

건강 Ethyl acetate 분획의 선충에 대한 수명연장 효과

이은별¹ · 김준형¹ · 임재윤¹ · 김혜수² · 김대성² · 김주은¹ · 김효신¹ · 이정호³ ·
문광현³ · 정경옥³ · 한순천¹ · 김대근^{1*}

¹우석대학교 약학대학, ²한풍제약, ³(재)순창건강장수연구소

Longevity Property of Ethyl acetate Fraction of Dried *Zingiber officinale* in *Caenorhabditis elegans*

Eun Byeol Lee¹, Jun Hyeong Kim¹, Jae-Yoon Leem¹, Hye-Soo Kim², Dae-Sung Kim², Ju Eun Kim¹,
Hyo Sin Kim¹, Jeong Ho Lee³, Kwang Hyun Moon³, Kyung Ok Jeong³
Sooncheon Han¹ and Dae Keun Kim^{1*}

¹College of Pharmacy, Woosuk University, Jeonju 55338, Korea

²Hanpoong Pharm. Co., LTD, Wanju 55316, Korea

³Sunchang Research Institute of Health and Longevity, Sunchang 595-912, Korea

Abstract – This study was performed to evaluate the lifespan extending effects of the dried ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae). Ethanol extract of the dried ginger was successively partitioned as methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and H₂O soluble fractions, and lifespan-extending effects of the fractions were investigated using *Caenorhabditis elegans* model system. Ethyl acetate-soluble fraction showed the most potent longevity property. Furthermore, ethyl acetate-soluble fraction elevated thermal stress tolerance, and increased expression of stress resistance protein. Further studies were performed to investigate several aging-related factors such as reproduction, food intake, growth and movement of *C. elegans*. The results revealed that there were no significant changes in aging-related factors including reproduction, food intake and growth, however, ethyl acetate-soluble fraction treatment led to an up-regulation of locomotory ability of aged worms, suggesting ethyl acetate-soluble fraction affected healthspan as well as lifespan of nematode.

Keywords – *Zingiber officinale*, *Caenorhabditis elegans*, Longevity

노화는 모든 인간이 겪어야 하는 자연현상으로 유전적인 요인을 비롯하여 환경적, 생활방식 등의 복합적인 요인에 의해 생리적인 기능저하뿐만 아니라 결과적으로 각종 질병을 야기시키고 결국은 사망에 이르게 한다. 노화인구의 증가는 의료비용의 증가와 건강관리 비용의 증가를 초래하여 사회적 문제를 일으킨다. 따라서 노화관련 질병의 예방이나 조기치료는 개인이나 사회의 경제적인 부담을 적게 하고 삶의 질을 높이는데 효과적인 방법이 될 수 있다.¹⁻³⁾ 이에 인체의 노화를 촉진하며 질병을 일으키는 것으로 알려진 활성 산소종의 생성을 억제하거나 제거할 수 있는 천연자원의 발굴이 필요한 실정이며, 실제로 산화적 스트레스 등의

각종 스트레스를 억제하고 노화를 지연시키며, 수명을 연장할 수 있을 가능성이 있는 천연물 유래 화합물들이 지속적으로 보고되고 있다.^{4,5)}

건강은 생강(*Zingiber officinale*, Zingiberaceae)을 말린 것으로 전통적으로 위장장애를 비롯하여 소화불량, 구역, 구토 및 감기 등의 치료에 이용되어 왔다.⁶⁾ 생강과 건강은 gingerol 유도체와 같은 diarylheptanoid계 유사 화합물들이 다수 보고되어 있으며, 간보호 효과, 강심, 세포독성 등이 보고되어 있다.⁷⁻¹⁰⁾

본 연구에서는 건강 알코올 추출물의 용매 분획물을 예쁜 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 사용하여 각 분획물의 수명연장 효능을 확인하였다. 또한, 수명연장의 기전적인 연구로 열 스트레스에 대한 저항성을 확인하였으며, 이와 관련된 스트레스 저항효능을 확인하는 기전확인의 일환으로

*교신저자(E-mail): dkkim@woosuk.ac.kr
(Tel): +82-63-290-1574

형질 전환된 선충을 대상으로 열 스트레스 저항성 단백질 발현 여부를 측정하여 살펴 보았다. 그 외에 노화 관련 인자로 생식능력, 몸길이 변화, 음식섭취량 및 운동량을 측정하여 건강 ethyl acetate 분획이 선충의 수명연장에 미치는 효능을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 실험에 사용한 사용한 건강은 2015년에 한풍 제약에서 제공받아 김대근교수가 검증한 후에 실험에 사용하였으며, 표준품은 우석대학교 약학과 생약표본실에 보관하고 있다(WSU-15-012).

추출 및 분획 - 건강 152 g을 절편으로 분쇄하여 50% ethanol로 진탕하면서 90°C에서 5시간씩 2회 온침 추출하였다. 추출액을 농축하여 ethanol엑스를 약 20 g을 얻었으며, 엑스를 증류수로 현탁시키고 상법에 따라 동량의 methylene chloride(5.1 g), ethyl acetate(2.3 g) 및 *n*-butanol(8.9 g)의 순으로 용매 분획하여 각각의 분획을 확보하였다.

***Caenorhabditis elegans*의 배양**¹¹⁾ - *C. elegans*(N2: wild type)는 Caenorhabditis Genetic Center(CGC; University of Minnesota, Minneapolis, MN)로부터 제공받은 것을 사용하였으며, *Escherichia coli* OP50를 도말한 Nematode Growth Medium(NGM) agar plate에 20°C에서 배양하였다. 건강 분획물을 DMSO를 용매로 한 stock solution을 제조하고 멸균시켜 일정량씩 NGM plates(50°C)에 첨가하였으며, 최종 DMSO농도는 모든 상태에서 0.1%(v/v)를 유지하였다.

수명연장효능평가¹²⁾ - 수명연장분석은 20°C에서 독립적으로 3회 실행하였다. 선충의 성장단계를 일치시키기 위해 NGM plate로부터 알만을 따로 분리하여 건강 분획 수용액을 첨가한 각각의 plate에 옮겨 배양하였고 매일 생존여부를 확인하였다. 생존여부의 확인은 *C. elegans*를 platinum wire의 끝으로 자극했을 때 반응이 없는 경우를 사망상태로 간주하였다.

온도에 의한 스트레스 저항성 평가¹³⁾ - 성장단계가 동일한 선충을 각각의 농도별로 NGM plate에서 배양하였다. 온도에 의한 내성을 분석하기 위해 선충을 신선한 배지로 옮기고 성체가 된 후 4일째에 36°C에서 배양하여 시간 별로 생존율을 24시간 동안 측정하였다(건강 ethyl acetate 분획물 250, 500 µg/mL).

형광 발현강도 정량 및 분석 - 형질 전환된 선충 HSP-16.2::GFP를 포함한 CL2070를 시료가 각 농도별로 투여된 배지에 배양하였다(건강 ethyl acetate분획 250, 500 µg/mL). 성체가 된 후 4일째에 사용되었으며, 현미경 관찰 전 CL2070는 2 시간 동안 36°C에서 열 스트레스를 가하고 4시간 동안 20°C에서 회복시켰다. 모든 개체의 선충은 sodium azide (2%)로 마취시켰고 GFP 발현은 형광 실체 현미경(Olympus, Japan)로 관찰 하였다. 발현강도를 정량, 분석 하기 위해 현미경을 이용한 사진 촬영과 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

노화 관련인자 분석 - 건강 ethyl acetate 수용액을 처리한 plate에서 성장 단계가 동일한 N2 선충을 배양하였다. 생식능 측정은 모체와 자손을 구별하기 위해 L4 유충을 개별

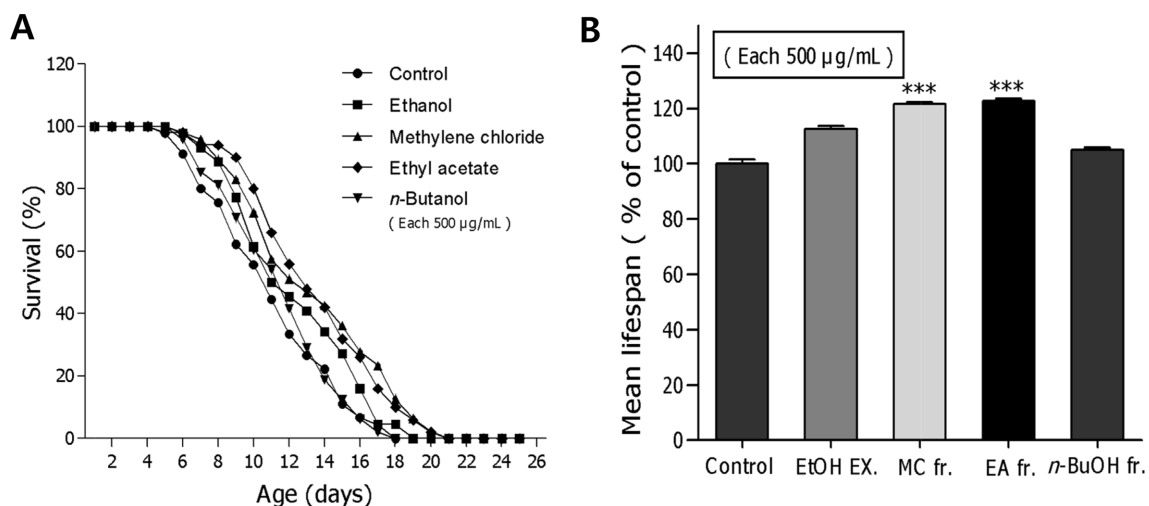


Fig. 1. Effects of fractions from dried ginger on the lifespan of wild-type N2 nematodes. Worms were grown in the NGM agar plate at 20°C in the absence or presence of fractions. The number of worms used per each lifespan assay experiment was 44-50 and three independent experiments were repeated (N=3). (A) The mortality of each group was determined by daily counting of surviving and dead animals. (B) The mean lifespan of the N2 worms was calculated from the survival curves. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. Error bars represent the standard error of mean (S.E.M.). Differences compared to the control were considered significant *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA.

적으로 매일 깨끗한 plate에 옮겼으며, 자손은 L2 또는 L3 단계에서 계산되었다. 그리고 선충의 식이량을 알아보기 위해 4일과 8일된 성충을 깨끗한 NGM plate로 옮겨 1분 동안 인두의 움직임에 측정하였다. 또한 선충의 몸길이는 4일째, 운동량은 성체 4일, 8일째에 측정하였다. 몸길이와 운동량은 Olympus software(Olympus, Japan)를 이용해 분석하였다(건강 ethyl acetate분획 250, 500 µg/mL).

통계 분석 - 통계 자료의 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M.)로 표시 하였으며, 그룹 간의 통계적 유의성 검정은 Student's t-test를 통해서 분석하였고, 선충의 연속적인 생존도는 Log-rank test분석 방법을 이용하였다. p 값은 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

C. elegans 수명 연장효능 - 야생형 N2 선충을 이용하여 건강 ethyl acetate 분획의 수명에 미치는 영향을 관찰하였으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 건강 분획 중 에틸아세테이트 분획은 *C. elegans*의 수명을 농도의존적으로 증가시켰다. 대조군의 평균 수명 시간은 11.1 ± 0.4 일이었고, 건강의 ethyl acetate 분획에서 선충의 평균 수명을 13.5 ± 0.5 일이었다(22.2% , $***p<0.001$, Fig. 1, Table I).

열 스트레스 저항성 증가 효능 - 건강 ethyl acetate 분획의 선충에 대한 열 스트레스 저항성에 미치는 영향은 고온

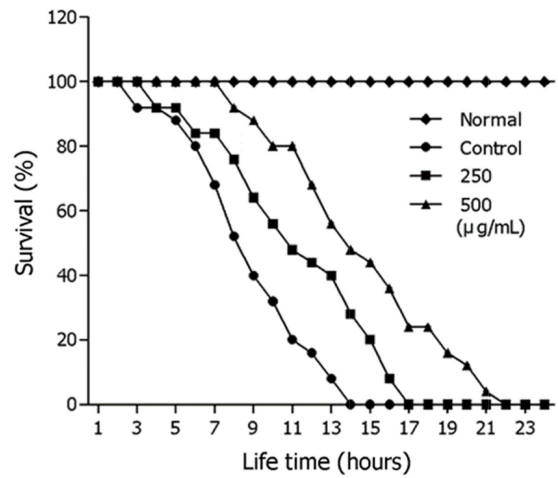


Fig. 2. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from the dried ginger on the thermal stress tolerance of wild-type N2 nematodes. To assess thermal tolerance, worms were incubated at 36°C and then their viability was scored. Statistical difference between the curves was analyzed by log-rank test. All experiments were done in triplicates.

스트레스 조건 하에서 선충을 배양하여 생존율을 확인하였다. 선충에게는 고온 조건인 36°C에서 생존율을 관찰한 결과 대조군은 3시간 만에 죽기 시작하여 14시간에 모두 사멸한 반면 건강 ethyl acetate 분획 처리군은 250, 500 µg/mL 농도에서 각각 17시간, 22시간으로 생존율이 향상되었다. 대조군의 평균 생존시간이 13.3 ± 0.6 시간이었으나 500 µg/mL

Table I. Effects of fractions from the dried ginger on the lifespan of wild-type N2.

Fraction	Mean lifespan (day)	Maximum lifespan (day)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
Control	11.1 ± 0.4	18	-	-
Ethanol	12.4 ± 0.5	19	11.6	-
Methylene chloride	13.4 ± 0.6	21	21.0	$***p<0.001$
Ethyl acetate	13.5 ± 0.5	21	22.2	$***p<0.001$
n-Butanol	11.5 ± 0.5	18	4.2	-

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at $***p<0.001$.

Table II. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from the dried ginger on the stress tolerance of wild-type N2

Stress condition	Fraction	Mean lifespan (h)	Maximum lifespan (h)	Change in mean lifespan (%)	Log-rank test
36°C	Control	13.3 ± 0.6	14	-	-
thermal	250 µg/mL	15.3 ± 0.8	17	27.9	$***p<0.001$
tolerance	500 µg/mL	17.3 ± 0.8	22	65.7	$***p<0.001$

Mean lifespan presented as mean±S.E.M data. Change in mean lifespan compared with control group (%). Statistical significance of the difference between survival curves was determined by log-rank test using the Kaplan-Meier survival analysis. Differences compared to the control were considered significant at $***p<0.001$.

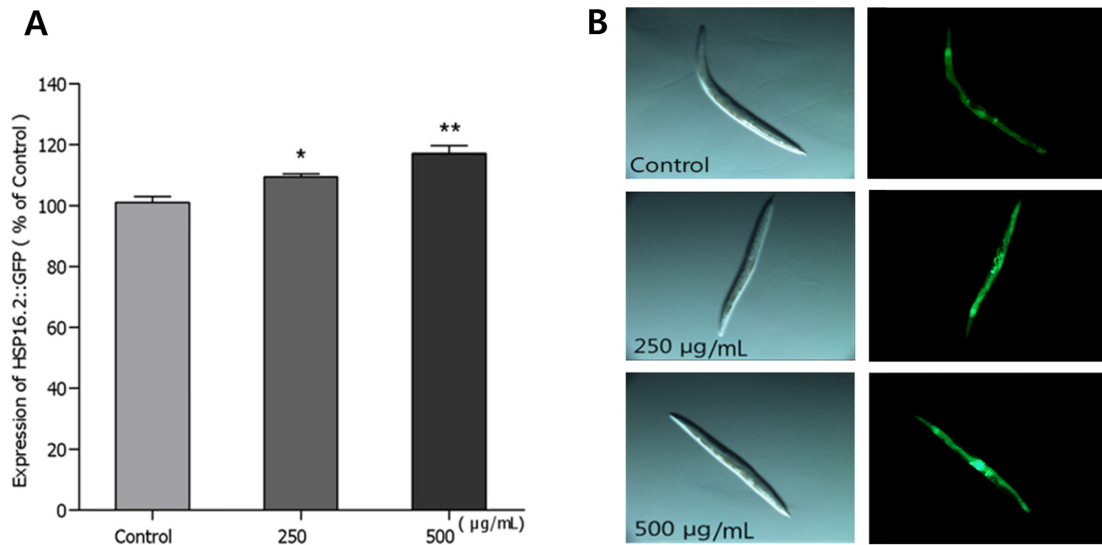


Fig. 3. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from the dried ginger on the expression of HSP-16.2 in *C. elegans*. (A) Mean GFP intensity of CL2070 mutant was represented as mean \pm S.E.M. of values from 19 to 25 worms per each experiment. (B) Images of 16.2::GFP expressions of CL2070 worms in the presence or absence of ethyl acetate-soluble fraction. Data are expressed as the mean \pm standard deviation of three independent experiments (N=3). Differences compared to the control were considered significant at * p <0.05 and ** p <0.01 by one-way ANOVA.

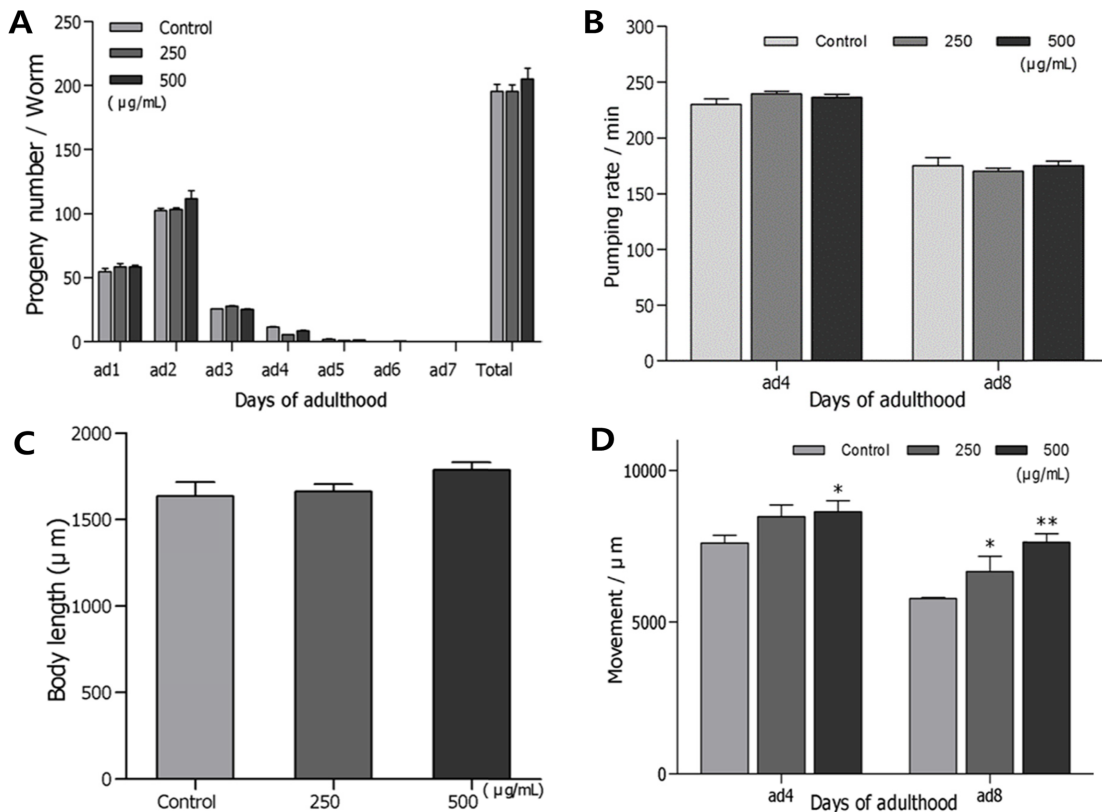


Fig. 4. Effects of ethyl acetate-soluble fraction from the dried ginger on the various aging-related factors of wild-type N2 nematodes. (A) Daily and total reproductive outputs were counted. The progeny was counted at the L2 or L3 stage. (B) On the 4th and 8th days of adulthood, the pharyngeal pumping rates were measured. (C) For the grown alteration assay, photographs were taken on 4th days of worms and the body length of each animal was analyzed. (D) The body movements were counted on 4th and 8th days of adulthood worms under a dissecting microscope for 20 seconds.

농도 처리군은 17.3 ± 0.8 시간 (** $p < 0.001$)으로 65.7% 평균 생존 시간을 향상시켰다(Fig. 2, Table II).

형질 전환 선충 HSP-16.2의 발현 증가 - 열 스트레스 조건 하에서의 내성 스트레스 반응 유전자의 증가 여부를 알아보기 위해, HSP-16.2를 포함한 형질 전환 선충 CL2070을 사용하였다. CL2070 유전자를 포함한 선충을 2시간 동안 36°C 에서 열처리를 하고 2시간 동안 20°C 에서 회복시킨 후 HSP-16.2::GFP 형광 강도를 정량한 결과, 건강의 ethyl acetate 분획 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 투여군은 열 충격에 의해 유발된 HSP-16.2::GFP 발현을 15.9% (** $p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 3A, 3B).

노화 관련인자의 변화 - 건강 ethyl acetate 분획 처리가 선충의 수명 메커니즘에 미치는 영향을 확인하기 위해 생식, 섭식, 몸길이 및 운동량을 측정하였다. 건강 에틸아세테이트 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 분획 처리군은 대조군에 비하여 선충의 생식능력과, 4일과 8일째의 먹이 섭취량의 변화 및 몸길이의 변화에 있어 미세한 증가는 있었으나 유의성이 없었다(Fig. 4A, 4B, 4C). 그러나 4일과 8일째 선충의 움직임 측정 결과 4일째에 대조군에 비해 운동량이 다소 증가하였으나 농도에 따른 유의성을 확실하게 보여주지 못했으나, 8일째에는 대조군과 비교하여 농도의존적으로 운동량이 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 5D).

고 찰

건강의 에탄올 추출물을 methylene chloride, ethyl acetate 및 butanol을 이용하여 용매분획을 실시하고 각 분획에 대하여 예쁜꼬마선충을 모델로 사용하여 수명에 미치는 영향을 확인하였다. *E. coli*를 먹이로 하는 예쁜꼬마선충은 약 1 mm 정도의 크기이며 몸이 투명하지만 실체 현미경으로 쉽게 관찰이 가능하고, 20°C 에서 20일 정도의 짧은 수명을 가지고 있어 최근 천연물을 이용한 수명연장 실험에 이용되고 있다.¹⁴⁾ 건강 분획의 수명연장 비교실험을 위해서 일반적인 배양환경에서의 야생형 N2 선충을 이용하였으며, 시간에 따른 선충의 생존율을 확인하였다. 선충의 생존율을 측정된 결과 건강 ethyl acetate 분획이 가장 높은 생존율을 나타냈다. 선충의 수명 연장 효능은 선충의 생존과 수명에 영향을 주는 스트레스와 관련이 되어 있으므로 생존율과 수명연장에 영향을 미치는 열 스트레스 조건에서 선충의 저항성을 측정 하였다.¹²⁾ 열 스트레스 조건에서 건강의 ethyl acetate 분획을 처리한 선충군이 대조군에 비해 높은 생존율을 보였으며, 이는 전보에서 확인한 juglone으로 유발시킨 산화적 스트레스 조건에서도 같은 결과를 보였다.¹³⁾ 이 결과는 건강의 ethyl acetate 분획의 선충에 대한 수명연장 효능이 열과 산화적 스트레스 저항성과 상당한 관련이 있음을 시사한다. 열 스트레스 조건하에서 heat shock protein-

16.2(HSP-16.2)을 발현시키는 선충의 mutant를 이용하여 건강의 ethyl acetate 분획이 이 단백질의 발현에 미치는 영향을 살펴 본 실험에서는 건강의 ethyl acetate 분획이 열 스트레스를 가할 시에 저항성을 나타내는 HSP-16.2 단백질 발현이 대조군과 비교하여 상당히 증가시킨 것이 관찰되었다. 이는, GFP-fused transgenic strain CL2070을 이용하여 juglone으로 인한 산화적 스트레스 저항성 확인실험에서도 건강의 ethyl acetate 분획 처리군의 형광 발현율이 상당히 증가함이 확인되어 산화적 스트레스에도 저항성이 있음이 보고된¹³⁾ 내용과 더불어 열과 산화적 스트레스에 저항할 수 있는 능력이 노화방지 및 수명연장과 상당한 관련이 있음을 추측할 수 있다. 또한, 건강 ethyl acetate 분획의 선충 내 항산화 효소인 SOD, catalase의 활성 증가와 선충 내의 활성산소종 축적억제 효과¹³⁾ 및 gingerol과 shogaol 유도체들의 항산화 활성과 항염증 효능 등은¹³⁾ 선충의 수명을 연장시키는데 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

건강 ethyl acetate 분획을 노화와 관련된 선충의 구조적, 기능적인 면에 미치는 영향을 실험하기 위해 선충의 생식, 먹이 섭취에 따른 인두의 움직임 횟수, 몸길이와 운동량 등을 측정된 실험에서 생식능, 섭식량, 몸길이의 변화는 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 다만, 운동량에서는 농도의존적으로 유의성 있는 변화를 나타내 운동량의 향상이 선충의 수명연장에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다.

결 론

건강의 ethyl acetate 분획은 예쁜꼬마선충을 실험 모델로 사용한 수명연장실험에서 대조군보다 유의성 있는 강한 수명연장 효과를 보여 주었다. 열에 의한 스트레스 저항성을 알아보기 위한 스트레스 저항성 평가에서 ethyl acetate 분획 처리군이 열 스트레스 조건하에서 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 생존율이 증가하는 것이 확인되었다. 이와 관련하여 HSP-16.2를 발현시키는 선충의 mutant를 이용하여 건강의 ethyl acetate 분획이 이에 미치는 영향을 확인한 실험에서는 건강의 ethyl acetate 분획이 열 스트레스를 가할 시에 저항성을 나타내는 HSP-16.2 단백질 발현이 대조군과 비교하여 상당히 증가시킨 것이 확인되었다. 한편, 수명에 미치는 노화 관련 인자를 측정된 결과 건강의 ethyl acetate 분획 처리가 선충의 생식능력과 몸길이의 변화 및 음식 섭취량에는 유의성 있는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나, 운동량을 유의성 있게 증가시켜는 것이 확인되어 선충의 수명연장에 어느 정도 영향이 있음을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2017년 산업통상자원부(MOT), 한국산업기술

진흥원(KIAT)의 지역주력산업육성사업(Grants No. R0004383)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

인용문헌

- Ling, S. and Xu, J. W. (2016) Biological activities of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside in antiaging and antiaging-related disease treatments. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016** (doi: 10.1155/2016/4973239).
- Bian, A., Neyra, J. A., Zhan, M. and Hu, M. C. (2015) Klotho, stem cells, and aging. *Clin. Interv. Aging* **10**: 1233-1243.
- Gao, L., Duan, D. D., Zhang, J. Q., Zhou, Y. Z, Qin, X. M. and Du, G. H. (2016) A Bioinformatic approach for the discovery of antiaging effects of baicalein from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Rejuvenation Res.* **19**: 414-422.
- Pandey, R., Gupta, S., Shukla, V., Tandon, S. and Shukla, V. (2013) Antiaging, antistress and ROS scavenging activity of crude extract of *Ocimum sanctum* (L.) in *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900). *Indian J. Exp. Biol.* **51**: 515-521.
- Tiwari, S., Singh, S., Pandey, P., Saikia, S. K., Negi, A. S., Gupta, S. K., Pandey, R. and Banerjee, S. (2014) Isolation, structure determination, and antiaging effects of 2,3-pentanediol from endophytic fungus of *Curcuma amada* and docking studies. *Protoplasma* **251**: 1089-1098.
- But, P. P. H., Kimura, T., Guo, J.-X. and Sung, C. K. (1997) International collation of traditional and folk medicine, 400. World Scientific, Singapore.
- Ma, J., Jin, X., Yang L. and Liu, Z.-L. (2004) Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **65**: 1137-1143.
- Hasan, I. H., El-Desouky, M. A., Hozayen, G. and Abd el Aziz, G. M. (2016) Protective effect of *Zingiber officinale* against CCl₄-induced liver fibrosis is mediated through downregulating the TGF- β 1/Smad3 and NF- κ B/I κ B pathways. *Pharmacology* **97**: 1-9.
- Shoji, N., Iwasa, A., Takemoto, T., Ishida, Y. and Ohizumi, Y. (1982) Cardiogenic principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J. Pharm. Sci.* **71**: 1174-1175.
- Wei, Q.-Y., Ma, J.-P., Cai, Y.-J., Yang, L. and Liu, Z.-L. (2005) Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 177-184.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S. and Johnson, T. E. (1995) Thermo tolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 7540-7544.
- Lee, E.Y., Shim, Y. H., Chitwood, D. J., Hwang, S. B., Lee, J. and Paik, Y. K. (2005) Cholesterol-producing transgenic *Caenorhabditis elegans* lives longer due to newly acquired enhanced stress resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**: 929-936.
- Guha, S., Natarajan, O., Murbach, C. G., Dinh, J., Wilson, E. C., Cao, M., Zou, S. and Dong, Y. (2014) Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. *Nutrients* **21**: 911-921.
- Zhang, L., Jie, G., Zhang, J. and Zhao, B. (2009) Significant longevity-extending effects of EGCG on *C. elegans* under stress. *Free Radic. Biol. Med.* **46**: 414-421.
- Lee, B. L., Kim, J. H., Leem, J.-Y., Kim, H.-S., Kim, D.-S., Eun, J. S., Han, S. and Kim D. K. (2015) Anti-oxidative activity of ethyl acetate fraction of the dried ginger in *Caenorhabditis elegans*. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**: 179-185.
- Masuda, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M. and Nakatani, N. (2004) Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors* **21**: 293-296.
- Ghasemzadeh A, Jaafar, H. Z. and Rahmat, A. (2015) Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complement Altern. Med.* **15**: 258.
- Justo, O. R., Simioni, P. U., Gabriel, D. L., Tamashiro, W. M., Rosa, Pde T. and Moraes, A. M. (2015) Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. *BMC Complement Altern. Med.* **15**: 390.

(2017. 3. 3 접수; 2017. 3. 14 심사; 2017. 3. 20 게재확정)