

## RAW 264.7 세포에서 *Carpinus pubescens* Burkill 추출물의 항산화 및 항염증 활성

이수현<sup>1</sup>, 진경숙<sup>1</sup>, 권현주<sup>1,2</sup>, 김병우<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터

<sup>2</sup>동의대학교 생명융합학과

Received: September 16, 2015 / Revised: February 5, 2016 / Accepted: May 13, 2016

### Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Activities of *Carpinus pubescens* Burkill Extract in RAW 264.7 Cells

Su Hyeon Lee<sup>1</sup>, Kyong-Suk Jin<sup>1</sup>, Hyun Ju Kwon<sup>1,2</sup>, and Byung Woo Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, <sup>2</sup>Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

In this study, to evaluate the anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Carpinus pubescens* Burkill ethanol extract (CPEE), we performed the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, reactive oxygen species (ROS) inhibition, and nitric oxide (NO) scavenging assays and an analysis of the related protein expressions. CPEE showed high DPPH radical scavenging activity and effectively increased ROS inhibition activity dose-dependently. Furthermore, CPEE induced the expression of the anti-oxidative enzyme heme oxygenase 1 and its upstream transcription factor, nuclear factor-E2-related factor 2, in RAW 264.7 cells. CPEE was associated with a reduction in NO production, which was induced by lipopolysaccharide treatment in a dose-dependent manner. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), an upstream regulator of NO production, was also inhibited. Taken together, these results suggest that CPEE has anti-oxidative and anti-inflammatory activities and could be useful as a potential anti-oxidant and anti-inflammatory agent.

**Keywords:** *Carpinus pubescens* Burkill, anti-oxidative activity, anti-inflammatory activity

## 서 론

각종 천연물은 다양한 종류의 생리활성 물질을 함유하며 오랫동안 식품으로 이용되거나 여러 가지 질병에 대한 치료 및 예방의 용도로 사용되어 왔으나 효능에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았다. 그러나 최근에 이르러 건강에 대한 관심이 높아지면서 기능성 관련 유용 소재 발굴을 위한 원천으로 천연물이 주목받고 있으며 이를 활용한 연구가 활발히 진행되고 있다[22, 26, 29, 32].

미토콘드리아 내의 산화환원 효소계, 외부 항원에 노출된

면역세포에 의해, 그리고 외부적으로는 방사선 또는 여러 화합물 등에 의해 생체 내에는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. ROS가 순간적으로 다량 발생되거나 항산화 시스템의 기능이 저하되어 그 생성과 제거 사이의 균형이 깨지면 생체는 산화적 스트레스(oxidative stress)를 받게 된다. 산화적 스트레스는 세포와 조직에 손상을 가하고 지속적인 손상은 DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래하게 된다[6, 8, 18, 41]. 세포의 항산화 시스템에서 중요한 구성요소인 heme oxygenase (HO)의 유도체 중 하나인 HO-1은 일반적으로 heme을 대사시키는 효소로 잘 알려져 있으며, 대사산물로 담록소, 일산화탄소 및 2가 철이온을 방출한다. 담록소는 담록소 환원효소에 의해 강력한 항산화 인자로 알려져 있는 빌리루빈으로 전환된다[39]. HO-1은 저산소증, 금속이온 및 염증성 사이토카인 등과 같은 산화적 스트레스 환경을 유도하는 자극에 의해 발현이 유도되

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2900, Fax: +82-505-182-6951

E-mail: bwkim@deu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

며, 산화적 스트레스에 대항하여 세포 내 redox (reduction-oxidation) 균형을 유지하는 항산화 인자로서 크게 기여한다 [7, 15, 19, 38]. HO-1의 발현은 일차적으로 전사단계에서 조절되며 전사인자 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 이루어진다고 알려져 있다[35]. 전사 인자로서의 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자의 발현과 단백질 생성을 향진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다[3, 11].

염증반응이란 생체에 이물질이 감염 또는 침입하였거나 물리적, 화학적 손상에 대해 면역세포가 이를 인지하여 다양한 염증 매개물질을 분비함으로써 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다[42]. 그러나 지속적으로 또는 과도하게 발생된 만성 염증반응은 조직의 손상을 유발하며 이와 관련한 ROS와 염증성 사이토카인은 내독소 자극을 포함한 다양한 질병의 매개체로서 중요한 역할을 한다[5]. 염증반응의 대표적인 예로 그람 음성 세균의 세포외막 성분인 LPS나 바이러스, 미생물 등의 자극에 의해 대식세포(macrophage)가 활성화되면 염증성 사이토카인을 방출하게 되고, inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현을 유도하며 NO 및 prostaglandin E<sub>2</sub>와 같은 염증성 인자가 생성됨으로써 염증반응이 매개된다. 이 과정에서 iNOS에 의한 과다한 NO 생성은 그 자체로 염증유발과 조직손상을 일으킬 뿐만 아니라, 활성산소와 결합하게 되면 보다 반응성이 강한 형태로 전환되어 생체조직의 괴사를 야기할 수 있다[2, 20, 31].

*Carpinus pubescens* Burkill은 자작나무과(Betulaceae) 서어나무속에 속하는 식물로서 중국과 베트남 등지에서 자란다. *C. pubescens*와 동일한 자작나무과인 개서어나무의 신경보호작용[16], 항염증작용[13, 14], 세포보호작용[43] 등 효과에 대해서는 알려져 있지만 *C. pubescens* Burkill의 구체적인 효능에 대해서 알려진 바가 없으며, 특히 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *C. pubescens* Burkill의 에탄올 추출물이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 시험관 분석법과 세포 실험 모델계를 이용하여 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### *C. pubescens* 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *C. pubescens* 에탄올 추출물(이하 CPEE)은 한국생명공학연구원 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FB123-019)하여 사용하였으며 추출과정은 다

음과 같다. 건조 및 분쇄한 CPEE를 95% 에탄올을 이용하여 45°C에서 15분간 초음파 추출 후 2시간 동안 정치시키는 과정을 하루 10회 반복하여 총 3일간 추출을 수행한다. 추출이 끝난 시료를 여과지에 걸러 고형물을 없애고 감압농축(N-1000SW, EYELA, Japan) 및 동결 건조(FDU2100, EYELA, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

### DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 통한 CPEE의 항산화능 분석

전자공여능은 항산화 작용의 주요 지표로서 활용되고 있는데, 주로 DPPH 라디칼 소거능의 측정을 통해 이뤄지고 있다. DPPH는 비교적 안정한 라디칼로 520 nm 부근에서 특정한 광흡수를 나타내는 짙은 보라색의 화합물이며 라디칼 소거활성이 있는 물질에 의해 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하게 된다. DPPH에 의한 라디칼 소거활성은 지질과산화 억제활성을 비롯한 항산화 활성과 상관관계를 보이므로 항산화제 검색에 널리 이용되고 있다[9, 37].

DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 위해 CPEE를 농도별(0.1024–12.8 µg/ml)로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5 × 10<sup>-4</sup> 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 대조군과 비교하여 라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 저해 농도(inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH 라디칼 소거 활성 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 아스코르브산을 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

### RAW 264.7 세포주의 배양 및 CPEE의 세포독성 분석

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 쥐 대식세포주인 RAW 264.7을 American Type Culture Collection (ATCC, TIB-71™, VA, USA)로부터 구입하여 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Invitrogen Corporation, CA, USA)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen)이 포함된 DMEM (Invitrogen) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다.

활성 분석 수행 전 시료가 지닌 세포독성의 유무 확인과 함께 이후 실험 농도의 결정을 위해 RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 3.0 × 10<sup>5</sup>개씩 분주하여 부착시킨 후 CPEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 분석하였다. CPEE 처리 24시간 후 WST 시약(Daeil Lab Service, South Korea)이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 반응시키고 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험

의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

### CPEE의 ROS 소거능 분석

ROS는 매우 반응성이 크기 때문에 세포막 분해, 단백질 분해, 지방 산화, DNA 손상 및 합성 억제 등을 일으켜 세포 손상의 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[21, 24].  $H_2O_2$ 는 대표적인 ROS 중 하나로 소재의 항산화능을 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[28, 30, 33]. 본 연구에서는 CPEE가 보유한 항산화능을  $H_2O_2$ 로 유도한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포주에 세포 침투성 형광 염료인  $50 \mu M$ 의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, MO, USA)를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고  $500 \mu M$ 의  $H_2O_2$ 와 농도 별 시료를 처리한 후 시료에 의한 ROS 생성 억제능을 multiplate reader를 이용한 형광 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

### 항산화 효소 HO-1 및 전사인자인 Nrf2의 발현 조절능 분석

CPEE의 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 브래드포드 법으로 단백질 농도를 결정한 후  $50 \mu g$ 의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 니트로셀룰로즈 막에 전사한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 hybridization하였다. 막을 수세한 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system (Fluo-Chem<sup>®</sup> FC2, AlphaInnotech, CA, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

### CPEE의 NO 생성 억제능 분석

반응성 질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 최근 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO는 신경독성, 신호전달 및 체내방어 등의 생리기능을 갖고 있으며, 염증과 암 발생에 관여해 병리적으로 중요한 역할을 한다[34, 36]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[28]의 방법을 변

형하여 수행하였다. RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당  $3.0 \times 10^5$  개씩 분주하여 부착시킨 후  $1 \mu g/ml$ 의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 CPEE에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 실험에 사용한 시약은 모두 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### CPEE의 항염증 활성 관련 단백질 발현 조절능 분석

iNOS는 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도 되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 부종 등의 염증반응을 촉진시키고 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[17, 40]. CPEE의 항염증 활성 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 Western blot hybridization으로 분석하였다. iNOS의 일차항체는 Cell Signaling Technology (MA, USA)로부터 구입하였고, Actin의 일차항체와 anti-goat와 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 브래드포드 법으로 단백질 농도를 결정한 후  $50 \mu g$ 의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 니트로셀룰로즈 막에 전사한 후 희석한 대상 단백질의 일차항체와 hybridization하였다. 막을 수세한 후 HRP가 부착된 이차항체로 한 시간 동안 반응시키고 chemiluminescence detection system을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 실험의 결과는 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

### 통계 분석

실험의 결과는 평균(mean)  $\pm$  표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 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.

## 결과 및 고찰

### CPEE의 라디칼 소거 활성 측정을 통한 항산화능 분석

항산화 물질의 가장 특징적인 기작은 유리기와 반응하는 것으로 라디칼 소거 작용은 활성라디칼에 전자를 공여하여 항산화 효과나 인체 노화를 억제하는 척도로 이용되고 있다 [1]. CPEE의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거 활성을 통해 분석하였다. 그 결과 CPEE의 농도 증가에 따라 강한 라디칼 소거능을 보여  $0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 \mu g/ml$ 의 시료 처리에 의해 DPPH 라디칼 소거능이 각각 21.85, 37.04, 86.99,

**Table 1. DPPH radical scavenging activity of CPEE.**

Reagent	Concentration (µg/ml)	Inhibition rate (%)
CPEE	0.1024	21.85 ± 0.72
	0.512	37.04 ± 0.76
	2.56	86.99 ± 0.53
	12.8	99.85 ± 0.27
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	27.08 ± 0.36
	2.56	96.45 ± 0.27
	12.8	98.10 ± 0.19

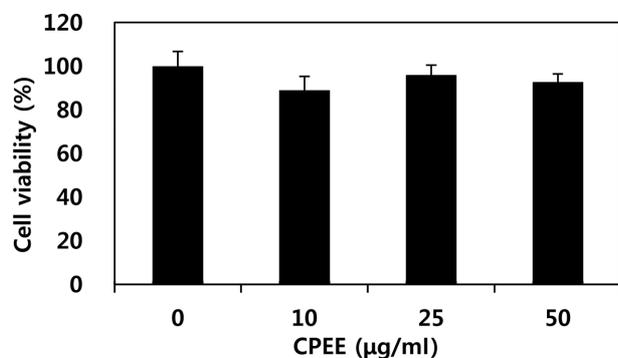
99.85%로 나타나 50% 소거 농도를 나타내는 IC<sub>50</sub> 값이 1.04 µg/ml로 양성 대조군으로 사용한 아스코르브산, 즉 비타민 C의 IC<sub>50</sub> 값인 1.19 µg/ml과 유사한 정도의 높은 활성을 보여 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다(Table 1).

**CPEE가 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향**

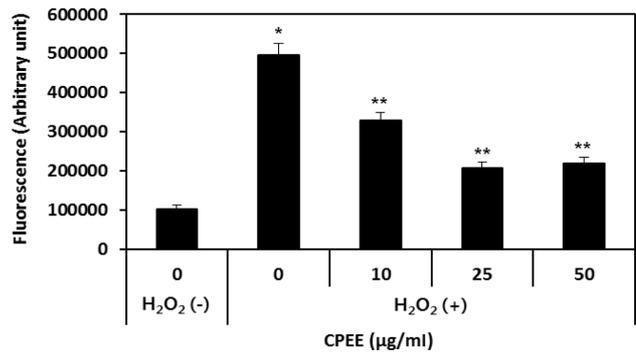
CPEE가 보유한 항산화능을 세포 수준에서 확인하기 위해 CPEE가 세포 실험 모델체인 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. CPEE를 농도별(0, 10, 25, 50 µg/ml)로 24시간 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 유발하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이후 진행된 항산화능 기전분석에서는 10-50 µg/ml까지의 농도를 사용하였다.

**CPEE의 ROS 소거능 분석**

DPPH 라디칼 소거 활성에 의해 CPEE가 보유한 높은 항산화능이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 세포주에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 CPEE에 의한 ROS 소거능을 분석하였다. 세포 내에서 활성산소가 발생되면 DCF-DA가 에스터라제 또는 산화적 가수분해에 DCFH로 탈아세틸화 되고 비형광성인 DCFH는 활성 산소에 의해 산화되어 2',7'-dichloro-fluorescein (DCF)로 전환되고 이는 강한 형광



**Fig. 1. Effect of CPEE on cell viability in RAW 264.7 cells.** Values are represented as the mean ± SD (n = 3).

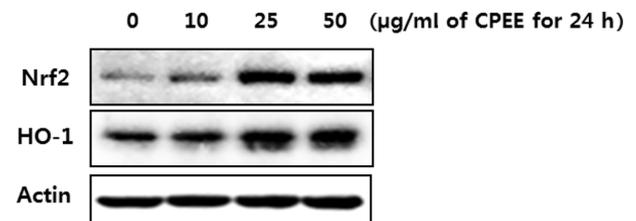


**Fig. 2. ROS scavenging activity of CPEE in RAW 264.7 cells.** Values are represented as the mean ± SD (n = 3). \*, \*\*Significantly different from the vehicle control (-/-) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced control (-/+), respectively (p < 0.05).

을 나타낸다[23]. 이러한 원리를 이용하여 ROS 생성 정도를 측정할 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 ROS 생성이 CPEE의 처리에 의해 농도의존적으로 저해되었다(Fig. 2). 즉, CPEE가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 산화적 스트레스를 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다.

**CPEE가 항산화 효소 HO-1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향**

HO-1은 산화적 손상 억제, 염증 반응 감소 및 세포 증식 조절을 통해 조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하며, 전사인자인 Nrf2를 통해 발현이 조절된다[12]. Nrf2는 산화적 스트레스에 대응하는 세포 방어기전을 위한 일차적인 전사인자로 알려져 있다[4]. 정상적인 상태에서 Nrf2는 Keap1에 의해 비활성화 상태로 세포질에 존재하지만, 산화적 자극을 받으면 Keap1과 해리되어 핵 내로 이동하여 ARE에 결합함으로써 HO-1과 같은 항산화 효소의 발현을 조절한다[27]. 상기 실험에서 CPEE에 의해 ROS가 감소되는 것이 확인됨에 따라 CPEE가 보유한 항산화능의 작용기작을 알아보기 위해 HO-1 및 Nrf2의 발현 정도를 Western blot hybridization을 통해 분석하였다. 그 결과 10-50 µg/ml의



**Fig. 3. Modulation of the representative anti-oxidative enzyme, HO-1 and its upstream transcription factor Nrf2 protein expression in RAW 264.7 cells by CPEE.** Actin was used as an internal control.

시료 처리에 의해 HO-1 단백질 발현이 증가되었으며 상위 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현 또한 증가되었다(Fig. 3). 따라서 CPEE는 RAW 264.7 세포주에서 Nrf2를 전사시켜 HO-1 단백질 발현을 유도함으로써 산화적 스트레스로부터 항산화 활성을 나타낸다는 사실을 확인하였다.

### CPEE가 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. iNOS는 세균의 내독소 및 염증성 사이토카인에 의해 강하게 유도된다[10]. 병리적인 조건 하에서 iNOS에 의한 NO의 현저한 증가는 다른 염증성 매개체들과 함께 과도한 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있어 염증성 손상의 주요 매개체이다[25]. CPEE가 강한 항산화 활성을 보유하고 있음이 상기의 실험을 통해 밝혀졌다. 따라서 CPEE가 항염증 활성 또한 나타내는지 알아보기 위해 NO 생성 저해능을 분석하였다. 먼저 CPEE가 LPS로 자극을 유

도한 RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 10–200 µg/ml의 시료 처리에 의해 세포독성을 유발하지 않았다(Fig. 4A). 다음으로 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포주에서 농도별 CPEE의 처리에 따른 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 10–200 µg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해활성과 함께 iNOS 발현이 저해됨을 확인하였다(Fig. 4B, 4C). 이러한 결과를 통해 CPEE가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 항염증 활성을 보유한 것으로 사료된다.

### 요 약

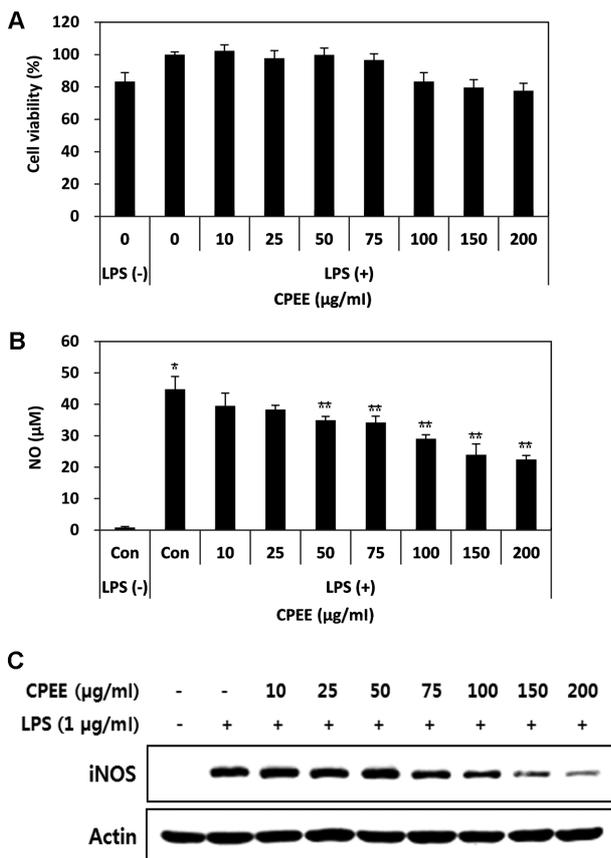
본 연구에서는 *C. pubescens* Burkill 에탄올 추출물(CPEE)의 항산화능과 항염증 생리활성을 DPPH 라디칼 소거능, ROS 생성 억제능, NO 소거 활성 등을 통해 분석하였다. 먼저 CPEE의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능으로 분석한 결과 강한 소거능을 보였으며, 좀 더 자세한 항산화능 작용 기작을 알아보기 위해 ROS 생성 억제능으로 분석한 결과 농도 의존적으로 강한 ROS 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화 효소인 HO-1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 CPEE에 의해 HO-1 및 Nrf2의 발현이 증가됨을 보였다. 한편 CPEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 CPEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 확인하였으며 향후 잠재적인 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

- Ahn SI, Heung BJ, Son JY. 2007. Antioxidative activity and nitrite scavenging abilities of some phenolic compounds. *Korean J. Food Cookery Sci.* **23**: 19–24.
- Albina JE, Reichner JS. 1995. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz.* **3**: 46–64.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, *et al.* 2003. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochem. J.* **371**: 887–895.
- Chen XL, Kunsch C. 2004. Induction of cytoprotective genes



**Fig. 4.** Effect of CPEE on cell viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A, B) Values are represented as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*, \*\*Significantly different from the vehicle control (-/-) and LPS-induced control (-/+), respectively ( $p < 0.05$ ). (C) Actin was used as an internal control.

- through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr. Pharm. Des.* **10**: 879–891.
5. Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim JH, Kim KH, Lee BR. 2011. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of extracts from organic soybean. *Korean J. Organic Agric.* **2**: 245–253.
  6. Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**: 689–695.
  7. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI. 1997. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **80**: 557–564.
  8. Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**: 872–879.
  9. Gonzalez-Burgos E, Gomez-Serranillos MP. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**: 5319–5341.
  10. Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**: 85–94.
  11. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**: 313–322.
  12. Jozkowicz A, Was H, Dulak J. 2007. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid. Redox Signal.* **9**: 2099–2117.
  13. Kang GJ, Kang NJ, Han SC, Koo DH, Kang HK, Yoo BS, et al. 2012. The chloroform fraction of *Carpinus tschonoskii* leaves inhibits the production of inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes and RAW 264.7 macrophages. *Toxicol. Res.* **28**: 255–262.
  14. Kang SH, Koo JE, Hong HJ, Mathema VB, Koh YS. 2012. Anti-inflammatory activity of *Carpinus tschonoskii* leaves extract in R848-stimulated bone marrow-derived macrophages and dendritic cells. *J. Bacteriol. Virol.* **42**: 77–82.
  15. Keyse SM, Tyrrell RM. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblast by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 99–103.
  16. Kim MK, Kim SC, Kang JI, Boo HJ, Hyun JW, Koh YS, et al. 2010. Neuroprotective effects of *Carpinus tschonoskii* MAX on 6-hydroxydopamine-induced death of PC12 cells. *Biomol. Ther.* **18**: 454–462.
  17. Kim RG, Shin KM, Chun SK, Ji SY, Seo SH, Park HJ, et al. 2002. *In vitro* anti-inflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Yakhak Hoeji.* **46**: 343–347.
  18. Lee JH, Min DB. 2006. *Handbook of Functional Lipids*, pp. 325–350. CRC Press, Florida.
  19. Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, et al. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**: 5375–5381.
  20. Lee SJ, Lim KT. 2008. Phytoglycoprotein inhibits interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 via p38 mitogenactivated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Naunyn. Schmi. Arch. Pharmacol.* **377**: 45–54.
  21. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 233–240.
  22. Lee YS, Choi JB, Joo EY, Kim NW. 2007. Antioxidative activities and tyrosinase inhibition of water extracts from *Ailanthus altissima*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 1113–1119.
  23. Lim NK, Lee DS, Yeo SH, Kim YC, Jeong GS. 2012. Involvement of Heme Oxygenase-induction in the neuroprotective activity of extract of siegesbeckia herba in murine hippocampal HT22 Cells. *Korean J. Pharmacogn.* **43**: 316–322.
  24. McKee T, McKee JR. 2002. *Biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. pp. 319–325, Prentice Hall, New York.
  25. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051–3064.
  26. Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. 2004. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1414–1421.
  27. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.* **275**: 15466–15473.
  28. 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.
  29. Perry LM. 1990. *Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses*. pp. 431. The MIT Press, London, UK.
  30. 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.
  31. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**: 4244–4250.
  32. Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. 2000. Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **8**: 342–350.
  33. 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.
  34. Schmidt H, Walter U. 1994. NO at work. *Cell* **78**: 919–925.
  35. Shan Y, Lambrecht RW, Donohue SE, Bonkovsky HL. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**: 2651–2653.
  36. Shapira L, Soskolne WA, Houry Y, Barak V, Halabi A, Stabholz A. 1996. Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline; correlation with

- inhibition of cytokine secretion. *Infect. Immun.* **64**: 825–828.
37. Shin DC, Kim GC, Song SY, Kim HJ, Yang JC, Kim BA. 2013. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from *Dendropanax morbifera*, corni fructus and lycii fructus. *Korean J. Herbol.* **28**: 95–100.
38. Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. 1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.* **245**: 173–176.
39. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**: 748–755.
40. Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, Banskota AH, Nagaoka T, Xiong Q, et al. 2001. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Ethnopharmacol.* **77**: 209–217.
41. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B.* **39**: 44–84.
42. Willoughby DA. 1975. Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **34**: 471–478.
43. Zhang R, Kang KA, Piao MJ, Park JW, Shin TY, Yoo BS, et al. 2007. Cytoprotective activity of *Carpinus tschonoskii* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. *Nat. Prod. Sci.* **13**: 118–122.