

만성 역류성 식도염 동물 모델에 대한 黃柏 물 추출물의 식도 점막 보호 효과

이세희^{1#}, 이진아^{1#}, 신미래¹, 이지혜², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 한국한의학연구원 한약자원연구센터

The Protective Effect of Water Extract of Phellodendri Cortex in Chronic Reflux Esophagitis-induced Rats

Se Hui Lee^{1#}, Jin A Lee^{1#}, Mi-rae Shin¹, Ji Hye Lee², Seong-soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

2 : Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objective : Reflux esophagitis is a disease caused by the reflux of gastric acid and inflammation due to unstable gastroesophageal sphincter. The aim of the present study was to clarify the effect of Phellodendri Cortex (PC) on chronic reflux esophagitis (CRE) in rats.

Methods : The anti-oxidant activity of PC was measured by total polyphenol, total flavonoid contents, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and 2, 2'-azinobis-3-ethyl-enzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity. A CRE was established surgically in SD rats. And then CRE rats were treated with water or PC 200 mg/kg body weight for 14 days. Besides, the anti-oxidant and inflammatory protein levels were evaluated using western blotting.

Results : PC reduced esophagus tissues injury. The total polyphenol (36.05 ± 0.25 mg/g) and total flavonoid (72.90 ± 0.61 mg/g) of PC showed a high content. PC strongly reduced radical scavenging activities (DPPH IC_{50} 43.58 ± 1.54 μ g/ml; ABTS IC_{50} 36.75 ± 0.35 μ g/ml).

Moreover, reactive oxygen species (ROS) and peroxynitrite (ONOO⁻) levels in serum, the protein expression of inducible nitric oxide synthases (iNOS) were significantly reduced. In addition, the protein expression of NADPH oxidases related to oxidative stress were significantly reduced in PC compared to CRE control.

PC effectively reduced inflammatory factors including, TNF- α , and IL-6 via NF- κ Bp65 inactivation through the inhibition of p-I κ B α and increased anti-oxidant enzyme such as HO-1, SOD, catalase, and GPx-1/2 via Nrf2 activation.

Conclusions : Taken together, these results show that PC can alleviate the esophageal mucosal ulcer through the inhibition of NF- κ B inflammatory and the enhancement of Nrf2 anti-oxidant pathway.

Key words : Phellodendri Cortex, chronic reflux esophagitis, esophageal mucosal ulcer, anti-oxidant, anti-inflammatory.

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2350. · Fax : +82-53-768-6340. E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Se Hui Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258. · Fax : +82-53-768-6340. E-mail : k18dw@naver.com

#Co-first author : Jin A Lee, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258. · Fax : +82-53-768-6340. E-mail : tgs02022@naver.com

· Received : 20 May 2020 · Revised : 14 July 2020 · Accepted : 25 July 2020

I. 서론

위식도 역류질환 (Gastroesophageal reflux disease, GERD)은 주로 하부식도 조임근의 장애에 의해 위산이나 위 내용물이 식도로 역류하여 흉통이나 속 쓰림을 유발하며, 제대로 제어되지 못했을 경우 침습성 식도, 바렛식도, 선암 및 협착 등과 같은 합병증을 유도하는 만성 질환으로 알려져 있다¹⁻⁴. 위식도 역류질환을 가진 대부분의 환자들이 가슴앓이 및 산 역류와 같은 전형적인 증상을 나타내지만, 일부 환자들의 경우 嗶聲 (hoarseness), 만성 기침, 구취, 연하 곤란과 같은 비전형 증상을 호소하기도 한다⁵.

건강보험심사평가원 통계에 따르면 2015년 대비 2019년 위식도 역류질환 환자가 458만 명으로 18.7%로 증가되었고 하였고, 위식도 역류질환 중 특히 역류성 식도염 (reflux esophagitis; RE)의 발병률이 점점 증가하는 추세라고 보고하였다^{6,7}. 역류성 식도염이란 위식도 역류질환 중의 하나로 내시경을 통한 식도 점막의 손상 유무로 판단하는데⁸, 하부식도 괄약근의 조임쇠 역할이 불안정할 경우 위 내용물이 역류하여 식도 점막에 염증을 유발했을 때를 의미한다⁹. 그 원인은 다양하지만 가장 흔한 원인은 하부식도 조임근과 관련된 병태생리학적 요인이며¹⁰, 이 외에도 서구화된 식습관, 음주, 흡연 등과 과식, 하부 식도 괄약근 압을 저하시키는 약제의 복용 등이 역류성 식도염 발생의 원인으로 작용한다는 보고가 있다¹¹.

역류성 식도염은 한의학적으로는 “胸痞”, “吞酸”, “噎膈”, “吐酸”, “吐血”의 病證에서 나타나는 증상과 유사하다. 胃氣虛逆, 肝胃不和, 痰濕鬱阻 등으로 辨證할 수 있고, 治法으로는 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 자주 쓰며, 牡蠣도 制酸作用이 있어 위산과다로 인한 질환에 양호한 치료효과를 보여 역류성 식도염에 종종 활용하고 있다¹⁰.

체내 정상 세포는 신체의 항상성 유지를 위해 독성 반응성 종족, 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이나 반응성 질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 대항하는 항산화 반응 시스템을 가지고 있는데¹², 이러한 항산화 반응 시스템 조절의 붕괴는 역류성 식도염 증상을 심화시키고 합병증을 유도할 수 있다. 최근 연구에서는 역류성 식도염의 증상 악화에 산화적 스트레스가 깊이 관여한다고 하였으며^{13,14}, 항산화제 투여에 의해 산화적 스트레스를 개선시켰을 경우 식도 점막의 손상을 보호한다고 발표하였다¹⁵⁻¹⁷.

현재 위식도 역류질환의 치료는 제산제, 양성자 펌프 억제제 (PPIs) 및 히스타민 H₂ 수용체 길항제 (H₂RA)가 주로 사용되고 있으며, PPIs는 H₂ 수용체 길항제보다 효과가 좋고, 상대적으로 부작용이 적으나 약제 중단 시 재발율이 1년 이내 50 ~ 80% 정도이며¹⁸, 장기간 복용할 경우 미네랄 및 칼슘 흡수 저해 등의 부작용이 뒤따른다¹⁹. 특히, GERD의 높은 유병률에 따른 장기간 고비용의 산 조절 약물의 사용은 상당한 사회 경제적 부담을 초래한다. 따라서 부작용 없이 역류성 식도염의 증상을 효과적으로 개선시키면서 안전한 천연 유래의 치료제의 개발이 무엇보다 필요하다.

黃柏 (황백, *Phellodendri Cortex*, PC)은 운향과 (rutaceae)

식물인 황백나무 (*Phellodendron amurense* Ruprecht)의 주피를 벗겨내 말린 줄기껍질 (樹幹皮)이다²¹. 黃柏은 berberin, magnoflorine, candicine, jatrorrhizin, palmatin, phellodendrine, menisperine (*n*-methylysocorydinum) 등의 alkaloid가 함유된 외에도 obacunon, obaculacton, dictamnolide, obacunonic acid, lumicaeruleic acid, 7-dehydrostigmasterol, β -sitosterol, campesterol 등이 함유되어 있으며²², 膽囊炎, 結膜炎, 細菌性赤痢, 慢性大腸炎, 下痢, 糖尿, 下半身 麻痺, 黃疸, 淋濁, 便血, 濕熱, 瀉痢, 瘡瘍腫毒, 目赤腫痛, 盜汗遺精 및 입안과 혀에 나는 瘡 등의 치료에 사용되어 왔다²³. 한방에서는 항균, 염증, 항산화, 골결핵, 혈압강하, 폐렴, 감기, 해열제 및 소염제로도 쓰이며, 처방용약에서는 苦味健胃, 消炎藥 및 止瀉 등에 배합되었으며, 대표적으로 柴胡清肝湯, 黃連解毒湯, 半夏白朮天麻湯, 滋陰降火湯 등에 사용되고 있다²⁴. 약리 연구로는 항산화작용, 항궤양 작용, 항바이러스작용, 항염증작용, 항균작용 등이 보고되어 있다²⁵⁻²⁷.

黃柏은 다양한 질환에 대한 보호 효과가 잘 알려져 있지만, 역류성 식도염 및 식도 점막 보호에 미치는 효과에 대한 연구는 아직 미흡하다. 이에 본 저자는 수술적으로 유도한 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 黃柏의 식도 점막 보호 효능 및 그 기전을 연구하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료 추출

본 실험에서 사용한 黃柏은 휴먼허브 (영천, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사 후, 약전규격에 적합한 것만을 정선하여 사용하였다. 黃柏 200 g을 분쇄한 후 2,000 ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압 추출장치 (N-1100, Eyela, Japan)로 농축 후, 동결 건조기 (FreeZone 1, Labconco, France)를 이용해 완전 건조시켜 파우더 (수율, 4.5%; 수분함량, 6.818%M)를 얻어 -80°C에서 보관하였으며, 실험 직전에 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), gallic acid, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, naringin, diethylene glycol, sodium hydroxide, potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, IL, UK)에서 구입하였고, NADPH oxidase 4 (NOX4), p47^{phox}, p22^{phox}, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), super oxide dismutase (SOD), catalase,

glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), phosphorylation of nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65), inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (I κ B α), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (p-I κ B α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), histone, β -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Protease inhibitor mixture, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 2', 7-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 Dihydrorhodamine 123 (DHR123)는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL western blotting detection reagents는 GE Healthcare로부터 구입하여 사용하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

3) 실험 동물

SD 흰쥐 5주령 (130~150 g) 수컷을 대한바이오 (음성, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였으며, 사료 (조단백질 18% 이상, 조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 1.0% 이상, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)와 물을 충분히 공급하였다. 그리고 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2020-012)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 측정하였다²⁸⁾. 시료 10 μ l에 증류수 790 μ l, Folin-Ciocalteu's phenol reagent 50 μ l를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 150 μ l의 20% sodium carbonate를 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 구하고 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

총 플라보노이드 함량은 Lister 등의 방법에 의해 측정하였다²⁹⁾. Diethylene glycol 1 mL와 시료 추출물 100 μ l와 1 N NaOH 10 μ l를 잘 혼합시켜 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

2) DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 측정

추출한 시료의 DPPH free radical 소거능 측정은 Blois 법에 의해 측정하였다³⁰⁾. 60 μ M DPPH 용액 100 μ l와 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l를 혼합하여 30분간 암소상태로 방치한 후 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 양성대조물질로 L-ascorbic acid를 사용하였다. IC₅₀ 값은 free radical 농도를 절반으로 감소시킬 때 필요한 시료의 양으로 나타내었으며, 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ & = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100 \\ & \text{OD}_{\text{control}} : \text{시료가 들어가지 않은 경우 흡광도} \\ & \text{OD}_{\text{sample}} : \text{시료가 들어간 경우 흡광도} \end{aligned}$$

ABTS free radical 소거능은 Re의 방법으로 측정하였다³¹⁾. 7 mM ABTS용액과 2.45 mM의 potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS⁺을 형성시킨 후 415 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02이 되게 ethanol로 희석하였다. 희석된 용액 95 μ l에 시료 5 μ l를 가하여 15분 동안 방치한 후 Microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan, Switzerland)로 흡광도를 측정하였으며, 양성대조물질로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 흡광도는 아래의 식으로 계산하여 값을 구하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = \{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100 \\ & \text{OD}_{\text{control}} : \text{시료가 들어가지 않은 경우 흡광도} \\ & \text{OD}_{\text{sample}} : \text{시료가 들어간 경우 흡광도} \end{aligned}$$

3) 만성 역류성 식도염 유발 및 동물 처치

수술 전, 24시간 절식 후 Zoletile mixture (Vibrac, France)을 25 mg/kg 복강 주사하여 마취한 뒤 수술을 진행하였다. 제모기로 복부 털을 제거하고 복간 정중부를 2 cm 정도 개복하여 대만부위 (limiting ridge)를 블랙 실크 (1-0)실로 묶고, 날문부위에는 latex ring (18-Fr Nelaton catheter, 2 mm in thickness)을 끼워 나일론 (5-0)으로 묶은 후, 복막과 피부를 봉합하였다. 감염을 방지하기 위하여 3일간 항생제 (Gentamicin sulfate)와 소염제 (Dexamethasone)를 희석하여 피하주사 하였다. 수술 24시간 후 물을 공급해주었으며, 수술 48시간 후 사료를 공급해주었다. 1주일간 회복기를 거친 후, 아무런 처치를 하지 않은 정상군 (Nor), 만성 역류성 식도염 유발 후 증류수를 투여한 대조군 (Con), 만성 역류성 식도염 유발 후 200 mg/kg 黃柏 물 추출물 투여군 (PC) 총 3 그룹으로 무작위 분류하였으며, 모든 그룹은 매일 일정한 시간에 몸무게 및 사료 섭취량을 측정하였고, 약물은 1일 1회 14일 동안 경구 투여하였다.

4) 산화적 스트레스 바이오 마커 측정

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS 값은 Ali 방법으로 측정하였다³²⁾. 1 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate buffer

(pH 7.4)와 혈청을 혼합한 후, 25 mM DCFH-DA를 첨가하여 형광 광도계 (Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용해 0분부터 매 5분씩 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 값을 계산하였다.

ONOO⁻는 Kooy 방법으로 측정하였다³³⁾. DHR123 buffer (rodamin buffer, 5 mM DTPA, 10mM DHR123)와 혈청을 혼합한 후, 37°C에서 5분간 교반하였다. 그 다음 형광 광도계 (Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용해 0분부터 매 5분씩 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 485 nm에서 30분간 측정된 값을 계산하였다.

5) 식도 조직 Western blotting

식도의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 30분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μl의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 후 10분마다 vortex를 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리 한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 세포질의 NOX4, p47^{phox}, p22^{phox}, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2, IκBα, p-IκBα, iNOS, TNF-α, IL-6, β-actin 단백질과 핵에서의 Nrf2, NF-κBp65, histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 10 μg의 단백질을 8-12% SDS polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다. 각 그룹의 단백질 수준은 정상군의 단백질 수준으로 나누어 상대적 비로 나타내었다 (represented as 1).

6) 식도 육안적 관찰

식도 조직을 분리한 후 수술용 가위를 이용하여 식도를 세로로 절단하였다. 절단된 식도 내부는 적당량의 0.9% NaCl로 세척한 후 깨끗한 모눈종이 위에 전개했으며, 광학 디지털 카메라 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 식도 점막 측정은 I-Solution lite (Innerview Co., Gyeonggido, Korea) 프로그램을 이용하여 실제 손상

부위의 면적을 측정된 후, 식도 전체 면적과 비교하여 비율 (%)로 표시하였다.

$$\text{The gross mucosal damage ratio (\%)} \\ = [\text{width of area with esophageal mucosal injury (mm}^2\text{)} \\ / \text{width of total area of esophagus (mm}^2\text{)}] \times 100$$

7) 통계분석

*In vitro*의 수치는 평균과 표준오차로, *in vivo*의 수치는 평균과 표준편차로 표시하였으며, SPSS (Version 25.0, IBM, Armonk, NY, USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 $P < 0.05$ 에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

PC 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정 한 결과, 총 폴리페놀 함량은 36.05 ± 0.25 mg/g으로 나타났다. 총 플라보노이드 함량은 72.90 ± 0.61 mg/g으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of Phellodendri Cortex Extract

Sample name	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Phellodendri Cortex	36.05 ± 0.25	72.90 ± 0.61

All values are expressed mean \pm SEM of three replications

2. DPPH 및 ABTS radical 소거 활성 측정

DPPH free radical 소거 활성을 측정 한 결과, 양성대조물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 1.67 ± 0.03 μg/ml으로 나타났고, PC 물 추출물의 IC₅₀ 값은 43.58 ± 1.54 μg/ml으로 나타났다.

ABTS free radical 소거 활성을 측정 한 결과, 양성대조물질인 L-ascorbic acid의 IC₅₀ 값은 3.57 ± 0.04 μg/ml으로 나타났고, PC 물 추출물의 IC₅₀ 값은 36.75 ± 0.35 μg/ml으로 뛰어난 radical 소거 활성을 나타냈다 (Table 2).

Table 2. Scavenging Activity (IC₅₀) of Phellodendri Cortex Extract on DPPH and ABTS Free Radical

Sample name	DPPH free radical (μg/ml)	ABTS free radical (μg/ml)
L-ascorbic acid	1.67 ± 0.03	3.57 ± 0.04
Phellodendri Cortex	43.58 ± 1.54	36.75 ± 0.35

All values are expressed mean \pm SEM of three replications

3. 식도점막 손상도 측정

식도 점막의 손상 정도를 확인한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 정상군의 식도 점막에서는 손상이 발견되지 않았으나, 만성 역류성 식도염 유발 후 증류수를 투여한 대조군은 손상

면적이 $16.27 \pm 0.81\%$ 로 식도의 중간 부위와 말초 부위에서 점막 손상과 궤양이 발견되었으며, PC 투여군 ($8.75 \pm 1.2\%$)에서는 식도의 말초 부위에 점막 손상과 궤양이 발견되었으나 대조군에 비하여 현저하게 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 1).

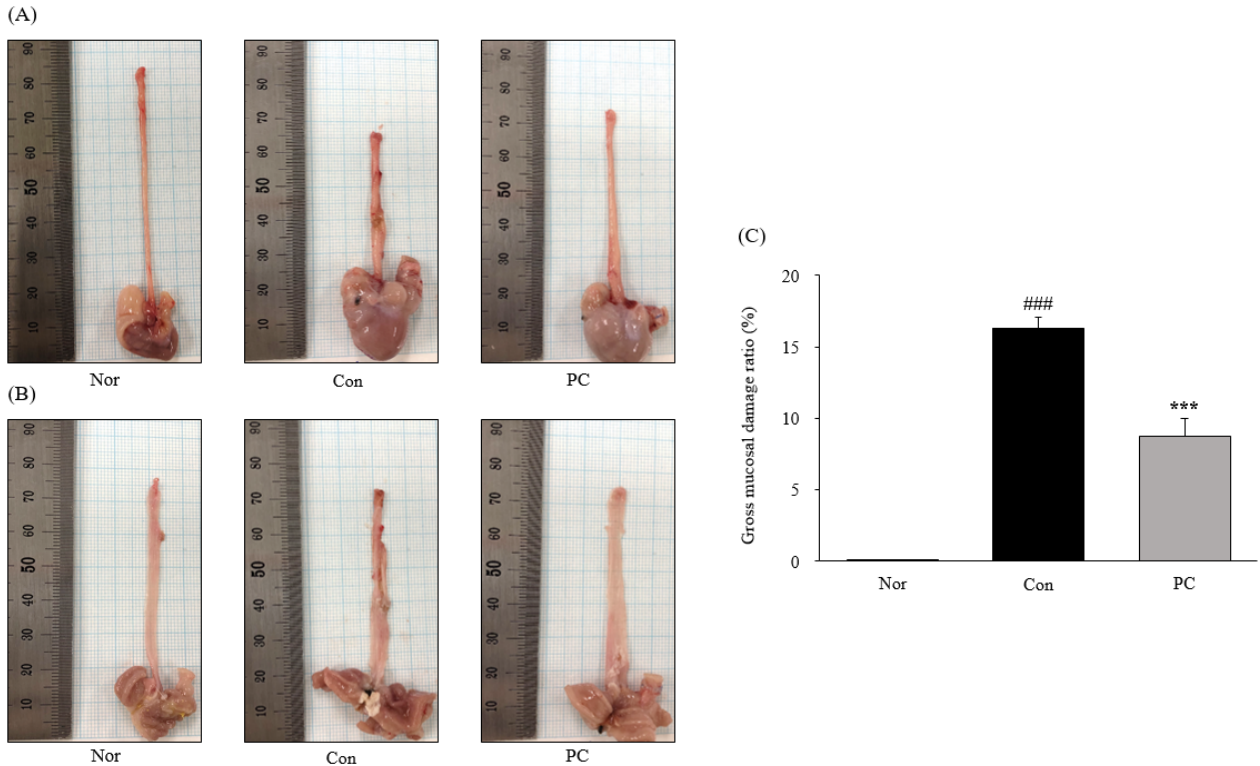


Fig. 1. The gross mucosal injury evaluation in esophagus tissue. A representative gross image after surgical induction; (A), the opened gross mucosal injury; (B), gross mucosal injury ratio; (C), Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean±SD (n=8). Significance: ###*P*<0.001 vs. Nor rats and ****P*<0.001 vs. CRE control rats.

4. 산화적 스트레스 바이오마커 및 염증유도효소 발현 측정

본 연구에서는 만성 역류성 식도염 유발 동물 모델의 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS와 ONOO⁻를 혈청 내에서 측정하였으며, Western blot을 통한 조직 내의 염증유도효소인 iNOS의 발현을 측정하였다. ROS 측정 결과, 정상군 (6646 ± 746 fluorescence/min/ml) 대비 대조군 (27800 ± 2149 fluorescence/min/ml)에서 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (22251 ± 1438 fluorescence/min/ml)에서 유의적으로 감소하였으며 또한, ONOO⁻ 정상군 (7538 ± 376 fluorescence/ml) 대비 대조군 (9259 ± 129 fluorescence/ml)에서 유의적으로 높게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (7071 ± 336 fluorescence/ml)에서 유의적으로 낮게 나타났다. iNOS의 경우, 정상군 (1.00 ± 0.10) 대비 대조군 (2.61 ± 0.22)에서 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.97 ± 0.06)에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2).

5. 식도 조직 내 NOX4, p47^{phox} 및 p22^{phox} 단백질 발현량 분석

식도 조직에서 Western blot을 실시하여 ROS의 중요 세포 공급원인 NOX4, p47^{phox} 및 p22^{phox}의 발현을 확인하였다. NOX4의 발현을 확인한 결과, 정상군 (1.00 ± 0.05) 대비 대조군 (1.29 ± 0.05)에서 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.03 ± 0.06)에서 유의성 있게 낮게 나타났으며, p47^{phox}의 경우, 정상군 (1.00 ± 0.05) 대비 대조군 (1.25 ± 0.03)에서 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.97 ± 0.07)에서 유의적으로 감소하였다. 또한, p22^{phox}도 정상군 (1.00 ± 0.06) 대비 대조군 (1.31 ± 0.09)에서 유의성 있게 높게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.95 ± 0.04)에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig 3).

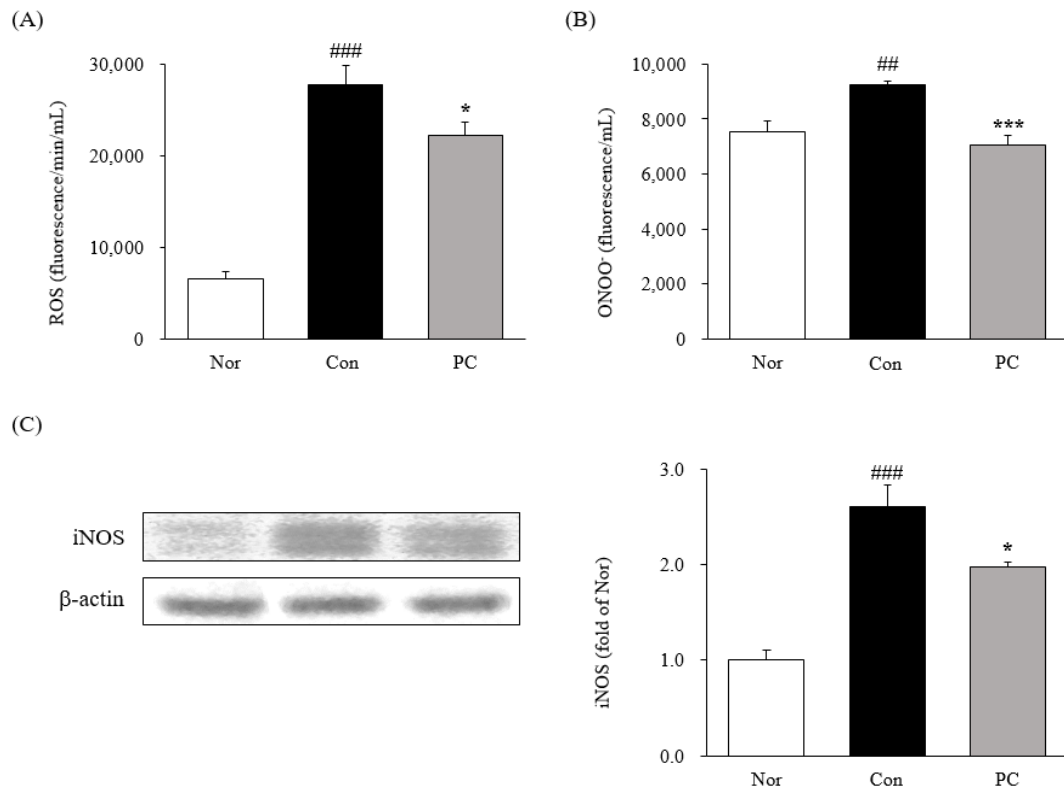


Fig. 2. Serum ROS and ONOO⁻ levels, expression of oxidative factors in serum. Reactive oxygen species (ROS); (A), peroxynitrite (ONOO⁻); (B), Inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expressions; (C). Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean \pm SD (n=8). Significance: $^{*}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. Nor rats and $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs. CRE control rats.

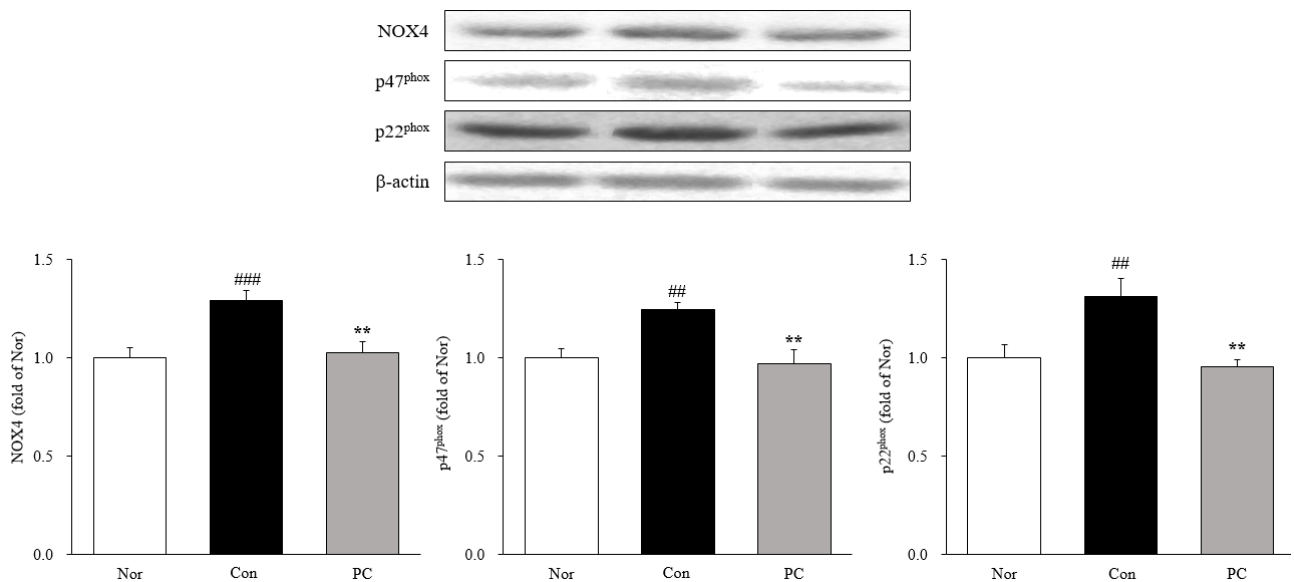


Fig. 3. Expressions of NADPH oxidase proteins, NADPH oxidase 4 (NOX4), p47^{phox}, and p22^{phox} protein expressions. Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean \pm SD (n=8). Significance: $^{*}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. Nor rats and $^{**}P < 0.01$ vs. CRE control rats.

6. 식도 조직 내 항산화 단백질 발현량 분석

식도 조직에서 Western blot을 실시하여 항산화 관련 단백질인 Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 확인하였다. Nrf2의 경우, 정상군 (1.00 ± 0.05) 대비 대조군 (0.64 ± 0.06)에서 유의적으로 낮게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.07 ± 0.11)에서는 유의적으로 높게 나타났다. 또한, HO-1도 정상군 (1.00 ± 0.04) 대비 대조군 (0.73 ± 0.06)에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.91 ± 0.02)에서는 유의적으로 증가하였다.

SOD의 경우, 정상군 (1.00 ± 0.05) 대비 대조군 (0.81 ± 0.05)에서 유의성 있게 감소하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.99 ± 0.07)에서 유의적으로 증가하였다. Catalase의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.06) 대비 대조군 (0.79 ± 0.02)에서 유의성 있게 감소하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.98 ± 0.05)에서 유의성 있게 높게 나타났다. GPx-1/2의 경우, 정상군 (1.00 ± 0.07) 대비 대조군 (0.74 ± 0.04)에서 유의적으로 낮게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.94 ± 0.06)에서는 유의적으로 증가하였다 (Fig. 4, 5).

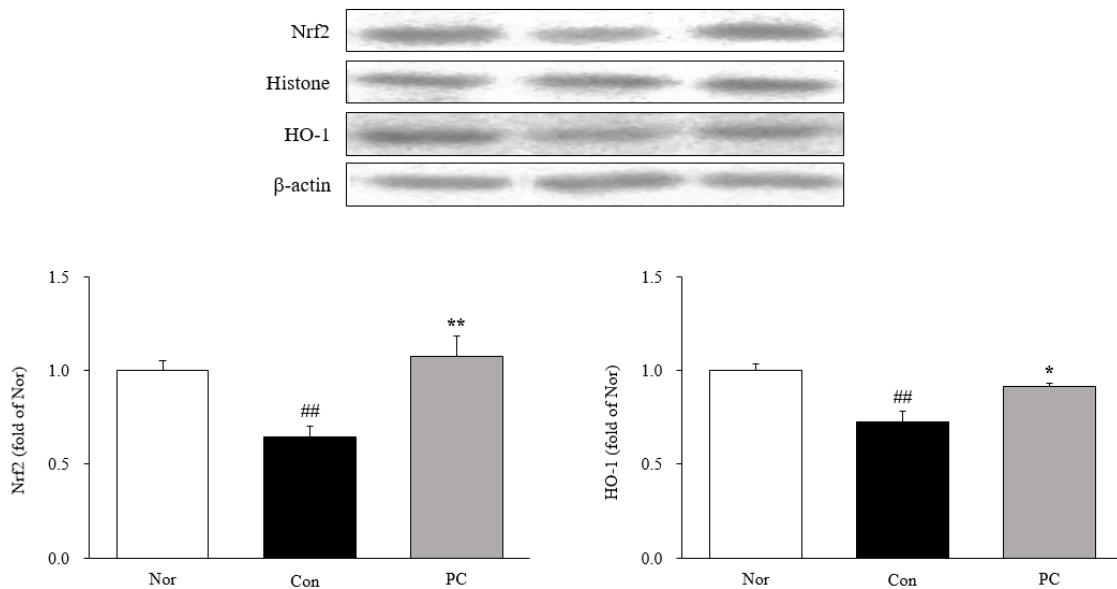


Fig. 4. Expressions of anti-oxidation related proteins. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein expressions. Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean ± SD (n=8). Significance: ##*P* < 0.01 vs. Nor rats and **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. CRE control rats.

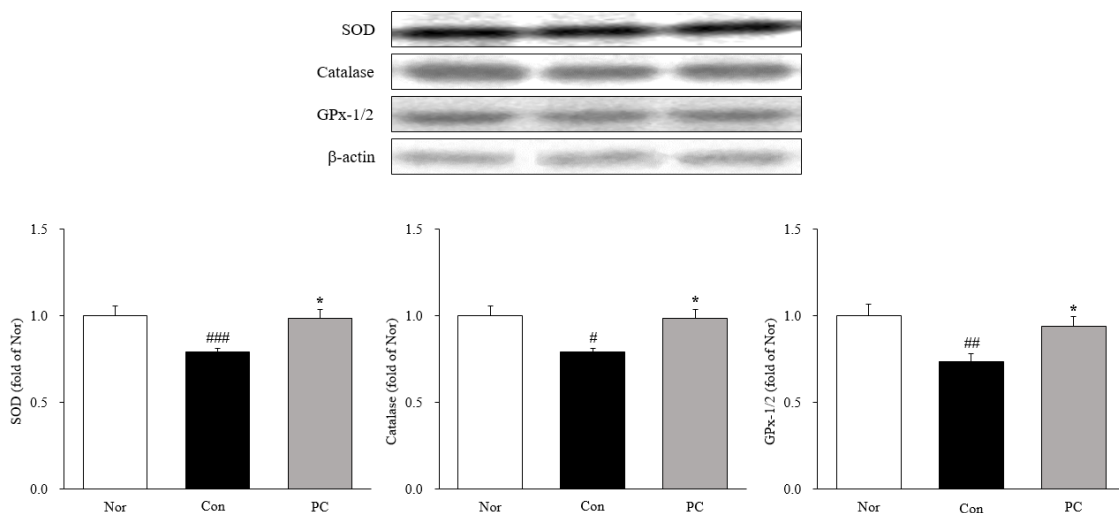


Fig. 5. Expressions of anti-oxidant enzymes. Superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2) protein expressions. Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean ± SD (n=8). Significance: #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs. Nor rats and **P* < 0.05 vs. CRE control rats.

7. 식도 조직 염증성 단백질 발현량 분석

1) NF-κBp65와 p-IκBα 염증성 전사인자 발현량 분석
 식도 조직 내에서 Western blot을 실시하여 NF-κBp65와 p-IκBα의 발현을 측정하였다. 그 결과, NF-κBp65는 정상군 (1.00 ± 0.07) 대비 대조군 (1.46 ± 0.09)에서 유의성 있게 높게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (0.99 ± 0.09)에서 유의적으로 감소하였으며 또한, p-IκBα도 정상군 (1.00 ± 0.10) 대비 대조군 (1.64 ± 0.13)에서 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.23 ± 0.05)에서 유의적으로 감소하였다 (Fig 6).

2) TNF-α 및 IL-6 염증성 단백질 발현량 분석

식도 조직에서 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 발현을 확인한 결과, TNF-α는 정상군 (1.00 ± 0.12) 대비 대조군 (2.09 ± 0.19)에서 유의성 있게 높게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.54 ± 0.10)에서 유의성 있게 감소하였으며, IL-6의 경우 정상군 (1.00 ± 0.10) 대비 대조군 (1.68 ± 0.19)에서 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군 (1.22 ± 0.05)에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 7).

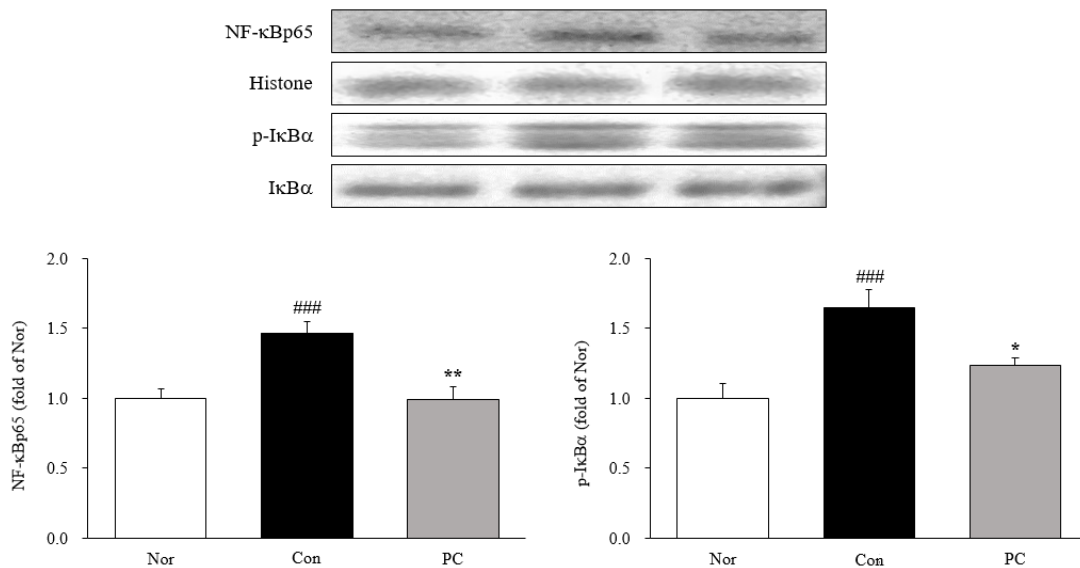


Fig. 6. Expressions of inflammation related proteins, nuclear factor-kappa Bp65 (NF-κBp65), phosphorylation inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (p-IκBα) protein expressions. Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean ± SD (n=8). Significance: ###P<0.001 vs. Nor rats and *P<0.05, **P<0.01 vs. CRE control rats.

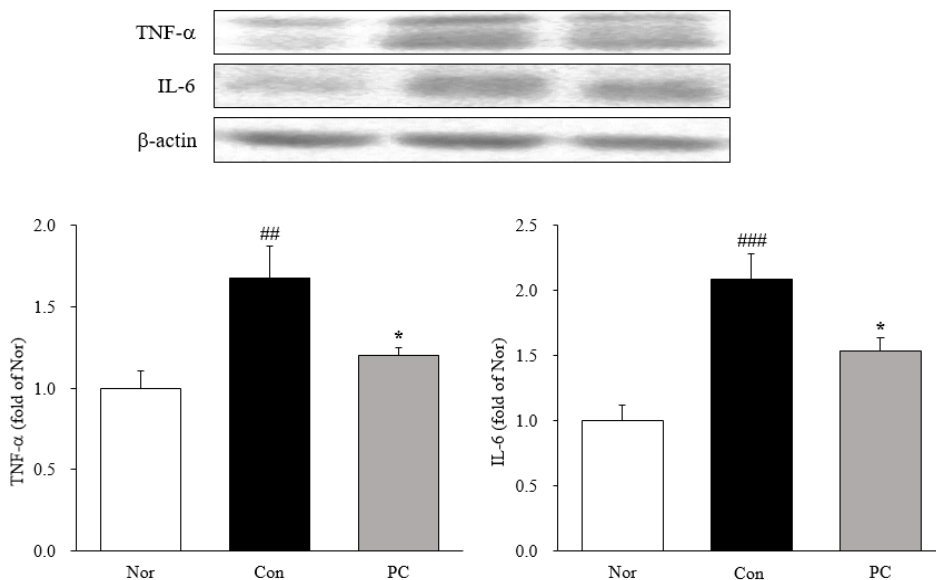


Fig. 7. tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interleukin-6 (IL-6) protein expressions. Nor; normal rats, Con; chronic reflux esophagitis control rats, PC; Phellodendri Cortex extract 200 mg/kg body weight/day-treated chronic reflux esophagitis rats. Data are mean ± SD (n=8). Significance: ##P<0.01, ###P<0.001 vs. Nor rats and *P<0.05 vs. CRE control rats.

IV. 고 찰

黃柏 (황백, *Phellodendri Cortex*, PC)은 운향과 (rutaceae) 식물인 황벽나무 (*Phellodendron amurense* Ruprecht)의 주피를 벗겨내 말린 줄기껍질로²¹⁾, 苦, 寒, 無毒하고, 膀胱·腎·大腸經으로 귀경하며, 瀉火解毒, 清熱燥濕, 清心除煩, 滋陰降火, 苦味健胃하는 효능이 있어, 瘡瘍腫毒, 黃疸, 骨蒸勞熱, 濕熱瀉痢, 口苦, 帶下를 치료한다³⁴⁾. 黃柏은 수피에 berberine을 함유하고 있는 天然生理活性물질로서, 소염기능 및 심장박동 촉진효과 뿐만 아니라 항궤양, 항염증 및 항균효과가 있다고 알려져 있다³⁻⁵⁾.

위식도 역류질환은 하부식도 조임근의 불안정한 활동으로 인해 위산이나 위 내용물이 식도로 역류하여 식도 점막 손상을 야기시켜 합병증이 유발되는 질환으로, 주로 가슴앓이, 위산 역류로 인한 속 쓰림과 같은 증상이 일어난다¹⁻⁴⁾. 위식도 역류질환의 치료제로 제산제, 양성자 펌프 억제제 (PPIs) 및 히스타민 H₂ 수용체 길항제 (H₂RA)가 있으나, 장기간 치료 시 재발 가능성과 부작용이 뒤따른다고 보고가 되어있다³⁵⁾. 따라서 새로운 치료제 개발이 무엇보다 필요한 실정이다.

이번 연구는 만성 역류성 식도염 증상 개선에 유효한 효과를 나타낼 수 있는 새로운 치료제 개발을 위한 연구로서 黃柏 물 추출물의 *in vitro* 항산화 활성을 측정하였으며, 그 결과를 토대로, *in vivo* 실험을 통해 黃柏 물 추출물이 만성 역류성 식도염 동물 모델에 미치는 효과를 알아보았다. 만성 역류성 식도염을 유발한 후 14일간 黃柏 물 추출물을 경구 투여하여 육안적 손상면적, 혈청 내 산화적 스트레스 바이오 마커, Western blot을 통한 혈청 내 산화효소, 항산화 관련 인자, 염증 유도 효소와 염증성 사이토카인의 발현을 측정하였다.

黃柏 물 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량과 DPPH 및 ABTS free radical 소거능을 확인하였다. 黃柏 물 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드를 측정된 결과, 총 폴리페놀 함량은 36.05 ± 0.25 mg/g으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은 72.90 ± 0.61 mg/g으로 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 또한, DPPH free radical 소거 활성 측정 결과, 黃柏 물 추출물의 IC₅₀ 값은 43.58 ± 1.54 μ g/ml으로 나타났으며, ABTS free radical 소거 활성을 측정된 결과 黃柏 물 추출물의 IC₅₀ 값은 36.75 ± 0.35 μ g/ml으로 높은 항산화 활성을 나타냈다 (Table 1, 2).

만성 역류성 식도염을 유발한 동물 모델에 黃柏 물 추출물을 14일간 투여한 후 식도 조직을 적출하여 육안적으로 관찰한 결과, 정상군은 식도 점막의 손상이 나타나지 않았으나 대조군에서는 만성 역류성 식도염 유발로 인한 하부식도의 점막 손상 및 궤양이 뚜렷하게 나타났으며, PC 투여군에서는 대조군에 비하여 식도 점막의 손상이 현저하게 감소되어 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 1).

최근 연구에 따르면, 산화적 스트레스가 만성 역류성 식도염 발병에 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다^{13,14)}. 산화적 스트레스는 ROS의 과도한 생리적 이용 가능성으로 정의되며, 체내의 ROS 및 RNS의 생성계와 제거계의 불균형으로 세포 사멸과 조직 손상을 일으켜 여러 질병을 유발하는 산화적 손상을 야기한다³⁶⁾. 이 중 ROS는 superoxide anion (O₂⁻),

hydroxyl radicals (\cdot OH), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등을 포함하며, RNS는 nitric oxide (NO \cdot), nitrogen dioxide (NOO \cdot), peroxyntirite (ONOO \cdot) 등을 포함하는데, RNS 중 iNOS에 의해 다량 생성된 NO는 활성산소인 O₂⁻와 결합하여 ONOO \cdot 와 같은 맹독성 물질을 형성하게 되고 이는 산화 및 지질 과산화를 유도하여 급격한 세포독성을 야기하며, H₂O₂에 비해 반응속도가 빨라 짧은 시간 내에 급격한 손상을 유발한다. 뿐만 아니라, NADPH oxidase (NOX)는 세포막 효소 단백질 (membrane bound enzyme complex)으로써, ROS의 중요한 세포 공급원이며 식세포의 plasma membrane에서 찾을 수 있고, 주로 미생물에 대항하는 숙주의 방어 기작으로 O₂⁻를 생성한다고 알려져 있다³⁷⁾. 혈청 내 ROS, ONOO \cdot 의 수치와 iNOS 단백질 발현을 확인한 결과, ROS와 ONOO \cdot 는 정상군 대비 대조군에서 유의적으로 높게 나타났으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 또한 western blot을 통한 iNOS, NOX4, p47^{phox}와 p22^{phox}의 발현 측정 결과, 정상군 대비 대조군에서 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2, 3). 이를 통해 PC의 투여는 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시켜 식도 손상을 개선시킬 수 있다고 판단된다.

Nrf2는 발암과정 및 활성산소종에 대항하는 전사인자로서, 세포가 활성산소종이나 친전자성 물질에 의해 자극을 받게 되면 Nrf2가 활성화되어 핵 내로 이동하고 핵 내에 존재하는 antioxidant response element (ARE)와 결합함으로써 항산화 효소의 발현을 조절하며, 이러한 항산화 효소들은 생성된 활성산소의 생성을 억제시킨다³⁸⁾. HO-1은 세포 내 산화 스트레스와 ROS 생성에 대한 세포 산화 환원 항상성 유지하는 역할을 하며, Nrf2에 의해서 유도된 HO-1은 대식세포에서 LPS로 유도된 ROS 생성과 염증 방어를 대해 중요한 역할을 하는 항산화 효소로 알려져 있다. 또한 HO-1에 의해 생성되는 철, 일산화탄소, biliverdin 등의 분해 생성물들이 항염, 항산화 효과를 갖는다는 연구도 보고되어 있다³⁹⁾. Western blot을 통한 Nrf2와 HO-1의 실험 결과, 정상군 대비 대조군에서 유의적으로 감소하였으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의적으로 높게 나타났다 (Fig. 4).

인체는 활성산소의 공격에 대응하기 위한 항산화체계를 보유하고 있다. 항산화체계는 효소적·비효소적 방어기전으로 구분되는데, 효소적 방어기전으로 항산화효소는 H₂O₂의 전환을 촉매하는 superoxide dismutase (SOD), H₂O₂를 물과 산소로 전환시키는 catalase, H₂O₂를 물로 환원시키는 glutathion peroxidase (GPx) 효소 등이 있다⁴⁰⁾. 식도 조직을 이용한 western blot을 통해 항산화 단백질인 SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 측정하였다. 그 결과, 정상군 대비 대조군에서 유의성 있게 감소하였으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 5). 이와 같은 결과로 黃柏 물 추출물이 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 Nrf2 항산화 경로를 통한 항산화 체계로 인해 손상된 식도 점막의 보호 효과가 있다고 사료된다.

NF- κ B는 핵 내 전사요소로서, 세포 내 산화환원 상태 (Redox status)에 의해 조절된다. 세포질에서 NF- κ B는 I κ B α 에 접합되어 비활성인 상태로 존재하다가 산화적 스트레스 등의 자극에 의해 인산화되면서 I κ B α 로부터 분리되고 핵 안으로 유도되어

촉진 유전자 위치에 결합하여 염증 관련 유전자들의 핵심적인 전사 조절의 역할을 하면서 염증반응을 촉진한다⁴¹⁾. Western blot을 통해 NF- κ Bp65와 p-I κ B α 의 발현을 측정된 결과, 정상군 대비 대조군에서 유의적으로 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6).

또한 산화적 스트레스 등의 자극에 의한 염증성 매개인자의 유도에 의해 발현하는 염증성 사이토카인을 측정된 결과, TNF- α 과 IL-6에서 정상군 대비 대조군에서 유의성 있게 증가하였으나, 대조군 대비 PC 투여군에서 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 7). 이는 黃柏 물 추출물이 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 염증 관련 단백질의 비활성화로 인한 염증성 사이토카인의 억제를 통해 손상된 식도 점막을 보호한다고 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 黃柏을 14일간 투여한 후 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 黃柏의 *in vitro*를 통한 항산화 활성을 확인한 결과, 총 폴리페놀 (36.05 \pm 0.25 mg/g)과 총 플라보노이드 (72.90 \pm 0.61 mg/g)는 높은 함량을 보여주었으며, DPPH 및 ABTS free radical 분석에서도 뛰어난 radical 소거능을 발휘하였다.
2. 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 黃柏의 투여는 식도 점막 궤양을 유의적으로 감소시켰다.
3. 黃柏의 투여는 혈청에서 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS와 ONOO⁻를 유의적으로 감소시켰으며, 식도 조직 내의 iNOS 단백질 발현 또한 유의적으로 감소시켜 식도 점막 손상을 억제하였다.
4. 黃柏의 투여는 식도 조직 내의 산화적 스트레스 관련 인자인 NOX4, p47^{phox}와 p22^{phox}의 발현을 유의적으로 감소시켰다.
5. 黃柏의 투여는 항산화 관련 인자인 Nrf2, HO-1, SOD, catalase, GPx-1/2의 발현을 유의적으로 증가시켰다.
6. 黃柏의 투여는 I κ B α 의 인산화에 의한 NF- κ Bp65 활성을 억제하였으며, 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 발현을 유의적으로 감소시켰다.

따라서 만성 역류성 식도염 동물 모델에서 黃柏 물 추출물은 Nrf2를 활성화시켜 항산화 관련 단백질 발현을 증가시켰으며, 염증 경로인 NF- κ Bp65 활성을 억제하여 염증성 사이토카인의 발현을 억제시킴으로써 식도 점막 보호 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 17년도 한국연구재단에서 시행한 중견연구자지원사업 (NRF-2017R1A2B2006858)과 2020년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (No. 2018R1A5A2025272)을 받아 수행되었습니다.

References

1. Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Lee KJ, Lee JS, Park HJ, Shin IS, Lee SH, Han SY. Korean Society of Neurogastroenterology and Motility. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. Korean Journal of Gastroenterol. 2012;60(4):195-218.
2. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease : a global evidence-based consensus. American Journal Gastroenterol. 2006;101(8):1900-1920.
3. Wu J, Liu D, Feng C, Luo Y, Nian Y, Wang X, Zhang J. The Characteristics of Postprandial Proximal Gastric Acid Pocket in Gastroesophageal Reflux Disease. Medical Science Monitor. 2018;24:170-176.
4. Pettit M. Treatment of gastroesophageal reflux disease. Pharmacy World and Science. 2005;27(6):432-435.
5. Mouli VP, Ahuja V. Questionnaire based gastroesophageal reflux disease (GERD) assessment scales. Indian Journal Gastroenterol. 2011;30:108-117.
6. Yamasaki T, Hemond C, Eisa M, Ganocy S, Fass R. The changing epidemiology of gastroesophageal reflux disease : are patients getting younger? Journal of Neurogastroenterology and Motility. 2018;24(4):559-569.
7. Health Insurance Review & Assessment Service. Retrieved Mar. 12, 2020, from <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfrnIntrnsInfo.do>
8. Wienbeck M, Barnert J. Epidemiology of reflux disease and reflux esophagitis. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 1989;156:7-13.
9. Kahrilas PJ, Quigley EM. Clinicalesophageal pH recording : a technical review for practice guideline development. Gastroenterology. 1996;110:1982-1996.
10. Song CH. A Comparative Study of Sepiae Os, Arcae Concha, Ostreae Concha and Esomeprazole in a Mouse Model of Reflux Esophagitis : Sangji University Graduate School, Wonju, 2016.
11. Jo YC. Risk Factors of Reflux Esophagitis in

- General Health Screening People in Tongyeong : Dongguk University Graduate School, Seoul, 2006.
12. Peng D, Lu H, Zhu S, Zhou Z, Hu T, Chen Z, Zaika A, El-Rifai W. NRF2 antioxidant response protects against acidic bile salts-induced oxidative stress and DNA damage in esophageal cells. *Cancer Letters*. 2019;458:46-55.
 13. Malfertheiner P, Hallerback B. Clinical manifestations and complications of gastroesophageal reflux disease (reflux esophagitis). *International Journal of Clinical Practice*. 2005;59(3):346-355.
 14. Jimenez P, Piazuelo E, Sanchez MT, Ortego J, Soteras F, Lanasa A. Free radicals and antioxidant systems in reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *World Journal of Gastroenterology*. 2005;11(18):2697-2703.
 15. Seo SH, Bae GS, Choi SB, JO IJ, Kim DG, Shin JY, Song HJ, Park SJ, Choi MO. The antioxidative and cytoprotective effect of *Lonicera japonica* Flos water extracts on the ultraviolet(UV)B-induced human HaCaT keratinocytes. *The Korea Association of Herbology*. 2014;29(6):63-71.
 16. Kim SH, Park HJ, Kim KJ, Kim MJ, Lee JA, Lee AR, Roh SS. Antioxidant Activity of Citrus Peel and Effect on its Glucose Metabolism in L6 Rat Skeletal Muscle Cells. *The Korea Association of Herbology*. 2018;33(4):101-109.
 17. Lee JA, Kim MJ, Roh SS. Effect of *Artemisia capillaris* Thunberg on Anti-oxidative and Inhibition of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *The Korea Association of Herbology*. 2018;18(1):75-83.
 18. Jung HK, Hong SJ, Jo YJ, Lee KJ, Lee JS, Park HJ, Shin IS, Lee SH, Han SY. Updated guidelines 2012 for gastroesophageal reflux disease. *Korean Journal of Gastroenterology*. 2012;60(4):202-204.
 19. Lodato F, Azzaroli F, Turco L, Mazzella N, Buonfiglioli F, Zoli M, Mazzella G. Adverse effects of proton pump inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010;24(2):193-201.
 20. DeVault KR, Castello DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *American Journal Gastroenterol*. 1999;94:1434-1440.
 21. Zhang Y, Zhang Z, Liu H, Zhang B, Liao Y, Zhang Z. Quantitative and chemical fingerprint analysis for quality evaluation of the dried bark of wild *Phellodendron amurense* Rupr. based on HPLC-DAD-MS combined with chemometrics methods. *Analytical Methods*. 2015;7(5):2041-2049.
 22. Herbal medicine editorial committee of Korean medicine college. *Herbal medicine*. Seoul : Younglimsa. 2011:221-222.
 23. Kim CM, Shin MK, An DK, Lee KS. The encyclopedia of oriental herbal medicine : DoSeochulpanjeongdam, 1997:50-52.
 24. Min YD. Cytotoxic and MDR Reversal Active Constituents from *Coptis japonica*, *Phellodendron amurense* and *Sinomenium acutum* : SungKyunKwan University Graduate school. Seoul. 2004.
 25. Lee MJ, Park JW, Kim DS, Kim JK, Choi DY, Kim CH. : Antioxidant and Nitrite Scavenging Activity of Water-Extract from *Phellodendron amurense* Rupr. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 1999;13(1):112-118.
 26. Wang W, Zu Y, Fu Y, Reichling J, Suschke U, Nokemper S, Zhang Y. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from China. *The American journal of Chinese medicine*. 2009;37(1):195-203.
 27. Um SD. Study on Fractional Utility Promotion of Five Medicinal Plants, *Artemisia princeps* and *Scutellaria baicalensis*, *Coptidis spp*, *Phellodendron amurense*, and *Houttuynia cordata*. Seoul National University Graduate School. Seoul. 2015.
 28. Folin O, Denis W. On phosphotungsticphosphomolybdic compounds as color reagent. *Journal of biological chemistry*. 1912;12:239-243.
 29. Lister CE, Lancaster JE, Sutton KH, Walker JR. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *Journal of the science of food and agriculture*. 1994;64:155-161.
 30. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181:1199-1200.
 31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;26(9-10):1231-1237.
 32. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992;13(3):637-648.
 33. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrohodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine*. 1994;16(2):149-156.
 34. Korean Traditional Knowledge Portal. Official Website. Retrieved Mar. 3, 2020, from <http://www.koreantk.com/ktkp2014/medicine/medicine-view.view?medCd=M0004391>
 35. Hillman L, Yadlapati R, Thuluvath AJ, Berendsen

- MA, Pandolfino JE. A review of medical therapy for proton pump inhibitor nonresponsive gastroesophageal reflux disease. *Diseases of the Esophagus*. 2017;30(9):1–15.
36. KIM JH. Protective effect of purple sweet potato hot water extract added to *Bacillus subtilis*-fermented soymilk against oxidative stress and cognition ability. Pusan National University Graduate School, Pusan, 2011.
37. Kim YY. Suppression of Reactive Oxygen Species by Inhibiting NADPH Oxidase Activity. University of Seoul Graduate School, Seoul, 2012.
38. Lim JS. Expression of Nrf2 Transcription Factor in Rat Kidney : Chonnam National University Graduate School, Gwangju, 2009.
39. Kim DY. Anti-oxidative Effect of Graviola Leaf Extracts via Activation of Nrf2/HO-1 Pathway in Macrophages. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2019;15(3):275–283.
40. Park SH, Kim KL, Yoon JH. Effects of combined treatment of chlorella intake and exercise training on antioxidant enzyme activity in rat's liver tissue. *The Korean Society of Living Environmental System*. 2014;21(5):829–836.
41. Jang BM. The effect of continuity treadmill training and accumulation of short duration treadmill training on expression of NF- κ B protein in rat skeletal muscle : Chonbuk National University Graduate School, Jeonju, 2012.