

알코올성 위염에 대한 鈞鈞藤의 항염증 효과

이진아^{1#}, 이태종^{1#}, 김진영¹, 신미래¹, 박해진², 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : DHU 바이오융복합시험센터

Anti-inflammatory effect of *Uncariae Ramulus et Uncus* on alcohol-induced gastritis

Jin A Lee^{1#}, Tae Jong Lee^{1#}, Jin Young Kim¹, Mi-Rae Shin¹
Hae-Jin Park², Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sinchondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Republic of Korea

2 : DHU Bio Convergence Testing Center, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38610, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : Gastritis refers to an inflammatory disease of the gastric mucosa. Alcohol is one of the main aggression factors, causing bleeding and inflammation in the gastric mucosa and it is known to not only increase lipid peroxide levels, but also deplete key antioxidant factors. The purpose of this study was to determine the effect of *Uncariae Ramulus et Uncus* water extract (URW) in alcohol-induced gastritis.

Methods : The total polyphenol and flavonoid contents of URW were confirmed through an *in vitro* experiment. Also, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) activity were confirmed. For *in vivo* experiments, mice were divided into 4 groups (n=8). Also, 1 hr after oral administration of each drug, 50% ethanol was orally administered to induce gastritis.

Results : As a result of *in vitro* experiments, URW showed excellent antioxidant activity. In alcohol-induced gastritis, URW alleviated the damage to the gastric mucosa caused by alcohol. Also, URW decreased reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) levels in serum and gastric tissues, and significantly decreased the expression of NADPH oxidases in gastric tissues. In addition, it significantly modulated the nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2) and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B) pathways as well as significantly increased the expression of anti-inflammatory proteins.

Conclusions : These results suggest that URW not only reduces oxidative stress through excellent antioxidant activity but also relieves gastric mucosal inflammation as a regulator of Nrf2 and NF- κ B pathways.

Key words : *Uncariae Ramulus et Uncus*, gastritis, antioxidant, oxidative stress, inflammation

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

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Jin A Lee, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sinchondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Republic of Korea.

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

Tae Jong Lee, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sinchondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : nonstop615@djcare.net

· Received : 02 August 2022 · Revised : 14 September 2022 · Accepted : 25 September 2022

I. 서 론

위염은 위 점막에 생기는 염증성 질환을 말한다. 위벽은 점막층, 점막하층, 근육층, 장막층으로 이루어져 있으며, 첫 번째 층인 점막층이 손상된 경우를 보통 위염이라 하며, 소화불량, 복통, 메스꺼움 및 구토 등의 증상이 나타난다. *Helico-bacter pylori* (*H. pylori*) 감염, NSAIDs, 스트레스, 알코올 등과 같은 공격인자에 의해 위 점막 내 방어인자의 균형이 깨지게 되면 위염이 발생한다고 알려져 있으며, 특히 알코올은 위 점막을 손상시키는 주요한 공격인자 중 하나로 알코올의 과다 섭취는 위 점막에 출혈 및 염증을 발생시키며, 과산화지질 수치를 높일 뿐 아니라 주요 항산화 인자를 고갈시키는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 또한, 많은 연구들에서 위염을 일으키는 공격인자들은 인체 내에 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)를 발생시킨다고 보고되었으며, 이러한 활성산소의 과도한 증가는 세포의 과산화지질 형성 증가로 이어지며³⁾, 세포 내 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 발현을 유도하여 염증성 매개 사이토카인을 증가시킴으로써 위염을 발생시킨다고 알려져 있다⁴⁾. 위염을 치료하기 위해 사용되어지는 치료제로 점막 손상을 유발하는 공격인자 억제제, 점막을 보호하는 방어인자 증강제 및 제산제 등이 복합적으로 사용되어지고 있으나 이러한 치료제들은 우수한 임상치료 효과에도 불구하고 위장 장애, 발진, 두드러기, 가려움 등의 부작용 뿐 아니라 일부 만성 난치성 위염 및 위궤양에 대해서는 치료의 한계를 보이는 경우가 있어 이를 개선 보완 할 수 있는 약물의 개발이 필요하다⁵⁻⁷⁾.

조구등 (釣鉤藤, *Uncariae Ramulus et Uncus*)은 꼭두서니과 (茜草科, Rubiaceae)에 속한 상록 (常綠) 목질등본 (木質藤本)인 화구등 (華鉤藤) *Uncaria sinensis* (Oliv.) Havil. 또는 기타 동속 근연식물의 갈고리 (鉤)가 달린 가지를 건조한 것으로, 봄과 가을에 갈고리가 달린 어린가지를 채취하여 쉐건 (晒乾)하거나 약간 찌서 말린 것이다. 이외에도 구등 (鉤藤) *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. (= *Ouroparia rhynchophylla* Maltz)과 대엽구등 (大葉鉤藤) *Uncaria macrophylla* Wall., 모구등 (毛鉤藤) *U. hirsuta* Havil., 또는 무병과구등 (無柄果鉤藤) *U. sessifructus* Roxb., 반지구등 (攀枝鉤藤)(개갈비루덩굴) *U. scandens* (Smith) Hutch 등이 사용되고 있다⁸⁾. 釣鉤藤은 평간식풍 (平肝息風)의 효능을 가지고 있어서 두통현훈 (頭痛眩暈), 경간추축 (驚癇抽搐) 등 질환에 다양하게 활용되어 왔으며, Rhynchophylline, Isorhynchophylline과 같은 인돌 알칼로이드를 함유하고 있어 심혈관 및 중추신경계와 관련된 다양한 질병의 치료에 광범위하게 사용되어 왔다⁹⁾. 또한, 여러 연구에서 釣鉤藤에 대한 항고혈압, 항간질 효과가 보고하였으며¹⁰⁾, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 우울증에 대해 유사한 약리학적 신경 보호 효과를 가진다고 보고하였다¹¹⁾. 특히 식물유래 알칼로이드는 염증성 질환 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 기존 연구에서 釣鉤藤 추출물은 NF- κ B 경로를 차단하여 다양한 염증으로 인한 NO 및 전염증성 사이토카인을 감소시키는 것으로 보고되었다^{12,13)}. 하지만 소화기계 질환에 포함되는 위염에 대한 釣鉤藤의 효능에 대해서는 보고되지 않은 바, 본 연구에서는 염증성 질환에 효과적이라고 알려진 釣鉤藤이 알코올로 인해 유발된 위염에 미치는 효과 및 그 기전에 확인함으로써 위염 치료를

위한 새로운 기능성 소재로서의 활용 가능성을 평가하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료추출

본 실험에서 사용한 釣鉤藤은 용기한약국 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사한 후, 약전규격에 적합한 것만을 사용하였다. 釣鉤藤 200 g을 분쇄하여 증류수 2 L를 첨가하여 열탕 추출기로 2시간 추출하였다. 얻어진 추출물은 감압 추출장치로 농축한 후, 동결 건조기를 이용해 완전 건조하여 파우더를 얻었다 (URW, yield 2.20%). 얻어진 추출물은 실험 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 L-ascorbic acid와 aluminum chloride는 Alfa Aesar (Wardhill, CA, USA)에서 구입하였으며, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), ethanol, gallic acid, Folin-ciocalteu's phenol reagent, quercetin, methanol, potassium ferricyanide, ferric chloride, n-butanol, 1,1,3,3-Tetramethoxypropane, sucrose octasulfate aluminum complex (sucralfate), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, 2-Mercaptoethanol, Bromophenol blue는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Sodium carbonate와 potassium acetate는 Daejung chemicals&metals Co., Ltd. (Siheung, Korea)에서 구입하였으며, Phosphoric acid와 trichloroacetic acid는 Duksan company (Ansan, Korea)에서 구입하였고, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였다. 또한, Pierce bicinchoninic acid (BCA)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Western blotting을 위한 ECL Western Blotting Detection Reagents는 Cyanagen Srl (Bologna, Italy)에서 구입하였으며, nitrocellulose membranes는 Amersham GE Healthcare (Little Chalfont, UK)에서 구입하였고, NADPH oxidase 2 (NOX2), p47^{phox}, p22^{phox}, nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase-1 (SOD-1), Catalase, glutathione peroxidase-1/2 (GPx-1/2), nuclear factor- κ B p65 (NF- κ Bp65), inhibitor of nuclear factor κ B α (I κ B α), phospho-inhibitor of nuclear factor κ B α (p-I κ B α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6),

interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), Histone, β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였으며, 2차항체는 GeneTex, Inc. (Irvine, LA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 실험동물

5주령 ICR mouse 수컷 (20-25 g)을 대한바이오링크 (음성, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 사육실 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였다. 사육실 조건은 conventional system으로 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 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., USA)와 물은 충분히 공급하였다. 본 실험은 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대구한의대학교 동물실험윤리 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee : IACUC)의 승인 (승인번호: DHU 2022-056)을 받아 진행하였다.

2. 방법

1) 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

URW의 총 폴리페놀 함량은 다음과 같이 측정하였다¹⁴⁾. 시료 100 μL , 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μL 및 7.5% sodium carbonate 400 μL 를 혼합하여 실온에서 30분 반응시킨 후, UV 분광광도계 (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출하였다.

URW의 총 플라보노이드 함량은 다음과 같이 측정하였다¹⁵⁾. 시료 100 μL , methanol 300 μL , 1 M potassium acetate solution 20 μL , 10% aluminum chloride solution 20 μL 및 증류수 560 μL 를 혼합하여 실온에서 30분 반응시킨 후, UV 분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

2) DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정

URW의 DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같이 측정하였다¹⁶⁾. 농도별로 희석한 시료 100 μL 와 60 μM DPPH 용액 100 μL 를 혼합하여 실온에서 30분 반응시킨 후, UV 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

URW의 ABTS 라디칼 소거능은 다음과 같이 측정하였다¹⁷⁾. 7.4 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간 이상 방치하여 ABTS^+ 를 형성시킨 후, 415 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 에탄올을 이용하여 희석하였다. 농도별로 희석한 시료 5 μL 와 ABTS^+ 용액 95 μL 를 혼합하여 실온에서 15분 반응시킨 후, UV 분광광도계를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DPPH와 ABTS의 표준물질은 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 50%의 라디칼이 소거되는 농도를 IC_{50} 으로 나타냈다. 라디칼 소거능은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH and ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - \text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{blank}}) \times 100$$

3) FRAP 측정

URW의 ferric reducing antioxidant power (FRAP)은 다음과 같이 측정하였다¹⁸⁾. 농도별로 희석한 시료 200 μL , 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) 500 μL 및 1% potassium ferricyanide 500 μL 를 혼합하여 50°C 에서 20분 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 500 μL 를 혼합하여 실온에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액, 증류수, 0.1% ferric chloride solution (FeCl_3)을 5:5:1 (v/v/v)의 비율로 혼합한 후, UV 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 L-ascorbic acid를 사용하여 비교하였다.

4) 알코올성 위염 유발 및 처치

실험동물은 아무런 처치를 하지 않은 정상군 (Nor), 증류수를 단회 투여한 후 알코올성 위염을 유발한 대조군 (Con), Sucralfate 10 mg/kg를 단회 투여한 후 알코올성 위염을 유발한 양성대조군 (SC10), URW 100 mg/kg를 단회 투여한 후 알코올성 위염을 유발한 약물군 (UR100) 총 4그룹으로 그룹당 8마리씩 무작위로 분류하였다. 실험 전 18시간동안 절식하였다. 각 약물을 농도에 맞게 경구 투여하였으며, 1시간 후 50% ethanol을 각 0.55 mL씩 경구 투여하여 위염을 유발하였다. 50% ethanol 투여 1시간 후 isoflurane (Telangana, India)으로 흡입 마취하여 혈액 채취 및 위 조직을 적출하였다. 채취한 혈액은 원심분리 (4,000 rpm, 10 min)하여 혈청을 분리하였으며, 분리한 혈청과 위 조직은 -80°C 에서 보관하였다.

5) 위 점막 손상 확인

적출한 위 조직을 saline으로 세척한 후 고정하여 광학 디지털 카메라 (DSCHX50V, Sony, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하였다. 손상된 위 점막 측정은 iSolution Lite $\times 64$ (IMT I-Solution Inc., Burnaby, BC, Canada) 프로그램을 이용하여 실제 손상 부위의 면적을 측정한 후, 위 전체 면적과 비교하여 비율로 표시하였다.

$$\text{위 손상 비율} = \frac{\text{위 손상 면적}}{\text{위 전체 면적}} \times 100$$

6) ROS 측정

Reactive oxygen species (ROS) 값은 다음과 같이 측정하였다¹⁹⁾. 샘플 10 μL , 50 mM phosphate buffer 190 μL 및 1.25 mM DCFDA 50 μL 를 혼합한 후, UV 분광광도계

(infinite F200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 0분부터 매 5분씩 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 형광값의 변화를 측정하였다. ROS의 수준은 Nor군과의 상대적인 비로 나타냈다 (represented as 1).

7) MDA 측정

Malondialdehyde (MDA) 값은 다음과 같이 측정하였다²⁰⁾. 샘플 100 μ L, 1% phosphoric acid 50 μ L 및 0.67% thiobarbituric acid 167 μ L를 혼합한 후, 95°C에서 45분간 끓여주었다. 그 후, n-butanol 500 μ L을 첨가하여 실온에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. UV 분광광도계 이용하여 540 nm에서 분리된 상층액의 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 MDA 시약을 사용하였으며, 표준 검량선을 구하여 MDA 값을 산출하였다.

8) 위 조직 western blotting

위 조직의 세포질을 얻기 위해 10 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.8), 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, protease inhibitor mixture solution을 첨가한 buffer A를 넣고 조직 분쇄기 (tissue grinder) (Biospec Product, Bartlesville, OK, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 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 μ L의 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 원심분리 한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 위 조직 세포질의 NOX2, p47^{phox}, p22^{phox}, Keap1, HO-1, SOD-1, Catalase, GPx-1/2, I κ B α , p-I κ B α , iNOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10, β -actin 단백질과 핵에서의 Nrf2, NF- κ Bp65, Histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 14 μ g의 단백질을 10-14% 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 2시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 membrane을 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co., Ltd., 서울, 한국)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

9) 통계분석

*In vitro*의 수치는 mean \pm SEM으로, *in vivo*의 수치는 mean \pm SD로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, 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 유의수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

URW의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과, URW의 총 폴리페놀 함량은 143.82 \pm 0.28 mg (GAE)/g으로 나타났으며, URW의 총 플라보노이드 함량은 33.92 \pm 0.57 mg (QE)/g으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Total Polyphenol and Total Flavonoid Contents of URW

Sample	Total polyphenol mg (GAE)/g	Total flavonoid mg (QE)/g
URW	143.82 \pm 0.28	33.92 \pm 0.57

URW, Uncariae Ramulus et Uncus water extract; GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalents. All values are expressed as mean \pm SEM of three replications.

2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능 측정

URW의 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS 라

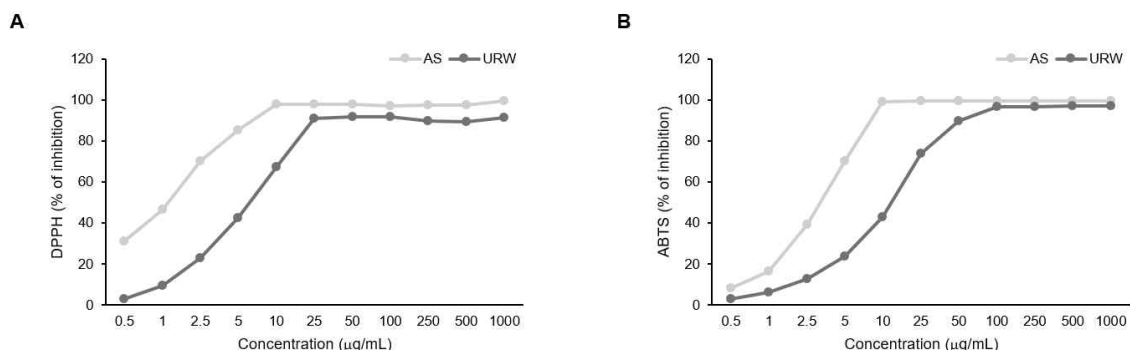


Fig. 1. DPPH and ABTS radical scavenging activities of URW.

DPPH radical scavenging activity, (A); ABTS radical scavenging activity, (B). AS, L-ascorbic acid; URW, Uncariae Ramulus et Uncus water extract. All values are expressed as mean \pm SEM of three replications.

디칼 소거활성을 측정하였다. 실험의 정확성을 확인하기 위해 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며, 50%의 라디칼이 소거되는 농도를 IC₅₀으로 나타냈다. URW의 DPPH 라디칼 소거활성은 IC₅₀ = 6.50±0.15 µg/mL로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거활성은 IC₅₀ = 13.17±0.88 µg/mL로 뛰어난 라디칼 소거 활성을 나타냈다 (Fig. 1).

3. FRAP 측정

URW의 항산화 활성을 확인하기 위해 FRAP assay를 측정하였으며, 실험의 정확성을 확인하기 위해 L-ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였다. URW의 Fe³⁺ → Fe²⁺ 형태로의 환원력을 확인한 결과, 양성대조군으로 사용한 AS의 항산화 활성은 50, 100, 250 µg/mL 농도에서 각각 2.73±0.01, 2.75±0.02, 2.76±0.01으로 2.5 이상의 흡광도 값을 나타냈으며, URW의 항산화 활성은 250 µg/mL 농도에서 양성대조군인 AS와 유사한 2.51±0.02의 흡광도 값을 나타냈다. 또한, URW는 농도 의존적으로 환원력이 높아져 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

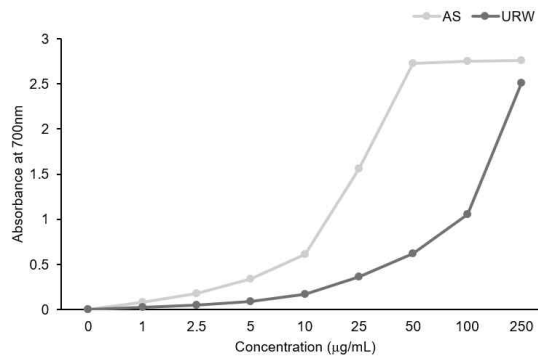


Fig. 2. FRAP activity of URW. AS, L-ascorbic acid; URW, Uncariae Ramulus et Uncus water extract. All values are expressed as mean±SEM of three replications.

4. 위 점막 손상도 측정

위 점막의 손상 정도를 육안으로 관찰한 결과, 아무런 처치를 하지 않은 Nor군의 식도 점막에서는 손상이 발견되지 않았으나, 증류수 투여 및 알코올성 위염을 유발한 Con군에서는 넓은 면적에 걸쳐 위 점막 병변이 발견되었다. 반면에 Con군 대비 SC10군에서 31% 유의하게 병변이 감소되었으며, UR100군 또한 Con군 대비 24% 이상 유의하게 병변이 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 3).

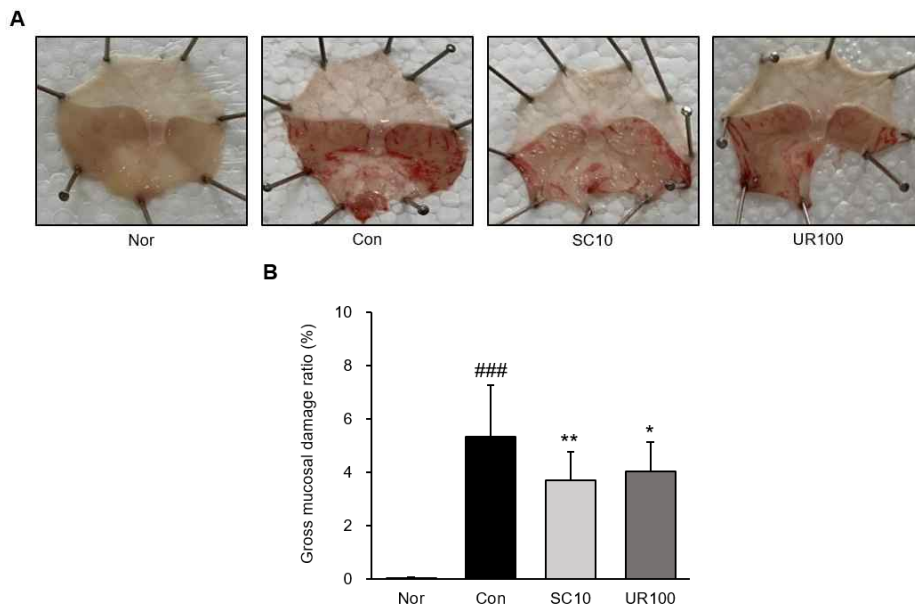


Fig. 3. Optical changes of gastric mucosa in alcohol-induced gastritis mice. A representative gross image; (A), gastric mucosal damage ratio; (B), Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means±SD (n=8). Significance: ###p<0.001 vs. Nor group and *p<0.05, **p<0.01 vs. Con group.

5. 혈청 및 위 조직 내 ROS 측정

혈청 및 위 조직 내에서 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS의 수준을 확인하였다. 그 결과, 혈청 내 ROS의 경우 Nor군 대비 Con군에서 34% 유의하게 증가한 것을 확인하였으며, Con군 대비 SC10군과 UR100군에서 각각 15%, 19% 유의하게

감소하였다. 또한, 위 조직 내 ROS의 경우 Nor군 대비 Con군에서 61% 유의하게 증가하였으며, Con군 대비 SC10군과 UR100군에서 각각 15%, 61% 유의하게 감소하였다. ROS의 수준은 양성대조군인 SC10군보다 UR100군에서 더 뛰어나게 감소하였으며, UR100군에서 Nor군과 유사한 수준으로 나타났다 (Fig. 4).

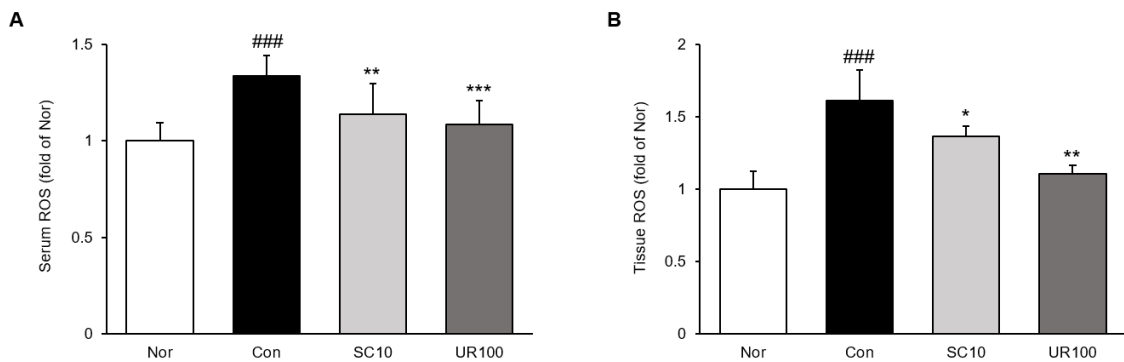


Fig. 4. Levels of serum and tissue ROS in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means \pm SD (n=8). Significance: ###p<0.001 vs. Nor group and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Con group.

6. 혈청 및 위 조직 내 MDA 측정

혈청 및 위 조직 내에서 지질과산화물인 MDA의 수준을 확인하였다. 그 결과, 혈청 내 MDA의 경우 Nor군 대비 Con군에서 약 15배 유의하게 증가한 것을 확인하였으며, Con군 대비 SC10군과 UR100군에서 각각 21%, 31% 유의하게 감소하였

다. 또한, 위 조직 내 ROS의 경우 Nor군 대비 Con군에서 32% 유의하게 증가하였으며, Con군 대비 SC10군에서 17% 유의하게 감소하였고, UR100군에서는 24% 유의하게 감소하여 Nor군과 유사한 수준으로 나타났다 (Fig. 5).

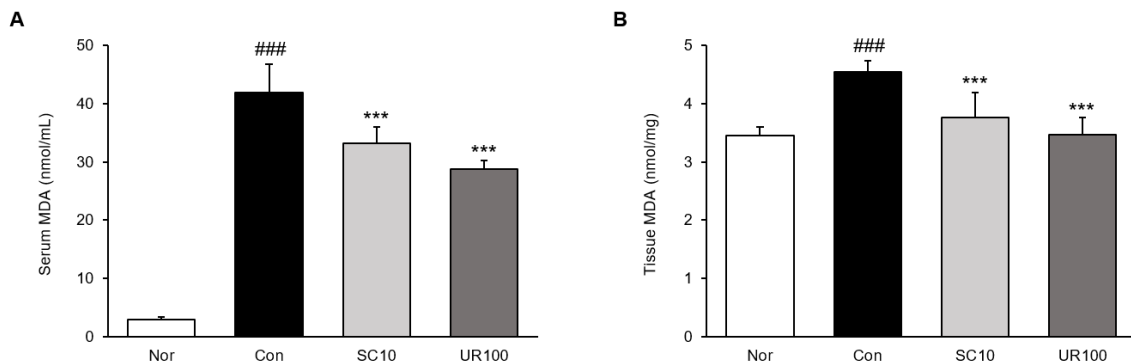


Fig. 5. Levels of serum and tissue MDA in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means \pm SD (n=8). Significance: ###p<0.001 vs. Nor group and ***p<0.001 vs. Con group.

7. 위 조직 내 NADPH 단백질 발현량 분석

위 조직 내에서 NADPH 단백질인 NOX2, p47^{phox} 및 p22^{phox} 단백질 발현을 확인하였다. NOX2의 발현은 Nor군 대비 Con군에서 57% 유의하게 증가하였으며, Con군 대비 SC10군과 UR100군에서 각각 22%, 28% 유의하게 감소하였다. p47^{phox}와 p22^{phox}의 발현 또한 Nor군 대비 Con군에서 각각 63%, 59% 유의하게 증가하였으며, Con군 대비 SC10군에서 p47^{phox} 21%, p22^{phox} 27% 유의하게 감소하였고, UR100군에서는 p47^{phox} 23%, p22^{phox} 28% 유의하게 감소하였다 (Fig. 6).

8. 위 조직 내 항산화 관련 단백질 발현량 분석

위 조직 내에서 항산화 관련 단백질인 Nrf2, Keap1, HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2의 발현을 확인하였다. Nor군

대비 Con군에서 Nrf2의 발현은 30% 유의하게 감소하였으며, Keap1의 발현은 67% 유의하게 증가하였다. 반면에 Con군 대비 SC10군에서는 Nrf2의 발현이 24% 유의하게 증가하였으며, Keap1의 발현이 31% 유의하게 감소하였다. 또한, UR100군에서는 Nrf2의 발현이 36% 유의하게 증가하였으며, Keap1의 발현이 38% 유의하게 감소하였다. HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2의 발현의 발현을 확인한 결과, Nor군 대비 Con군에서 유의하게 감소하였으며 (HO-1, 35%, SOD-1, 25%; Catalase, 15%; GPx-1/2, 26%), Con군 대비 SC10군에서는 HO-1, SOD-1 및 GPx-1/2의 발현이 유의하게 증가하였으며 (HO-1, 31%, SOD-1, 39%; Catalase, 39%; GPx-1/2, 35%), UR100군에서는 HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2 모두 유의하게 증가하였다 (HO-1, 48%, SOD-1, 67%; Catalase, 43%; GPx-1/2, 61%) (Fig. 7).

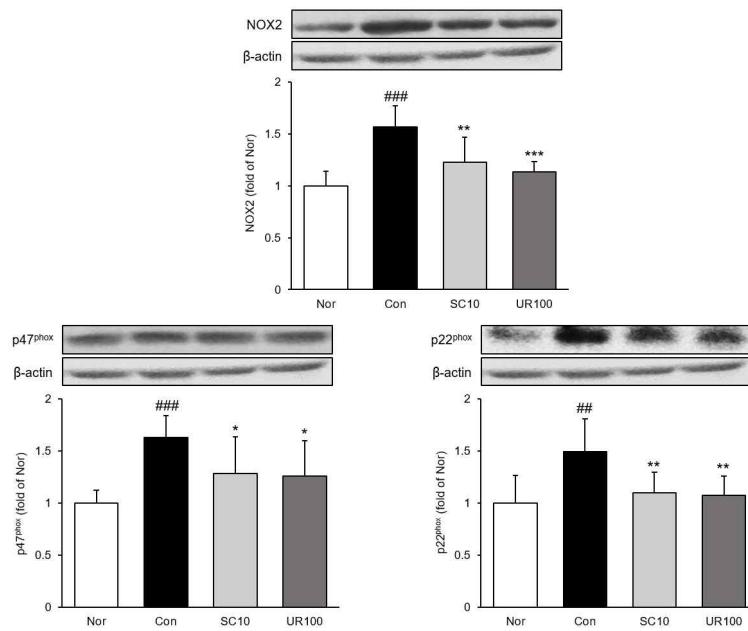


Fig. 6. Expressions of NADPH oxidase in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means±SD (n=8). Significance: ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Nor group and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Con group.

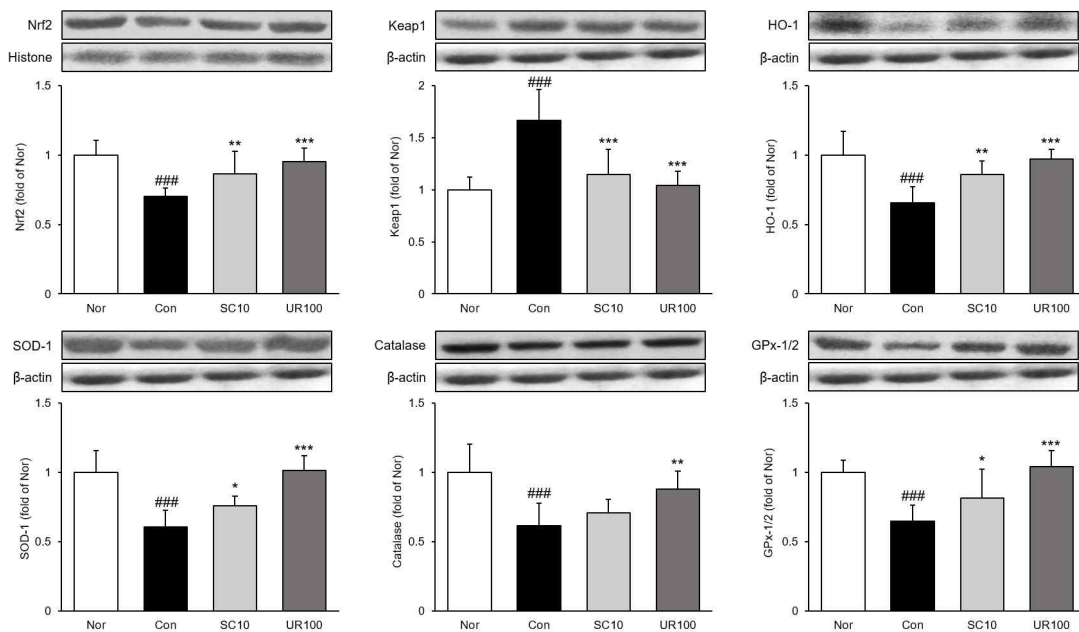


Fig. 7. Expressions of antioxidant-related protein in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means±SD (n=8). Significance: ###p<0.001 vs. Nor group and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. Con group.

9. 위 조직 내 NF-κ Bp65 및 p-Iκ Ba 단백질 발현량 분석

위 조직 내에서 NF-κBp65 및 p-IκBa 단백질 발현을 확인하였다. Nor군 대비 Con군에서 NF-κBp65 및 p-IκBa의 발현이 각각 34%, 37% 유의하게 증가하였다. 반면에 Con군

대비 SC10군에서는 NF-κBp65 및 p-IκBa 단백질의 발현이 각각 22%, 24% 유의하게 감소하였으며, UR100군에서 또한 각각 21%, 22% 유의하게 감소하였다 (Fig. 8).

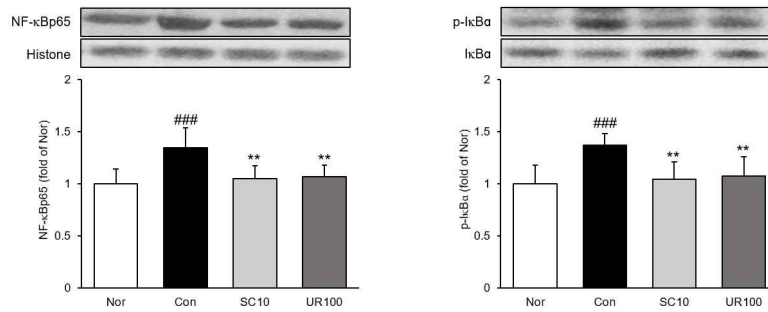


Fig. 8. Expressions of NF- κ Bp65 and p-I κ B α in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means \pm SD (n=8). Significance: ^{###}p<0.001 vs. Nor group and ^{**}p<0.01 vs. Con group.

10. 위 조직 내 염증성 단백질 발현량 분석

위 조직 내에서 염증성 단백질인 iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-6의 발현을 확인하였다. 염증성 매개인자인 iNOS와 COX-2의 경우 Nor군 대비 Con군에서 각각 46%, 43% 유의하게 증가하였다. 반면에 Con군 대비 SC10군에서는 iNOS 및 COX-2의 발현이 각각 23%, 25% 유의하게 감소하였으며, UR100군에서는 iNOS와 COX-2 모두 23% 유의하게 감소하

였다. 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 경우에는 Nor군 대비 Con에서 각각 40%, 47% 유의하게 증가하였으며, Con군 대비 SC10군에서는 TNF- α 와 IL-6 각각 24%, 31% 유의하게 감소하였고, UR100군에서는 21%, 28% 유의하게 감소하였다 (Fig. 9).

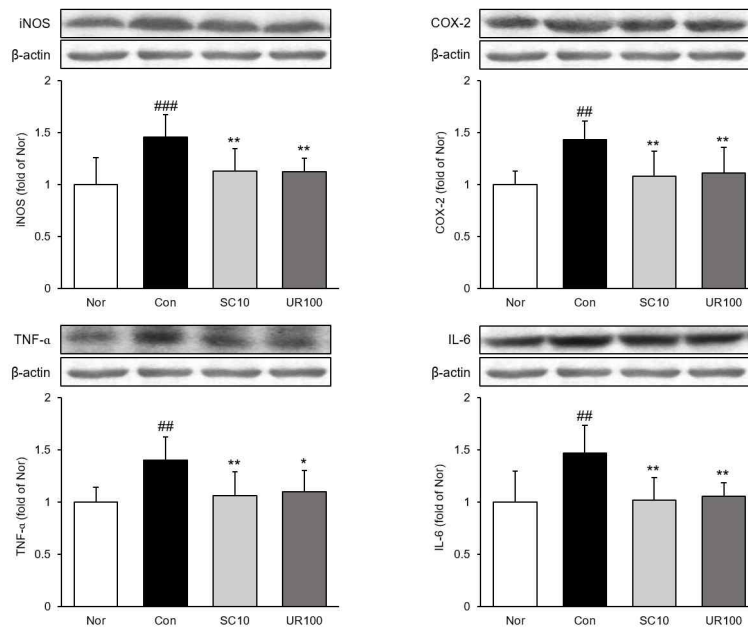


Fig. 9. Expressions of inflammatory protein in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means \pm SD (n=8). Significance: ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 vs. Nor group and ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01 vs. Con group.

11. 위 조직 내 항염증성 단백질 발현량 분석

위 조직 내에서 항염증성 단백질인 IL-4와 IL-10의 발현을 확인하였다. Nor군 대비 Con군에서 IL-4와 IL-10의 발현이 각각 42%, 34% 유의하게 감소하였다. 반면, Con군 대비

SC10군에서는 IL-4와 IL-10의 발현이 각각 15%, 19% 증가하였으며, UR군에서는 각각 77%, 76% 유의하게 증가하여 Nor군의 수준을 나타냈다 (Fig. 7).

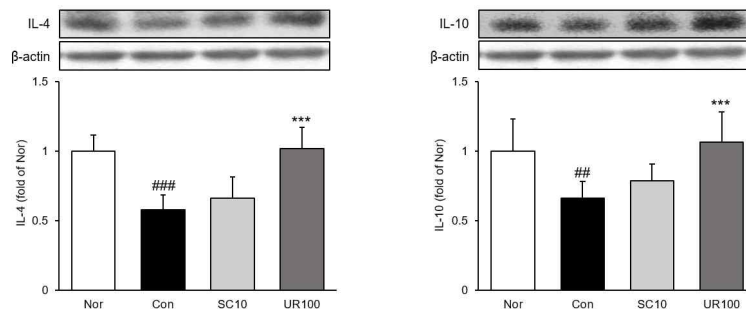


Fig. 10. Expressions of anti-inflammatory protein in alcohol-induced gastritis mice. Normal mice, Nor; alcohol-induced gastritis mice, Con; sucralfate 10 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, SC10; Uncariae Ramulus et Uncus water extract 100 mg/kg body weight/day-treated alcohol-induced gastritis mice, UR100. All data are expressed means \pm SD (n=8). Significance: ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Nor group and ***p<0.001 vs. Con group.

IV. 고 찰

위염은 위 상피의 염증, 자극 또는 침식을 특징으로 하는 염증성 질환을 말하며, 극심한 스트레스, 과도한 음주 및 NSAIDs 약물의 잘못된 사용 등으로 인해 발생한다. 특히 과도한 음주는 위 점막에 출혈 및 염증을 발생시키며, 산화 손상을 유발하여 자유라디칼, 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 등의 발생을 증가시켜 위 점막의 손상을 극대화 시킨다고 알려져 있다^{1,21}. 조구등 (鈎鈎藤)은 많은 연구를 통해 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 NF- κ B 경로를 차단함으로써 다양한 염증을 완화한다고 알려져 있다^{13,22,23}. 이에 본 연구에서는 다양한 염증에 효과가 있다고 알려진 鈎鈎藤의 항산화 활성을 확인하였으며, 鈎鈎藤 추출물 (URW)이 알코올로 인해 유발된 위염에 미치는 효과 및 그 기전에 확인하였다.

먼저, URW에 포함되어있는 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량을 확인하였으며, DPPH와 ABTS 라디칼 소거능을 측정하여 URW의 항산화 활성을 확인하였다. 체내 세포의 산화 및 환원과 같은 화학반응의 과정 중에는 라디칼이 생성되며, 이러한 과정에서 생성된 라디칼은 지질, 단백질 및 DNA와 같은 유기 기질과 반응하여 정상적인 기능을 방해하고 조직을 손상시켜 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁴. 폴리페놀 화합물은 플라보노이드, 탄닌, 이소플라본, 리그난 등을 총칭하며, 이 중 플라보노이드는 높은 항산화능을 나타내 ROS를 효과적으로 제거할 뿐만 아니라 체내의 라디칼을 소거시키는 역할을 가지는 것으로 알려져 있다²⁵. 이에 본 연구에서는 URW의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석하였으며, 그 결과 총 폴리페놀 함량은 143.82 ± 0.28 mg (GAE)/g, 총 플라보노이드 함량은 33.92 ± 0.57 mg (QE)/g으로 나타났다 (Table 1). 또한, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정 결과, DPPH 라디칼 소거활성은 $IC_{50} = 6.50 \pm 0.15$ μ g/mL로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거활성은 $IC_{50} = 13.17 \pm 0.88$ μ g/mL로 뛰어난 라디칼 소거 활성을 나타냈다 (Fig. 1). 추가적으로 ferric reducing antioxidant power (FRAP)를 측정하여 URW의 환원력을 확인하였다. FRAP 측정법 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리를 이용한 방법으로써 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에서 고안되어져 환원력 측정을 위해 널리 사용되어지고 있는

방법이다²⁶. FRAP 측정을 통해 URW의 환원력을 확인한 결과, 250 μ g/mL 농도에서 흡광도 2.51 ± 0.02 으로 양성대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 흡광도를 나타냈으며, 농도 의존적으로 환원력이 높아져 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). URW은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높게 나타났으며, 우수한 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능 및 FRAP 환원력을 나타냈으므로 결과적으로 URW은 뛰어난 항산화 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

이를 토대로 알코올로 인해 유발된 위염 동물모델을 이용하여 URW의 항염증 효과를 확인하였다. ICR mouse에게 URW을 경구 투여한 후, 50% ethanol을 경구 투여하여 위염을 유발하였으며, 실험 종료 후 혈액 채취 및 위 조직을 적출하였다. 적출한 위 조직을 손상 정도를 육안으로 관찰한 결과, Nor군에 비해 Con군에서는 넓은 면적에 걸쳐 위 점막의 병변이 발견되었으며, URW는 알코올로 인한 위 점막의 병변을 유의하게 감소시켰다 (Fig. 3).

다양한 염증의 원인 중 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 의한 ROS 발생이 주요 원인으로 꼽히고 있으며, ROS의 과도한 생성은 DNA, RNA, protein oxidation 및 lipid oxidation 등을 증가시킴으로써 체내의 염증, 암, 동맥 경화, 심혈관 질환, 신경세포의 기능장애로 인한 뇌신경 질환을 유발한다²⁷. 이러한 ROS는 NADPH oxidase (NOX)의 반응에 의해서도 생성된다고 알려져 있으며, 사이토카인, 지질과산화 등과 같은 체내의 반응에 의해 세포막에 존재하는 p47^{phox} 등의 세포질 인자가 NADPH oxidase를 활성화시켜 ROS의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁸⁻³⁰. 또한, ROS에 의해 매개되는 과산화지질은 DNA 및 RNA와 반응하여 손상을 일으키며, 지질과산화물의 최종 부산물인 malondialdehyde (MDA)는 다불포화지방산이 직접 또는 간접적인 과산화 과정을 통해 분해되어 형성되는 물질로써 지질과산화 정도를 알기 위해 주로 측정되어지며, 이는 산화적 스트레스 지표로 널리 사용되고 있다^{31,32}. 본 실험에서 URW는 알코올성 위염으로 인해 증가된 혈액 및 위 조직 내 ROS와 MDA 수준을 유의하게 감소시켰으며, 이러한 결과는 양성대조군인 sucralfate 투여군보다 URW 투여군에서 더욱 우수하게 나타났다 (Fig. 4, 5). 또한, western blotting을 통해 위 조직 내 NOX family의 발현을 확인하였으며, URW 투여는 알코올성 위염으로 인해 증가한 NOX2, p47^{phox} 및 p22^{phox}의 발현을 유의하게 감소시켰다

(Fig. 6). 따라서 URW의 우수한 항산화능이 이와 같은 ROS, MDA 및 NADPH oxidase의 발현 조절에 영향을 미쳤을 것이라 판단된다.

위 조직을 이용하여 western blotting을 통해 항산화, 염증 및 항염증 관련 단백질의 발현을 분석하였다. Nrf2는 대표적인 항산화 관련 전사인자로서 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하며, Keap1과 복합체를 형성하여 존재하다가 산화적 스트레스 등과 같은 외부의 자극에 의해 분리되어 HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2과 같은 항산화 인자의 발현을 촉진한다³³. NF- κ B는 세포의 분화, 증식, 발달 및 세포자멸 등에 관여하며, 염증을 매개하는 TNF- α , IL-6을 포함한 사이토카인 및 COX-2의 발현을 조절한다^{28,34}. 정상적인 조건에서 NF- κ B는 I κ B와 결합되어 비활성 상태로 존재하다가 외부의 다양한 염증 자극에 의해 I κ B의 인산화 및 NF- κ B의 활성화가 일어나 다양한 염증 매개 인자들의 발현을 촉진한다²⁸. 이러한 Nrf2와 NF- κ B는 산화적 스트레스 및 염증에 대한 반응을 공동으로 조절한다고 알려져 있다. 많은 연구를 통해 NF- κ B 활성화를 억제해 Nrf2 경로를 활성화 할 수 있으며, HO-1이 NF- κ B 활성화의 억제를 통해 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다고 밝혀졌다^{34,35}. 본 실험에서 URW는 Nrf2 경로를 통해 항산화 인자의 발현을 유의적으로 증가시켰으며, NF- κ B 경로를 통해 염증성 인자의 발현을 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 7-9). 본 연구에서는 추가적으로 항염증성 단백질의 발현을 확인하였다. IL-4와 IL-10은 일반적으로 염증성 단백질의 발현을 억제하는 항염증성 단백질로 알려져 있다³⁶. 연구 결과, URW는 알코올성 위염으로 인해 감소한 IL-4와 IL-10의 발현을 정상군의 수준까지 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 URW가 Nrf2 및 NF- κ B 경로의 상호작용에 관여할 뿐 아니라 항염증성 단백질의 발현을 조절함으로써 위 점막의 염증을 완화시키는 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 항산화 활성을 나타낼 뿐 아니라 항염증 효과가 있다고 알려진 鈞鈞藤이 알코올로 유발된 위염이 미치는 효과 및 그 기전을 확인하였다. 먼저, 鈞鈞藤 추출물의 항산화 효능을 확인하였다. 또한, ICR mice에게 鈞鈞藤 추출물을 경구 투여한 후, 알코올을 이용해 위염을 유발하여 위 조직 내 NADPH oxidase, 항산화, 염증 및 항염증성 단백질의 발현을 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 鈞鈞藤 추출물의 총 폴리페놀 함량은 143.82 ± 0.28 mg (GAE)/g, 총 플라보노이드 함량은 33.92 ± 0.57 mg (QE)/g으로 나타났다.
2. 鈞鈞藤 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 $IC_{50} = 6.50 \pm 0.15$ μ g/mL로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거활성은 $IC_{50} = 13.17 \pm 0.88$ μ g/mL로 뛰어난 라디칼 소거 활성을 나타냈다.
3. 鈞鈞藤 추출물의 환원력을 확인한 결과, 250 μ g/mL 농도에서 흡광도 2.51 ± 0.02 로 양성대조군인 L-ascorbic acid와 유사한 흡광도를 나타냈으며, 농도 의존적으로 환원력이 높아져 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였다.
4. 알코올로 유발된 위염 모델에서 鈞鈞藤 추출물은 알코올로 인한 위 점막의 병변을 유의하게 감소시켰다.
5. 알코올로 유발된 위염 모델에서 鈞鈞藤 추출물은 혈액 및 위 조직 내 ROS와 MDA 수준을 유의하게 감소시켰으며, 위 조직 내 NOX2, p47phox 및 p22phox의 발현을 유의하게 감소시켰다.
6. 알코올로 유발된 위염 모델에서 鈞鈞藤 추출물은 항산화 관련 단백질인 Nrf2, Keap1, HO-1, SOD-1, Catalase 및 GPx-1/2의 발현을 유의하게 증가시켰다.
7. 알코올로 유발된 위염 모델에서 鈞鈞藤 추출물은 염증성 단백질인 NF- κ Bp65, p-I κ B α , iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-6의 발현을 유의하게 감소시켰다.
8. 알코올로 유발된 위염 모델에서 鈞鈞藤 추출물은 항염증성 단백질인 IL-4 및 IL-10의 발현을 유의하게 증가시켰다.

이상의 결과로부터 鈞鈞藤은 알코올성 위염에서 우수한 항산화능을 통해 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 Nrf2 및 NF- κ B 경로의 상호작용에 관여할 뿐 아니라 항염증성 단백질의 발현을 조절함으로써 위 점막의 염증을 완화시키는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 鈞鈞藤이 알코올로 인한 위염을 치료할 수 있는 소재로서의 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 글

이 연구는 2022년도 정부 (과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다 (No. 2018R1A5A2025272).

References

1. Hernández-Muñoz R, Montiel-Ruiz C, Vázquez-Martínez O. lab invest. 2000;80(8):1161-9.
2. Lee JA, Kim SH, Kim MJ, Ahn JH, Park HJ, Lee WR, Roh SS. Protective Effects of Chrysanthemi Indici Flos Extract and Flaxseed Oil Mixture on HCl/ethanol-induced Acute Gastric Lesion Mice. Kor J Herbol. 2018;33(6):19-28.
3. Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Krohn RL, Bagchi

- DJ, Garg A, Bagchi M, Mitra S, Stohs SJ. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J Appl Toxicol*. 1998;18(1):3-13.
4. Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Mogami S, Hibi T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;50(1):35-9.
 5. Lee JJ, Choi HS, Lee JH, Jung CJ, Lee MY. The Effects of Ethylacetate Fraction of *Sanguisorba officinalis* L. on Experimentally-induced Acute Gastritis and Peptic Ulcers in Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2005;34(10):1545-52.
 6. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Proton pump inhibitors, histamine H2 receptor antagonists, and other antacid medications and the risk of fracture. *Calcif Tissue Int*. 2006;79:76-83.
 7. Kang MH, Jeong CS. Effects of Amomi Semen Butanol Fraction on Gastritis and *Helicobacter pylori*. *Kor J Pharmacogn*. 2004;35(4):350-6.
 8. Ju YS. *Ungok Herbology*. Seoul : Woosuk, 2013: 1670.
 9. Tian Z, Zhang S, Wang H, Chen Z, Sun M, Sun L, Gong L, Li Y, Jiang H. Intervention of *Uncaria* and Its Components on Liver Lipid Metabolism in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Pharmacol*. 2020;11:910.
 10. Zhou Q, Ma J, Chen L. Tissue Distribution of Hirsutine and Hirsuteine in Mice by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Methods Chem*. 2020;2020: 7204315.
 11. Kushida H, Matsumoto T, Ikarashi Y. Properties, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Active Indole and Oxindole Alkaloids in *Uncaria Hook*. *Front Pharmacol*. 2021;12:688670.
 12. Nunes CDR, Barreto Arantes M, Menezes de Faria Pereira S, Leandro da Cruz L, de Souza Passos M, Pereira de Moraes L, Vieira JJC, Barros de Oliveira D. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*. 2020;25(16):3726.
 13. Kim JH, Bae CH, Park SY, Lee SJ, Kim Y. *Uncaria rhynchophylla* inhibits the production of nitric oxide and interleukin- 1β through blocking nuclear factor κ B, Akt, and mitogen-activated protein kinase activation in macrophages. *J Med Food*. 2010; 13(5):1133-40.
 14. Rama P, Vignesh A, Lakshmanan G. In vitro antioxidant activity of *Achyranthes aspera* linn. *Int Med Pharm*. 2013;3(2):37-78.
 15. Jiao H, Wang SY. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. *J Agric Food Chem*. 2000;48(11):5672-6.
 16. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-200.
 17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7.
 18. Rahman MM, Islam MB, Biswas M, Khurshid Alam AH. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Res Notes*. 2015;8:621.
 19. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992 ; 13 : 637-648.
 20. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978;86(1):271-8.
 21. Yeo D, Hwang SJ, Kim WJ, Youn HJ, Lee HJ. The aqueous extract from *Artemisia capillaris* inhibits acute gastric mucosal injury by inhibition of ROS and NF- κ B. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:681-7.
 22. Zhang Y, Cui Y, Dai S, Deng W, Wang H, Qin W, Yang H, Liu H, Yue J, Wu D, Wang J, Guo H. Isorhynchophylline enhances Nrf2 and inhibits MAPK pathway in cardiac hypertrophy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020;393(2):203-12.
 23. Zhou Z, Su Y, Fa XE. Isorhynchophylline exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activities in LPS-stimulated murine alveolar macrophages. *Life Sci*. 2019;223:137-45.
 24. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas*. 2007; 28(4):R41-55.
 25. Oh GH, Nam JB, Yang SM, Joung WH, Jeong JS, Shin JM, Kang SG. A Study on the Antioxidant Effectiveness of the Extracts from Superheated Steaming Torrefied Wood. *J of Korea TAPPI*. 2018;50(2):5-12.
 26. Choi GN, Jeong CH, Kim JH, Kawk JH, Shin YH, Lee SC, Cho SH, Choi SG, Heo HJ. Effect of Storage Temperature and Water Activity on Antioxidant Activities of Powdered Green Tea Extracts. *Korean J Food Preserv*. 2009;16(3):333-41.
 27. Park SK, Jin DE, Park CH, Seung TW, Choi SG, Heo HJ. PC12 Cell Protective Effects of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) Leaf Fraction against H2O2-induced Oxidative Stress. *Korean J Food Sci Technol*. 2014;46(4):483-8.
 28. Lee JA, Shin MR, Lee SN, Park SA, Park HJ. Effect of a Mixture of *Rhei Rhizoma* and *Scutellariae Radix* Extract on Acute Reflux Esophagitis Rats. *Kor J Herbol*. 2020;35(6):43-53.

29. Lee JA, Shin MR, Lee JH, Park HJ, Roh SS. The Effect of Chaenomelis Fructus on Thioacetamide-Induced Acute Hepatic Injury. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2021;50(4):322-9.
30. Lee JA, Shin MR, Choi JW, Roh SS. Effect of Toosendan Fructus on Chronic Acid Reflux Esophagitis Rats. *Kor J Herbol*. 2021;36(3):1-8.
31. Kim JH, Li L, Kim MS, Cho EJ, Kim HY, Choi JS. Hesperidin and Hesperetin Protect against Oxidative Stress on Hepatic Toxicity in Rats. *J Korean Med Obes Res*. 2022;22(1):1-10.
32. Kim KS, Hong KE, Yim YK. A study on the anti-oxidative effect of electroacupuncture at Wijung (BL40) in rats. *Korean J Acupunct*. 2007;24(1):145-60.
33. He HJ, Wang GY, Gao Y, Ling WH, Yu ZW, Jin TR. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes*. 2012;3(5):94-104.
34. Gao W, Guo L, Yang Y, Wang Y, Xia S, Gong H, Zhang BK, Yan M. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- κ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:809952.
35. Rushworth SA, MacEwan DJ, O'Connell MA. Lipopolysaccharide-Induced Expression of NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 and Heme Oxygenase-1 Protects against Excessive Inflammatory Responses in Human Monocytes. *J Immunol*. 2008;181(10):6730-7.
36. Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MD, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y. Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1 (AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis. *Lab Invest*. 2008;99(6):652-63.