

Anti-Oxidative and Anti-Neuroinflammatory Effect of Ethanol Extracts from Walnuts's (*Juglans regia* L.) Shell

Hyun Kang^{†,*}

Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University,
Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea

In this study, antioxidant and anti-neuroinflammatory of ethanol extracts from walnuts's (*Juglans regia* L.) shell were investigated *in vitro*. Radical-scavenging activities of the walnuts's shell ethanol extracts (WSE) were examined by using ABTS radicals and α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radicals assay. In the ABTS and DPPH radical scavenging activity, RC_{50} of WSE were measured as 15.74 and 40.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Also, to evaluate the anti-neuroinflammatory effects of WSE in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV-2 microglial cells. The production of proinflammatory cytokines NO were examined by LPS in BV-2 cell. BV-2 cells activated with LPS were treated with various doses (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) of WSE. Supernatants were analyzed for the production of NO using Griess reagent. WSE up to 10 $\mu\text{g/mL}$ still required to inhibit NO induced by LPS. These results showed that walnuts's (*Juglans regia* L.) shell can be used as an easily accessible source of natural anti-neuroinflammatory and natural antioxidants.

Key Words: Walnuts, Anti-inflammatory activity, ABTS, Microglial cells, NO

서 론

호두(Walnut; *Juglans regia* L.)는 가래나무과 호두나무 (*Juglans sinensis*) 속에 속하는 낙엽교목 또는 소교목의 열매로 유럽 및 아메리카 대륙에 걸쳐 중국 및 아시아에 널리 분포하고 있다(Seo et al., 2001). 주로 식용으로 사용되고 있는 호두의 열매에는 불포화 지방산 오메가-3인 알파-리놀렌산(ALA)이 주된 성분이며 비타민 B1, B2 등의 성분이 풍부하여 식품뿐만 아니라 화장품 원료로 활용되고 있다(Grosso et al., 2014). 열매뿐만 아니라 호두의 껍질과 잎 등의 부산물은 화장품이나 의약품 분야에서 사용되어 왔다(Stampar et al., 2006). 특히, 호두의 껍질은 상처 치유 등에 사용되어져 왔으며, 많은 양의 폴리페놀 화합

물을 함유하고 있어 항산화력이 우수하나(Maqsood and Benjakul, 2010) 해마다 많은 양이 생산되어져 버려지고 있다(Akbari et al., 2012).

DNA에 손상을 유발할 수 있는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 미토콘드리아, 식세포 및 세포질에서 정상적인 체내 대사과정에서 생성된다(Valko et al., 2007). ROS에는 superoxide radical anion ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2)가 있고, 이들 가운데 hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$)의 손상반응이 가장 강하게 작용하는 것으로 알려져 있다(Liu and Ng, 2000). 생체에서는 이러한 ROS를 방어하는 superoxide dismutase, catalase, glutathion reductase 등의 항산화 효소들에 의해 산소 상해에 대한 저해와 방어가 가능하지만(Kim et al., 1999), 과도한 ROS의 생성은 세포 손상, DNA 및 주요한 효소에

Received: November 11, 2018 / Revised: December 1, 2018 / Accepted: December 5, 2018

*Professor.

[†]Corresponding author: Hyun Kang. Department of Medical Laboratory Science, College of Health Science, Dankook University, Cheonan-si, Chungnam 31116, Korea.

Tel: +82-41-550-3015, Fax: +82-41-559-7934, e-mail: hkang@dankook.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

영향을 미쳐 노화 이외의 관상동맥질환, 염증, 뇌졸중, 암 등의 다양한 만성 및 퇴행성 질환의 발병 원인이 된다 (Kumar et al., 2010). 특히 중추신경계는 ROS를 제거하는 항산화 효소들이 충분하지 않아(Rosen et al., 1993) 제거되지 못한 ROS들은 축적되어 산화적 스트레스를 일으키고 이는 신경퇴행성 질환의 중요한 인자로 뇌 속 세포의 세포막 불포화지방산을 peroxidation 시켜 Alzheimer's disease (AD), Parkinson disease 같은 퇴행성 뇌질환의 원인이 된다 (Reynolds et al., 2007; Knott et al., 2008).

따라서 활성산소를 방어하는 항산화 물질이 여러 질병 치료의 가능성 때문에 활발히 연구되고 있으며, 특히 천연에 존재하는 항산화제에 관한 연구가 주목 받고 있다. 특히 각종 식물체에 다량으로 존재하는 천연물질 flavonoid 류와 산성 페놀화합물들이 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있는 것으로 밝혀져 이에 대한 검색이 활발히 진행되고 있다(Ames and Saul, 1987).

따라서 본 연구에서는 호두의 부산물인 호두껍질의 이용가치를 높이는 방법으로 호두껍질 추출물(WSE)을 이용하여 항산화 효과를 가지는 폴리페놀 및 플라보노이드 성분 확인 및 항산화 효과에 대해 알아보고 이러한 효과들이 항신경염증 활성에 영향을 미치는지에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

에탄올 추출물 제조

본 실험에서 사용한 충청남도 천안지역에서 구매한 것으로 호두의 껍질 부분을 분리한 후 분쇄기로 20 mesh 이하로 조분쇄하여 시료 100 g에 대해 10배의 70% 에탄올을 넣어 3일 동안 추출한 후, 추출액은 여과지(Whatman No.1 and 3, Maidstone, England)를 사용하여 여과하고 회전감압 농축기(N-1000S-WD, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조(FDU-1100, Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 항산화 활성과 항신경염증 활성 검정에 사용하였다 (Fig. 1). 이 때 WSE의 수율은 10.2%로 나타났다.

호두껍질 추출물(WSE)의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis (1912) 방법을 변형하여 측정하였다. WSE 시료를 증류수 1 mL에 녹이고 농도별로 희석 후, 희석한 샘플을 96 well-plate에 60 μ L씩 분주하였다. 증류수와 1:1 희석한 Folin 시약을 동량 첨가하고 3분

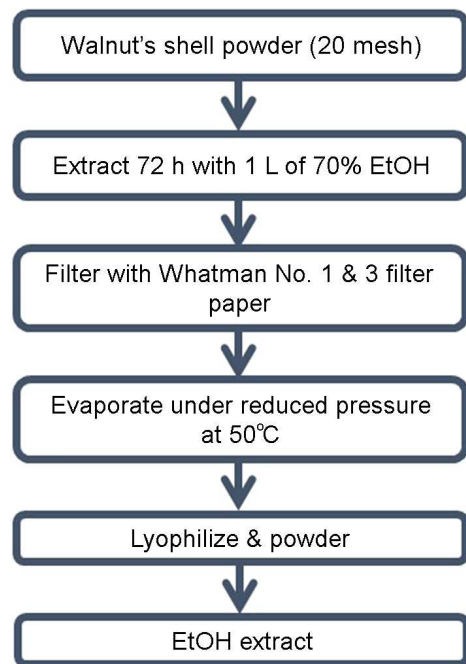


Fig. 1. Schematic diagram for preparation of ethanol extract from walnuts's (*Juglans regia* L.) shell.

간 반응시킨 후 10% sodium carbonate (Na_2CO_3)을 동량 넣고 1시간 동안 반응시켜 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)를 이용한 표준곡선은 시료 측정 방법과 동일하게 측정하여 작성하였다.

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등(Nieva et al., 2000)의 방법에 의해 측정하였다. WSE를 80% ethanol을 이용하여 농도별로 희석 후, 희석한 시료 100 μ L와 80% ethanol 860 μ L를 첨가하여 혼합 후 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate 20 μ L를 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 96 well-plate에 200 μ L씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin (Sigma Chemical Co.)을 표준물질로 표준 검량 곡선을 작성하여 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH radical 소거 활성

WSE의 유리 라디칼 소거 활성은 안정한 라디칼인 DPPH (Sigma Chemical Co.)에 대한 환원력을 측정하는 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 96 well-plate에 농도별로 희석한 시료 160 μ L와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 40 μ L를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에

서 흡광도를 측정하였다. WSE의 라디칼 소거 활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이때 positive control로 천연 항산화제인 ascorbic acid (Vit.C., Chemical Co.)를 사용하였다.

ABTS radical 소거 활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 $ABTS^{+}$ cation decolorization assay 방법(Re et al., 1999)을 변형하여 시행하였다. 14 mM 농도의 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical Co.)와 5 mM 농도의 potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온상태에 암실에서 24시간 동안 반응시켜 파랑/녹색의 ABTS radical을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 (± 0.02)이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 180 μ L에 WSE 20 μ L를 가하여 1분 동안 방치한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포주 배양

실험에 사용한 신경교세포인 BV-2 세포는 미국 하버드 의과대학에서 분양 받아 사용하였다. BV-2 세포 배양에 사용된 RPMI1640 배지(Gibco BRL, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL)을 첨가한 배지를 이용하여 5% CO_2 incubator에서 2~3일에 1회씩 계대 배양하였다.

세포독성 측정

LPS로 자극된 BV-2 세포에서 LPS 및 WSE에 대한 세포독성을 측정하기 위해 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 분석법으로 측정하였다. 세포(1×10^5 cell/mL)를 96 well-plate에 100 μ L씩 분주하여 12시간 이상 CO_2 배양기에서 배양한 다음, 새 배지 100 μ L와 WSE를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후에 2.5 mg/mL MTT를 10 μ L씩 첨가한 후 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 그 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 μ L 첨가하여 생성된 formazone 결정을 용해시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포독성은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

LPS로 활성화된 신경교세포에서 NO 생성저해 작용

BV-2 세포로부터 생성되는 활성질소종인 nitric oxide

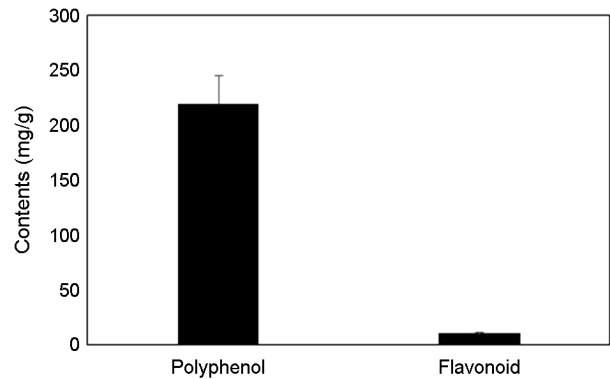


Fig. 2. Total polyphenols and flavonoids contents of walnuts' shell extract (WSE). Milligrams of total polyphenol content/g of samples based on gallic acid as standard. Milligrams of total flavonoid content/g of samples based on quercetin as standard. Each value is mean \pm S.D. (n=3).

(NO)의 양은 Green 등(1982)의 방법을 이용하여 세포 배양액 중 존재하는 NO_2^- 형태를 Griess Reagent와 반응시켜 측정하였다. BV-2 cell을 RPMI1640 배지를 이용하여 5×10^5 cells을 96 well-plate에 분주한 후 WSE를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였으며 Lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/mL를 첨가하여 다시 24시간 배양시켰다. 세포 배양액 100 μ L와 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine 25% phosphoric acid) 100 μ L를 혼합하여 96 well-plates에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. NO_2^- 의 함량 측정을 위해 $NaNO_2$ 를 농도별로 조제하여 배양액과 동일한 방법으로 측정하여 사용하였다.

통계학적 분석

대조군과 WSE 처리군의 결과에 대한 통계처리는 Student's *t*-test로 비교하였으며, 통계처리 후 *P*값이 0.01 미만일 경우 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 비교

본 실험에서는 WSE에 존재하는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 각각 gallic acid, quercetin을 기준 물질로 하여 측정하였다(Fig. 2). 그 결과, WSE의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량은 각각 220.14 ± 24.48 , 10.76 ± 0.19 μ g/mg으로 나타났다.

Table 1. Scavenging effects of ascorbic acid and ethanol extracts from walnuts's shell on 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radicals (ABTS⁺) and α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radicals (DPPH[•])

| Sample | ABTS radical | | | DPPH radical | | |
|--------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|---|
| | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Scavenging effect (%) | RC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | Concentration ($\mu\text{g/mL}$) | Scavenging effect (%) | RC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$) |
| WSE | 1 | 3.20 \pm 1.21 ²⁾ | | 5 | 2.34 \pm 1.21 | |
| | 5 | 21.41 \pm 1.23 | | 10 | 15.24 \pm 3.24 | |
| | 10 | 40.55 \pm 0.77 | 15.74 \pm 1.34 | 25 | 32.16 \pm 0.97 | 40.13 \pm 2.47 |
| | 25 | 79.22 \pm 1.73 | | 50 | 67.32 \pm 1.24 | |
| | 50 | 90.76 \pm 1.20 | | 100 | 89.34 \pm 2.87 | |
| Vit.C | 1 | 7.80 \pm 1.28 | | 1 | 13.21 \pm 0.34 | |
| | 2.5 | 23.71 \pm 0.20 | | 2.5 | 32.14 \pm 0.98 | |
| | 5 | 53.41 \pm 3.24 | 5.21 \pm 0.34 | 5 | 67.32 \pm 0.24 | 4.40 \pm 0.01 |
| | 7.5 | 78.51 \pm 6.67 | | 7.5 | 79.35 \pm 1.27 | |
| | 10 | 93.47 \pm 0.33 | | 10 | 94.32 \pm 2.34 | |

¹⁾ Concentration required for 50% reduction of free radical after starting the reaction

²⁾ Each value is mean \pm SD (n \geq 3)

ABTS 및 DPPH radical 소거 활성

WSE를 대상으로 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해 천연 항산화제로 알려진 Vit.C와 비교하여 조사하였다. WSE의 ABTS와 DPPH radical 소거능은 Table 1에 나타내었고, free radical을 50% 저해하는 시료의 농도를 RC₅₀ 값으로 나타내었다. WSE는 ABTS 라디칼 소거 활성이 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 79.22 \pm 1.73, 90.76 \pm 1.20%의 저해활성을 나타내었으며, RC₅₀ 값은 15.74 \pm 1.34 $\mu\text{g/mL}$ 로 Vit.C의 약 3배 정도 높은 값을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거 활성은 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 67.32 \pm 1.24, 89.34 \pm 2.87%의 저해활성을 나타내었으며, RC₅₀ 값은 ABTS 라디칼 소거농도 보다는 다소 높은 40.13 \pm 2.47 $\mu\text{g/mL}$ 의 값을 나타냈다.

세포생존율 측정

WSE가 BV-2 세포에 독성을 나타내지 않는 조건에서 항염증 효과를 조사하기 위해 준비된 WSE를 각각 단독 처리한 후 LPS (100 ng/mL)를 처리하여 24시간 후에 MTT assay를 이용하여 생존율을 측정하였다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 WSE를 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 모두 LPS를 동시에 처리하여도 생존율이 90% 이상으로서 BV-2 세포에 대한 독성을 나타내지 않았기에 이를 항염증 효능 실험 조건으로 선정하였다(Fig. 3).

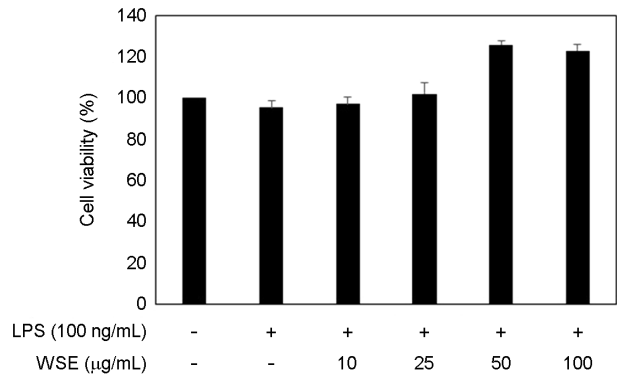


Fig. 3. Effect of walnuts's shell extract (WSE) on cytotoxicity in BV-2 cells. WSE was treated with various concentrations in BV-2 cells for 24 h. Values are expressed as the mean \pm SD (n=3) of determinations made in triplicate experiments.

LPS로 유도된 BV-2 세포의 NO 생성 증가에 미치는 호두껍질 추출물의 영향

WSE의 항염 효과를 확인하기 위하여 LPS로 자극하여 염증반응을 유도한 BV-2 cell에 WSE를 10~100 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 처리한 후, NO의 생성 농도를 확인하였다. LPS를 단독 처리하였을 때, NO 함량이 53.33 μM 로 증가되는 것을 확인하였다. 이에 반해, WSE를 처리하였을 때 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 41.16, 37.72, 16.26, 3.16 μM 의 농도로 NO가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히,

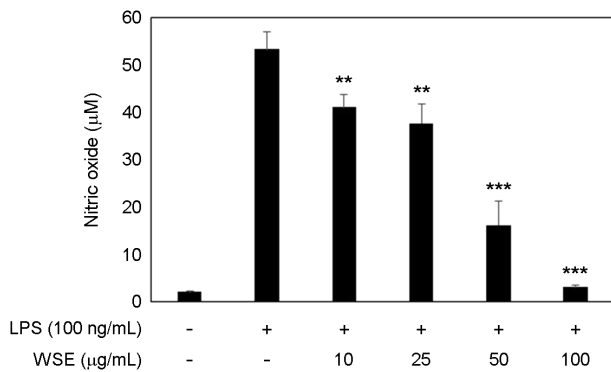


Fig. 4. Effect of walnuts's shell extract (WSE) on NO production in BV-2 cells. WSE was treated with various concentrations in BV-2 cells for 24 h. The culture supernatants were used to measure NO production. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments (n=3). ** P <0.01, *** P <0.001 when compared the groups treated with LPS (100 ng/mL) alone.

100 μ g/mL 농도에서는 대조군의 NO 생성량(2.11 μ M)과 유사하게 억제된 것을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

과다한 활성산소의 생성으로 인한 체내 산화와 항산화의 불균형은 DNA, 지질 및 단백질 등의 생체 구성요소에 산화적 손상으로 일으켜 세포 사멸을 초래하고, 이는 노화와 관련된 신경퇴행성 질환의 중요한 원인이다(Knott et al., 2008). 대표적인 신경퇴행성 질환인 알츠하이머 질환은 뇌 내 과다한 amyloid beta protein (A β)의 응집으로 인한 산화적 손상이 원인이 되어 신경세포의 사멸을 일으키며, 이는 인지능력과 기억력 저하를 초래한다(Reynolds et al., 2007). 이러한 신경퇴행성 질환을 예방하고 치료하기 위해서 부작용이 없고 안전한 식물과 식물 유래의 활성물질을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

천연식물류에 함유된 항산화 물질은 폴리페놀 화합물이 가장 많은 비율을 차지하고 있다. 이러한 폴리페놀 화합물은 산화적 스트레스나 독성이 강한 물질의 독성을 저하해 항산화 활성 및 라디칼 소거 활성을 가지는 것으로 알려져 있다(Lee and Park, 2005). 호두껍질 추출물의 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 확인한 결과 220.14 \pm 24.48, 10.76 \pm 0.19 μ g/mg의 우수한 함량을 나타냈다(Fig. 1). Jeong 등(2008)의 연구에 따르면 천연물에 다량으로 존재하는 폴리페놀성 화합물은 강력한 항산화 능력을 갖고 있어 ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성 등의 중요한 역할을 하

는 원인 물질로 보고되고 있다.

ABTS 라디칼 소거 활성은 시료에 함유된 다양한 항산화 물질에 의해 제거되어 ABTS 라디칼 특유의 청록색이 탈색되어 나타나는 색 변화를 이용한 측정법이며, 수용성 및 지용성 화합물의 항산화력을 측정하는 데 효과적으로 적용할 수 있어 널리 사용되는 방법이다(Re et al., 1999). WSE의 50 μ g/mL 농도에서 ABTS 라디칼 소거 활성은 90.76 \pm 1.20%로 나타났으며 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성이 증가하는 농도 의존적 경향을 나타냈다(Table 1). DPPH 라디칼은 비교적 안정한 자유 라디칼로서 이를 이용한 라디칼 소거 활성 실험은 여러 가지 천연식물류의 항산화 물질의 효능을 확인하는 데 사용되고 있다. 이를 이용하여 WSE의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다(Table 1). WSE는 100 μ g/mL 농도에서 89.34 \pm 2.87%로 나타났으며 양성대조군인 Vit.C와 비교하였을 때는 유의적으로 낮은 소거 활성을 나타내었지만, ABTS 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거 활성이 증가하는 농도 의존적 경향을 역시 나타냈다. Han (Han et al., 2015) 등의 연구에서 호두껍질 메탄올 추출물의 항산화 효과를 검증한 결과, ABTS와 DPPH 라디칼의 RC₅₀ 값이 각각 652.98, 112.21 μ g/mL로 본 연구에서 사용된 WSE의 라디칼 소거능이 현저히 높게 측정되는 것을 확인하였다. 이는 호두껍질의 추출 방법, 산지 등의 차이로 생각된다. 여러 연구에서 폴리페놀성 화합물은 라디칼 등을 효과적으로 소거할 수 있는 것으로 나타났는데(Jeong et al., 2008), WSE 역시 많은 폴리페놀성 화합물을 함유하고 있어 이상과 같은 연구 결과가 나타난 것으로 판단된다.

염증반응이란 외부 자극이나 다양한 유해인자에 저항하기 위한 일련의 생체방어 기전이다. 그러나, 과도한 염증반응은 세포 손상 등의 병리적 상태에 이르게 하기 때문에 염증반응을 유발하는 사이토카인이나 염증 매개체들을 조절하는 것이 염증성 질환의 치료법으로 제시되고 있다(Zamora et al., 2000). WSE가 BV-2 신경교세포에서 항염증 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 LPS로 유발되는 염증관련 인자의 억제여부를 검토하였다. 먼저 MTT assay를 이용하여 WSE의 BV-2 세포의 독성을 확인하여 세포 독성을 나타내지 않는 농도를 산출하였다(Fig. 3). NO가 지속적이고 과도하게 생성될 경우 해당 조직에서 염증성 손상을 유발하며, 이 물질은 iNOS에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 것으로 알려져 있다(Hou et al., 1999). LPS를 BV-2 세포에서의 염증 유도물질로 처리하여 전염증매

개체인 NO 생성량을 nitrite assay로 측정하였다. WSE는 100 µg/mL의 농도에서 LPS를 처리하지 않은 대조군과 유사한 감소 효과를 나타내었다(Fig. 4).

연구 결과에서 보여준 WSE는 우수한 항산화 효과 및 신경세포에 대한 항염 효과를 가지고 있는 것을 확인하였으며 본 연구 결과를 바탕으로 추가적인 기전연구 및 동물 실험이 진행된다면 염증관련 질병의 예방 및 치료에 효능이 있는 기능성 소재로 유용할 것임을 제시하고 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

None.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Akbari V, Jamei R, Heidari R, Esfahlan AJ. Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food Chemistry*. 2012. 135: 2404-2410.
- Ames BN, Saul RL. Oxidative DNA damage, cancer and aging. Oxygen and human disease. *Annals of Internal Medicine*. 1987. 107: 536-539.
- Boje KM, Arora PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*. 1992. 587: 250-256.
- Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. 1912. 12: 239-249.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J. Analysis of nitrate, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982. 126: 131-138.
- Grosso G, Galvano F, Marventano S, Malaguarnera M, Bucolo C, Drago F, Caraci F. Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014. doi: 10.1155/2014/313570.
- Han KL, Kim MR, Jo BK, Kim MJ, Kang MJ, Park KH, Koo YE, Kim BS, Jung EG, Han MD. Antimicrobial and antioxidative activities of the extracts from Walnut (*Juglans regia* L.) green Husk. *Journal of Life Science*. 2015. 25: 433-440.
- Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Current Pharmaceutical Design*. 1999. 5: 417-441.
- Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sasaborealis* leaf tea. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 2008. 40: 586-592.
- Kim TS, Kang SJ, Park WC. Changes in antioxidants and anti-oxidants enzymes activities of soybean leaves subject to water stress. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 1999. 42: 246-251.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzendacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008. 9: 505-518.
- Kumar R, Balaji S, Sripriya R, Nithya N, Uma TS, Sehgal PK. *In vitro* evaluation of antioxidants of fruit extract of *Momordica charantia* L. on fibroblasts and erantinoocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 58: 1518-1522.
- Lee HS, Park YW. Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2005. 34: 759-764.
- Liu F, Ng TB. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. *Life Sciences*. 2000. 66: 725-735.
- Maqsood S, Benjakul S. Comparative studies of four different phenolic compounds on *in vitro* antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. *Food Chemistry*. 2010. 119: 123-132.
- Nieva, Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000. 71: 109-114.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. 26: 1231-1237.
- Reynolds A, Lauriea C, Mosleya LR, Gendelmana EH. Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *International Review of Neurobiology*. 2007. 82: 297-325.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentai A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature London*. 1993. 362: 59-62.
- Valko MD, Leibfritz J, Moncol MT, Cronin M, Mazur, Telser J. Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease. *The International Journal of Biochemistry*

& Cell Biology. 2007. 39: 44-84.

Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Molecular Medicine*. 2000. 6: 347-373.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.365>

Cite this article as: Kang H. Anti-Oxidative and Anti-Neuroinflammatory Effect of Ethanol Extracts from Walnuts's (*Juglans regia* L.) Shell. *Biomedical Science Letters*. 2018. 24: 365-371.