

RAW264.7 세포에서 *Cymbopogon Citratus* 에탄올 추출물의 HO-1 유도를 통한 항산화 효과

박충무^{1,3} · 윤현서^{2†,3}

¹동의대학교 임상병리학과 교수, ^{2†}동의대학교 치위생학과 교수, ³동의대학교 기능성소재연구소

Anti-Oxidative Effects of *Cymbopogon Citratus* Ethanol Extract through the Induction of HO-1 Expression in RAW 264.7 Cells

Chung-Mu Park, Ph.D.^{1,3} · Hyun-Seo Yoon, Ph.D.^{2†,3}

¹Dept. of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui University, Professor

^{2†}Dept. of Dental Hygiene, Dong-Eui University, Professor

³The Research Institute for Functional Health Materials, Dong-Eui University

Abstract

Purpose : *Cymbopogon citratus*, also known as lemongrass, has widely spread around the world and its essential oil is usually applied in food, perfume, and other industrial purposes. In addition, *C. citratus* has also been used for the treatment of inflammation, digestive disorders, and diabetes in traditional medicine. In this study, the antioxidative activity of *C. citratus* ethanol extract (CCEE) was analyzed in RAW 264.7 cells through the induction of one of phase II enzymes, heme oxygenase (HO)-1 by nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor (Nrf)2, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt.

Methods : The antioxidative activity of CCEE against oxidative stress and its underlying molecular mechanisms were analyzed by the cell viability assay, intracellular reactive oxygen species (ROS) formation assay, and Western blot analysis in RAW 264.7 cells.

Results : The results exhibited that CCEE potently attenuated tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced intracellular ROS levels in a dose-dependent manner without any cytotoxicity. CCEE treatment significantly induced the expression of HO-1 which is known for its antioxidative capacity. In addition, CCEE treatment significantly upregulated the expression of Nrf2, a corresponding transcription factor for the regulation of antioxidative enzymes, which was in accordance with the HO-1 overexpression. MAPK and PI3K/Akt were also evaluated for their important roles in the regulation of cellular redox homeostasis against oxidative damage. As a result, the potent HO-1 expression was mediated by not extracellular regulated kinase (ERK), c-Jun NH2 terminal kinase (JNK), p38, but phosphoinositide 3-kinase (PI3K) phosphorylation. To confirm the antioxidative activity of CCEE-induced HO-1 expression, oxidative damage was initiated by t-BHP and attenuated by CCEE treatment, which was identified by HO-1 selective inhibitor and inducer.

Conclusion : Consequently, CCEE potently induced the HO-1-mediated antioxidative potential through the modulation of Nrf2 and PI3K/Akt signaling pathways in RAW 264.7 cells. These results suggest that CCEE could be a promising strategy for the mitigation against cellular oxidative damage. 7)

Key Words : *cymbopogon citratus* ethanol extract, heme oxygenase-1, mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor2, phosphoinositide 3-kinase

†교신저자 : 윤현서, yoonhs@deu.ac.kr

제출일 : 2023년 10월 8일 | 수정일 : 2023년 11월 1일 | 게재승인일 : 2023년 11월 10일

I. 서론

1. 연구의 배경 및 필요성

신체 내에서 과도하게 생성된 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 세포 내 여러 구성요소를 손상시킴으로써 암, 노화, 죽상동맥경화증 등 다양한 질병 발생의 원인을 제공한다(Sies, 1997). 이러한 산화 스트레스의 발생에 대처하기 위한 세포는 다양한 제2상 효소의 유도를 통해 활성산소종의 생성을 제거하는 항산화 메커니즘을 가지고 있다(Ma, 2013). 이 중 heme oxygenase(HO)-1은 산화 스트레스로부터 세포내 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 효소로서 전사인자인 nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor (Nrf)-2에 의해 조절된다(Keum, 2012; Yoo 등, 2017). Nrf2는 항산화물질에 노출되거나 산화 스트레스에 의해 활성화되고, 활성화된 전사인자는 핵으로 이동하여 promoter region인 antioxidative response element(ARE)와 결합함으로써 제2상 효소중 하나인HO-1의 발현을 유도한다. 특히 항산화 전사인자인 Nrf2는 mitogen activated protein kinase (MAPK)와 phosphoinositide 3-kinase (PI3K)와 같은 상위 신호 전달물질에 의해 활성화된다(Farombi & Surh, 2006). MAPK는 대표적으로 extracellular regulated kinase (ERK), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p38 MAPK(Johnson & Lapadat, 2002)로 구성되고, 항산화 물질에 노출되거나 산화 스트레스를 받으면 활성화된 신호전달물질에 의해 Nrf2가 활성화됨으로써 항산화 기전이 작동된다(Yu 등, 2000). 따라서 Nrf2는 세포의 항산화 효과를 나타내는 제2상 효소 중 하나인 HO-1의 발현 유도에 중요한 역할을 하고, 이 전사인자의 활성화에는 MAPK와 PI3K가 작용을 한다(Johnson & Lapadat, 2002)

현재까지 활성산소종을 소거할 수 있는 다양한 천연 물질이 확인되었고(Kim, 2020; Kwon 등, 2019), 이들은 신체 내 산화스트레스에 의해 발생할 수 있는 다양한 질환의 진행을 약화시킬 수 있는 치료제로서의 가능성을 인정받고 있다(Kim, 2020). 그 중 레몬그라스 잎에는 폴리페놀 분획물인 flavonoid, myrcin, quercetin, rutin, selenium 등이 풍부하게 함유된 되어 있다(Lee & Lim, 2016). 또한 hydrogen peroxide, hydroxyradicals, nitrogen

dioxide 등을 소거할 수 있고 또한 세포 내 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase, peroxidase 및 vitamin E, vitamin C의 상태를 개선함으로써 항산화 효과를 보이는 것으로 보고된다(Francisco 등, 2014). 레몬그라스 잎에 대한 생리 활성은 항균, 항염증 효과, 항산화 등 다양한 활성이 보고되었으나 세포 내 제2상 효소인 HO-1의 유도에 의한 항산화 활성에 대한 여러 보고는 이루어지지 않아 본 연구에서는 RAW 264.7 세포에서 산화 스트레스 손상에 대한 CCEE의 항산화 활성과 그 분자 기전을 분석하고자 하였다.

2. 연구의 목적

본 연구에서는 레몬그라스 에탄올 추출물(C. Citrus ethanol extract; CCEE)의 항산화 활성을 RAW 264.7 세포에서 제2상 효소 중 하나인 HO-1의 발현 유도를 통해 분석하고, 관련된 전사인자인 Nrf2와 그 상위 신호전달물질인 MAPK, PI3K/Akt의 활성 유도를 통해 확인하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 세포배양 및 시약

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(No. 40017, KCLB, Korea)에서 분양받아 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Cytiva)에 영양성분인 10 % fetal bovine serum(FBS, Cytiva, USA)와 항생제인 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Cytiva)을 첨가하여 배양하였다. CCEE는 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 사용하였고, 1차 항체인 HO-1, Nrf2, phospho-ERK, ERK, phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38, phospho-Akt, Akt, actin과 horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-rabbit IgG 항체는 Cell signaling technology(USA)에서 구입하여 분석에 활용하였다.

2. 세포독성 분석

CCEE의 RAW 264.7 세포에 대한 독성은 EZ-Cytox

cell viability assay kit(Daeil Lab., Service, Korea)을 이용하여 분석하였다. 파종된 RAW 264.7 세포에 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 CCEE를 처리한 후 24시간 동안 배양하고 각 well에 시약 10 μl 를 넣은 후 1시간 동안 배양하였을 때 생성되는 formazan의 농도를 480 nm의 파장에서 측정하였다(BioTek Instruments Inc., USA).

3. 세포 내 활성산소종 분석

CCEE의 ROS의 소거능 분석을 위하여 파종된 RAW 264.7 세포에 50 μM 의 DCFH-DA를 첨가하여 2시간 동안 염색하고 다양한 농도의 시료를 2시간 동안 처리하였다. 그리고 세포내 활성산소종의 생성을 위하여 30분 동안 100 μM 의 t-BHP에 노출하였다(Park, 2018). ROS 소거능은 각각 485 nm와 530 nm의 excitation과 emission 파장에서 분석(Bio-Tek Instruments Inc.)하였다.

4. Western blot analysis

CCEE의 처리에 의한 항산화 효과를 분석하기 위하여 파종된 RAW 264.7 세포에 시료를 농도별로 처리하고 20시간 동안 배양하여 HO-1의 발현을, 4시간 동안 배양한 세포에서는 전사인자와 상위신호전달물질의 발현을 Western blot으로 분석하였다. Protein extraction buffer(PRO-PREP, Intron Biotechnology, Korea)를 이용하여 단백질을 추출하고 시료의 농도는 Bradford법으로 측정하였다. 시료는 4x Laemli sample buffer(Bio-Rad Laboratories, USA)와 혼합한 후 10 % SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하고 polyvinylidene fluoride(PVDF, Bio-Rad Laboratories) membrane에 blotting 후 5 % non-fat dry milk(Bio-Rad Laboratories)로 실온에서 1시간 동안 블로킹을 진행하였다. 그리고 각각의 비율로 희석된 1차 항체로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 보합반응을 한 후 실온에서 2시간동안 2차 항체와 반응을 진행한 후 enhanced chemiluminescence solution(ECL, Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하여 ChemiDoc XRS+ system(Bio-Rad Laboratories)에서 단백질 발현을 분석하고, Gel Doc EQ system(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 정량분석을 하였다.

5. 통계적 방법

모든 실험 결과는 3회 반복하여 시행하고 SPSS 프로그램(version 26.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)를 알아보고 실험군 간의 유의수준을 검증하기 위해 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검증은 Duncan's test를 이용하였다.

III. 결 과

1. CCEE의 HO-1 발현 유도 효과

CCEE의 세포 내 항산화 활성을 확인하기 위해 radical scavenging assay를 실시한 결과 Fig 1에서 보는 것과 같이 CCEE가 RAW 264.7 세포에서 농도 의존적으로 ROS 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 그리고 CCEE가 제2상 효소 중 하나인 HO-1의 발현유도에 미치는 효과를 확인한 결과 Fig 2와 같이 CCEE는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 동안 처리하였을 때 가장 강하게 HO-1을 유도하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 CCEE는 다양한 농도에서 24시간 처리하였을 때에도 Fig 3에서 보는 것과 같이 세포독성은 유발하지 않는 것으로 나타났다.

2. CCEE의 Nrf2, MAPK 및 PI3K/Akt 인산화 조절 효과

제2상 효소의 전사인자인 Nrf2는 RAW 264.7 세포에서 항산화 물질에 노출되었을 때 HO-1의 과발현을 매개하는 것으로 알려져 있다. 세포질 내에서 비활성형으로 존재하는 이 전사인자는 항산화 물질에 의해 활성화되고, 활성화된 Nrf2는 핵막을 통과하여 제2상 효소의 전사를 조절하는 promoter region인 ARE에 결합함으로써 이들의 전사를 유도한다(Surh, 2003). Fig 4에서 보는 것과 같이 CCEE의 처리에 의해 Nrf2는 유의적으로 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그리고 Nrf2의 활성을 조절하는 것으로 알려진 상위 신호전달 물질인 MAPK와 PI3K/Akt의 활성화도 또한 Western blot으로 분석한 결과 Fig 5에서 보는 것과 같이 CCEE는 Akt의 인산화를 유의적으로 유도하고, ERK, JNK, p38의 인산화에는 큰 영향

을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 통해 CCEE는 PI3K/Akt의 인산화를 유도함으로써 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다.

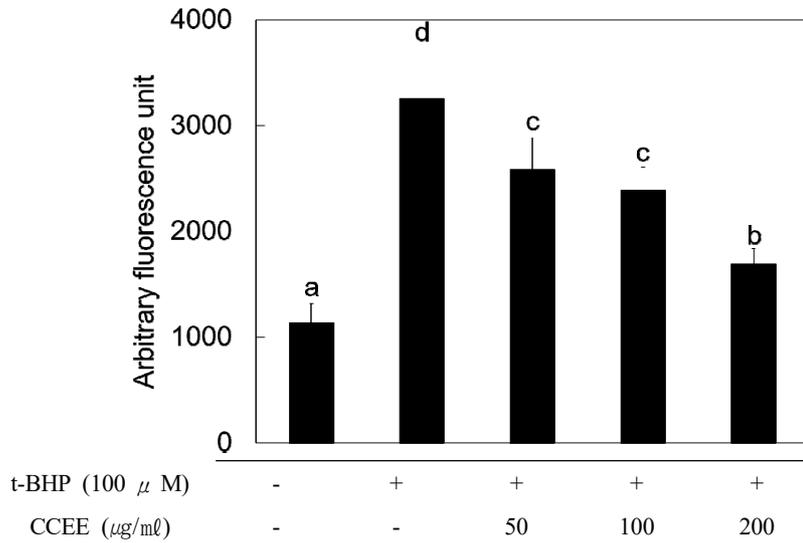
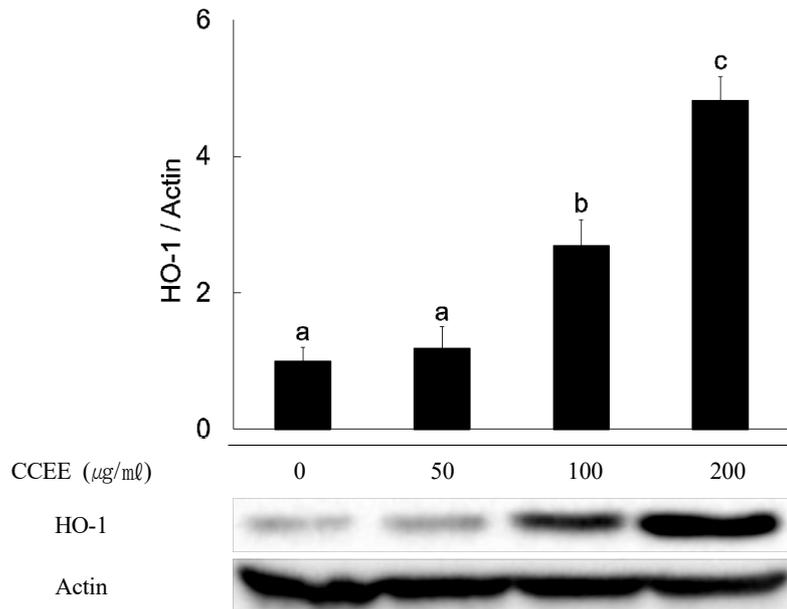


Fig 1. Inhibitory effect of CCEE against t-BHP induced intracellular ROS formation in RAW 264.7 cells
 Data represent the mean \pm SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test

A)



B)

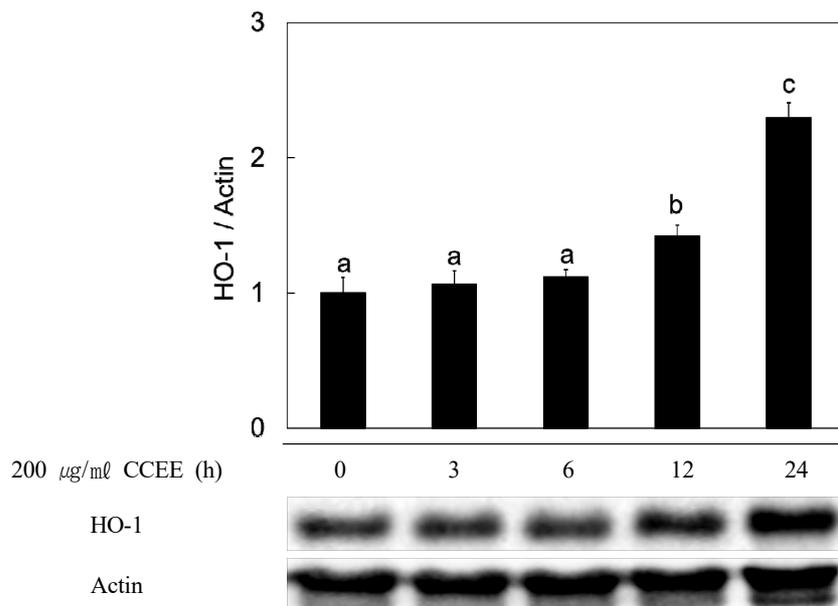


Fig 2. Potently induced HO-1 expression by CCEE treatment by a dose- and time-dependent manner in RAW 264.7 cells

Panel A shows various concentrations of CCEE were treated to induce HO-1 expression for 24h. Panel B exhibits indicated that 200 µg/ml of CCEE was exposed as indicated time in RAW 264.7 cells. Data represent the mean ± SD of triplicate experiments. The values sharing the same superscript are not significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test

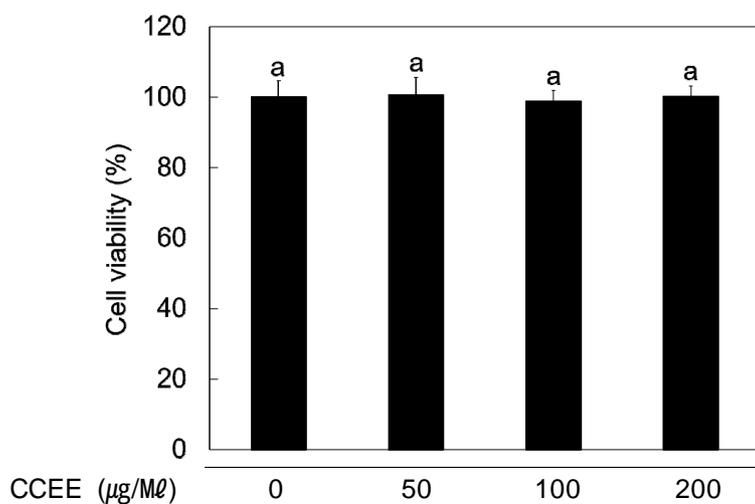
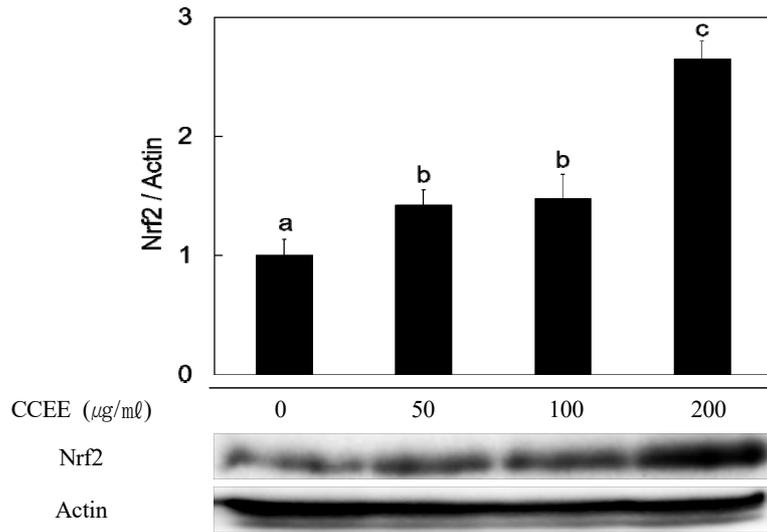


Fig 3. Cytotoxic effect of CCEE treatment in RAW 264.7 cells
Data represent the mean ± SD of triplicate experiments. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test

A)



B)

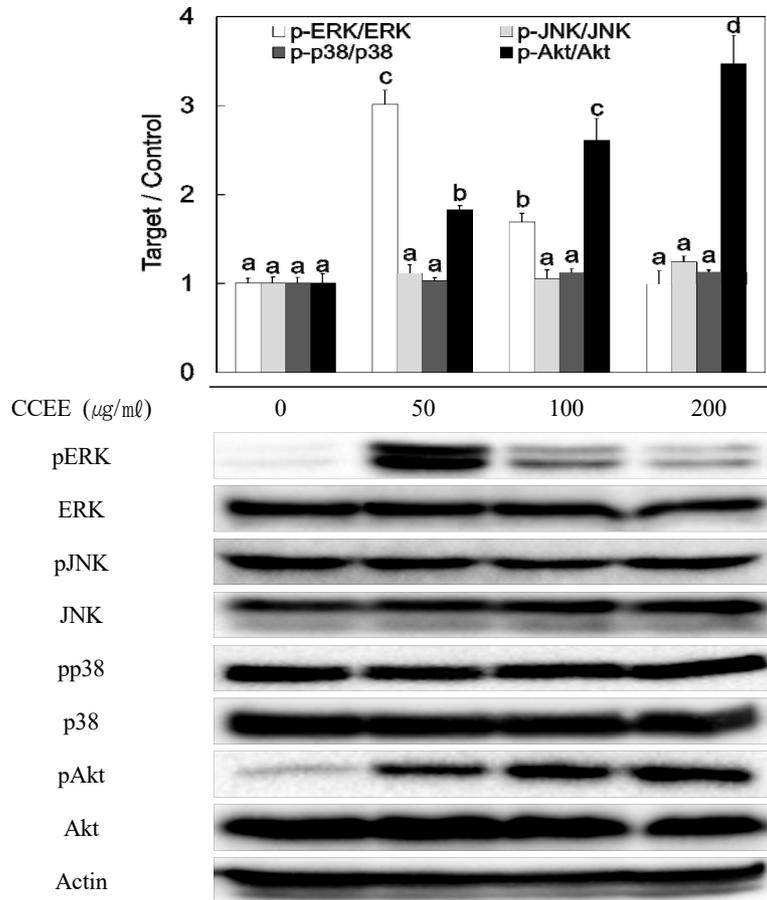


Fig 4. Nrf2 activation and Akt phosphorylation by CCEE treatment in RAW 264.7 cells. Activated Nrf2 (panel A), phosphorylated MAPKs, and PI3K/Akt (panel B) status were determined by Western blot analysis. Data represent the mean ± SD of triplicate experiments. The values sharing the same superscript are not significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test.

3. 산화 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 lycopene의 세포 보호 효과

세포에 노출된 ROS는 세포의 지질, 단백질, DNA를 심각하게 손상시킴으로써 세포사멸을 유도할 수 있다. 본 연구에서는 유기 과산화수소 중 하나인 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)를 이용하여 RAW 264.7 세포에 산화적 스트레스로 인한 세포사멸을 유도하였다. 그 결과로 Fig 6에서 보는 것과 같이 t-BHP에 의한 지질과산화로 세포독성이 급격히 증가하였고, 이는 CCEE의 처리에 의해 유의적으로 완화되었다. 그리고 이 결과는

신호전달물질의 선택적 저해제인 U0126(ERK 저해제), SP600125(JNK 저해제), SB202190(p38 저해제), LY294002(PI3K 저해제), CoPP(HO-1 유도제), SnPP(HO-1 억제제) 처리 후 t-BHP에 의한 세포독성유도로 Western blot assay 결과를 검증할 수 있었다. 결론적으로, 이러한 결과는 CCEE의 Nrf2 매개 HO-1 과발현이 RAW 264.7 세포에서 PI3K/Akt 신호경로의 조절을 통해 이루어지고, 이는 t-BHP에 의한 유발된 산화적 스트레스를 효율적으로 소거함으로써 세포의 항산화능을 강화한다는 것을 시사한다.

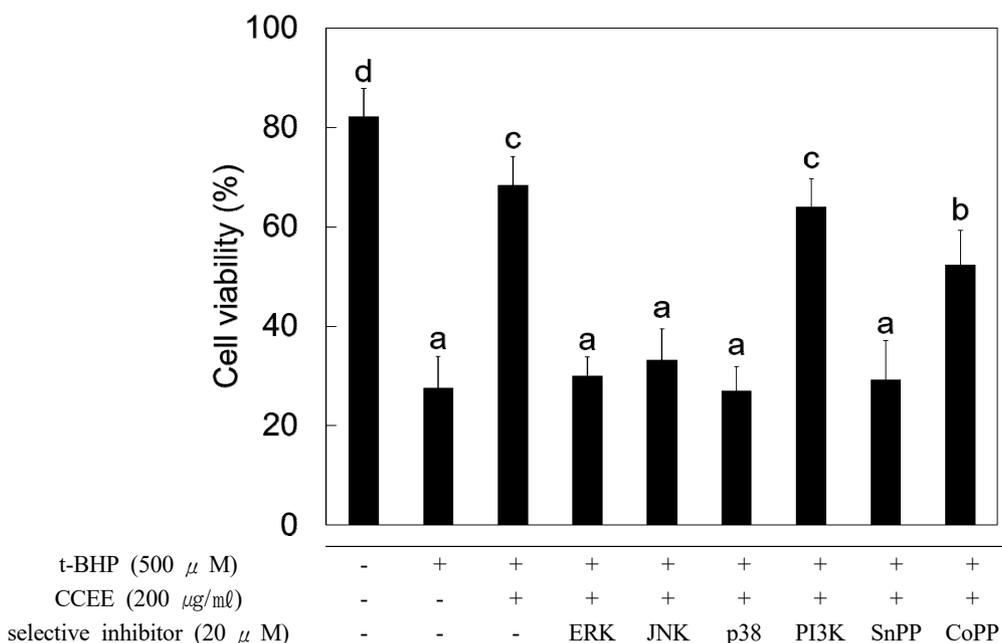


Fig 4. Enhanced antioxidative potential by CCEE against the t-BHP-induced oxidative damage in RAW 264.7 cells

The data represent the mean ± standard deviation of triplicate experiments. The values sharing the same superscript are not significantly different at p<.05 by Duncan's multiple range test

IV. 고찰

본 연구에서는 RAW 264.7 세포에서 CCEE의 항산화 효능을 알아보기 위해 2상 효소인 HO-1의 발현 유도 정도와 분자적 기전을 분석하고자 하였다. CCEE의 항산화

활성을 평가하기 위해 radical scavenging assay를 통해 분석한 결과 CCEE는 농도 의존적으로 t-BHP에 의해 유도된 과도한 ROS 생성을 억제하는 것으로 보아 CCEE는 항산화제로서의 역할을 할 수 있는 후보 물질이 될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 제2상 효소 중 하나인 HO-1

은 heme을 대사산물인 bilirubin/biliverdin, CO 및 free iron으로 분해하는 데 중요한 역할을 하며, 이는 산화적 손상 및 염증 자극에 대한 보호 역할을 하는 것으로 보고되었다(Chiang 등, 2021). Bilirubin은 시험관 내에서 α -tocopherol에 필적하는 항산화 활성을 보이는 강력한 peroxy radical의 소거제로 보고되었고, 과산화수소에 의해 유발되는 산화적 손상으로부터 세포를 보호하는 능력도 입증되었다(Jansen & Daiber, 2012). 또한 헴 대사의 가스 부산물인 CO는 전 염증 과정을 감소시키는 역할을 하고, ferritin의 유도는 산소 지향 라디칼 생성의 중요한 촉매인 유리 세포질 철을 효율적으로 격리하여 탁월한 항산화 능력을 발휘하는 것으로 보고되기도 하였다(Al-Qenaei 등, 2014; Ryter & Choi, 2009). 본 연구를 통해 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 CCEE를 24시간 처리했을 때 강한 HO-1 유도 효과를 보인다는 것을 확인하였고 세포독성 또한 보이지 않았다.

제2상 효소 발현을 위한 전사인자인 Nrf2는 ARE를 매개로 한 유전자 발현을 촉진하는 역할을 한다(Loboda 등, 2016). Nrf2는 주로 세포질에서 비활성 상태로 존재하며, 세포 골격 관련 단백질인 Kelch-like ECH-associated protein(Keap) 1에 의해 유리되며, Nrf2-Keap1 복합체는 ROS 및 전기적 자극과 같은 외부 자극에 의해 활성화된다. 해리된 Nrf2는 세포질에서 핵으로 이동하게 되며 이로 인해 HO-1, NQO1 및 GCLC를 포함한 항산화 효소의 과발현이 유도된다(Loboda 등, 2016). Nrf2의 활성화 상태를 분석하기 위해 Western blot을 수행한 결과 CCEE의 처리에 의하여 농도 의존적으로 Nrf2의 활성이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

MAPK 또는 PI3K/Akt 경로는 RAW 264.7 세포의 다양한 상위 신호전달 체계에 관여하는 분자 중 Nrf2와 관련된 HO-1 발현의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Yoon & Park, 2019). 기존의 연구에서 HO-1 조절과 관련된 intracellular kinase 역할은 여러 phytochemical이 대식세포에서 MAPK 및 PI3K/Akt 경로의 활성화를 통해 HO-1 발현을 강력하게 유도하는 것으로 보고하였다(Chow 등, 2005; Kwon 등, 2018). 본 연구에서는 CCEE의 처리로 인해 이 신호전달물질의 인산화가 유발되는지 분석한 결과 CCEE의 처리는 Akt의 인산화를 현저하게 유도하는 반면, ERK, JNK 및 p38의 활성

에는 뚜렷한 효과를 나타내지 않았다. 그리고 이러한 신호전달물질의 역할을 확인하기 위하여 기존에 확립된 선택적 억제제인 U0126(ERK), SP600125(JNK), SB202190(p38), LY294002(PI3K/Akt)를 사용하여 RAW 264.7 세포에서 HO-1 유도 신호전달 분자를 확인하였다. 과도하게 생성된 ROS에 노출되면 세포 지질, 단백질 및 DNA에 손상이 가해져 세포 사멸로 이어질 수 있다. 유기 과산화수소 중 하나인 t-BHP를 500 μM 로 처리하였을 때 RAW 264.7 세포에서 치명적인 산화적 손상을 유도하였다(Song & Park, 2014). CCEE를 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 12시간 동안 처리하고 선택적 억제제뿐만 아니라 SnPP 및 CoPP(HO-1 억제제 및 유도제)를 처리하고 500 μM 의 t-BHP로 세포사멸을 유도한 결과, t-BHP에 의한 지질 과산화로 현저히 증가한 세포독성은 CCEE의 처리에 의하여 완화되었고, LY294002, CoPP(HO-1 선택적 유도제)를 처리한 세포에서 같은 경향의 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 U0126(ERK), SP600125(JNK), SB202190(p38) 및 SnPP(HO-1 선택적 억제제)를 처리한 세포에서는 HO-1 발현이 소실되어 t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 CCEE의 세포 보호 효과는 나타나지 않았다.

이러한 결과를 통해 CCEE 처리에 의한 Nrf2 매개 HO-1 발현이 RAW 264.7 세포에서 PI3K/Akt 신호전달 경로의 활성화를 통해 항산화 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 통해 CCEE는 산화적 스트레스로부터 세포를 효과적으로 보호할 수 있는 항산화제로서의 가능성이 있음을 알 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 RAW 264.7 세포에 CCEE의 HO-1 발현 유도를 통한 항산화 효과와 기전을 전사인자와 상위 신호전달물질을 중심으로 분석하였다. 그 결과 CCEE는 농도 의존적으로 강하게 HO-1의 발현을 유도하였고, 전사인자인 Nrf2와 신호전달물질인 PI3K/Akt의 인산화를 통해 발현을 매개하는 것으로 나타났다. 그리고 이러한 결과는 선택적 저해제 분석을 통해 검증하였다. 이상의 결과를 통해 CCEE는 Nrf2와 PI3K/Akt 경로를 통해 유의

적으로 HO-1의 발현을 유도하였고, 이를 통해 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하였다. 이는 CCEE가 신체 내에서 발생할 수 있는 산화적 스트레스를 완화할 수 있는 소재로서의 가능성을 시사한다. 따라서 본 논문의 결과를 바탕으로 향후 CCEE의 유효성분에 대한 분리 연구 및 항산화 활성의 기전에 대한 동물 실험이 진행된다면 CCEE가 산화적 스트레스를 효과적으로 소거할 수 있는 천연 항산화 소재로 이용될 수 있는 가치가 충분히 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Al-Qenaie A, Yiakouvaki A, Reelfs O, et al(2014). Role of intracellular labile iron, ferritin, and antioxidant defence in resistance of chronically adapted Jurkat T cells to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 68(100), 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.006>.
- Chiang SK, Chen SE, Chang LC(2021). The role of HO-1 and its crosstalk with oxidative stress in cancer cell survival. *Cells*, 10(9), Printed Online. <https://doi.org/10.3390/cells10092401>.
- Chow JM, Shen SC, Huan SK, et al(2005). Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase 1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol*, 69(12), 1839-1851. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.03.017>.
- Farombi EO, Surh YJ(2006). Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol*, 39(5), 479-491. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2006.39.5.479>.
- Francisco V, Figueirinha A, Costa G, et al(2014). Chemical characterization and anti-inflammatory activity of luteolin glycosides isolated lemongrass. *J Funct Foods*, 10, 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.003>.
- Jansen T, Daiber A(2012). Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase?. *Front Pharmacol*, 16(3), Printed Online. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00030>.
- Johnson GL, Lapadat R(2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>.
- Keum YS(2012). Regulation of Nrf2-mediated phase II detoxification and anti-oxidant genes. *Biomol Ther*, 20(2), 144-151. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.144>.
- Kim DY(2020). Anti-oxidative effect of sapindus mukorossi fruits extract in LPS-stimulated macrophages via activation of Nrf2/HO-1 pathway. *J Korean Appl Sci Technol*. 37(5), 1306-1313. <http://doi.org/10.12925/jkocs.2020.37.5.1306>.
- Kwon DH, Cha HJ, Choi EO, et al(2018). Schisandrin a suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages by suppressing the NF-kappaB, MAPKs and PI3K/Akt pathways and activating Nrf2/HO-1 signaling. *Int J Mol Med*, 41(1), 264-274. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3209>.
- Kwon DH, Hwang BH, Kim MY, et al(2019). Sipyukmiryuki-eum exhibits anti-inflammatory and anti-oxidative effect via activation of Nrf2/HO-1 signaling in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Herb Formula Sci*, 27(1), 17-29. <https://doi.org/10.14374/HFS.2019.27.1.17>.
- Lee HJ, Lim MH(2016). Antioxidation effect of lemongrass and maychang essential oil. *J Kor Soc Cosm*, 22(2), 319-326.
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al(2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 73(17), 3221-3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>.
- Ma Q(2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53, 401-426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.

- Park CM(2018). Fortified antioxidative potential by chrysoeriol through the regulation of the Nrf2/MAPK-mediated HO-1 signaling pathway in RAW 264.7 cells. *J Life Sci*, 28(1), 43-49. <https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.1.43>.
- Ryter SW, Choi AMK(2009). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41(3), 251-260. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0170TR>.
- Sies H(1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>.
- Song YS, Park CM(2014). Luteolin and luteolin-7-O-glucoside strengthen antioxidative potential through the modulation of Nrf2/MAPK mediated HO-1 signaling cascade in RAW 264.7 cells. *Food Chem Toxicol*, 65, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.017>.
- Surh YJ(2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>.
- Yoo OK, Lee YG, Do KH, et al(2017). Ethanol extracts of rheum undulatum and inula japonica protect against oxidative damages on human keratinocyte HaCaT cells through the induction of ARE/NRF2-dependent phase II cytoprotective enzymes. *J Life Sci*, 27(3), 310-317. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.3.310>.
- Yoon HS, Park CM(2019). Alleviated oxidative damage by Taraxacum officinale through the induction of Nrf2-MAPK/PI3K mediated HO-1 activation in murine macrophages RAW 264.7 cell line. *Biomolecules*, 9(7), Printed Online. <https://doi.org/10.3390/biom9070288>.
- Yu R, Chen C, Mo YY, et al(2000). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 275(51), 39907-39913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004037200>.