* and gastric damage. *Toxicol. Res.* **30**, 45-48.
 13. Kim, S. J., Kim, Y. K. and Park, G. Y. 2012. Inhibitory effects of ginger and processed (beopje) ginger extracts on HCl-ethanol induced gastritis in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1528-1533.
 14. Kim, Y. S., Gwon, H. J., Park, J. S., Lim, Y. M. and Nho, Y. C. 2011. Anti-inflammatory activity of herbal extracts through inhibition of TNF- α , IL-6 and IL-8. *J. Rad. Ind.* **5**, 273-277
 15. Lee, J. A., Park, H. J., Kim, S. H., Kim, M. J., Kim, K. J. and Shin MR. 2019. Evaluation of *Evodiae Fructus* extract on the chronic acid reflux esophagitis in rats. *Kor. J. Herbol.* **34**, 15-23.
 16. Lee, J. A., Shin, M. R., Lee, J. H. and Roh, S. S. 2020. Effect of *Coptidis Rhizoma* and *Evodiae Fructus* mixture on esophageal mucosa in chronic reflux esophagitis. *Kor. J. Pharmacogn.* **51**, 349-359.
 17. Lee, J. A., Shin, M. R., Roh, S. S. and Park, H. J. 2021. Effects of a mixture of *Citri Pericarpium* and *Scutellariae Radix* on acute reflux esophagitis in rats. *J. Nutr. Health* **54**, 321-333.
 18. Lee, S. H. and Baik, T, H. 2019. A comparative study on the effects of *Pinellia ternata*, *Zingiber officinale* and *Sobanhatang* on reflux esophagitis. *J. Kor. Med.* **40**, 17-34.
 19. Lee, Y. I., Kim, J. S., Cho, J. S., Kim Hyun Kyu, A. Hussain 2019. Standardized combined plant extract, RUG-com, reduces bacterial levels and suppresses acute and chronic inflammation in Balb/c mice infected with CagA⁺ *Helicobacter pylori*. *Prev. Nutri. Food. Sci.* **24**, 426-433.
 20. Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C. N., Tang, G., Y., Li, S., Gan, R., Y. and Li, H., B. 2018. Natural products for the prevention and management of *Helicobacter pylori* infection. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **17**, 937-952.
 21. Mark F., Michael E. B. 1990. Histamine2-receptor antagonists. Standard therapy for acid-peptic diseases. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1672-1680.
 22. Oh, T. Y., Lee, J. S., Ahn, B. O., Cho, H., Kim, W. B., Kim, Y. B., Surh, Y. J., Cho, S. W. and Hahm, K. B. 2001. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 905-915.
 23. Omura, N., Kashiwagi, H., Chen, G., Suzuki, Y., Yano, F. and Aoki, T. 1999. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* **34**, 948-953.
 24. Orwa, H. and Zaid, M. 2012. Evaluation of the effectiveness of the acid neutralizing contents of selected Palestinian folk medicinal herbs. *American J. Chem.* **2**, 322-325.
 25. Park, J., Bu, Y. M., Bae, J. H., Lee, B. J., Ko, S. J., Kim, J. S. and Ryu, B. H. 2011. Protective effect of *Ulmus macrocarpa* on experimental colitis mice models. *Orient. Pharm. Exp. Med.* **11**, 107-112.
 26. Park, J., Kang, J. H., Abdur Rahman, M., A., Hussain, A., Cho, J., S. and Lee, Y. I. 2019. Gastroprotective effects of plants extracts on gastric mucosal injury in experimental Sprague-Dawley Rats. *Bio. Med. Res. Int.* **3**, 1-11.
 27. Park, J. U., Cho, J. S., Kim, J. S., Md Aziz Abdur Rahman, and Lee, Y. I. 2020. Synergistic effect of *Rubus crataegifolius* and *Ulmus macrocarpa* against *Helicobacter pylori* clinical isolates and gastritis. *Frontiers in Pharmacology* **11**, 1-7.
 28. Peters, Y., Al-kaabi, A., Shaheen, N., J., Chak, A., Blum, A., Souza, R., F., Pietro, M., D., Lyer, P., G., Pech, O., Fitzgerald, R., C. and Siersema, P., D. 2019. Barret esophagus. *Nat. Rev. Dis. Primers* **35**, 18-36.
 29. Richter, J. E. and Rubenstein, J. H. 2018. Presentation and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol.* **154**, 267-276.
 30. Rogers, A. B. 2012. Histologic scoring of gastritis and gastric cancer in mouse models. *Methods Mol. Biol.* **921**, 189-203.
 31. Szabo, S. and Bynum, T. 1998. Alternatives to the acid-oriented approach to ulcer disease: does 'cytoprotection' exist in man? A new classification of antiulcer agents. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**, 1-6
 32. Wallace, J. L. and Sharkey, K. A. 2011. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcers, and gastroesophageal reflux disease. *Pharmacol. Bas. Therap.* **12**, 11-22.
 33. Wang, R., Zeng, X., Liu, B., Yi, R., Zhou, X., Mu, J. and Zhao, X. 2020. Prophylactic effect of *Lactobacillus plantarum* KSFY06 on HCl/ethanol-induced gastric injury in mice. *Food Funct.* **11**, 2679-2692.
 34. Yoo, C. Y., Son, H. U., Kim, S. K., Kim, S. O. and Lee, S. H. 2022. Improved image analysis for measuring gastric ulcer index in animal models and clinical diagnostic data. *Diagnostics* **12**, 1233.

초록 : 산딸기, 유백피, 치자 추출물의 임상용 복합제제의 동물 실험모델에서의 위 질환 억제활성이영익¹ · 아톳삼 후세인¹ · 아지즈 압둘 라만¹ · 손호용² · 윤혜정¹ · 조진숙^{1*}(¹주리즈바이오텍, ²안동대학교 식품영양학과)

산딸기(RC), 유백피(UM)와 치자(GJ)는 위장장애 개선 및 다양한 효능이 보고된 중요한 민간 의약품 소재이다. 본 연구에서는 안전한 천연물을 이용한 실제적 위장 질환 개선제의 상업화를 위해, 상기 3종 천연물 추출물의 분말을 각각 3:1:2(w/w/w) 비율로 혼합하여 제조한 임상용 복합제제(LS-RUG-com)의 위 질환 억제활성을 평가하였다. HCl/EtOH 유도 위염 모델에서 LS-RUG-com (150 mg/kg)은 76%의 우수한 위염 억제 효능을 보였다(lesion index; HCl/EtOH, 112.37±11.20 mm, RUG-com; 26.32±1.87 mm). 또한 indomethacin 처리에 의한 위궤양 rat model에서 LS-RUG-com (150 mg/kg) 처리 시 90.8%의 위궤양 억제 효능을 보여, 임상에서 사용중인 cimetidine (100 mg/kg) 처리구의 81.1% 억제활성보다 우수한 활성을 보였다(lesion index; indomethacin ; 121.72±3.19 mm, RUG-com ; 12.5±1.16 mm). 역류성 식도염 유발 모델에서는 LS-RUG-com (150 mg/kg) 처리군에서 조직학적으로 omeprazole (150 mg/kg)에 비교되는 우수한 위 및 위 점막 손상 회복 활성을 확인하였으며, 위 내용물의 pH 상승, 위점막 보호의 증가 및 위의 pepsin 생성억제를 확인하였다. 또한, 위 식도 조직에서 TNF- α 및 IL-1 β 발현이 유의적으로 감소하여 염증 발생이 억제됨을 확인하였다. 또한 항 *Helicobacter pylori* 효능도 검증하였다. 본 연구는 LS-RUG-com이 인체의 위 관련 질환을 개선하고, 위 및 위 점막 손상을 예방, 개선할 수 있음을 제시하고 있다.