

## 한방 추출물의 역류성 식도염 점막보호 효과에 대한 스크리닝

정일하<sup>1#</sup>, 김민주<sup>2</sup>, 신미래<sup>1</sup>, 노성수<sup>1\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터

### Screening for Mucosal Protective Effects of Various Korean Herbal Medicine Extracts in Gastroesophageal Reflux Disease

Il-ha Jeong<sup>1#</sup>, Min Ju Kim<sup>2</sup>, Mi-Rae Shin<sup>1</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1\*</sup>

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University  
2 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives** : This study evaluates how various traditional Korean herbal medicines assess MUC5AC expression for esophageal mucosal defense and analyzes the associated mechanisms involved in inflammation.

**Methods** : Forty types of traditional Korean herbal medicines were assessed for in vitro antioxidant activities, and the real-time PCR method was employed to analyze MUC5AC expression under pH 4.5 conditions in human esophageal epithelial cells (HET-1A). Eight types of Korean herbal medicines were evaluated for in vitro antioxidant activities, and Reactive oxygen species (ROS) expression was analyzed under bile salt (480  $\mu$ M) and pH 5.5 conditions in human esophageal epithelial cells (HET-1A). Simulation experiments involving bile salts and acidity were conducted for one hour to assess the efficacy of four drugs, and the activities of Mitogen-activated Protein Kinase (MEK), Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B), and Cyclooxygenase-2 (COX-2) were detected through Western blot analysis.

**Results** : Compared to the Normal group, the Control group exhibited higher ROS generation. Such increased ROS levels were significantly reduced by four extracts: Citrus Unshius Pericarpium (CUP), Cnidium officinale Rhizoma (CR), Ginseng Radix (GR), and Linderae Radix (LR). The protein expression of COX-2 decreased with the treatment of LR, CUP, and CR. Particularly, CUP and CR exhibited superior effects compared to other groups in inhibiting the phosphorylation of NF- $\kappa$ B.

**Conclusion** : Based on the results obtained, we have identified drugs that inhibit oxidative stress and inflammation caused by bile acid in esophageal epithelial cells. Our future plans involve comparing and analyzing the efficacy of these herbal medicines through animal experiments.

**Key words** : MUC5AC, Reactive Oxygen Species, HET-1A, NF- $\kappa$ B, COX-2

\*Corresponding author : Seong-Soo Roh, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheon-dong Road, Suseong-gu, Daegu

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-770-6340

· E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Il-ha Jeong, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheon-dong Road, Suseong-gu, Daegu

· Tel : +82-53-770-2258

· Fax : +82-53-770-6340

· E-mail : ddochi04@hanmail.net

· Received : 11 December 2023

· Revised : 27 December 2023

· Accepted : 25 January 2024

## I. 서론

역류성 식도질환 (Gastroesophageal reflux disease, GERD)은 식도와 위에서 나타나는 intestinal metaplasia (IM)로 인해 발생하며, 손상된 편평 상피가 화생형 원주 상피로 대체되는 후천성 대사 이상의 증상을 나타낸다<sup>1)</sup>. 또한, 역류성 식도염 (Reflux esophagitis)으로 인한 강한 산성 위산의 역류는 하부 식도의 상피 내병을 침식하고 가슴 통증을 유발한다. 강한 산성을 나타내는 위산이 역류하게 되면 하부 식도의 상피 내벽을 침식하고 심한 가슴 통증을 나타낸다. 특히, 담즙 역류는 위식도 역류 질환을 가진 사람들에서 흔하며, 이는 이후 바렛식도 (Barrett's esophagus, BE) 발생으로 이어 질수 있다<sup>2)</sup>. 최근 연구에서는 위 및 십이지장 내용물 중에 있는 담즙 산이 바렛식도 (Barrett's esophagus)와 위장화생 (Gastrointestinal metaplasia, GIM)의 발생과 발달을 촉진한다고 알려져 있다<sup>3)</sup>. 정상적인 식도 조직에서 분비된 점액은 위산과 담즙을 포함한 잠재적인 손상으로부터 점막을 보호하는 역할을 한다<sup>4)</sup>. 그러나 바렛식도에서는 담즙산 자극에 의해 MUC5AC 및 MUC2 유전자의 발현이 관찰되었으며, 상피 세포를 보호하는데 중요한 역할을 한다<sup>5)</sup>. 이러한 식도의 보호에 대한 MUC5AC 유신의 발현을 조절하는 메커니즘 및 바렛 원주 상피에서의 병리학적 중요성에 대한 연구가 필요하다.

또한, 담즙산의 십이지장 위식도 역류는 식도염과 바렛 화생 발병에 중요한 역할을 하며, 다양한 담즙산, 농도, 노출 시간에 따라 염증 인자 발현이 다르다는 연구 결과가 있다<sup>6,7)</sup>. 정상 편평 세포와 암종에서 비접합 담즙산과 복합 담즙산 모두 산화 질소를 포함한 활성 산소 종을 증가 시키다고 알려져 있다<sup>8)</sup>.

세포의 확장, 세포 간 간격, 지속적인 염증 및 상피 침식은 GERD 환자의 식도에서 담즙산에 의한 점막 손상과 염증성 증상으로 나타난다<sup>9)</sup>. Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)는 염증과 세포 증식, 증화에 관여하는 중요한 인자로, 식도의 정상 편평상피 내막에서는 존재하지 않지만 GERD 염증이 있는 식도 상피에서 활성화된다. 최근 연구에서 위 상피세포를 담즙산에 노출 시키면 Caudal Type Homeobox 2 (CDX2) 프로 모터가 활성화 되고, NF- $\kappa$ B활성 및 단백질 발현이 증가하고 증가한다고 알려져 있다<sup>10)</sup>. 또한 담즙산은 식도 편평상피 세포와 바렛 상피 세포를 자극하여 식도 염증 반응을 촉진하는 Cyclooxygenase-2 (COX-2)를 생성할 수 있으며, 세포 증식 촉진, 세포 사멸 억제, 혈관 신생 촉진, 종양 세포의 침입 능력 증가, 신체의 면역 기능 억제 등 다양한 염증 질환의 발달에 관여하여, 산화 스트레스와 DNA손상을 일으킬 수 있다<sup>11)</sup>. 이전 연구에 따르면 COX-2는 BE의 발생과 발달에 관여하며,

toll-like receptor 4 (TLR-4)에 자극받은 COX-2는 NF- $\kappa$ B, CDX-2 및 bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) 신호 경로를 활성화시킨다고 알려져 있다<sup>12)</sup>. 이에 BE세포의 COX-2의 역할의 이해에 대한 많은 연구가 필요하다.

본 연구에서는 구성 성분 중 담즙산 (Bile acid)와 산 (Acid)에 의한 IM의 발생 기전 연구를 통하여, 역류성 식도염을 발생 하는 산에 의한 식도 점막을 보호하기 위하여 한의약물중에서 후보 물질을 찾고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 실험에 사용된 20종의 한의약물은 한국 한의약진흥원에서 구입하였으며, 각 20종의 열수 추출물과 ethanol 추출물로 나누어 구입하였다. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, quercetin, 2-Diphenyl-1-icrylhydeazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-hylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, 1,1,3,3-tetramethoxypropane, 2-thiobarbituric acid, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, potassium chloride (KCl), glycerol, protease inhibitor cocktail 및 담즙산 구성물인 glycocholate, taurocholate, taurocholate, glycochenodeoxycholate, taurocholate, glycodeoxycholate, and taurodeoxycholate은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Sodium carbonate와 potassium acetate는 DAEJUNG chemicals&metals (Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Aluminum chloride, L-ascorbic acid, and bicinchoninic acid (BCA) Protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Cellular ROS detection assay kit를 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였으며, Radio immunoprecipitation assay(RIPA) buffer는 Thermo (Ashland, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare (Chicago, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 한 의약품 20종의 추출물의 열수 추출물과 etanol 추출물 간의 유효 성분 차이가 있어 분리하여 실험을 진행하였으며, Table 2에 나타내었다.

Table 1. Lists of herbal medicines used for this study

Medicinal Herb name	Latin name	Family	Abbreviation
甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	Leguminosae	GRR
陳皮	Citri Unshius Pericarpium	Rutaceae	CUP
白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	Compositae	ARA
薄荷	Menthae Herba	Labiatae	MH

Medicinal Herb name	Latin name	Family	Abbreviation
芍藥	Paeoniae Radix	Paeoniaceae	PR
人蔘	Ginseng Radix	Araliaceae	GR
川芎	Cnidii Rhizoma	Umbelliferae	CR
枳實	Ponciri Fructus Immaturus	Rutaceae	PFI
烏藥	Linderae Radix	Lauraceae	LR
梔子	Gardeniae Fructus	Rubiaceae	GF
木香	Aucklandiae Radix	Compositae	AuR
山查	Crataegi Fructus	Rosaceae	CF
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	Compositae	AtR
五靈脂	Trogopterus Faeces	Petauristidae	TF
藿香	Agastachis Herba	Labiatae	AH
麥芽	Hordei Fructus Germinatus	Gramineae	HFG
決明子	Cassiae Semen	Leguminosae	CS
當歸	Angelicae Gigantis Radix	Umbelliferae	AGR
茯苓	Poria Sclerotium	Polyporaceae	PS
黃芪	Astragali Radix	Leguminosae	AsR

## 2. 세포 배양 및 처리

식도 점막 상피 세포 (HET-1A)는 American Type Culture (ATCC, Rockville, MD)에서 분양 받아 실험에 사용하였으며, bronchial epithelial cell basal medium (Lonza Group Ltd, Switzerland)에서 제공되는 recombinant epidermal growth factor (BEGM, Kit Catalog No. CC-3170)를 첨가하여 배양에 사용하였다. HET-1A 세포는 collagen type I, fibronectin과 BSA로 코팅된 plate에  $1 \times 10^5$  의 세포를 배양하고, 산성 배지 처리시에는 1N HCL로 pH 4.5로 산성화하여 사용하였고, 담즙염 처리 시에는 480  $\mu$ M 의 molar ratio로 조절하여 실험을 진행하였다. 담즙산의 molar ratio은 glucocholate, taurocholate, glycochenodeoxycholate, taurochenodeoxycholate, gltcodeoxycholate, and taurodeoxycholate (Sigma-Aldeich, USA)를 20:3:15:3:6:1의 비율로 처리하였다<sup>13)</sup>.

Table 2. Primer sequences used for PCR analysis

mRNA	Sequence (5' → 3')
MUC5AC	sense (5' → 3') CAG CAC AAC CCC TGT TTC AAA antisense (3' → 5') GCG CAC AGA GGA TGA CAG T
GAPDH	sense (5' → 3') TGG GCT ACA CTG AGC ACC AG antisense (3' → 5') GTG GAC GGG TCG ATG TCA C

## 4. Reactive oxygen synthesis (ROS) 측정

qPCR의 결과에 따라 8종의 선별된 추출물의 효능을 확인하기 위해 담즙산과 산의 자극에 반응하여 분비되는 활성 산소종인 ROS를 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)를

## 3. Quantitative Realtime PCR

Real-time PCR로 mRNA 발현을 확인하기 위해 HET-1A 세포를 well당  $1 \times 10^6$  cell이 되도록 분주하고 24시간 배양한 후 40종의 추출물 100  $\mu$ g/mL을 1시간 동안 전 처리하였다. 이 후 정상 배지에 1N Hcl을 첨가하여 pH 4.5로 조정된 배지로 교환하여 30분 동안 반응하였다. 배양이 끝난 후 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척한 다음, Trizol reagent (Invitrogen, USA)을 각 well에 처리하여 total RNA를 분리하고, nano drop으로 정량하였다. Maxima cDNA Synthesis kit (thermofisher)를 이용하여 20°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 조건으로 1  $\mu$ g의 RNA로부터 cDNA를 합성한 다음 SYBR Primix Ex Taq™ (Takara)을 사용하여 qPCR을 시행하여 MUC5AC의 발현량을 측정하였다 (Table 2).

사용하여 측정하였다. 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, 25  $\mu$ M의 DCF-DA를 45분 동안 빛을 차단하여 excitation 485nm, emission 530 nm에서 DCF fluorescence를 Microplate reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf,

ZH, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

### 5. 세포 생존율

세포 생존율 측정은 CCK-8을 이용하여 측정하였으며, HET-1A 세포를 well당  $1 \times 10^4$  cells로 96-well culture plate에 4종의 추출물을 농도별 (50 ~ 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이 후, 배양하던 배지를 제거하고, well당 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 배지를 넣고 10  $\mu\text{L}$ 의 CCK-8을 분주하고 2시간 후 Microplate reader로 450 nm의 흡광도로 측정하였다.

### 6. Western blot 분석

세포에서 단백질을 추출하기 위해서  $1 \times \text{PBS}$ 로 3회 세척한 후, protease inhibitor cocktail이 포함된 RIPA buffer에 lysis 하여 분리하였다. HET-1A 세포에서 p-MEK, MEK, p-NF- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ , COX-2,  $\beta$ -actin 단백질 발현을 측정하기 위하여 BCA protein assay를 이용하여 단백질은 정량 한 후, 10  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 10% SDS-PAGE에 loading하고 PVDF membrane에 transfer 하였다. 준비된 membrane에 5% BSA가 포함된 0.1% TBS-T에 blocking 하여 1차 antibody (1:1000)를 처리하고, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 한 membrane을 0.1% tween-20이 포함된  $1 \times \text{TBS-T}$ 로 10분간 3회씩 세척하였다. 그 후 membrane에 2차 antibody (1:1000)를 2시간 반응시킨 후, 0.1% tween-20이 포함된  $1 \times \text{TBS-T}$ 로 10분간 3회씩 세척하였다. 그리고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) solution에 노출한 후, Chemidoc (Vilber, Loumat, Eberthaedzell, Germany) 감광시켜 해당 단백질 발현을 확인하였다.

### 7. 통계분석

실험에 사용된 값들은 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance(ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences(LSD) test로 사후검정을 실시하여 유의수준  $p < 0.05$ 일 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

## III. 결 과

### 1. 점액분비 인자의 발현

본 연구에서는 한의약물 20종의 추출물을 직접 처리하여 무신 관련 인자인 MUC5AC를 mRNA 수준에서 확인해 보고자 qPCR을 통하여 확인하였다. 담즙산과 산을 처리하지 않은 군을 fold of normal ( $1.11 \pm 0.49$ )로 나타 내었을 때, pH 4.5를 처리한 군에서는 ( $2.87 \pm 0.86$ )으로 증가하였다. 약물을 처리한 군에서는 발현량이 가장 높은 순으로 열수 추출물 중에서는

GRW ( $13.01 \pm 0.60$ ), LPW ( $13.02 \pm 1.15$ ), CUPW ( $12.44 \pm 1.22$ ), ARAW ( $11.21 \pm 0.89$ ), AuRW ( $11.13 \pm 1.77$ ), MHW ( $10.52 \pm 1.50$ )으로 나타났으며, ethanol 추출물 중에서는 CRE ( $13.53 \pm 0.85$ ), AuRE ( $10.41 \pm 1.77$ )순으로 나타났다 (Fig. 1).

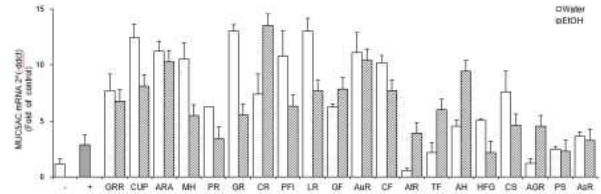


Fig. 1. Screening of Esophageal Cell Protective Effects of 20 Extracts on MUC5AC mRNA Expression in HET-1A Cells. The mRNA levels of up-regulated HET-1A cells treated with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration of extract for 1 hour followed by exposure to hydrochloric acid (pH 4.5) for 30 minutes. All values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3).

### 2. Reactive oxygen spesis (ROS) 측정

체내에서 정상적인 대사 과정 중에 생성되는 ROS는 항산화 효소들에 의해서 제거 되는데 DCF-DA는 쉽게 세포 안으로 확산하여 세포 안의 esterase에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수 분해된다. 이 후, ROS가 존재하는 환경에서 DCF로 빠르게 산화되어 형광을 띄게 된다. 본 실험에서는 담즙산과 산에 의한 산화적 손상을 유발하여 증가된 ROS와 DCF-DA와 반응하여 발생하는 형광 강도 값을 측정하였다. 그 결과 정상군 ( $1.00 \pm 0.04$ )로 fold of normal 하여 확인하였을 때, 양성 대조군은 HET-1A 세포에 담즙산과 산이 처리된 양성 대조군 ( $1.51 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ )로 1.5배 증가 하였으며, 열수 추출물 중에서는 LRW ( $0.86 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ), GRW 열수 ( $1.17 \pm 0.10$ ,  $p < 0.01$ ), CUPW ( $1.21 \pm 0.11$ ,  $p < 0.01$ ), AUW ( $1.40 \pm 0.11$ ), AAW ( $1.44 \pm 0.05$ ) 순으로 나타났으며, ethanol 추출물 중에서는 AuRE ( $0.49 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ ) CRE ( $1.11 \pm 0.10$ ,  $p < 0.01$ ) 순으로 ROS 소거 활성을 나타 내었다. (Fig. 2).

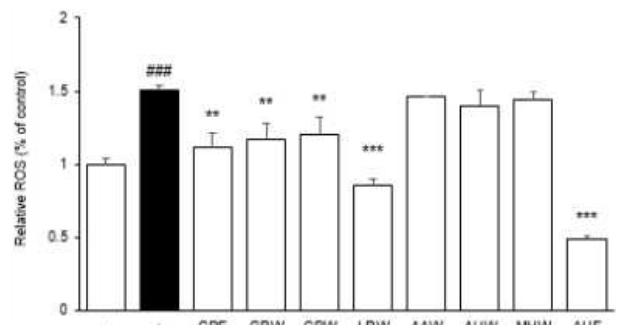


Fig 2. Reactive oxygen species (ROS) and expression in HET-1A cells. Exposure to 480  $\mu\text{M}$  bile acid at pH 5.5 decreased the levels of ROS in esophageal epithelial cells for 8 extracts. All data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ###  $p < 0.001$  vs. Normal,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  vs. Control,  $p < 0.001$  vs. Control.

### 3. 염증 관련 인자의 발현

추출물 중 ROS 생성을 억제하는 약물 8종을 선별하여 western blot을 통하여 확인해 보고자 하였다. HET-1A 세포는 collagen type I, fibronectin 및 BSA로 코팅된 plate에  $1 \times 10^5$ 의 세포를 배양하고, 추출물을 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 전처리하였다. 이후 산과 담즙염 배지를 1N HCL로 pH5.5로 산성화 하고 480  $\mu\text{M}$ 의 담즙산염 배지로 교체하여 3시간 동안 식도염 유발을 하였다.

p-NF- $\kappa$ B의 결과를 분석한 결과, 자극을 주지 않은 군을 정상군 ( $1.00 \pm 0.04$ )으로 하여 fold of normal로 나타 내었 으며, 양성 대조군 ( $1.44 \pm 0.05$ ,  $p < 0.001$ )로 1.5배 증가하였다. CRE ( $1.17 \pm 0.04$ ,  $p < 0.01$ ), GRW ( $1.51 \pm 0.04$ ), CUPW ( $1.02 \pm 0.05$ ,  $p < 0.001$ ), LRW ( $1.26 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ ), ARAW ( $0.99 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ ), AuRE ( $1.26 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ ), MHW ( $1.69 \pm 0.05$ ), AuRW ( $1.21 \pm 0.06$ ,  $p < 0.01$ )으로 확인하였다 (Fig. 3).

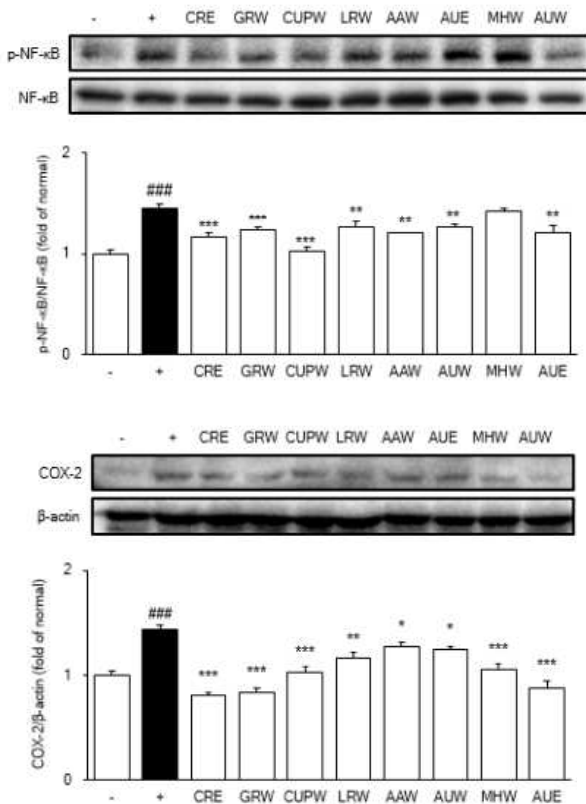


Fig. 3. Protein p-NF- $\kappa$ B and COX-2 were activated in HET-1A cells treated for 3hours with a solution of pH 5.5 + 480  $\mu\text{M}$  bile acids (BA). Western analysis of HET-1A cells lysates with (A) p-NF- $\kappa$ B activation and (B) COX-2 expression in HET-1A cell. All data are expressed as means  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ###  $p < 0.001$  vs. Normal, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control.

### 4. 세포 생존율

정상 상피 세포인 HET-1A에서 8종의 열수 와 ethonol의 농도를 5종의 추출물을 농도별 (50 ~ 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하여 24시간 동안 배양한 결과, CRE, GRW 및 CUPW는 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 독성이 없었으며, LRW는 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 80%의

생존율을 보였다. 그러나 AuRW는 저 농도인 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 독성이 확인되어 실험에 제외하였다. 이 후 실험에 사용되는 농도는 추출물의 안정적인 농도에서 실험을 위해 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 진행하였다 (Fig. 1).

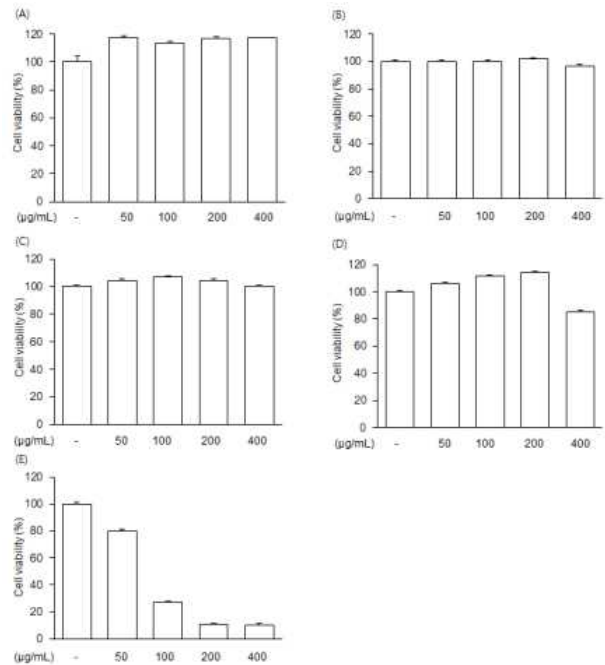


Fig. 4. Effects of 4 extract of Water and EtOH extracts on cell viability in HET-1A cells. The CCK-8 results are presented as the percentage of cell viability of the cells. (A) Cnidium Rhizome; CRW (B) Ginseng Radix; GRW, (C) Citri Unshius Pericarpium; CUPW, (D) Linderae Radix; LRW, and (E) Aucklandiae Radix; AuRW. All data were performed in triplicate and expressed as mean  $\pm$  SEM.

### 5. 농도별 p-NF- $\kappa$ B와 COX-2 측정

#### 1) p-NF- $\kappa$ B와 COX-2

4종의 추출물을 선별하여, 담즙산과 산에 의한 산화적 손상을 유발하여 증가된 p-NF- $\kappa$ B의 발현을 농도 별로 측정하였다. 그 결과, 정상군 ( $1.00 \pm 0.05$ )로 fold of normal 하여 확인하였을 때, HET-1A 세포에 담즙염과 산이 처리된 양성 대조군 ( $1.61 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ )은 1.6배 증가하였으며, CRW의 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.61 \pm 0.04$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.35 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ ), 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.00 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ )로 확인하였다. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 발현이 감소하지 않았으나, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의적인 감소를 확인하였다 (Fig. 5). GRW의 양성 대조군 ( $1.48 \pm 0.06$ ,  $p < 0.001$ )로 1.5배 증가하였으며, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $0.79 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $0.40 \pm 0.00$ ,  $p < 0.001$ ), 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $0.96 \pm 0.07$ ,  $p < 0.001$ )로 확인하였다. 모든 농도에서 유의적인 감소를 확인하였다. CUPW의 양성 대조군 ( $1.78 \pm 0.13$ ,  $p < 0.001$ )로 1.8배 증가 하였으며, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.35 \pm 0.18$ ,  $p < 0.01$ ), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.09 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ), 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.18 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ )로 확인하였다. 모든 농도에서 유의적인 감소를 확인하였다. LRW의 양성 대조군 ( $1.70 \pm 0.15$ ,  $p < 0.001$ )로 1.7배 증가 하였으며, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $1.14 \pm 0.08$ ,  $p < 0.05$ ),

100 µg/mL ( $1.06 \pm 0.07$ ,  $p < 0.01$ ), 200 µg/mL ( $1.00 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ )로 확인하였다. 모든 농도에서 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 5).

또한, 담즙산과 산에 의한 산화적 손상을 유발하여 증가 된 COX-2의 발현을 측정 한 결과, 정상군 ( $1.00 \pm 0.03$ )로 fold of normal 하여 확인하였을 때, HET-1A 세포에 담즙산과 산이 처리된 양성 대조군 ( $1.52 \pm 0.08$ ,  $p < 0.001$ )로 1.5배 증가하였으며, CRW의 50 µg/mL ( $1.42 \pm 0.12$ ), 100 µg/mL ( $1.08 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), 200 µg/mL ( $0.84 \pm 0.02$ ,  $p < 0.001$ )로 확인하였다. 50 µg/mL에서는 발현이 감소하지 않았으나, 100 µg/mL과 200 µg/mL에서 유의적인 감소를 확인하였다. GRW의 양성 대조군 ( $1.82 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ )로 1.8배 증가 하였으며, 50 µg/mL ( $1.92 \pm 0.06$ ), 100µg/mL ( $0.65 \pm 0.01$ ), 20 µg/mL ( $1.49 \pm 0.09$ ,  $p < 0.01$ )로 확인하였다. 200 µg/mL 에서 미비한 감소로 확인되었다. CUPW의 양성 대조군 ( $1.55 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ )로 1.6배 증가하였으며, 50 µg/mL ( $1.00 \pm 0.07$ ,  $p < 0.001$ ), 100 µg/mL ( $0.50 \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ ), 200 µg/mL ( $0.38 \pm 0.01$ ,  $p < 0.001$ )로 확인하였다. 모든 농도에서 유의적인 감소를 확인하였다. LRW의 양성 대조군 ( $1.70 \pm 0.08$ ,  $p < 0.001$ )로 1.7배 증가 하였으며, 50 µg/mL ( $1.77 \pm 0.13$ ), 100 µg/mL ( $1.44 \pm 0.04$ ,  $p < 0.01$ ), 200 µg/mL ( $1.74 \pm 0.06$ )로 확인하였다. 모든 농도에서 100 µg/mL 에서 유의적인 감소를 확인하였다 (Fig. 6).

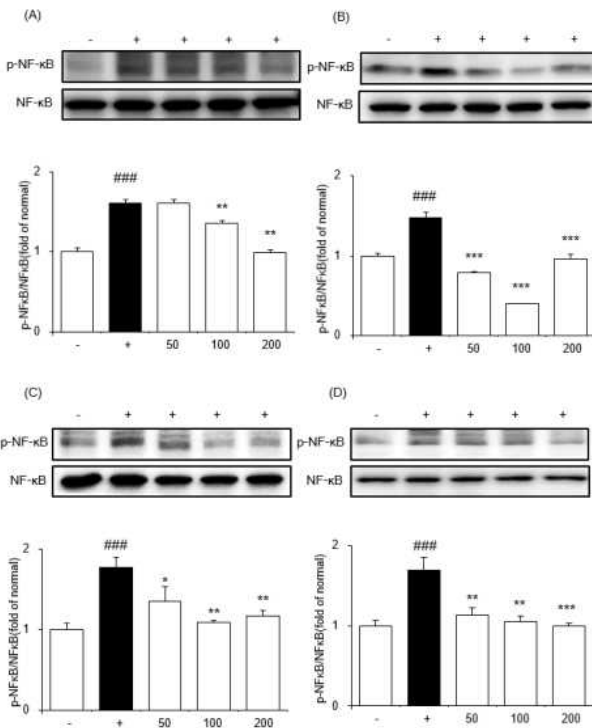


Fig 5. Acidic bile salt increased the expression of p-NF-κB in HET-1A cells through western analysis. HET-1A cells were seeded overnight at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well and the following day were untreated or treated for 3 h with pH 5.5 + 480 µM bile acids (BA). (A) Cnidium Rhizome; CRW, (B) Ginseng Radix; GRW, (C) Citri Unshius Pericarpium; CUPW, and (D) Linderæ Radix; LRW. All values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ### $p < 0.001$  vs. Normal, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Control, \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control. Significance: ### $p < 0.001$  vs. Normal, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control.

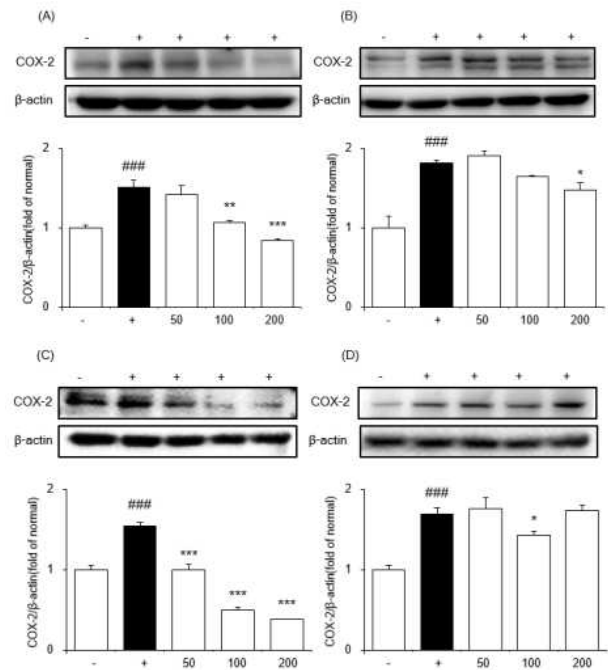


Fig 6. Acidic bile salt increased the expression of COX-2 in HET-1A cells through western analysis. HET-1A cells were seeded overnight at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well and the following day were untreated or treated for 3 h with pH 5.5 + 480 µM bile acids (BA). (A) Cnidium Rhizome; CRW, (B) Ginseng Radix; GRW, (C) Citri Unshius Pericarpium; CUPW, and (D) Linderæ Radix; LRW. All values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ### $p < 0.001$  vs. Normal, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control.

## IV. 고찰

역류성 식도염 (Reflux Esophagitis)은 위의 산성 내용물이 식도로 역류하여 식도 점막을 손상시키는 상태를 나타낸다. 이러한 손상은 역류성 식도염의 증상 중 하나이며, 만약 지속 되면 식도 내막에 염증이 생길 수 있습니다. 따라서 점막보호는 역류성 식도염의 관리와 예방이 중요하다<sup>14)</sup>.

식도에서의 점액 분비는 식도의 건강과 기능에 중요한 역할을 하는 중요한 생리적 현상 중 하나이다. 점액을 보호하고, 음식물의 원활한 이동을 도와주며, 소화 과정에서의 지능적 역할도 수행한다. MUC5AC는 RE에서 분비가 증가하는 경향이 있으며, 산성 소화액이 식도에 접촉하면 상피세포에 염증을 일으키는데 이는 점액의 분비와 관련 되어 진다<sup>15)</sup>. MUC5AC 유전자는 위와 기관지 세포에서 발현되지만 정상식도에서는 발현되지 않는다. 그러나 궤양성 식도염, 특히 미란성 식도염 환자에서는 MUC2와 MUC5AC의 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다<sup>16)</sup>. 역류성 식도염에서 염증으로 인한 상피세포의 반응으로 점액분비와 관련된 연구는 계속 진행 중이며, 이를 통하여 식도의 점막 보호 기능을 향상시키는 새로운 치료 전략을 개발하고 있다<sup>17-19)</sup>.

또한, 식도에서 담즙산에 의한 reactive oxygen species (ROS)생성과의 연관성이 있으며, 식도로 역류되면서 산화 스

트레스가 증가하고, 이로 인한 ROS는 세포 막 구조, DNA, 단백질 등에 손상을 일으킬 수 있다<sup>20)</sup>. 담즙산에 의한 미토콘드리아 손상은 세포 내  $[Ca^{2+}]$  및 NADPH 농도의 감소를 유발하고, 정상적인 세포에서 미토콘드리아는 ATP 생산을 주도하는 전자 수송 사슬에 의해 생성되는 세포 내 ROS의 주요 공급원이 될 수 있다.<sup>21)</sup> 담즙산에 의한 ROS 생성은 NF- $\kappa$ B의 경로를 활성화시키고 COX-2의 발현을 증가시킬 수 있으며, 역류성 식도염 치료에 사용되는 PPI와 같은 약물, 항산화제, 염증억제제 등이 염증과 관련된 인자들의 활성을 억제하고 염증을 감소시키는 역할을 한다<sup>22)</sup>. 이는 위산과 담즙산은 산화 스트레스를 유발하며, 이는 MAPK, NF- $\kappa$ B 및 STAT3와 같은 신호 전달을 변화시킨다고 알려져 있다<sup>23)</sup>.

이 연구에서는 한방에서 사용되는 한의약물 20종을 선별하여 열수와 에탄올 추출물로 나누어 실험을 진행하여, 점막 보호와 예방에 효과적인 추출물을 선별하고자 하였다. MUC5AC의 분비를 측정하기 위해 qPCR을 사용하였으며, 상위 8종의 선별 결과는 다음과 같다: CRE > LRW > GRW > CUPW > ARAW > AuRW > MHW > AuRE. 이 결과는 점막 보호와 역류성 식도염 예방을 위한 한방 추출물 선별에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있다. 이 중에서 CRE가 가장 효과적으로 MUC5AC의 분비를 유발했음을 나타내며, 다른 추출물들도 유망한 효능을 나타냅니다. HET-1A 세포에서 ROS를 측정할 결과, 이 중 상위 4종은 CRE > GRW > CUPW > LRW 순으로 감소함을 확인하였습니다. 이 결과는 다양한 화합물이나 조건에서 발생하는 ROS 양상을 고려할 때 특히 CRE가 가장 효과적으로 ROS를 감소시키는 경향을 보인다는 것을 시사한다. HET-1A 세포에서 NF- $\kappa$ B의 인산화 정도를 평가하기 위해 8종의 약물을 선별한 결과, 상위 4종은 CUPW > GRE > LRW > GRW 순으로 NF- $\kappa$ B의 인산화를 감소시키는 효과가 나타났습니다. 또한, COX-2 발현 정도를 평가하기 위해 8종의 약물을 선별한 결과, 상위 4종은 CRE > GRW > CUPW > LRW 순으로 COX-2의 발현을 감소시키는 것으로 나타났습니다. 이 결과는 특히 CUPW, CRE 및 GRW에서 관련 인자의 발현을 억제하는 데 가장 효과적으로 작용한다는 점을 관찰하였다.

실험 결과에서 확인 되어진 상위 추출물 중 陳皮 (CUP) 추출물은 전통적으로 동아시아에서 구토와 소화불량 치료 등 다양한 소화기계 질병의 치료에 널리 활용해 왔으며, 대식세포에서 전염증성 매개체생성에 대한 효과를 확인한 바 있다<sup>24)</sup>. 또한 川芎 (CR) 추출물은 중국, 일본 및 한국에서 널리 재배되며 오랫동안 전통 의학에서 통증, 염증, 월경이상, 혈압감소 및 항비타민 결핍 질환을 치료하는데 사용되었다<sup>25)</sup>. 마지막으로 人蔘 (GR)은 오랫동안 동아시아에서 약초 치료제로 사용되었으며, 소화불량 치료, 불안, 피로 등 스트레스 요인에 대한 저항력을 강화시키는데 사용한다. 구성 성분 중에 하나인 진세노사이드는 항암과 항염증 활성을 가지고 있어 염증 반응을 억제한다고 알려져 있다<sup>26)</sup>.

이러한 추출물들은 한방 의학 분야에서 염증 관련 반응을 조절하는 데 기여할 수 있으며, 이는 향후 역류성 식도염에 관한 연구 및 치료 전략 개발을 통해 염증성 질환에 대한 효과적인 치료 및 예방을 위한 새로운 방법을 모색하는 데 도움이 될 것으로 기대된다. 또한, 이러한 연구 결과는 전통적인 한방

의학의 지식과 현대 의학의 융합을 통해 혁신적인 치료 전략을 개발하는 데 중요한 역할을 할 수 있다.

## V. 결 론

본 연구는 역류성 식도염의 개선을 위해 한방에 쓰이는 한의약물의 항산화 및 항염증에 관여되어지는 인자들의 억제 효과를 확인함으로써, 20종의 추출물을 열수와 에탄올 추출물을 비교 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 한의약물 20종을 독성이 없는 범위에서 200 ug/mL을 처리하여 점액 분비를 분석하기 위해 PCR로 MUC5AC 측정할 결과, CRE > LRW > GRW > CUPW > ARAW > AuRW > MHW > AuRE 순으로 MUC5AC의 발현량이 증가하는 것으로 나타났다.
2. HET-1A 세포의 생존율을 확인하기 위해 추출물의 200 ug/mL의 처리 농도에서 측정하여 80% 이하의 약물은 제외하고 8종의 약물을 선별하여 진행하였으며, HET-1A 세포에서 ROS를 측정할 결과, 이 중 상위 4종은 CRE > GRW > CUPW > LRW 순으로 감소시키는 것으로 나타났다.
3. HET-1A 세포에서 NF- $\kappa$ B가 인산화 되는 정도를 확인하기 위해 8종의 약물을 선별하여 진행한 결과, 이 중 상위 4종은 CUPW > GRE > LRW > GRW 순으로 감소시키는 것으로 나타났다.
4. HET-1A 세포에서 COX-2가 발현되는 정도를 확인하기 위해 8종의 약물을 선별하여 진행한 결과, 이 중 상위 4종은 CRE > GRW > CUPW > LRW 순으로 감소시키는 것으로 나타났다.
5. 상위 4종을 농도 별로 독성이 없는 범위에서 진행하고자 농도 별로 CCK-8을 진행한 결과, LRW의 400 ug/mL에서 80%의 생존율을 보여 다음 실험에서 4종의 추출물의 농도를 200 ug/mL의 농도 실험에 진행하였다.
6. 상위 4종의 염증 개선 효과로 NF- $\kappa$ B의 인산화와 COX-2의 억제에 100 ug/mL과 200 ug/mL의 농도에서 탁월한 효능을 보였다. 다만 LRW의 COX-2의 감소 효과가 미미하게 나타났다.

위 연구 결과에 대해 종합적으로, 陳皮, 川芎뿐만 아니라 人蔘 추출물에서 뛰어난 항산화 능력이 확인되어, 역류성 식도염 연구에 예방 효과로 추가적인 연구를 진행하고자 한다.

## 감사의 글

이 성과물은 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 (No.2022R1A2B5B0100257112) 및 여성과학공학기술인 R&B 경력복귀 지원사업으로 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원을 받아 연구되었습니다.

## References

- Chai J, Jamal MM. Esophageal malignancy: a growing concern. *World J Gastroenterol*. 2012;18(45):6521-6. doi: 10.3748/wjg.v18.i45.6521.
- McQuaid KR, Laine L, Fennerty MB, Souza R, Spechler SJ. Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(2):146-65. doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04709.x.
- Souza RF, Krishnan K, Spechler SJ. Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(2):G211-8. doi: 10.1152/ajpgi.90250.2008.
- Song S, Byrd JC, Guha S, Liu KF, Koul D, Bresalier RS. Induction of MUC5AC mucin by conjugated bile acids in the esophagus involves the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C/activator protein-1 pathway. *Cancer*. 2011;117(11):2386-97. doi: 10.1002/cncr.25796.
- Warson C, Van De Bovenkamp JH, Korteland-Van Male AM, Büller HA, Einerhand AW, Ectors NL, Dekker J. Barrett's esophagus is characterized by expression of gastric-type mucins (MUC5AC, MUC6) and TFF peptides (TFF1 and TFF2), but the risk of carcinoma development may be indicated by the intestinal-type mucin, MUC2. *Hum Pathol*. 2002;33(6):660-8. doi: 10.1053/hupa.2002.124907.
- Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ. Sodium deoxycholate causes nitric oxide mediated DNA damage in oesophageal cells. *Free Radic Res*. 2009;43(3):234-40. doi: 10.1080/10715760802684211.
- Feagins LA, Zhang HY, Zhang X, Hormi-Carver K, Thomas T, Terada LS, Spechler SJ, Souza RF. Mechanisms of oxidant production in esophageal squamous cell and Barrett's cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(2):G411-7. doi: 10.1152/ajpgi.00373.2007.
- Rafiee P, Nelson VM, Manley S, Wellner M, Floer M, Binion DG, Shaker R. Effect of curcumin on acidic pH-induced expression of IL-6 and IL-8 in human esophageal epithelial cells (HET-1A): role of PKC, MAPKs, and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(2):G388-98. doi: 10.1152/ajpgi.90428.2008.
- O'Riordan JM, Abdel-latif MM, Ravi N, McNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(6):1257-64. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41338.x.
- Huo X, Zhang X, Yu C, Cheng E, Zhang Q, Dunbar KB, Pham TH, Lynch JP, Wang DH, Bresalier RS, Spechler SJ, Souza RF. Aspirin prevents NF- $\kappa$ B activation and CDX2 expression stimulated by acid and bile salts in oesophageal squamous cells of patients with Barrett's oesophagus. *Gut*. 2018;67(4):606-615. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313584.
- Wang DH, Clemons NJ, Miyashita T, Dupuy AJ, Zhang W, Szczepny A, Corcoran-Schwartz IM, Wilburn DL, Montgomery EA, Wang JS, Jenkins NA, Copeland NA, Harmon JW, Phillips WA, Watkins DN. Aberrant epithelial-mesenchymal Hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1810-22. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.048.
- Verbeek RE, Siersema PD, Ten Kate FJ, Fluiter K, Souza RF, Vleggaar FP, Bus P, van Baal JW. Toll-like receptor 4 activation in Barrett's esophagus results in a strong increase in COX-2 expression. *J Gastroenterol*. 2014;49(7):1121-34. doi: 10.1007/s00535-013-0862-6.
- Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Feussner H, Ireland AP, Stein HJ, Siewert RJ. Composition and concentration of bile acid reflux into the esophagus of patients with gastroesophageal reflux disease. *Surgery*. 1997;122(5):874-81. doi: 10.1016/s0039-6060(97)90327-5.
- Niv Y, Fass R. The role of mucin in GERD and its complications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(1):55-9. doi: 10.1038/nrgastro.2011.211.
- Song S, Byrd JC, Guha S, Liu KF, Koul D, Bresalier RS. Induction of MUC5AC mucin by conjugated bile acids in the esophagus involves the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase C/activator protein-1 pathway. *Cancer*. 2011;117(11):2386-97. doi: 10.1002/cncr.25796.
- Van Roon AH, Mayne GC, Wijnhoven BP, Watson DI, Leong MP, Neijman GE, Michael MZ, McKay AR, Astill D, Hussey DJ. Impact of gastro-esophageal reflux on mucin mRNA expression in the esophageal



- mucosa, *J Gastrointest Surg.* 2008;12(8):1331-40. doi: 10.1007/s11605-008-0522-y.
17. Lee JA, Shin MR, Choi JW, Roh SS. Effect of Toosendan Fructus on Chronic Acid Reflux Esophagitis Rats. *Kor. J. Herbol.* 2021;36(3):1-8. doi: 10.6116/KJH.2021.36.3.1.
  18. Shin MR, Lee JA, Kim MJ, An HJ, Roh SS. The protective effect of Areca Semen and Toosendan Fructus mixture in a chronic model of reflux esophagitis. *Kor. J. Herbol.* 2020;35(1):57-68. doi: 10.6116/KJH.2020.35.1.57.
  19. Lee JA, Oh MH, Shin MR, Park HJ. Effect of Rhei Rhizoma and Scutellariae Radix Mixture in Chronic Acid Reflux Esophagitis Rats. *Kor. J. Herbol.* 2021;52(3):177-85. doi: 10.22889/KJP.2021.52.3.177.
  20. Dvorak K, Payne CM, Chavarria M, Ramsey L, Dvorakova B, Bernstein H, Holubec H, Sampliner RE, Guy N, Condon A, Bernstein C, Green SB, Prasad A, Garewal HS. Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Gut.* 2007;56(6):763-71. doi: 10.1136/gut.2006.103697.
  21. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
  22. Jang TJ, Min SK, Bae JD, Jung KH, Lee JI, Kim JR, Ahn WS. Expression of cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux. *Gut.* 2004;53(1):27-33. doi: 10.1136/gut.53.1.27.
  23. Dvorak K, Chavarria M, Payne CM, Ramsey L, Crowley-Weber C, Dvorakova B, Dvorak B, Bernstein H, Holubec H, Sampliner RE, Bernstein C, Prasad A, Green SB, Garewal H. Activation of the interleukin-6/STAT3 antiapoptotic pathway in esophageal cells by bile acids and low pH: relevance to barrett's esophagus. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5305-13. doi: 10.1158/1078-0432.
  24. Kim C, Ji J, Ho Baek S, Lee JH, Ha IJ, Lim SS, Yoon HJ, Je Nam Y, Ahn KS. Fermented dried Citrus unshiu peel extracts exert anti-inflammatory activities in LPS-induced RAW264.7 macrophages and improve skin moisturizing efficacy in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Pharm Biol.* 2019; 57(1):392-402. doi: 10.1080/13880209.2019.1621353.
  25. Jeong JB, Ju SY, Park JH, Lee JR, Yun KW, Kwon ST, Lim JH, Chung GY, Jeong HJ. Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. *Cancer Epidemiol.* 2009;33(1):41-6. doi: 10.1016/j.canep.2009.04.010.
  26. Shen T, Lee J, Park MH, Lee YG, Rho HS, Kwak YS, Rhee MH, Park YC, Cho JY. Ginsenoside Rp1, a ginsenoside derivative, blocks promoter activation of iNOS and COX-2 genes by suppression of an IKKb-mediated NF- $\kappa$ B pathway in HEK293 cells. *J Ginseng Res.* 2011;35:200-8. doi: 10.5142/jgr.2011.35.2.200.