Microbiol. Biotechnol. Lett. (2015), 43(3), 280–285
http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1507.07008
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

Cotoneaster horizontalis Decne 추출물의 항산화 및 항염증 활성

이지영[1], 진경숙[1], 권현주[1,2], 김병우[1,2]*
[1]동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터
[2]동의대학교 생명응용학과

Received: July 31, 2015 / Revised: September 2, 2015 / Accepted: September 2, 2015

Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne Extract

Ji Young Lee[1], Kyong-Suk Jin[1], Hyun Ju Kwon[1,2], and Byung Woo Kim[1,2*]
[1]Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, [2]Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science & Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne ethanol extract (CHEE) were evaluated. CHEE possessed a potent scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, which was similar to the activity of ascorbic acid which was used as a positive control. CHEE also effectively suppressed hydrogen peroxide-induced reactive oxygen species on RAW 264.7 cells. Furthermore, CHEE induced the expression of the anti-oxidative enzyme heme oxygenase 1, and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2. CHEE inhibited LPS induced nitric oxide (NO) formation as a consequence of inducible NO synthase (iNOS) down regulation. Taken together, these results provide us with an important new insight; that *C. horizontalis* possesses anti-oxidative and anti-inflammatory activities. Therefore, *C. horizontalis* may be utilized as a promising material in the field of nutraceuticals.

Keywords: *Cotoneaster horizontalis*, anti-oxidative, anti-inflammatory

생명체는 산화촉진물질과 산화억제물질이 균형을 이뤄 생체 내 항상성을 유지하고 있으나, 다양한 외부 요인들로 인해 이러한 균형 상태를 잃고 산화가 촉진되는 방향으로 기울게 되면 체내에 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 세포손상 및 질병을 일으키게 된다. 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소(reactive oxygen species, 이하 ROS)는 화학적으로 불안정하고 반응성이 높아 DNA, 단백질, 지질, 탄수화물과 같은 생체 내 고분자 물질과 쉽게 반응할 수 있으며, 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으켜 돌연변이, 세포 독성, 암 등을 유발하게 된다[1, 5, 11, 21, 22].

대표적인 cellular defensive phase 2 detoxifying antioxidant enzyme으로 알려진 heme oxygenase (HO)-1의 유도는 산화적 스트레스를 방어하는 중요한 기전 중 하나로 다양한 carcinogen으로부터 세포를 보호하는 chemoprevention에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 특히 천연에서 유래한 다양한 dietary phytochemical은 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절되는 phase 2 detoxifying antioxidant enzyme의 발현 증가를 통해 chemopreventive function을 나타낸다[4, 31]. 이러한 chemoprevention은 항산화 활성을 기초로 하여 암 뿐만 아니라 염증, 뇌 및 심혈관계 질환, 노화 등의 예방 및 치료 기전과도 상호작용하는 것으로 알려져 있어 그 중요성이 커지고 있다[2, 12, 25, 29].

염증은 외부자극에 대한 생체조직의 주요 방어 기전이나 지속적인 염증 반응은 조직의 손상을 초래하여 암을 비롯한 각종 질병을 유발한다[3, 6]. 생체 내 염증 반응은 대식세포(macrophage)에서 과량 생산되는 염증 매개인자(inflammatory mediators)로 부터 유래되는데 inducible nitric oxide synthase (iNOS)로 부터 생산되는 nitric oxide (NO)와 cyclooxygenase 2 (COX-2)로부터 생산되는 prostaglandin E2 (PGE2) 등이 대표적이다. 외부 자극에 의해 과량 생산된 염증 매개인자는 tumor necrosis factor α, interleukin 1β 등과 같은 사이토카인을 생산하여 염증 반응을 일으킨다[12, 13]. 염증 반응의 대표적인 세포 실험계 중 하나인 RAW 264.7 murine macrophage에 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증 유발인자를 처리하면 iNOS 및 COX-2의 발현 유도에 의해 NO

*Corresponding author
Tel: +82-51-890-2900, Fax: +82-505-182-6951
E-mail: bwkim@deu.ac.kr
© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

와 PGE2 등 염증 매개인자의 생성 및 이를 통한 사이토카인 분비량 증가를 확인할 수 있다[17, 19, 26]. 그러므로 이러한 염증 매개인자의 생성을 효과적으로 제어할 수 있는 물질들이 염증의 예방 및 치료를 위한 소재로서 각광받고 있으며 이에 따라 최근 많은 연구들이 항산화 및 항염증 활성을 바탕으로 한 생리활성 보유 신소재 개발 및 그 활성 기전의 규명에 주력하고 있다. 특히 천연유래 소재로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명하여 기능성 소재로서의 가능성을 타진하는 연구가 활발히 이루어지고 있다[14, 15, 23].

Cotoneaster horizontalis Decne는 장미과에 속하는 반상록 또는 낙엽성 관목으로 홍자단이라고도 불린다. 아시아, 북아메리카, 유럽 등의 온대지역에 약 50여종이 분포하며, 보통 1 m 내외로 자라는데, 가지는 낮은 포복으로 덩굴모양으로 늘어지며, 윤기 있는 잎이 달린다. 5–6월에 연분홍의 꽃을 피우며, 9–10월에 열매를 맺는다. *C. horizontalis*의 현재까지 보고된 생리활성으로는 Mohamed 등이 이집트에서 재배된 *C. horizontalis* 지상부의 주요 성분과 점액질의 항당뇨 및 항이상지질혈증 효과를 보고하였고[18], Sokkar 등이 이집트에서 수집한 *C. horizontalis* 가지 에탄올 추출물의 항산화, 항암 및 간보호 효과를 보고하였으며[24], Khan 등은 *C. horizontalis* 전초의 메탄올 추출물의 분획으로부터 분리한 콜린에스터라아제 억제제에 대해 보고한 바 있다[10]. 현재까지 *C. horizontalis*의 규명된 생리활성은 상기의 연구 결과뿐이며 그 구체적인 작용기작에 대한 연구, 특히 항산화 및 항염증 효과에 대한 연구는 매우 미흡하다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *C. horizontalis* 95% 에탄올 추출물(CHEE)이 보유한 항산화 및 항염증 활성과 그 작용 기작을 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

본 연구에 사용한 시료는 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-004)하여 사용하였다. 건조 및 분쇄한 시료를 95% 에탄올을 용매로 하여 45°C에서 3일간 초음파 추출을 수행하였다. 추출이 끝난 시료를 filter로 여과하여 고형물을 없애고 감압농축(N-1000SW, EYELA, Japan) 및 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

항산화 작용의 주요 기전 중 하나인 전자공여능은 인체 내에서 생성되는 free radical의 전자를 공여함으로써 free radical에 의한 노화와 질병을 억제한다. 항산화 작용의 주요 지표로서의 전자공여능은 특히 천연물이 보유한 항산화능의 측정에 많이 사용되고 있으며[5], 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical 소거능 분석을 이용하여 측정하였다. DPPH는 비교적 안정한 free radical로써, ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되는 원리를 이용하여 항산화 활성을 간단히 측정할 수 있는 동시에 식물체의 항산화 활성과도 연관성이 매우 높기 때문에 많이 이용되고 있는 방법이다[9]. DPPH radical scavenging activity 측정을 위해 CHEE를 농도별(0.1024-12.8 μg/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 μl와 각 시료 160 μl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군의 흡광도와 비교하여 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(Inhibitory Concentration, IC_{50})를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH radical 소거 활성 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 ascorbic acid를 함께 비교 분석하였다.

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험은 murine macrophage cell line인 RAW 264.7을 American Type Culture Collection (ATCC®, VA, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Corporation, CA, USA) 및 penicillin/streptomycin (Invitrogen)이 포함된 DMEM 배지(Invitrogen)에서 배양하여 수행하였다[20]. 활성 분석 수행 전 먼저 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인함과 동시에 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 CHEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 수행하였다. 1.0×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고, EPEE 처리 24시간 후 WST 시약(Daeil Lab Service, South Korea)이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시킨 다음 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ROS는 과량 생산 시 DNA, 단백질, 지질을 포함한 생체 내 분자에 산화적인 변형을 유발하여 다양한 질병의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[16]. Hydrogen peroxide (H_2O_2)는 대표적인 ROS 중 하나로 항산화능 분석을 위한 많은 연구에서 산화적 스트레스 유발제로 사용되고 있다[27, 28, 30]. 본 연구에서는 CHEE가 보유한 항산화능을 H_2O_2로 유도한 ROS 생성에 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 cell에 cell permeable fluorescent dye인 50 μM의 dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Sigma-aldrich, MO, USA)를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고 500 μM의 H_2O_2를 농도 별 시료와 함께 처리한 후 시료에 의한 ROS 생성 억제능을 multiplate reader를 이용한 fluorescence 측정을 통해 분석하였다.

CHEE의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1과 그 전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로부터 구입하였고, Nrf2와 Actin의 일차항체와

anti-goat와 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후 50 μg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000–5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 hybridization하였다. Membrane washing 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system (FluoChem® FC2, AlphaInnotech, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다.

대표적인 free radical 중 하나인 NO는 생체 내에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[8]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[20]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 cell을 24-well tissue culture plate에 well 당 1.0×10^5 cell을 seeding하여 부착시킨 후 1 μg/ml의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 시료에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였다. 96-well plate에 세포 배양액 상층 100 μl를 분주하고 50 μl의 sulphanilamide (1% in 5% phosphoric acid)와 50 μl의 naphthynaphthylene dihydrochloride (0.1%)를 섞은 후 실온에서 10분간 반응시켰다. Multiplate reader를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 단계 희석한 표준액으로 표준 정량선을 그린 후 NO 생성량을 계산하였다. 실험에 사용한 시약은 모두 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 또한 CHEE가 보유한 NO 생성 억제능의 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 분석하였다. Western blot hybridization을 위한 iNOS의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로 부터 구입하여 사용하였으며 분석 과정은 상기 HO-1 및 Nrf2의 경우와 같다.

모든 실험 결과는 최소 3회 이상의 반복 실험을 통하여 얻은 데이터를 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 필요 시 대표적인 그림이나 데이터를 제시하였다. 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 p 값이 0.05 미만 ($p < 0.05$)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

이상의 실험을 통한 CHEE의 항산화능 및 항염증 생리활성의 분석 결과는 다음과 같다. 먼저 CHEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH radical scavenging activity를 분석한 결과 CHEE의 농도 증가에 따른 강한 radical 소거능을 보여 0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 μg/ml의 시료 처리에 의해 DPPH radical 소거능이 각각 26.82, 34.25, 66.21, 96.99%로 나타나 50% 소거 농도를 나타내는 IC_{50} 값이 1.52 μg/ml로 양성 대조군으로 사용한 ascrobic acid, 즉 vitamin C의 IC_{50} 값인 1.53 μg/ml와 유사한 정도의 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다(Table 1). 이는 앞서 Sokkar 등이 보고한 결과에서와 유사하게 농도의존적인 활성의 증가를 보였으나 더 낮은 농도에서 더 높은 활성을 나타내었다[24]. 이와 같이 DPPH radical scavenging activity 분석을 통해 CHEE가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 CHEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인하고자 하였다.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of CHEE.

Reagent	Concentration (μg/ml)	Inhibition rate (%)
CHEE	0.1024	26.82 ± 0.07
	0.512	34.25 ± 0.25
	2.56	66.21 ± 0.35
	12.8	96.99 ± 0.13
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	19.79 ± 0.23
	2.56	80.38 ± 0.21
	12.8	97.59 ± 0.16

CHEE의 세포 수준에서의 생리활성을 분석하기 전 먼저 시료가 세포 생존율에 미치는 영향을 RAW 264.7 cell에서 분석한 결과 0–200 μg/ml의 CHEE 처리에 의해 세포 독성이 일어나지 않음을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 RAW 264.7 cell에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H_2O_2를 처리하여 CHEE에 의한 ROS scavenging activity를 분석한 결과 H_2O_2 단독 처리에 의해 유도되는 과량의 ROS 생성이 CHEE의 병용 처리에 의해 효과적으로 저해되는 것으로 나타나 CHEE가 DPPH radical 뿐만 아니라 세포 실험계에서 H_2O_2에 의해 유도된 산화적 스트레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(Fig. 1B).

강한 항산화능을 보유한 천연 유래 소재들이 Nrf2에 의한 항산화 효소계의 발현 유도를 통해 활성을 나타낸다는 것이 여러 연구를 통해 밝혀짐에 따라 CHEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보고자 하였다[7, 25]. 이를 위해 대표적인 항산화 효소로 천연물에 의한 항산화 활성에 의해 주로 발현이 유도되는 HO-1과 그 상위 전사인자인 Nrf2의 단백질 발현에 CHEE가 미치는 영향을 분석한 결과 6시간 동안 10–50 μg/ml의 시료 처리에 의해 HO-1과 Nrf2의 단백질 발현이 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

CHEE가 항산화능 뿐만 아니라 항염증 활성 또한 보유하는지를 알아보기 위해 NO 생성에 미치는 효과를 알아보았

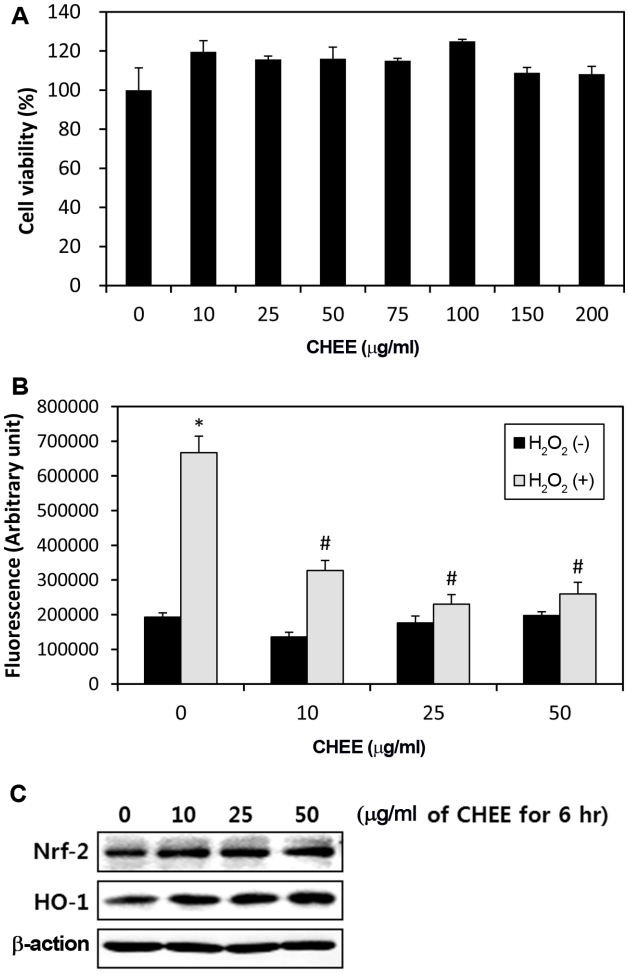

Fig. 1. Effect of CHEE on cell viability (A), H_2O_2-induced ROS scavenging activity (B), modulation of an anti-oxidative enzyme, HO-1 and its upstream transcription factor, Nrf2 protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A, B) Values are represented as the mean ± SD (n = 3). (B) *, # Significantly different from the vehicle control [0, H_2O_2 (–)] and H_2O_2- induced control [0, H_2O_2 (+)], respectively (p < 0.05). (C) Actin was used as an internal control.

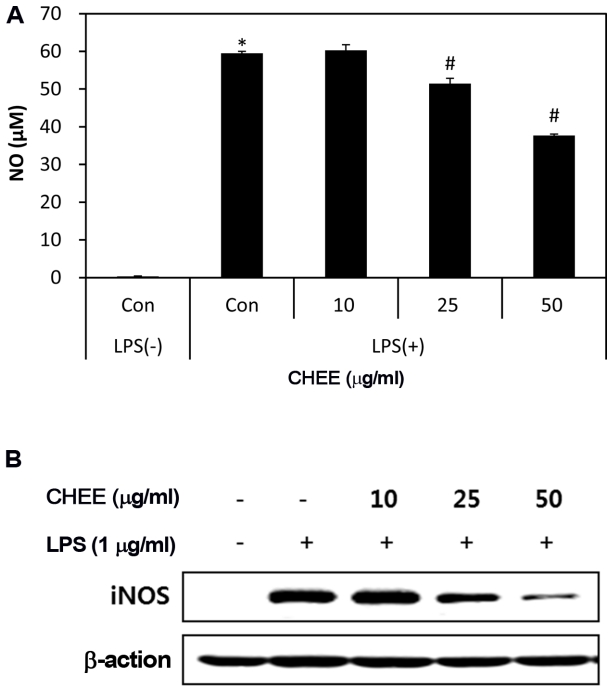

Fig. 2. Modulation of CHEE on LPS-induced NO formation (A) and iNOS protein expression (B) in RAW 264.7 cells. (A) Values are represented as the mean ± SD (n = 3). *, # Significantly different from the vehicle control [0, LPS (–)] and LPS-induced control [0, LPS (+)], respectively (p < 0.05). (B) Actin was used as an internal control.

다. LPS로 자극을 유도한 쥐 대식세포주 RAW 264.7 cell에서 농도별 CHEE의 처리에 따른 NO 생성양의 변화를 분석한 결과 10–50 μg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현저해에서 기인하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해 CHEE가 산화적 스트레스 뿐만 아니라 염증성 자극에 대한 방어능 또한 보유함을 확인하였다. 한편 CHEE의 처리는 iNOS의 단백질 발현은 유의적으로 감소시켰으나 COX-2의 발현에는 영향을 주지 않았다(data not shown).

이상의 결과를 통해 *C. horizontalis*가 항산화능과 항염증활성을 보유함을 세포 수준에서 처음으로 확인하였으며, 이러한 결과는 신규 소재에 대한 새로운 기능성 데이터를 구축함과 동시에 향후 생리활성 보유 기능성 소재로서의 활용을 위한 근거자료로 이용될 수 있을 것이다. 후속 연구를 통해 *C. horizontalis*의 활성 성분을 분리함과 동시에 각 생리활성의 상위신호전달경로의 규명이 필요할 것으로 판단된다.

요 약

Cotoneaster horizontalis Decne 에탄올 추출물(CHEE)의 항산화능과 항염증 생리활성을 분석하였다. CHEE의 항산화능을 DPPH radical scavenging activity로 분석한 결과 radical 소거능의 정도가 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 정도의 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주를 이용하여 H_2O_2 유도에 의해 생성된 ROS에 대한 소거능을 분석한 결과에서도 강한 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 항산화효소 HO-1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현이 CHEE의 처리에 의해 증가되었다. 한편 CHEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발

현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 *C. horizontalis*의 항산화능과 항염증 활성을 세포 수준에서 처음으로 확인하였으며 향후 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This work was supported by Blue-Bio Industry Regional Innovation Center (RIC08-06-07) at Dong-Eui University as a RIC program under Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Busan city.

References

1. Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C. 2013. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 17643–17663.
2. Chapple SJ, Siow RC, Mann GE. 2012. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**: 1315–1320.
3. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. 2011. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 738–749.
4. Giudice A, Arra C, Turco MC. 2010. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. *Methods Mol. Biol.* **647**: 37–74.
5. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**: 5319–5341.
6. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**: 883–899.
7. Hu R, Saw CL, Yu R, Kong AN. 2010. Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid. Redox Signal.* **13**: 1679–1698.
8. Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* **1**: 244–257.
9. Kedare SB, Singh RP. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**: 412–422.
10. Khan S WZ, Wang R, Zhang L. 2014. Horizontoates A-C: New cholinesterase inhibitors from *Cotoneaster horizontalis*. *Phytochemistry Letters* **10**: 204–208.
11. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. 2009. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* **3**: 73–80.
12. Kundu JK, Surh YJ. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**: 1–30.
13. Kundu JK, Surh YJ. 2012. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.* **52**: 2013–2037.
14. Lee JC, Hou MF, Huang HW, Chang FR, Yeh CC, Tang JY, *et al.* 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Int.* **13**: 55.
15. Li J, Zhang H, Huang W, Qian H, Li Y. 2012. TNF-alpha inhibitors with anti-oxidative stress activity from natural products. *Curr. Top Med. Chem.* **12**: 1408–1421.
16. Liochev SI. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.* **60**: 1–4.
17. Lu Y, Suh SJ, Kwak CH, Kwon KM, Seo CS, Li Y, *et al.* 2012. Saucerneol F, a new lignan, inhibits iNOS expression via MAPKs, NF-kappaB and AP-1 inactivation in LPS-induced RAW264.7 cells. *Int. Immunopharmacol.* **12**: 175–181.
18. Mohamed SA SN, El-Gindi O, Ali ZY, Alfishawy IM. 2012. Phytoconstituents Investigation, Anti-diabetic and Anti-dyslipidemic Activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne Cultivated in Egypt. *Life Sci. J.* **9**: 394–403.
19. Park CM, Jin KS, Lee YW, Song YS. 2011. Luteolin and chicoric acid synergistically inhibited inflammatory responses via inactivation of PI3K-Akt pathway and impairment of NF-kappaB translocation in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **660**: 454–459.
20. Park CM, Park JY, Noh KH, Shin JH, Song YS. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production via the NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 834–842.
21. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**: 17–34.
22. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **49**: 1603–1616.
23. Saw CL, Wu Q, Su ZY, Wang H, Yang Y, Xu X, *et al.* 2013. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. *Biopharm. Drug Dispos.* **34**: 303–311.
24. Sokkar N E-GO, Sayed S, Mohamed S, Ali Z, Alfishawy I. 2013. Antioxidant, andticancer and hepatoprotective activities of *Cotoneaster horizontalis* Decne extract as well as *a*-tocopherol and amygdalin production from in vitro culture. *Acta Physiol. Plant.* **35**: 2421–2428.
25. Su ZY, Shu L, Khor TO, Lee JH, Fuentes F, Kong AN. 2013. A perspective on dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: oxidative stress, nrf2, and epigenomics. *Top Curr. Chem.* **329**: 133–162.
26. Tsai HH, Lee WR, Wang PH, Cheng KT, Chen YC, Shen SC. 2013. Propionibacterium acnes-induced iNOS and COX-2

protein expression *via* ROS-dependent NF-kappaB and AP-1 activation in macrophages. *J. Dermatol. Sci.* **69**: 122–131.
27. Wang FW, Wang Z, Zhang YM, Du ZX, Zhang XL, Liu Q*, et al.* 2013. Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro. *J. Cell Biochem.* **114**: 2346–2355.
28. Yagi H, Tan J, Tuan RS. 2013. Polyphenols suppress hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell Biochem.* **114**: 1163–1173.
29. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. 2013. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **100**: 30–47.
30. Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Maeng YH, Lee KH, Chang WY*, et al.* 2009. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chem. Biol. Interact.* **177**: 21–27.
31. Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ. 2010. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol.* **34**: 523–533.

http://dx.doi.org/10.4014/mbl.1507.07008