

HCl/ethanol로 유발한 급성 위염 마우스에서 PI3K/Akt/NF- κ B 신호전달경로를 통한 진피 열수 추출물의 보호 효과

이세희¹ · 신미래¹ · 박해진² · 노성수^{1,*}

¹대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, ²대구한의대학교 DHU 바이오융복합시험센터

The protective effect of *Citrus unshiu* Peel water extract through PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in mice with HCl/ethanol-induced acute gastritis

Se Hui Lee¹, Mi-Rae Shin¹, Hae-Jin Park², and Seong-Soo Roh^{1,*}

¹Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

²DHU Bio Convergence Testing Center, Daegu Haany University

Abstract This study aimed to verify the effect of *Citrus unshiu* peel water extract (CUP) on a mouse model of acute gastritis (AG) induced by HCl/ethanol. Several studies have found that CUP has anti-inflammatory effects. The AG model was induced by oral administration of 150 mM HCl/60% ethanol (550 μ L) to all groups except the control group. Also, for drug treatment, sucralfate (10 mg/kg) and CUP (100 or 200 mg/kg) were orally administered for 90 minutes before induction. The effect of CUP treatment was confirmed by gross gastric mucosal damage measurement, and the levels of Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT), Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT), and myeloperoxidase were reduced as well as the levels of oxidative stress biomarkers and their related proteins. In addition, the levels of inflammatory proteins, mediators, and cytokines were significantly downregulated by PI3K/Akt signaling. Taken together, these results show that CUP treatment alleviates AG by regulating PI3K/Akt signaling.

Keywords: Gastritis, anti-inflammatory, PI3K/Akt/NF- κ B signaling, *Citrus unshiu* Peel, HCl/ethanol

서 론

위장관은 위와 내장을 포함하는 소화 기능 시스템의 일부로, 기계적 및 화학적인 작용을 통해 음식을 영양소로 전환하고 이를 체내의 세포에 전달하는 기능을 필수적으로 수행한다(Jeon 등, 2015). 이러한 위장관 질환은 소화-흡수와 관련된 기능 장애나 염증, 염증, 스트레스 및 불규칙한 식습관 등에 의해 발생할 수 있으며, 위염, 대장염 및 궤양 등의 질병을 유발한다(Banks, 1998). 최근 전세계적으로 위장관 질환의 유병률이 급격히 증가하고 있으며, 중국, 일본, 한국을 비롯한 동아시아에서도 증가하고 있는 추세이다. 건강보험심사평가원의 통계에 따르면, 국내 위염·십이지장염 환자가 2018년에 약 530만명으로 집계되었다(Oh, 2020). 위장관 질환 중 하나인 위염은 흔한 상부위장관 질환으로, 약물, 염증 등의 외부 자극에 의해서 위 점막이 손상된 상태를 일컫는다(Xiang 등, 2004). 주로 약물과 염증 등으로 시작하여 병원성 감염, 흡연, 음주 및 스트레스 등으로 인한 소화불량, 흉통, 복부 팽만감의 증상을 나타내며, 증증으로 갈 수록 구토, 출혈, 메스꺼움 등을 나타내기도 한다(Amirshahrokhi와 Khalili, 2015;

Rocco, 2014). 현재 위염과 위식도 역류질환을 포함한 위장관 질환의 치료법으로는 양성자 펌프 억제제(proton-pump inhibitors, PPIs), 제산제 및 H2 수용체 길항제(H2 receptor antagonist, H2RA) 등의 약물이 사용되고 있으나, 이러한 약물은 완치를 목표로 하는 치료법이 아니며, 장기간 복용할 경우 부작용이 뒤따르는 것으로 알려져 있다(Corleto 등, 2014; Forgacs와 Loganayagam, 2008; Lee 등, 2020). 따라서, 부작용을 최소화하며 위염을 비롯한 위장관 질환의 증상을 효과적으로 완화할 수 있는 천연 치료제의 개발을 위해 다양한 연구가 활발히 이루어지고 있는 추세이다(Lee 등, 2011; Lee 등, 2022).

진피(*Citrus unshiu* Peel or *Citrus reticulata*)는 운향과(Rutaceae)에 속한 상록 소교목인 귤나무(*Citrus unshiu* Markovich)의 성숙한 과실의 과피이다(Mowat 등, 2016). 예로부터 천식, 구토, 혈액순환 장애 및 소화불량을 치료하는 약재로 한국, 중국 및 일본을 비롯한 동아시아에서 널리 사용되어져 왔다(Safranko 등, 2021). 진피에서 분리된 성분으로 narirutin, hesperidin 및 β -carotene 등이 포함되며, 특히 주요 flavonoid 화합물인 hesperidin을 다량 함유하고 있다(Lim 등, 2018). 진피의 여러 연구가 보고되고 있으며, 항우울증, 항비만, 항바이러스, 항산화, 항당뇨 및 항염증에 대한 약리학적 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Kang 등, 2018; Kim 등, 2018; Oh 등, 2012; Suzuki 등, 2015). 또한, Karthikeyan 등(2021)에 따르면, lipopolysaccharide (LPS)로 유도된 RAW 세포에서 항염증 및 항산화 효능을 나타낸다고 밝혔으며, Nishi 등(2021)은 전신 염증 모델에서 nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65)와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로의

*Corresponding author: Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Daegu 42158, Korea.

Tel: +82-53-770-2350

Fax: +82-53-768-6340

E-mail: ddede@dhu.ac.kr

Received February 15, 2022; revised April 14, 2022;

accepted April 20, 2022

조절로 인해 염증 억제효과를 나타냈다고 보고하였다. 이처럼 진피의 항염증 효과에 대한 여러 연구가 보고되어 있지만, 위장관 질환에 대한 기전은 명확하지 않다. 따라서, 진피의 여러 항염증 연구를 바탕으로 150 mM/60% ethanol로 유발한 급성 위염 동물 모델에서 진피 열수 추출물의 PI3K/Akt/NF- κ B 신호 경로 조절을 통한 염증 완화 효과를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

시료

본 실험에 사용한 진피는 용기한약국(Daegu, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 진피 300 g을 열탕추출기(Daewoong Bio, DWT-1800T, Hwaseong, Korea)를 이용하여 100°C에서 2시간 동안 10 배수의 증류수 3,000 mL로 추출하였다. 얻은 추출액을 여과한 후, 용매를 50°C의 감압 추출장치(Buchi B-480, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 이용하여 농축하였다. 그 다음 동결 건조기(LABCONCO, Kansas, MO, USA)로 완전 건조하여 수율 9.3%의 진피 파우더(CUP)를 얻었다. 이를 -80°C에서 냉동 보관하였으며, 실험 직전 증류수에 녹여 실험에 사용하였다.

진피 열수 추출물의 narirutin과 hesperidin 분석

진피 열수 추출물(CUP, 0.5 mg)을 1 mL의 methanol에 용해시켰으며, 용액을 원심분리(13,500 rpm, 3분)하여 상층액을 얻어 분석을 진행하였다. C18 column (Phenomenex 2.6 μ m C18 100Å, 2.1×100 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)에 용액(1 μ L)을 주입하였으며, 용매 시스템은 다음과 같다; 용매 A (deionized water with 0.1% formic acid), 용매 B (100% acetonitrile with 0.1% formic acid); 용매 A: 용매 B=82:18→82:18 (1 min)→75:25 (15 min)→0:100 (20 min)→0:100 (25 min)→82:18 (26 min)→82:18 (32 min); 0.2 mL/min의 유속으로 진행하였다. Narirutin과 hesperidin의 peak는 머무른 시간과 UV 스펙트럼을 비교하여 산출하였으며, CUP의 narirutin과 hesperidin의 정량은 peak 면적 측

정으로 수행되었다. 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40 μ g/mL의 농도로 peak 면적을 반복(5회)하여 표준 검량선을 구하였으며, narirutin과 hesperidin의 회귀계수(R^2)는 각각 0.9999와 0.9992로 계산되었다. CUP 내의 narirutin과 hesperidin의 함량은 각각 12.210±0.311, 9.998±0.146 (mg/g, mean±SEM)으로 나타났다(Fig. 1).

시약

본 실험에 사용된 ethanol은 Merck Millipore (Burlington, MA, USA)로부터 구매하였고, L-(+)-ascorbic acid와 aluminium chloride는 Thermo Fisher Scientific (Ward Hill, MA, USA)에서 구매하였으며, potassium persulfate, potassium phosphate dibasic, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), quercetin, gallic acid, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 1,1,3,3-tetramethoxypropane, 2-thiobarbituric acid (TBARS), potassium phosphate monobasic 및 sodium hydroxide은 Sigma-Aldrich Co. (St. Paul, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2',7-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구매하였으며, potassium acetate과 sodium carbonate는 Daejung chemicals & metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서 구매하였다. 또한, phosphoric acid와 hydrochloric acid (HCl)는 Duksan company (Ansan, Korea)에서 구매하여 실험에 사용하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), protease inhibitor mixture는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 1차 항체 gp91-phox (NOX2), p22^{phox}, phosphoinositide 3-kinase p85 α (PI3K), phospho-inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (p-IkBa), inhibitor of nuclear factor kappa B alpha (IkBa), nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ Bp65), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (Cox-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), β -actin 및 Histone은 Santa Cruz

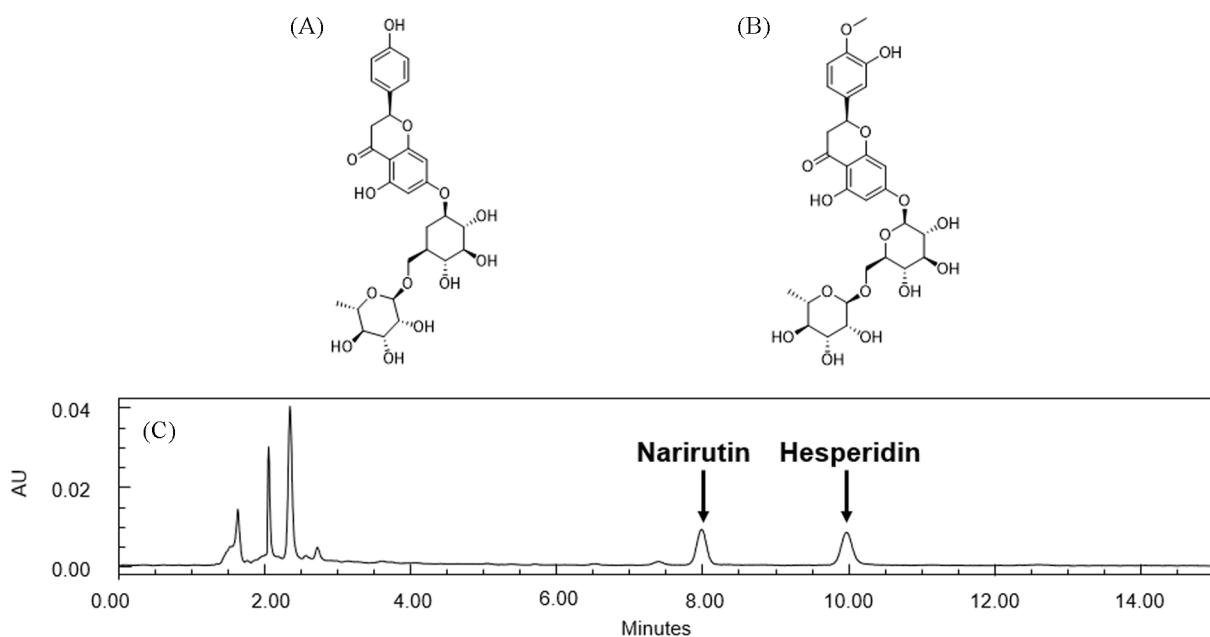


Fig. 1. Analysis of narirutin and hesperidin in the *Citrus unshiu* Peel water extract. (A) Chemical structure of narirutin (B) Chemical structure of hesperidin (C) The chromatogram of the CUP. CUP, *Citrus unshiu* Peel water extract.

Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구매하였으며, phospho-phosphoinositide 3-kinase p85/p55 (p-PI3K), Akt, phospho-Akt (p-Akt) 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MN, USA)에서 구매하였다. 또한, 2차 항체인 rabbit IgG antibody와 mouse IgG antibody는 GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection reagents는 GE Healthcare (Chicago, IL, USA)에서 구매하였고, 단백질 정량에 사용되는 pierce bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Ward Hill, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Total polyphenol과 total flavonoid 측정

진피 열수 추출물(CUP)의 total polyphenol 함량(mg gallic acid equivalents (GAE)/g)은 Rama 등(2013)의 Folin Ciocalteu's 방법으로 측정하였다. 100 μ L의 CUP, 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ L, 7.5% sodium carbonate를 혼합하여 상온에서 차광하여 30분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Tecan, Infinite M200 pro, Männedorf, ZRH, Switzerland)로 흡광도(765 nm)를 측정 한 뒤, 표준물질인 gallic acid를 이용하여 표준 검량선을 구하고 total polyphenol 함량을 산출하였다.

진피 열수 추출물(CUP)의 total flavonoid 함량(mg quercetin equivalents (QE)/g)은 Rama 등(2013)의 aluminum chloride 방법에 의해 측정하였다. 1 M potassium acetate solution 20 μ L, 560 μ L 증류수, 100 μ L의 CUP, 20 μ L의 10% aluminum chloride solution와 300 μ L의 methanol을 혼합하여 상온에서 차광하여 30분 동안 반응시킨 다음 흡광도(420 nm)를 측정하였다. 표준물질인 quercetin으로 표준 검량선을 구하여 total flavonoid 함량을 산출하였다.

DPPH 및 ABTS free radical 소거 활성 측정

진피 열수 추출물(CUP)의 항산화능 분석을 위해서 BLOIS (1958)의 DPPH free radical 소거법을 활용하여 측정하였다. 농도 별로 희석한 CUP 용액 100 μ L와 60 μ M DPPH용액 100 μ L을 혼합하여 실온에서 차광하여 30분 동안 반응시킨 다음 흡광도(540 nm)를 측정하였다. 본 실험에서 L-ascorbic acid는 양성대조군으로 사용하였으며, radical 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 아래의 식에 대입하여 계산한 값을 IC₅₀으로 나타내었다.

진피 열수 추출물(CUP)의 항산화능을 평가하기 위해서 RE 등 (1999)의 ABTS radical 소거법을 활용하여 측정하였다. 7 mM ABTS 시약과 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온과 차광의 조건에서 약 16시간 방치하여 ABTS^{•+}을 형성시켰다. 흡광도 415 nm에서 0.70±0.02의 측정값이 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. 5 μ L의 CUP와 희석된 ABTS 용액 95 μ L을 혼합하여 15분 동안 방치하고 흡광도(415 nm)를 측정하였다. 본 실험에서 L-ascorbic acid는 양성대조군으로 사용하였으며, radical 소거 활성이 50% 저해된 농도의 값을 아래의 식에 대입하여 계산한 값을 IC₅₀으로 나타내었다.

DPPH and ABTS radical scavenging activity(%)

$$= [1 - (OD_{\text{sample}} / OD_{\text{control}})] \times 100$$

OD_{sample}: Absorbance of sample

OD_{control}: Absorbance without sample

실험동물

본 실험은 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회(Institutional

Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(DHU2021-066)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. 본 실험에 사용되는 동물은 DBL (Eumseong, Korea)에서 6주령의 ICR mice (20-25 g 내외) 수컷을 구매하였으며, 물과 일반사료(조지방 5.0% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조단백질 18% 이상, 조단백질 8.0% 이하, 인 0.85% 이상, 칼륨 0.55% 이상, 나트륨 0.25% 이상, 칼슘 1.0% 이상, 마그네슘 0.15% 이상, NIH-41, Zeigler Bros, Inc., Gardners, PA, USA)를 자유롭게 공급하였다. 동물 사육실은 온도(23±2°C), 습도(50±10%) 및 light/dark cycle (12/12 시간)로 조절되며, 이러한 사육실에서 적응기를 1주일 동안 거친 후 본 실험에 투입되었다. 동물은 무작위로 각 군당 8마리씩 5군으로 분리하였다; (1) 아무런 처치를 하지 않은 대조군(Control), (2) 증류수를 경구투여한 유발군(Model), (3) sucralfate 10 mg/kg 투여군(SC), 진피 100 mg/kg 투여군(CUPL), 진피 200 mg/kg 투여군(CUPH). 동물 실험 전 12시간 절식시켰으며, 물만 공급하였다. 대조군을 제외한 나머지 군은 각각 약물을 경구투여 해주었으며, 90분 후 급성 위염 유발을 위해 150 mM HCl/60% ethanol을 혼합한 용액을 550 μ L을 경구투여해주었다. 그런 다음, 90분 후, isoflurane (Troikaa Pharmaceuticals Ltd., Gujarat, India)을 사용하여 흡입 마취시킨 후 심장에서 채혈한 혈액을 냉장고속원심분리기(GYROZEN Co. Ltd., LaboGene 1730R, Gimpo, Korea)를 이용하여 원심 분리(4,000 rpm, 4°C, 10분)하였으며, 얻은 혈청과 실험 동물에서 적출한 위 조직은 -80°C에서 냉동 보관하였다.

육안적인 위 점막 손상도 측정

위 점막의 손상도는 I-Solution lite (Innerview Co., Korea) 프로그램 사용하여 위 점막의 손상된 면적을 측정하였으며, 위 전체 면적과 비교한 후 다음의 식을 이용하여 값을 산출하였다.

Gastric lesion area (%)

$$= \text{injury area of stomach} / \text{total area of stomach} \times 100$$

간 기능 지표 분석

혈청 내 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 assay kit (Asanpharm Co., Ltd, Seoul, Korea)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

혈청 내 염증성 바이오마커 분석

혈청 내 myeloperoxidase (MPO)의 활성은 MPO colorimetric activity assay kit (BioVision, CA, USA)의 프로토콜에 따라 측정하였다.

혈청과 조직 내 산화적 스트레스 바이오 마커 분석

혈청 내 reactive oxygen species (ROS)의 수치는 Ali 등(1992)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)와 혈청을 혼합한 후, 25 mM DCFH-DA를 첨가한 후, UV-VIS 분광광도계(Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 emission 파장 535 nm와 excitation 파장 485 nm로 0분부터 30분까지 매 5분씩 측정된 값을 계산하였다.

조직 내 malondialdehyde (MDA) 수치는 Mihara 등(1978)의 방법으로 측정하였으며, 조직 샘플과 1% phosphoric acid를 잘 혼합시킨 후, 0.67% thiobarbituric acid를 첨가하여 가열시켰다(95°C, 45분). 그 후, butanol을 첨가하여 원심분리(3,000 rpm, 10분) 하여 상층액을 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents of *Citrus unshiu* Peel water extract

Sample name	Total polyphenol (mg gallic acid equivalents (GAE)/g)	Total flavonoid (mg naringin equivalent (QE)/g)
CUP ¹⁾	42.25±3.10	15.58±0.08

¹⁾CUP, *Citrus unshiu* Peel water extract; GAE, gallic acid; QE, quercetin. All values are expressed as mean ± SEM of three replications

위 조직 western blotting

위 조직의 세포질을 얻기 위해 protease inhibitor cocktail, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, 2 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM CaCl₂ 및 100 mM Tris-HCl (pH 7.4)을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Products, Bartlesville, OK, USA)와 homogenizer Stirrer (DAIHAN Scientific Co., Ltd., HS-30E, Wonju, Korea)로 분쇄한 후 아이스 위에서 30분간 정치시켰다. 그런 다음, NP-40 용액(10%)을 첨가하였으며, 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 2분)한 후 세포질을 포함하고 있는 상층액을 보관하였다. 핵을 분리하기 위해 NP-40 용액(10%)이 첨가된 buffer A (Washing buffer)로 2회 세척하고 100 µL의 buffer C (50 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF)를 첨가해 재부유 시킨 다음 10분마다 vortex를 3회 반복하였다. 그리고 원심 분리(12,000 rpm, 4°C, 10분)한 후 핵을 포함한 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 위 조직 세포질의 NOX2, p22^{phox}, p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-IκBα, IκBα, iNOS, Cox-2, TNF-α, IL-6 및 β-actin과 핵의 NFκBp65와 Histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 8-12 µg의 단백질을 8-15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane에 각각의 1차 antibody (1:1000)를 처리하여 overnight (4°C) 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각 밴드의 1차 antibody에 적절한 2차 antibody (1:3000)를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분 간격으로 5회 세척하였다. 그리고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd., Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인하였다. 각각의 band 정량은 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하였으며, 단백질 수준은 대조군의 단백질 수준으로 나눈 후 상대적 비로 나타났다.

통계분석

실험 수치는 mean±SEM (*in vitro*), mean±SD (*in vivo*)로 나타났다. 각 자료의 통계적 유의성은 SPSS (Version 25.0, IBM, NY, USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하여 least significant difference (LSD) test로 검증하였고, 대조군과 유발군, 유발군과 약물 투여군 사이에 유의성은 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 와 $p < 0.001$ 수준에서 유의성이 있다고 판정하여 나타났다.

결과 및 고찰

Total polyphenol과 total flavonoid 함량

CUP의 total polyphenol과 total flavonoid 함량 측정 결과는 다음과 같다. Total polyphenol 함량은 42.25±3.10 mg gallic acid equivalents (GAE)/g, total flavonoid 함량은 15.58±0.08 mg quercetin equivalent (QE)/g으로 나타났다(Table 1).

DPPH와 ABTS free radical 소거능 분석

DPPH와 ABTS radical 소거능을 측정한 결과는 다음과 같다. 양성대조물질로 사용한 L-(+)-ascorbic acid의 IC₅₀값은 1.13±0.04 µg/mL로 나타났고, CUP의 IC₅₀값은 94.44±0.44 µg/mL로 나타났다(Fig. 2A). ABTS radical 소거능을 측정한 결과, 양성대조물질로 사용한 L-(+)-ascorbic acid의 IC₅₀값은 2.98±0.44 µg/mL로 나타났고, CUP의 IC₅₀값은 107.47±1.00 µg/mL로 나타났다(Fig. 2B).

육안적인 위 점막 손상도 분석

육안적인 위 점막 손상도를 측정한 결과는 다음과 같다. 유발군(34.81±0.14)은 대조군(0.88±1.79)과 비교하여 위 점막의 출혈 및 점막의 결손을 유의적으로 나타냈다($p < 0.001$). 반면에 SC군(10.72±1.64), CUPL군(15.52±1.72) 및 CUPH군(13.17±2.05)은 유발군에 비해 위 점막의 출혈 및 점막의 결손이 유의하게 감소하였

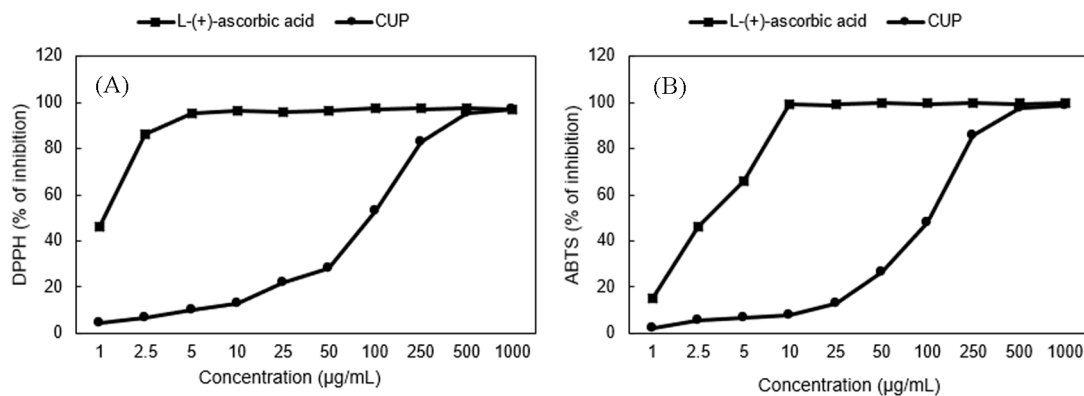


Fig. 2. Scavenging activity (IC₅₀) of *Citrus unshiu* Peel water extract on DPPH and ABTS free radical. CUP, *Citrus unshiu* Peel water extract. All values are expressed as mean±SEM of three replications.

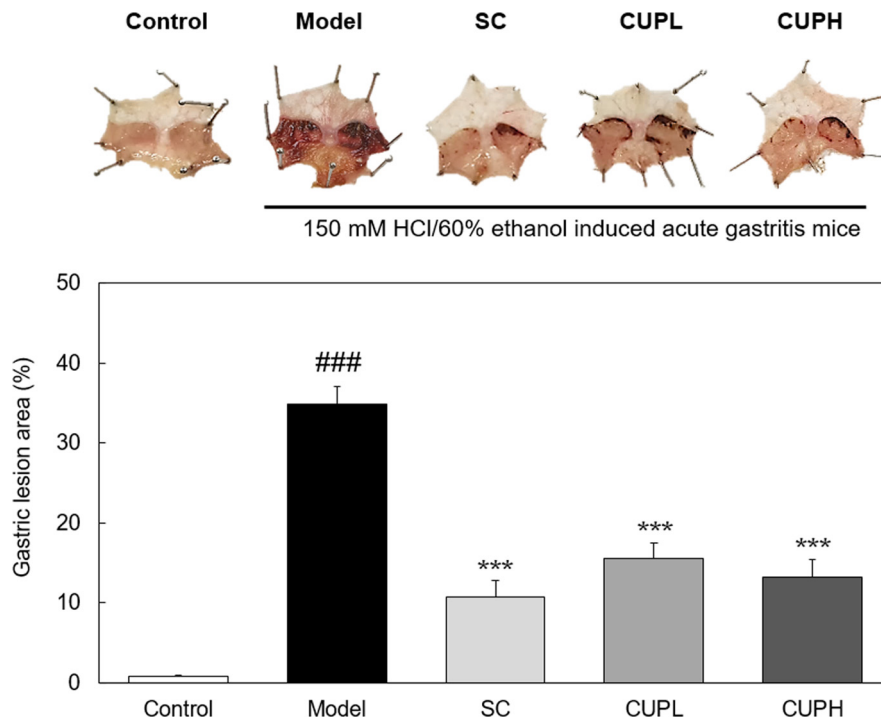


Fig. 3. Effects of CUP on gross gastric mucosal damage. Control, normal mice; Model, HCl/ethanol-induced mice; SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means±SD (n=8 mice). Significance: ### p <0.001 vs. Control, *** p <0.001 vs. Model.

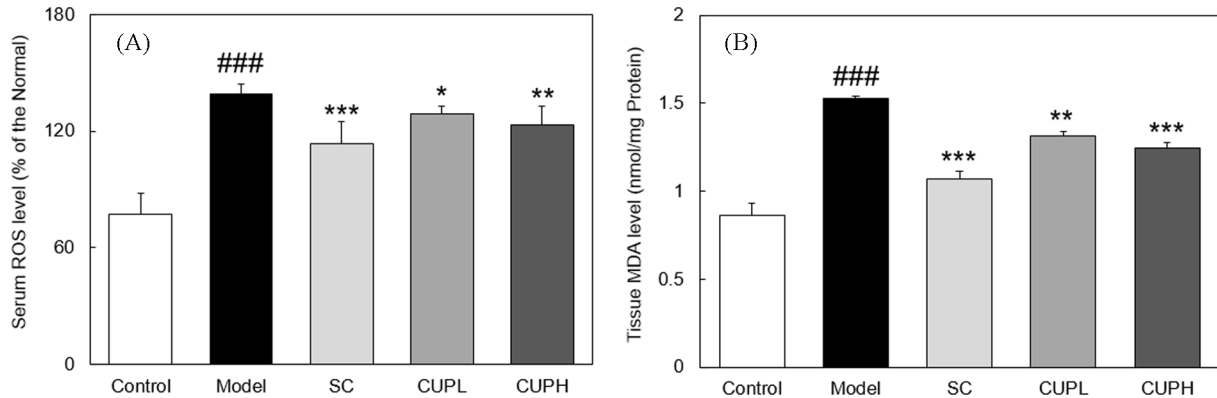


Fig. 4. Levels of ROS level in serum and MDA level in tissue. (A) Reactive oxygen species (ROS) level in serum (B) malondialdehyde (MDA) level in tissue. Control, normal mice; Model, HCl/ethanol-induced mice; SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means±SD (n=8 mice). Significance: ### p <0.001 vs. Control, * p <0.05, ** p <0.01, and *** p <0.001 vs. Model.

다(p <0.001) (Fig. 3).

혈청 내 간기능 지표 분석

GOT와 GPT 효소는 간 기능의 지표 분석으로 주로 분석되며 이들은 간 내 생성되는 대사에 필요한 효소이다. 주로 간세포에 존재하며 여러 요인으로 인해 간에 무리가 가해질 시 간세포가 파괴되면서 효소가 혈중으로 유리되며, 이러한 효소의 수치가 정상 간보다 증가하게 되면서 간의 기능 이상을 간접적으로 확인할 수 있다(Rahmouni 등, 2019). 따라서 GOT 및 GPT 수치의 증가가 간 기능 장애 및 조직 손상과 직접적인 관련이 있음을 측

적된 연구를 통해 확인할 수 있다(Huang 등, 2006; Tsai 등, 2020). 따라서 본 연구에서는 HCl/ethanol, sucralfate 및 CUP에 의한 간 손상이 관찰되는지 확인하고자 하였다. 혈청 내 간기능 지표인 GOT와 GPT (IU/L) 측정 결과는 다음과 같다. GOT의 수치는 대조군에 비하여 유발군에서 약 2.5배 유의성 있게 증가하였고(p <0.001), 유발군과 비교하여 SC군(p <0.001)은 40%, CUPL군(p <0.01)은 28% 및 CUPH군(p <0.001)은 32%로 모두 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다. GPT의 수치는 대조군에 비하여 유발군에서 1.39배가량 유의성 있게 증가하였으나(p <0.001), 반면에 SC군은 19% (p <0.05), CUPL군은 13% (p <0.05) 및 CUPH군은

Table 2. Effect of CUP on liver function indicator analysis and inflammatory biomarker analysis

	GOT ¹⁾ (IU/L)	GPT ²⁾ (IU/L)	MPO ³⁾ (mU/mL)
Control ⁴⁾	12.69±1.36	5.37±0.13	99.90±13.56
Model ⁵⁾	44.79±1.80 ^{###}	7.49±0.42 ^{###}	196.66±9.19 [#]
SC ⁶⁾	26.70±1.02 ^{***}	6.07±0.14 ^{**}	119.02±7.92 ^{**}
CUPL ⁷⁾	32.12±1.80 ^{**}	6.55±0.40	173.20±14.41
CUPH ⁸⁾	30.19±2.29 ^{***}	5.98±0.24 ^{**}	136.83±19.13 [*]

¹⁾GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; ²⁾GPT, glutamate pyruvate transaminase; ³⁾MPO, myeloperoxidase; ⁴⁾Control, normal mice; ⁵⁾Model, HCl/ethanol-induced mice; ⁶⁾SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; ⁷⁾CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 100 mg/kg body weight mice. ⁸⁾CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means±SD (n=8 mice). Significance: [#] $p<0.01$ and ^{###} $p<0.001$ vs. Control, ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$, and ^{***} $p<0.001$ vs. Model.

20% ($p<0.001$) 모두 유의성 있게 감소하였다(Table 2). 이러한 결과는 sucralfate와 CUP가 급성 위염 동물 모델에서 간 손상을 일으키지 않았을 뿐만 아니라 HCl/ethanol 유발로 인해 증가된 GOT와 GPT의 수치를 완화함을 나타낸다.

염증 바이오 마커 분석

Myeloperoxidase (MPO)는 호중구나 단핵구에 존재하며, 세포 및 미생물 사멸에 관여하는 반응성 종의 형성을 촉매함으로써 염증 반응에 필수적인 역할을 한다(Davies 등, 2008). 또한, 염증으로 인한 조직 손상을 촉진하고 폐 질환, 신장 손상, 당뇨병 및 패혈증과 같은 여러 질병의 발병기전에 기여한다(Galijasevic, 2019). 이에 본 연구에서 혈청 내 염증 바이오 마커인 MPO 수치를 측정하였으며 결과는 다음과 같다. 대조군과 비교하여 유발군에서 2배 정도 유의성 있게 증가하였으나($p<0.01$), 반면에 DSS 유발로

인해 증가한 MPO 수치가 CUPL군에서 12% 가량 감소하였으며, SC군($p<0.01$)과 CUPH군($p<0.05$)에서는 약 30% 이상 유의성 있게 감소하였다(Table 2).

혈청과 조직 내 산화적 스트레스 바이오 마커 분석

높은 산화적 스트레스(oxidative stress)는 세포 기능과 혈관 신생을 손상시키며, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성과 분해의 불균형으로 인해 과도하게 집적된 상태를 일컫는다. NADPH oxidase복합체의 일부인 NADPH oxidase 2 (NOX2)는 ROS의 주요 공급원으로서 생성을 담당하고 혈관 신생에도 중요한 역할을 한다(Oh 등, 2001). NADPH oxidase에 의해 생성되는 ROS는 산소를 중심으로 하는 유리기지만 각 조직의 세포에서 발생하며 강한 활성을 지닌 산소를 일컫는다. 과도하게 생성된 ROS는 인체의 세포를 구성하고 있는 DNA, 단백질 및 지질 등과 반응하게 되며 이들은 변형 및 기능 이상을 초래하게 된다. 또한, ROS가 세포막을 공격할 시 불포화지방산을 산화시켜 과산화지질을 형성하게 된다(Ji, 1995). 이에 본 연구에서 혈청 내 ROS 수치, 조직 내 MDA 수치, 산화적 스트레스 관련 단백질인 NOX2와 p22^{phox}을 분석하였으며 혈청 내 ROS와 조직 내 MDA의 수치를 측정된 결과는 다음과 같다. 혈청 내 ROS는 대조군과 비교하여 유발군에서 2배가량 유의성 있게 증가하였으나($p<0.001$), SC군은 18% ($p<0.001$), CUPL군은 7% ($p<0.05$), CUPH군은 12% ($p<0.01$) 정도 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4A). 조직 내 MDA는 대조군과 비교하여 유발군에서 77% 정도 유의성 있게 증가하였으나($p<0.001$), 유발군 대비 SC군, CUPL군, CUPH군은 각각 30% ($p<0.001$), 14% ($p<0.01$), 18% ($p<0.001$) 정도 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4B).

또한, 위 조직 내 산화적 스트레스 관련 단백질인 NOX2와 p22^{phox} 단백질의 발현을 측정된 결과는 다음과 같다. NOX2와 p22^{phox}의 경우, 대조군에 비해 유발군에서 각각 55, 66% 유의성 있게 증가하였다($p<0.001$). 반면에 유발군과 비교하여 CUPL군은 14% 정도 유의성 있게 감소하였으며(NOX2, $p<0.05$; p22^{phox},

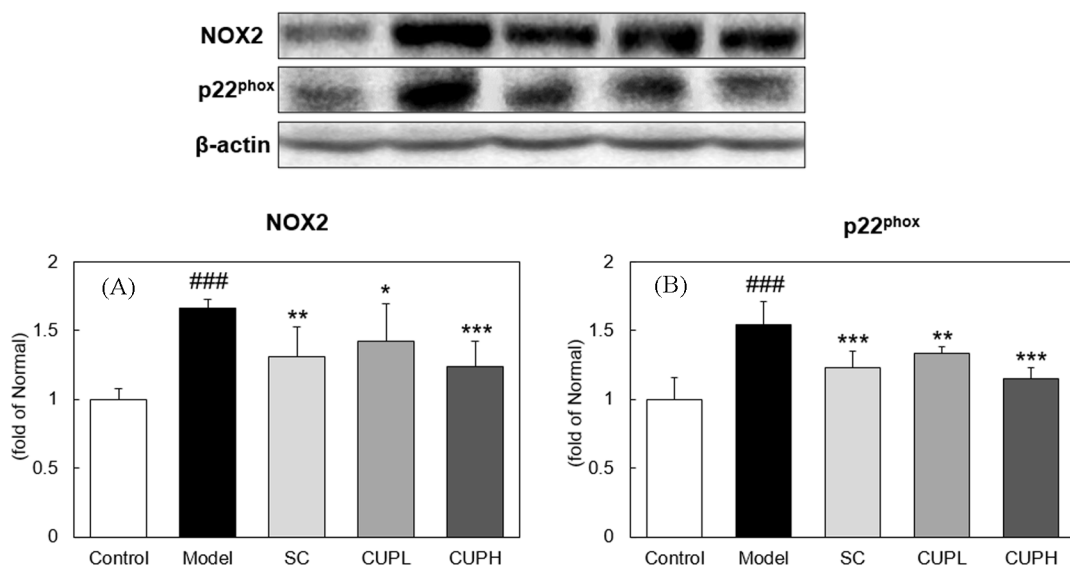


Fig. 5. Effect of CUP on NADPH-related proteins expression. (A) NADPH oxidase 2 (NOX2) (B) p22^{phox}. Control, normal mice; Model, HCl/ethanol-induced mice; SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means±SD (n=8 mice). Significance: ^{###} $p<0.001$ vs. Control, ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$, and ^{***} $p<0.001$ vs. Model.

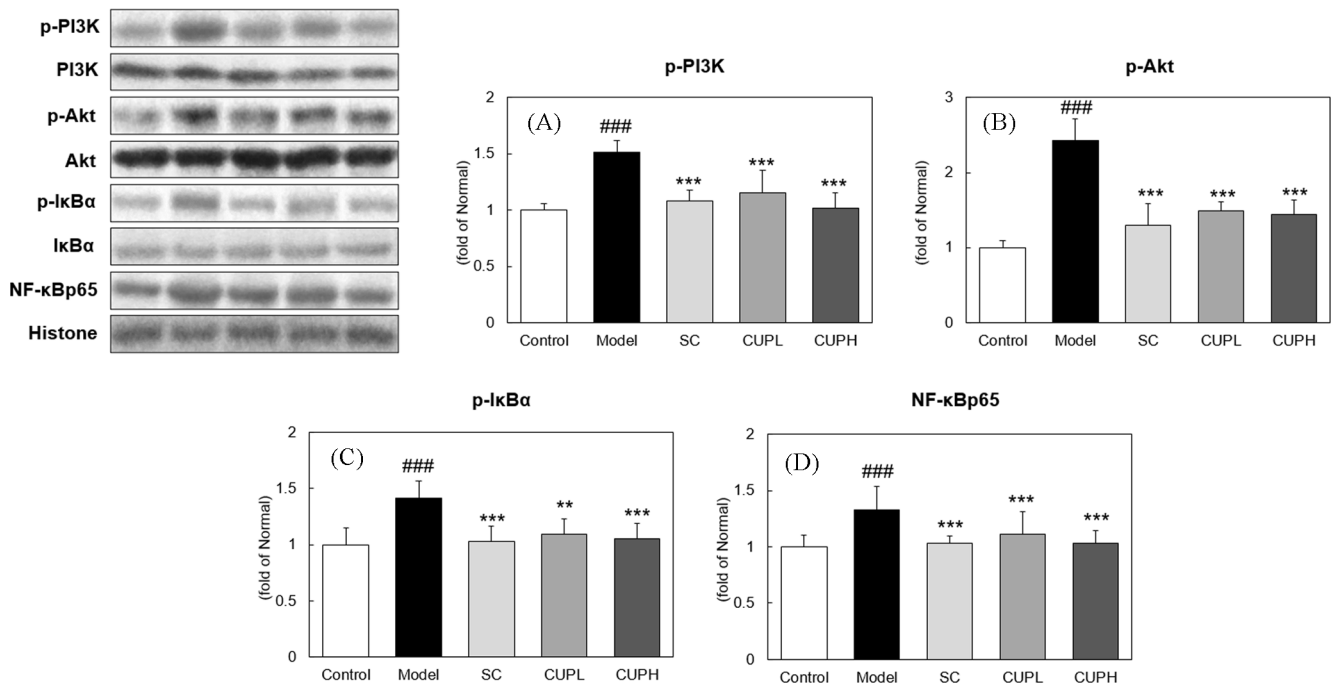


Fig. 6. Effect of CUP on PI3K/Akt/NF- κ B proteins expression. (A) p-PI3K (B) p-Akt (C) p-I κ B α (D) NF- κ Bp65. Control, normal mice; Model, HCl/ethanol-induced mice; SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 100 mg/kg body weight mice; CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means \pm SD (n=8 mice). Significance: ### p <0.001 vs. Control, ** p <0.01, and *** p <0.001 vs. Model.

p <0.01), SC군(NOX2, p <0.01; p22^{phox}, p <0.001)과 CUPH군 (p <0.001)은 21% 이상 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5).

위 조직의 PI3K/Akt 신호 전달 경로를 통한 NF- κ Bp65 발현

PI3K/Akt 신호 전달 경로는 생존, 증식, 분화 및 세포사멸과 같은 여러 세포 과정과 연관되어 있으며, Nakanishi 등(2014)에 따르면, PI3K/Akt의 활성화가 ROS 생성에 의해 매개되는 경로의 핵심적인 역할을 한다고 보고하였다. 또한, Sokolova 등(2014)은 *Helicobacter pylori*에 의한 위염의 발달 과정에서 PI3K/Akt 신호 전달 경로가 활성화된다고 보고하였으며, 이외에도 PI3K/Akt 신호 전달 경로를 조절하여 위염을 개선시키는 연구가 활발히 진행되고 있다(Tong 등, 2021; Zhao 등, 2008). 또한, PI3K/Akt 신호 전달 경로는 염증 반응을 일으키는 I κ B α 의 인산화와 NF- κ Bp65를 조절하는 것으로 알려져 있다(Liu 등, 2020). 위 조직 내 p-PI3K, p-Akt, p-I κ B α , NF- κ Bp65의 단백질 발현을 측정된 결과는 다음과 같다. p-PI3K의 단백질은 대조군과 비교하여 유발군에서 51%가량 유의성 있게 증가하였으나(p <0.001), 반면에 유발군과 비교하여 SC군, CUPL군, CUPH군은 대조군의 수준까지 유의성 있게 감소하였다(p <0.001). p-Akt의 경우, 대조군과 비교하여 유발군에서 2배가량 유의성 있게 증가하였다(p <0.001). 반면 유발군과 비교하여 SC군, CUPL군, CUPH군에서 각각 47, 39, 41% 정도 유의성 있게 감소하였다(p <0.001). 또한, p-I κ B α 의 경우, 대조군과 비교하여 유발군에서 42%가량 유의성 있게 증가하였으나(p <0.001), 유발군과 비교하여 SC군, CUPL군, CUPH군은 대조군의 수준까지 유의성 있게 감소하였다(p <0.01). NF- κ Bp65의 경우, 대조군과 비교하여 유발군에서 33% 정도 유의성 있게 증가하였다(p <0.01). 반면에 유발군과 비교하여 CUPL군은 16%가량 유의성 있게 감소하였으며(p <0.05), SC군과 CUPH군의 경우, 대조군의 수준까지 유의성 있게 감소함을 나타냈다(p <0.01).

위 조직의 염증성 매개인자 및 전염증성 사이토카인의 발현

NF- κ Bp65는 I κ B α 와 결합하여 불활성 상태로 존재하다가 PI3K/Akt의 신호에 의해 I κ B α 의 인산화가 이루어져 NF- κ Bp65 또한 활성화되고 핵으로 유도된 NF- κ Bp65는 전사 조절에 핵심적인 역할을 담당하며 염증성 매개인자와 전염증성 사이토카인의 발현을 유도하여 염증 반응을 촉진하게 된다(Liu 등, 2020; Lee 등, 2021). 위 조직 내 염증성 매개인자인 iNOS, COX-2와 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6의 단백질 발현을 측정된 결과는 다음과 같다. iNOS는 대조군과 비교하여 유발군에서 약 73% 가량 유의성 있게 증가하였으나(p <0.001), 유발군과 비교하여 SC군은 31% (p <0.001), CUPL군은 16% (p <0.01), CUPH군은 28% (p <0.001) 정도 유의성 있게 감소하였다. COX-2의 경우, 대조군과 비교하여 유발군에서 69% 유의성 있게 증가하였으며(p <0.001), 유발군과 비교하여 SC군과 CUPH군은 약 20%가량 유의성 있게 감소하였다(p <0.01). TNF- α 는 대조군과 비교하여 유발군에서 72% 정도 유의성 있게 증가하였으나(p <0.001), 유발군과 비교하여 SC군과 CUPH군은 약 17% 정도 유의성 있게 감소하였다(p <0.01). IL-6의 경우, 대조군과 비교하여 유발군에서 약 2배가량 유의성 있게 증가하였다(p <0.001). 반면에, 유발군과 비교하여 SC군은 19% (p <0.01), CUPL군은 10%, CUPH군은 25% (p <0.001) 정도로 감소하였으며, CUPL군은 제외하고 모두 유의성을 나타냈다.

요 약

본 연구에서는 우선 진피 열수 추출물의 *in vitro* 항산화능을 평가하기 위해 total polyphenol, total flavonoid 함량, DPPH 및 ABTS radical 소거능을 분석한 후, 150 mM/60% ethanol로 유발한 급성 위염 동물 실험을 진행하여 급성 위염 완화 효과를 검증하였다. 약물투여군의 혈청 내 ROS와 MPO 수준, 조직 내

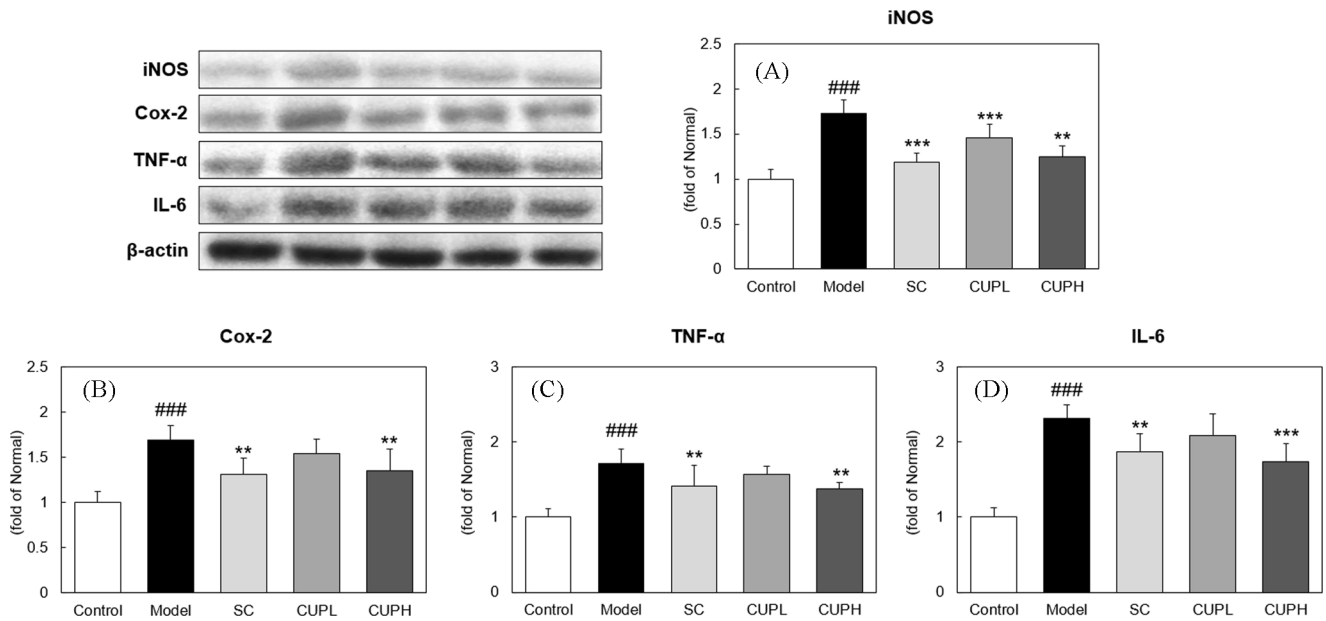


Fig. 7. Effect of CUP on inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines expression. (A) iNOS (B) Cox-2 (C) TNF-α (D) IL-6. Control, normal mice; Model, HCl/ethanol-induced mice; SC, HCl/ethanol-induced with sucralfate 10 mg/kg body weight mice; CUPL, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 100 mg/kg body weight mice; CUPH, HCl/ethanol-induced with *Citrus unshiu* Peel water extract 200 mg/kg body weight mice. All data are expressed as means±SD (n=8 mice). Significance: ### p <0.001 vs. Control, ** p <0.01, and *** p <0.001 vs. Model.

MDA 수준의 유의성 있는 감소를 확인하였으며, western blot을 통해 NOX2와 p22^{phox}를 포함한 산화적 스트레스 관련 단백질을 억제하였고, PI3K/Akt/NF-κB 신호 전달 경로를 통한 염증성 단백질의 현저한 감소를 확인하였다. 따라서 이러한 결과는 진피 열수 추출물이 급성 위염에 대한 완화 효과를 나타냈으며, 위염 및 천연 치료제의 후보 소재로서 가능성이 있다고 판단된다. 또한, 향후 만성 위염, 위암과 같은 위장 질환에 관한 추가 연구에서 진피 열수 추출물의 활용 가능성을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단에서 시행한 (2017R1A2B2006858)와 (2018R1A5A2025272)의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* 13: 637-648 (1992)
- Amirshahrokhi K, Khalili AR. The effect of thalidomide on ethanol-induced gastric mucosal damage in mice: involvement of inflammatory cytokines and nitric oxide. *Chem. Biol. Interact.* 225: 63-69 (2015)
- Banks WJ. *Applied veterinary histology*. second edition. Can. J. Vet. Res. 52: 398 (1998)
- BLOIS MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- Corleto VD, Festa S, Di Giulio E, Annibale B. Proton pump inhibitor therapy and potential long-term harm. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabet. Obes.* 21: 3-8 (2014)
- Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid. Redox. Sig.* 10: 1199-1234 (2008)
- Forgacs I, Loganayagam A. Overprescribing proton pump inhibitors. *BMJ* 336: 2-3 (2008)
- Galijasevic S. The development of myeloperoxidase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 29: 1-7 (2019)
- Huang XJ, Choi YK, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors (Basel)* 6: 756-782 (2006)
- Jeon WY, Lee MY, Shin IS, Jin SE, Ha H. Curcuma aromatica water extract attenuates ethanol-induced gastritis via enhancement of antioxidant status. *Evid. Based. Complement. Alter. Med.* 2015: 582496 (2015)
- Ji LL. Oxidative stress during exercise implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Bio. Med.* 18: 1079-1086 (1995)
- Kang S, Song S, Lee J, Chang H, Lee S. Clinical investigations of the effect of Citrus unshiu peel pellet on obesity and lipid profile. *Evid. Based. Complement Alter. Med.* 2018: 4341961-4341966 (2018)
- Karthikeyan A, Kim HH, Prathi V, Moniruzzaman M, Lee KH, Kalaiselvi S, Kim GS, Min T. Assessment of Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Citrus unshiu Peel (CUP) Flavonoids on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Plants (Basel)* 10: 2209 (2021)
- Kim HJ, Han JS, Kim SH, Park HJ, Park HS, Ko MK, et al. Study on the effects of natural herb extract against acute gastritis induced by HCl-ethanol in SD rats. *Journal of Animal Assisted Psychotherapy* 6: 57-66 (2017)
- Kim MH, Lee HS, Lee HA, Choi JH, Park SY, Kim SH, et al. Effect of Lentinus edodes extract against acute gastritis in Wistar Rats. *Journal of Animal Assisted Psychotherapy* 6: 79-84 (2017)
- 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. *Kor. J. Herbology* 33: 101-108 (2018)
- Lee JS, Do EJ, Kwak MA, Park HJ, Ha DI, Sung KJ, Kim MR. Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of Extract of Citri Pericarpium on Serum Lipid Profiles in Subjects: a Randomized, Double-blind. *Kor. J. Herbology* 26:125-132 (2011)
- Lee SH, Lee JA, Shin MR, Lee JH, Roh SS. The Protective Effect

- of Water Extract of Phellodendri Cortex in Chronic Reflux Esophagitis-induced Rats. *Kor. J. Herbology* 35: 25-36 (2020)
- Lee SH, Lee JA, Shin MR, Lee JH, Roh SS. The Protective Effect of *Arecae Semen* and *Coptidis Rhizoma* in a Chronic Reflux Esophagitis Rat Model. *J. Int. Korean Med.* 42: 11-24 (2021)
- Lee JA, Shin MR, Park HJ, Roh ss. *Scutellariae Radix* and *Citri Reticulatae Pericarpium Mixture* Regulate PPAR γ /RXR Signaling in Reflux Esophagitis. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2022: 6969241 (2022)
- Lieber CS. Gastritis in the alcoholic: Relationship to gastric alcohol metabolism and *Helicobacter pylori*. *Addict. Biol.* 3: 423-433 (1998)
- Lim DW, Um MY, Han T, Lee J, Kim YT, Cho S, Kim IH, Han D, Lee C. Standardized Citrus unshiu peel extract ameliorates dexamethasone-induced neurotoxicity and depressive-like behaviors in mice. *Metabolic. Brain Disease* 33: 1877-1886 (2018)
- Liu J, Zhu M, Feng Y, Tang Q, Xu M. The multidrug resistance can be reversed for the decrease of P-gp and LRP by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway in nasopharynx carcinoma. *Biosci. Rep.* 40: BSR20190239 (2020)
- Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 60: 571-607 (2016)
- Nakanishi A, Wada Y, Kitagishi Y, Matsuda S. Link between PI3K/AKT/PTEN pathway and NOX protein in diseases. *Aging. Dis.* 5: 203-211 (2014)
- Ning JW, Lin GB, Ji F, Xu J, Sharify N. Preventive effects of geranylgeranylacetone on rat ethanol-induced gastritis. *World J. Gastroenterol.* 18: 2262-2269 (2012)
- Nishi K, Ito T, Kadota A, Ishida M, Nishiwaki H, Fukuda N, Kanamoto N, Nagata Y, Sugahara T. Aqueous Extract from Leaves of Citrus unshiu Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in a Mouse Model of Systemic Inflammation. *Plants (Basel)* 10: 1708 (2021)
- Oh JH. Protective effect of *Dolichos lablab* Linne extract on acute and chronic gastric mucosal damage [dissertation]. Daejeon University, Daejeon, Korea (2020)
- Oh YC, Cho WK, Jeong YH, Im GY, Yang MC, Hwang YH, Ma JY. Anti-inflammatory effect of Citrus unshiu peel in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Am. J. Chin. Med.* 40: 611-629 (2012)
- Oh TY, Lee JS, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free. Radic. Biol. Med.* 30: 905-915 (2001)
- Rahmouni F, Badraoui R, Amri N, Elleuch A, El-Feki A, Rebai T, Saoudi M. Hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats induced by carbon tetrachloride and the protective effects of *Teucrium polium* and vitamin C. *Toxicol. Mech. Methods* 29: 313-321 (2019)
- Rama P, Vignesh, A. and Lakshmanan, G. In vitro antioxidant activity of *Achyranthes aspera* Linn. *Int. J. Med. Pharm.* 3: 67-78 (2013)
- 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 Bio. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
- Rocco A, Compare D, Angrisani D, Sanduzzi Zamparelli M, Nardone G. Alcoholic disease: liver and beyond. *World. J. Gastroenterol.* 20: 14652-14659 (2014)
- Šafranko S, Ćorković I, Jerković I, Jakovljević M, Aladić K, Šubarić D, Jokić S. Green Extraction Techniques for Obtaining Bioactive Compounds from Mandarin Peel (*Citrus unshiu* var. Kuno): Phytochemical Analysis and Process Optimization. *Foods* 10: 1043 (2021)
- Sokolova O, Vieth M, Gnad T, Bozko PM, Naumann M. *Helicobacter pylori* promotes eukaryotic protein translation by activating phosphatidylinositol 3 kinase/mTOR. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 55: 157-163 (2014)
- Suzuki M, Sasaki K, Yoshizaki F, Oguchi K, Fujisawa M, Cyong JC. Anti-hepatitis C virus effect of Citrus unshiu peel and its active ingredient nobiletin. *Am. J. Chin. Med.* 33: 87-94 (2015).
- Soreide K, Thorsen K, Soreide JA. Strategies to improve the outcome of emergency surgery for perforated peptic ulcer. *Br. J. Surg.* 10: 51-64 (2014)
- Tong Y, Wang R, Liu X, Tian M, Wang Y, Cui Y, Zou W, Zhao Y. Zuojin Pill ameliorates chronic atrophic gastritis induced by MNNG through TGF- β 1/PI3K/Akt axis. *J. Ethnopharmacol.* 271: 113893 (2021)
- Tsai JC, Peng WH, Chiu TH, Huang SC, Huang TH, Lai SC, Lai ZR, Lee CY. Hepatoprotective effect of *Scoparia dulcis* on carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice. *Am. J. Chin. Med.* 38: 761-775 (2020)
- Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86: 271-278 (1978)
- Xiang Z, Si JM, Huang HD. Chronic gastritis rat model and role of inducing factors. *World J. Gastroenterol.* 10: 3212-3214 (2004)
- Zhao L, Lee JY, Hwang DH. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway negatively regulates Nod2-mediated NF- κ B pathway. *Biochem. Pharmacol.* 75: 1515-1525 (2008)