

## LPS가 처리된 대식세포에서 Nrf2/HO-1 경로 활성을 통한 무환자나무 열매 추출물의 항산화 효과

김대용<sup>†</sup>

우석대학교 한의과대학, 조교수  
(2020년 10월 7일 접수: 2020년 10월 29일 수정: 2020년 10월 29일 채택)

### Anti-oxidative Effect of *Sapindus mukorossi* Fruits Extract in LPS-stimulated macrophages via Activation of Nrf2/HO-1 pathway

Dae-Yong Kim<sup>†</sup>

College of Korean Medicine, Woosuk University  
(Received October 7, 2020; Revised October 29, 2020; Accepted October 29, 2020)

**요약** : 본 연구의 목적은 LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 *Sapindus mukorossi* 열매 추출물 (SME)의 항산화 효능을 확인하는 것이다. 그 결과, SME가 LPS로 자극된 RAW264.7 세포에서 ROS 생성을 현저하게 감소시켰고 전염증성 단백질인 COX-2 및 iNOS의 발현을 억제하였다. 또한 SME는 HO-1 및 Nrf2 발현을 상향 조절하였고 Akt 및 GSK-3 $\beta$ 의 인산화를 증가시켰다. 이러한 결과는 SME가 Nrf2/HO-1 신호전달 경로의 활성화를 통하여 산화적 스트레스를 완화시킬 수 있음을 시사한다.

**주제어** : 항산화 효능, 무환자나무, Nrf2, HO-1, 대식세포

**Abstract** : The aims of this study were to determine the effects of *Sapindus mukorossi* fruit extracts (SME) on the anti-oxidant activity in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. The results showed that SME significantly reduced the production of ROS in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The expression of pro-inflammatory proteins including COX-2 and iNOS were also obviously inhibited by SME in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Further studies revealed that SME up-regulated HO-1 and Nrf2 expression. Additionally, SME increased phosphorylation of Akt and GSK-3 $\beta$ . These results suggest that SME could attenuate oxidative stress by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

**Keywords** : Anti-oxidative effect, *Sapindus mukorossi*, Nrf2, HO-1, RAW264.7 cells

---

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: dykim@woosuk.ac.kr)

## 1. 서론

산소의 정상적인 대사의 부산물로 알려진 활성 산소 종 (reactive oxygen species, ROS)은 조직 손상을 유발할 수 있는 반응성 분자이다. 정상적인 상황에서 ROS는 세포의 신호경로와 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하고 있다. 하지만 과도한 산화적 스트레스에 의해 생성된 ROS는 허혈, 발암, 염증, 당뇨병과 같은 다양한 질병과 노화를 유발하는 것으로 보고되고 있다[1]. 특히 많은 연구에 의하면 이러한 산화적 스트레스가 염증을 유발한다고 알려져 있다[2]. 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS) 자극을 통하여 ROS의 생성이 증가되고 이는 cytokine 같은 염증성 인자의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다[3].

Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor 2)는 항산화 및 세포 보호 기능을 갖는 catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase (GPx)와 같은 단백질의 발현을 조절하는 전사인자이다[2]. 산화적 스트레스가 발생하면 Nrf2가 활성화되어 핵으로 이동하여 항산화와 관련된 유전자의 전사를 촉진한다. Nrf2에 의하여 발현이 증가되는 대표적인 분자가 HO-1이다[4]. HO-1은 산화적 스트레스에 의한 ROS 생성과 세포의 산화-환원 환경의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다고 보고되고 있다. 자극이 없는 상황에서는 낮은 수준으로 발현되는 HO-1은 LPS, heme, 저산소 환경, 또는 다양한 산화 유도제에 의해 신속하게 유도될 수 있다. 산화적 스트레스와 염증 상태에서 발현이 증가된 HO-1은 세포 보호에 중요한 역할을 수행한다[3]. 그러므로 산화적 스트레스 및 염증과 관련된 다양한 질환에서 Nrf2/HO-1 신호전달 경로의 유도를 통한 세포 보호 작용은 중요한 표적이 될 수 있을 것이다.

무환자나무는 *Sapindaceae*과에 속하는 soapnut 나무로 일본에서부터 인도에 이르기까지 아시아의 열대 및 아열대 기후에서 발견되는 나무 중 하나이다. Soapnut은 과피에 triterpenoid saponin이 함유된 과일로 유명하며, 이는 천연 세제로 널리 사용되고 있다. *Sapindus* 속에는 40종 이상의 야생종이 있으며 이 중에서 *Sapindus mukorossi* (*S. mukorossi*)와 *Sapindus trifoliatus* (*S. trifoliatus*)가 주요 품종으로 알려져 있다. 과

피, 줄기 및 열매에서는 triterpenoid saponin 뿐만 아니라 지방산 및 플라보노이드 등이 함유된 것으로 밝혀졌다. *S. mukorossi*의 사포닌은 많은 연구를 통하여 약리학적 적용이 가능성이 확인되었다. 사포닌은 종양세포의 성장을 억제하거나 항균 작용을 가지고 있으며 습진과 건선 치료에도 사용되고 있다. 또한 무환자나무 추출물이 간 보호, 항염증 및 항종양의 효과가 있다고 보고되고 있다[5,6]. 이외에도 다양한 연구결과에 따르면 무환자나무 추출물은 tyrosinase 억제, 자유 라디칼 소거능 등이 있으며 이는 화장품 개발에 활용할 수 있는 기능성 소재로서의 가치가 있다고 판단된다[7,8].

이에 본 연구에서는 무환자나무 열매 추출물의 항산화 효능을 확인하기 위하여 RAW264.7 대식세포를 이용하여 LPS에 의한 산화적 스트레스를 유도하고 이에 대한 추출물의 항산화 효능을 연구하였다. 이를 통해 무환자나무 열매 추출물이 가지고 있는 항산화 효과를 확인하고 그 기전을 밝혀, 기능성 소재로서 화장품 개발에 활용할 수 있는 기초자료를 제시하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료 제조

무환자나무 열매 추출물(*Sapindus mukorossi* Fruits extract, SME)은 한국융합기술연구소(주)에서 제조하여 제공하였다. 시료 중량 10배의 증류수와 혼합하여 진탕배양기(Daihan Scientific, Korea)를 이용하여 상온에서 24시간 30 rpm으로 교반하면서 열수추출물을 얻었다. 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 더 실시하여 추출물을 확보하였다. 추출물은 여과지에 여과한 다음 감압농축기(Rotary vacuum evaporator, N-100, Japan)를 이용하여 농축하고 동결건조한 다음 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 10% heat-inactivated FBS (HyClone, USA), 100 U/ml penicillin/streptomycin (HyClone, USA)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, USA) 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

### 2.3. 세포 독성 측정

SME의 세포 독성을 실험하기 위하여 CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, Medison, WI)를 사용하였다. 대식세포를  $5 \times 10^5$  cells/mL 농도로 96-well plate에 분주하고 37°C에서 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이후 추출물을 농도별 (0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\mu$ g/mL)로 처리한 후 다시 24시간 배양하였다. 그 후 kit에 첨가된 방법에 따라 실험을 진행하였다.

### 2.4. ROS 생성 측정

세포 내 ROS의 생성은 DCFH2-DA (ThermoFisher Scientific, USA)를 이용하여 형광 현미경(Eclipse Ti, Nikon, Japan)을 통하여 확인하였다. 12-well plate에 대식세포를  $4 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양한 후에 LPS (1  $\mu$ g/mL, Merck, Germany)를 처리하고 30분 동안 ROS 생성을 유도하였다. 그 후 SME (100-500  $\mu$ g/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척한 후, 10  $\mu$ M DCFH2-DA를 첨가한 배지를 넣고 37 °C에서 추가로 30분 동안 배양 하였다. 배양 후, 세포를 PBS로 세척하고, 형광현미경을 통해 ROS를 측정하였다.

### 2.4. 단백질 발현 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에  $4 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 24시간 배양하였다. 새로운 배지로 교환한 후 SME의 농도를 100, 300, 500  $\mu$ g/mL가 되도록 세포에 처리하여 2시간 동안 배양한 후 LPS를 처리하고 배양하였다. 24시간 후 단백질 발현을 측정하기 위하여 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 lysis buffer (10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)를 첨가하여 단백질을 추출하였다. 단백질을 정량하여, 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후, membrane으로 transfer하여 5% skim milk에 1시간 동안 blocking하였다. COX-2, iNOS 및 HO-1의 단백질 발현과 Akt와 GSK-3 $\beta$ 의 인산화를 확인하였다.

### 2.5. 핵 단백질 추출

Nrf2의 활성화를 측정하기 위하여 SME (100, 300, 500  $\mu$ g/mL)를 처리한 RAW264.7 세포로

부터 핵단백질을 분리하였다. LPS와 SME로 처리된 세포( $2 \times 10^6$  cells/dish)를 PBS로 세척하여 회수하였다. 세포는 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (ThermoFisher scientific, USA)를 사용하여 핵과 세포질을 분리하였다. Nrf2의 활성은 western blot analysis를 이용하여 측정하였다.

### 2.6. 통계처리

모든 결과는 3회 반복하였으며, mean  $\pm$  SD로 표시하였다. 통계분석은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., USA)을 이용하였다. 통계학적인 유의성 검증은 p = 0.05에서 Duncan's multiple range test를 진행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포독성

SME의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행한 결과, 1,000  $\mu$ g/mL에서 세포독성이 확인되었다. (Fig. 1). 이에 본 연구에서는 1,000  $\mu$ g/mL 미만의 농도를 실험에 사용하였다.

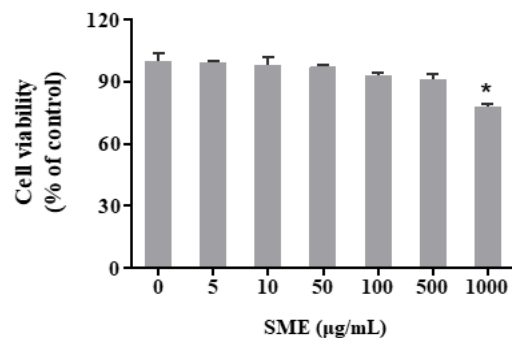


Fig. 1. The effect of SME on cell viability. RAW264.7 cells were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  cells per well (96-well plate) and MTT assay was conducted with various concentrations of SME.

### 3.2. ROS 생성 억제

LPS로 유도된 대식세포에서 ROS는 과잉 생산되고 이는 염증 유발로 이어진다[3]. 그러므로 본 연구에서는 ROS 생성에 대한 SME의 억제 효과

를 평가하였다. 대식세포에 LPS를 처리하므로써 ROS 생성이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 SME를 전처리한 경우에는 ROS 생성이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 즉, SME가 ROS의 생성을 억제할 수 있는 항산화 효능을 가지고 있다는 것을 확인하였다.

### 3.3. COX-1 및 iNOS 발현 조절

이전 연구에 의하면 증가된 산화적 스트레스는 COX-2 및 iNOS와 같은 염증성 유전자의 발현을 유도한다고 알려졌다. COX-2는 염증 반응을 매개하고 조직 손상을 일으키는 prostaglandin (PG)의 생성을 촉진시킨다[9]. iNOS는 염증, 비정상적인 세포 성장 및 면역 조절을 조절하는 것으로 알려진 효소이다. 특히 iNOS는 염증과 관련된 NO(nitric oxide)의 과잉 생산을 담당하는 것으로 알려져 있다[10]. 대식세포에서 COX-2와 iNOS의 수준은 염증 정도를 평가하는 중요한 자료로 사용되고 있다.

본 연구에서도 SME가 산화적 스트레스에 의한 염증에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 COX-2와 iNOS의 발현을 측정하였다. 그 결과로, LPS에 의하여 증가된 COX-2와 iNOS의 발현이 SME에 의하여 농도의존적으로 감소됨을 확인하

였다. 이것은 산화적 스트레스에 의해 유도된 염증 매개물질이 무환자나무 열매 추출물에 의하여 감소된 것으로, 무환자나무 열매 추출물이 항염증 활성을 가지는 기능성 소재로서의 가능성을 제시하고 있다.

### 3.4. Nrf2 및 HO-1 활성 조절

Nrf2는 산화 손상에 대한 세포 방어 메커니즘을 조절한다. Nrf2는 세포질에 존재하는 전사인자이다. 산화적 스트레스 또는 Nrf2 활성화 화합물의 존재하에 Nrf2는 핵으로 이동하여 항산화 기능을 가지는 HO-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione-S-transferase (GST) 등의 유전자의 발현을 조절한다[11,12]. 따라서 Nrf2의 활성화는 산화적 스트레스의 해로운 영향에 대한 보호 메커니즘 중 하나로 간주되며 Nrf2의 분해를 억제하거나 Nrf2의 핵으로의 전좌를 유도하는 것은 산화적 스트레스에 대항하는 중요한 기작 중 하나이다[13,14]. 본 연구에서 LPS로 유도된 산화적 스트레스 환경에서 Nrf2의 핵 내에서의 발현을 살펴 보았다. 그 결과, SME에 의하여 핵 내에서 Nrf2 발현이 현저하게 증가하였다(Fig. 4A).

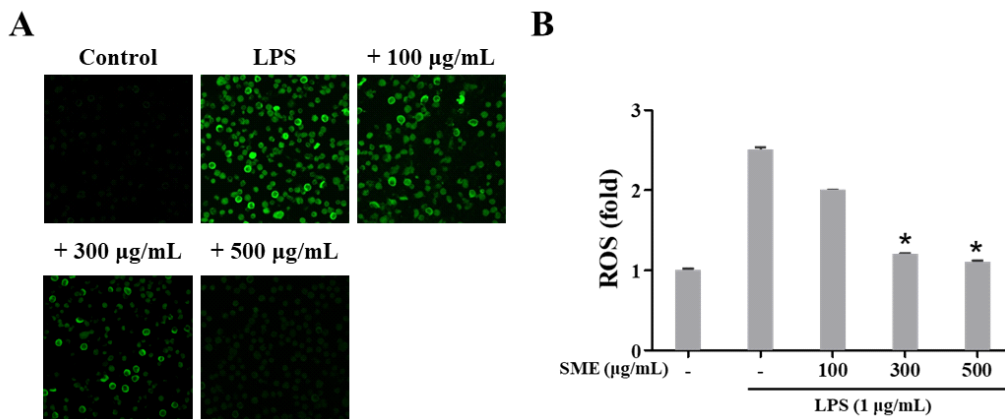


Fig. 2. SME suppresses ROS generation in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. (A) Cells were treated with various concentrations of SME in the presence of LPS (1  $\mu$ g/mL). DCF fluorescence was imaged under a fluorescence microscope. (B) The fold increase of intracellular ROS, compared to the control was quantified by measuring the DCF fluorescence intensity in the microscopic field. The results are the mean  $\pm$  SD of three assays. \* indicated a significant difference from the LPS-stimulated group ( $p < 0.05$ ).

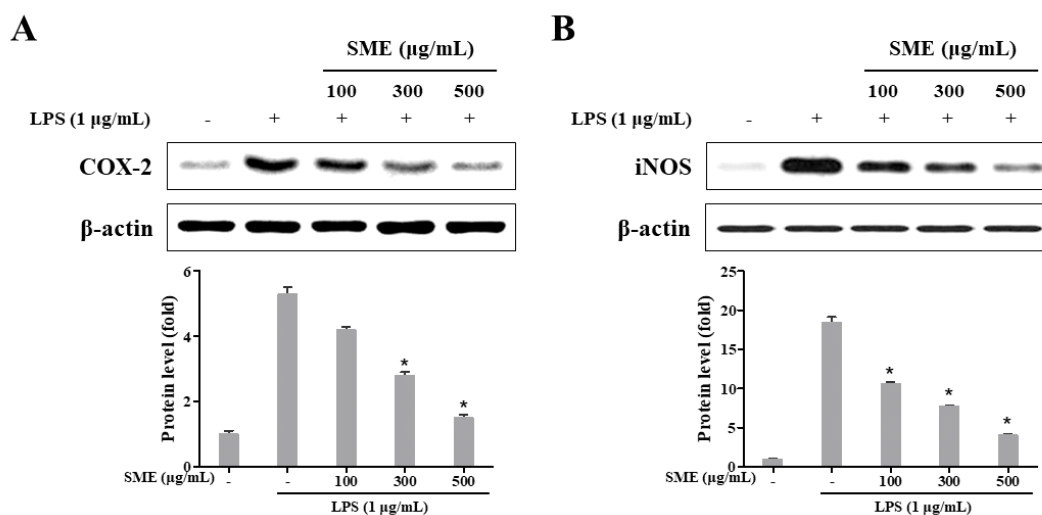


Fig. 3. SME inhibit the expression of the COX-2 and iNOS in RAW264.7 macrophages. Cells were incubated with or without SME and total proteins were prepared. The expression of COX-2 and iNOS were detected by Western blot. The relative changes in the intensities of the protein bands were measured by densitometry. The results are the mean  $\pm$  SD of three assays. \* indicated a significant difference from the LPS-stimulated group ( $p < 0.05$ ).

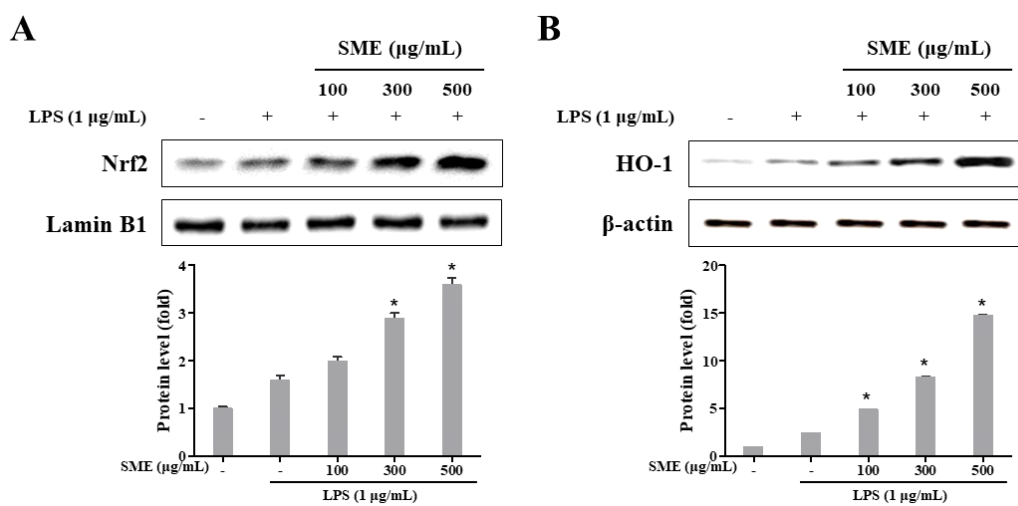


Fig. 4. SME activate Nrf2 transcriptional activation and induces the expression of the HO-1 in RAW264.7 macrophages. Cells were incubated with or without SME and total proteins were prepared. The expression of Nrf2 and HO-1 were detected by Western blot. The relative changes in the intensities of the protein bands were measured by densitometry. The results are the mean  $\pm$  SD of three assays. \* indicated a significant difference from the LPS-stimulated group ( $p < 0.05$ ).

HO-1은 대부분의 세포에서 ROS에 의해 자극되어 지며 세포 방어 기작에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[3,15]. 대식세포에 LPS로 자극을 가하며 ROS 생성이 증가하고 이는 DNA 손상이나 염증성 사이토카인의 과잉 생산을 유도하여 심각한 조직 손상을 초래하는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 과도한 염증을 억제하기 위해서는 ROS의 과잉 생산을 억제해야한다. 본 연구에서 SME를 처리한 결과, 대식세포에서 HO-1 발현이 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 이러한 결과는 SME가 Nrf2의 핵 이동을 증가시켜 전사활성을 상향 조절하여 HO-1 발현을 증가시키고, 이는 항산화 효능으로 나타난 것으로 생각할 수 있다.

### 3.5. Akt 및 GSK-3 $\beta$ 활성 조절

Akt는 serine/threonine 단백질 인산화효소로 세포의 사멸과 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 인슐린성장인자와 같은 성장인자에 의해서 활성화되고 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) 경로를 통하여 조절되고 있다. 또한 활성화된 Akt는 glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )의 활성을 조절할 수 있는

것으로 알려져 있다. GSK-3 $\beta$ 는 serine/threonine 단백질 인산화효소로 세포에서 여러 기능을 가지고 있다. Akt는 GSK-3 $\beta$ 를 인산화시켜 불활성 상태로 전환시킨다[16]. 그리고 GSK-3 $\beta$ 는 ROS에 의해서 활성화될 수 있으며 활성화된 GSK-3 $\beta$ 는 Nrf2를 인산화시켜 핵 밖으로의 유출을 유도하며 궁극적으로 분해를 촉진한다. 또한 GSK-3 $\beta$ 는 Nrf2의 음성조절자로 알려진 Fyn을 활성화시켜 Nrf2의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. GSK-3 $\beta$ 에 의해 인산화된 Fyn은 활성을 가지게 되고, Fyn은 Nrf2를 인산화시킨다. 인산화된 Nrf2가 핵 밖으로 빠져나오며 분해된다[17].

본 연구에서는 SME에 의해서 활성화되는 Nrf2가 Akt와 GSK-3 $\beta$ 의 신호경로에 의한 것인지 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 그 결과, LPS에 의해 감소된 Akt의 인산화가 SME에 의해서 증가됨을 확인하였다. 그에 반해 LPS에 의해서 감소된 GSK-3 $\beta$ 의 인산화는 SME에 의해서 증가됨을 확인하였다(Fig. 5). 이는 Akt의 활성이 증가하고 GSK-3 $\beta$ 의 활성은 감소함을 나타낸다고 할 수 있다.

이전 연구에 의하면 Akt 억제제를 처리하면

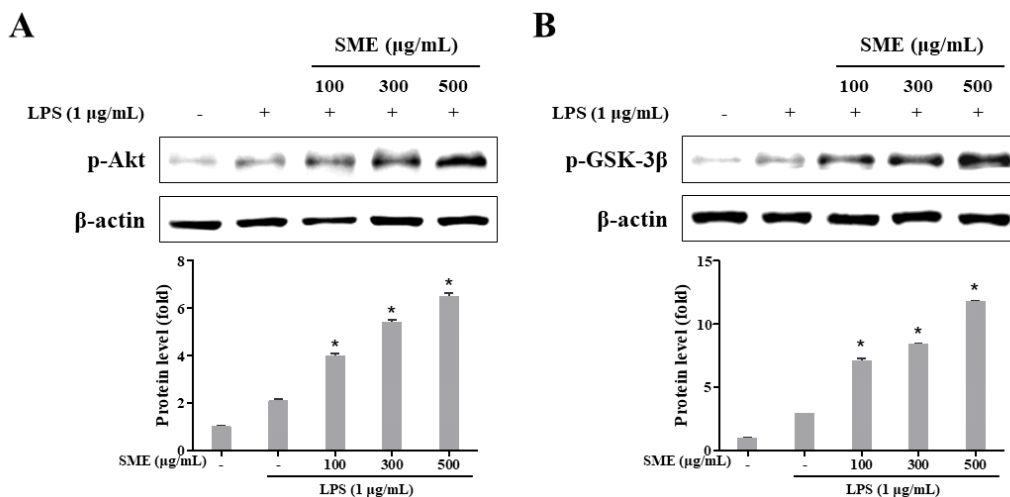


Fig. 5. The effect of SME on the activation of Akt and GSK-3 $\beta$  pathway in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Cells were incubated with or without SME and total proteins were prepared. The expression of phosphorylation level of Akt and GSK-3 $\beta$  were detected by Western blot. The relative changes in the intensities of the protein bands were measured by densitometry. The results are the mean  $\pm$  SD of three assays. \* indicated a significant difference from the LPS-stimulated group ( $p < 0.05$ ).

Akt의 인산화가 감소되고 Nrf2/HO-1의 발현이 억제되어 세포의 방어 능력이 현저히 감소됨을 보여주었다[3]. 또 다른 연구에 의하면, GSK-3 $\beta$ 의 억제를 통하여 Nrf2의 핵 방출 및 분해가 저해되어 산화적 스트레스가 완화되었다는 결과가 보고되었다[2].

본 실험의 결과로, SME에 의해서 증가된 Akt가 GSK-3 $\beta$ 의 인산화를 유도하여 불활성화시키고, GSK-3 $\beta$ 의 불활성화로 인해 Nrf2의 활성은 증가하여 항산화 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

본 연구는 항산화 효능을 가지 기능성 소재에 대한 기초자료를 제시하고자 대식세포에 LPS를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하고 무환자나무 열매 추출물을 전처리하여 항산화 효능을 관찰하였다. 그 결과, 무환자나무 열매 추출물에 의하여 ROS의 생성 감소, COX-2, iNOS, HO-1의 단백질 발현의 감소, Nrf2의 핵 이동 증가, Akt와 GSK-3 $\beta$ 의 인산화 증가의 결과가 관찰되었다.

이상의 결과로부터 무환자나무 열매 추출물이 LPS에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대항하여 Nrf2/HO-1 경로를 통하여 항산화 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 항산화 효능을 가지는 기능성 소재로서 무환자나무 추출물이 이용될 수 있는 근거를 제공할 수 있다고 사료된다.

#### References

1. Y. Zhuang, H. Wu, X. Wang, J. He, S. He, Y. Yin, "Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway", *Oxid. Med. Cell Longev.*, Vol.2019, pp. 1-14, (2019).
2. H. F. Zhang, J. H. Wang, Y. L. Wang, C. Gao, Y. T. Gu, J. Huang, J. H. Wang, Z. Zhang, "Salvianolic Acid A Protects the Kidney against Oxidative Stress by Activating the Akt/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 Signaling Pathway and Inhibiting the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in 5/6 Nephrectomized Rats", *Oxid. Med. Cell Longev.*, Vol.2019 pp. 1-16, (2019).
3. X. Xu, H. Li, X. Hou, D. Li, S. He, C. Wan, P. Yin, M. Liu, F. Liu, J. Xu, "Punicalagin Induces Nrf2/HO-1 Expression via Upregulation of PI3K/AKT Pathway and Inhibits LPS-Induced Oxidative Stress in RAW264.7 Macrophages", *Mediators Inflamm.*, Vol.2015, pp. 1-16, (2015).
4. C. Yan, X. Zhang, J. Miao, H. Yuan, E. Liu, T. Liang, Q. Li, "Farrerol Directly Targets GSK-3 $\beta$  to Activate Nrf2-ARE Pathway and Protect EA.hy926 Cells against Oxidative Stress-Induced Injuries", *Oxid. Med. Cell Longev.*, Vol.2020, pp. 1-17, (2020).
5. C. C. Chen, C. J. Nien, L. G. Chen, K. Y. Huang, W. J. Chang, H. M. Huang, "Effects of Sapindus mukorossi Seed Oil on Skin Wound Healing: In Vivo and in Vitro Testing", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.20, NO.10 pp. 2579-2593, (2019).
6. M. Liu, Y. L. Chen, Y. H. Kuo, M. K. Lu, C. C. Liao, "Aqueous Extract of Sapindus mukorossi Induced Cell Death of A549 Cells and Exhibited Antitumor Property in Vivo", *Sci. Rep.*, Vol.8, No.1, pp 4831-4845, (2018).
7. A. Upadhyay, D. K. Singh, "Pharmacological Effects of Sapindus Mukorossi", *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, Vol.54, No.5, pp. 273-280, (2012).
8. F. M. Porsche, D. Molitor, M. Beyer, S. Charton, C. André, A. Kollar, "Antifungal Activity of Saponins from the Fruit Pericarp of Sapindus mukorossi against *Venturia inaequalis* and *Botrytis cinerea*", *Plant Dis.*, Vol.102, No.5, pp. 991-1000, (2018).
9. Y. Onodera, T. Teramura, T. Takehara, K. Shigi, K. Fukuda, "Reactive Oxygen Species Induce Cox-2 Expression via TAK1 Activation in Synovial Fibroblast Cells", *FEBS Open Bio.*, Vol.5, pp. 492-501 (2015).
10. Y. J. Choi, H. S. Kim, J. Lee, J. Chung, J.

- S. Lee, J. S. Choi, T. R. Yoon, H. K. Kim, H. Y. Chung, "Down-regulation of Oxidative Stress and COX-2 and iNOS Expressions by Eimethyl Lithospermate in Aged Rat Kidney", *Arch. Pharm. Res.*, Vol.37, No.8, pp. 1032-1038, (2014).
11. P. L. Tran, O. Kim, H. N. K. Tran, M. H. Tran, B. S. Min, C. Hwangbo, J. H. Lee, "Protective Effects of Extract of *Cleistocalyx operculatus* Flower Buds and Its Isolated Major Constituent against LPS-induced Endotoxic Shock by Activating the Nrf2/HO-1 Pathway", *Food Chem. Toxicol.*, Vol.129, pp. 125-137, (2019).
  12. J. H. Shin, K. M. Kim, J. U. Jeong, J. M. Shin, J. H. Kang, K. Bang, J. H. Kim, "Nrf2-Heme Oxygenase-1 Attenuates High-Glucose-Induced Epithelial- to-Mesenchymal Transition of Renal Tubule Cells by Inhibiting ROS-Mediated PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  Signaling", *J. Diabetes Res.*, Vol.2019, pp. 1-8, (2019).
  13. G. Armagan, E. Sevgili, F. T. Gürkan, F. A. Köse, T. Bilgiç, T. Dacı, L. Saso, "Regulation of the Nrf2 Pathway by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in MPP<sup>+</sup>-Induced Cell Damage", *Molecules*, Vol.24, No.7, pp. 1377-1396, (2019).
  14. S. M. Ahmed, L. Luo, A. Namani, X. J. Wang, X. Tang, "Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles in Inflammation", *Biochimica Biophysica Acta*, Vol.1863 No.2, pp. 585-597, (2017).
  15. Y. Liu, P. Liu, Q. Wang, F. Sun, F. Liu, "Sulforaphane Attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidant Stress in Human Trabecular Meshwork Cells (HTMCs) via the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Serine/Threonine Kinase (Akt)-Mediated Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Signaling Activation", *Med. Sci. Monit.*, Vol.25, pp. 811-818, (2019).
  16. H. Endo, C. Nito, H. Kamada, T. Nishi, P. H. Chan, "Activation of the Akt/GSK3 $\beta$  Signaling Pathway Mediates Survival of Vulnerable Hippocampal Neurons after Transient Global Cerebral Ischemia in Rats", *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, Vol.26, No.12, pp. 1479-1489 (2006).
  17. G. Shang, X. Tang, P. Gao, F. Guo, H. Liu, Z. Zhao, Q. Chen, T. Jiang, N. Zhang, H. Li, "Sulforaphane Attenuation of Experimental Diabetic Nephropathy Involves GSK-3 $\beta$ /Fyn/Nrf2 Signaling Pathway", *J. Nutr. Biochem.*, Vol.26, No.6, pp. 596-606, (2015).