

Original Article

## 역류성 식도염 생쥐 모델에서 해표초, 와릉자, 모려와 Esomeprazole의 치료효과에 대한 비교 연구

송창훈, 백태현

상지대학교 한의과대학 내과학 교실

이 논문은 2017년도 상지대학교 대학원 박사학위 논문임

### A Comparative Study of Sepiae Os, Arcae Concha, Ostreae Concha and Esomeprazole in a Mouse Model of Reflux Esophagitis

Chang-Hun Song, Tae-Hyun Baek

Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Sangji University

**Objectives:** This aim of this study is to compare the reflux esophagitis improvement effects of Sepiae Os, Arcae Concha, Ostreae Concha, and Proton Pump Inhibitor(esomeprazole) through rat experiments.

**Methods:** NO production inhibitory effect was measured by NO production amount and iNOS mRNA expression level in cell lines. iNOS, TNF- $\alpha$  and p-I $\kappa$ B, and serotonin were compared using immunohistochemistry at the rat reflux esophagitis. Reflux esophagitis connection external form, lower esophageal sphincter, and gap were observed and an esophageal inflammatory indicator, IL-6 activity was also evaluated by immunohistochemistry.

**Results:** NO production and iNOS mRNA expression was showed concentration dependent decrease in cell lines treated with Sepiae OS, Arcae Concha, and Ostreae Concha at the experiments of cell lines. In the suppression of iNOS and p-I $\kappa$ B at the rat reflux esophagitis, Sepiae Os treat group(SOT) and Ostreae Concha treat group(OCT) were more effective. In the increase of serotonin at the rat reflux esophagitis, ACT, MT and OCT were more effective. Damage of lower esophageal sphincter, and gap between esophageal keratin and mucosa were observed less at the SOT, ACT, OCT. In the suppression of IL-6 at the rat reflux esophagitis, SOT and OCT were more effective than GE and, SOT was more effective than MT significantly.

**Conclusions:** The anti-inflammatory effect was the best in the SOT and lower esophageal sphincter muscle contraction was the best in the ACT at the rat reflux esophagitis. Sepiae OS was more effective than esomeprazole in the suppression of iNOS, TNF- $\alpha$ , and IL-6.

**Key Words :** *Sepiae Os, Arcae Concha, Ostreae Concha, esomeprazole, reflux esophagitis*

### 서론

위식도 역류질환(GERD: gastroesophageal reflux disease)은 위산이 식도내로 역류하여 발생하는 궤양이나 미란 등의 조직학적 병변뿐만 아니라, 가슴 쓰림

이나 산 역류와 같은 전형적인 증상과 흉통, 만성기침, 천식, 목이물감, 쉼 목소리 등 비전형적인 증상을 포괄 하는데 이중에서 식도에 염증이거나 궤양 등의 병변이 발생한 것을 역류성 식도염이라 한다<sup>1)</sup>. 위식도 역류질환의 유병률은 최근 우리나라에서도 빠르게 증가하여

· Received : 31 May 2018

· Revised : 20 June 2018

· Accepted : 20 June 2018

· Correspondence to : 백태현(Tae-Hyun Baek)

강원도 원주시 우산동 283번지, 상지대학교 부속한방병원 내과학교실

Tel : +82-33-741-9207, E-mail : white@sangji.ac.kr

2000년대 초 3.5%에서 2000년대 말 8.5%로 증가되었고, 2013년도에는 내시경 검사에서 7.6%의 환자가 역류성 식도염으로 진단되었다<sup>2-3)</sup>.

위식도 역류질환의 원인은 다인성으로 위식도 역류가 지나치게 많거나, 식도의 청소능이 저하된 경우, 역류된 위액의 산성도가 증가된 경우, 식도 점막의 민감도가 증가한 경우에 발생한다. 정신적 요소도 원인이 될 수 있으며, 하부식도 조임근과 관련된 병태생리학적 요소들이 주 원인이다<sup>4)</sup>.

주된 치료법으로는 양성자 펌프 억제제, 히스타민 수용체 길항제, 제산제, 위장운동 촉진제, 항 우울제 등의 약물요법 및 외과적 수술요법 등이 있는데, 치료 중단 후 재발되거나 장기간 치료 할 경우 심각한 부작용이 보고되고 있다. 기타 보완할 수 있는 방법으로 하부식도 조임근 작용제나 점막 보호제도 고려되고 있다<sup>5)</sup>.

역류성 식도염은 한의학적으로는 “吞酸”, “吐酸”, “胸痞”, “噎膈”, “吐血”의 病證에서 나타나는 증상과 유사하다. 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆 등으로 辨證할 수 있고, 각각 舒肝和胃降逆, 清化濕痰 和胃降逆, 健脾胃 降逆氣 등의 治法을 활용하는데, 위산 역류의 경우에는 烏賊骨(海螵蛸) 瓦楞子를 隨症加味하여 쓰며<sup>1)</sup>, 牡蠣도 制酸作用이 있어 위산과다로 인한 질환에 양호한 치료효과를 보여<sup>6)</sup> 역류성 식도염에 활용하고 있다.

따라서 저자는 海螵蛸 (Sepiae Os), 瓦楞子 (Arcae Concha), 牡蠣 (Ostreae Concha)의 항염증 효과를 규명하기 위한 세포주 실험으로, Nitric Oxide (NO) 생성량과 염증 효소인 iNOS mRNA 발현량을 측정하였고, 유의한 효과가 있었다. 이에 역류성 식도염에 대한 치료 효과를 밝히고자 역류성 식도염 생쥐 모델을 이용하여 대표적 양성자 펌프 억제제인 esomeprazole<sup>7)</sup>과 각각의 약재들을 비교하여 위식도 연결부 내의 iNOS, TNF- $\alpha$ , p-I $\kappa$ B, serotonin, 조직학적 외부형태, IL-6 를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 세포주와 세포 배양

실험에 사용한 마우스의 RAW 264.7 cell은 KCLB (Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포는 3

7℃, 5% CO<sub>2</sub>incubator(Sanyo,Japan)에서 10% Fetal Bovine Serum (Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin (Sigma, USA), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 실험과정의 모든 세포는 70~80% 정도의 밀도로 계대배양하여 준비하였다.

### 2) 실험동물

오리엔트 (대한민국)에서 분양 받은 태령 7주된 Balb/C 수컷 생쥐를 무균사육장치 내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 대조군 (Ctrl군), 역류성 식도염 유발군 (GE군), esomeprazole 투여 후 역류성 식도염 유발군 (MT군), 海螵蛸 투여 후 역류성 식도염 유발군 (SOT군), 瓦楞子 투여 후 역류성 식도염 유발군 (ACT군), 牡蠣 투여 후 역류성 식도염 유발군 (OCT군) 으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다. 실험기간 동안 고지방식이 (fat, 60%; carbohydrate, 20%; protein, 20%; DIO DIET, USA)를 자유 섭식하였다. 본 연구과정은 동국대학교 IACUC 승인을 받아 시행하였고 (IACUC number: 2015-005), 실험실 동물의 관리와 사용에 대해서는 NIH 가이드라인에 따랐다.

### 3) 약재

실험에 사용된 海螵蛸, 牡蠣는 신흥제약(여주, 한국)에서 구입하였고, 瓦楞子는 삼흥 건재약품사(서울, 한국)에서 구입하였으며, 역류성 식도염 유발 전 14일 동안 200 mg/kg씩 구강투여 하였다. 한방약제에 대한 대조약물인 esomeprazole은 넥시움정 40mg(한국 아스트라제네카, 한국)을 선정하고 역류성 식도염 유발 전 14일 동안 40mg/kg씩 구강투여 하였다.

세포주 실험을 위한 세포 생존률 평가는 tetrazolium-based colorimetric assay (MTT assay)법을 통해 이루어졌다. 총 세포수  $5 \times 10^6$ /ml를 96well plate에 분주하여 세포를 부착시키고, 100ng/ml의 LPS와 海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣 추출물을 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 3 mg/ml)로 첨가해서 24시간 배양하였다. 대조군으로는 무처리된 배양조건을 사용하였다.

배양이 완료된 후 5mg/ml 의 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 시약을 첨가하여 4시간 재 배양하고, 상등액을 제거 후 DMSO를 첨가하여 formazan을 형성시키고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존을 평가는 다음 식으로 계산하였다.

세포생존율 (%) = (시료의 흡광도 / 무처리군의 흡광도) × 100  
세포생존율 평가 결과 0.1~3 mg/ml 농도에서는 생존율의 뚜렷한 차이가 없어 적용농도로 결정하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 세포주를 이용한 NO(Nitric Oxide) 생성 조절 효과 조사

#### ① NO 생성량 측정

海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣가 NO의 생성능에 미치는 영향 분석은 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응을 이용하여 측정하였다. 총 세포수  $2.5 \times 10^5$ /ml를 24 well plate 에 분주하여 세포를 부착시키고, 100 ng/ml의 LPS와 약재 추출물을 농도별(0.5, 1, 2, 3 mg/ml)로 첨가해서 24시간 배양하였다. 대조군으로는 무처리된 배양조건을 사용하였다. 배양이 완료된 후 상등액은 동량의 griess 시약(10 mg/ml 의 sulfanilamide+1mg/ml의 naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 암소에서 10분간 반응시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite 의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

#### ② RT-PCR

염증효소인 induce NO synthase (iNOS) mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 역전사 효소와 유전자 증폭방법을 통해 분석하였다. 총 세포수  $2.5 \times 10^5$ /ml를 6 well plate 에 분주하여 세포를 부착시키고, 100 ng/ml의 LPS와 약재 추출물을 농도 별 (0.5, 1, 2, 3 mg/ml)로 첨가해서 24시간 배양하였다. 대조군으로는 무처리된 배양조건을 사용하였다. 배양이 완료된 후 회수된 세포는 trizol 시약을 1 ml 첨가하고, 200  $\mu$ l 클로로포름(Chloroform)을 첨가하여 혼성화 시켰다. 12000 rpm 10분간의 원심분리과정을 통해 분리된 시료는 상등액 만을 회수하였다. 동량

의 isopropanol을 첨가하여 동일 원심분리과정을 반복하여 핵산침전을 유도하고, 침전물만을 건조하여 초순수에 녹여 사용하였다. 분리된 RNA (1  $\mu$ g) 와 oligi-(dt) primer, Improm-II reverse transcriptase를 이용하여 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 70℃에서 15분 조건으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 대한 유전자 증폭법은 바이오니아사에서 제시하는 primer를 혼합하여 94℃에서 30초, annealing을 위해 55~60℃에서 30초 및 extension을 위해 70℃에서 30초 조건에서 30회를 반복 수행하였다. Agarose gel 1%에서 100 V 전압으로 30분간 전기영동하고, UV 하에서 EtBr을 통해 검출되는 양상을 CCD 카메라로 기록하고 intensity 를 증폭량으로 정의 하였다. 시험회수는 3회 이상의 반복실험을 통해 평균값과 표준오차를 구하였다.

### 2) 역류성 식도염 동물 모델을 이용한 효과 측정

#### ① 추출물 처리 후 역류성 식도염 유발

海螵蛸 (200 mg/kg), 瓦楞子 (200 mg/kg), 牡蠣 (200 mg/kg) 그리고 esomeprazole (40 mg/kg)을 14 일 동안 경구 투여 하였으며, 수술 1시간 전에 마지막 약물투여를 시행했다. Nakamura 등<sup>8)</sup>의 방법을 이용한 역류성 식도염을 유발하였는데, 수술은 24시간 전부터 절식시킨 실험 생쥐를 sodium pentobarbital로 마취시킨 후 복강을 열고 위의 위바닥과 날문 쪽을 실크 실로 결찰 시켰다. 봉합 24시간 후 실험동물을 희생시켜 위식도 연결부 (gastroesophageal junction, GEJ)를 절취하여 실험에 이용하였다. 한편 위식도 연결부 주변부 외부형태의 변화 관찰을 위해 Steroscope (Olympus, Japan)로  $\times 4$ 배율로 촬영하였다.

#### ② 조직절편제작

vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액 (neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류 고정을 실시하였다. 위식도 연결부를 적출한 후 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

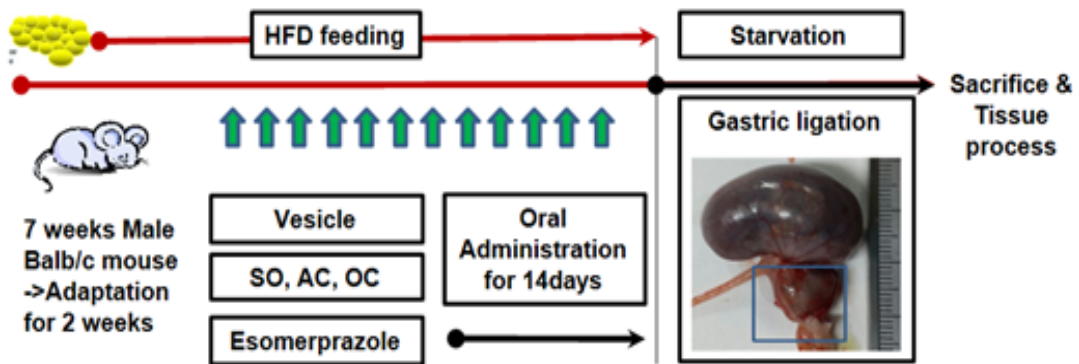


Fig. 1. Experimental design and reflux esophagitis animal model  
Abbreviation. HFD, high fat diet; SO, Sepiae Os; AC, Arcae Concha; OC, Ostreae Concha.

### ③ 조직화학

위식도 연결부내 근육조직의 변화를 관찰하기 위해 phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액 30분간 반응시켰다. 그 다음 tartrazine 용액에서 분별 후 광학현미경 (BX 60, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### ④ 면역조직화학

위 점막내 NO 생성조절 평가를 위해 iNOS을, iNOS 발현과 관련된 전염증효소의 조절평가를 위해 TNF- $\alpha$  와 p-I $\kappa$ B를, 내분비신경물질관련 식도하부 조임근 수축 조절 평가를 위해 serotonin 등을 면역조직화학법을 통해 관찰하였다. GEJ 조직을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 goat anti-iNOS (1:250, Santa Cruz Biotech, USA), goat anti-TNF- $\alpha$  (1:200, Santa Cruz Biotech), goat anti-p-I $\kappa$ B (1:500, Santa Cruz Biotech) 그리고 goat anti-serotonin (1:100, Sigma)에 4  $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체인 biotinylated rabbit anti-goat IgG (1:100, Santa Cruz Biotech)에 실온에서 24시간 동안 반응

하였고, 이어서 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)를 이용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후 hematoxylin으로 대조 염색하였다.

### ⑤ 영상처리, 분석과 통계처리

면역조직화학의 결과는 Image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means  $\pm$  standard error) 했다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 부위를  $\times 400$ 배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상 분석하였다. 본 실험의 통계는 SPSS 24 (SPSS Inc., USA)를 이용하였으며, Kruskal-Wallis test 시행을 통해 유의성 ( $p < 0.05$ )을 검정하고 Bonferroni Correction Method로 사후 검정하였다.

## 실험결과

### 1. 세포주내 NO 생성 억제 조절 효과

#### 1) 海螵蛸의 NO 생성 억제 및 iNOS mRNA 발현 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 99% ( $14.61 \pm 0.16 \mu\text{M} / 2.5 \times 10^5$  cells)로 증가한

반면, 海蝶蠟 처리된 RAW 264.7 세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 海蝶蠟 0.5 mg/ml 처리 시 14%, 1.0 mg/ml 처리 시 22, 2.0 mg/ml 처리 시 40% 그리고 3.0 mg/ml 처리 시 47%가 감소하였다 (Fig. 2). 또한 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 海蝶蠟 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.5 mg/ml에서 8.5%, 1.0 mg/ml에서 20.0%, 2.0 mg/ml에서 53.5%, 3.0 mg/ml에서 91.9%가 감소하였다 (Fig. 2).

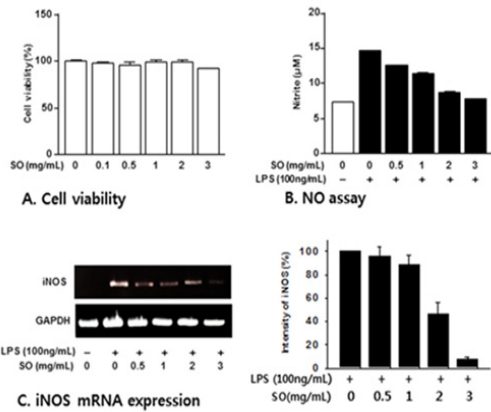


Fig. 2. Inhibition of NO production and iNOS mRNA expression by Sepiae Os (SO)

2) 瓦楞子의 NO 생성 억제 및 iNOS mRNA 발현 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 101%로 증가한 반면, 瓦楞子 처리된 RAW 264.7 세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 瓦楞子 0.5 mg/ml 처리 시 15, 1.0 mg/ml 처리 시 27%, 2.0 mg/ml 처리 시 48% 그리고 3.0 mg/ml 처리 시 55%가 감소하였다 (Fig. 3). 또한 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 瓦楞子 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.5 mg/ml에서 6.8%, 1.0 mg/ml에서 22.8%, 2.0 mg/ml에서 63.9%, 3.0 mg/ml에서 93.1%가 감소하였다 (Fig. 3).

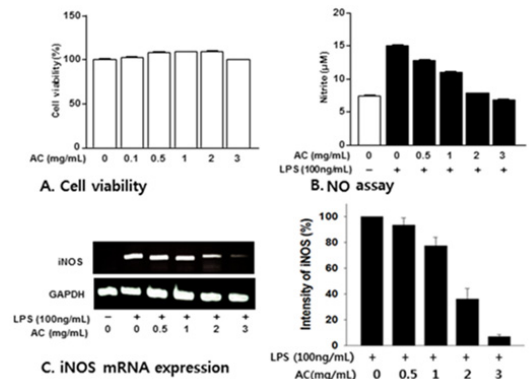


Fig. 3. Inhibition of NO production and iNOS mRNA expression by Arcae Concha (AC)

3) 牡蠣의 NO 생성 억제 및 iNOS mRNA 발현 억제

LPS 처리된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 99%로 증가한 반면, 牡蠣 처리된 RAW 264.7 세포에서는 유의성 있는 농도-의존적 감소를 보였다. 牡蠣 0.5 mg/ml 처리 시 11%, 1.0 mg/ml 처리 시 27%, 2.0 mg/ml 처리 시 48% 그리고 3.0 mg/ml 처리 시 55%가 감소하였다 (Fig. 4). 또한 LPS 자극에 의한 RAW 264.7 세포에서의 iNOS mRNA 발현은 증가하였는데, 牡蠣 처리 후 농도-의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, LPS 자극 시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 0.5 mg/ml에서 10.7%, 1.0 mg/ml에서 20.2%, 2.0 mg/ml에서 72.2%, 3.0 mg/ml에서 86.0%가 감소하였다 (Fig. 4).

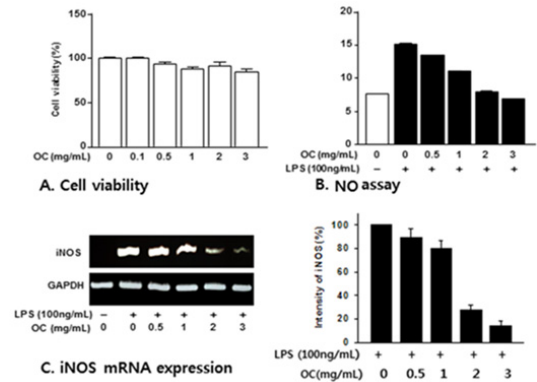
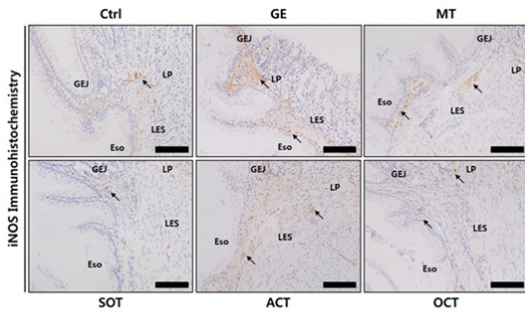


Fig. 4. Inhibition of NO production and iNOS mRNA expression by Ostrea Concha (OC)

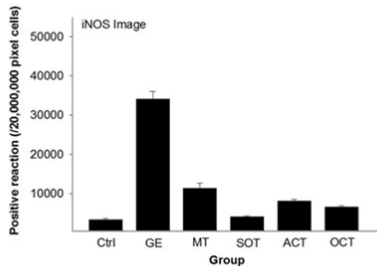
## 2. 역류성 식도염 유도 동물 모델에서 NO 생성 억제 효과

### 1) iNOS 생성 억제

평활근 이완을 유도하는 NO 생성에 관여하는 iNOS의 GEJ내 생성 변화를 조사하기 위해 면역조직화학법을 실시하였다. GE군에서는 높은 iNOS 양성반응을 보였으며, 영상분석 결과 대조군에 비해 양성반응이 919% 증가한 것으로 측정되었다. 치료약물 투여군에서는 GE군에 비해 낮은 양성을 보였는데, SOT군 (88%), OCT군 (81%), ACT (76%) 그리고 MT군 (67%) 순으로 감소되었다 (Fig. 5).



A. iNOS Immunohistochemistry



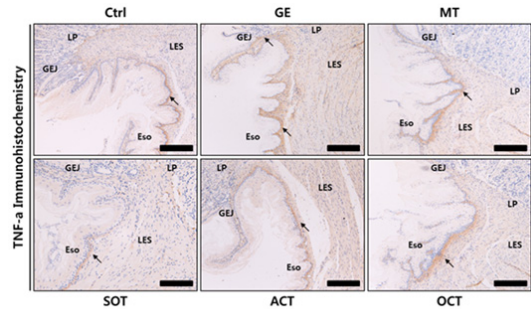
B. iNOS Image analysis

**Fig. 5.** The iNOS positive reaction in gastroesophageal junction (GEJ) with reflux esophagitis. Abbreviation. Ctrl, no reflux esophagitis elicited group; GE, reflux esophagitis elicited group; MT, medicine as esomeprazole treat group before reflux esophagitis elicitation; SOT, Sepiae Os (SO) treat group before reflux esophagitis elicitation; ACT, Arcae Concha (AC) treat group before reflux esophagitis elicitation; OCT, Ostreae Concha (OC) treat group before

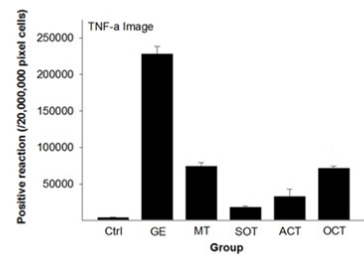
reflux esophagitis elicitation; Bar size, 200 $\mu$ m; arrow, iNOS positive reaction; LES, lower esophageal sphincter; ES, esophagus; LP, lamina propria.

### 2) TNF- $\alpha$ 활성 억제

전염증 cytokine인 TNF- $\alpha$  활성 변화를 조사하기 위해 면역조직화학법을 실시하였다. GE군에서는 높은 TNF- $\alpha$  양성반응을 보였으며, 영상분석 결과 대조군에 비해 양성반응이 5253% 증가한 것으로 측정되었다. 치료약물 투여 군에서는 GE군에 비해 낮은 양성반응을 보였는데, SOT군 (92%), ACT군 (86%), OCT군 (69%) 그리고 MT군 (68%) 순으로 감소되었다 (Fig. 6).



A. TNF- $\alpha$  Immunohistochemistry



B. TNF- $\alpha$  Image analysis

**Fig. 6.** The TNF- $\alpha$  positive reaction in gastroesophageal junction (GEJ) with reflux esophagitis

### 3) p-I $\kappa$ B 활성 억제

전염증 cytokine인 NF- $\kappa$ B 활성 변화를 조사하기 위해 p-I $\kappa$ B를 이용한 면역조직화학법을 실시하였다. GE군에서는 높은 p-I $\kappa$ B 양성반응을 보였으며, 영상



분석 결과 대조군에 비해 양성반응이 2154% 증가한 것으로 측정되었다. 치료약물 투여 군에서는 GE군에 비해 낮은 양성반응을 보였는데, SOT군 (91%), MT군 (85%), OCT군 (83%) 그리고 ACT군 (81%) 순으로 감소되었다 (Fig. 7).

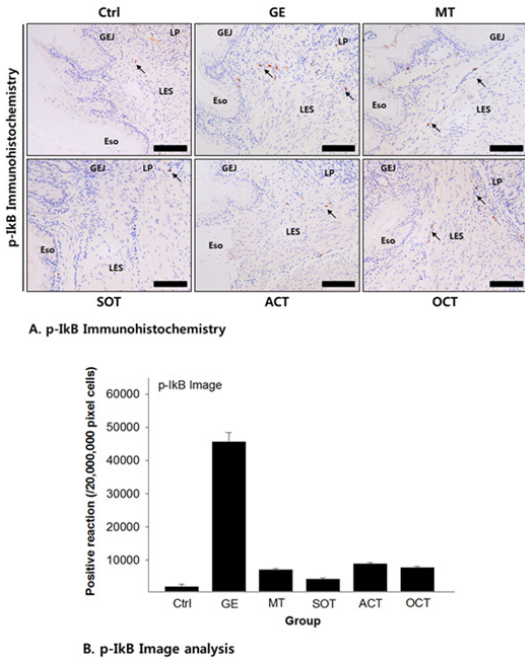


Fig. 7. The p-IkB positive reaction in gastroesophageal junction (GEJ) with reflux esophagitis

### 3. 역류성 식도염 유도 동물 모델에서 내장신경 조절 효과

평활근 수축에 관여하는 신경물질인 serotonin 활성을 조사하기 위해 면역조직화학을 실시하였다. GE군에서는 높은 serotonin 양성 반응을 보였으며, 영상분석 결과 대조군에 비해 양성반응이 244% 증가한 것으로 측정되었다. 치료약물 투여군에서는 GE군에 비해 더 많은 serotonin이 생산되어 높은 양성반응을 보였는데, ACT군 (472%), MT군 (303%), OCT군 (296%) 그리고 SOT군 (207%) 순으로 증가되었다 (Fig. 8).

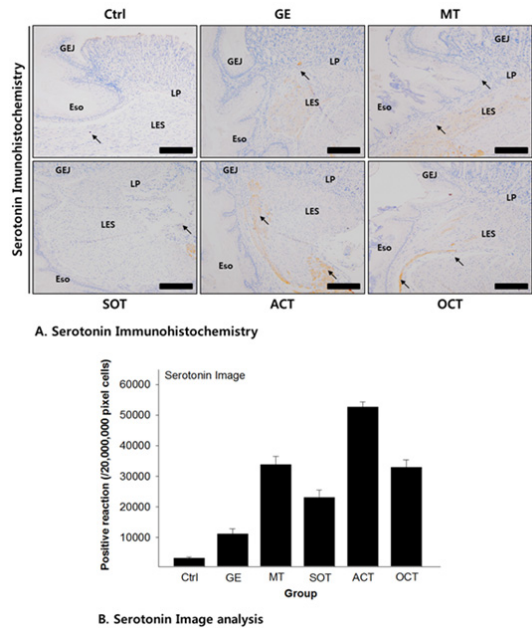


Fig. 8. The Serotonin positive reaction in gastroesophageal junction (GEJ) with reflux esophagitis

## 4. 역류성 식도염 유도 동물 모델에서 GEJ 손상 완화

### 1) GEJ 형태 변화

GE군의 외부형태는 GEJ 주변부에서 심한 출혈성 찰과가 관찰되었다. 약물투여군에서는 정도의 차이는 있으나 GE군에 비해 감소되었다. SOT군이 가장 완화된 것으로 관찰되었다 (Fig. 9).

GE군의 GEJ에서 하부식도 조임근의 일부가 유실되었고, 식도 점막의 첨단부 (apical surface)에서 식도 각질과 점막세포사이 이음 손상에 따른 세포사이 간극이 확인되었다. 치료약물 투여 군에서는 이러한 손상이 적었다 (Fig. 9).

### 2) GEJ내 염증 조절

식도 점막내의 염증지표인 IL-6 활성을 조절하기 위해 면역조직화학을 실시하였다. GE군에서는 높은 IL-6 양성반응을 보였으며, 영상분석 결과 대조군에 비해 양성반응이 1358% 증가한 것으로 측정되었다. 치료약물 투여 군에서는 GE군에 비해 낮은 양성반응

을 보였는데, SOT군 (69%), OCT군 (58%), ACT군 (46%) 그리고 MT군 (36%) 순으로 감소되었다 (Fig. 10).

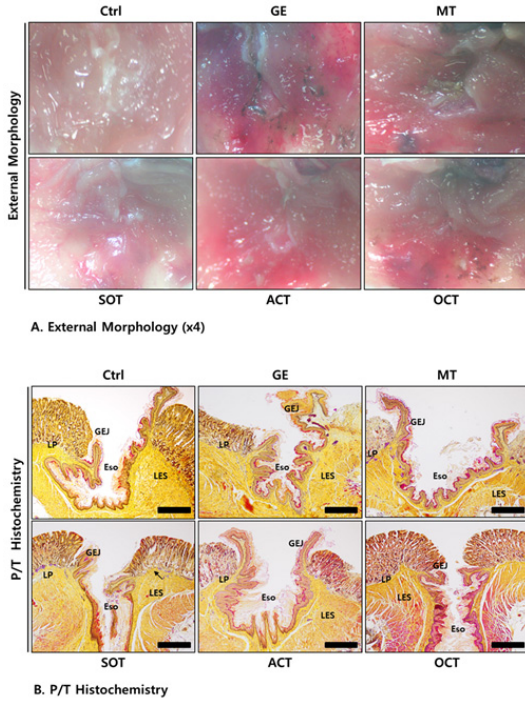
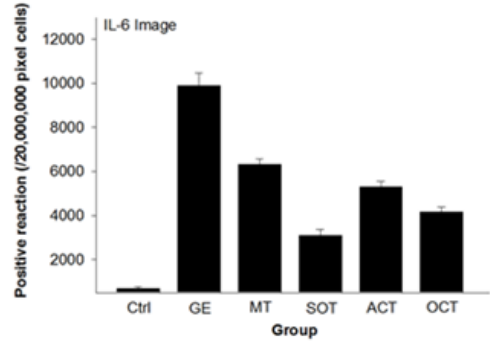
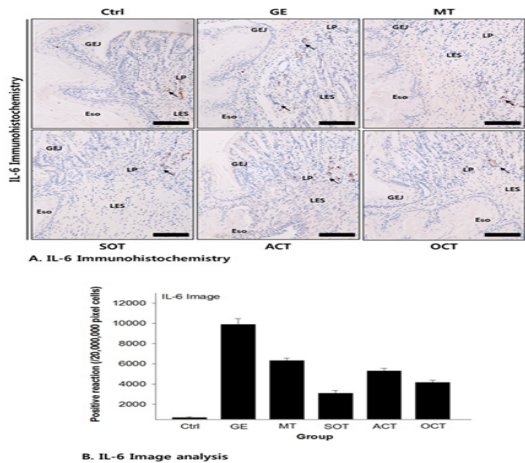


Fig. 9. The improvement effect of hemorrhagic erosion in GEJ by SO, AC, OC and Esomeprazole (a photo  $\times 4$ ; b photo bar size  $200\mu\text{m}$ )



B. IL-6 Image analysis

Fig. 10. The IL-6 positive reaction in gastroesophageal junction (GEJ) with reflux esophagitis

## 고찰

역류성 식도염은 위의 내용물이 분문을 넘어 식도내로 위산이 역류하여 식도에 궤양이나 미란 등의 형태 조직학적 변화를 초래하는 경우를 말한다. 그 원인은 LES(하부식도 괄약근) pressure의 저하, 식도의 연동저하, 위산분비 항진, 위의 연동저하, 중력 등이 있고, 이 중 하부식도 괄약근의 기능저하가 가장 큰 원인이다. 진단은 식도내압 측정으로 LES pressure의 저하를 확인하고, 24 hrs ambulatory ph monitoring( $\text{ph} < 4$ )으로 위 내용물이 역류하는 것을 확인하며, 식도 내시경에서는 식도점막의 발적, 미란, 궤양을 확인한다. 치료는 우선 생활습관을 개선하고, 다음으로 약물요법을 실시한다. 그래도 치료가 안 되면 외과적 요법을 실시한다. 약물요법은, 위산분비 억제제를 위한 H2-blocker나 PPI를 사용한다<sup>9)</sup>. 특히 PPI는 H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase를 억제하여 산분비의 마지막 단계에서 작용하므로 H2-receptorblocker보다 효과가 우수하여, 위식도 역류질환의 일차적인 치료제로 사용되고 있다<sup>10)</sup>.

대표적 PPI제제인 omeprazole은 위식도 역류질환의 표준 치료제로써 오래전부터 사용되어 왔고, 한약과의 비교연구도 종종 보고된바 있다<sup>11-12)</sup>. Omeprazole의 광 이성질체인 esomeprazole은 작용기전은 동일하지만, omeprazole에 비해 약물상호 작용이 비교적



적으며, 대사 과정이 느려서 항 위산분비 효과가 보다 오래 지속 된다<sup>13)</sup>. 그래서 esomeprazole은 최근 가장 많이 사용하는 대표적 PPI제제이다<sup>14)</sup>. 그러나 실제 임상에서는 표준 치료에도 호전되지 않고 증상이 지속되는 PPI 불응성을 흔히 경험하게 된다. 약 10~40%의 환자들은 PPI 치료에 불응성 반응을 보인다<sup>15)</sup>. 또한 대부분 위식도 역류질환은 만성 질환이므로 장기간 유지 요법이 가끔 필요하며 치료를 중지하였을 때 약 80%까지 증상이 재발한다. 또 고가스트린혈증을 유발하고, 비타민 B12와 칼슘의 흡수를 저해시키고, 골반 골절의 위험성을 증가 시킨다<sup>16)</sup>. 그러므로 다른 대안적 치료법이 필요한 상황이다.

한의학적으로 역류성 식도염은 吞酸, 吐酸, 胸痞, 噎膈, 吐血의 범주에 속한다. 원인은 肝胃不和, 痰濕鬱阻, 胃氣虛逆 등으로 나눌 수 있고, 각각 舒肝和胃降逆, 清化濕痰 和胃降逆, 健脾胃 降逆氣를 치료 원칙으로 한다. 위산 역류의 경우에는 海螵蛸(烏賊骨) 瓦楞子 牡蠣를 隨症加味하여 쓴다<sup>17)</sup>. 역류성 식도염 치료효과에 관하여 발표된 국내 한의학적 연구로 김 등<sup>11)</sup>, 허 등<sup>12)</sup>의 연구와 박 등<sup>17)</sup>은 二陳湯加味方 투여 후 항산화효과 및 식도점막 보호 효과를 omeprazole과 비교하였고, 장 등<sup>18)</sup>은 半夏瀉心湯이 위꿈틀운동 조절과 하부식도 조임근 수축 및 위산분비억제에 효과가 있음을 보고하였다. 김 등은 大黃甘草 복합추출물이, 김 등<sup>20)</sup>은 金銀花 물 추출물이, 이 등<sup>21)</sup>은 吳茱萸 물 추출물이 역류성 식도염에 효과가 있음을 각각 보고하였다.

海螵蛸는 無鹹烏賊科 갑오징어의 內殼을 건조한 것으로, 80~85%의 탄산칼슘을 함유하며, 收斂止血, 澀精止帶한다. 위·십이지장 궤양에서 나타나는 胃痛, 泛吐酸水, 궤양출혈을 치료하며<sup>17)</sup>, 制酸劑로서 위산 과다, 위궤양에 유효하다<sup>22)</sup>. 발표된 연구로는 이 등<sup>23)</sup>이 위궤양에 대한 효과를 보고하였다.

瓦楞子是 꼬막, 새꼬막, 피조개의 敗殼을 건조한 것으로, 탄산칼슘과 인산칼슘을 함유하며, 軟堅散結, 消痰化癥한다. 煨用하여 위산과다를 치료하며, 胃痛으로 신물을 토하고 트림하며 심할 때 吐血하는 증상의 치료에 瓦楞子, 烏賊骨, 廣皮를 곁게 갈아 복용한다<sup>22)</sup>. 瓦楞子에 대한 국내 연구발표는 아직 없다.

牡蠣는 굴의 敗殼을 건조한 것으로, 주성분은 탄산칼슘이고, 다양한 무기염을 함유하고 있다. 胛肝潛陽, 軟堅散結한다. 制酸작용이 있어 위산과다로 인한 궤양에 煨用하여 양호한 치료효과가 있다<sup>17)</sup>. 각종 制酸劑로 쓰이는데 胃氣를 고르게 하고 진통하는 작용을 한다<sup>22)</sup>. 국내에 발표된 연구는 김 등<sup>24)</sup>, 허 등<sup>12)</sup>이 각각 小建中湯과 二陳湯에 牡蠣를 가하여 항궤양 효과와 식도 보호 효과를 보고하였고, 박 등<sup>25)</sup>은 牡蠣로부터 conchiolin을 추출하여 항염증효과를 보고하였으며, 이 등<sup>26)</sup>은 牡蠣粉을 加한 처방이 스트레스 관련 호르몬을 조절하는 효과가 있음을 보고 하였다.

이와 같이 海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣가 역류성 식도염의 주증상인 위산역류에 가감하여 쓰임에도 불구하고, 단일 약제에 대한 효과를 비교 연구한 논문은 없었다. 또, 역류성 식도염의 주요 원인이 되는 하부식도 조임근 이완에 대한 단일 약제 효과를 비교한 논문도 없었다.

역류성 식도염의 발병기전은 다양한 원인에 의한 염증과 이에 따른 하부식도 조임근의 이완증가와 수축약화이므로, 전염증효소(pro-inflammatory cytokine)와 전사인자(transcription factor), arachidonic acid metabolites, reactive oxygen and nitrogen species (RONS) 등과 같은 염증반응 조절을 통한 치료법에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>27)</sup>. 따라서 저자는 海螵蛸 (Sepiae Os), 瓦楞子 (Arcae Concha), 牡蠣 (Ostreae Concha)의 효과를 규명하기 위한 세포주 실험을 시행하여, 평활근 이완과 수축 약화에 관여하는 NO 생성량과<sup>28-30)</sup> 전염증 효소의 전사인자인 iNOS mRNA 발현량을 측정하였다<sup>27)</sup>.

海螵蛸 瓦楞子 및 牡蠣 모두 세포주 실험에서 NO 생성량과 iNOS mRNA 발현량의 감소는 3.0mg/ml 에서 가장 많이 감소하는 농도 의존적 감소를 보였으며, 2.0mg/ml, 1.0mg/ml, 0.5mg/ml 순이었다. LPS 처리군 기준으로 농도 2.0mg/ml 이상에서 유의한 감소 효과를 보였다.

이에 저자는 역류성 식도염 생쥐 모델을 이용하여 위식도 접합부(GEJ)내 NO 생성조절 평가를 위해 iNOS를, iNOS 발현과 관련된 전염증효소의 조절평가를 위해 TNF- $\alpha$  와 p-I $\kappa$ B를 면역조직화학법을 통

해 측정하였다. 역류성 식도염 생쥐 모델에서 생쥐 위 바닥과 날문쪽 결찰을 통한 위산의 흐름 장애는 전염 증효소 TNF- $\alpha$  활성을 유도한다<sup>31)</sup>. iNOS를 비롯한 염증효소의 생산은 nuclear factor interleukin-6, fos/jun (AP-1), CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) 그리고 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) 등과 같은 전사인자에 의해 조절 된다<sup>32)</sup>. 특히 NF- $\kappa$ B는 염증성 잘 질환에서 산화스트레스에 의한 염증과 발암과 관련된 유전자의 발현을 조절한다<sup>33)</sup>. NF- $\kappa$ B는 산화적 스트레스가 증가하면 I $\kappa$ B kinase로 알려진 IKK (IKK $\alpha$ ,  $\beta$ )를 활성화시켜 I $\kappa$ B protein의 serine residue를 인산화시킨다. 이 때 인산화된 I $\kappa$ B protein은 ubiquitination 되어 26S proteasom에 의해서 분해되며 (degradation), 세포질에 존재하는 NF- $\kappa$ B는 불활성화된 상태로 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site (consensus sequence: 5'-GGGpNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련 유전자의 발현을 유도한다<sup>34)</sup>. 최근에는 *Cudrania tricuspidata*<sup>35)</sup>, *Cyrenus rotundus*<sup>36)</sup>, *Melia azedarach*<sup>37)</sup>, *Lonicera japonica*<sup>38)</sup>, *Scrophularianing poensis*<sup>39)</sup> 등의 한약제에서 NF- $\kappa$ B 조절제를 찾으려는 많은 연구가 진행 중이다.

iNOS 억제 및 TNF- $\alpha$  억제는 *海螵蛸*군, *牡蠣*군, *瓦楞子*군, *esomeprazole*군 순서로 우수하였고, *海螵蛸*군과 *牡蠣*군이 역류성 식도염 유발군에 비해 우수한 억제 효과를 보였으며, *海螵蛸*군은 *esomeprazole*군보다 억제 효과가 우수하였다.

p-I $\kappa$ B 억제는 *海螵蛸*군, *esomeprazole*군, *牡蠣*군, *瓦楞子*군 순서로 우수하였고, *海螵蛸*군과 *esomeprazole*군이 대조군에 비해 우수한 억제 효과를 보였으며, *海螵蛸*군은 *瓦楞子*군보다 억제 효과가 우수하였다.

역류성 식도염 유도 생쥐 모델에서 식도하부조임근 수축 조절 평가를 위해 평활근 수축에 관여하는 신경물질인 serotonin 등을 면역조직화학법을 통해 관찰하였다. enterochromaffin cells에서 분비되는 Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT)은 내장 신경체계에 중요한 신경전달물질이며, 위산과다에 의해 감소된다<sup>40)</sup>. 5-HT의 감소는 cyclooxygenase

pathway에 의한 prostaglandin (PG) synthesis을 약화시켜 점액장벽기능저하를 초래한다<sup>41)</sup>. 또한 5-HT는 LES의 수축기전에도 관여하는데, 역류성 식도염시 5-HT에 의한 LES의 수축력이 감소한다고 보고되었으며, 본 실험에서 역류성 식도염 유발군에서 5-HT의 감소가 GEJ주변부에서 관찰되어 LES의 수축력 저하가 일어난 것으로 사료된다<sup>42)</sup>.

Serotonin 증가는 *瓦楞子*군, *esomeprazole*군, *牡蠣*군이 역류성 식도염 유발군에 비해 serotonin이 효과적으로 증가였는데, *瓦楞子*군은 *海螵蛸*군보다 더 우수하였다.

위식도 연결부 손상완화 작용을 연구하기 위해 외부 형태를 관찰 하였는데, 역류성 식도염 유발군에서는 심한 출혈성 찰과가 관찰되었고, 약물 투여군에서는 정도의 차이가 있으나 상대적으로 적게 관찰되었으며, 이중 *海螵蛸*군의 손상이 가장 적었다. 광학 현미경을 이용한 관찰에서는 역류성 식도염 유발군의 위식도 연결부에서 하부식도 조임근의 일부가 유실되었고, 식도 점막의 침단부에서 식도 각질과 점막세포사이 이음 손상에 따른 세포사이 간극이 확인되었다. 치료약물 투여군에서는 이러한 손상이 적었다. 식도 점막의 저항력이 높을수록 상피세포가 무결성을 보이므로 위식도 역류 질환 환자에서는 대부분 식도 상피세포 사이 간격이 확장된 소견을 보인다<sup>43)</sup>. 또한 이는 식도 점막의 초기 손상을 증명하는 기준이 된다<sup>44)</sup>.

IL-6는 염증을 유도하는 단백질로써 면역관련 세포를 염증 부위로 모여들게 하는 염증성 사이토카인으로 염증 반응 관련 실험에서 대표적 발현인자로써 사용되고 있다<sup>45)</sup>.

식도 점막내의 염증 지표인 IL-6 활성을 조사하였는데, 역류성 식도염 유발군에서는 가장 높은 IL-6 양성반응을 보였으며, *esomeprazole*군, *瓦楞子*군, *牡蠣*군, *海螵蛸*군 순으로 양성반응을 보였다. 역류성 식도염 유발군에 비해 *海螵蛸*군, *牡蠣*군이 유의하게 높았으며, *海螵蛸*군은 *esomeprazole*군보다도 유의한 효과를 보였다.

이상의 연구로 *海螵蛸*, *瓦楞子*, *牡蠣*는 위의 위바닥과 날문부 결찰로 유발된 생쥐의 역류성 식도염에 대

해 위식도 연결부 점막 손상을 방어하며, 염증을 완화시키고, 하부 식도 조임근 손상을 치료하는 효과가 있었다. 그 기전은 각각의 약제가 NO 생성을 감소시켜 평활근의 이완을 막고<sup>46-48)</sup>, 수축에 관여하는 Serotonin 분비를 촉진시켜<sup>42)</sup> 하부식도 조임근의 기능을 원활히 하기 때문으로 사료된다. 또한, 대표적 약 약 처방제인 esomeprazole 과 비교하여도 더 우수한 효과를 나타내었다. 꾸준히 증가하고 있는 역류성 식도염의 치료에 있어, 현재 중국과 일본에서도 PPI제제 보다 우수한 대체제 개발을 위하여 다양한 방법으로 연구되고 있다<sup>49)</sup>. 향후 海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣 등의 항염증작용과 하부 식도 조임근 강화작용의 추가적인 연구를 통해 PPI제제 보다 우수한 한방약재 개발이 가능할 것으로 보인다.

### 결론

海螵蛸 (Sepiae Os), 瓦楞子 (Arcae Concha), 牡蠣 (Ostreae Concha)가 역류성 식도염에 미치는 효과를 알아보고자, 세포주 실험을 시행하고, 위의 위바닥과 날문부 결찰로 유발된 역류성 식도염 생쥐 모델을 이용하여 위식도 연결부 내의 iNOS, TNF- $\alpha$ , p-I $\kappa$ B, serotonin, 조직학적 외부형태, IL-6를 관찰하였다. 각각의 약제들을 esomeprazole과 비교하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 세포주내 NO 생성 억제 조절 효과는 海螵蛸군, 瓦楞子군, 牡蠣군에서 NO 생성량과 iNOS mRNA 발현량의 감소는 3.0mg/ml 에서 가장 많이 감소하는 농도 의존적 감소를 보였다. LPS 처리군 기준으로 海螵蛸군, 瓦楞子군, 牡蠣군 모두 농도 2.0mg/ml 이상에서 유의한 효과를 보였다.
2. iNOS 생성 억제 효과는 海螵蛸군, 牡蠣군, 瓦楞子군, esomeprazole군 순이었다. 海螵蛸군과 牡蠣군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 海螵蛸군은 esomeprazole군 보다도 유의한 효과를 보였다.
3. TNF- $\alpha$  생성 억제 효과는 海螵蛸군, 瓦楞子군, 牡蠣군, esomeprazole군 순이었다. 海螵蛸군과 瓦楞子군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 海螵蛸군은 esomeprazole군 보다도 유의한 효과를 보였다.

海螵蛸군과 瓦楞子군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 海螵蛸군은 esomeprazole군 보다도 유의한 효과를 보였다.

4. p-I $\kappa$ B의 생성 억제 효과는 海螵蛸군, esomeprazole군, 牡蠣군, 瓦楞子군 순이었다. 海螵蛸군과 esomeprazole군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 海螵蛸군은 瓦楞子군 보다도 유의한 효과를 보였다.
5. Serotonin 양성반응은 瓦楞子군, esomeprazole군, 牡蠣군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 瓦楞子군은 海螵蛸군 보다도 유의한 효과를 보였다.
6. 하부식도 조임근의 손상과 식도 각질 및 점막세포사이 이음 손상에 따른 세포사이 간극이 海螵蛸군, 瓦楞子군, 牡蠣군, esomeprazole군에서 역류성 식도염 유발군보다 적게 관찰되었다.
7. IL-6 양성반응은 海螵蛸군, 牡蠣군, 瓦楞子군, esomeprazole군 순으로 적게 나타났다. 海螵蛸군, 牡蠣군이 역류성 식도염 유발군에 비해 유의성 있는 효과를 보였으며, 海螵蛸군은 esomeprazole군 보다도 유의한 효과를 보였다.

이상의 결과로 海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣는 위의 위바닥과 날문부 결찰로 유발된 생쥐의 역류성 식도염에 대해 위식도 연결부 점막 손상을 방어하며, 염증을 완화시키고, 하부조임근 손상을 치료하는 효과가 있는 것으로 관찰되었다. 海螵蛸, 瓦楞子, 牡蠣는 현재 주된 치료약제인 PPI제제를 대체하여 향후 역류성 식도염의 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각한다.

### 참고문헌

1. National Professors of Bikye Internal Medicine. Bikye Internal Medicine. Seoul:Kunja Publisher. 2009;96, 314-318.
2. Cho YS, Choi MG, Jeong JJ. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a

- population-based study in Asan-si, Korea. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:747-753.
3. Lee D, Lee KJ, Kim KM, Lim SK. Prevalence of asymptomatic erosive esophagitis and factors associated with symptom presentation of erosive esophagitis. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48:906-912
  4. Kim JH, Kim JB, Kim SY, Kim SE, Kim YS, Sung HY, et al. Current Issues on Gastroesophageal Reflux Disease. *Korean J Gastroenterol.* 2014;64:127-128.
  5. Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Jeon SW, Cho YK, Lee KJ, et al. Updated guidelines 2012 for gastroenterol reflux disease. *Korean J Gastroenterol.* 2012;60(4):195-218.
  6. National Professors of Herbology. *Herbology.* Seoul:Youngelem Publisher. 1998:475, 513, 632.
  7. Anderson T, Rohss K, Bredberg E, Hassan-Alim M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of esomeprazole, the S-isomer of omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15:1563-1569.
  8. Nakamura k, Ozawa Y, Furuta Y, Miyazaki H. Effects of sodiumpolyacrylate(PANa) on acute esophagitis by gastric juice in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 1982;32:445-456.
  9. Sin GT. *Steps to Internal Medicine 6 Gastrodigestive Disease.* Seoul: Jungdam Publisher. 2002:54-55.
  10. Horn J. The proton-pump inhibitors: similarities and differences. *Clinther.* 2000;22:266-280.
  11. Kin HJ, Leem SY, Gwak MA, Kim DJ, Byeon JS. Effects of Yijintang-gamibang on Reflux Esophagitis Induced by Pylorus and Forestomach Ligation in Rat. *J of Internal Korean Medicine.* 2010;31(1):128-141.
  12. Heo JI. *Protective Effects of Yijin-tang-gamib-molyeo Aqueous Extracts on Reflux Esophagitis*[Ph.D. Dissertation]. Daegu: Daegu Haany University; 2011.
  13. Dent J. Pharmacology of esomeprazole and comparisons with omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(suppl 1):5-9.
  14. Pharmscore. Available at: [http://www.pharmscore.com/news/digestive\\_pharms/treatarticles/esomepr1.html](http://www.pharmscore.com/news/digestive_pharms/treatarticles/esomepr1.html). Accessed June 21, 2016
  15. Fass R, Dickman R. Non erosive reflux disease. *GI Motility online.* 2006;doi:10.1038/gimo42.
  16. Fauci. *Harrison's Internal Medicine.* Seoul: MIP Publisher. 2010:2234.
  17. Park K, Gwak MA, Kim DJ, Byeon JS. Protective Effects of Yijin-tang-gamibang Aqueous Extracts on Reflux Esophagitis Mediated by Antioxidant Defense Systems. *Korean J of Oriental Physiology and Pathology.* 2010;24(3):416-425.
  18. Jang MW, Leem SW. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *J of Internal Korean Medicine.* 2013;34(4):362-374.
  19. Kim MY, Sin YO, Lee JY, Lee AR, Sin SH, Kwon OJ, et al. Improving Effect of a Combined Extract of Rhei Rhizoma and Glycyrrhizae Rhizoma through Anti-oxidative Stress in Reflux Esophagitis rats. *Korea J of Herbology.* 2015;30(4):37-44.
  20. Kim DJ, No SS. Effect on Acute reflux Esophagitis by Evodiae Fructus Aquous Extract. *Korea J of Herbology.* 2012;27(1):51-58.
  21. Lee YJ, Park JH, No SS. Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Lonicerae Flos Extract. *Korean J of Oriental Physiology and Pathology.* 2010;24(6):970-975.
  22. Chinese Medicine Dictionary Publish Members. *Chinese Medicine Dictionary.* Seoul: Jungdam Publisher. 1997:1317-1320, 3123-3124, 4722-4726.
  23. Lee NK, Yun HI, Park SC, Park JI, Jo MH. Effects of heat-treated alumen, halloysitum rubrum and os sepiae in experimentally induced stomach ulcer in rats. *J of Applied Pharmacology.* 1997;5:246-252.
  24. Kim TG, Lee YH, Choi YS, Byeon JS, Park SD. *The Effects of ShogunJungtang-ga-younggol.*

- morea on Gastric Ulcer. J of Internal Korean Medicine. 2001;22(1):13-20.
25. Patk SM, Jo YG, Kee JR, Lee YC, Kim HJ, Kwon YK, et al. Inhibitory Effect of Oyster Conchioloin on Pro-inflammatory Mediator in Lipopolysaccharide; Activated Raw 264.7 Cells Korean J of Oriental Physiology and Pathology. 2008;22(4):878-883.
  26. Lee YT, Choi BT, Choi Yh, Kang KH. Development of Health Assistances for Anti Stress used with *Ostreae Concha*. Korean J of Oriental Physiology and Pathology. 2006;20(6):1604-1611.
  27. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004;287(1):G7-17.
  28. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. Science. 1992;258:1898-1902.
  29. De May JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. Journal of Physiology. 1981;316:347-355.
  30. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288:373-376.
  31. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Cytokine expression in chronic inflammatory disease. Br Med Bull. 1995;51(2):368-84.
  32. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem. 18; 269(7): 4705-8, 1994.
  33. Barnes PJ, Karin MN. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. Engl J Med. 10;336(15): 1066-71, 1997.
  34. Baeuerle PA, Baltimore D. NF- $\kappa$ B - Ten years after. Cell. 1996;87:13-20.
  35. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, et al. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide. Gen Pharmacol. 2000;35:21-28.
  36. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, et al. Inhibitory effects of methanol extracts of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophages cell line, RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 2001;76:59-64.
  37. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. Eur. J. Pharmacol. 2000;406:301-309.
  38. Lee DA, Lee JR, Kim YW, Kwon YK, Byun SH, Sin SW, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Inducible Nitric Oxide Synthase, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and COX-2 Expression by Flower and Whole Plant of *Lonicera japonica*. Korean J of Oriental Physiology and Pathology. 2005;19(2):481-489.
  39. Byeon SH, Yang JH, Kim SC. Inhibitory effect of *Scrophulariae Radix* extract on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and Nitric Oxide production in Lipopolysaccharide - activated Raw 264.7 cells. Korea J of Herbology. 2005;20(2):7-16.
  40. Racke K, Riemann A, Schworer H, Kilbinger H. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cell. Behav Brain Res. 1996;73:83 - 7.
  41. Morrow JD, Roberts LJ. Lipid-derived autotoxins, eicosanoids and platelet-activating factor. In: Hardman JG, Limberd LE, editors. Goodman and Gilman's The Pharmacological



- Basis of Therapeutics. USA:McGraw Hill and Co. 2001:673.
42. Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Oridate N, Nakagawa K, Sadakane C, et al. Decreased motility of the lower esophageal sphincter in a rat model of gastroesophageal reflux disease may be mediated by reductions of serotonin and acetylcholine signaling. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(5):704-11.
  43. Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux - damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology.* 1996;111(5):1200-5.
  44. De Hertogh G, Ectors N, Van Eyken P, Geboes K. Review article: the nature of oesophageal injury in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(Suppl2):17-26.
  45. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs.* 2005;65(16):2253-86.
  46. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science.* 1992;258:1898-1902.
  47. De May JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *Journal of Physiology.* 1981;316: 347-355.
  48. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
  49. Han GJ, Leem JT, Kim JS, Lee JH. Analysis of the Existing Guidelines and Clinical Trials for the Development of the Guidelines of Clinical Trials with Herbal Medicinal Products for Gastroesophageal Reflux Disease(GERD). *J of Internal Korean Medicine.* 2016;37(1):90-108.