

Anti-inflammatory Effect of Broccoli Leaf Hexane Fraction in LPS-stimulated RAW264.7 Cells

Mee-Kyung Kim*

*Professor, Dept. of Bio-Cosmetic Science, Seowon University, Cheongju, Korea

[Abstract]

In this study, we tested the anti-inflammatory effects of broccoli leaf hexane fraction to confirm the applicability as a functional material in food and cosmetics. This sample was extracted using 70% ethanol from Broccoli leaf and then fractionated with hexane. The production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β), protein expression of iNOS and COX-2, phosphorylation of MAPKs (ERK, JNK, p38) and NF- κ B with broccoli leaf hexane fraction were assayed on LPS-stimulated RAW264.7 cells. The broccoli leaf hexane fraction inhibited the secretion of pro-inflammatory cytokines and protein expression of iNOS and COX-2. Also, the broccoli leaf hexane fraction reduced the phosphorylation of MAPKs and NF- κ B. Therefore, it is considered that the broccoli leaf hexane fraction has the potential to be used as a natural anti-inflammatory material in food and cosmetics. In the future, it is considered necessary to study the anti-inflammatory mechanism and identification of major bioactive substances.

▶ **Key words:** Anti-inflammatory effect, Broccoli leaf, iNOS & COX-2, MAPKs, NF- κ B

[요 약]

본 연구에서는 브로콜리 잎 헥산 분획물의 항염 효과를 평가하여 기능성 식품 및 화장품 소재로의 적용 가능성을 확인하였다. LPS-자극된 RAW264.7 세포에서 전염증성 사이토카인의 생성, iNOS와 COX-2의 발현, MAPK (ERK, JNK, p38) 및 브로콜리 잎 헥산 분획을 사용한 NF- κ B의 인산화를 분석하였다. 브로콜리 잎 헥산 분획은 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β 등의 전염증성 사이토카인의 분비와 iNOS와 COX-2의 발현을 억제했습니다. 또한, 브로콜리 잎 헥산 분획물은 MAPK와 NF- κ B의 인산화를 감소시켰다. 따라서 브로콜리 잎 헥산 분획물은 식품 및 화장품에서 천연 항염증 소재로 적용 가능성이 있는 것으로 판단된다. 향후 항염증 기전 및 주요 생리활성 물질의 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

▶ **주제어:** 항염증 효과, 브로콜리 잎, iNOS & COX-2, MAPKs, NF- κ B

• First Author: Mee-Kyung Kim, Corresponding Author: Mee-Kyung Kim
*Mee-Kyung Kim (kim5179@hanmail.net), Dept. of Bio-Cosmetic Science, Seowon University
• Received: 2021. 12. 03, Revised: 2022. 01. 07, Accepted: 2022. 01. 07.

I. Introduction

인체에 일어나는 염증 반응은 외부의 자극이나 세균에 의한 감염, 스트레스에 대한 몸의 방어 기작으로서 외부 이물질 제거 및 손상된 조직의 회복에 관여하는 면역작용이다[1]. 그러나 장기간 염증 반응이 지속화되면 체내의 정상 세포와 조직에 손상을 주어 동맥경화, 천식, 암, 피부염 등의 만성 염증 질환을 유발하게 된다[2],[3],[4]. 이러한 염증 반응은 전 염증성 사이토카인과 염증 매개체를 생성하는 염증성 세포를 활성화시키게 된다[5],[6].

대식세포는 염증반응에 관여하는 세포로서 염증 유도 물질인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 세포 표면의 인식수용체(toll-like receptor 4)가 자극되어 미토겐 활성화 단백질 키나제(mitogen- activated protein kinase, MAPKs)와 nuclear factor- κ B (NF- κ B)를 활성화시켜 염증을 유발한다[7],[8]. MAPKs의 ERK, p38 및 JNK는 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 전 염증성 사이토카인의 발현을 유도하고[9],[10], 활성화된 NF- κ B는 전 염증성 사이토카인, iNOS 및 COX-2 등의 염증 관련 유전자의 발현을 유도한다[11],[12].

현재 염증 반응 억제를 위해 비스테로이드성 항염제제를 주로 사용하고 있다[13]. 그러나 이를 장기간 사용 시 부작용이 동반되므로 천연자원을 활용한 항염증 소재를 개발하기 위한 연구를 활발히 있다[14],[15].

브로콜리(*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck)는 무기질, 비타민 C, β -carotene, tocopherol, rutin, selenium, glutathione, quercetin, glucosinolates 등의 성분에 의해 활성산소로부터 우리 몸을 보호하는 작용과 각종 질병을 예방하는데 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되어 있다[16],[17],[18]. 연구는 주로 꽃 부위를 이용한 생리활성물질 분리 및 동정, 항산화, 항균, 항암 작용 및 가공식품 개발 등으로 주를 이루고 있을 뿐[19],[20],[21],[22], [23] 비가식 부위인 잎을 활용한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 비가식 부위인 브로콜리 잎 활용을 목적으로 브로콜리 잎 핵산 분획물의 항염증 소재로서의 활용 가능성을 알아보기 위하여 LPS를 처리한 RAW264.7 세포에서 전 염증성 사이토카인, 염증매개체, MAPKs의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

II. Methods

1. Material & fraction preparation

본 실험에 사용한 시료인 브로콜리 잎은 충청북도 청주시 미원면의 농가에서 공급받아 세척한 후 동결건조하여 냉동고(-20°C)에 보관하면서 추출 분획물의 재료로 사용하였다. 건조된 브로콜리 잎에 시료 중량대비 70% 에탄올을 10배 정도 가하여 실온에서 24시간 교반, 추출한 다음 상층액과 침전물을 여과-분리하였으며, 이와 같은 방법으로 3회 반복 추출하였다. 이 에탄올 추출물은 감압 여과 및 감압농축을 한 후 핵산과 동량으로 혼합하여 분획 깔때기에서 핵산층과 물층으로 분획하였고, 핵산층을 감압농축하여 핵산 분획물(HX)을 얻었다. 추출 분획한 핵산 분획물의 수율은 0.8%이었다.

2. Cell culture

마우스 대식세포 RAW264.7 세포는 10% 열-비활성화된 FBS, 100 U/mL penicillin/streptomycin 을 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며 세포의 밀도가 80~90% 정도일 때 계대배양을 하였다.

3. Cell viability assay

브로콜리 잎의 핵산 분획물(HX)이 세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay를 사용하여 실험하였다. RAW264.7 세포(5×10^5 cells/well)를 96-well plate에 분주하고 37°C에서 각 24시간 동안 배양한 후 핵산 분획물을 5, 10, 50, 100, 500, 1000 μ g/mL로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 Assay kit의 지시에 따라 실험을 하였다.

4. Measurement of pro-inflammatory cytokine levels

RAW264.7 세포(4×10^5 cells/well)를 96-well plate에 분주하고, 브로콜리 잎의 핵산 분획물을 농도별(300, 500, 1000 μ g/mL)로 2시간 처리한 후 LPS (1 μ g/mL)로 자극하여 24시간 배양하였다. 24시간 이후 세포를 원심분리 (1,200 rpm, 3분)하여 상층액을 모아 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-1 β 를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

5. Measurement of Inflammation-related protein expression

RAW264.7 세포(1×10^6 cells/well)를 6-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 새로운 DMEM 배지로 교환한 후 브로콜리 잎의 핵산 분획물을 농도별(300, 500,

1000 µg/mL)로 2시간 처리한 후 1 µg/mL LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포 용해 버퍼(10 mM pH 7.4 Tris-HCl, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)를 첨가하여 단백질을 추출·정량하였다. 정량한 단백질을 10% SDS-PAGE에 전기영동 한 후, transfer 및 blocking 하였다. iNOS, COX-2, ERK, JNK, p38, NF-κB의 발현과 인산화는 ECL 을 이용하여 확인하였다.

6. Data Analysis

본 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험 값에 대한 통계 처리는 IBM SPSS Statistics 23 프로그램으로 분석하였다. 유의성 검증은 분산분석을 한 후 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법으로 분석하였다.

III. Research Results

1. Effect of HX on the viability of RAW264.7 cells

면역관련 세포인 대식세포는 여러 가지 자극원에 의해 활성화되면 cytokines, prostaglandins, nitric oxide (NO) 등의 염증매개물질을 생성하게 되고, 생성된 이 물질에 의해 만성염증성 질환이 유발되는 것으로 알려져 있다 [24],[25]. 본 실험에서는 대식세포인 RAW264.7 세포의 생존에 미치는 브로콜리 잎의 헥산 분획물(HX)을 영향을 보기 위하여 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 처리한 결과 농도 1,000 µg/mL까지 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 이 결과를 토대로 RAW 264.7 세포로 진행하는 항염증 관련 실험을 독성이 없는 1000 µg/mL 이내의 범위에서 진행하였다.

2. Effect of HX on pro-inflammatory production

염증을 나타내는 주된 전사인자인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 전 염증성 사이토카인은 급성 염증을 자극하며 내인성 발열원으로 작용함으로써 염증성 질환에서 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다[26],[27]. TNF- α 는 대식세포 활성화제 및 면역 반응의 개시인자이고 염증성 피부질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[28]. 그리고 IL-6와 IL-1 β 는 대식세포를 활성화시키고 급성 및 만성 염증의 유발 매개체 역할을 하는 것으로 알려져 있다[29].

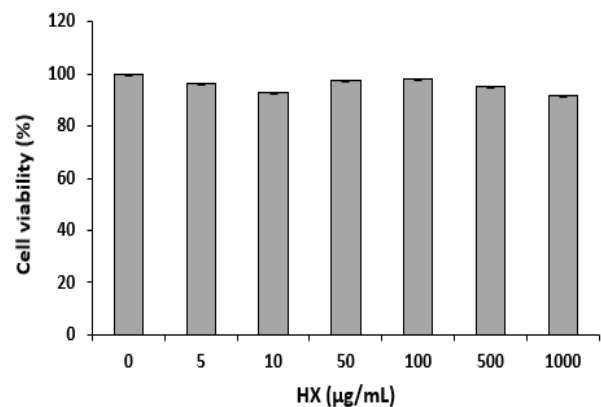


Fig. 1. Effect of hexane fraction (HX) from broccoli leaf on the viability of RAW264.7 cells. Values are mean±SD of triplicate experiments.

본 연구에서 RAW264.7 세포에서 브로콜리 잎의 헥산 분획물이 전염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 헥산 분획물을 300, 500, 1,000 µg/mL로 처리하여 ELISA kit 를 이용하여 측정하였다. 그 결과 헥산 분획물이 전염증성 사이토카인 TNF- α , IL-4, IL-6 및 IL-1 β 모두의 생성을 억제함을 확인하였다(Fig. 2). 특히, LPS 자극에 의해 유도되는 TNF- α 발현은 농도 1,000 µg/mL에서 유의적으로 억제하여 감소됨을 알 수 있다.

3. Effect of HX on pro-inflammatory production

대식세포는 LPS의 자극에 의해 염증 반응에 관계된 전사인자가 활성화되고 그로 인해 iNOS 및 COX-2가 발현되어 염증을 일으킨다[30]. NO 생성 효소인 iNOS와 다양한 prostaglandins 생합성 매개 효소인 COX-2가 염증반응을 조절하는 주된 매개체로 알려져 있다[31]. 본 연구에서 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 브로콜리 잎의 헥산 분획물을 처리한 후 LPS를 처리하여 배양한 다음 세포의 단백질을 분리하여 염증 유도에 관련된 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과 농도 1,000 µg/mL에 iNOS와 COX-2 단백질의 발현이 헥산 분획물에 의해 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다.

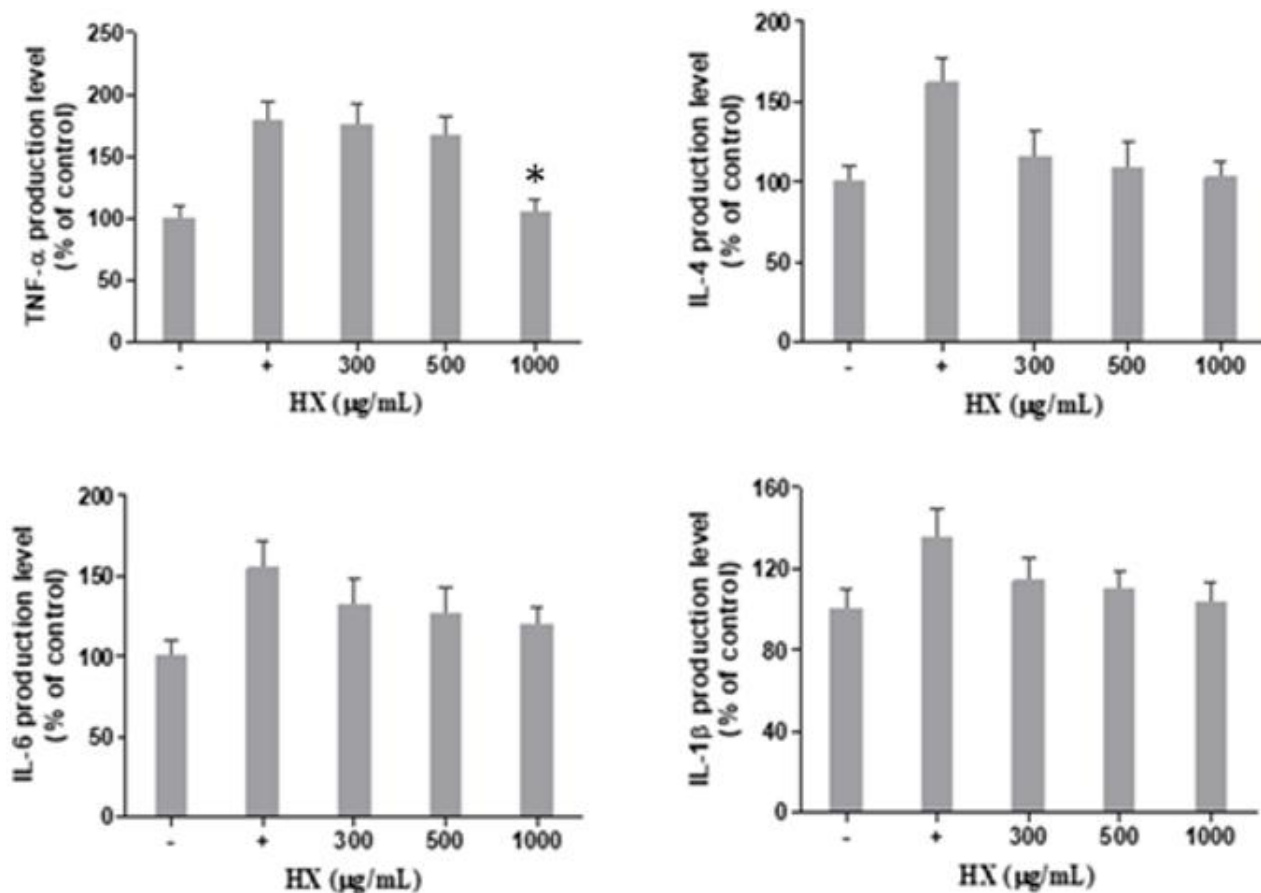


Fig. 2. Effect of hexane fraction (HX) from broccoli leaf on pro-inflammatory cytokine production in LPS-induced RAW264.7 cells. Values are mean±SD of triplicate experiments. *p<0.05 vs only LPS-treated group.

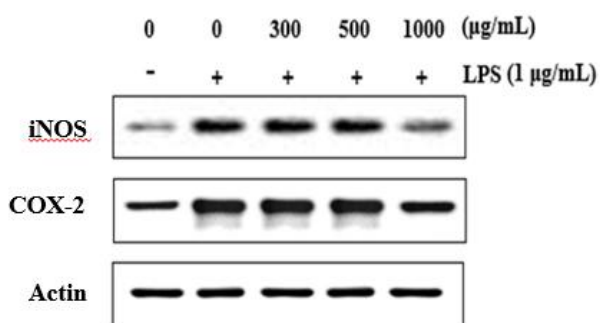


Fig. 3. Effect of hexane fraction from broccoli leaf on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

4. Effect of HX on LPS-induced Phosphorylations MAPKs

대식세포는 LPS의 자극에 의해 세포 표면의 toll-like receptor 4를 자극하여 MAPKs 또는 NF-κB의 활성화 유도하고 전염증성 사이토카인의 발현을 개시하게 된다 [32]. MAPKs 중의 ERK, p38 및 JNK는 iNOS와 COX-2, 전염증성 사이토카인의 발현에 중심적인 역할을 하고 있으므로 염증, 세포자멸사 및 증식과 같은 생물학적 과정에서 중요한 신호경로로 잘 알려져 있다[9],[10].

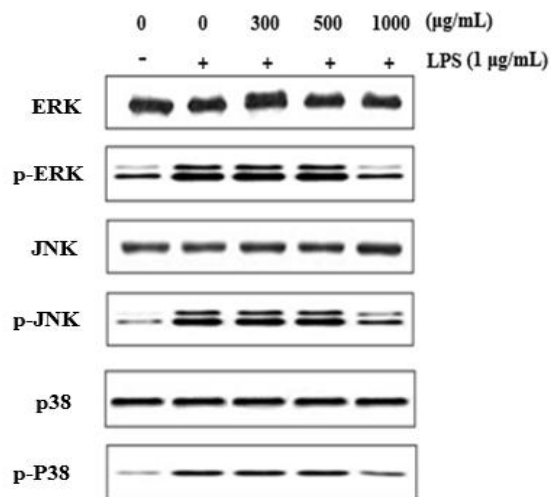


Fig. 4. Effect of hexane fraction from broccoli leaf on phosphorylation of MAPKs in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

RAW264.7 세포에서 ERK, JNK 및 p38의 LPS 유도 인산화에 대한 브로콜리 잎의 헥산 분획물의 효과를 측정하였다. 그 결과 LPS의 자극에 의해 증가된 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 농도 1,000 μg/mL에서 현저하게 감소되

는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과는 핵산 분획물이 대식세포에서 MAPKs 신호 전달의 LPS 유도 인산화를 조절함을 확인할 수 있었다.

5. Effect of HX on phosphorylation of NF- κ B

NF- κ B는 정상 세포에서 inhibitor of kappa B (I κ B)와 결합한 불활성 형태로 존재하고, LPS, cytokines 등의 자극이 주어지면 I κ B는 I κ B kinase (Ikk)에 의해 인산화되고 유비퀴틴화(ubiquitination)를 거쳐 프로테아좀(proteasome)에 의해 분해, 유리되어 핵으로 이동하여 염증관련유전자의 발현을 유도한다[11],[12]. 또한 단백질 인산화 효소인 MAPKs에 의해 활성화된 NF- κ B는 염증 반응을 촉진한다고 보고되어 있다[33]. 본 연구에서는 브로콜리 잎의 핵산 분획물에 의해 LPS에 의해 증가된 NF- κ B의 인산화 조절 기능을 확인하기 위하여 NF- κ B 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과 인산화된 NF- κ B 발현은 핵산 분획물을 1,000 μ g/mL 처리하였을 때 현저하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 5). 이를 통해 브로콜리 잎의 핵산 분획물이 NF- κ B의 인산화를 저해함으로써 인해 NF- κ B에 의한 염증 반응이 억제됨을 알 수 있었다.

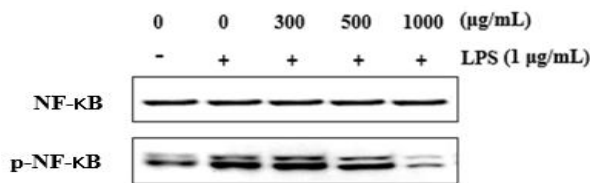


Fig. 5. Effect of hexane fraction from broccoli leaf on phosphorylation of NF- κ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

IV. Conclusions

브로콜리 잎 핵산 분획물의 항염증 효과를 평가하여 기능성 식품 및 화장품 소재로서의 적용 가능성을 알아보기 위해, 마우스 대식세포에 LPS로 자극하여 염증 반응을 유도시키면서 브로콜리 잎 핵산 분획물을 처리하여 여러 염증 관련 매개체를 확인하였다. 그 결과 LPS 자극에 의해 대식세포에서 생성되는 전 염증성 사이토카인 TNF- α , IL-4, IL-6 및 IL-1 β 이 억제되었고, 염증 매개체인 iNOS, COX-2 분자의 단백질 발현, MAPKs (EKR, JNK 및 p38) 인산화 및 NF- κ B의 인산화 모두 농도 1,000 μ g/mL을 처리한 군에 현저하게 억제 효과를 보였다. 따라서, 본 연구 결과는 브로콜리 잎 핵산 분획물이 항염증 개선에 효과가 있는 기능성 천연 소재로서의 가능성을 제시

하고 있다고 판단된다. 향후 식품 및 화장품의 기능성 천연 소재화를 위해서는 항염증 메커니즘 및 주요 생리활성 물질 규명, 안전성 등에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

REFERENCES

- [1] Coussens, L. M. & Werb, Z., "Inflammation and cancer", *Nature*, Vol. 420, No. 6917, pp. 860-867, Jan. 2006. DOI: 10.1038/nature01322
- [2] Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., & Hermoso, M. A., "Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment", *Journal of Immunology Research*, Article ID 149185, pp.1-19, May. 2014. DOI: 10.1155/2014/149185
- [3] Libby P., "Inflammation and cardiovascular disease mechanisms", *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 83, No. 2, pp.456S-460S, Fed. 2006. DOI: 10.1093/ajcn/83.2.456S
- [4] Wellen, K. E. & Hotamisligil G. S., "Inflammation, stress, and diabetes", *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 115, No. 5, pp. 1111-1119, May. 2005. DOI: 10.1172/JCI25102
- [5] Cho, W., Nam, J. W., Kang, H. J., Windono, T., Seo, E. K., & Lee, K. T., "Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF- κ B pathway in LPS-stimulated murine macrophages", *International Immunopharmacology*, Vol. 9, No. 9, pp.1049-1057, Aug. 2009. DOI: org/10.1016/j.intimp.2009.04.012
- [6] Kim, J. H., Song, H. N., Ko, H. C., Lee, J. Y., Jang, M. G., & Kim, S. J., "Anti-oxidant and anti-inflammatory properties of *Clerodendrum trichotomum* leaf extracts", *Journal of Life Science*, Vol. 27, No. 6, pp.640-645, Feb. 2017. DOI: org/10.5352/JLS.2017.27.6.640
- [7] Anderson, N. & Borlak, J., "Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis", *Pharmacological Reviews*, Vol. 60, No. 3, pp.311-357, Sep. 2008. DOI: 10.1124/pr.108.00001
- [8] Cheng, B. C. Y., Ma, X. Q., Kwan, H. Y., Tse, K. W., Cao, H. H., Su, T., Shu, X., Wu, Z. Z., & Yu, Z. L., "A herbal formula consisting of *rosae multiflorae fructus* and *loniceræ japonicæ flos* inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages", *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 153, No. 3, pp.922-927, May. 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.02.029
- [9] Fan, Z., Cai, L., Wang, Y., Zhu, Q., Wang, S., & Chen, B., "The acidic fraction of *isatidis radix* regulates inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through MAPKs and NF- κ B pathway", *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, Article ID 8879862, pp.1-10, Mar. 2021. DOI: org/10.11

55/2021/8879862

- [10] Liu, G., Xie, J., Shi, Y., Chen, R., Li, L., Wang, M., Zheng, M., & Xu, J., "Sec-O-glucosylhamaudol suppressed inflammatory reaction induced by LPS in RAW264.7 cells through inhibition of NF-kappaB and MAPKs signaling", *Bioscience Reports*, Vol. 40, No. 2, BSR20194230. 2020. DOI: 10.1042/BSR20194230
- [11] Elliott, P. J., Zollner, T. M., & Boehncke, W. H., "Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy", *Journal of Molecular Medicine*, Vol. 81, No. 4, pp. 235-245, May. 2003. DOI:10.1007/s00109-003-0422-2
- [12] Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A., "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols", *Biochemical Pharmacology*, Vol. 72, No. 11, pp. 1439-1452, Aug. 2006. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.07.004
- [13] Rashad, S., Hemingway, A., Rainsford, K., Revell, P., Low, F., & Walker, F., "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the course of osteoarthritis", *The Lancet*, Vol. 334, No. 8672, pp.1149-1152, Nov. 1989. DOI: 10.1016/s0140-6736(89) 91503-1
- [14] Huang, J., Zhu, M., Tao, Y., Wang, S., Chen, J., & Sun, W., "Therapeutic properties of quercetin on monosodium urate crystal-induced inflammation in rat", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 64, No. 8, pp.1119-1127, Mar. 2012. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01504.x
- [15] Jiang, Y., You, X. Y., Fu, K. L., & Yin, W. L., "Effects of extract from *Mangifera indica* leaf on monosodium urate crystal-induced gouty arthritis in rats", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 967573, pp.1-6, Nov. 2012. DOI: 10.1155/2012/967573
- [16] Kwon, Y.D., Ko, E. Y., Hong, S. J., & Park, S. W., "Comparison of sulforaphane and antioxidant contents according to different parts and maturity of broccoli", *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, Vol. 26, No. 3, pp.344-349, Sept. 2008.
- [17] Lee, H. S. & Park, Y. W., "Antioxidant activity and antibacterial activities from different parts of broccoli extracts under high temperature", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 34, No. 6, pp.759-764, Jun. 2005.
- [18] Stoewsand, G. S., "Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetable-a review", *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 33, No. 6, pp.537-543, Jun. 1995. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00017-v
- [19] Kim, D. Y., Cho, S. C., Kwon, H. S., & Kim, M. K., "Cosmeceutical activities of broccoli extracts", *Journal of the Korean Society Beauty & Art*, Vol. 17, No. 1, pp.23-33, Mar. 2016.
- [20] Sok, D. E., Kim J. H., & Kim, M. R., "Isolation and identification of bioactive organosulfur phytochemicals from solvent extract of broccoli", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 32, No. 3, pp.315-319, Apr. 2003.
- [21] Oh, J. B. & Lee H. J., "Effect of cake improver on antioxidant activity and properties characteristics of pound cakes prepared using broccoli stem powder", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 24, No. 4, pp.567-576, Nov. 2011.
- [22] Cho, K. R., "Quality characteristics of Seodiddeok added with broccoli(*Brassica oleracea* var. *italica* Plen.) powder", *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol. 22, No. 2, pp.229-237, May. 2009.
- [23] Brooks, J. D., Paton, V. G. & Vidanes, G., "Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, Vol. 10, No. 9, pp.949-954, Sep. 2001.
- [24] Adams, D. O. & Hamilton, T. A., "The cell biology of macrophage activation", *Annual Review of Immunology*, Vol. 2, pp.283-318, Aug. 1984. DOI: 10.1146/annurev.iy. 02.040184.001435
- [25] Li, Y., Wu, Q., Deng, Y., Lv, H., Qiu, J., Chi, G., & Feng, H., "D(-)-Salicin inhibits the LPS-induced inflammation in RAW 264.7 cells and mouse models", *International Immunopharmacology*, Vol. 26, No. 2, pp.286-294, Jun. 2015. DOI: 10.1016/j.intimp. 2015.04.016
- [26] Kaqamata, H., Ochiai, H., Mantani, N., & terasawa, K., "Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line", *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 28, No. 2, pp.217-226, Jun. 2000. DOI: 10.1142/S0192415X0000026X
- [27] Shew, R. L., Papka, R. E., McNeill, D. L., & Yee, J. A., "NADPH-diaphorase-positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction", *Peptides*, Vol. 14, No. 3, pp.637-641, May. 1993. DOI: 10.1016/0196-9781(93) 90157-c
- [28] Piguat, P. F., Grau, G. E., Houser, C., & Vassalli, P., "Tumor necrosis factor is a critical mediators in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reaction", *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 173, No. 3, pp.673-679, Mar. 1991. DOI: 10.1084/jem.173.3.673
- [29] Xie, C., Li, X., Zhu, J., Wu, J., Geng, S., & Zhong, C., "Magnesium isoglycyrrhizinate suppresses LPS-induced inflammation and oxidative stress through inhibiting NF-kappaB and MAPK pathways in RAW264.7 cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 27, No. 3, pp.516-524, Feb. 2019. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.12.033
- [30] Park, J. S. & Jug S. H., "Effects of sandalwood essential oil on the iNOS expression and proinflammatory cytokine production", *The pharmaceutical Society of Korea*, Vol. 57, No. 1, pp.70-75, Feb. 2013.
- [31] Kim, Y. J. & Son, D. Y., "Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated

- Raw264.7 mouse macrophage” The Korean Society of Food Preservation, Vol. 21, No. 1, pp.114-120, Sept. 2014. DOI: 10.11002/kjfp. 2014.21.1.114
- [32] Jung, H. W., Mahesh, R., Park, J. H., Boo, Y. C., Park, K. M., & Park, Y. K., “Bisabolangelone isolated from *Ostericum koreanum* inhibits the production of inflammatory mediators by down-regulation of NF- κ B and ERK MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells”, *International Immunopharmacology*, Vol. 10, No. 2, pp. 155-162, Feb. 2010. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.10.010
- [33] Kaminska, B., “MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits”, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1754, No. 1-2, pp.253-262, Dec. 2005. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.08.017

Authors



Mee-Kyung Kim received the Ph.D. degree in Department of Food Science and Technology from Daegu Catholic University, Korea. Dr. Kim is currently an assistant professor of Dept. of Bio-Cosmetic Science at Seowon University.

She is interested in cosmetic professional training course, customized cosmetic manufacturing manager trainin course and development of cosmetic functional materials.