

Gallic acid 등으로 유발된 인간 간 조직세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 유산균발효애엽 추출물의 영향

박완수* · 김도훈

경원대학교 한의과대학 한의학과

Effect of *Artemisiae Argi Folium* Fermented with *Lactobacillus Pentosus* on Hydrogen Peroxide Production of Human Hepatocyte Treated with Toxicants

Wan Su Park*, Do Hoon Kim

College of Oriental Medicine, Kyungwon University

The purpose of this study is to investigate the effect of water extract from *Artemisiae Argi Folium* Fermented with *Lactobacillus pentosus* (AFL) on hydrogen peroxide production within human hepatocyte HepG2 cells treated with gallic acid, EtOH, nicotine, acetaminophen, and acetaldehyde. AFL (0~400 ug/mL) was treated with gallic acid, EtOH, nicotine, acetaminophen, and acetaldehyde. And the intracellular productions of hydrogen peroxide were measured by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. AFL showed the restoration of the intracellular productions of hydrogen peroxide which were reduced by gallic acid, EtOH, nicotine, acetaminophen, and acetaldehyde in HepG2 Cells. AFL could be supposed to have the hepatoprotective effect related with hepatocytologic signaling activity against gallic acid, EtOH, nicotine, acetaminophen, and acetaldehyde.

Key words : hepatocyte, *lactobacillus pentosus*, *artemisiae argi folium*, fermentation, hydrogen peroxide

서 론

애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 국화과에 속한 여러해살이 풀인 황해쭉(*Artemisia argyi* L.)의 잎을 말린 것으로, 夏季에 꽃이 아직 피지 않았을 때 채취하여 햇볕에 말린 후 사용된다. 성미(性味)는 따뜻하나 독이 약간 있고(溫有小毒) 맵고 쓴 것(辛苦)으로 알려져 있으며, 온경지혈(溫經止血), 산한지통(散寒止痛)하는 효능이 있어서 소복냉통(少腹冷痛), 월경부조, 궁냉불임(宮冷不孕), 토혈(吐血), 녹혈(衄血), 붕루경다(崩漏經多), 임신으로 인한 하혈(下血) 등을 치료하는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾. 외용(外用)으로는 피부가려움증에 적용되기도 하며 뜸치료(灸)의 기본재료로서 사용되기도 한다^{1,3)}.

최근에는 한약재를 발효하여 한약의 안전성을 확보하고 효

능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 여러 가지 연구들이 보고되고 있으며, 쭉의 발효에 대한 연구 또한 많이 이루어지고 있다^{3,4)}.

근래에 한약과 한약재·한약제품에 대한 안전성과 신뢰성에 대한 많은 관심들이 제기되고 있으며, 천연물에 의한 간 독성, 급성 간염 등 간 조직에 유해한 약리적 반응을 일으키는 현상에 대한 연구보고들⁵⁻⁷⁾도 많이 이루어지고 있으나, 그러나 한약재나 한약의 성분이 오히려 다른 독성물질들에 의해 간 조직에서 발생하는 다양한 병리적 현상을 완화하는 효과를 나타낸다는 보고도 또한 많이 이루어지고 있다^{3,8-13)}.

본 연구에서는 애엽(艾葉)을 유산균의 일종인 *Lactobacillus pentosus*로 발효시켜 얻은 시료(AFL)가 gallic acid(GA), EtOH, nicotine, acetaminophen(AAP), acetaldehyde(AC) 등의 다양한 간 독성유발물질들에 의해서 유발되는 인간 간 조직세포 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide의 생성억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro 실험을 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 박완수, 성남시 수정구 복정동 경원대학교 한의과대학

· E-mail : pws98@kyungwon.ac.kr, · Tel : 031-750-8821

· 접수 : 2009/08/22 · 수정 : 2009/09/17 · 채택 : 2009/10/04

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 Dimethyl Sulfoxide(DMSO), dihydrorhodamine 123(DHR) 등은 Sigma사(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan), freeze dryer(Eyela, Tokyo, Japan), deep freezer(Revco, NC, USA), microplate reader(Bio-Rad, CA, USA) 등이다.

2) 약제

본 실험에 사용된 약제 애엽(艾葉; *Artemisiae Argi Folium*)은 한국 서해안에서 채취, 김정환 후 사용하였으며 검증된 약제(No. 2008-01-0015)는 경원대학교 한의과대학 병리학교실에 보관되었다.

2. 방법

1) 시료의 제조

(1) 艾葉 추출물 제조

艾葉 50 g을 전기약탕기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 150분 동안 가열, 추출하였다. 추출이 끝난 뒤 추출액을 filter paper(Advantec No.2, Japan)로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 뒤 발효할 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 6 g을 얻었으며 수율은 12%였다.

(2) 艾葉 발효 추출물(AFL) 제조

위에서 제조된 艾葉 추출물을 이용하여 다음과 같이 艾葉 발효 추출물(AFL)을 제조하였다.

① 조효소 조제 : 조효소제인 3 g α -herbzyme(한국효소, 화성, 한국)에 증류수 100 mL를 가하고 37°C에서 30분간 침출하여 여과시킨 후 그 여액을 조효소액으로 사용하였다.

② 열수출하여 건조한 艾葉 추출물(3.0 g, pH:5.44)을 screw cap tube 0.95 g을 담고 미리 추출된 조효소액을 2.2 mL를 첨가하여 37°C에서 2시간 효소 반응하였다.

③ 효소반응 후 95°C에서 10분간 살균하였다.

④ *Lactobacillus pentosus* K34를 艾葉에 4%씩 접종하여 37°C에서 4일간 배양하였다.

⑤ 배양 후 pH는 5.42였다.

⑥ 배양 후 60°C에서 20분간 열처리한 후 동결건조하여 艾葉 발효 추출물(AFL) 제조를 완료, 실험에 사용하였다.

2) Cell line

실험에 사용된 대식세포는 human hepatocyte(HepG2 cell line)로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

3) 세포 배양

HepG2 cells은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Cells이 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히

증식된 후 배양, 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 75 cm² flask 당 3 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

4) Dihydrorhodamine 123(DHR) assay

세포내의 hydrogen peroxide(H₂O₂) 생성은 Roesler 등¹³⁻¹⁷의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 실시하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123(R123)로 바뀌게 된다. 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 mouse의 대식세포 내에서 대량으로 발생하는 reactive oxygen species(ROS)의 수준을 dihydrorhodamine 123 assay를 이용하여 측정할 수 있다. 본 실험에서는 GA, EtOH, Nicotine, AAP, AC 등이 유발하는 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 시료의 영향을 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어주었다. 시료를 처리하기 전에 우선 DHR(10 μ M)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 다음으로 배지에 녹인 시료(0, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)와 독성물질들(GA, EtOH, nicotine, AAP, AC)을 각 well에 처리하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

실험성적은 Mean \pm S.D.로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student t-test와 ANOVA test로 분석하여 P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

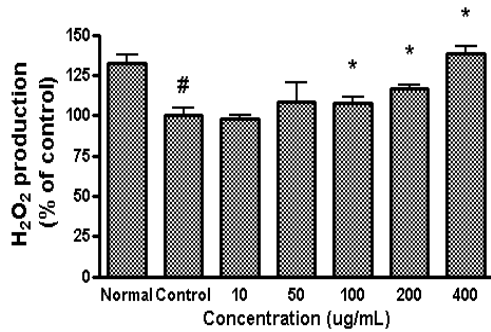
1. Gallic acid(GA)의 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFL 영향

GA(100 μ M)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 GA에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 100 μ g/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 1).

2. EtOH의 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFL 영향

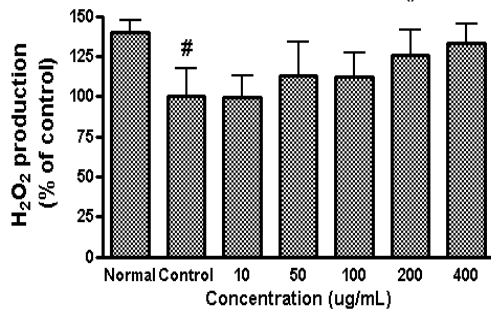
EtOH(100 μ M)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억

체를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 200 µg/mL 이상의 농도에서 유의하게 (p<0.05) 회복시켰다(Fig. 2).



AFL (µg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
GA (100 µM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	132.64	100.00	98.25	108.38	107.96	116.41	138.34
SD	5.19	5.10	2.01	12.31	3.47	2.27	4.74

Fig. 1. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of HepG2 cell treated with gallic acid (GA; 100 µM). Cells were incubated with AFL for 24 hr with GA. Results are represented as mean ± S.D. AFL : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Lactobacillus pentosus*. Normal : Not treated with GA. Control : Treated with GA only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.



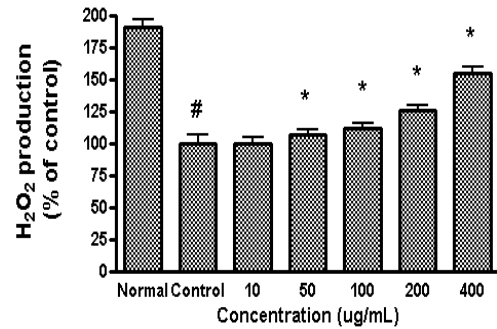
AFL (µg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
EtOH (100 µM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	140.26	100.00	99.65	113.29	112.45	125.66	132.94
SD	7.13	17.44	13.24	20.40	14.95	15.92	12.35

Fig. 2. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of HepG2 cell treated with EtOH (100 µM). Cells were incubated with AFL for 24 hr with EtOH. Results are represented as mean ± S.D. AFL : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Lactobacillus pentosus*. Normal : Not treated with EtOH. Control : Treated with EtOH only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

3. Nicotine의 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFL 영향

Nicotine(1 mM)으로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 Nicotine에 의한 세포내

hydrogen peroxide 생성억제를 50 µg/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 3).

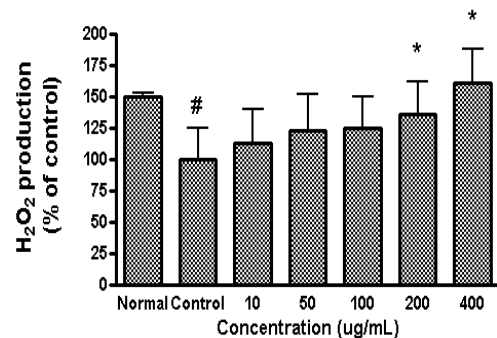


AFL (µg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
Nicotine (1 mM)	-	+	+	+	+	+	+
Mean	190.41	100.00	100.00	106.57	111.61	125.21	155.09
SD	6.18	6.85	4.29	3.75	3.68	4.69	4.22

Fig. 3. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of HepG2 cell treated with nicotine (1 mM). Cells were incubated with AFL for 24 hr with Nicotine. Results are represented as mean ± S.D. AFL : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Lactobacillus pentosus*. Normal : Not treated with Nicotine. Control : Treated with Nicotine only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

4. AAP의 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 AFL 영향

AAP(2 mM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 AAP에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 200 µg/mL 이상의 농도에서 유의하게 (p<0.05) 회복시켰다(Fig. 4).

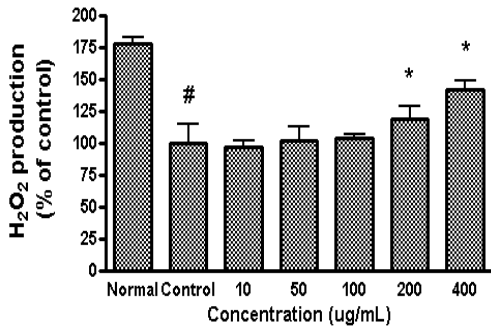


AFL (µg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
AAP	-	+	+	+	+	+	+
Mean	149.84	100.00	112.44	122.94	124.21	135.83	160.64
SD	2.79	24.18	27.07	28.61	25.33	26.26	27.09

Fig. 4. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of HepG2 cell treated with acetaminophen (AAP; 2 mM). Cells were incubated with AFL for 24 hr with AAP. Results are represented as mean ± S.D. AFL : Water extract of *Artemisiae Argi* Folium Fermented with *Lactobacillus pentosus*. Normal : Not treated with AAP. Control : Treated with AAP only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

5. Acetaldehyde(AC)의 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성 억제에 대한 AFL 영향

AC(200 uM)으로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 AC에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다(Fig. 5).



AFL (µg/mL)	0	0	25	50	100	200	400
AC	-	+	+	+	+	+	+
Mean	178.16	100.00	96.25	101.71	108.50	118.17	141.98
SD	4.49	15.04	5.02	11.26	3.30	10.95	6.32

Fig. 5. Effect of AFL on the intracellular production of hydrogen peroxide (H₂O₂) of HepG2 cell treated with acetaldehyde(AC; 200 uM). Cells were incubated with AFL for 24 hr with acetaldehyde. Results are represented as mean ± S.D. AFL : Water extract of *Artemisiae Argi Folium* Fermented with *Lactobacillus pentosus*. Normal : Not treated with acetaldehyde. Control : Treated with acetaldehyde only. # represents P < 0.05 compared to the normal. * represents P < 0.05 compared to the control.

고찰

애엽(*Artemisiae Argi Folium*)은 국화과에 속한 다년생 초본 황해쑥(*Artemisia argyi* L.)의 잎을 건조한 것으로, 여름에 꽃이 아직 피지 않았을 때 채취하여 햇빛에서 말린 후 사용하는데, 간(肝), 비(脾), 신(腎) 등으로 귀경(歸經)하며 산한지통(散寒止痛), 온경지혈(溫經止血)하는 효능이 있어서 소복냉통(少腹冷痛), 월경부조, 궁냉불임(宮冷不孕), 토혈(吐血), 녹혈(衄血), 붕루경다(崩漏經多), 임신으로 인한 하혈(下血), 그밖에 외용(外用)으로 피부 가려움증, 뜸 치료로서 경락을 덥혀서 출혈을 멈추게 하는 작용으로(溫經止血) 허한성(虛寒性) 출혈(出血)을 치료하는 것과^{1,3)}, 진해거담평천(鎮咳祛痰平喘) 작용, 항혈액응고 작용, 면역증강 작용, 항균 작용 등이²⁾ 있는 것으로 알려져 있다. 주요한 성분으로는 약리활성을 가진 플라보노이드의 일종인 Jaceosidin, scopoletin, isoscopoletin, Arteminolides B·C·D, Eudesmanolides 등¹⁹⁻²⁴⁾이 보고된 바 있다.

최근에는 한약재 혹은 한약을 발효하여 한약의 안전성을 높이고 효능의 증대를 시도하거나 새로운 약효를 발굴하는 다양한 연구들^{25,26)}이 보고되고 있는데, 발효애엽연구^{3,4)}도 계속되고 있다.

Hydrogen peroxide와 같은 활성산소종들(reactive oxygen species; ROS)은 주로 산화적 손상을 일으키는 생체유해작용을

하는 것에 많은 연구들이 이루어져왔으나, 최근의 연구에서는 정상적인 생명활동에 필수적인 activator protein-1^{27,28)}, NF-κB^{28,29)}, p53³⁰⁾과 같은 전사인자들(transcription factors)의 조절과 순차적인 관련 유전자들의 발현에 있어 중요한 순기능을 담당하고 있음이 보고³¹⁾되고 있다.

본 연구에서는 GA, EtOH, nicotine, AAP, AC 등에 의해서 유발되는 대식세포의 hydrogen peroxide 세포내 생성억제에 대하여 유산균발효애엽 물추출물(AFL)이 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

GA(100 uM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 GA에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 100 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. 또한 EtOH(100 uM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 EtOH에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. Nicotine(1 mM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발한 경우에도 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과 nicotine에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 50 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. AAP(2 mM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과에서도 AAP에 의한 세포내 hydrogen peroxide 생성억제를 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰다. AC(200 uM)로 HepG2 cell 내 hydrogen peroxide 생성억제를 유발하고 AFL(0, 10, 50, 100, 200, 400 µg/mL)를 함께 처리하여 24시간동안 배양한 결과에서는 AFL이 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과는 황해쑥(*Artemisia argyi* L.)을 기원으로 하는 애엽(*Artemisiae Argi Folium*)을 유산균(*Lactobacillus pentosus*)으로 발효시켜 얻은 물추출물(AFL)이 GA, EtOH, nicotine, AAP, AC 등의 독성물질들에 의해서 유발되는 간 조직세포의 병리적 현상 중 다양한 전사인자들(transcription factors)의 발현을 조절하는 간 조직세포 내 hydrogen peroxide의 생성억제를 회복시킬 수 있는 효과를 가지고 있음을 알려주는 것이다.

결론

GA(100 uM)로 유발된 인간 간 조직세포 HepG2 cell 내의 hydrogen peroxide 생성억제를 유산균 발효애엽 물추출물 AFL은 100 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게(p<0.05) 회복시켰으며, EtOH(100 uM)에 의한 hydrogen peroxide 생성억제에 대하여는 200 ug/mL 이상의 농도에서, Nicotine(1 mM)에 의한 hydrogen peroxide 생성억제에 대하여는 50 ug/mL 이상의 농도에서, AAP(2 mM)에 의한 hydrogen peroxide 생성억제에 대하여는

200 ug/mL 이상의 농도에서, AC(200 uM)에 의한 hydrogen peroxide 생성억제에 대하여는 200 ug/mL 이상의 농도에서 유의하게($p < 0.05$) 회복시켰다. 이러한 결과는 유산균발효에업 물추출물(AFL)이 간 독성을 유발하는 물질들에 의한 간 조직세포의 병리적 현상 중 다양한 전사인자들(transcription factors)의 발현을 조절하는 간 조직세포 내 hydrogen peroxide의 생성억제를 회복시킬 수 있는 효과를 가지고 있음을 알려주는 것이다. 앞으로 독성물질들에 의한 간 조직세포의 기능손상회복제로서 AFL의 효용성에 대한 보다 면밀한 연구가 필요한 것으로 판단되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 경원대학교 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과임.

참고문헌

1. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 405-407, 1991.
2. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당, pp 309-311, 2001.
3. 박완수. Gallic acid 등으로 유발된 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 유산균발효에업 추출물의 영향. 동의생리병리학회지 23(2):438-442, 2009.
4. 박완수, 김도훈. 고삼과 애엽의 발효 혼합물이 에탄올과 니코틴으로 유발된 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성 감소에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 22(5):1293-1298, 2008.
5. Zhou, S.F., Xue, C.C., Yu, X.Q., Wang, G. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Curr Drug Metab.* 8(6):526-553, 2007.
6. Savvidou, S., Goulis, J., Giavazis, I., Patsiaoura, K., Hytioglou, P., Arvanitakis, C. Herb-induced hepatitis by *Teucrium polium* L. report of two cases and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 19(6):507-511, 2007.
7. Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O. Safety of traditional arab herbal medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 3(4):433-439, 2006.
8. Yuan, L.P., Chen, F.H., Ling, L., Dou, P.F., Bo, H., Zhong, M.M., Xia, L.J. Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *J Ethnopharmacol.* 116(3):539-546, 2008.
9. Yen, F.L., Wu, T.H., Lin, L.T., Cham, T.M., Lin, C.C. Nanoparticles formulation of *Cuscuta chinensis* prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 46(5):1771-1777, 2008.
10. Lin, H.M., Tseng, H.C., Wang, C.J., Lin, J.J., Lo, C.W., Chou, F.P. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact.* 171(3):283-293, 2008.
11. Balderas-Renteria, I., Camacho-Corona Mdel, R., Carranza-Rosales, P., Lozano-Garza, H.G., Castillo-Nava, D., Alvarez-Mendoza, F.J., Tamez-Cantú, E.M. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Ann Hepatol.* 6(4):251-254, 2007.
12. Kim, E.Y., Kim, E.K., Lee, H.S., Sohn, Y., Soh, Y., Jung, H.S., Sohn, N.W. Protective effects of *Cuscutae semen* against dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in Sprague-Dawley rats. *Biol Pharm Bull.* 30(8):1427-1431, 2007.
13. Zhong, M.M., Chen, F.H., Yuan, L.P., Wang, X.H., Wu, F.R., Yuan, F.L., Cheng, W.M. Protective effect of total flavonoids from *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *J Pharm Pharmacol.* 59(7):1017-1025, 2007.
14. Jirapongsananuruk, O., Malech, H.L., Kuhns, D.B., Niemela, J.E., Brown, M.R., Anderson-Cohen, M., Fleisher, T.A. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol.* 111(2):374-379, 2003.
15. Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 219(1-2):187-193, 1998.
16. Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide.* 1(2):145-157, 1997.
17. van Pelt, L.J., van Zwieten, R., Weening, R.S., Roos, D., Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods.* 191(2):187-196, 1996.
18. Roesler, J., Hecht, M., Freihorst, J., Lohmann-Matthes, M.L., Emmendorffer, A. Diagnosis of chronic granulomatous disease and of its mode of inheritance by dihydrorhodamine 123 and flow microcytofluorometry. *Eur J Pediatr.* 150(3):161-165, 1991.
19. Kim, M.J., Kim, D.H., Lee, K.W., Yoon, D.Y., Surh, Y.J. Jaceosidin induces apoptosis in ras-transformed human

- breast epithelial cells through generation of reactive oxygen species. *Ann NY Acad Sci.* 1095: 483-495, 2007.
20. Jeong, M.A., Lee, K.W., Yoon, D.Y., Lee, H.J. Jaceosidin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia argyi*, inhibits phorbol-ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 by blocking phosphorylation of ERK-1 and -2 in cultured human mammary epithelial cells. *Ann NY Acad Sci.* 1095: 458-466, 2007.
 21. Lee, H.G., Yu, K.A., Oh, W.K., Baeg, T.W., Oh, H.C., Ahn, J.S., Jang, W.C., Kim, J.W., Lim, J.S., Choe, Y.K., Yoon, D.Y. Inhibitory effect of jaceosidin isolated from *Artemisia argyi* on the function of E6 and E7 oncoproteins of HPV 16. *J Ethnopharmacol.* 98(3):339-343, 2005.
 22. Adams, M., Efferth, T., Bauer, R. Activity-guided isolation of scopoletin and isoscapoletin, the inhibitory active principles towards CCRF-CEM leukaemia cells and multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells, from *Artemisia argyi*. *Planta Med.* 72(9):862-864, 2006.
 23. Lee, S.H., Kim, H.K., Seo, J.M., Kang, H.M., Kim, J.H., Son, K.H., Lee, H., Kwon, B.M., Shin, J., Seo, Y. Arteminolides B, C, and D, new inhibitors of farnesyl protein transferase from *Artemisia argyi*. *J Org Chem.* 67(22):7670-7675, 2002.
 24. Tan, R., Jia, Z. Eudesmanolides and Other Constituents from *Artemisia argyi*. *Planta Med.* 58(4):370-372, 1992.
 25. 조수인, 김형우, 이근지. 동백 발효 추출물 단기 투여의 활성화에 대한 연구. *대한본초학회지* 21(2):55-62, 2006.
 26. 한효상, 박완수, 이영중. 艾葉 발효 추출물의 면역활성에 관한 연구. *대한본초학회지* 23(3):103-112, 2008.
 27. Karin, M., Shaulian, E. AP-1: linking hydrogen peroxide and oxidative stress to the control of cell proliferation and death. *IUBMB Life.* 52: 1724, 2001.
 28. Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44: 239-267, 2004.
 29. Bowie, A., O'Neill, L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 59: 1323, 2000.
 30. Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., Alt, F.W. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120: 497-512, 2005.
 31. Biswas, S., Gupta, M.K., Chattopadhyay, D., Mukhopadhyay, C.K. Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(2):H758-766, 2007.