

코스메슈티컬 적용을 위한 흑호두 과피의 생리학적 연구

이현주¹ · 옥승호^{2,†}

¹전남대학교 대학원 향장품학협동과정

²전남대학교 치의학전문대학원 구강미생물학교실

(2021년 1월 19일 접수: 2021년 2월 11일 수정: 2021년 2월 15일 채택)

Physiological Study of the Extract of *Juglans nigra* Shells for the Cosmeceutical Application

Hyun Ju Lee¹ · Seung-Ho Ohk^{2,†}

¹Interdiscilpinary Program of Perfume and Cosmetics, Chonnam National University

²Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Chonnam National University

(Received January 19, 2021; Revised February 11, 2021; Accepted February 15, 2021)

요약 : 천연물 중 시판되지 않고 대부분 버려지는 흑호두(*Juglans nigra*) 과피를 추출하여 화장품 적용 가능성과 생리 활성 및 효능을 조사하였다. 흑호두 과피 열수 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 300 µg/mL에서 76.06%였으며 ABTS 라디칼 소거 활성은 1000 µg/mL에서 61%로 우수한 항산화 활성을 나타냈다. 흑호두 과피 추출물을 피부 각질 세포인 HaCaT 세포에 적용했을 때 250 µg/mL에서 92.6%로 세포 생존율에 미치는 영향이 현저히 낮았고 500 µg/mL 농도에서 67.35%의 nitric oxide(NO) 생성이 억제되었으며 100 µg/mL 농도에서 비타민 C보다 31배 더 높은 Hyaluronidase 억제 효과를 나타냈다. 결론적으로 흑호두 과피 추출물은 코스메슈티컬 응용 및 식품, 향료, 헬스 케어, 제약 등 다양한 산업에서 고부가 가치 천연 소재로 활용 가능성을 시사하고 있다.

주제어 : 흑호두, 과피, 코스메슈티컬, 항산화, 항염효과

Abstract : Among natural products, the shells of black walnut (*Juglans nigra*), which are not used commercially and mostly discarded, were examined to investigate the physiological activity and the efficacy for the cosmetic application. DPPH radical scavenging activity of hot water extract of black walnut shells was 76.06% at 300 µg/mL. ABTS radical scavenging activity of the extract was 61% at 1000 µg/mL, showing excellent antioxidant activity. When the black walnut shell extract was applied to HaCaT cells, a skin keratinocyte, the viability of the cells was 92.6% at 250 µg/mL, showing a remarkably low effect on cell viability. At the concentration of 500 µg/mL, 67.35% of nitric oxide(NO) production was inhibited. It also showed an inhibitory effect on Hyaluronidase 31 times

[†]Corresponding author

(E-mail: shohk@chonnam.ac.kr)

higher than that of Vitamin C at 100 µg/mL concentration. In conclusion, the black walnut shell extract showed high potentials for the cosmeceutical applications, suggesting the possibility of using it as a high value-added natural material in various industries such as food, fragrance, healthcare, and pharmaceuticals.

Keywords : *Juglans nigra*, *cosmeceutical*, *antioxidant activity*, *anti-inflammatory*, *pericarp*

1. 서론

노화란 세포와 신체조직 전 기관에 걸쳐 일어나는 기능적, 구조적 생화학적 변화로 특히 자외선에 의한 광 산화적 피부 손상은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 매개되며 항산화제 고갈, 지질과산화, 단백질 산화 및 DNA 산화적 손상의 결과를 가져온다[1]. 산소에서 superoxide(O₂⁻)가 만들어지고, superoxide에서 과산화수소(H₂O₂)가 생성된다. 생성된 과산화수소로부터 만들어진 Singlet Oxygen(¹O₂) 및 Hydroxyl Radical(OH⁻)는 반응성이 매우 큰 물질로 피부의 피지막에 함유된 다량의 불포화지질과 반응하여 과산화지질을 생성하고 멜라닌 분해 속도가 느려져 자외선에 의한 침전물을 발생시키며 세포와 조직에 손상을 가해 피부 탄력성을 감소시키는 등 노화를 가속 시킨다. 항산화 물질은 활성산소를 조절하여 산화적 손상을 억제하거나 지연시키는 물질로 세포 내 주요 물질들이 활성산소에 의한 연쇄 반응을 막아 주어 세포를 보호하는 것으로 알려져 있으며 대부분 식물들은 tocopherol, lecithin, cephalin, polyphenol, ascorbic acid, flavonoid 등의 천연 항산화제로 활성산소에 대한 방어기전을 가지고 있다[2,3]. 항산화 효과가 뛰어난 합성 항산화제로 butylated hydroxyanisole(BHA)와 butylated hydroxytoluene(BHT) 등이 주로 사용되고 있으나 최근 안전성에 대한 인식변화로 가치 소비문화가 정착되어 합성물질의 부작용을 최소화할 수 있는 자연적으로 파생된 화학물질에 대한 관심이 증가됨에 따라 천연 소재의 필요성이 대두되었다. 천연물이란 동물, 식물, 미생물 등 살아있는 유기체에서 기원하는 물질을 가르키며 의약품, 건강기능식품, 기능성 화장품뿐 아니라 비료, 천연색소, 향료 등 다양한 산업적 활용이 가능하지만 아직까지 다양성이 떨어지고 생산성이 낮은 단점을 갖고 있다.

흑호두 나무(*Juglans nigra*)는 북아메리카에 서

식하는 호두과인 Juglandaceae에 속하는 낙엽수종으로 전체 열매는 알맹이(kernel), 과피(shell), 외피(husk)로 구성되어 있으며 매우 단단하고 독특한 매운 냄새가 난다[4]. 흑호두 열매에는 saponin, cardenolides, alkaloid, anthraquinones, tannin 등의 화학성분이 함유되어 있고 plumbagin(노란색 퀴논 색소), juglone(5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) 및 tannin의 화합물은 매염제와 착색제로 사용되어 진다[5]. 흑호두 나무의 부작용으로 알려진 juglone 성분은 식물들에 제초제 역할로 살충효과가 발휘되지만, 인간에게는 항바이러스, 항진균 효과를 발휘하는 유익한 작용을 하는 피토케미칼 중 하나로 알려져 있으며 juglone의 항진균 활성은 zinc undecylenate 및 selenium sulfide를 포함하여 시판되는 항진균제만큼 효과적일 수 있다[6]. 또한 견과류에 많은 양으로 존재하는 프로 안토시아닌은 태양 손상으로부터 신체를 보호하고 시력을 향상시키며 관절, 동맥 및 심장 조직의 유연성을 촉진하고 혈액순환을 개선하는 데 도움을 준다[7]. 흑호두는 항산화와 항균성을 나타내는 페놀 화합물을 포함하는 풍부한 항산화제의 원천이자 건강상 이점이 있는 것으로 입증됨에 따라[8] 상업적인 면에서 잠재적 가능성을 가진 천연자원이지만 과피는 부산물로 가공과정에서 일반적으로 농산폐기물로 버려진다. 흑호두 활성에 관한 연구로는 염증성 사이토카인 생성 억제[9], 흑호두 외피 추출물의 항균 활성[10] 에탄올 개질제와 함께 초임계 이산화탄소를 사용하여 추출한 흑호두 껍질의 항산화 잠재력[1] 등이 보고되었으나 항산화 소재로의 활성 평가에 관한 연구는 부족하여 본 연구에서는 흑호두 과피의 열수 추출을 이용한 항산화와 항염증 효능에 관해 연구하였으며 향후 코스메슈티컬의 소재로 사용할 수 있는 활용성에 대한 자료를 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

2.1.1. 재료

본 실험에서 사용한 흑호두 과피 *Juglans nigra*(Black walnut hulls) shell은 미국에서 종자 과피를 커팅하여 가공한 것을 사용하였다.

2.1.2. 시약

본 연구의 실험에 사용한 시약으로는 DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), ascorbic acid, butylated hydroxytoluene(BHT), lipopolysaccharide, HAase 효소, vitamin C 는 Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서, QuantiChrom™ Hyaluronidase Inhibitor Screening Assay Kit는 (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)에서 구입하였으며 그 밖의 시약은 시판되는 특급 혹은 1급 분석용 시약을 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 흑호두 과피 추출

커팅하여 가공한 흑호두 과피 600 g에 정제수 1 L를 가하여 95°C water bath에서 12시간 추출하였다. 추출한 상등액을 여과지 filter paper No.2(Qualitative filter paper, Advantec, Tokyo, Japan)로 거른 후 감압 농축하고 농축된 추출물은 동결 건조하여 각각의 실험에 맞는 농도로 사용하였다.

2.2.2. DPPH radical 소거활성 측정

DPPH radical 소거능은 시료 200 μ L에 0.2 mM DPPH(Sigma-Aldrich Co.) 용액 800 μ L를 가한 후 암소에서 30분간 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능 결과 값은 시료 용액 첨가군과 무첨가군을 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

$$DPPH\ radical\ 소거\ 활성\ (\%) = 100 - \left[\frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{시료 무첨가군 흡광도}} \times 100 \right]$$

2.2.3. ABTS radical cation 소거작용 측정

ABTS radical cation 소거 활성은 7 mM ABTS 용액 2 mL에 2.6 mM potassium persulfate 2 mL를 혼합한 후 암소에서 약 24시간 반응시켰다. 실험 직전에 ABTS 용액을 734 nm에서 흡광도가 0.70 이 되도록 phosphate buffer saline(pH 7.4)으로 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS 용액 800 μ L를 일정 농도로 희석한 시료 200 μ L에 첨가하여 암소에서 5 분간 반응시키고, ELISA reader를 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정 후 결과 값은 시료 용액 첨가군과 대조군을 비교하여 라디칼의 소거능을 백분율(%)로 나타내었다.

2.2.4. 세포독성 측정

인간 각질 세포(keratinocyte)인 HaCaT 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양받아 사용하였으며 HaCaT 세포주는 10% fetal bovine serum과 항생제(50 μ g/mL streptomycin과 50 U/mL penicillin)가 첨가된 DMEM으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고 3일에 한 번씩 subculture를 수행하였다. 흑호두 과피 추출물에 의한 세포독성을 알아보기 위해 배양된 세포를 5×10⁴ cells/mL로 96 well에 100 μ L씩 분주한 후 24시간 배양 후 시료들을 처리해 주었다. 시료 처리 48시간 후 MTT (5 mg/mL) 시약을 10 μ L 가하고 4시간을 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 후 DMSO를 200 μ L씩 넣어 주고 microplate ELISA reader로 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 100%와 0%의 세포 생존율은 배양액, 0.1% Triton X-100을 각각 처리한 세포의 흡광도를 기준으로 계산하였다.

2.2.5. Hyaluronidase(HAase) 활성 저해 측정

Hyaluronidase 활성 저해 효과는 HAase 효소와 QuantiChrom™ Hyaluronidase Inhibitor Screening Assay Kit를 이용하여 실험을 수행하고 microplate reader로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 대조군으로 vitamin C를 사용하였으며 실험은 독립적으로 세 번 시행하였다.

2.2.6. Nitro oxide(NO) 측정

실험에 사용된 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 분양

받아 사용하였으며 RAW 264.7 세포의 배양액으로부터 NO₂ 를 GRIESS 반응으로 실험하여 NO 생산을 측정하였다. 12 well plate에 1×10⁵ cells/mL의 농도로 24시간 전 미리 부착시키고, cell을 PBS로 수세하고 RPMI-1640 배지로 교체 후 LPS 1 µg/mL를 well에 첨가하고 1시간 뒤 시료를 처리하여 12시간 배양하였다. NO 생성량은 상등액을 모아 Griess reagent로 10분간 반응시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 Nitrite standard를 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

3. 결과

3.1. DPPH radical 소거 활성

흑호두 과피 추출물의 DPPH radical 소거 활성능을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. DPPH에 의한 항산화 활성 측정방법은 free radical에 전자를 공여하여 지방질 산화 억제 및 free radical에 의한 노화 저해 작용의 척도로 이용된다[11]. 시료의 농도를 100, 200, 300 µg/mL로 실험한 결과 농도가 높아질수록 유의적으로 활성이 증가하였으며 300 µg/mL 농도에서 흑호두 과피 추출

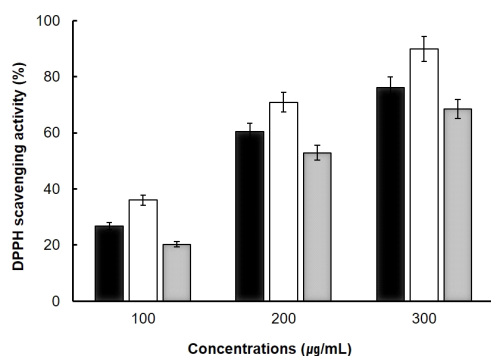


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of the extract of black walnut shells. The scavenging activity was compared with those of ascorbic acid and butylated hydroxytoluene. Data are the mean ± S.E. of values in three independent experiments. Symbols: ■, the extract of *Juglans nigra* shells; □, ascorbic acid; ▒, butylated hydroxytoluene.

물은 76.06%로 나타났고 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 BHT는 각각 89.9%, 68.55%로 나타났다. 동일농도에서 흑호두 과피 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성능은 ascorbic acid에 미치지 못했지만 BHT보다 높은 효능을 나타냈다. 1,000 µg/mL 농도에서 연근 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능 측정 결과 66.7%로[12] 낮은 농도에서 흑호두 과피 추출물의 효능이 더 우수했으며 호두(*Juglans regia* L.) 외피(husk)의 항산화 활성 비교 연구[13]에서 DPPH radical 소거능은 열수 추출이 메탄올 추출보다 2배 이상 높은 효과를 나타내어 열수 추출한 흑호두 과피 추출물은 항산화 효능이 우수할 것으로 예상된다.

3.2. ABTS radical 소거 활성

ABTS radical 소거 활성 실험은 ABTS를 peroxidase, H₂O₂와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS radical이 형성되면 흑호두 과피의 항산화력에 의해 radical이 소거되어 청록색이 탈색되고 투명한색이 나타내는 원리를 이용한다[14]. 흑호두 과피 추출물은 100, 500, 1,000 µg/mL 농도에서 각각 8.9%, 24%, 61%로 나타났고 기준물질인 ascorbic acid와 BHT는 1,000 µg/mL 농도에서 각각 94.7%, 79.2%로 흑호두 과피 추출물은 기준물질들에 비해 ABTS radical 소거 활성이 낮았으나 농도가 높아질수록 유의적으로 활성이 증가하였다(Fig. 2). 연근 에탄올 추출물은 1,000 µg/mL 농도에서 51.2%로 흑호두 과피 추출물이 연근보다 ABTS radical 소거능이 우수한 것으로 나타났으며 총 폴리페놀 함량 또한 연근 181 µGAE/mL, 흑호두 과피 489 µGAE/mL로 흑호두 과피에서 훨씬 많은 활성을 나타냈다[12]. 총 phenol 함량이 높을수록 DPPH 와 ABTS의 항산화능이 우수한 것으로 알려져 있으며 플라보노이드는 종류에 따라 다양한 환원성 작용기를 나타내기 때문에 상관관계가 없었다[13].

3.3. 세포 생존율 측정

흑호두 과피 추출물이 안전한 소재로 활용될 수 있는지 알아보기 위하여 HaCaT cell에서 독성을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 살아있는 세포 미토콘드리아의 산화환원 반응에 의한 물질대사 능력을 측정함으로써 세포의 생존력과 활성도를 나타낸다. 흑호두 과피 추출물을 15.6, 31.2, 62.5, 125 및 250 µg/mL 농도로 처리한 결과는 Fig. 3과 같다. 측

정한 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며 250 µg/mL 농도에서 92.6%의 생존율을 보여 세포 생존력에 미치는 영향이 현저히 낮음을 알 수 있다.

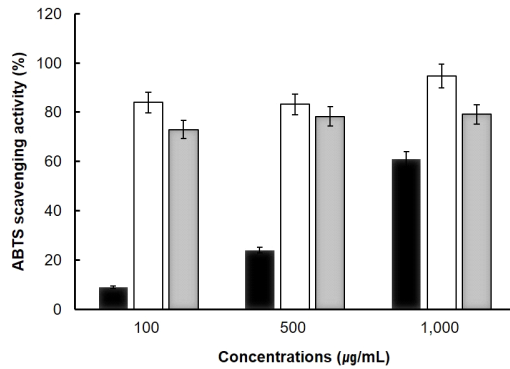


Fig. 2. ABTS scavenging activity of the extract of black walnut shells. The scavenging activity was compared with those of ascorbic acid and butylated hydroxytoluene. Data are the mean ± S.E. of values in three independent experiments. Symbols: ■, the extract of *Juglans nigra* shells; □, ascorbic acid; ▣, butylated hydroxytoluene.

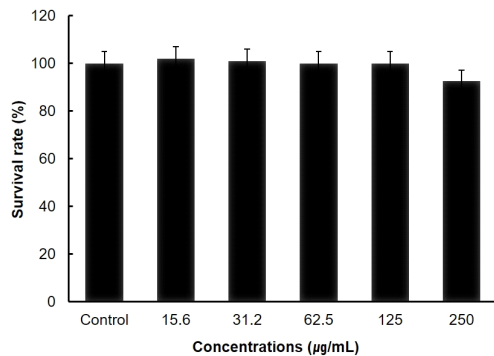


Fig. 3. Effects of the black walnut shell extract on the viability of HaCaT cells. Cell viability of HaCaT(human keratinocyte) cells in the presence of the black walnut extract was determined by MTT assay. Data are the mean ± S.E. of values in three independent experiments.

3.4. Hyaluronidase(HAase) 활성 저해능

흑호두 과피 추출물을 코스메슈티컬에 적용 범 위인 항염증에 대한 활성을 알아보기 위해 Hyaluronidase 저해 활성을 평가하였다. Hyaluronidase는 피부 보습 및 탄력 유지에 기여 하는 hyaluronic acid의 분해효소로 피부 면역에 관련된 것으로 알려져 있으며 HAase의 활성을 저하시킴으로써 피부를 보호할 수 있다. HAase 저해 활성 측정 결과는 Fig. 4와 같이 100 µg/mL 농도에서 흑호두 과피 추출물은 100%로 나타났으며 동일농도에서 대조군 Vitamin C와 tannic acid는 각각 3.22%, 68.55%로 흑호두 과 피 추출물은 대조군보다 높은 HAase 저해율을 보여 매우 우수한 항염증 및 피부보호 효과가 있음을 알 수 있다.

3.5. Nitro oxide(NO) 저해능

염증은 Lipopolysaccharide(LPS)에 의해 대식세포(macrophage)에서 과량 생산되는 염증 매개인자를 통해 증대되며 NO 및 prostaglandin E2(PGE2) 등과 같은 염증 인자를 만들어 낸다. 염증 인자는 신체가 정상적인 상태에서는 방어작용을 하지만 염증반응이 장기적으로 진행되면 염증성 인자들이 과도하게 분비되어 정상 세포와 조직을 손상 시킨다[15,16]. NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로 NO synthase에 의해 형성되고 과잉 생성된 NO는 함께 발생하는 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 결합하여 반응성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)을 형성함으로써 ROS의 유해 효과를 증폭시켜서 혈관 투과성 및 부종 등의 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다[17,18]. 반응성 질소종에는 peroxytrite(ONOO-)와 dinitrogen trioxide(N2O3) 등이 있으며 이들은 nitrosation, oxidation 및 nitration 등의 반응을 통해 살균 작용, 조직 손상, 그리고 발암 작용 등을 나타내게 된다[19]. 항염증 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포의 NO 생성 저해 활성을 측정된 결과는 Figure 5와 같다. 생성된 NO량을 Control로 하여 LPS를 처리하지 않은 대조구와 비교했을 때 10, 50, 100, 500 µg/mL의 농도로 처리한 결과 농도가 증가할수록 NO 생성량은 감소하였으며 500 µg/mL의 농도에서 67.35% 감소하였음을 알 수 있다.

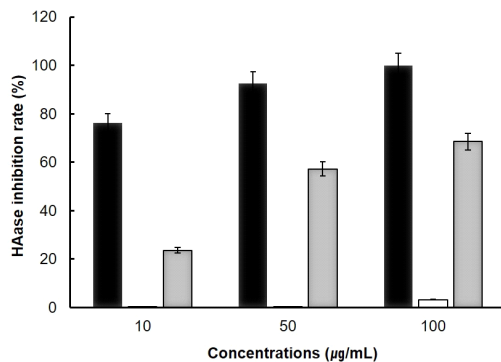


Fig. 4. Inhibition activity of the black walnut shell extract on Hyaluronidase. The inhibitory effect was compared with those of ascorbic acid and Tannic acid. Data are the mean \pm S.E. of values in three independent experiments. Symbols: ■, the extract of *Juglans nigra* shells; □, Vitamin C; ■, Tannic acid.

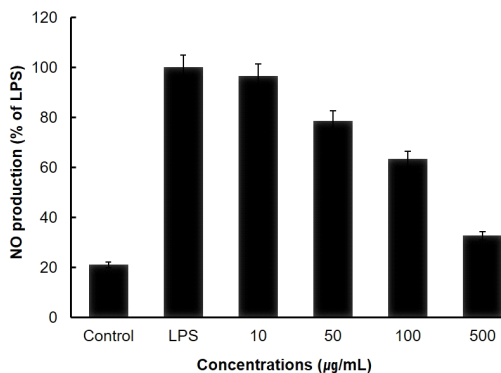


Fig. 5. Inhibitory effects of the black walnut shell extract on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Data are the mean \pm S.E. of values in three independent experiments.

4. 결론

본 연구에서는 흑호두(*Juglans nigra*) 과피 열수 추출물의 항산화, 항염증 실험을 통해 코스메슈티컬 소재로서의 가능성에 대해 평가하였다. 흑호두 과피 추출물의 항산화 활성 DPPH radical

scavenging activity 결과 300 µg/mL 농도에서 76.06%로 동일농도에서 BHT 68.55%보다 더 높은 효능을 나타냈다. ABTS radical 소거 활성 결과 1,000 µg/mL 농도에서 흑호두 과피 추출물은 61%, 기준물질인 ascorbic acid는 94.7%, BHT는 79.2%로 ascorbic acid 및 BHT의 효능이 더 우수하였고 흑호두 과피 추출물의 농도가 높아질수록 유의적으로 활성이 증가함을 확인하였다. 흑호두 과피 추출물의 항염증 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7 세포의 NO 생성 저해 활성을 측정된 결과 NO 생성량은 농도가 증가할수록 감소하였으며 500 µg/mL 농도에서 흑호두 과피 추출물은 NO 발현량이 67.35% 감소하여 높은 항염증 효능을 보여 주었다. 또한, HAase 저해 활성 측정 결과 흑호두 과피 추출물은 100 µg/mL 농도에서 100%로 나타나 매우 우수한 항염증 및 피부보호 효과가 있음을 알 수 있었으며 MTT assay에 의한 HaCaT 세포에서 생존율은 500 µg/mL에서 92.6%를 나타내었다. 본 연구 결과로 흑호두 과피 추출물은 항산화 및 우수한 항염 효과를 가진 코스메슈티컬 소재로써 활용 가치가 높을 것으로 사료되며 향후 다양한 후속 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education (Grant number: 2020R111A3072936)

References

1. B. Ticar, Z. Rohmah, M. Bat-Erdene, S. H. Park and B. D. Choi, "Evaluation of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Ascidian Tunic Carotenoids As a Source of Color Cosmetics", *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*, Vol.28, No.1 pp. 36-41, (2013).

2. M. G. Hertog, E. J. Feskens, P. C. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout, "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study", *The Lancet*, Vol.342, No.8878 pp. 1007-1011, (1993).
3. Y. H. Kim, "Clinical Application of Antioxidants", *Surgical Metabolism and Nutrition*, Vol.2, No.1 pp. 11-15, (2011).
4. Peterson, George A. Petrides, *A Field Guide to Trees and Shrubs: Northeastern and North-Central United States and Southeastern and South-Central Canada (2nd.)*. Boston: Houghton Mifflin Harcourt, (1972).
5. S. E. Owumi, O. A. Odunola, M. A. Gbadegesin, K. L. Nulah, "Protective effect of Juglans nigra on sodium arsenite-induced toxicity in rats", *Pharmacognosy Res.*, Vol.5, No.3 pp. 183-188, (2013).
6. G. H. Shahidi Bonjar, S. Aghighi, A. K. Nik, "Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran", *Journal of Biological Sciences*, Vol.4, No.3 pp. 405-412, (2004).
7. A. Peralbo-Molina, F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro, "Characterization of grape seed residues from the ethanol distillation industry" *Analytical Methods*, Vol.5, No.8 pp. 1922-1929, (2013).
8. J. Wenzel, C. S. Samaniego, L. Wang, L. Burrows, E. Tucker, N. Dwarshuis, M. Ammerman, A. Zand, "Antioxidant potential of Juglans nigra, black walnut, husks extracted using supercritical carbon dioxide with an ethanol modifier", *Food Science & Nutrition*, Vol.5, No.2 pp. 223-232, (2017).
9. K. V. Ho, K. L. Schreiber, D. C. Vu, S. M. Rottinghaus, D. E. Jackson, C. R. Brown, Z. Lei, L. W. Sumner, M. V. Coggeshall, and C. H. Lin, "Black Walnut (*Juglans nigra*) Extracts Inhibit Proinflammatory Cytokine Production From Lipopolysaccharide-Stimulated Human Promonocytic Cell Line U-937", *frontiers in Pharmacology*, Vol.10, pp. 1059, (2019).
10. K. V. Ho, Z. Lei, L. W. Sumner, M. V. Coggeshall, H. Y. Hsieh, G. C. Stewart, C. H. Lin, "Identifying antibacterial compounds in black walnuts (*Juglans nigra*) using a metabolomics approach", *Metabolites* Vol.8, No.4 pp. 58-76 (2018).
11. J. D. Hwang, J. S. Choi, J. B. Kim, Y. S. Lee. "Antioxidant Activities of Bark Extracts from *Kalopanax pictus*", *Journal of Investigative Cosmetology*, Vol.7, No.4 pp. 329-337, (2011).
12. Y. A. Jang, S. H. Park, B. A. Kim, J. Y. Park, Y. O. Jeoung, J. T. Lee, "Effect of ethanol extract of Lotus Rhizome and node of Lotus Rhizome", *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, Vol.34, No.3 pp. 657-665, (2017).
13. K. I. Han, M. R. Kim, B. K. Jo, M. J. Kim, M. J. Kang, K. H. Park, Y. E. Koo, B. S. Kim, E. G. Jung, M. D. Han, "Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Extracts from Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husk", *Journal of Life Science*, Vol.25, No.4 pp. 433-440, (2015).
14. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.53, No.10 pp. 4290-4592, (2005).
15. J. K. Kundu, Y. J. Surh, "Emerging avenues linking inflammation and cancer", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.52, No.9 pp. 2013-2050, (2012).
16. D. H. Kim, S. J. Park, J. Y. Jung, S. C. Kim, S. H. Byun, "Anti-inflammatory effect of the aqueous extract of Hwangnyenhaedok-tang in LPS-activated macrophage cells", *The Korea Journal of Herbology*, Vol.24, No.4 pp. 39-47, (2009).
17. AS. Noman, N. Koide, F. Hassan, I.

I-E-Khuda, J. Dagvadorj, G. Tumurkhuu, S. Islam, Y. Naiki, T. Yoshida, T. Yokochi, "Thalidomide inhibits lipopolysaccharide -induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression", *Innate Immunity*, Vol.15, No.1 pp. 33-41, (2009).

18. M. B. Grisham, D. Jourdeuil, D. A. Wink, "Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation", *American Journal of Physiology*, Vol.276, No.2 pp. 315-336, (1999).