



노루오줌 에탄올 추출물의 산화스트레스 및 대장암 세포 억제활성

노종현¹ · 장지훈¹ · 정호경 · 이무진 · 심미옥 · 정다운 · 조현우[†]

한약진흥재단

Ethanol Extracts from *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. Exhibit Inhibitory Activities on Oxidative Stress Generation and Viability of Human Colorectal Cancer Cells

Jong Hyun Nho¹, Ji Hun Jang¹, Ho Kyung Jung, Mu Jin Lee, Mi Ok Sim, Da Eun Jeong and Hyun Woo Cho[†]

National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea.

ABSTRACT

Background: *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. is a plant belonging to Saxifragaceae family and contains various active ingredients including astilbin and bergenin. It has been used as a traditional Korean medicine to improve fever, pain, and cough. Recently, a number of Korean medical resources have been studied for cancer and inflammation treatment, but *A. chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. has not yet been investigated. Consequently, this study investigated the inhibitory effect of ethanol extracts from *A. chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat. (ARE) on oxidative stress and colorectal cancer using RAW264.7 and the human colorectal cancer cell line HCT-116.

Methods and Results: In total, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARE reduced cell viability by $38.96 \pm 1.32\%$, and increased caspase-3 activity by $133.08 \pm 3.41\%$ in HCT-116 cells. Moreover, TUNEL signaling and the early apoptosis ratio ($34.56 \pm 1.67\%$) increased by 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARE treatment. H_2O_2 -induced oxidative stress and cell death were diminished by 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ARE treatment through decreasing ROS (reactive oxygen species).

Conclusions: The inhibitory effects of ARE against human colorectal cancer cells is mediated by apoptosis and caspase-3 activation, and H_2O_2 -induced ROS generation and cell death are decreased by ARE treatment in RAW264.7 cells. However, further study is required to explore how ARE treatment is involved in the signaling pathway to decrease ROS.

Key Words: *Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat., Colorectal Cancer, Oxidative Stress

서 언

노루오줌 [*Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat.]는 범의귀과 (Saxifragaceae)에 속하는 다년초로서 산지, 냇가, 습지를 포함한 대한민국 전역에서 발견된다. 전초의 길이는 70 cm 까지 자라며 잎은 호생으로 갈색의 긴 털을 가지고 있다. 개화는 주로 7 월과 8 월 사이에 일어난다 (Lee, 2003, 2007).

노루오줌의 뿌리는 적승마 (赤升麻)라고 하였고 전초는 낙신부 (落新婦)라고 불렸으며 예로부터 한의학에서 청열, 지해, 해독 및 거풍작용을 가지는 식물로 사용되었다 (Kang, 2008;

Hong *et al.*, 2015). 현재 알려진 바로, 노루오줌 메탄올 추출물은 인간 췌장암 세포주에 대한 성장 억제효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있을 뿐 다른 생리활성효능에 대해 보고된 연구 결과가 없다 (Hong *et al.*, 2015).

대장암 (colorectal cancer)은 유전적으로 가장 흔히 알려진 암으로 이에 대한 기전과 환경적인 원인이 잘 알려져 있을 뿐만 아니라, 가장 큰 특징인 주위에 가깝게 분포하고 있는 조직 간에 작용이 활발하여 다양한 전이를 초래하는 대표적인 암이다 (O'Brien *et al.*, 2007; Ogino *et al.*, 2011).

이러한 전이성 암은 초기 발생지점으로부터 혈관이나 림프

¹Jong Hyun Nho and Ji Hun Jang are contributed equally to this paper

[†]Corresponding author: (Phone) +82-61-860-2873 (E-mail) thej01234@gmail.com

Received 2018 January 31 / 1st Revised 2018 March 6 / 2nd Revised 2018 March 26 / 3rd Revised 2018 April 9 / Accepted 2018 April 9

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.

관을 통해 신체 여러 부위로 전이되기 때문에 치명적이며, 특히 우리나라에서 발병률이 급속하게 증가하고 있다고 알려져 있다 (Disibio and French, 2008; Kim, 2013). 이에 따라 암 세포의 전이 또는 초기 단계의 성장을 억제하는 과정은 대장암 치료에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Caspase-3 단백질은 세포가 정상적인 때 불활성화된 상태로 존재하지만 세포 외부나 내부에서 특정 세포사멸 프로세스가 활성화 되면 Asp²⁸/Ser²⁹ 부분과 Asp¹⁷⁵/Ser¹⁷⁶ 부분의 아미노산 서열이 절단되면서 활성화 된다 (Han *et al.*, 2015). 활성화된 caspase-3 단백질은 세포에서 apoptosis (세포자멸사) 또한 necrosis (세포괴사)가 일어나는 중에 DNA 수리를 담당하는 poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)을 억제시켜 세포사멸 과정에 관여하게 될 뿐만 아니라 다양한 세포에서 세포사멸 과정에 관련된 중요한 표지자로 이용되고 있다 (Nikoletopoulou *et al.*, 2013; Ko and Lee, 2015).

Reactive oxygen species (ROS, 활성산소종)는 일반적인 세포의 대사를 통해 합성되는 물질로 산소 (O₂)가 4 개의 전자를 받으면서 H₂O를 만드는 중에 생겨나는 부산물이다. Superoxide와 hydrogen 같은 물질이 이에 속하며, 이러한 활성산소종은 독성이 강해 세포 내부에서 DNA를 산화시키거나 지질을 산화시킴에 따라 lipid peroxide 등을 생성함으로써 세포내부에서 독성을 유발할 뿐만 아니라 대식세포의 활성화를 유도해 체내의 염증반응을 유도 한다 (Kirkham, 2007; Lee *et al.*, 2015).

따라서 세포내 산화적 손상을 억제하거나 대장암세포의 성장을 억제하는 효과를 가진 자원식물을 찾기 위해 실험을 진행하였으며, 마우스 대식세포인 세포주에 H₂O₂를 처리하여 산화스트레스를 유발하고, 휴면 대장암 세포인 HCT-116 세포주에 노루오줌 에탄올 추출물을 처리하여 암세포 억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 노루오줌 [*Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat.]의 전초는 2015년 8월경에 전남 장흥 (위도 34.53°23'N, 경도 126.91°59'E)에서 채취하였으며, 대한민국 약전 (KP)을 근거로 하여 목포대학교 한약자원학과 김휘 교수에게 의뢰하여 식물학적 동정을 거친 뒤 사용하였고 실험에 사용된 시료의 확정표본 (TKM-2108)은 한약진흥재단 한약자원본부에 보관하고 있다.

노루오줌은 멸균수로 수세한 뒤 50°C 온도의 열풍건조기에서 일주일간 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄하여, 시료 100 g에 에탄올을 500 ml 가한 뒤 100°C 조건에서 3 시간 3 회 반복하여 추출하였다. 추출된 시료는 filter paper

(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 여과하고, 여과액을 동결 건조하여 시료를 PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 뒤 사용하였다.

2. 세포배양

그리고 HCT-116 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 사용하였다.

3. 세포생존율 분석

세포생존율은 CellTiter 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay (Promega Co., Madison, WI, USA)를 사용하고 제조사에서 제공한 protocol에 따라 실험을 진행했다.

HCT-116 세포를 96 well plate에 5 × 10⁴ cells/ml 농도가 되도록 분주하고, 세포를 96 well plate에 2 × 10⁵ cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양한 후 노루오줌 에탄올 추출물을 각각 31.3, 62.5, 125, 250 그리고 500 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하였으며, MTS 시약 20 µl 를 넣고 2 시간 동안 배양한 뒤 microplate reader infinite[®] 200 PRO (TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율은 정상대조군에 대한 생존율을 %로 표시하였고 나타난 결과에 따라 추출물들의 암세포 사멸효과와 H₂O₂ 처리에 대한 세포생존율을 측정하였다.

4. Caspase-3 활성도 측정

Caspase-3 단백질의 활성도는 caspase-3 colorimetric detection kit (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)를 이용해 측정하였다. HCT-116 세포는 차가운 PBS로 세척한 뒤 Pierce[™] protease and phosphatase inhibitor mini tablets (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)가 포함된 RIPA cell lysis buffer 2 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA)로 얼음위에서 1 시간 동안 용해하였다.

세포용해액은 원심분리기로 4°C, 13,000 × g 조건에서 20 분간 원심분리 하였고, 단백질 농도를 bradford assay를 이용하여 측정하였다. 총 20 µg 의 단백질을 사용해 제조사가 제공한 프로토콜에 따라 실험을 수행하고 결과에 따라 caspase-3 단백질의 활성도를 정상대조군에 비교하여 %로 표시하였다.

5. 세포사멸비율 측정

세포사멸비율 측정은 annexin V-FITC apoptosis detection kit (Enzo Life Sciences Inc., Farthingale, NY, USA)를 사용했다. HCT-116 세포에 노루오줌 에탄올 추출물 처리 후 유도되는 apoptosis 및 necrosis의 비율을 구하기 위해 제조사에서 제공한 protocol에 따라 annexin V-FITC와 PI 시약으로 염색했으며, 염색된 세포는 CytoFLEX (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용해 분석하였다.

6. 활성산소종 측정

세포 내부에 활성산소종의 비율 측정은 DCFDA cellular ROS detection assay kit (Abcam, Cambridge, England)를 사용했다. 세포에 H₂O₂ 처리에 따른 활성산소종의 생성을 확인하기 위해 DCFDA (2'7'-dichlorofluorescein diacetate, H2DCFDA) 시약으로 염색하였으며, 염색된 세포는 CytoFLEX (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)를 이용해 분석하였다.

7. TUNEL 염색

TUNEL 염색은 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용하였으며, 제조사에서 제공된 프로토콜에 따라서 수행하였다.

HCT-116 세포를 12 well plate에서 cover slip 위에 5 × 10⁵ cells/ml 농도가 되도록 분주한 뒤, 37°C, 5% 배양기에서 24 시간 배양했다. 배양된 세포는 500 µg/ml 농도로 노루오줌 에탄올 추출물을 24 시간 동안 처리하였다. 그 후 10% NBF (neutralized buffered formalin)로 4°C에서 30 분 동안 고정하였고, 차가운 PBS (phosphate buffered saline)로 2 번 씻어 주었다. 다음으로 0.2% Triton X-100 in PBS 용액으로 10 분간 투과화 한 뒤 차가운 PBS로 2 번 씻어주었다. 티슈를 이용해 남은 액체가 없도록 모두 제거하고 키트에서 제공된 equilibration buffer를 5 분간 처리하였으며 100 µl rTdT incubation buffer를 처리하고 37°C에서 60 분 동안 배양하였다. 그 후 제공된 2 × SSC buffer를 10 분간 처리하고, PBS로 2 번 씻은 뒤 Prolong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)로 세포를 마운트하여 epi-fluorescence microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)하에 관찰하였고 DAPI와 TUNEL의 형광을 각각 알맞은 파장에서 촬영하였다.

8. 통계처리

통계처리는 평균 ± 표준편차 (Means ± SD)로 표시하였고, 처리군 간 유의성을 검정하기 위해 SPSS (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 사용하였다. 일원변량분석 (One-way ANOVA)을 실시하여, 유의성이 있는 경우 p < 0.05 수준에서, Duncan's Multiple

Range Test (DMRT)와 Tukey post-hoc test를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 노루오줌 에탄올 추출물의 대장암세포 억제효과

노루오줌 [*Astilbe chinensis* (Maxim.) Franch. Et Savat.] 에탄올 추출물이 대장암세포주인 HCT-116 세포에 대해 성장 억제효과를 나타내는지 알아보기 위해 MTS assay를 진행하였다. HCT-116 세포에 노루오줌 에탄올 추출물을 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml)로 24 시간 동안 처리하였을 때 500 µg/ml에서 세포생존율이 38.96 ± 1.32%로 감소되었

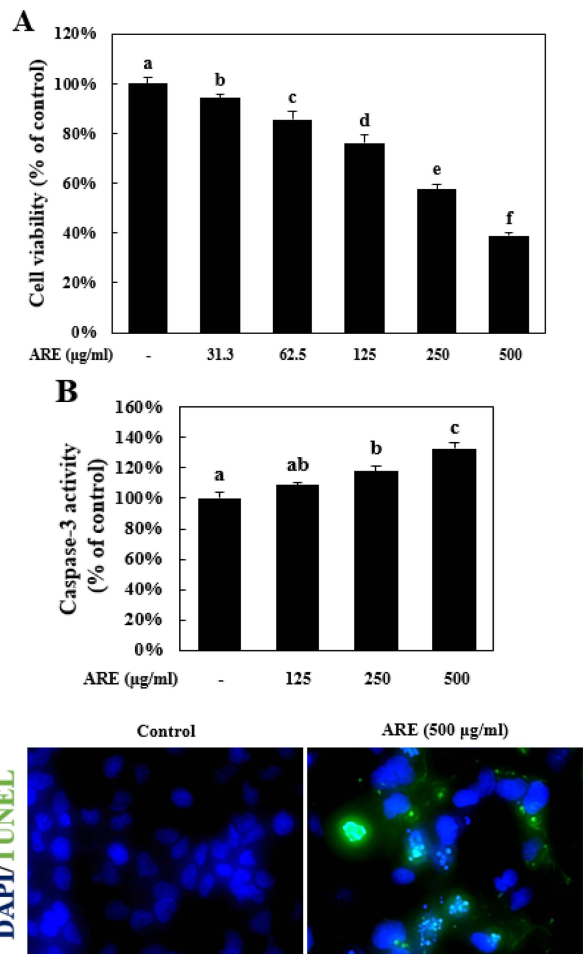


Fig. 1. ARE increased caspase-3 protein activation and DNA fragmentation in HCT-116 cells. (A) HCT-116 cells were treated with ARE for various concentration. Cell viability was measured by MTS assay, (B) caspase-3 activation was measured by caspase-3 activity assay, (C) HCT-116 cells treated with 500 µg/ml ARE, TUNEL fluorescence analyzed by TUNEL assay. *Different letters are significantly different at p < 0.05 by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Representative images were taken from at least three independent experiments.

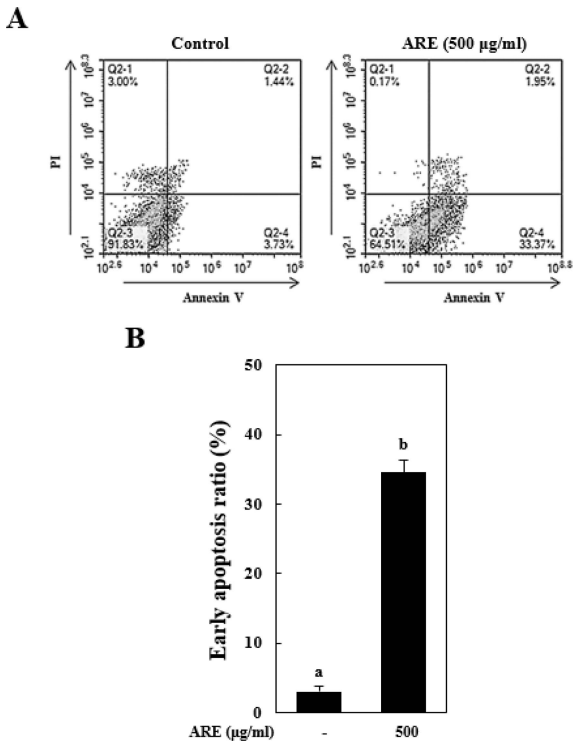


Fig. 2. ARE increased early apoptosis in HCT-116 cells. (A) early apoptosis ratio was measured by annexin V and PI staining. Data represent the means \pm SD (n = 3). *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey post-hoc test. Representative images were taken from at least three independent experiments.

다 (Fig. 1A).

Caspase-3 단백질은 다양한 암세포에서 세포사멸에 관여한다고 알려진 단백질들 중 하나로 알려져 있다 (O'donovan *et al.*, 2003; Choi, 2007). 이에 따라 HCT-116 세포에서 caspase-3 단백질 활성도를 확인해본 결과 500 µg/ml 노루오줌 에탄올 추출물 처리에 의해 정상대조군 (100%) 대비 $133.08 \pm 3.41\%$ 로 증가되었다 (Fig. 1B). 125 µg/ml 농도 처리군은 $108.97 \pm 1.81\%$, 250 µg/ml 농도 처리군은 $117.69 \pm 3.84\%$ 로 처리량이 높아질수록 caspase-3 단백질 활성도가 증가하였다.

이는 MTS assay 결과와 비교하였을 때, 500 µg/ml 농도에서 HCT-116 세포의 생존율을 $38.96 \pm 1.32\%$ 까지 감소시킨 것과 비교해 caspase-3 단백질 활성도는 처리농도대비 큰 차이가 나타나지 않아, caspase-3 단백질뿐만 아니라 암세포 사멸에 관련하는 여러 단백질들인 BAX (Bcl-2-associated X protein), BID (BH3 interacting-domain death agonist) 및 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)을 추가적으로 확인해야 할 것으로 사료된다.

다음으로 노루오줌 에탄올 추출물이 대장암세포에 대해 apoptosis 또는 necrosis를 일으키는지 알아보기 위해, HCT-

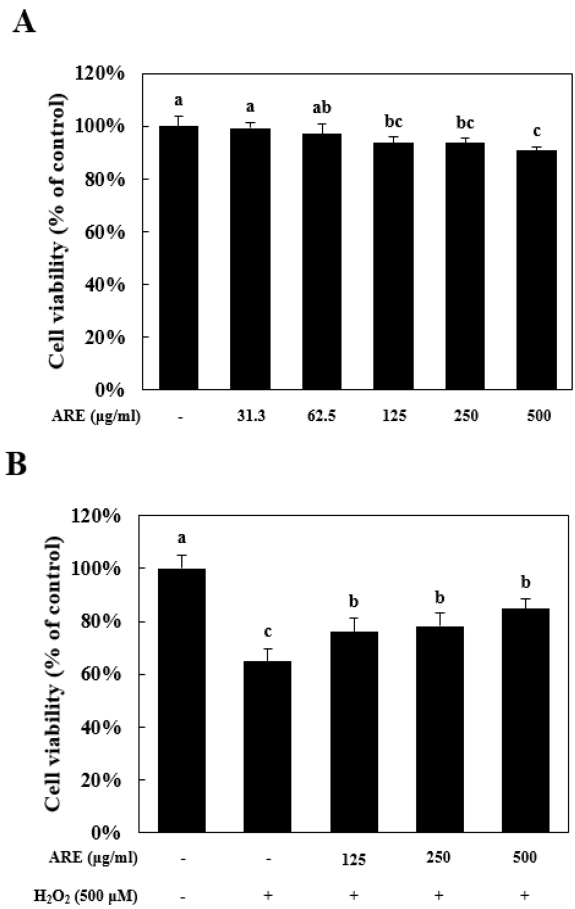


Fig. 3. ARE prevents H₂O₂-induced cell death and ROS production in RAW264.7 cells. (A) RAW264.7 cells were treated with ARE for various concentration, (B) After pretreatment with ARE for various concentration, RAW264.7 cells were treated with 500 µM H₂O₂ for 24 h. Cell viability was measured by MTS assay. *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Representative images were taken from at least three independent experiments.

116 세포주에 가장 효과가 좋게 나타났던 500 µg/ml 농도로 24 시간 동안 처리하고 TUNEL 염색을 실시한 결과, 노루오줌 에탄올 추출물 처리군에서 TUNEL 형광이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 1C).

TUNEL 은 apoptosis의 특징중 하나인 DNA 단편화를 시각화하는 방법으로 알려져 있으며 (Kyrylkova *et al.*, 2012), 이에 근거하여 노루오줌 에탄올 추출물은 HCT-116 세포주에 대해 apoptosis를 일으켜 암세포를 사멸시키는 것으로 보인다. 다음으로 annexin V and propidium iodide (PI) 염색을 통해 유세포분석기를 이용하여 apoptosis의 비율을 확인한 결과 500 µg/ml 추출물은 early apoptosis (Q2-4)를 $34.56 \pm 1.67\%$ 까지 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2A and 2B).

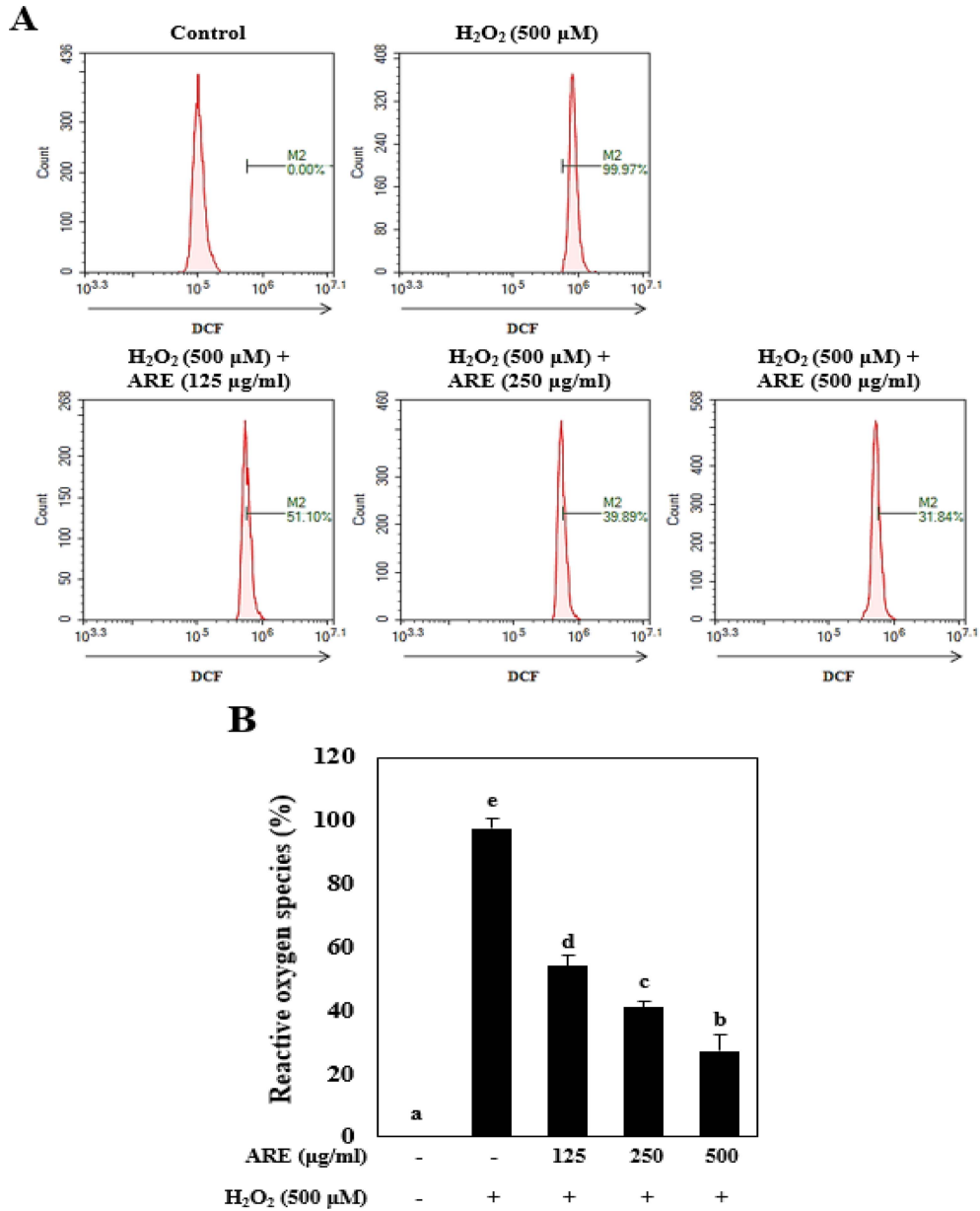


Fig. 4. ARE prevents H₂O₂-induced cell death and ROS production in RAW264.7 cells. (A and B) After pretreatment with ARE for various concentration, ROS production was measured by DCFDA staining using flowcytometry. Data represent the means \pm SD (n = 3). *Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Representative images were taken from at least three independent experiments.

노루오줌 에탄올 추출물을 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때 late apoptosis (Q2-2)가 $2.10 \pm 0.53\%$ 로 정상대조군의 late apoptosis (Q2-2)가 $1.34 \pm 0.46\%$ 인 것을 비교하였을 때 증가 폭의 차이가 크게 없는 것으로 보아 노루오줌 에탄올 추출물은 apoptosis 과정 중 early apoptosis를 촉진시키는 것으로 사료된다.

2. 노루오줌 에탄올 추출물의 항산화 효과

노루오줌 에탄올 추출물이 마우스 대식세포인 세포에서 자체적인 세포독성을 가지는지 또는 산화스트레스를 통해 세포 사멸을 유도하는 H₂O₂처리에 대한 추출물의 세포보호효과를 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였다.

세포에 노루오줌 에탄올 추출물을 다양한 농도 (31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$)로 24 시간 동안 처리하였을 때 최고농

도인 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포생존율은 $90.70 \pm 1.27\%$ 으로 정상대조군에 비해 유의적인 차이가 있었으나 세포에 직접적으로 영향을 미칠 정도의 세포독성은 나타나지 않았다 (Fig. 3A). 이어서 추출물을 125, 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 30 분 동안 전 처리한 뒤, 500 μM H_2O_2 를 24 시간 동안 처리했을 때, H_2O_2 처리군은 정상대조군과 비교하여 세포생존율이 $64.81 \pm 4.84\%$ 로 낮아진 반면 노루오줌 에탄올 추출물 처리군은 세포생존율 (125 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $75.96 \pm 5.12\%$, 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $78.16 \pm 4.95\%$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $84.78 \pm 3.5\%$)이 회복되었다 (Fig. 3B).

H_2O_2 처리에 대한 노루오줌 에탄올 추출물의 세포보호효과는 125 $\mu\text{g/ml}$ 와 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 큰 차이가 나타나지 않았지만 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포보호효과가 크게 상승하였으며, 이는 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도부터 세포보호효과가 급격히 증가될 것으로 예상된다.

다음으로 DCFDA 염색을 통해 H_2O_2 처리에 의해 증가되는 ROS에 대한 노루오줌 에탄올 추출물의 ROS 억제율을 평균치로 확인했을 때, 500 μM H_2O_2 단독처리군은 정상대조군에 비해 $97.50 \pm 3.11\%$ 가 증가되었지만 이는 500 $\mu\text{g/ml}$ 노루오줌 에탄올 추출물 처리에 의해 $27.11 \pm 5.01\%$ 까지 감소되었다 (Fig. 4A and 4B).

DCFDA는 세포내부에서 생성된 ROS를 측정할 수 있는 방법 중 하나로 산화스트레스 관련 실험 중 자주 사용되는 물질이다 (Eruslanov and Kusmartsev, 2010). 여러 연구에 따르면 ROS는 다양한 질병과 염증반응에서 매개인자로 작용하는 원인으로 알려져 있음에 따라 (Brieger *et al.*, 2012; Hsieh *et al.*, 2014), 노루오줌 에탄올 추출물이 항산화기능을 가지는 인자로서 작용하는 가능성이 있는 것으로 생각되지만 이는 항산화 관련 신호전달에 관여하는 superoxide dismutase, peroxidase, catalase 및 glutathione-S-transferase의 항산화단백질의 활성 및 단백질 발현량을 증가시키는지 또는 노루오줌 에탄올 추출물에 존재하는 여러 성분들이 retinol, ascorbic acid, α -tocopherol 같은 항산화제처럼 직접 작용하는지에 대한 추가 실험이 필요하다고 생각된다. 또한 한의학에서 노루오줌은 풍열 (風熱)을 감수하여 발생한 감기를 개선하는 풍열감모 (風熱感冒)의 효능 및 기침을 개선해주는 해수 (咳嗽)작용을 하는 것으로 알려져 있는데 (Kim, 1984; Oh *et al.*, 1992), 실험 결과에서 노루오줌 추출물이 대식세포의 산화스트레스 및 염증반응 매개 인자인 ROS를 억제하는 작용을 나타냄에 따라, 염증반응에 일부 분 관여하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한국 토종자원의 한약재기반구축사업 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ and Krause KH. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*. 142:w13659. <https://smw.ch/article/doi/smw.2012.13659> (cited by 2018 January 31).
- Choi JH. (2007). Bax protein in cancer treatment. *Journal of the Korean Medical Association*. 50:1016-1022.
- Disibio G and French SW. (2008). Metastatic patterns of cancers: Results from a large autopsy study. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 132:931-939.
- Eruslanov E and Kusmartsev S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. 594:57-72.
- Han B, Park D, Li R, Xie M, Owonikoko TK, Zhang G, Sica GL, Ding C, Zhou J, Magis AT, Chen ZG, Shin DM, Ramalingam SS, Khuri FR, Curran WJ and Deng X. (2015). Small-molecule Bcl2 BH4 antagonist for lung cancer therapy. *Cancer Cell*. 27:852-863.
- Hong JY, Park HR, Kwon YG, Kwon WY, Kim SY, Park RD and Shin SY. (2015). Anticancer properties of *Astilbe rubra* extracts on AsPC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Basic Sciences*. 32:21-28.
- Hsieh HJ, Liu CA, Huang B, Tseng AHH and Wang DL. (2014). Shear-induced endothelial mechanotransduction: The interplay between reactive oxygen species(ROS) and nitric oxide(NO) and he pathophysiological implications. *Journal of Biomedical Science*. 21:3. <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-21-3> (cited by 2017 November 13).
- Kang BH. (2008). *Hanguk sangyak jawon sangtae dogam*, Geobook, Seoul, Korea. p.487.
- Kim HS. (2013). Site-specific colorectal cancer: How is it different? *Korean Journal of Gastroenterology*. 61:63-70.
- Kim JG. (1984). *Illustrated natural drugs encyclopedia*. Namsandang, Seoul, Korea. p.441.
- Kirkham P. (2007). Oxidative stress and macrophage function: A failure to resolve the inflammatory response. *Biochemical Society Transactions*. 35:284-287.
- Ko WC and Lee SR. (2015). Effect of immature *Citrus sunki* peel extract on neuronal cell death. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:144-149.
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M and Kioussi C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis*. 887:41-47.
- Lee CB. (2003). *Coloured flora of Korea*. Hyangmunsa, Seoul, Korea. p.469.
- Lee YM, Han SI, Song BC and Yeum KJ. (2015). Bioactives in commonly consumed cereal grains: Implications for oxidative stress and inflammation. *Journal of Medicinal Food*. 18:1179-1186.
- Lee YN. (2007). *New flora of Korea*. Kyohaksa, Seoul, Korea. p.498.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K and Tavernarakis N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833:3448-3459.
- O'brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 445:106-110.

O'donovan N, Crown J, Stunell H, Hill ADK, Mcdermott E, O'higgins N and Duffy MJ. (2003). Caspase 3 in breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 9:738-742.

Ogino S, Galon J, Fuchs CS and Dranoff G. (2011). Cancer immunology-analysis of host and tumor factors for personalized

medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 8:711-719.

Oh KJ, Choi YS, Choi IS, Park SK, Lee KH, Chung SG and Cho EH. (1992). Analgesic Components of the Rhizoma of *Astilbe chinensis* var. *dauidii*. *Yakhak Hoeji*. 36:474-480.