

## 苦練丸의 항산화 및 항염증 효과에 관한 실험 연구

동신대학교 한의과대학 한방부인과교실  
윤예슬, 양승정, 조성희

### ABSTRACT

#### An Experimental Study on the Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Goryeon-hwan*

Ye-Seul Yun, Seung-Jeong Yang, Seong-Hee Cho  
Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

**Objectives:** The purpose of this study is to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Goryeon-hwan* (GRH), which is mentioned in *«Donguibogam»* that treats leukorrhea.

**Methods:** In this study, the antioxidant efficacy of GRH was evaluated by measuring the total polyphenol and flavonoid content, DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, and ROS production through RAW264.7 cells. The concentration of GRH cytotoxicity was confirmed through the cell viability of RAW264.7 cells, and the production of NO, the production of Cytokine through ELISA assay, and the expression of genes through Real-time PCR were measured to evaluate anti-inflammatory efficacy. Protein phosphorylation and protein expression were measured through Western blot analysis.

**Results:** As a result of the experiment, GRH contained polyphenol and flavonoid, and concentration-dependent increased DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity and decreased ROS production. The anti-inflammatory efficacy measurement results showed a significant decrease in NO and Cytokine production in the GRH administration group compared to the control group. In terms of gene expression and protein expression, there was a significant decrease in iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  depending on the concentration, and a significant increase in HO-1 and NQO1. Protein phosphorylation measurements showed a concentration-dependent significant decrease in the GRH group at ERK and p38.

**Conclusions:** As a result, the study experimentally confirmed the antioxidant and anti-inflammatory effects of GRH, suggesting that it may be used as a treatment for various gynecological inflammatory diseases including vaginitis.

**Key Words:** Antioxidant, Anti-inflammatory, Leukorrhea, *Goryeon-hwan*, *Donguibogam*

## I. 서 론

여성 생식기 감염으로는 질 감염, 자궁 목점막염, 골반 염증성 질환이 있다<sup>1)</sup>. 이중 질 감염은 질 분비물, 소양감, 작열감, 냄새, 성교통 등의 증상을 특징으로 하는 염증 상태로, 외래에서 가장 흔한 부인과 질환이다. 질염은 감염원에 따라 세균성 질증과 트리코모나스 질염, 질 칸디다증, 염증성 질염으로 분류된다<sup>1)</sup>.

질염이 심하게 발전되는 경우는 드물지만, 치료 후 재발률이 높아 항생제를 지속적으로 사용할 경우, 질염을 일으키는 병원성 미생물뿐만 아니라 정상적인 질 내 세균총을 파괴하여 만성으로 진행될 수 있다. 또한 장기간의 항생제 사용은 질을 통한 항생제의 흡수가 전신적 독성을 야기할 수도 있음이 보고되어왔다<sup>2)</sup>. 이에 반해, 천연물로부터의 항균 작용은 인체 내의 항체 생성 촉진과 체내 생화학적 수치들의 정상화를 통한 면역기능 증가로 만성적 질환을 예방하고 치료하는데 긍정적인 효과를 나타내며 이에 대한 관심이 한약재 추출물에 대한 항균 활성 연구 보고로 이어지고 있다<sup>3)</sup>.

질염은 한의학에서 帶下의 범주에 해당된다<sup>4)</sup>. 帶下는 출혈 이외의 질 분비물을 일컫는 말로, 정상 분비물 양의 과다나 생식 내강의 병적 상황에 의한 이상 삼출물을 의미하는데, 한의학적으로는 ‘縱帶脈以下’의 뜻을 가지며, 여성 생기의 분비물을 총칭한다. 대부분의 帶下는 자궁경부, 질, 난관 등의 단순 감염과 연관되는 경우가 많아 부인과적 증상 중 가장 흔하다<sup>4)</sup>.

《東醫寶鑑·胞門》<sup>5)</sup>에서는 赤白帶下를

‘原其本，皆濕熱結于脉，故津液涌溢，是爲赤白帶下，臍下痛，陰中綿綿而下也.’, 즉, 습열로 인한 대하가 하복통과 함께 지속적인 질 분비물을 발생시킨다고 하였으며 이는 현대 여성 생식기의 병리적 상황을 의미하는 여성생식기 감염과 유사하다고 볼 수 있다. 이어 ‘赤白帶，宜伏龍肝散，苦練丸，白芍藥散.’라고 하며 고련환<sup>5)</sup>을 ‘治熱入大小腸，爲赤白帶下，最妙.’라고 언급하였다. 그럼에도 고련환의 구성 약재인 川練子, 茴香, 當歸에 대한 항산화 및 항염증 실험 연구들은 진행된 바 있지만<sup>6-9)</sup>, 고련환에 관한 연구는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 고련환(*Goryeon-hwan*, GRH)의 항산화 효능 및 염증 억제 기전에 관련하는 인자들의 유전자 및 단백질 발현량을 통해 그 기전을 규명하고자 생쥐 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포로 *in vitro* 연구를 시행하였고, GRH의 항산화 및 염증 반응 개선 효능 및 그 작용 기전을 탐구하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 시 료

본 연구에 사용된 고련환(*Goryeon-hwan*, GRH)<sup>5)</sup>의 구성 약제는 한약재 유통업체인 (주)옵니허브에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였으며, 처방의 구성은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of GRH

Herbal medicine name	Scientific name	Origin	Weight (g)
川楝子	<i>Melia azedarach</i> Linné	China	10
茴香	<i>Foeniculum vulgare</i> Miller	India	10
當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Korea	10
Total amount			30

## 2) 시약

본 연구에는 gallic acid, quercetin, sodium carbonate, aluminium nitrate nonahydrate, potassium acetate solution, 1,1 - diphenyl -2-picryl-hydrazyl(DPPH), 2,2'-azinobis -3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), penicillin-streptomycin, trypan blue, lipopolysaccharides, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA), protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail, EZ-cytox, folin-ciocalteu's phenol reagent, ethanol, methanol, Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), nitric Oxide plus detection kit, total RNA extraction kit, acrylamide-Bis Solution 30%, 1.5M Tris-HCl(pH 8.8), 0.5M Tris-HCl(pH 6.8), protein ladder, 10X Tris-Glycine-SDS buffer, 10X transfer Buffer, 10X Tris-Buffered Saline(TBS) with Tween 20, cyclescript RT premix (dT20), prostaglandin E2(PEG2) Parameter Assay Kit, mouse Interleukin(IL)-1 beta & mouse IL-6 ELISA kit, mouse tumor necrosis factor(TNF)-alpha ELISA kit, Bicinchoninic acid(BCA) protein assay Kit, RIPA lysis and extraction buffer, 10% ammonium persulfate 등을 사용하

였다.

## 3) 기기

본 연구에는 extraction mantle, rotary vacuum evaporator, freeze dryer, carbon dioxide(CO<sub>2</sub>) incubator, autoclave, vortex mixer, centrifuge, ice-maker, plate shaker, micro plate reader, flow cytometry system, nanodrop, polymerase chain reaction(PCR) cyclers, real-time PCR cyclers, chemidoc 등의 장비를 사용하였다.

## 2. 방법

## 1) 실험군 및 대조군

GRH군은 100, 200, 400 ng/mL의 lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증반응을 유도하고 고령환을 각각 100, 200, 400 ug/mL 농도로 처리한 실험군이며, 대조군으로 사용된 Control군은 LPS를 처리하지 않은 실험군, LPS군은 200 ng/mL의 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 실험군이다. 모든 실험은 3회 반복하여 결과를 도출하였다.

## 2) 시료 추출

1ℓ의 증류수에 2첩 분량의 GRH(60 g)을 넣어 100℃에서 3시간 동안 추출하였으며, 추출된 GRH은 여과지를 사용하여 여과하였다. 여과된 GRH 추출물은 rotary vacuum evaporator를 통해 감압농축하고 freeze dryer를 통해 동결건조하였다. 동결건조 완료 후, 9.31 g(수득률 : 15.52%)의 분말을 얻어 -20℃에 보관하였으며, 실험 당일 소분 및 증류수에 용해하여 사용하였다.

## 3) 항산화 효능 평가

## (1) 총 polyphenol 함량 측정

GRH를 1 mg/ml 농도로 준비하였으며, 시료 1 ml에 50% Folin-Ciocalteu's

phenol reagent 0.5 ml를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시킨 용액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1 ml와 7.5 ml 증류수를 차례로 가하여 30분간 일정한 곳에 둔 후, 14,000 g에서 10분간 원심분리하여 발생한 상등액을 가지고 760 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량을 측정하기 위해서는 gallic acid를 표준물질로 이용한 검량선을 이용하였다.

#### (2) 총 flavonoid 함량 측정

GRH를 1 mg/ml 농도로 준비하였으며, 시료 0.1 ml와 80% 에탄올 0.9 ml를 혼합한 용액 0.5 ml에 1 M potassium acetate 0.1 ml, 10% aluminium nitrate와 에탄올 4.3 ml를 더하여 40분 동안 실온에 놓아둔 후 415 nm 파장에서 흡광도 측정을 시행하였으며, quercetin을 이용한 표준곡선을 이용하여 함량을 구하였다.

#### (3) DPPH radical 소거능 측정

최종적인 GRH의 농도가 1, 10, 100, 1000 µg/ml가 되도록 희석시키고, 각 시료 100 µl와 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에는 시료 대신 증류수를 투여했으며, DPPH 용액의 대조군으로는 에탄올을 사용해 보정값을 얻었다.

#### (4) ABTS radical 소거능 측정

최종적인 GRH의 농도가 1, 10, 100, 1000 µg/ml가 되도록 희석시키고, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS와 산화제 역할을 하는 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 어두운 장소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS<sup>+</sup>)을 형성시켰다. 이후 732 nm에서 흡광도 값이 1.5 이하

가 되도록 해당 용액을 희석하고, 희석된 ABTS<sup>+</sup> 용액 150 µl에 시료를 5 µl씩 가하고, 10분간 실온에서 반응시킨 후, 732 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 세포 배양

한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 생쥐 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포를 구입하여 사용하였으며, DMEM 배지에 10%의 FBS를 추가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 세포를 배양하였다. 세포의 계대 배양은 2-3일 주기로 진행하였다.

#### 5) 세포 생존율 측정

RAW264.7 세포를 48 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 하루 동안 배양하고 GRH을 100, 200, 400, 600 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 하루 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후에는 배양액 100 µl당 10 µl의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 30분 동안 세포배양기에서 반응시켰다. 이후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 LPS군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

#### 6) Reactive oxygen species(ROS) 생성량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 하루 동안 배양하고 GRH을 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하고 200 ng/ml의 LPS를 추가하여 다시 하루 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후에 원심분리하여 얻은 세포는 저온의 PBS로 세척한 후, 10 uM의 DCF-DA를 이용하여 15분 동안 세포배양기에서 반응시키고 남아있는 DCF-DA를 제거하기 위해 다시 저온의 PBS로 세척하였다. 이후 ROS 생성량 분석을 위해 flow

cytometry system을 사용하였다.

#### 7) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포는 48 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 하루 동안 배양하고 GRH를 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 200  $\text{ng/ml}$ 의 LPS를 추가하여 하루 동안 다시 배양하였다. 배양이 모두 종료된 후 N1 buffer 100  $\mu\text{l}$ 를 추가하여 10분간 상온에서 반응시켰고, 반응 후 N2 buffer 100  $\mu\text{l}$ 를 추가하여 다시 10분간 상온에서 반응시켰다. 반응 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 8) Cytokine 생성량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 하루 동안 배양하고 GRH를 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 200  $\text{ng/ml}$ 의 LPS를 추가하여 하루 동안 다시 배양하였다. 배양이 모두 종료되었을 때, 96 well plate에 분리한 세포 배양액 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 plate에 있던 시약은 제거하고 washing buffer로 4회 세척하였다. 이후 detection antibody를 100  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 상온에서 2시간 반응시켰으며, 또다시 plate에 streptavidin-HRP를 100  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 TMB or pink-ONE solution 100  $\mu\text{l}$ 씩을 각 well에 투여한 후 15분간 반응시키고, 100  $\mu\text{l}$ 의 stop solution

을 추가 투여하여 micro reader를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이는 standard curve를 기준으로 한 절대값으로 나타냈다.

#### 9) 유전자 발현량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주해 하루 동안 배양한 후, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 GRH를 처리하고, 200  $\text{ng/ml}$ 의 LPS를 추가하여 24시간 동안 재배양하였다. 배양이 모두 종료된 후, total RNA prep kit를 사용하여 원심분리하여 얻은 세포에서 RNA를 추출하였으며, 이렇게 추출한 RNA는 reverse transcription premix와 혼합 후 PCR cycler를 사용하여  $45^\circ\text{C}$ 에서 60분간,  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이후 real-time PCR을 진행하여 합성된 cDNA로부터 특정 유전자를 증폭시켜 확인하고자 하였는데, 특정 유전자와 cDNA에 맞는 primer, SYBR green premix를 혼합해 2분 동안  $95^\circ\text{C}$ 에서 반응시킨 후,  $95^\circ\text{C}$ 에서 5초,  $62.5^\circ\text{C}$ 에서 30초씩 번갈아 반응시키는 행위를 40회 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 LPS군의 유전자 발현량을 기준으로 상대적으로 정량하였으며, 이에 사용된 primer들의 정보는 Table 2와 같다.

Table 2. Real-Time PCR Primer Sequences

Gene name	Size (bp)	F/R*	Sequences
iNOS <sup>†</sup>	127	F	GCTCCAGCATGTACCCTCAG
		R	AAGGCATCCTCCTGCCCACT
COX-2 <sup>‡</sup>	128	F	CCGTGGGGAATGTATGAGCA
		R	GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
IL <sup>§</sup> -1 $\beta$	135	F	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
		R	ATGTGCTGCTGCGAGATTTG
IL-6	141	F	CCCAATTTCCAATGCTCTCC
		R	CGCACTAGGTTTGCCGAGTA
TNF- $\alpha$ <sup>  </sup>	129	F	GATCGGTCCCCAAAGGGATG
		R	TTTGCTACGACGTGGGCTAC
Keap1 <sup>¶</sup>	134	F	CAACTTCGCTGAGCAGATTGGC
		R	TGATGAGGGTCACCAGTTGGCA
Nrf2 <sup>**</sup>	112	F	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG
		R	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
HO-1 <sup>+++</sup>	84	F	TCCTGGCTCAGCCTCAAATG
		R	CACGCATGGCTCAAAAACCA
NQO1 <sup>**</sup>	123	F	CCCTGCAGTGGTTTGGAGTC
		R	CTGCCTTCTTACTCCGGAAGG
$\beta$ -actin	102	F	CACTGTCGAGTCGCGTCC
		R	CGCAGCGATATCGTCATCCA

\* F : forward, R : reverse, <sup>†</sup> iNOS : Inducible nitric oxide synthase, <sup>‡</sup> COX-2 : Cyclooxygenase-2, <sup>§</sup> IL : Interleukin, <sup>||</sup> TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha, <sup>¶</sup> Keap1 : Kelch like ECH-associated protein 1, <sup>\*\*</sup> Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, <sup>+++</sup> HO-1 : Hemeoxygenase-1, <sup>\*\*</sup> NQO1 : NADPH quinone oxidoreductase 1

10) 단백질 발현량 측정

RAW264.7 세포를 6 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 하루 동안 배양하여 100, 200, 400  $\mu$ g/ml 농도의 GRH을 처리한 후, 200 ng/ml의 LPS를 추가하여 하루 동안 재배양하였다. 배양이 모두 종료된 후, protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III가 포함된 RIPA buffer를 사용하여 원심분리하여 얻은 세포에서 단백질을 추출하였다. BCA protein assay kit를 이용해 추출한 단백질을 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 통한 SDS-PAGE를 시행하여 크기별로 분리

했으며, PVDF membrane으로 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 PVDF membrane은 3% BSA에 담가 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후, TBS-T buffer를 이용하여 세척하였다. 이후 primary antibody를 넣어 16시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응시키고 다시 3회 세척하고 secondary antibody를 넣어 1시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 또다시 세척하여 ECL solution을 통해 단백질을 발색시켰다. 이후 단백질 발현량 분석에는 chemidoc fusion FX를 사용하였다.

단백질 인산화의 경우 해당 인자의 활성화 상태인 인산화 형태(phospho form)와 모든 형태(total form)를 비교한 것으로, 실험 방법은 단백질 발현량 측정과 동일하다.

### 3. 통계처리

연구 결과 측정된 수치는 SPSS Statistics Version 21.0(IBM, U.S.A.)을 이용하여 mean±standard error of mean으로 나타냈다. 통계적 비교에 있어 두 그룹 사이의 비교는 independent sample t-test를 사용하였고, 여러 그룹 사이의 비교는 analysis of variance(ANOVA)를 사용하였다. 유의성을 확인하기 위해서는 Tukey's HSD test를 이용해 유의수준을 0.05로 설정하여 검정을 시행하였으며,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$ 의 3가지 유의수준으로 나누어 표기하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 항산화 효능

Galic acid를 표준물질로 하여 GRH에 존재하는 총 polyphenol 함량을 측정된 결과,  $31.21 \pm 0.53$  mg GAE(Galic acid equivalent)/g의 값을 나타냈으며, Quercetin을 표준물질로 하여 GRH에 존재하는 총 flavonoid 함량을 측정된 결과,  $11.18 \pm 0.54$  mg QE(quercetin equivalent)/g의 값을 나타냈다. DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, GRH에 대한 농도 의존적인 소거능 증가가 나타났다(Fig. 1, 2).

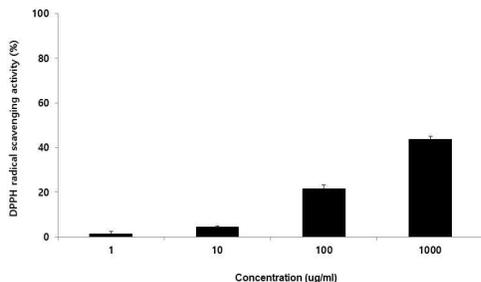


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of GRH.

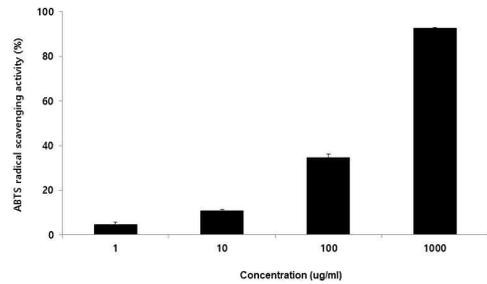


Fig. 2. ABTS radical scavenging activity of GRH.

### 2. 세포 생존율

GRH은 600 µg/ml 이상의 농도에서 Control군에 비해 세포생존율이 10%이상 감소하며 독성이 나타나 이후 실험에서는 400 µg/ml 농도까지 진행하였다(Table 3).

Table 3. Cell Viability of GRH in RAW264.7 Cells

Concentration (µg/ml)	Cell viability (% of Control)
Control	100.00±0.29
100	100.82±1.65
200	100.41±1.52
400	99.38±3.48
600	88.92±3.07

### 3. 항염증 효능

#### 1) ROS 생성량

ROS 생성량을 측정된 결과, GRH는 100 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ ;  $p < 0.001$ , \* ;  $p < 0.05$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ )(Fig. 3).

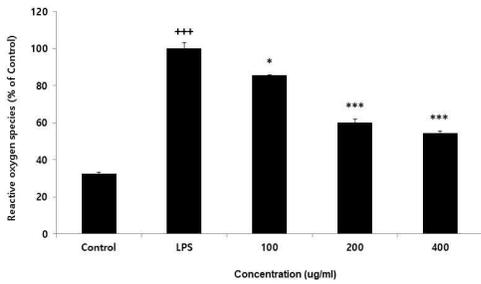


Fig. 3. Effect of GRH on reactive oxygen species level in RAW264.7 cells.

2) Nitric oxide 생성량

NO 생성량을 측정한 결과, GRH는 100 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ ; p < 0.001, \*\* ; p < 0.01, \*\*\* ; p < 0.001)(Fig. 4).

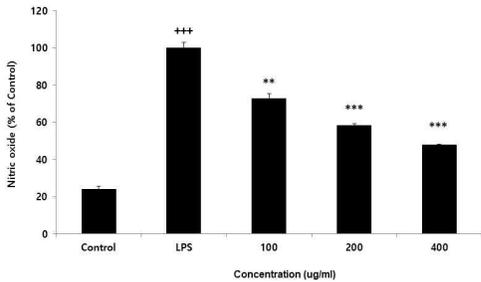


Fig. 4. Effect of GRH on nitric oxide level in RAW264.7 cells.

3) Cytokine 생성량

(1) PGE2

PGE2 생성량을 측정한 결과, GRH는 100 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ ; p < 0.001, \*\* ; p < 0.01, \*\*\* ; p < 0.001)(Fig. 5).

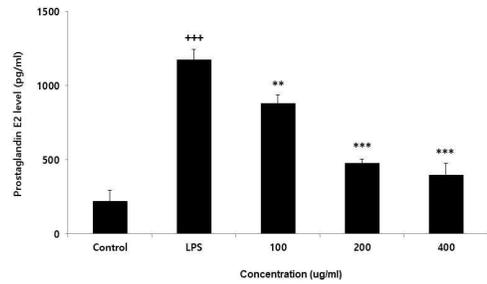


Fig. 5. Effect of GRH on prostaglandin E2 level in RAW264.7 cells.

(2) IL-1β

IL-1β 생성량을 측정한 결과, GRH는 200 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ ; p < 0.001, \* ; p < 0.05, \*\* ; p < 0.01)(Fig. 6).

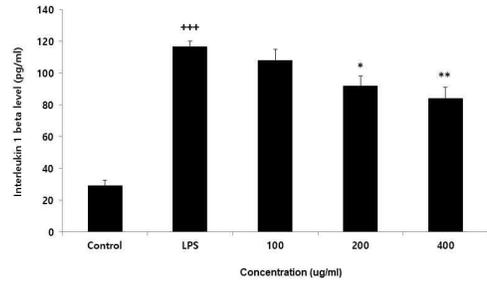


Fig. 6. Effect of GRH on interleukin 1 beta level in RAW264.7 cells.

(3) IL-6

IL-6 생성량을 측정한 결과, GRH는 200 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ ; p < 0.001, \* ; p < 0.05, \*\* ; p < 0.01)(Fig. 7).

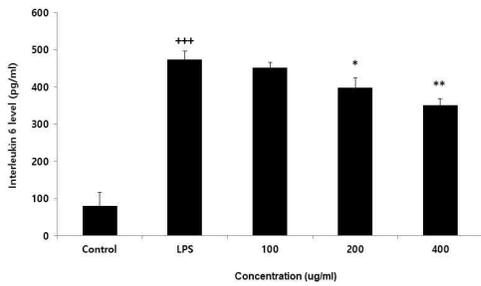


Fig. 7. Effect of GRH on interleukin 6 level in RAW264.7 cells.

(4) TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  생성량을 측정한 결과, GRH는 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(+++ :  $p < 0.001$ , \* :  $p < 0.05$ )(Fig. 8).

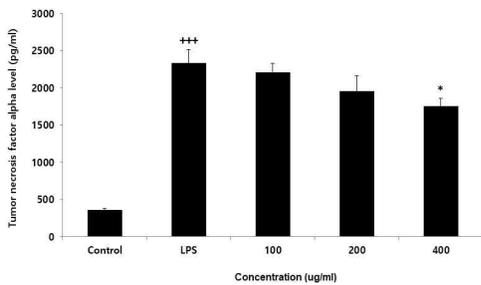


Fig. 8. Effect of GRH on tumor necrosis factor alpha level in RAW264.7 cells.

4. 유전자 발현량

Inducible nitric oxide synthase(iNOS), TNF- $\alpha$  유전자 발현량을 측정한 결과, GRH는 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. Cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-1 $\beta$ , IL-6, Hemeoxygenase-1 (HO-1), NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 유전자 발현량을 측정한 결과, GRH는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. Kelch like ECH-associated

protein 1(Keap1), Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2) 유전자 발현량을 측정한 결과, GRH는 Control군에 비해 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

5. 단백질 발현량

단백질 발현량은 유전자 발현량과 유사한 결과를 보였다. TNF- $\alpha$  단백질 발현량을 측정한 결과, GRH는 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, HO-1, NQO1 단백질 발현량을 측정한 결과, GRH는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다. Keap1, Nrf2 단백질 발현량을 측정한 결과, GRH는 Control군에 비해 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

6. 단백질 인산화

단백질 인산화 측정은 단백질 발현량 측정과 동일하나, 활성화 상태를 비교한다는 차이가 있다.

1) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 단백질의 인산화를 측정한 결과, GRH는 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Significance of results, +++ :  $p < 0.001$  compared to control, \* :  $p < 0.05$  compared to LPS)(Fig. 9).

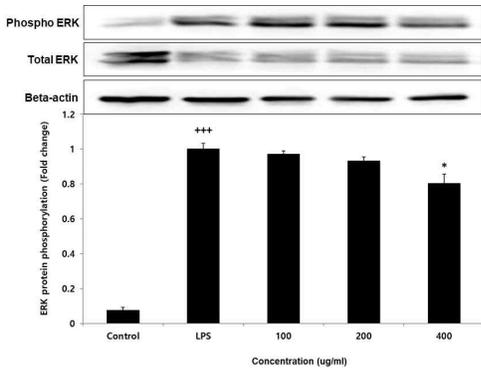


Fig. 9. Effect of GRH on ERK protein phosphorylation level in RAW264.7 cells.

2) C-Jun NH2-terminal kinase(JNK) 단백질의 인산화를 측정 한 결과, GRH는 LPS군에 비해 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Significance of results, +++ ;  $p < 0.001$  compared to control)(Fig. 10).

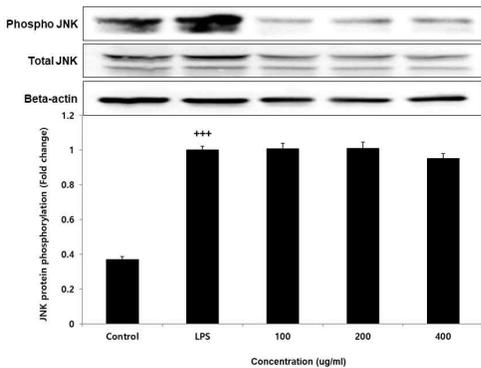


Fig. 10. Effect of GRH on JNK protein phosphorylation level in RAW264.7 cells.

3) p38 단백질의 인산화를 측정 한 결과, GRH는 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 농도 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다(Significance of results, +++ ;  $p < 0.001$  compared to control, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  compared to LPS)(Fig. 11).

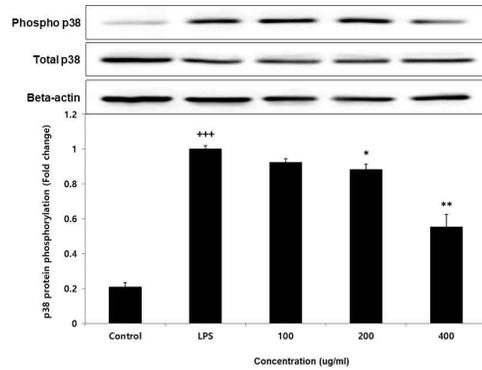


Fig. 11. Effect of GRH on p38 protein phosphorylation level in RAW264.7 cells.

#### IV. 고 찰

정상적인 질 분비물은 습 모양의 흰색으로 후방질정에 고이는 경우가 일반적이며, 감염 시 질 분비물의 증가나 화농성 질 분비물의 발생 등 질 분비물의 변화가 나타난다<sup>1)</sup>. 여성 생식기 감염 중 외래에서 가장 흔한 질환인 질염의 경우, 세균성 질염이 40~50% 정도로 가장 많고, 질 칸디다증이 20~25%, 트리코모나스 질염이 15~20%를 차지하며, 그 외 비감염성 질염 등이 있다. 회색의 생선 냄새가 나는 분비물이 특징인 세균성 질증은 정상 세균총이 변형되어 유산균은 감소하고 비호기성 균이 과증식된 상태로, 비호기성 균을 억제하기 위하여 Metronidazole, Clindamycin 등의 항생제로 국소적 질내 치료를 시행한다<sup>1)</sup>. 치즈 형태의 분비물이 특징인 질 칸디다증은 항생제 장기 사용 등에 의해 유산균과 정상 질 세균의 농도가 낮아지며 진균의 과성장이 발생하므로, 항진균제로 다용하는 Azole, Fluconazole을 사용하여 국소 치료나 경구 투여 치료를 시행한다. 다량의 화농성, 냄새나는 분비물이 특징인 트리코모나스

질염은 기생충인 *Trichomonas vaginalis*에 의한 성병으로, 항원충제인 Metronidazole, tinidazole을 사용하여 치료한다<sup>1)</sup>. 그러나 Metronidazole과 같이 광범위하게 사용되는 항생제의 경우 유익한 유산균을 포함한 정상 세균총의 사멸과 항생제 내성 등의 부작용을 발생시킬 수 있으며, 이는 만성적이고 반복적인 질염으로 이어질 수 있다<sup>2)</sup>. 이와 달리 천연물의 항균 작용은 체내 면역기능을 증가시키며 질환의 치료와 예방에 긍정적인 효과를 나타내 한약재 추출물에 대한 관심도 증가하고 있다<sup>3)</sup>.

질염은 한의학에서 대하의 범주로 볼 수 있다<sup>4)</sup>. 대하는 여성생식기의 분비물이 증가하여 질 외부까지 유출되어 외음부 등이 감염된 상태를 표현한 것으로, 여성 생식기 병변을 확인할 수 있는 직접적 증거이자 부인과 임상 진단 상 중요한 자료가 된다. 자궁경부, 질, 난관 등 현대의 여성 생식기 계통의 감염과 연관되는 경우가 많다<sup>4)</sup>. 한의학에서는 대하를 크게脾虛型, 腎陽虛型, 腎陰虛型, 濕熱型, 濕毒型으로 변증한다.脾虛型은 양이 많고 흰색이나 연한 황색을 띠며 냄새가 없는 것이 특징이다. 腎陽虛型은 양이 많고 오래 지속되며, 묽고 냄새가 없으며 흰색이고, 腎陰虛型은 양이 많지 않고 끈적하며 냄새가 없고 담홍색이나 붉은색과 흰색이 섞여 있다. 濕熱型은 양이 많고 황색의 끈적한 포말상이거나 흰색의 두부 찌꺼기 성상을 나타내며, 간혹 냄새가 나기도 한다. 濕毒型은 양이 많고 황색이며 끈적하고 냄새가 나며, 심한 경우膿血이 보이기도 한다<sup>4)</sup>. 질염에 대한 항염 및 항산화 기전 연구로는 단일 약물에 대하여 치자, 차전자, 천궁, 포

공영, 황금과<sup>10)</sup>, 질 내 미생물에 대한 단일 약제들의 효과를 실험한 연구들<sup>11-4)</sup>이 있으며 복합 처방 연구로는 淸熱解毒化癥湯<sup>15)</sup>, 側柏樗皮丸<sup>16)</sup>, 蛇床子洗方, 淸帶湯의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 항균 실험 연구<sup>17,18)</sup>가 있다.

《東醫寶鑑·內景篇》<sup>5)</sup>에서는 대하를 습열로 인한 것이라 하며 주된 치법을燥濕으로 보고, 伏龍肝散, 苦練丸, 白芍藥散을 사용한다고 하였다. 그중에서도 고련환은 治熱入大小腸, 爲赤白帶下, 最妙<sup>5)</sup>라고 하였으며, 苦練子, 茴香(炒), 當歸를 동일한 양으로 가루 내어 술을 넣어 쏘풀로 반죽하여 오자대환을 만들어 30-50환씩 복용한다고 하였다<sup>5)</sup>. 이를 구성하는 약재 중 苦練子是 천련자라고도 하며 《本經》에 처음 언급이 되었고, 성미가 苦, 寒하고 行氣止痛, 殺蟲, 療癬하는 효능이 있어 내복 시 충적복통을 치료하고, 외용 시 頭癬을 치료한다. 茴香은 《新修本草》에 辛, 溫하고 去寒止痛, 理氣和胃하여 少腹作痛, 開胃하는 효능이 있다고 하였다. 《日華子本草》에는 茴香이 膀胱痛, 陰痛을 치료한다는 기록이 있다. 當歸는 《本經》에 甘, 辛, 溫하고 補血, 活血, 止痛, 潤腸 하는 효능이 있다고 하였다. 《本經》에는 부녀자의 漏下絶者, 모든 惡瘡瘍을 치료한다고 하였으며 《本草綱目》에서는 頭痛과 心腹諸痛, 癰疽를 치료하고 排膿止痛하며, 和血補血한다고 하였다<sup>19)</sup>. 관련 논문으로는, Mouse 대식세포에서 천련자의 항산화 및 항염증 효과를 밝힌 연구와<sup>6)</sup>, 회향추출물을 투여한 흰쥐에 급성 염증 반응을 유발시킨 후, 쥐의 혈액 및 간장에서 전염증성 cytokine 농도를 확인하여 회향이 염증 반응에 미치는 영향을 밝힌 연구가 있으

며<sup>7)</sup>, 當歸 에탄올 추출물이 RAW264.7 대식세포에서 염증 매개 물질들을 효과적으로 억제시킴을 밝힌 연구가 있다<sup>8)</sup>. 이와 같이 고령환 처방의 구성요소인 천련자, 회향, 당귀의 단일 약물 항염증 연구는 보고된 바가 있으나 고령환의 항산화 및 항염증 기전 연구는 시행되지 않아 본 연구에서는 in vitro 항산화 및 항염증 실험을 설계하여 진행하였다.

항산화 효능 평가에는 총 polyphenol 및 flavonoid 함량, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능 측정 및 RAW264.7 cell을 통한 ROS 생성량 측정이 시행되었다. 폴리페놀은 여러 화합물과 쉽게 결합하는 하이드록실기(-OH)를 다수 포함하고 있어 항산화 및 항암, 항염 효과가 뛰어나다. 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 성분으로, C6-C3-C6를 기본골격으로 하여 노란색 혹은 담황색을 띠는 페놀계 화합물을 총칭한다. 플라보노이드는 항산화능이 높아 활성산소종(ROS)을 효과적으로 제거하며, 폴리페놀과 마찬가지로 항산화, 항염증, 항바이러스 효과가 있다<sup>20)</sup>. DPPH assay는 항산화 측정에 사용되는 실험 방법이다. DPPH는 짙은 보라색의 organic nitrogen radical로, 에탄올 용액 상태에 있을 때 525 nm의 파장대에서 최대의 흡광도를 보이는데, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 안정한 화합물인 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine으로 빠르게 환원되어 비가역적으로 전환된다. 이때 짙은 보라색을 띠던 용액이 없어지는 정도를 통해 시료의 DPPH radical 소거능을 측정한다. ABTS assay는 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphate) 양이온에 대한 항산화제의 소거능을 측정하는 방법이다. ABTS는 potassium

persulfate와 반응하여 녹색의 ABTS radical을 형성하는데, 항산화력을 가진 물질로부터 전자를 받으면 무색의 물질로 환원된다. 이때 일정한 시간 동안 ABTS radical과 시료의 반응에서 녹색이 없어지는 정도를 측정함으로써 시료의 항산화능을 측정할 수 있다<sup>21)</sup>. GRH에서 polyphenol 및 flavonoid가 검출되었으며, DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능의 값에서 또한 GRH 농도 의존적인 증가가 나타났다. RAW264.7 세포의 ROS 생성량 또한 GRH 농도 의존적으로 감소했고, LPS군에 비해서도 유의한 감소를 나타내 GRH의 항산화 효능을 확인할 수 있었다.

세포 독성 발생 농도의 경우, 시료를 처리하지 않은 실험군(Control군)에 비해 세포생존율이 10% 이상 감소하게 되면 이후 실험결과에 대해 영향을 미칠 수 있기 때문에 독성이 나타난다고 표기한다. GRH의 세포 독성 발생 농도를 알아보기 위하여 RAW264.7 세포의 생존율을 알아본 결과, GRH는 400 µg/ml 이하의 농도에서 99% 이상의 세포 생존율을 보였으며 정상 세포에 대한 독성은 나타나지 않았다.

대식세포(macrophage)는 혈액 단핵세포로부터 분화된 조직세포로, 체내 염증반응에 관여하는 중요한 세포 중 하나이다. 대식세포가 내독소로 알려진 LPS의 자극을 받아 염증반응이 일어나면 interferon-γ (IFN-γ), IL-1β, IL-6 등과 같은 염증성 cytokine을 방출하게 되고, iNOS와 COX-2의 발현을 유도하여 NO 및 PGE2와 같은 다양한 염증매개 분자들이 생성되어 염증반응이 개시된다<sup>22)</sup>. 이에 따라 본 연구에서는 GRH의 항염증 효능을 평가하기

위해 NO와 Cytokine의 생성량과 Real-time PCR을 통한 유전자 발현량을 측정하고, 단백질 인산화와 단백질 발현량을 측정하였다. NO는 산화질소로, 내피세포에서 분비되어 혈관 이완 반응을 유발하며 염증 세포 인자를 억제한다. 또한 혈소판의 응집과 부착을 감소시키고, 비만세포 유도로 발생하는 염증의 일부 및 백혈구가 모이는 것을 억제한다. NO와 그 유도물질은 살균작용이 있어 감염 시 숙주의 방어기전의 핵심이 된다<sup>23)</sup>. GRH 투여군의 NO 생성량을 측정한 결과, 농도의 의존적이고 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타나 GRH의 항염증 효능을 확인할 수 있었다. Cytokine은 염증을 매개하는 중요한 인자로, 주로 활성화된 대식세포에서 생성되어 감염이나 손상 시 전신적인 급성기 반응을 유발한다<sup>23)</sup>. IL-1은 TNF와 유사한 작용을 하는 급성단계 염증반응의 또 다른 매개자로, IL-1  $\beta$ 은 IL-1 중 주요한 생물학적 활성을 가진 분비형을 뜻한다. IL-6 또한 급성 염증 반응에서 중요한 사이토카인 중 하나로, 국소적 작용과 함께 전신적 작용을 수행하며, 간에서 다른 염증매개자의 합성 유도 및 골수의 호중구 생성 자극, IL-17을 생산하는 T 도움세포를 분화시킨다. TNF- $\alpha$ 는 세균이나 다른 병원성 미생물에 대한 급성염증반응의 매개자로, 유사한 물질이자 림포톡신이라고 불리는 TNF- $\beta$ 와 구별하기 위해 TNF- $\alpha$ 라고도 불려진다. PGE2는 염증과 관련된 주된 prostanoids로, 염증부위 혈류를 증가시켜 부종 발생과 백혈구 침윤을 촉진시킨다<sup>24)</sup>. 본 연구에서 cytokine에 속하는 PEG2, IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정했을 때, GRH 투여군에서

LPS군에 비해 유의성 있는, GRH에 농도 의존적인 감소가 나타나 GRH의 항염증 효능을 확인할 수 있었다.

유전자 발현량 측정에 사용된 primer 들을 살펴보면, iNOS는 사이토카인이나 미생물 생성물질에 의해 대식세포가 활성화되어 유도되는 유도성 산화질소 합성효소로, 중성구, 대식세포 등에서 고농도의 iNOS가 NO를 생성한다<sup>23)</sup>. COX-2는 성장인자, 종양촉진자, 사이토카인에 의해 발현이 증가되는 조기발현 유전자 산물로, 염증과 암에서 prostanoid의 주 공급원이 된다<sup>24)</sup>. Keap1과 Nrf2는 산화적 스트레스나 발암 과정에서 세포를 보호하는 중요한 전사인자로, ARE(antioxidant response element)와 결합하여 주요 항산화효소와 phase II detoxifying 효소들의 전사를 활성화시킨다. Nrf2는 정상 시 음성 조절인자인 Keap1에 의해 세포질에 격리되어 있다가 산화적 스트레스 등에 노출될 경우 Keap1과 분리되어 핵 내로 이동해 ARE 의존성 유전자 발현을 활성화시킴으로써 세포 내 산화환원 반응의 항상성을 유지시키고, T-cell과 B-cell의 활성화에 관여하여 항염증효과를 매개한다. HO-1와 NQO1은 Nrf2가 만들어내는 항산화 효소이다<sup>25)</sup>. 본 연구에서 유전자 발현량을 측정한 결과, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 에서 대조군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 감소가 나타났고, HO-1과 NQO1의 유전자 발현량이 대조군에 비해 유의성 있게, GRH 농도 의존적으로 증가하였다. 이를 토대로 유전자뿐만 아니라 단백질 발현량 또한 확인하고자 하였고, 동일한 인자들의 단백질 발현량을 측정한 결과, iNOS, COX-2, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 에서

대조군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 감소가 나타났고, HO-1과 NQO1에서 대조군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 증가가 나타나 GRH의 항염증 효능을 확인할 수 있었다. 세포의 성장, 분화, 증식, 사멸 및 스트레스 반응 등을 조절하는 것으로 알려져 있는 MAPKs(mitogen-activating protein kinases)는 특히 apoptosis 유발에 관여하는 신호 전달계로서 중요한 역할을 담당하는데, ERK, JNK 및 p38-MAPK로 구성되어 있다<sup>26)</sup>. 이들의 인산화를 측정된 결과 ERK와 p38에서 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타나 GRH의 항염증 효능에 MAPKs 활성의 차단이 관여하고 있음을 알 수 있다.

이상의 결과를 통해 고령환의 항산화 및 염증 반응 개선 효과를 실험적으로 확인할 수 있었고, 이를 바탕으로 향후 추가적인 세포 실험과 충분한 임상 적용 연구를 통해 고령환을 외음부 및 질 감염, 자궁목점막염, 골반 염증성 질환 등 여성 생식기 제반 염증에 다양하게 활용 가능할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

고령환의 항산화 및 염증 반응 개선 효과를 알아보기 위한 실험 결과는 다음과 같다.

1. GRH은 항산화 효과를 가진 폴리페놀과 플라보노이드를 함유하고 있고, 항산화 측정에 사용되는 DPPH 소거능과 ABTS 소거능에서 농도 의존적인 증가가 나타났다. 생쥐 유래 대식세포

인 RAW 264.7 cell의 ROS 생성량 또한 GRH에 대하여 농도 의존적으로 감소했다.

2. GRH의 세포 독성 발생 농도 측정을 위하여 RAW 264.7 세포에 GRH을 처리한 결과 400 µg/ml 이하의 농도에서 99% 이상의 세포 생존율을 보였다.
3. GRH의 항염증 효능을 평가한 결과, GRH 투여군의 NO, Cytokine(PEG2, IL-1 β, IL-6, TNF-α) 생성량에서 LPS군에 비해 농도 의존적이고 유의성 있는 감소가 나타났다.
4. 유전자 발현량을 측정된 결과 iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, TNF-α에서 대조군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 감소가 나타났고, HO-1과 NQO1의 유전자 발현량이 대조군에 비해 유의성 있게, GRH 농도 의존적으로 증가하였다.
5. 단백질 발현량을 측정된 결과, iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6, TNF-α에서 LPS군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 감소가 나타났고, HO-1과 NQO1에서 LPS군에 비해 유의성 있는, GRH 농도 의존적인 증가가 나타났다.
6. 단백질 인산화를 측정된 결과 ERK와 p38에서 LPS군에 비해 유의성 있는 감소가 나타났다.

Received : Mar 05, 2024

Revised : Apr 22, 2024

Accepted : May 31, 2024

## References

1. Korean Society of Obstetrics and Gynecology Textbook Compilation Committee. Gynecology. Vol. 1. 6th Edition. Seoul: Korea medicine Publish. 2021:143-56.
2. Kim HK, et al. Effect Active Ingredients of Natural Extracts and Dyeing Effect on Cotton Fabric. The Journal of the Convergence on Culture Technology (JCCT). 2023;9(1):725-33.
3. Jang JE. Separation and purification of antimicrobial substances from natural materials for treatment of microbial vaginosis. Department of Biology, Graduate school, Keimyung University. 2019.
4. Kim DI, et al. Korean medicine obstetrics and gynecology. Vol 1. 3rd rev. ed. Seoul: Euseongdang. 2016:277-90.
5. Heo J. Donguibogam. Seoul:Daesung Cultural publishing house. 1992:178-9.
6. Yi HS, et al. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Melia Toosendan in Mouse Macrophage Cells. The Korea journal of herbology. 2008;23(4):121-34.
7. Heo SK, et al. Effect of Foeniculum Vulgare extract on inflammatory response in lipopolysaccharide exposed rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2013;23(2):73-83.
8. Jang SI, et al. Anti-Inflammatory Effect of Ethanol Extract of Angelica uchiyamana in Activated Murine RAW 264.7 macrophages. Herbal formula science. 2002;10(2):189-97.
9. Choi SW, et al. Anti-Inflammatory Effects of Volatile Flavor Extracts from Cnidium officinale and Angelica gigas. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2012; 41(8):1057-65.
10. Lim SM, et al. In vitro activities of Terminaliae Fructus, Plantaginis Semen, Cnidii Rhizoma, Taraxaci Herba, Scutellariae Radix extracts against vaginosis-associated Candida albicans, Candida tropicalis and Gardnerella vaginalis. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2004;17(4): 34-45.
11. Park JH, et al. Antimicrobial effects of the interior warming herbs on vaginal microbe. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2007;20(2):124-38.
12. Kim ES, et al. Antimicrobial effects of herbs for removing dampness and promoting urination against vaginal microbe. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2007;20(1):1-15.
13. Kim KS, et al. Antibiotic effects of medicinals resolving dampness with aroma on vaginal microorganisms. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2006;19(4):33-46.
14. Kim KJ, et al. Antibiotic effect of heat-clearing medicinals on vaginal microorganisms. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2006;19(3):175-90.
15. Kim SR, Ahn SW, Yoo DY. The Experimental Study on Anti-thrombotic

- and Anti-inflammatory Effect of Chungyeol-Haedog HwaeoTang(CHHT). Korea Journal of Oriental Medicine. 2005;11(2):97-111.
16. Jo OH, Choi CM. Anti-inflammatory Effect of Cheukbaekjurpi hwan(CBJPH). The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2008;21(2):152-65.
  17. Sung HA, et al. Antibacterial Effects of Sasangjasaebang Aqueous Extracts Against Gardnerella Vaginalis ATCC 14018, and Combination Effects with Metronidazole. The journal of oriental obstetrics & gynecology. 2010;23(2):20-37.
  18. Kwon JM, et al. Antibacterial effects of Chungdae-tang Aqueous extracts, and their combination effects with clindamycin against Gardnerella vaginalis in vitro. 2011;24(2):1-12.
  19. Neung IG. Junhyak Bonchohak. Seoul: Bogeonsinmunsa. 1998:391-684.
  20. Kim EJ, et al. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. Korean Journal of Food Science and Technology. 2012;44(3):337-42.
  21. Kim MJ, Park EJ. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011; 40(7):1053-62.
  22. Kang HJ, et al. Inhibition of NO Production by Ethanol Extract of Prunus mume Fruits in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages through Regulation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. Herbal formula science. 2017;25(1):1-10.
  23. Journal of Pathology and Translational Medicine. Pathology. 7th Edition. Seoul:Koomonsa. 2013:78-84.
  24. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology 7th. Seoul:Panmuneducation. 2013;7(1):84-90.
  25. Choi JY, et al. Identification of the Plant Part of Gleditsia sinensis that Activates Nrf2, an Anti-oxidative Transcription Factor. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2014;28(3):303-9.
  26. Park C, Choi YH. Induction of Apoptosis by J-7, a Methyl Jasmonate Derivative, in Human Hepatocarcinoma Hep3B Cells through Activation of the ERK and JNK. Journal of Cancer Prevention. 2011;16(2):126-33.