

역류성 식도염에 대한 천연 미네랄 워터의 효과

추 병 길*

Effects of Natural Mineral Water on Reflux Esophagitis

Choo, Byung-Kil

Reflux esophagitis (RE) is a gastroesophageal reflux disease (GERD) caused by repeated reflux of gastric acid into the esophagus. The present study investigated the protective effect of natural mineral water on esophageal injury induced by gastric acid reflux. The cytotoxicity of mineral water was confirmed using Cell viability, proliferation and cytotoxicity assay kit. The protective effect of mineral water on esophageal injury was investigated in RE rat model. The results showed that no cytotoxicity of mineral water was observed in RAW264.7 cells. Mineral water decreased the ratio of esophageal damage, inhibited the increase of inflammatory-protein expression levels and increased the mucosa protection and tight junction proteins expression level in RE control rat. The results suggest that mineral water may have the potential to protect esophageal damage caused by gastric acid reflux and the potential to alleviate reflux esophagitis.

Key words : *anti-inflammation, natural mineral water, reflux esophagitis, tight junction*

I. 서 론

광천수(mineral water)는 광물질(mineral) 및 미량원소들을 다량으로 함유하고 있으며 건강에 유익한 도움을 주고 안전성이 확인된 천연수 중 하나이다. 미네랄 성분은 생체 내 에너지원은 아니지만, 생체 조절 작용에 영향을 줄 수 있는 필수 영양소로 기능성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며 예로부터 질병의 예방 또는 치료를 위해 광범위하게 사용되어 왔다(Chetoni, 2000; Ham et al., 2005; Petraccia et al., 2006; Jeong et al., 2011). 최근에는 소비

* Corresponding author, 전북대학교 농업생명과학대학 작물생명과학과(bkchoo@jbnu.ac.kr)

자들의 삶의 질 향상 및 위생에 대한 경각심 증가, 건강에 대한 관심도가 높아짐으로써 예방과 치유를 목적으로 한 광천수 기반의 음용수, 기능성 식품 및 화장품 개발 등 다양한 분야에서 광천수를 활용한 산업이 확대되고 있다. 또한, 천연물 유래 항생제 대체제, 면역증강 첨가제, 성장촉진제 등 가축의 성장 촉진 및 면역증강을 위한 첨가 사료제 개발에 대한 관심이 높아지면서 친환경 농업 분야에서도 광천수의 기능성을 활용하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Lee et al., 2014). 국외, 특히 유럽에서는 오래전부터 광천수의 성분 분석 및 기능성 등의 연구가 보고되고 있으며(Misund et al., 1999; Dinelli et al., 2012; Eggenkamp and Marques, 2013; Koh and Ko, 2018; Di Marco et al., 2020), 국내에서도 광천수 또는 탄산수의 특성, 광천수의 기능성 및 영양학적 분석, 항산화 및 면역반응 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다(Yoon and Kim, 2000; Hwang, 2006; Jung et al., 2006; Kim et al., 2008; Kim et al., 2009).

역류성 식도염(Reflux Esophagitis, RE)은 위산 및 위 내용물의 역류로 인한 자극으로 식도 점막에 손상 유발되는 염증성 질환이며 속쓰림과 가슴 통증, 소화불량 등의 증상을 나타낸다. 식도 점막에서의 반복적인 자극은 염증을 유발하며 만성으로 지속되는 경우 궤양, 미란 등의 조직학적인 병증을 일으키게 된다(Choi and Lim, 2004; Nam et al., 2021a). 최근, 불규칙하고 서구화된 식습관과 음주, 흡연, 스트레스 등으로 인해 국내 역류성 식도염 발병 환자가 점차 증가하고 있으며, 치료제로는 위산 분비를 억제하는 H2 수용체 길항제(histamin type2 receptor antagonist, H2RA) 또는 양성자 펌프 억제제(proton pump inhibitor, PPI)가 주로 사용되고 있다(Jang and Lim, 2013; Kim et al., 2015). 그러나, 환자의 40~60% 정도가 재발 경험이 있으며 장기복용 시 살균작용 감소, 소화불량, 골다공증 등의 합병증 유발 위험이 있어 부작용을 최소화하고 재발을 방지할 수 있는 천연 유래의 치료제 개발이 요구되고 있다(Lee et al., 2008; Lee et al., 2010). 현재까지 보고된 연구 결과에 의하면 광천수는 다량의 무기성분을 함유하고 있어 삼투압 조절, 대사 작용, 세포 기능, pH 조절 등 체내에서의 유익한 작용과 이용 가치가 예상되며, 다양한 산업 분야에서의 활용을 위해 성분 분석 및 기능성에 대한 다각적 검증이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 강원도 춘천시 청정지역의 연옥 암반에서 용출된 미네랄 워터의 미네랄 성분 및 기능성 분석을 위해 동물모델을 이용하여 역류성 식도염에 대한 보호 작용 및 개선 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

본 연구에 사용한 시료는 강원도 춘천시 청정지역의 연옥 암반에서 용출된 미네랄 워터

(성민코리아(주))를 구입 후 4°C에 보관하여 사용하였다. 분석을 위한 Duplecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin은 Welgene (Namcheon-ro, Namcheon-myeon, South Korea)의 제품을 사용하였다. Cell viability, proliferation & cytotoxicity assay kit는 DoGenBio (Guro-gu, Seoul, South Korea)로부터 구입하였으며, luminol reagent, iNOS, COX-1, COX-2, Claudin-4, Claudin-5, β -actin 1차 항체 및 m-IgGk BP-HRP 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (DA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Protein assay reagent, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 및 bovin serum albumin standard는 Bio Rad Laboratories (Hercules, California, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 성분 분석

천연 미네랄 워터의 미네랄 성분 분석을 위해 한국기초과학지원연구원에 시험분석을 의뢰하였으며, 유도결합 발광광도기 Inductively Coupled plasma Mass Spectrometer (ICP-MS)를 사용하여 분석하였다.

3. 세포배양 및 세포독성

마우스 대식세포 RAW264.7 cell은 America Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양받았으며, 10% FBS와 100 units/mL penicillin, 100 ug/mL streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 천연 암반수 미네랄 워터의 세포독성 여부를 판단하기 위해 96 well plate에 5×10^5 cell/mL로 100 uL씩 분주하여 24시간 배양 후 미네랄 워터 100 uL, 무처리구에는 생리식염수 100 uL를 처리하였다. 24시간 후에 Cell viability, proliferation & cytotoxicity assay kit를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

4. 실험동물

7주령, 수컷 Sprague-Dawley (SD) rats 24마리를 한일실험동물센터로부터 공급받아 온도 21~25°C, 습도 45~55%, 명암주기 12 h light-dark 사육환경에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 1주일 동안 모든 동물에 사료를 공급하였으며 6마리씩 무작위로 분리하여 정상군(Normal control group)과 역류성 식도염 유발군(RE control group), RE+MW 처리군(RE + 미네랄 워터)에는 역류성 식도염 유발과 함께 미네랄 워터를 공급하였다. 본 연구에서 진행된 모든 실험은 동물관리 규정을 준수하였으며, 전북대학교 동물실험 윤리위원회 승인(CBNU2017-0048)을 받아 수행하였다.

5. 역류성 식도염 유발 수술

역류성 식도염 유발 수술 전 18시간 동안 절식하였고, 물과 미네랄 워터는 충분히 공급하였다. 수술 전 호흡 마취 후 개복하여 위의 유문부와 전위부를 결찰하여 역류를 유도하였다. 수술 4시간 30분 후 모든 rat를 희생시켜 위와 식도 조직을 분리하였고, 식도를 세로로 절개하여 식도 점막을 디지털카메라를 사용하여 촬영하였다. 식도 점막 손상률은 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다(식 (1)).

$$\text{점막 손상률(\%)} = [\text{식도 손상면적}(\text{mm}^2) / \text{식도 전체면적}(\text{mm}^2)] \times 100 \quad (1)$$

6. 조직병리학적 분석

분리된 식도 조직은 0.9% NaCl로 세척하여 1~1.5 mm의 크기로 절단 후 10% neutral buffered formalin (NBF)에 고정하였다. 조직병리학적 분석을 위해 고정된 조직을 탈수, 투과, 파라핀 포매 과정을 거쳐 5 μm 정도의 절편으로 제조하였으며, H&E 염색 후 Leica 현미경으로 10X 배율에서 관찰하였다.

7. 조직 단백질 추출

식도 조직 단백질 추출을 위해 protease inhibitor cocktail이 포함된 lysis buffer를 첨가하여 균질기를 사용하여 조직을 분쇄하였고, 10% NP-40를 첨가하여 4°C에서 12,000 rpm으로 4분 동안 원심분리하였다. 세포질의 단백질이 용해된 상등액을 수집하여 -80°C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. 세포핵 단백질을 얻기 위해 남은 pellet에 lysis buffer를 첨가하여 10분마다 vortex를 3회 실시하였으며 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포핵 단백질이 용해된 상등액을 얻어 -80°C 초저온 냉동고에 보관하여 분석용 시료로 사용하였다.

8. Western blot assay

Protein assay kit를 이용하여 단백질 정량 후 loading sample을 제조하여 8%, 10%, 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer 후 5% skim milk로 실온에서 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체로는 iNOS, COX-1, COX-2, claudin-4, claudin-5, β -actin을 사용하였으며 PBST로 1:1000 비율로 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 2차 항체는 희석배수 1:10000으로 희석하여 실온에

서 2시간 반응 후 ECL을 사용하여 ChemiDoc (Bio-Rad, CA, Hercules)을 통해 검출하였다.

9. 통계분석

모든 data는 평균±표준편차로 표시하였으며, SPSS (12.0K for Windows program)을 사용하여 one way analysis of variance 및 LDS's multiple comparisom test로 data의 통계적 유의성을 검증하였다. $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 미네랄 워터의 성분 분석

미네랄 워터의 각종 무기성분을 분석한 결과, Table 1과 같이 미네랄 Ca, Mg, K, Si, Na, Fe 성분이 검출되었으며, 미량 미네랄 Ti, Sr, Cr, Ni, V, Mn, Li, Co 등의 13종류의 성분이 검출되었다.

Table 1. Analysis of composition of the mineral water (MW) and general waters

No.	Macro minerals	(ppm) MW ¹⁾	Trace minerals	(ppb) MW
1	Calcium (Ca)	62.81	Titanium (Ti)	246.01
2	Magnesium (Mg)	14.109	Strontium (Sr)	117.98
3	Potassium (K)	0.602	Chromium (Cr)	5.31
4	Silicon (Si)	6.739	Lithium (Li)	1.25
5	Sodium (Na)	1.647	Vanadium (V)	1.19
6	Iron (Fe)	<0.05	Nickel (Ni)	0.75
7			Lithium (Li)	1.25
8			Carbon monoxide (Co)	<0.10
9			Manganese (Mn)	<0.10
10			Zinc (Zn)	<0.10
11			Selenium (Se)	<0.10
12			Molybdenum (Mo)	<0.10
13			Aurum (Au)	<0.10

Note: ¹⁾ MW: Mineral Water

2. 세포 생존율

미네랄 워터 처리에 의한 RAW264.7 cell의 생존율 측정 결과, 무처리군에 비해 미네랄 워터 처리군에서 세포 생존율이 100% 이상으로 나타나 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 1).

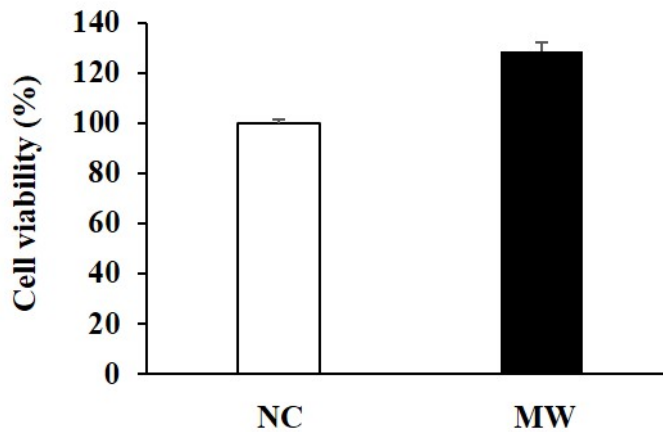


Fig. 1. Effect of mineral water (MW) on cell viability in RAW264.7 cell. NC: normal control group, MW: mineral water treatment group. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

3. 식도 점막 손상도 변화

Jabri 등(2016)에 의하면 역류성 식도염 동물모델은 SD rat를 주로 이용하며, 위 내용물의 역류를 유도하는 방법으로는 유문부와 전위부를 결찰을 통해 시행되고 있다(Jabri et al., 2016). 역류성 식도염 유발 동물모델에서의 미네랄 워터에 의한 보호 효과를 분석한 결과, 역류가 유도되지 않은 정상군에서는 식도 점막 손상이 발견되지 않았으나 역류가 유도된 대조군에서는 위 내용물 및 위산 역류로 인해 손상이 관찰되었고, 손상 비율은 $47.10 \pm 11.04\%$ 로 나타났다. 그러나, 미네랄 워터 처리와 함께 위산 역류를 유도한 미네랄 워터 처리군에서는 손상 비율이 $9.21 \pm 4.03\%$ 로 나타나 대조군에 비해 손상도가 유의하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 2).

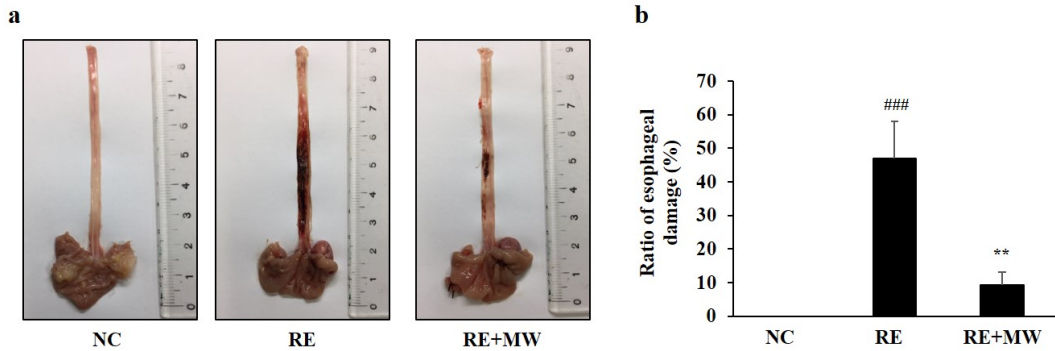


Fig. 2. Effects of mineral water (MW) on gastric contents reflux induced esophageal mucosa damages in rats. (a) Images of esophagus mucosa, (b) the ratio of esophagus mucosa damages. NC: normal control group, RE: RE-induced control group, RE+MW: RE rats treated with MW. ### $p < 0.001$ vs. normal group, ** $p < 0.01$ vs. RE control group. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

4. 조직병리학적 분석

식도염 유발 대조군에서는 정상군에 비해 상피층 파괴와 점막 손실, 염증성 세포 침투 등의 조직학적 변화가 관찰되었다. 그러나 미네랄 워터 처리군에서는 역류성 식도염 유발 대조군에 비해 상피층과 점막하층의 손상 정도와 염증세포 침투의 정도가 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

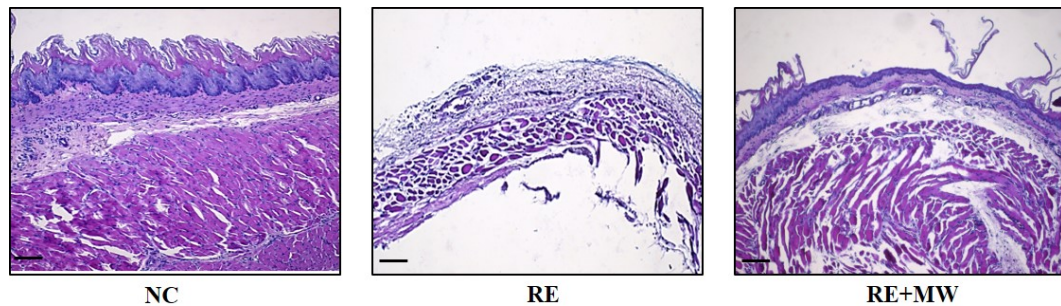


Fig. 3. Mineral water (MW) improved esophagus tissue histological changes in reflux esophagitis rats. NC: normal control group, RE: RE-induced control group, RE+MW: RE rats treated with MW.

5. 조직 내 염증성 단백질 발현

미네랄 워터 투여에 의한 식도 조직 내 염증성 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 western blot assay를 실시하였다. 염증성 단백질 iNOS 및 COX-2의 발현량을 측정할 결과, 대조군에서는 역류로 인한 손상으로 iNOS 및 COX-2의 염증성 단백질 발현량이 정상군에 비해 증가하였다. 그러나, 미네랄 워터를 처리하였을 때 대조군에 비해 염증성 단백질 발현이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. COX-1 단백질은 정상군과 미네랄 워터 투여군에서 발현이 확인되었으나, 역류성 식도염 유발군에서는 정상군과 미네랄 워터 투여군에 비해 발현량이 유의미하게 감소하였다(Fig. 4).

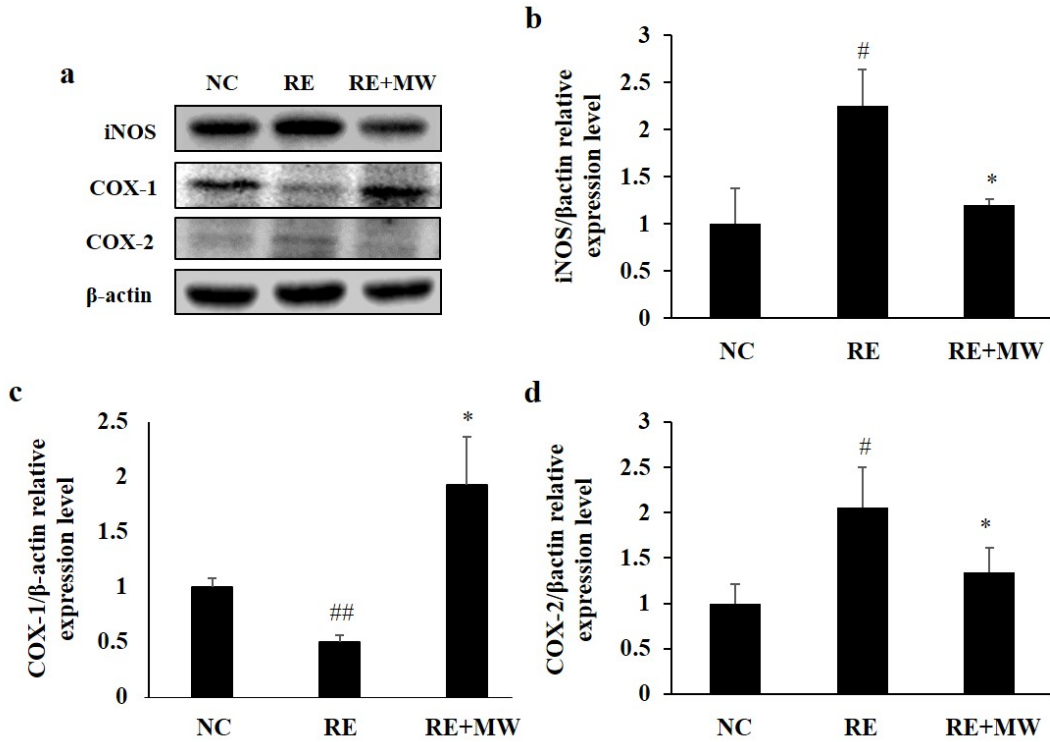


Fig. 4. Effects of mineral water (MW) on expression levels of iNOS, COX-2 and COX-1 in esophageal tissue were measured by western blot assay. NC: normal control group, RE: RE-induced control group, RE+MW: RE rats treated with MW. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. normal group, * $p < 0.05$ vs. RE control group. Data are expressed as mean \pm standard deviation.

6. 세포 연결 단백질 발현

미네랄 워터의 처리에 의한 조직의 손상 개선 효과를 관찰하기 위해 western blot assay를 실시하여 세포 연결 단백질인 claudin-4 및 claudin-5의 발현량을 측정하였다. 대조군에서는 조직의 손상으로 인해 세포 연결 단백질 발현 감소가 관찰되었으나, 미네랄 워터 처리군에서는 대조군에 비해 claudin-4 및 claudin-5 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 5).

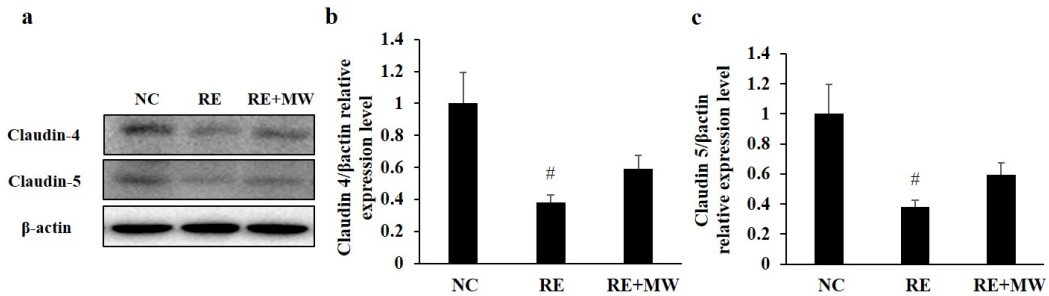


Fig. 5. Effects of mineral water (MW) on expression levels of claudin-4 and claudin-5 in esophageal tissue were measured by western blot assay. NC: normal control group, RE: RE-induced control group, RE +MW: RE rats treated with MW. [#]*p* < 0.05 vs. normal group. Data are expressed as mean ± standard deviation.

IV. 고 찰

역류성 식도염은 미국이나 유럽에서 발병률이 높은 염증성 질환으로 완치가 어려워 경제적 부담을 높이고 삶의 질을 저하시키는 질병으로 서양을 비롯한 전 세계적으로 발병률이 증가하고 있어 예방과 치료에 대한 관심이 고조되고 있다(Lee et al., 2010). 현재 치료의 목적으로 사용되고 있는 PPI 계열의 합성의약품의 경우 재발률이 높고, 장기복용 시 부작용을 동반한다는 단점이 있어 천연 유래의 치료제 개발을 위한 연구가 진행되고 있다(Lee et al., 2008; Lee et al., 2010, Nam et al., 2018). 광천수는 예로부터 풍부한 미네랄 성분을 함유하고 있어 질병 예방과 치료에 이용되었으며, 기능성을 규명하고 활용성을 증대시키기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다(Chetoni, 2000; Ham et al., 2005; Petraccia et al., 2006; Jeong et al., 2011). 본 연구에서는 강원도 춘천지역에서 용출된 천연 미네랄 워터의 기능성 및 활용 가치를 확인하기 위해 미네랄 성분 분석 및 미네랄 워터를 급여한 역류성 식도염 유발 동물모델에서 식도 점막 보호 효과를 분석하였다. 체내에서 무기질 성분은 반드시 필요한 필수 영양소로 기능성과 밀접한 관계가 있으며, 특히 Na과 K 성분은 세포의 정상 구

조과 기능을 유지하는데 중요한 작용을 한다고 알려져 있다(Ham et al., 2005). 또한, Mg은 세포소기관의 구성과 기능성에 관여하며 세포핵 내에서 핵산과 밀접한 관련이 있으며, Ca은 뼈의 발달과 유지, 세포 내외 대사과정, 세포 내 효소 활성 조절에 관여하고 위 점막 보호 효과에 대한 연구결과가 보고된 바 있다(Brodie et al., 1977; Koo, 1994; Ciosek et al., 2021). 미네랄 워터에 함유된 미네랄 성분을 분석한 결과, 다량 미네랄 Ca, Mg, K, Si, Na, Fe 성분과 미량 미네랄 Ti, Sr, Cr, Ni, V, Mn, Li, Co 등 13종류의 성분이 검출되었다.

위 내용물의 역류로 인해 손상된 식도 조직에서는 출혈, 발적 등이 나타나며 조직병리학적 증상으로는 상피층 탈락, 점막 손실, 점막 하층의 출혈과 염증세포 침윤, 근육조직의 구조 변형 등이 관찰된다(Nam et al., 2021b). 역류성 식도염 유발 후 식도 점막 손상도를 측정 한 결과, 대조군에서는 정상군에 비해 위산 역류로 인한 점막 손상과 출혈이 관찰되었지만, 미네랄 워터를 급여한 그룹에서는 점막 손상 및 출혈 정도가 유의하게 감소됨을 확인하였다. H&E 염색을 통한 조직학적 분석에서는 손상에 의한 상피층의 탈락과 점막 구조 변형, 출혈, 염증세포 침윤 등이 관찰되었지만, 미네랄 워터 투여군에서는 손상 지표가 감소되었다. 염증 반응시 염증성 단백질인 iNOS는 nitric oxide (NO)를 과도하게 생성함으로써 염증 반응을 악화를 기인하는 생성물로 염증반응 억제 효과를 측정하는데 주요 인자이다(Buttar et al., 2002). Cyclooxygenase (COX)는 위장관에서 점막 보호 및 재생과 관련이 있는 prostaglandins (PGs)를 생성하는 효소로서, COX-1은 주로 점막 혈류량을 증가시키고 점액질과 중탄산염 분비를 통해 위 점막을 보호한다. COX-2는 염증반응 시 발현되는 인자로 과발현시 염증을 악화시키는 역할을 한다(Mahmoud and Abd El-Ghffar, 2019). 역류성 식도염 유발군의 식도 조직에서는 염증 지표인자인 iNOS와 COX-2의 발현이 정상군에 비해 증가하였으나, 점막 보호에 관여하는 COX-1 단백질의 발현은 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나 미네랄 워터 투여로 인해 손상이 감소된 식도 조직에서는 iNOS와 COX-2 발현이 감소하였고, COX-1의 발현이 증가함에 따라 항염증 및 점막 재생에 관련된 인자의 조절을 통해 식도 점막 보호 효과를 나타낸 것으로 판단되었다. 세포 연결 단백질은 상피의 장벽기능을 담당하는 단백질로 상피 또는 내피세포에 존재하며, 최근 식도 점막 손상으로 인한 장벽 기능의 파괴와 연결 단백질 발현의 감소가 상관관계를 보이는 것으로 보고되었다(Wu et al., 2018). 정상적인 식도 조직에서 발현되는 세포 연결 단백질의 발현량을 측정한 결과, 위 내용물 역류로 인해 손상된 식도 점막에서는 Claudin-4, Claudin-5의 발현이 모두 감소하였으나, 미네랄 워터의 점막 보호 작용으로 인해 세포 연결 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였다. 이에 따라, 미네랄 워터의 성분 분석을 통해 기능성에 관여하는 미네랄 성분의 종류와 함량을 확인할 수 있었으며, 역류성 식도염 모델에서 식도 점막에 대한 보호 작용을 확인하였다.

V. 적 요

본 연구는 다량 미네랄 6종 및 미량 미네랄 8종이 함유된 천연 미네랄 워터의 기능성을 확인하기 위해 역류성 식도염 유발 동물모델을 이용하여 개선 효과를 분석하였다. RAW264.7에서의 세포 생존을 측정 결과를 통해 미네랄 워터는 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였으며, 역류성 식도염 동물모델에서 위 내용물 역류에 의한 식도 손상을 감소시켰으며, 식도 점막 보호 작용으로 인해 세포 연결 단백질 발현을 억제하였다. 따라서, 미네랄 워터의 식도 보호 작용은 조직 내 염증성 단백질 및 점막 재생 관련 단백질을 조절함으로써 나타난 것으로 사료된다. 이러한 연구 결과를 통해, 미네랄 워터의 기능성을 확인함으로써 음용수, 식품 생산 등의 다양한 산업 분야에서의 활용성과 가축 생산에 있어 면역증진 및 염증 관련 질병에 대처할 수 있는 친환경 기능성 사료첨가제로서의 미네랄 워터의 이용 가치를 확인할 수 있었다.

[Submitted, November. 5, 2021; Revised, December. 21, 2021; Accepted, December. 29, 2021]

References

1. Brodie, M. J., P. C. Ganguli, A. Fine, and T. J. Thomson. 1977. Effects of oral calcium gluconate on gastric acid secretion and serum gastrin concentration in man. *Gut*. 18(2): 111-114.
2. Buttar, N. S., K. K. Wang, M. A. Anderson, R. A. Dierkhising, R. J. Pacifico, K. K. Krishnadath, and L. S. Lutzke. 2002. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition in Barrett's esophagus epithelium: an *in vitro* study. *J. Natl. Cancer Inst.* 94(6): 422-429.
3. Chetoni, R. *Acque minerali e termali*. Segrate: Geograph; 2000.
4. Choi, H. M. and S. W. Lim. 2004. The effects of Hyangsapyeongwisan on Gastric Mucosal Lesions Induced by Indomethacin. *Korean J. Orient. Int. Med.* 25(3): 518-528.
5. Ciosek, Ż., K. Kot, D. Kosik-Bogacka, N. Łanocha-Arendarczyk, and I. Rotter. 2021. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*. 11(4): 506.
6. Di Marco, M., A. M. P. De Novellis, V. Carluccio, R. Bozzelli, M. Orlando, and P. Lanuti. 2020. Short- and long-term beneficial effects of medicinal mineral water administration. *Environ Geochem Health*. 42(2): 353-364.

7. Dinelli, E. A. Lima, S. Albanese, M. Birke, D. Cicchella, L. Giaccio, P. Valera, and B. De Vivo. 2012. Comparative study between bottled mineral and tap water in Italy. *J. Geochem. Explor.* 112: 368-389.
8. Eggenkamp, H. G. M. and J. M. Marques. 2013. A comparison of mineral water classification techniques: Occurrence and distribution of different water types in Portugal (including Madeira and the Azores). *J. Geochem. Explor.* 132: 125-139.
9. Ham, S. S., S. H. Kim, S. Y. Moon, M. S. Jeon, D. H. Oh, and C. B. Cui. 2005. Antioxidative, Antimutagenic and Cytotoxic Effects of the Mineral Water. *J. Fd Hyg. Safety.* 20(1): 53-57.
10. Hwang, S. Y. 2006. A Study on the Mineral Water Quality in Asia Partial Area. *KOREAN J. Sanitation.* 21(3): 9-14.
11. Jabri, M. A., H. Tounsi, K. Rtibi, L. Marzouki, M. Sakly, and H. Sebai. 2016. Ameliorative and antioxidant effects of myrtle berry seed (*Myrtus communis*) during reflux-induced esophagitis in rats. *Pharm Biol.* 54(9): 1575-1585.
12. Jang, M. W. and S. W. Lim. 2013. Experimental Study for Effect of Banhasasim-tang on Mice with Reflux Esophagitis. *Korean J. Orient. Int. Med.* 34(4): 362-374.
13. Jeong, J. E., H. S. Ji, B. G. Kim, S. M. Han, S. Y. Kim, and K. W. Kwon. 2011. Functional Mineral Characteristics of Groundwater in Busan Area. *The Annual Report of Busan Metropolitan city Institute of Health & Environment.* 20(1): 88-109.
14. Jung, S. J., E. J. Joo, Y. K. Yoo, Y. K. Kim, Y. J. Cho, B. S. Yoon, J. K. Cho, K. T. Nam, and S. G. Hwang. 2006. Effect of the supply of natural water from deep sea rock on the immune response and antioxidant activity in rats. *Korean J. Anim Sci.* 48: 211-218.
15. Kim, M. Y., Y. O. Shin, J. Y. Lee, A. R. Lee, S. H. Shin, O. J. Kwon, B. I. Seo, and S. S. Roh. 2015. Improving Effect of a Combined Extract of *Rhei Rhizoma* and *Glycyrrhizae Rhizoma* through Anti-oxidative Stress in Reflux Esophagitis rats. *Kor. J. Herbol.* 35(4): 37-44.
16. Kim, W. J., H. Li, T. J. Yoon, J. M. Sim, S. K. Choi, and K. H. Lee. 2009. Inhibitory Activity of Brine Mineral Water on Cancer Cell Growth, Metastasis and Angiogenesis. *Korean J Food & Nutr.* 22(4): 542-547.
17. Kim, Y. J., I. S. Jung, H. J. Song, E. Y. Choi, I. S. Choi, and Y. J. Choi. 2008. Study of deep ground sea-like water on antioxidant activity and the immune response in RAW264.7 macrophages. *J Life Sci.* 18: 329-335.
18. Koh, D. C. and K. S. Ko. 2018. Recent Trends of Domestic and International Management and Research of Natural Mineral Water Used for Bottled Water. *J. Soil Groundwater*

- Environ. 23(6): 9-27.
19. Koo, M. W. 1994. The effects of milk and calcium on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Pharmacol Res.* 29(3): 217-224.
 20. Lee, J. Y., W. K. Hong, K. M. Sohn, D. Y. Kim, Y. M. Kim, H. H. Choi, C. S. Choi, S. J. Kim, G. H. Baik, J. B. Kim, and D. J. Kim. 2008. Prevalence and clinical Characteristics of gastroesophageal reflux disease and reflux esophagitis in chuncheon city-Health care examination study. *The Korean Journal of Medicine.* 74(4): 385-390.
 21. Lee, S. H., J. S. Shin, G. P. Min, K. J. Lee, J. H. Lee, H. T. Cheong, B. K. Yang, and C. K. Park. 2014. Effect of Brine Mineral Water on Growth Performance and Properties of Blood in Wearing Pigs. *Ann. Anim. Resour. Sci.* 25(1): 14-22.
 22. Lee, Y. J., J. H. Park, and S. S. Roh. 2010. Effects on Rats with Reflux Esophagitis Treated with Lonicerae Flos Extract. *Koren J. Oriental Physiology & Pathology.* 24(6): 970-975.
 23. Mahmoud, Y. I. and Abd El-Ghffar, E. A. 2019. Spirulina ameliorates aspirin-induced gastric ulcer in albino mice by alleviating oxidative stress and inflammation. *Biomed Pharmacother.* 109: 314-321.
 24. Misund, A., B. Frengstad, U. Siewers, and C. Reimann. 1999. Variation of 66 elements in European bottled mineral waters. *Sci. Total Environ.* 243: 21-41.
 25. Nam, H. H., Li, Nan, and B. K. Choo. 2018. Dichloromethane Extracts of Geranium Koreanum Kom. Alleviates Esophagus Damage in Acute Reflux Esophagitis-Induced Rats by Anti-Inflammatory Activities. *Int J Mol Sci.* 19(11): 3622.
 26. Nam, H. H., S. M. Ryu, S. G. Yang, W. J. Kim, B. C. Moon, and Y. S. Seo. 2021a. The Anti-inflammatory Effects of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) in Reflux Esophagitis Model. *Korean J. Org. Agric.* 29(1): 85-96.
 27. Nam, H. H., S. Yang, H. S. Kim, M. J. Kim, J. S. Kim, and J. H. Lee. 2021b. Role of *Semisulcospira gottschei* extract as medicinal food on reflux esophagitis in rats. *Food. Sci. Nutr.* 9(6): 3114-3122.
 28. Petraccia, L., G. Liberati, S. G. Masciullo, M. Grassi, and A. Fraioli. 2006. Water, mineral waters and health. *Clin Nutr.* 25(3): 377-385.
 29. Wu, L., T. Oshima, M. Li, T. Tomita, H. Fukui, J. Watari, and H. Miwa. 2018. Filaggrin and tight junction proteins are crucial for IL-13-mediated esophageal barrier dysfunction. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 315(3): G341-G350.
 30. Yoon, J. and K. Kim. 2000. Geochemistry and stable isotopes of carbonated waters in South Korea. *J. Kor. Soc. Groundwater Environ.* 7: 116-124.