

Research Article



RAW264.7 대식세포에서 미선나무 잎 추출물의 항산화, 항염증 효능 및 기전연구

유주희 , 김경아

충남대학교 식품영양학과

Antioxidant and anti-inflammatory effects and mechanism of *Abeliophyllum distichum* leaf extract in RAW264.7 macrophages

Juhee Yoo and Kyung-Ah Kim

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

OPEN ACCESS

Received: Jun 26, 2023
Revised: Aug 17, 2023
Accepted: Sep 5, 2023
Published online: Sep 22, 2023

Correspondence to

Kyung-Ah Kim

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea.
Tel: +82-42-821-6832
Email: kakim@cnu.ac.kr

© 2023 The Korean Nutrition Society
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID iDs

Juhee Yoo
<https://orcid.org/0000-0002-3367-5675>
Kyung-Ah Kim
<https://orcid.org/0000-0002-2611-3033>

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

ABSTRACT

Purpose: *Abeliophyllum distichum* (*A. distichum*) is a plant native to Korea. In this study, we investigated the mechanism of antioxidant and anti-inflammatory effects of the leaf extract of *A. distichum*.

Methods: The antioxidant capacity of the *A. distichum* leaf extract was determined based on the total polyphenol content, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay, and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The anti-inflammatory effects of the *A. distichum* leaf extract were evaluated by measuring the production of nitric oxide (NO) and the expression levels of proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-6 using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). In addition, the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear transcription factor-erythroid 2 related factor (Nrf2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase 2 (COX-2), as well as the activation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) were examined using the western blot analysis.

Results: The total polyphenol content of the *A. distichum* leaf extract was 329.89 ± 30.17 gallic acid equivalents mg/g and the DPPH and ABTS scavenging activities were 55% and 70%, respectively. Additionally, the FRAP value of the extract was 743.68 ± 116.59 mg/mL. After 12-hour treatment with the *A. distichum* leaf extract, there was a tendency for the Nrf2 expression to increase, and the expression of HO-1 was significantly elevated in the RAW264.7 cells. The *A. distichum* leaf extract treatment resulted in decreased levels of NO, TNF- α , IL-6, and IL-1 β , as well as reduced expression of iNOS and COX-2, along with inhibition of NF- κ B activation in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells.

Conclusion: These results suggest that the *A. distichum* leaf extract exerts antioxidative and anti-inflammatory effects by upregulating the expression of HO-1 and downregulating NF- κ B activation.

Keywords: *Abeliophyllum distichum*; antioxidant; inflammation; macrophages

서론

모든 세포는 생명을 유지하기 위해 에너지 생성하는 과정에서 산소를 필요로 하며 에너지 대사에 사용되는 일부 산소는 부산물인 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)로 전환된다 [1]. 활성산소는 세포 내 면역반응 및 세포 내 신호에 기여하지만 정상적으로 소거되지 않아 과도하게 생성될 경우 생체 내 활성산소의 불균형 상태인 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지게 된다. 이는 세포의 주요 구성성분인 단백질, 핵산, 지질 등을 손상시켜 생물에 치명적인 영향을 주고, 세포 내에 생체 고분자를 비선택적, 비가역적으로 공격하여 산화적 스트레스를 일으켜, 세포 사멸을 유도하여 다양한 질병과 노화를 유발할 수 있다 [2-4]. 생명체는 과잉의 활성산소와 프리라디칼을 제거하기 위해 자체적으로 항산화 방어체계를 갖추고 있다 [5]. 대표적으로 nuclear transcription factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)는 산화 스트레스를 감지하고 항산화 및 유전자 발현 경로의 활성을 조절하는 전사인자이며 항산화 유전자인 heme oxygenase-1 (HO-1)을 활성화시킨다 [6].

염증 (inflammation)반응이란 다양한 경로를 통해 생체에 부상 및 바이러스나 세균 등에 의한 감염으로부터 이를 다시 회복하려고 할 때 우리 몸에서 일어나는 중요한 방어체계가 면역반응이다. 그렇지만 과도하게 발생하면 신체 조직의 손상을 일으킬 수 있으며 동맥경화증, 류마티스 관절염, 천식, 기관지염, 다발성 경화증, 비만, 비알코올성 지방간, 만성염증질환, 종양, 암 등의 질병이 발생한다 [7,8]. 대식세포 (macrophage)의 과도한 활성화는 그람 음성 세균의 세포막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)나 활성산소종의 자극에 의해 발생되며 LPS에 의한 반응은 Toll-like receptor 4 (TLR-4) 수용체를 통해 nuclear factor-kappa B (NF-κB) 활성화에 의해 조절된다 [9]. NF-κB가 활성화되면 세포질에서 핵으로 전위되어 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 염증성 사이토카인인 interleukin (IL)-6, IL-1β, tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 발현이 증가된다 [10,11]. 그러므로 과도한 산화스트레스와 염증반응은 여러 질환의 발병에 관여하는 것으로 알려져 과도한 산화스트레스와 염증반응이 일어나지 않도록 적절한 대응이 질병을 예방할 수 있다 [12].

최근 소비자들이 건강에 대한 관심이 많아지면서 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있고, 만성 질환을 유발할 수 있는 염증반응 예방 및 완화에 도움을 줄 수 있는 안전성이 높은 과일, 채소와 같은 식물성 천연물을 이용한 건강기능식품의 소비가 증가하는 추세이다. 이러한 이유로 합성 의약품을 대용할 수 있는 천연소재 의약품의 중요성이 강조되고 있다. 그 예로 하고초, 송라, 황매화, 생강나무꽃, 올벚나무 잎, 대추씨 및 수국꽃 등과 같은 천연자원으로부터 항산화 및 항염 효능을 관찰한 연구가 발표되었으며 현재도 천연자원의 항산화 및 항염증효과에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 [13].

본 연구에서 사용하는 미선나무 (*Abeliophyllum distichum*, *A. distichum*)는 낙엽관목으로서 전 세계적으로 한국의 특정 지역에서만 재배되는 *Oleaceae* family 식물로 흰 개나리라고도 불린다 [14,15]. 현재 이 식물은 대한민국 부안군, 괴산군, 영동군에서 멸종위기 식물로 보호되었으며 괴산군이 주요 생산지이다 [16]. 최근 연구에 따르면 미선나무 잎 추출물 (*A. distichum* leaf extract)은 폐경 후 골다공증 완화효능, DNA손상 보호 효능, 항비만 효과 및 항암 효과가 보고되었다 [17-20]. 다양한 연구를 통해 미선나무 잎 추출물의 페놀 및 페닐에타노이드글리코시드 화합물의 특성을 조사한 결과 이 화합물들은 항간독성, 항 통각수용, 성기능향상, 항산화

및 항염증 등과 같은 약리학적 특성을 발휘하는 것으로 밝혀졌다 [18,21]. 또한 미선나무 잎 추출물에서 확인된 acteoside (phenylethanoid glycoside)와 isoacteoside (dihydroxyphenylethyl glycoside)는 각각 항산화 및 항염증 활성을 가지는 것으로 보고되었다 [14,22]. 그러나 미선나무 잎 추출물의 항산화 기전 및 항염증 기전에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 미선나무 잎 추출물의 항산화 기전 및 항염증 기전과 활성을 분석함으로써 천연소재의 항산화 및 항염증 조절 작용을 가진 기능성 소재로의 가능성을 알아보고자 연구를 수행하였다.

연구방법

추출물의 제조

본 연구에서 사용한 미선나무 잎 추출물은 한국프라임제약(주)에서 제공받았다. 33 kg의 건조된 미선나무 잎을 600 L의 70% 에탄올로 75°C에서 4시간 동안 추출하였다. 여과 및 농축시키고 동결건조하여 9.38 kg의 미선나무 잎 추출물을 얻었고 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다.

총 폴리페놀함량

시료의 총 폴리페놀 화합물 함량의 측정에는 Folin-Denis (1915)의 방법을 변형하여 측정하였다 [23]. 2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약과 증류수를 1:2로 섞은 혼합액 10 μ L와 시료 10 μ L를 동량으로 96-well plate에 넣어 암실에서 3분간 방치하고, 20% sodium carbonate (Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich Co.)를 150 μ L씩 넣어 주고 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Microplate Absorbance Spectrophotometer; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 작성한 표준검량곡선에 흡광도를 대입하여 총 폴리페놀 함량의 농도를 구하였다.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능 측정은 DPPH (Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 시료의 라디칼 소거능을 확인하는 Blois의 방법에 따라 측정하였다 [24]. 안정한 유리 라디칼 DPPH에 대한 시료와의 전자공여 효과로서 이 반응에 의해 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 측정하였다. 농도별 시료 10 μ L와 0.15 mM DPPH 용액 190 μ L를 넣어 교반하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Microplate Absorbance Spectrophotometer; Bio-Rad)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였으며, 전자공여능 (electron donating ability, EDA)은 $\text{EDA} (\%) = [1 - (\text{실험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도})] \times 100$ 을 이용하여 자유라디칼의 제거 활성을 백분율 (%)로 나타내었다.

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 라디칼 소거능

ABTS 라디칼 소거능 측정은 Nicoletta 등 [25]의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액 10 mL와 140 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Sigma-Aldrich Co.) 용액 176 μ L를 혼합하여 암실에서 12시간 이상 방치시켰다. 이 용액을 95% ethanol과 1:44 비율로 섞어 734 nm에서 대조군의 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 사이의 값이 되도록 ABTS solution 용액의 농도를 맞추어 사용하였다. 농도 별 시료 10 μ L

와 ABTS solution 200 μ L를 혼합하여 암실에서 2분 30초간 방치한 후 ELISA reader 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였으며, 전자공여능 (EDA)은 $EDA (\%) = [1 - (\text{실험군의 흡광도}/\text{대조군의 흡광도})] \times 100$ 을 이용하여 자유라디칼의 제거 활성을 백분율 (%)로 나타내었다.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay는 Benzie와 Strain의 방법으로 측정하였다 [26]. FRAP reagent는 sodium acetate buffer (pH 3.6, 300mM; Sigma-Aldrich Co.)와 10 mM 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (Sigma-Aldrich Co.), 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 각각 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 FRAP reagent를 제조하였다. 농도 별 시료 10 μ L와 증류수 30 μ L와 FRAP reagent 300 μ L를 섞어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질인 iron sulfate hexahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)의 검량곡선을 이용하여 FRAP value를 계산하였다.

세포 배양

본 연구에서는 마우스 대식세포인 RAW264.7을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator (BB15; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 실시하였다. 세포는 cell culture dish 90 \times 20 mm (SPL Life Science Co., Pocheon, Korea)에서 배양되었으며 세포의 density가 70–80%가 되었을 때 배지를 교환하였다.

세포 독성 평가 (water soluble tetrazolium salts [WST] assay)

A. distichum 잎 추출물이 RAW264.7 세포에 미치는 독성을 알아보기 위해 WST를 사용하여 cell viability를 측정하였다. 96-well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^4 cells/well의 농도로 100 μ L씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 추출물 (12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL)을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 EZ-Cytox WST assay reagent (Dogenbio Co., Ltd., Seoul, Korea)를 10 μ L씩 첨가한 후, 2시간, 3시간 뒤에 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 세포 생존율은 대조군의 세포 생존율 대비 %로 나타내었다.

Nitric oxide (NO) 생성량

RAW264.7 세포를 48-well plate (2×10^4 cells/well)에 500 μ L씩 분주하고 37°C, 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양 후 시료를 농도별로 처리하여 1시간 동안 배양한 다음 LPS (Sigma-Aldrich Co.)를 처리하여 24시간 배양하였다. NO 생성량을 측정하기 위하여 96-well plate에 100 μ L의 배양액과 griess reagent (Sigma-Aldrich Co.) 100 μ L를 혼합하여 15분간 반응시킨 후 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 nitrite를 사용하여 검량선을 작성하고 nitrite 생성량을 계산하였다.

Western blot analysis

Nrf2와 HO-1의 단백질 발현을 확인하기 위해 RAW264.7 세포를 6-well plate에 1×10^6 cell/mL로 배치하고 배양시킨 뒤, 추출물을 농도별로 처리하여 12시간 동안 배양시켰다. NF- κ B, iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 확인하기 위해서 앞서 설명한 것과 마찬가지로 RAW264.7 세포를

6-well plate에 1×10^6 cell/mL로 배치하고 배양시킨 뒤, 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 뒤에 LPS를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양시켰다. RIPA buffer를 첨가하여 단백질을 추출하였고, Bradford reagent (Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 단백질의 농도를 정량하였다. 단백질 전기영동을 통해 10–12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 뒤, 5% skim milk에서 blocking을 하였다. 1시간 후, primary antibody로 Nrf2 (Abcam, Cambridge, UK), HO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), iNOS (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen Rockford, IL, USA), COX-2, p-p65, p65 (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA), β -actin (Santa Cruz Biotechnology)을 1/1,000로 희석하여 4°C에서 overnight으로 반응시켜주고 Tris buffered saline Tween-20 (TBS-T)로 5분씩 3회 씻어주었다. 2차 항체는 anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology)와 anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 상온에서 1시간 반응시키고 TBS-T로 5분씩 3회 씻어주었다. 이후 membrane에 Ezwstlumi-plus (ATTO Co., Tokyo, Japan)를 입혀 ChemiDoc (LuminoGraph I; ATTO Co.)을 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다. 검출된 밴드의 정량 분석은 Image J intensity (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 통해 분석하였다.

ELISA

TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성량을 측정하기 위해 RAW264.7 세포 (24-well plate 5×10^4 cell/well)에 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 후, LPS를 첨가하여 24시간 배양하였다. 이후 세포 배양액을 회수하여 세포의 TNF- α , IL-1 β , IL-6의 생성량은 mouse ELISA kits (Cat No. DY008; BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 제시된 방법으로 처리하였으며 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도에서 측정하여 각 표준곡선을 바탕으로 생성량을 계산하였다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 mRNA 발현 정도를 측정하기 위해 6-well plate에 1×10^6 cell/mL로 분주하고 그 뒤에 추출물을 농도별로 처리하여 1시간 배양한 후, LPS를 첨가하여 24시간 배양하였다. Trizol 시약을 이용하여 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하였고 합성된 cDNA를 각 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 SYBR green qPCR mix (TOYOBO, Osaka, Japan)와 qRT-PCR (BioFACT, Daejeon, Korea)을 사용하였다. Real-time PCR의 조건은 pre-denaturation과정을 50°C에서 2분간, 95°C에서 15분간 수행하고, 95°C에서 20초, 60°C에서 40초간 증폭과정을 40 cycles로 수행하였다. 실험군과 대조군 모두 internal standard로 β -actin을 사용하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 이상 실시한 값을 측정하였고, 실험의 평균값을 구한 다음, 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 결과에 대한 통계분석은 SPSS ver.26.0 (Statistical Package for the Social Science; IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하였다. 유의성 분석은 independent t-test 및 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)으로 분석결과를 검증한 후 Duncan's multiple range test로 차이를 검증하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 확인하였다.

결과

미선나무 잎 추출물의 항산화 활성

미선나무 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정한 결과는 **Table 1**에서 보는 바와 같이 329.89 ± 30.17 GAE mg/g이었다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 미선나무 잎 추출물의 1 mg/mL 농도에서 55%의 소거 활성을 보였으며 IC_{50} 값은 0.526 ± 0.117 mg/mL로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 미선나무 잎 추출물의 1 mg/mL 농도에서는 70%의 소거 활성을 보였으며 C_{50} 값은 0.527 ± 0.130 mg/mL로 나타났다. FRAP value는 미선나무 잎 추출물의 1 mg/mL 농도에서 743.68 ± 116.59 mg/mL였다.

시료의 항산화 활성에 대한 연구 결과, 총 폴리페놀의 함량이 높은 것으로 확인되었고 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능에서는 항산화제로 잘 알려진 ascorbic acid 대비 각각 60.5%, 83%로 높은 소거능을 가지고 있는 것으로 나타났다.

미선나무 잎 추출물이 대식세포 생존율에 미치는 영향

본 연구에서는 미선나무 잎 추출물이 대식세포인 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 독성평가를 진행하였다. 미선나무 잎 추출물을 12.5–400 µg/mL의 농도로 24시간 배양하여 측정한 결과, 400 µg/mL 농도에서부터 세포 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (**Fig. 1**). 이 결과를 바탕으로 향후 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL 처리 농도에서 실험을 진행하였다.

미선나무 잎 추출물의 항산화 효소 HO-1 및 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

미선나무 잎 추출물의 처리가 Nrf2, HO-1 발현수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물을 12시간 처리한 결과, Nrf2는 미선나무 잎 추출물의 농도가 증가할수록 발현이 증가하는 경향을 보였지만 유의적이지 않았으나 HO-1의 발현은 농도 의존적으로 증가되었다 (**Fig. 2**).

미선나무 잎 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

미선나무 잎 추출물의 항염 효능을 확인하기 위하여 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에서 NO 생성량을 측정하였다 (**Fig. 3**). 그 결과, NO 생성량이 미선나무 잎 추출물의 농도 100, 200 µg/mL에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.

미선나무 잎 추출물이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향

RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물을 처리한 후 염증성 사이토카인의 생성을 측정한 결과 TNF-α의 생성량은 미선나무 잎 추출물 농도에 의존적으로 감소하여 100 µg/mL 농도에서부

Table 1. Antioxidant capacities of ADE

ADE (mg/mL)	Total polyphenol contents GAE (mg/mL)	FRAP value (mg ISHE/mL)	IC_{50} (mg/mL) ³⁾			
			DPPH		ABTS	
			ADE	Ascorbic acid	ADE	Ascorbic acid
1.000	329.900 ± 30.180	743.680 ± 116.590	0.526 ± 0.117	0.167 ± 0.057	0.527 ± 0.131	0.101 ± 0.026

Results are mean ± standard deviation (n = 3–5).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; GAE, gallic acid equivalents; ISHE, iron sulfate hexahydrate; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2-azino-bis-3-ethylen-benzothiazoline-6-sulfonate.

³⁾The concentration in mg/mL required for 50% reduction of DPPH and ABTS radical.

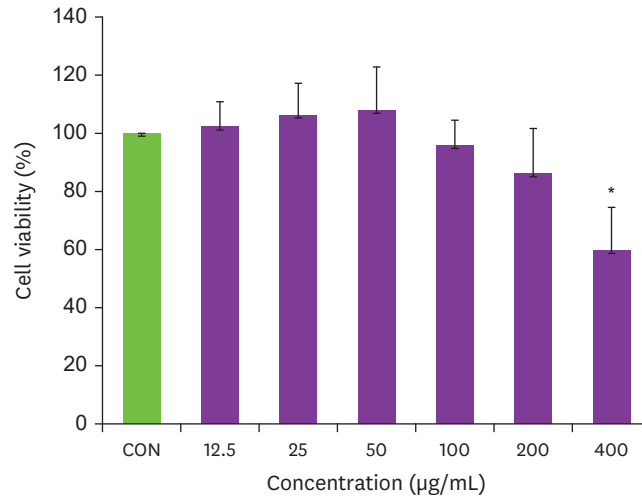


Fig. 1. Effect of *Abeliophyllum distichum* leaf extracts on RAW264.7 cells viability.

RAW264.7 cells were pretreated for 1 hour with various concentration of *A. distichum* leaf extract before lipopolysaccharide (100 ng/mL) treated. Values are expressed as mean ± standard deviation.

CON, control.

*p < 0.05 compared to CON.

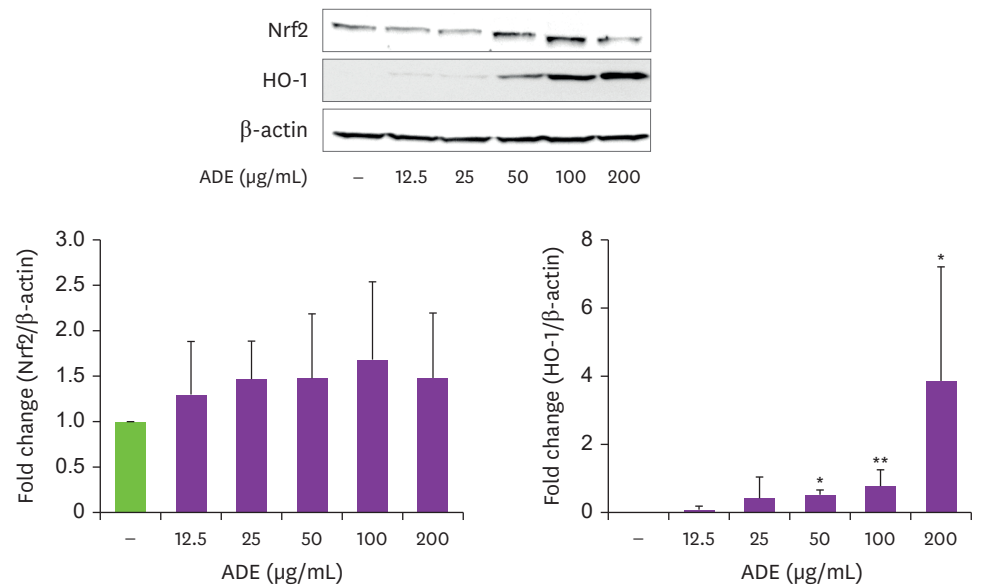


Fig. 2. Effect of ADEs on the expression levels of Nrf2 and HO-1 in RAW264.7 cells.

Protein expression was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control. Results are mean ± standard deviation (n = 3-5).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; Nrf2, nuclear transcription factor-erythroid 2 related factor; HO-1, heme oxygenase-1.

*p < 0.05, **p < 0.01 compared to control.

터 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 4A). IL-1β와 IL-6의 생성 또한 미선나무 잎 추출물을 처리하였을 때 50 µg/mL 농도에서부터 유의적인 감소를 보였다 (Fig. 4B and C).

미선나무 잎 추출물이 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향

LPS 처리로 증가한 TNF-α, IL-1β, IL-6 mRNA 발현은 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig. 5). 특히 TNF-α와 IL-6는 각각 50 µg/mL과 100 µg/mL 농도에서

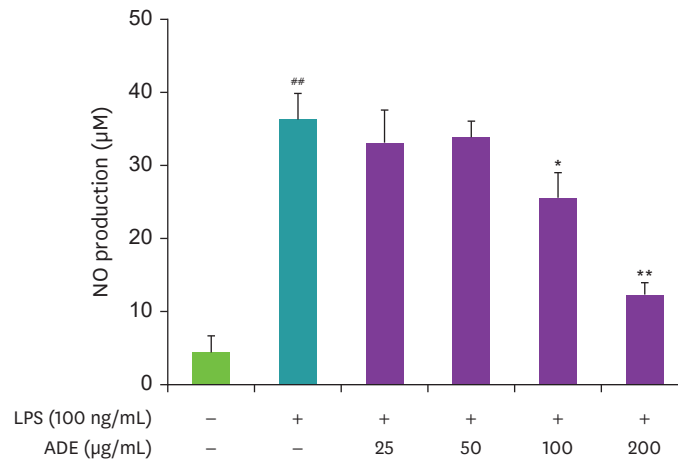


Fig. 3. Effect of ADEs on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

The production of NO was assayed in the culture media of cells pretreated with ADE (25, 50, 100, 200 µg/mL) or DMSO for 1 hour and then stimulated with LPS (100 ng/mL) for 24 hours. Results are mean ± standard deviation of 4 replicate determinations (n = 4).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide.

*p < 0.05, **p < 0.01 compared to LPS.

**p < 0.01 compared to control.

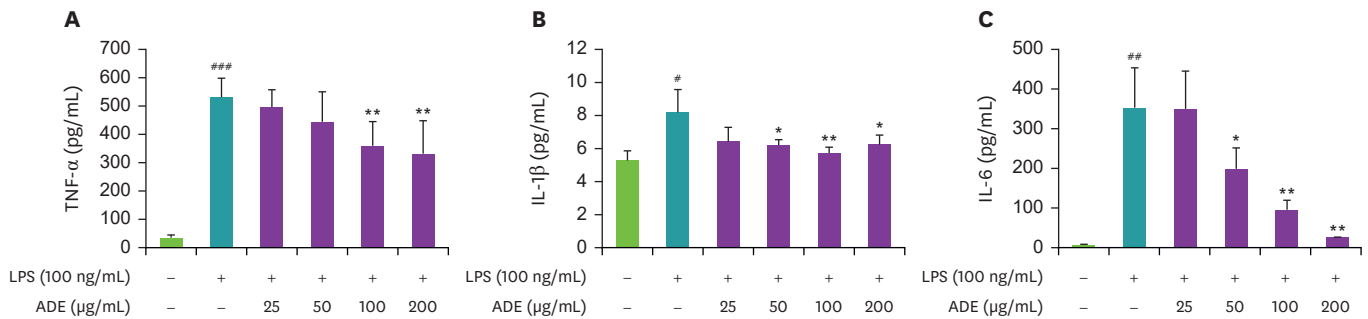


Fig. 4. Effect of ADEs on TNF-α (A), IL-1β (B) and IL-6 (C) production in RAW264.7 cells.

Cells were pretreated with ADE (25, 50, 100, 200 µg/mL) or DMSO for 1 hour and then stimulation with LPS (100 ng/mL) for 24 hours. The levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 production were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits. The data are presented as means ± standard deviation (n = 4).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; LPS, lipopolysaccharide; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

*p < 0.05, **p < 0.01 compared to LPS.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to control.

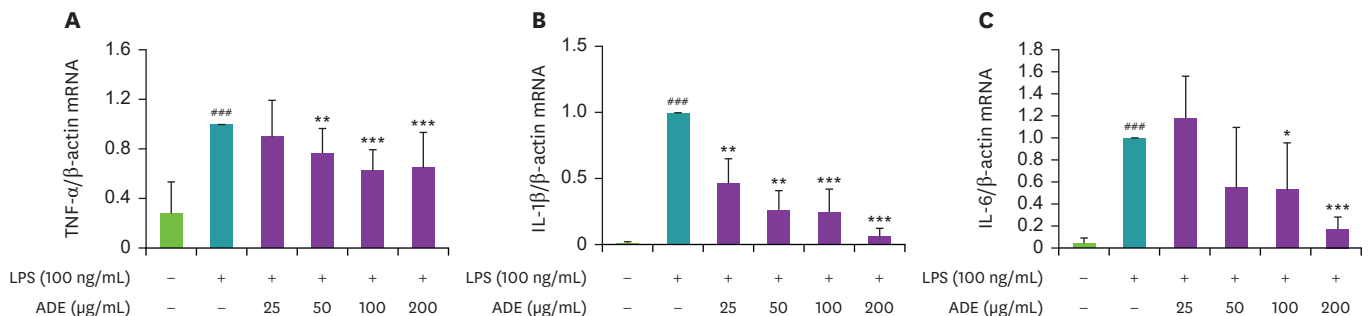


Fig. 5. Effect of ADEs on LPS-induced mRNA expression levels of TNF-α (A), IL-1β (B), IL-6 (C) in RAW264.7 cells.

Cells were pretreated with ADE (25, 50, 100, 200 µg/mL) or DMSO for 1 hour and then stimulation with LPS (100 ng/mL) for 24 hours. The mRNA levels of TNF-α, IL-1β and IL-6 were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. The data are presented as means ± standard deviation (n = 8).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; LPS, lipopolysaccharide; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor.

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to LPS.

***p < 0.001 compared to control.

부터 유의적인 감소를 보였고 IL-1β의 경우 25 μg/mL 농도에서부터 유의적인 감소를 나타내었다.

미선나무 잎 추출물이 NF-κB 및 iNOS와 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

대표적 염증신호 체계 단백질인 NF-κB의 활성화 및 NO 생성에 관여하는 iNOS와 함께 COX-2의 발현을 측정하기 위하여 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 미선나무 잎 추출물을 처리하였다. 그 결과, p65 단백질의 인산화 수준은 50 μg/mL 농도에서부터 p-p65의 발현이 유의하게 감소하였다 (Fig. 6). iNOS의 발현은 25 μg/mL 농도에서부터, COX-2의 발현은 100 μg/mL 농도에서부터 유의성 있게 감소하였다.

고찰

현재까지 미선나무 잎 추출물의 기능성에 대해 보고된 바에 따르면 Kim 등 [17]의 연구에서는 RAW264.7 세포에서 receptor activator of NF-κB ligand로 유도된 파골세포 분화 모델에서 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때 mitogen-activated protein kinase 및 파골세포의 분화에 필수적인 전사인자인 c-fos/NF of activated T cells c1경로를 억제하여 파골세포 효소 마커인 tartrate-resistant acid phosphatase 활성 억제, 액틴 고리 형성 저해, 그리고 파골세포 관련 유전자의 발현 억제를 통해 골다공증 완화효능이 있음을 보고하였다. Jang 등 [18]의 연구에서는 NIH3T3 세포를 이용하여 DNA 손상 지표자인 인산화된 p53와 DNA 손상 형태 중 이중나선손상 표지자인 인산화 된 γ-H2AX의 수준을 감소시켰으므로 미선나무가 DNA

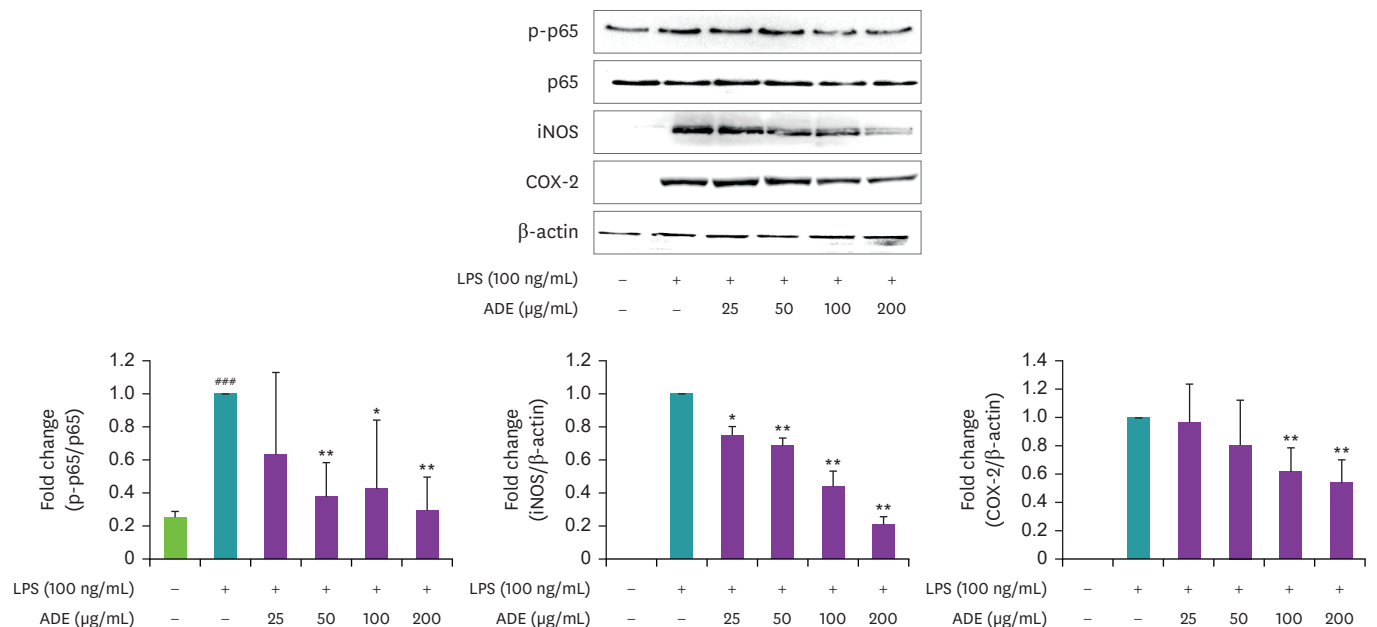


Fig. 6. Inhibitory effect of ADEs on protein levels of p-p65, iNOS, COX-2 in RAW264.7 cells.

RAW264.7 cells were pretreated with ADE (25, 50, 100, 200 μg/mL) or DMSO 1 hour and then stimulated with LPS (100 ng/mL) for 24 hours. The results presented as mean ± standard deviation of experiments (n = 3-5).

ADE, *Abeliophyllum distichum* leaf extract; iNOS, inducible nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase 2; LPS, lipopolysaccharide.

*p < 0.05, **p < 0.01 compared to LPS.

***p < 0.001 compared to control.

손상보호 효능이 있음을 보고하였다. 또한 Park 등 [20]의 연구에서는 꽃, 잎, 가지를 포함한 미선나무의 에틸아세테이트 분획물이 대장암 세포 (HCT116, SW480 및 LoVo), 유방암 세포 (MCF-7 및 MDA-MB-231), 간세포암종 (HepG-2)의 activating transcription factor 3 발현 증가를 통해 항암효과가 있는 것으로 보고되었다. 본 연구실에서도 고지방식이로 유도된 비만 쥐 모델에 미선나무 잎 추출물을 투여하였을 때 AMP-activated protein kinase 경로를 활성화시켜 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고 지방산의 산화를 촉진하여 항 비만 효과가 있음을 보고하였다 [19]. 이에 본 연구에서는 RAW264.7 cell을 이용하여 우리나라 고유종인 미선나무 잎 추출물의 항산화 활성 및 항염의 효능과 각각의 그 기전을 확인하고자 하였다.

항산화 방어체계는 활성산소에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는데 항산화 방어체계가 잘 작동하지 않을 경우 노화가 가속화되고 DNA 산화적 손상 및 효소 활성을 변화시켜 뇌 질환, 성인병, 암, 신장염 및 당뇨병 등의 각종 질병이 발생하는 위험도가 증가하게 된다. 따라서 항산화 방어체계를 적절히 보존하고 강화시키는 것이 건강을 유지하는데 중요한 것으로 알려져 있다 [27].

식물계에 널리 분포하는 대표적인 천연 항산화 물질에는 폴리페놀 화합물, 플라보노이드, 카로티노이드 및 토코페롤 등이 있으며, 그 중 총 폴리페놀 함량은 식품의 항산화 능력을 결정짓는데 중요한 요소로 사용되는 것으로 보고되었다 [28]. 본 연구에서 미선나무 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량이 329.89 ± 30.17 mg GAE/g임을 확인하였다. 이어서 페놀화합물의 항산화 활성 지표가 되는 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였는데 자유 라디칼 환원 능력이 클수록 항산화 활성 및 활성산소에 대한 소거 활성을 기대할 수 있다 [29]. FRAP 역시 전자공여 능력을 통해 산화 활성을 측정하는 방법으로 Fe^{3+} 와 항산화제와의 반응을 통해 생성된 Fe^{2+} 를 흡광도를 통해 정량하는 방법으로 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법이다 [30]. 미선나무 잎 추출물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 비교한 결과 양성대조군 ascorbic acid 대비 각각 60.5%, 83.6%로 나타났으며 FRAP value는 743.68 ± 116.59 mg/mL로 측정되었다.

Nrf2는 phase II 효소의 활성을 조절하는 전사인자이며 HO-1은 스트레스로 유발된 반응성 단백질로서 heme 산화를 촉매하여 일산화탄소, 철, biliverdin을 형성한다 [31]. 평소 Nrf2는 kelch-like ECH associated protein (keap) 1과 복합체를 이루며 낮은 수준으로 존재하나 자외선, LPS와 같은 외부 자극 및 산화스트레스를 받으면 keap1과 분리되고 Nrf2는 핵으로 이동하여 항산화와 연관된 유전자의 전사를 촉진하며 대표적으로 HO-1의 발현을 유도한다 [32,33]. 즉, Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 증가시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체 방어기전의 핵심적인 역할을 한다 [34,35]. 위의 내용을 바탕으로 본 연구에서 미선나무 잎 추출물이 Nrf2 및 HO-1의 발현에 미치는 영향을 western blot을 통해 확인한 결과, HO-1 단백질은 미선나무 잎 추출물 농도 의존적으로 증가하였고 상위 전사인자인 Nrf2 단백질은 유의하지 않았으나 발현이 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과를 종합해보면 RAW264.7 세포에서 미선나무 잎은 Nrf2/HO-1 발현 증가 기전을 통해 산화적 스트레스로부터 항산화 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

NF- κ B 신호전달체계는 생체 내 주요한 반응들을 수행하는데 특히 염증성 사이토카인을 생성하여 염증반응을 조절하는 기능이 대표적이다 [36,37]. 염증 조절에 중요한 신호전달 체계

중 하나인 NF- κ B는 세포질에 heterodimer 상태인 p50과 p65 단백질, 그리고 inhibitory kappa B (I κ B)와 복합체를 이루고 있으며 LPS 및 ROS에 의해 TLR-4 수용체를 통해 활성화된다. 즉, I κ B kinase에 의해 I κ B가 인산화되어 복합체가 분리되고 인산화 된 p65 (p-p65)가 세포질에서 핵으로 이동하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6와 같은 사이토카인 및 NO나 prostaglandin의 생성에 영향을 주는 iNOS, COX-2와 같은 단백질 발현을 조절한다 [38]. 따라서 p65의 인산화 저해는 NF- κ B 활성 조절 및 억제와 관련이 있다. Lee와 Kang [15]의 연구에서는 RAW264.7 세포에 미선나무 꽃 추출물을 처리한 결과, 추출물이 P38, ERK, JNK의 인산화를 감소시켜 MAPK의 활성을 억제하며 p65의 인산화 감소로 인해 NF- κ B 활성을 억제시키는 것을 통해 항염 효능을 나타내는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 마찬가지로 LPS와 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때 NF- κ B의 p-p65 발현량이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 이는 미선나무 잎 추출물 처리에 의해 NF- κ B의 활성이 억제되고 따라서 염증성 매개물의 발현량을 감소시켜 항염 효능을 갖고 있는 것으로 사료된다. iNOS의 발현은 세균성 독소, 면역반응 및 염증반응, 산화성 스트레스, 허혈 및 조직손상 등에 따라 유리되는 다양한 사이토카인에 의해서 유전자 전사 단계에서 유도되며 COX-2의 발현은 다양한 사이토카인에 의해 유도되는 유도성 효소로서 비정상적으로 증가하게 되면 세포 증식을 활성화하고 세포사멸을 억제하며 세포의 유동성 또 부착성을 강화시킴으로써 다양한 염증성 질병의 발병과 진행에 중요한 작용을 한다 [39,40]. 따라서 iNOS와 COX-2의 발현을 항염증 효능을 평가하는 지표로 많이 이용되고 있다. 본 연구에서도 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때, iNOS와 COX-2의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. Yoo 등 [12]의 연구에서는 LPS로 염증이 유도된 RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때 NO생성이 저해되었고 western blot을 통해 MEK-ERK1/2 활성 억제 및 iNOS 발현 감소를 확인하였으며, PCR을 통해 IL-6와 COX-2의 염증 유전자 발현 수준이 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 마찬가지로 LPS로 유도된 염증상태의 RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물을 처리했을 때 NO의 생성이 저해되는 것을 확인하였고 Yoo 등 [12]의 연구에서 진행된 IL-6 염증 유전자뿐만 아니라 IL-1 β 및 TNF- α 의 염증 유전자의 발현도 농도 50 μ g/mL에서부터 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 더 나아가 이들 염증성 사이토카인의 생성도 모두 유의하게 감소하였다. 따라서 본 연구는 미선나무 잎 추출물이 가지는 항산화능 및 항염 효능과 더불어 그에 대한 기전적인 연구를 통해 미선나무 잎 추출물이 산화적 스트레스 및 염증성 질환 예방을 위한 기능성 소재로서의 가능성을 제시하였다.

요약

본 연구에서는 잠재적인 기능성 소재로의 개발 가능성을 검증하기 위하여 미선나무 잎 추출물의 항산화능과 항염증 효능을 확인하였다. 시료의 총 폴리페놀함량, DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능, FRAP value를 측정하여 미선나무 잎 추출물의 항산화 활성을 확인하였으며 또한 RAW264.7 세포에 미선나무 잎 추출물 처리 후 HO-1의 발현이 증가하는 것을 통해 미선나무 잎 추출물의 항산화 기전을 확인하였다. 한편, LPS로 유도된 염증 상태의 RAW264.7 세포에서 미선나무 잎 추출물은 NF- κ B 활성 억제를 통한 NO 생성 억제, iNOS, COX-2 발현 억제 및 염증성 사이토카인의 발현과 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 본 연구 결과는 향후 미선나무 잎 추출물의 기능성 소재로의 개발을 위한 기초자료 마련에 그 의의가 있다.

REFERENCES

1. Kim TH, Ko SC, Oh GW, Park HH, Lee DS, Yim MJ, et al. Studies on bioactive substances and antioxidant activities of marine algae from Jeju Island. *J Mar Biosci Biotechnol* 2016; 8(1): 30-38.
[CROSSREF](#)
2. Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS, Cho SH. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) sap. *Korean J Food Preserv* 2008; 15(1): 105-110.
3. Shin YO, Lee JB, Kim JK. The effect of different oxygen content and vitamin C & E supplementation during underwater exercise on blood reactive oxygen radical and antioxidant capacity. *Korean J Exerc Nutr* 2010; 14(3): 137-143.
4. Jang SS, Park MH, Kim M. Analysis of the effective components and antioxidant activity of Korean black currant (*Ribes nigrum* L.) extracts. *J East Asian Soc Diet Life* 2021; 31(2): 114-122.
[CROSSREF](#)
5. Yu Y, Fan J, Hui Y, Rouzer CA, Marnett LJ, Klein-Szanto AJ, et al. Targeted cyclooxygenase gene (ptgs) exchange reveals discriminant isoform functionality. *J Biol Chem* 2007; 282(2): 1498-1506.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Jeon SH, Oh SL, Kim SJ, Jeon BH, Sung JY, Kim YM. Anti-oxidative effect of chungsimyeonja-um (CSYJE) via Nrf2/HO-1 pathway activity in lipopolysaccharide (LPS) induced RAW 264.7 macrophages. *J Soc Cosmet Sci Korea* 2020; 46(3): 253-263.
7. Jeong HR, Kim Y, Ham H, Choi Y, Lee J. Anti-inflammatory activity of *Salvia plebeia* R. Br. leaf through hemoxygnase-1 induction in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2012; 41(7): 888-894.
[CROSSREF](#)
8. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003; 24(1): 25-29.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
9. Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(9): 1102-1113.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, et al. Spinal NF-κB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci* 2004; 19(12): 3375-3381.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
11. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J Plant Resour* 2012; 25(3): 299-307.
[CROSSREF](#)
12. Yoo TK, Jeong WT, Kim JG, Ji HS, Ahn MA, Chung JW, et al. UPLC-ESI-Q-TOF-MS-based metabolite profiling, antioxidant and anti-inflammatory properties of different organ extracts of *Abeliophyllum distichum*. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(1): 70.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
13. Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36(9): 1113-1119.
[CROSSREF](#)
14. Choi JH, Seo EJ, Sung J, Choi KM, Kim H, Kim JS, et al. Polyphenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* Nakai extract. *J Appl Bot Food Qual* 2017; 90: 266-273.
[CROSSREF](#)
15. Lee JW, Kang YJ. Anti-inflammatory effects of *Abeliophyllum distichum* flower extract and associated MAPKs and NF-κB pathway in raw264. 7 cells. *Korean J Plant Resour* 2018; 31(3): 202-210.
16. Kang U, Chang CS, Kim YS. Genetic structure and conservation considerations of rare endemic *Abeliophyllum distichum* Nakai (Oleaceae) in Korea. *J Plant Res* 2000; 113(2): 127-138.
[CROSSREF](#)
17. Kim EY, Kim JH, Kim M, Park JH, Sohn Y, Jung HS. *Abeliophyllum distichum* Nakai alleviates postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats and prevents RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro. *J Ethnopharmacol* 2020; 257: 112828.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
18. Jang TW, Choi JS, Park JH. Protective and inhibitory effects of acteoside from *Abeliophyllum distichum* Nakai against oxidative DNA damage. *Mol Med Rep* 2020; 22(3): 2076-2084.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

19. Eom J, Thomas SS, Sung NY, Kim DS, Cha YS, Kim KA. *Abeliophyllum distichum* ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice by upregulating the AMPK pathway. *Nutrients* 2020; 12(11): 3320.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Park GH, Park JH, Eo HJ, Song HM, Woo SH, Kim MK, et al. The induction of activating transcription factor 3 (ATF3) contributes to anti-cancer activity of *Abeliophyllum distichum* Nakai in human colorectal cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14(1): 487.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Oh H, Kang DG, Kwon TO, Jang KK, Chai KY, Yun YG, et al. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. *Phytother Res* 2003; 17(7): 811-813.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
22. Yoo TK, Kim JS, Hyun TK. Polyphenolic composition and anti-melanoma activity of white forsythia (*Abeliophyllum distichum* Nakai) organ extracts. *Plants (Basel)* 2020; 9(6): 757.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
23. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* 1912; 12(2): 239-243.
[CROSSREF](#)
24. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181(4617): 1199-1200.
[CROSSREF](#)
25. Nicoletta P. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol* 1999; 299: 379-389.
[CROSSREF](#)
26. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, et al. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol* 2007; 54(1): 11-26.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
28. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009; 53(2): 75-100.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Park HJ, Kang S, Lee JY, Cho YJ. Antioxidant activities of extracts from medicinal plants. *Korean J Food Preserv* 2012; 19(5): 744-750.
[CROSSREF](#)
30. Kim YS, Lee SJ, Hwang JW, Kim EH, Park PJ, Jeong JH. Antioxidant activities of extracts from *Ligustrum ovalifolium* H. leaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2011; 40(12): 1642-1647.
[CROSSREF](#)
31. Roach JP, Moore EE, Partrick DA, Damle SS, Silliman CC, McIntyre RC Jr, et al. Heme oxygenase-1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion. *Shock* 2009; 31(3): 251-257.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(9): 1304-1309.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
33. Xu X, Li H, Hou X, Li D, He S, Wan C, et al. Punicalagin induces Nrf2/HO-1 expression via upregulation of PI3K/AKT pathway and inhibits LPS-induced oxidative stress in RAW264.7 macrophages. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 380218.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003; 371(Pt 3): 887-895.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
35. Johnson JA, Johnson DA, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, et al. The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1147(1): 61-69.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Lee MS, Kim KA. NF- κ B pathway in metabolic/endocrine diseases. *J Korean Endocr Soc* 2006; 21(5): 352-363.
[CROSSREF](#)
37. Park JH, Lee SR. Anti-inflammatory activities of *Scolopendra subspinipes mutilans* in RAW 264.7 cells. *J Nutr Health* 2018; 51(4): 323-329.
[CROSSREF](#)

38. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107(2): 135-142.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
39. Kim SH, Kang MY, Nam SH. Modulatory effects of 21 kinds of medicinal herbs including Herba Pogostemi (*Agastache rugosa*) on nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7 cells. *J Appl Biol Chem* 2005; 48(4): 411-417.
40. Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 2000; 60(18): 5040-5044.
[PUBMED](#)