

LPS로 유도된 대식세포에 대한 와송 hexan추출물의 AP-1과 IRF3 전사인자의 억제에 의한 전염증성 사이토카인의 감소 효과

이형선*

중원대학교 임상병리학과

Received: February 26, 2020 / Revised: March 30, 2020 / Accepted: March 31, 2020

Orostachys japonicus Hexane Fraction Attenuates Pro-inflammatory Cytokines in LPS-activated Macrophage Cells by Suppression of AP-1 and IRF3 Transcription Factors

Hyeong-Seon Lee*

Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Goesan 28024, Republic of Korea

Orostachys japonicus (*O. japonicus*) is known as a medicinal plant for the treatment of various symptoms. This study investigated the anti-inflammatory effect of the hexane fraction from *O. japonicus* (OJH) on the LPS-stimulated response in RAW 264.7 macrophage cells. This study was conducted to confirm the effect of cell cytotoxicity and production of reactive oxygen species (ROS) in OJH-treated macrophage cells. Additionally, pro-inflammatory cytokines and transcription factors were determined using RT-PCR and western blotting assay. OJH showed no change in lactate dehydrogenase (LDH) levels and exhibited reduced ROS levels in LPS-induced inflammatory cells. Moreover, OJH significantly suppressed the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , and IP-10. Furthermore, OJH effectively inhibited the protein levels of AP-1 (p-c-Jun and p-c-Fos) and p-IRF3 in a dose-dependent manner. In conclusion, our results demonstrate that OJH exhibits strong anti-inflammatory activities via regulation of inflammatory factors.

Keywords: *Orostachys japonicus*, hexane fraction, pro-inflammatory cytokine, AP-1, IRF3

서론

염증은 손상과 감염 그리고 치유과정에 대한 숙주의 보호 반응이다. 하지만 이러한 염증반응이 과도하고 지속적으로 일어나 만성화 되면 암, 자가면역질환, 동맥경화 등 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다[1]. 염증반응을 조절하는 세포 중 대식세포는 다양한 미생물 감염에 대항한 숙주 방어 시스템에서 매우 중요한 세포이다[2]. 대식세포는 다양한 자극으로 활성화되는데 특히 그람 음성균의 세포벽 성분인 lipopolysaccharide (LPS)가 세포막 수용체인 toll-like receptor (TLR) 4에 결합하면 MyD88과 TRIF 의존성 경로가 시작된다[3]. 활성화된 두 경로는 nuclear factor- κ B (NF-

κ B), activator protein-1 (AP-1), interferon regulatory factor 3 (IRF3)와 같은 전사인자를 핵 내로 이동시킨다[4]. 전사인자의 핵 내로 이동은 염증자극에 의해 일어나고 결과적으로 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) 및 tumor necrosis factor (TNF) 와 같은 전염증성 사이토카인과 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 염증성 인자들의 생성을 촉진한다[5-7]. 흔히 상용되는 염증성 질환의 치료제로는 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)와 glucocorticosteroids 등이 있다. 이들의 다양한 부작용 때문에 현재는 부작용이 적은 천연물질로부터 염증을 억제할 수 있는 물질 탐색에 대한 연구가 증가하고 있다[8].

와송(*Orostachys japonicus*)은 다년생 초본식물로 전통의 약에서 다양한 치료에 사용되어 왔다[9]. 와송은 triterpenoid 류인 friedelin, epi-friedianol, glutanone, glutinol과 sterol

*Corresponding author

Tel: +82-43-830-8861, Fax: +82-43-830-8679

E-mail: biohslee@juw.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

계열물질인 β -sitosterol, campesterol 등과 aromatic acid 인 4-hydroxy benzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid와 tannin 계열 물질인 gallic acid와 flavonoid인 kaemferol, quercetin 등의 다양한 식물 화합물이 있다고 보고되었다 [10, 11]. 본 연구에서는 와송을 건조 및 분쇄하여 에탄올 (EtOH), 헥산(Hex), 디클로로메탄(DCM), 에틸아세테이트 (EtOAc), 부탄올(BuOH), 물(H_2O) 순으로 분획하여 성분을 추출하였다. 본 연구 방식으로 추출된 와송의 유기 용매분획물은 정 등(2011)에 의해 항염증 활성이 평가되었고[12], 그 중 DCM과 Hex 분획물로 NF- κ B 전사인자를 매개로한 염증성 인자인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 탁월한 억제활성에 대해 본 연구자가 선행 연구하였다[13, 14]. 전체 6가지 분획물 중 DCM과 Hex 분획물이 항염증 활성이 탁월하였다. 여러 연구가 진행 중인 DCM 분획물을 제외하고 그 중 헥산추출물(OJH)을 이용하여 항염증 활성 실험을 진행하였다. 와송 헥산추출물을 전처리하여 LPS로 염증을 자극한 대식세포 주(RAW 264.7 cells)를 이용하여 항염증 관련 사이토카인에 미치는 영향을 확인하였다. 본 연구에서는 이전 연구에서 한번도 확인한 적 없는 AP-1과 IRF3 전사인자 관련 경로를 연구하고 염증성 사이토카인에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고자 한다.

재료 및 방법

와송 추출물 제조

농장에서 재배하여 건조한 와송을 경남 밀양 농장에서 직접 구입하였다. 건 와송을 갈아서 가루로 만들고 에탄올에 침지하여 95°C에서 3시간 3회 반복 추출하여 상층만을 여과 (Whatman, NO. 1)하였다. 여과한 에탄올 추출물은 회전식 감압농축기(Laborata 4000, Heidolph, Germany)로 최대한

농축하고 물을 이용하여 완전히 용해시켜 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 순으로 계층 분획 한 후 농축하여 유기용매를 제거하였다. 세포실험을 사용하기 위해 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 농도 100 mg/ml로 제조하여 사용하였다(Fig. 1). 본 연구의 재료 추출 방법은 인제대학교 이동석 교수님 연구실에서 제공 받았으면 본 연구자가 동일한 방법으로 추출 및 분리하여 공동으로 연구를 수행 중이다.

세포배양 및 실험처치

RAW 264.7는 murine macrophage cell line으로 한국 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 1% 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 배양하였고, 2-3일 간격으로 계대 배양하여 세포를 유지하였다. 모든 실험은 세포수(5×10^5 /ml)를 일정하게 준비하여 부착시킨 후 OJH를 농도별(0, 25, 50, 100 μ g/ml)로 2시간 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)로 조건에 맞추어 염증을 유도하였다.

세포독성 평가(LDH assay)

OJH의 세포독성은 Cyto Tox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit (Promega, USA)를 이용하여 lactic dehydrogenase (LDH) 를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^5 /ml로 96 well plate에 분주하였다. 하루 동안 안정화하여 OJH를 2시간동안 농도 별로 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)를 24시간처리 후 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층 배양 배지를 얻었다. 50 μ l 상층액과 reconstituted substrate mix를 96 well plate에 옮겨 담아 30분간 반응시킨 후 stop solution을 넣어 FilterMax F5 Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, USA) 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

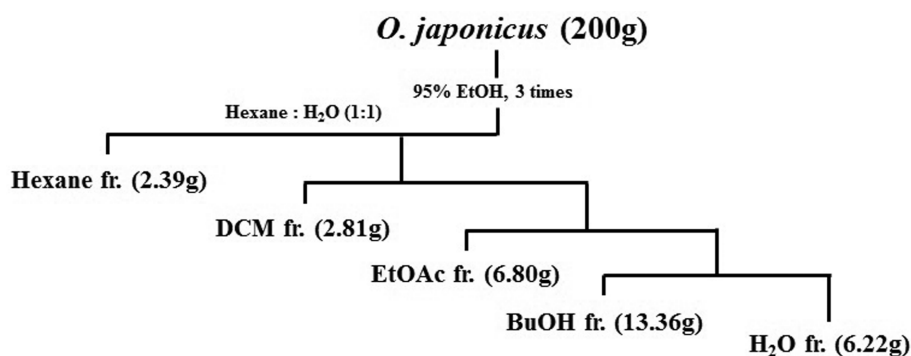


Fig. 1. Fractionated *Orostachys japonicus* with organic solvents. *O. japonicus* powder extracted in 95% EtOH for 3 h. EtOH extract is concentrated using rotary evaporator to dryness. The concentrate was suspended in water and fractionated with following sequence of organic solvents: hexane, DCM, EtOAc, BuOH, and H_2O . Each solvent fraction was concentrated by rotary evaporator to dryness.

활성산소 측정(DCF-DA assay)

ROS를 측정하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 형광시약을 이용하였다. RAW 264.7 세포를 5×10^5 /ml로 96 black well plate에 분주하고, 하루 동안 안정화하여 20 μ M DCF-DA (Sigma, USA) 시약으로 1시간 동안 전처리 하였다. 형광시약을 제거하고 $1 \times$ PBS로 2번 씻어내고 OJH를 2시간동안 농도 별로 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)를 2시간처리 후 $1 \times$ PBS로 2번 씻어내고 485/20 nm와 528/20 nm에서 형광값을 측정하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 2 ml씩 (5×10^5 /ml) 분주하여 하루 동안 안정화 시킨 후 시료를 농도 별로 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)를 18시간 처리하여 염증반응을 유도하였다. 배지를 완전히 제거하고 1 ml의 TRIzol 용액을 이용하여 세포를 회수하여 클로로포름 및 이소프로판올로 총 RNA를 분리하였다. RNA 1 μ g을 주형으로 AccuPower Reverse Transcription PreMix tube for the cDNA synthesis (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하고 목적 유전자의 oligo primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같으며 PCR은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer)를 이용하여 95°C에서 5분간 denaturation하고 95°C에서 30초, 각 primer 온도에서 30초, 72°C에서 30초 25-30 cycle을 반복 후 72°C에서 10분간 extension하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 Davinch-Chemi™ imaging system (Davinch-K, Korea)에서 결과를 확인하였다.

단백질 Immune blot 측정

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 2 ml씩 (5×10^5 /ml) 분주하여 하루 동안 안정화 시킨 후 시료를 농도 별로 전처리하고 LPS (1 μ g/ml)를 1.5시간처리하여 염증반응을 유도하였다. 배지를 제거하고 $1 \times$ PBS로 2번 씻어내고 100 μ l cell lysate buffer (Cell signaling Technology, USA)를 분주하여 스크래퍼로 세포를 회수하여 얼음에 30분간 반응시켰다. 세포 추출물을 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층을 얻어 bicinchoninic acid (BCA) protein determination kit (Thermo scientific, USA)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 40-50 μ g 단백질 샘플을 8-12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel에 전기 영동하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-rad, USA)으로 옮겨 목적 단백질에 특이적인 p-c-Jun, p-c-Fos, p-IRF3 1차 항체(Cell signaling Technology, USA)와 anti-rabbit HRP 2차 항체에 반응시켜 ECL 용액(Santa Cruz Biotechnology, USA)을 이용하여 발색하였다.

통계 처리

실험은 모든 과정을 최소 3회 이상 반복 실시하였으며, 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 각 실험결과의 유의성 검정은 Student's t-test로 비교하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적 의미가 있다고 판단했다.

결과 및 고찰

외송 추출물의 제조와 세포 독성 확인

자연 건조된 외송으로 부터 에탄올 추출물을 얻고 유기 용매의 극성을 이용하여 용매 분획을 실시하였다. 농축 감압기 (Laborata 4000, Heidolph)를 이용하여 용매를 제거한 건조

Table 1. Primer sequence design for RT-PCR.

Target		Sequence of primers	Size of products (bp)
IL-1 β	Sense:	5'-CAG GCA GGC AGT ATC ACT CA	350
	Antisense:	5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG	
IL-2	Sense:	5'-CCC ACT TCA AGC TCC ACT TC	389
	Antisense:	5'-TCC ACC ACA GTT GCT GAC TC	
IL-6	Sense:	5'- AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA	159
	Antisense:	5'- TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC	
TNF- α	Sense:	5'- AGC CCC CAG TCT GTA TCC TT	212
	Antisense:	5'- CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG	
IP-10	Sense:	5'- GGA TGG CTG TCC TAG CTC TG	211
	Antisense:	5'- ATA ACC CCT TGG GAA GAT GG	
β -actin	Sense:	5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA	392
	Antisense:	5'-TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG	

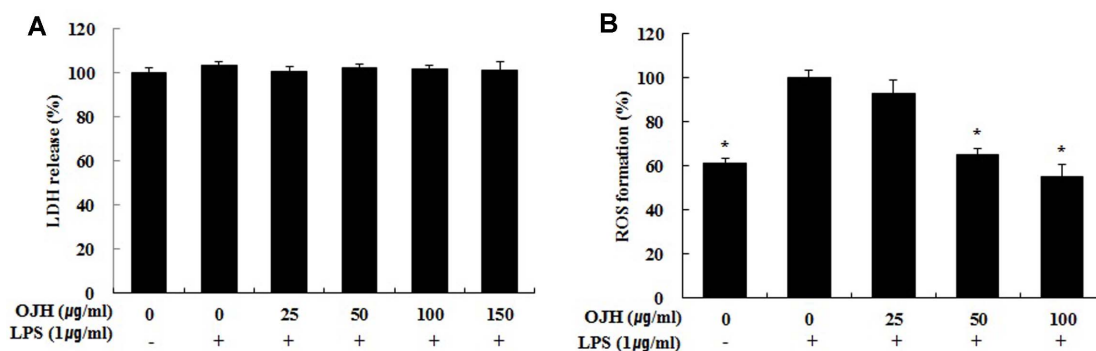


Fig. 2. Effect of hexane fraction on cell cytotoxicity and ROS formation in LPS-stimulated cells. (A) RAW 264.7 cells were incubated in the presence of hexane fraction and LPS for 24 h. Cell cytotoxicity was determined by LDH assay. (B) Cells were first incubated with 50 μM DCF-DA for 1 h, and then incubated with hexane fraction and LPS for 12 h. *significantly different from LPS only at $p < 0.05$.

상태의 hexane, DCM, EtOAc, BuOH, 그리고 H₂O 추출물의 각각 수율은 3.38 g, 2.81 g, 6.08 g, 13.36 g, 6.22 g이었다 (Fig. 1). 세포막의 손상 또는 괴사가 일어나면 세포막이나 핵 내에 LDH의 활성이 증가하고 세포 밖으로 용출되는 현상이 일어난다[15]. 배양배지를 이용하여 세포 밖으로 유출된 LDH의 양을 측정하여 세포독성 여부를 확인할 수 있다. 항염증 활성을 보인 hexane 추출물을 RAW 264.7 세포에 농도별(0, 25, 50, 100, 200 μg/ml)로 처리하고 동시에 LPS (1 μg/ml)를 처리하여 24시간 배양 후 세포독성을 측정하였다(Fig. 2A). 각 농도에서 LDH 활성율은 대조군과 비교하여 수치적 차이가 없는 것으로 확인되었다. 따라서 외송의 hexane 추출물을 실험한 농도 내에서는 독성이 없는 것으로 생각되어 이를 바탕으로 실험을 진행하였다.

ROS 생성 억제 효과

ROS의 생성은 세포를 공격하여 핵산 및 지질을 파괴하고 여러 단백질 효소의 기능을 저해한다. 그 결과 노화 촉진, 암 및 염증 등의 유발로 다양한 질병을 발생시키는 것으로 보고되어 있다[16]. ROS의 종류는 superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (·OH) 등이 있다. 세포내 ROS가 존재할 경우 DCF-DA와 반응하여 높은 형광을 띤 DCF로 산화됨으로써 ROS 생성량을 측정할 수 있다[17]. 대식세포 주에 LPS로 염증을 유발하여 외송 hexane 추출물이 LPS에 의해 생성된 ROS에 대한 억제능이 있는지 확인한 결과 농도 의존적으로 ROS의 형성이 저하되었다(Fig. 2B). 특히, 50 μg/ml 이상에서는 LPS 단독 처리에 대비 통계적으로 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 보였으며 정상과 매우 비슷한 수준으로 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 외송 hexane 추출물이 활성산소의 제거능을 가지고 있음을 보여준다. 염증으로 유발된 산화스트레스에 대해 대항하는 능력이 있을 것으로 생각된다.

염증성 사이토카인 억제 효과

면역세포는 염증반응이 일어나면 IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, IP-10과 같은 전염증성 사이토카인이 생성되어 증가하는 양상을 보인다[18]. 이와 같은 염증 매개 인자의 과다 발현은 전신성 염증반응, 만성염증, 동맥경화, 암 성장 촉진 등 다양한 질병의 기전에 관여한다[19, 20]. IP-10은 IRF3 전사 인자의 활성화에 의해 생성되는데 식세포의 화학 주성을 유도하여 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[21]. 따라서 염증에 의해 생성된 사이토카인의 조절은 염증반응에 의해 영향을 받는 다양한 질병의 조절 가능성을 시사한다. 본

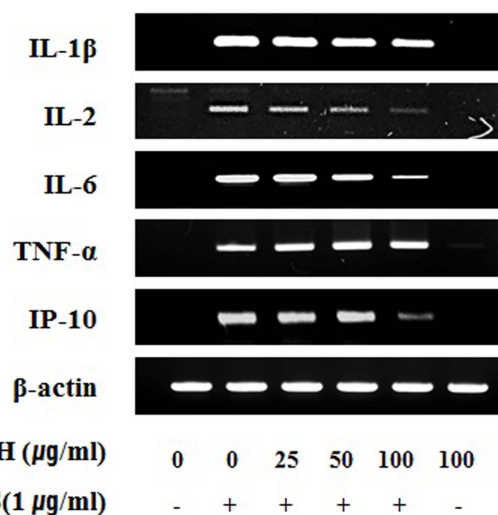


Fig. 3. Effect of hexane fraction on mRNA levels of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated cells. RAW 264.7 cells were pretreated with hexane fraction for 2 h and stimulated with LPS for 18 h. The mRNA expression of IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α, IP-10, and β-actin were analyzed by RT-PCR. Target products were separated on 1.5% agarose gel and detected by Davinch-Chemi™ imaging system (Davinch-K, Korea).

실험에서는 RAW 264.7 대식세포 주에 와송 hexane 추출물을 2시간 농도 별로 전처리하고 LPS로 염증을 자극하여 전염증성 사이토카인의 생성과 관련하여 mRNA 수준에서 측정하여 확인하였다(Fig. 3). LPS 단독 처리에 의해 사이토카인의 발현이 강하게 나타났으나, 와송 hexane 추출물 전처리에 의해 IL-1 β , IL-2, IL-6, IP-10의 발현이 농도의존적으로 확인한 감소 양상을 보인다. 그러나 TNF- α 는 와송 hexane 추출물 처리에도 불구하고 mRNA의 양이 감소하지 않았으며 오히려 약간씩 증가하는 듯한 결과를 보여준다. 따라서 와송 hexane 추출물은 IL-1 β , IL-2, IL-6, IP-10의 발현 억제를 통해 항염증 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

핵 내 전사인자 신호 전달 감소

LPS는 대식세포의 막 수용체를 자극하여 세포 내 MyD88과 TRIF 의존성 경로를 활성화 시킨다. 두 경로는 NF- κ B, AP-1, IRF3와 같은 전사인자를 핵 내로 이동시켜 염증 관련 사이토카인 인자의 생성을 유도한다[22]. AP-1은 c-Jun과 c-Fos 두 가지 단백질로 구성된 이형 이량체의 염증, 스트레스, 성장인자, 감염에 의해 자극을 받는 핵 내 전사인자로 MyD88 의존성 경로에 의해 활성화 된다[23]. 또한 IRF3 전사인자는 염증반응에서 TRIF 의존성 경로에 의해 활성화되어 IFN과 IP-10과 같은 사이토카인의 생성에 관여한다[24]. 염증 자극에 의해 생성된 사이토카인의 조절은 상위 단백질인 AP-1과 IRF3의 전사인자 활성 억제를 확인함으로써 가능하다. 와송 hexane 추출물을 2시간 농도 별로 전처리하고 LPS로 염증을 자극하여 핵 내 전사인자의 인산화 발현 억제와 관련하여 단백질 수준에서 측정하여 확인하였다(Fig. 4). 그 결과, AP-1 구성 단백질인 c-Jun과 c-Fos의 인산화의 발현이 와송 hexane 추출물 전처리에 의해 LPS 염증 자극에 대항

하여 농도 의존적으로 감소하였다. 또한, IRF3의 인산화 발현도 와송 hexane 추출물에 농도에 따라 감소하여 100 μ g/ml에서는 탁월한 효과를 보인다. 이러한 결과들은 와송 hexane 추출물이 염증 자극에 의한 전사인자의 인산화 억제로 핵 내 이동을 제한하여 염증성 매개 사이토카인의 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 와송에 유기용매를 활용하여 순차적으로 추출하여 항염증 활성에 대한 가능성을 평가하기 하기 위해 수행되었다. 대식세포에 와송 hexane 추출물을 전처리하고 LPS로 염증을 자극하여 염증과 관련한 세포내 신호전달 경로에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 대식세포에 와송 hexane 추출물은 LPS 자극에 의해 세포 독성이 나타나지 않았고, ROS의 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한, IL-1 β , IL-2, IL-6, IP-10과 같은 전염증성 사이토카인의 분비를 mRNA 수준에서 확인한 결과 탁월하게 억제하였다. 이러한 전염증성 사이토카인의 생성 억제는 상위 전사인자인 AP-1과 IRF3의 조절을 통해 이루어지므로 이들을 단백질 수준에서 발현량을 확인하였다. 그 결과 c-Jun, c-Fos, IRF-3의 인산화 억제로 핵 내 전사활성이 제한되었을 것으로 생각된다. 이들 결과를 종합해볼 때, 와송 hexane 추출물은 염증 반응을 저해하는 효과가 있는 것으로 나타나 다양한 염증성 질환의 예방 및 개선에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgment

This study was received by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (No. NRF-2017R1D1A1B03035934).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Kim JK, Jun JG. 2015. Licochalcone B exhibits anti-inflammatory effects via modulation of NF- κ B and AP-1. *Biomed. Sci. Lett.* **21**: 218-226.
2. Gilroy D, De Maeyer R. 2015. New insights into the resolution of inflammation. *Semin. Immunol.* **27**: 161-168.
3. O'Neill LA. 2006. How toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol.* **18**: 3-9.
4. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golen-

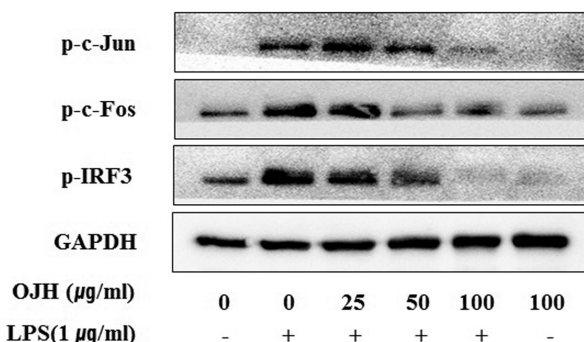


Fig. 4. Effect of hexane fraction on protein levels of transcription factors in LPS-stimulated cells. RAW 264.7 cells were pre-treated with hexane fraction for 2 h and stimulated with LPS for 1.5 h. The protein expression of p-c-Jun, p-c-Fos, p-IRF3, and β -actin were analyzed by western blotting. The result was visualized using ECL solution and detected by Davinch-ChemiTM imaging system (Davinch-K, Korea).

- bock DT, et al. 2003. IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* **4**: 491-496.
5. Jeong JB, Hong SC, Jeong HJ, Koo JS. 2012. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Cnidium officinale* Makino on LPS-stimulated RAW 264.7 and THP-1 cells. *Korean J. Plant Res.* **25**: 299-307.
 6. Guha M, Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**: 85-94.
 7. Yeom MJ, Choi BH, Han DO, Lee HJ, Shim IS. 2007. In vitro inhibition of pro-inflammatory mediator mRNA expression by Nephrite in lipopolysaccharide-induced mouse macrophage cells. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* **18**: 1622-1627.
 8. Smale ST. 2010. Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell* **140**: 833-844.
 9. Kim SG, Choi JW, Park HJ, Lee SM, Jung HJ. 2009. Anti-hyperlipidemic effects of the flavonoid-rich fraction from the methanol extract of *Orostachys japonicus* in rats. *Korean J. Pharmacogn.* **40**: 51-58.
 10. Park HJ, Young HS, Kim JO, Rhee SH, Choi JS. 1991. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J. Pharmacogn.* **22**: 78-84.
 11. Park JG, Park JC, Hur JM, Park SJ, Choi DR, Shin DY, et al. 2000. Phenolic compounds from *Orostachys japonicus* having anti-HIV-1 protease activity. *Nat. Prod. Sci.* **6**: 117-121.
 12. Jeong JH, Ryu DS, Suk DH, Lee DS. 2011. Anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Orostachys japonicus* on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *BMB Rep.* **44**: 399-404.
 13. Lee HS, Ryu DS, Lee GS, Lee DS. 2012. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: Suppression of NF- κ B activation and MAPK signaling. *J. Ethnopharmacol.* **140**: 271-276.
 14. Lee HS, Bilehal D, Lee GS, Ryu DS, Kim HK, Suk DH, et al. 2013. Anti-inflammatory effect of hexane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells by suppression of NF- κ B and PI3K-Akt signaling. *J. Funct. Foods.* **5**: 1217-1225.
 15. Kim MJ, Chung YC, Kim SS, Lim CK, Park KJ, Choi YH, et al. 2019. Anti-inflammatory effect of *Sechium edule* extract in LPS-stimulated RAW 264.7 cells via p-JNK and p-p38 down-regulation. *KSBBJ.* **34**: 99-106.
 16. Jeong YJ, Nam MK, Kang KJ. 2011. The effect of *Angelica keiskei* ethanol extract on proliferation, apoptosis and ROS accumulation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J. East Asian Soc. Diet Life.* **21**: 24-30.
 17. Lee YH, Ho JN, Dong MS, Park JH, Kim HK, Hong BS, et al. 2005. Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 1310-1316.
 18. Kim YS, Joung NY, Ryu BS, Park PJ, Jeong JH. 2016. Anti-inflammatory activities of extracts from fermented *Taraxacum platycarpum* D. leaves using *Hericium erinaceum* mycelia. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **45**: 20-26.
 19. Choi YJ, Park MH, Kim MH, Jung KI. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Mulberry (*Morus alba* L.) fermented liquid in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **47**: 995-1005.
 20. Lee YB, Ham YM, Yoon SA, Oh DJ, Song SM, Hong IC, et al. 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activities of crude extract and solvent fractions of *Allium hookeri*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **46**: 18-25.
 21. Zeng X, Moore TA, Newstead MW, Deng JC, Lukacs NW, Standiford TJ. 2005. IP-10 mediates selective mononuclear cell accumulation and activation in response to intrapulmonary transgenic expression and during adenovirus-induced pulmonary inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* **25**: 103-112.
 22. Kim HY, Han AR, Kil YS, Seo EK, Jin CH. 2019. Anti-inflammatory effects of Catalpalactone isolated from *Catalpa ovate* in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Molecules* **24**: 1236.
 23. Kim JK, Jun JG. 2015. Licochalcone B exhibits anti-inflammatory effects via modulation of NF- κ B and AP-1. *Biomed. Sci. Lett.* **21**: 218-226.
 24. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-Binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-Regulatory factor-3, in the toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* **171**: 4304-4310.