

清燥救肺湯의 Nrf2 매개 항산화 효능

이광규[#] · 이학인^{1#} · 정한솔^{2*}

우석대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 약학대학 한약학과, 2: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부

Cheogigopye-Tang has Anti-oxidant Potential through the Activation of Nrf2

Kwang Gyu Lee[#], Hak In Lee^{1#}, Han-Sol Jeong^{2*}

Department of Pathology, College of Korean Medicine, 1: Oriental Pharmacy Woosuk University,
2: Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

Transcription factor, Nrf2 was well known to protect cell from oxidative stress by up-regulating its dependent anti-oxidative genes such as HO-1 and NQO1. Cheogigopye-tang (CJGPT), a traditional herbal formula was originally recorded in 『EuiMunBeopRyul』, still having been used to treat pulmonary disease such as asthma and pulmonary inflammation, in Eastern Asian countries. However, the underlying therapeutic mechanisms remain elusive. The purpose of this study is to investigate the anti-inflammatory or anti-oxidative effects of CJGPT on the RAW 264.7 cells. To examine the anti-inflammatory or anti-oxidative effects of CJGPT, MTT assay, immunoblotting, RT-PCR and reporter gene assays were performed. Although CJGPT slightly suppressed the nuclear NF-κB expression, it did not decreased the expression of pro-inflammatory genes in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, it did not increased the transcriptional activity of NF-κB in reporter gene assay. However, CJGPT upregulated the nuclear expression of Nrf2, as well as increased the expression of Nrf2-dependent genes such as HO-1 and NQO1. In addition, CJGPT increased the transcriptional activity of Nrf2. Taken together, our results showed that CJGPT exerts functions as an anti-oxidant mainly by activating Nrf2.

keywords : Nrf2, Anti-oxidant response element, Cheogigopye-tang

서 론

세포를 손상시키는 인자 중 하나가 활성산소(Reactive Oxygen Species; ROS)이다. 슈퍼옥사이드 라디칼(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 수산화(OH^*)는 산소의 불완전한 환원으로 인하여 발생한다. 세포내 ROS는 정상적인 호흡과정 중 미토콘드리아의 산화적 인산화 과정에서 발생하거나 외부의 이물질에 섭취하여 이에 반응하는 과정에서 생겨난다¹⁾. 체내에는 이러한 ROS부터 세포를 보호하기 위한 다양한 방어시스템을 갖추고 있다. 슈퍼옥사이드 라디칼은 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase; SOD)에 의하여 과산화수소(H_2O_2)로 불활성화되며, 이들 과산화수소는 글루타치온 과산화효소(Glutathione peroxidase; GPX)나, 세포질에 존재하는 과산화소체(peroxisome)에서 카탈라아제(catalase)에 의하여 물로 환원된다^{2,3)}.

그러나 병리적인 상황에서는 ROS의 생성이 과도하게 되며, 방어역량을 넘어서는 ROS의 생성은 세포를 산화적 스트레스 상황으

로 인도한다. 이러한 산화적 스트레스는 발암과정, 신경퇴행성질환, 동맥경화, 당뇨, 노화, 만성폐질환과 같은 다양한 범주의 질병의 발병과정에 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다⁴⁻⁸⁾.

清燥救肺湯(CJGPT)은 淸나라 喻昌의 著書인 『醫門法律』⁹⁾에 최초로 수록되어 있다. 卷四 傷燥門에서 喻昌은 “古今의 처방 가운데 肺의 燥證을 치료하는 처방이 없어 본 방을 창방하였다”고 기록하고 있다. 본 처방은 外感燥火傷肺하여 身發寒熱, 喘促氣逆, 咳嗽不止, 咳痰帶血, 甚則引動胃氣, 嘔吐痰涎, 脈躁疾한 증상을 치료한다. 현재는 천식과 해소, 폐렴을 비롯한 만성 호흡기 질환에 널리 응용되고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

清燥救肺湯(CJGPT)에 대한 연구보고를 살펴보면 A549 폐암세포주의 성장을 억제하였고, Jurkat, HL60과 같은 백혈병 세포주의 apoptosis를 촉진하였다는 보고^{13,14)}가 있었다. 비만세포의 탈과립과 접촉성 피부염과 같은 지연형과민반응에도 효과가 있었다는 보고¹⁵⁾도 있었다. 또한 호흡기 뮤신 유전자의 발현을 증가시켰고, 적출한 토끼의 기관지 평활근을 억제하였다는 실험적 연구¹⁶⁾도 있다. 이차

Both authors contributed equally to this work

* Corresponding author

Han-Sol Jeong, Division of Applied Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

E-mail : jhsol33@pusan.ac.kr Tel : +82-51-510-8461

Received : 2015/02/26 Revised : 2015/04/06 Accepted : 2015/04/16

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.04.29.2.174

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

럼 천식과 항염, 항암 등 다양한 효능이 보고되어 있으나 이들이 항염과 항산화에 조율하는 전사인자인 Nrf2의 활성화에 미치는 효능은 아직 보고된 바 없었다. 이에 저자는 RAW264.7 cell을 이용하여 淸燥救肺湯(CJGPT)의 Nrf2 매개 항산화 활성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 한약재

본 실험에 사용한 淸燥救肺湯의 처방은 『醫門法律』에 준하였으며 처방내용은 Table 1과 같다. 약재들은 음니허브(대구, 대한민국)에서 구입하였다. 처방 2첩 분량을 증류수 2 L로 가열 추출, 여과 후 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 9 g (회수율 10.2%)을 얻었다.

Table 1. Formular of Cheongjogopye-tang (CJGPT)

韓藥名	生藥名	Weight(g)
桑葉	Mori Folium	11.25
石膏	Gypsum Fibrosum	9.375
甘草	Glycyrrhizae Radix	3.75
人蔘	Ginseng Radix	2.625
胡麻仁	Sesami Semen Nigrum	3.75
眞阿膠	Asini Gelatinum	3.0
麥門冬	Liriopsis Tuber	4.5
杏仁	Armeniaca Amarum Semen	2.625
枇杷葉	Eriobotryae Folium	3.0
Total		43.875

2. 시약 및 항체

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)와 Sulforaphane은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. TLR4-specific *Escherichia coli* LPS는 Alexis Biochemical(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용한 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포배양

RAW 264.7 세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 분양을 받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) (Hyclone; Logan, UT, USA)에 10% FBS, 100 U/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C incubator에서 5% CO₂ 상태에서 배양하였다.

4. 세포생존율 측정 (MTT assay)

Mitochondrial dehydrogenase activity를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 실험에 사용한 청조구 폐탕(CJGPT)이 세포의 생존에 미치는 효과를 Mosmann¹⁷⁾이 보고한 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 well 당 1×10⁵ cells 밀도로 분주한 후 CJGPT를 처리하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세

포를 새로운 배지로 교환하여 4 시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT (2.0 mg/ml)용액 50 µl/ml를 각 well에 넣고 3 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 200 µl/well씩 넣어 MTT-formazan을 용해하여 microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다. 살아있는 세포의 백분율은 미처리 세포를 기준으로 계산하였다. 모든 실험은 3번 반복하였다.

$$\% \text{ Cell viability} = 100 \times (\text{R}_{\text{sample}} / \text{R}_{\text{ctrl}})$$

R sample: Sample을 처리한 well의 570 nm에서의 흡광도
R ctrl: Vehicle control만 처리한 well의 570 nm에서의 흡광도

5. 총 RNA의 추출과 RT-PCR

Total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen)를 이용하였으며 제조사의 방법에 준하였다. Spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도를 측정한 후 M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)에 의하여 cDNA를 합성하였고, specific primer 들을 이용한 PCR방법을 통하여 cDNA를 증폭하였다.

PCR 증폭을 하기 위하여 TaqPCRxDNA polymerase, Recombinant (Invitrogen)을 사용하였고, 반응조건은 다음과 같이 하였다: 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 30 cycle을 증폭시켰다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초 동안 denaturation, 58°C (NQO1: 55°C)에서 30 초 동안 annealing, 72°C에서 40 초 동안 extension시켰다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc (Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 internal control로 사용하여 HO-1, NQO1의 발현을 상대적으로 평가하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같다.

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR in this study

Target gene	PCR primer sequence(5' to 3')	product size	Accession number	
TNF-α	sense	CTACTCCTCAGAGCCCCAG	239bp	NM013693
	antisense	AGGCAACCTGACCACTCTCC		
IL-1β	sense	GTGTCITTTCCCGTGGACCTT	281bp	NM008361.3
	antisense	TCGTTGCTTGGTTCTCCTTG		
iNOS	sense	GGTTTGAACCTCTCAGCCACC	399bp	NM010927.3
	antisense	CCTCACATACTGTGGACGGG		
COX2	sense	CCCAGAGCTCCTTTCAACC	241bp	NM011198
	antisense	AATTGGCACATTTCTCCCC		
IL-6	sense	CTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTA	599bp	NM031168.1
	antisense	ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGT		
HO-1	sense	TGAAGGAGGCCACCAAGGAGG	373bp	NM010442
	antisense	AGAGGTCACCCAGGTAGCGGG		
NQO1	sense	ACTACGCCATGAAGGAGGCT	224bp	NM008706
	antisense	TTCAGCTTCTGTGTTCCGG		
GAPDH	sense	GGAGCCAAAAGGGTCATCAT	203bp	NM008084
	antisense	GTGATGGCATGGACTGTGGT		

6. Western Blot Analysis

5×10⁶ cell의 total extracts를 추출하였다. 핵 단백질은 NE-PER nuclear extraction kit (Thermo Scientific, IL, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였고, 단백질은 Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량하

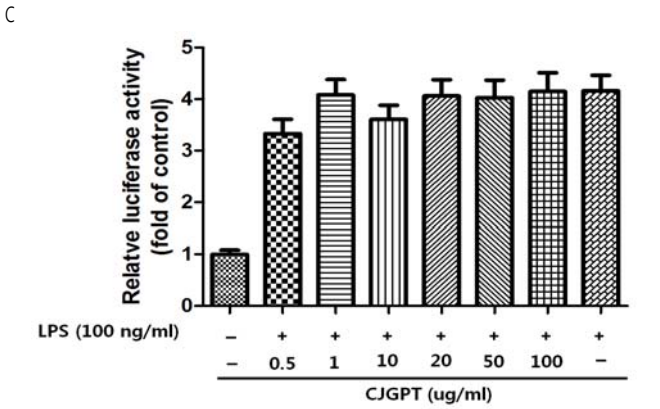


Fig. 2. Anti-inflammatory effect of CJGPT on LPS-induced RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were treated with increasing amounts of CJGPT for 16 h. Nuclear localization of NF- κ B was measured by western blot analysis. Equal loading was attested by western blotting of lamin A/C, house keeping genes in the nucleus. (B) Expressions of NF- κ B dependent pro-inflammatory genes, such as TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX2, and IL-6 were measured by semi-quantitative RT-PCR. GAPDH was used as internal control. (C) Luciferase assay was performed with total proteins prepared from NF- κ B reporter cell line, derived from RAW 264.7 cells. Cells were treated with water extracts of various amounts of CJGPT for 16 h, and subsequently stimulated with 100 ng/ml of LPS for 30 min. Luciferase activity was normalized by the amount of total proteins. Data represent the mean \pm SEM of triplicate settings, and experiment was repeated at least three times.

3. Nrf2와 Nrf2 dependent genes 발현에 미치는 효과

Nrf2는 다양한 항산화 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자로 산화적 스트레스 상황에서 세포를 보호하는 역할을 담당한다. 이에 CJGPT의 Nrf2전사인자의 핵 내 발현, Nrf2 dependent genes의 발현 및 Nrf2 전사활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 실험에서는 Nrf2 activator로 잘 알려진 sulforaphane을 positive control로 사용하였다. 여러 농도의 CJGPT를 RAW 264.7 cell에 16 시간 처리 후 핵 단백질을 추출하여 western blotting을 통하여 핵 내 Nrf2 단백질의 발현을 확인한 결과, CJGPT는 농도의존적으로 핵 내 Nrf2의 발현을 증가시켰다(Fig. 3A). 같은 조건의 세포에서 총 RNA를 추출한 후 Nrf2 dependent gene인 HO-1과 NQO1의 발현을 관찰한 결과 고농도 (50 μ g/ml)의 CJGPT처리군에서 HO-1의 발현이 미약하게 증가하였고, NQO1의 발현이 증가하였음을 관찰하였다(Fig. 3B).

Nrf2 전사활성에 어떤 영향을 주는지 관찰하고자 다양한 농도의 CJGPT를 Nrf2 reporter cell line에 16 시간동안 처리하였다. 비록 sulforaphane (5 μ mol)처리군보다는 약했지만 CJGPT의 처리는 Nrf2 전사활성을 증가시켰으며, 특히 50 μ g/ml이상의 농도에서 현저한 증가를 유도하였다(Fig. 3C).

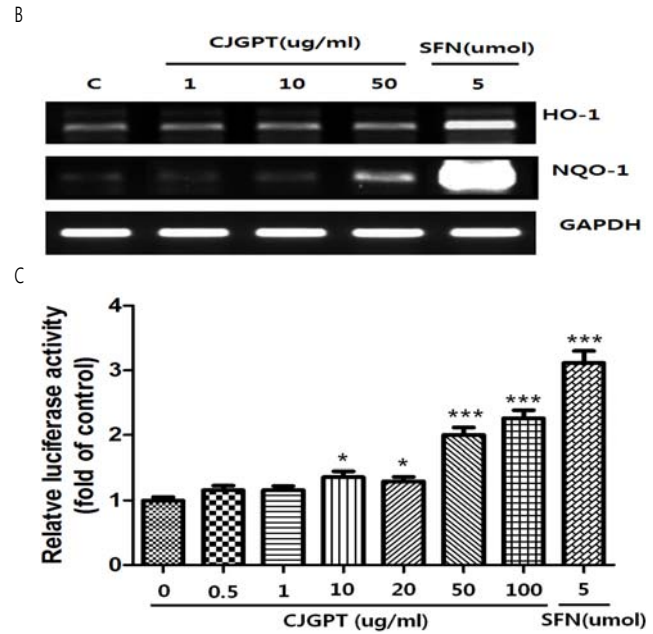
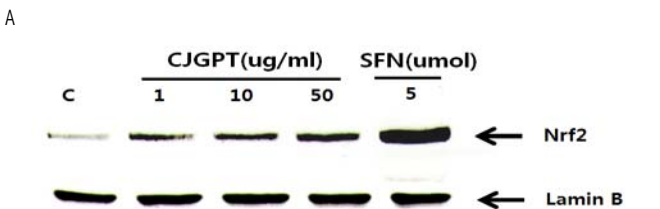


Fig. 3. Anti-oxidative effects of CJGPT on RAW 264.7 cells. (A) RAW 264.7 cells were treated with various amounts of CJGPT water extracts for 16 h. The nuclear fraction of the treated cells was isolated, and the nuclear Nrf2, indicative of activation, was measured by western blot analysis. Sulforaphane (SFN, 5 μ mol), a well-documented activator of Nrf2 was used as positive control. (B) Expressions of Nrf2 dependent anti-oxidant genes, such as HO-1 and NQO-1 were measured by semi-quantitative RT-PCR. (C) Luciferase assay was performed with total proteins prepared from Nrf2 reporter cell line, derived from RAW 264.7 cells. Cells were treated with water extracts of various amounts of CJGPT for 16 h. Luciferase activity was normalized by the amount of total proteins. Data represent the mean \pm SEM of triplicate settings, and experiment was repeated at least three times (*P<0.05, ***P<0.001, compared to untreated group).

고 찰

산화적 스트레스는 암, 노화, 퇴행성질환, 자가면역질환, 천식 등 다양한 질병의 발생과정에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 왔다. 특히 활성산소는 염증성 질환의 병리기전에서 세포와 조직손상의 중요 원인인자가 된다. 염증과정 중 대식세포나 호중구가 세균을 잡아먹고(phagocytosis) 사멸시키는(killing) 과정에서 NADPH oxidase는 환원형인 NADPH를 NADP+로 산화시키며, 이 과정 중 산소로부터 슈퍼옥사이드 라디칼(O₂⁻)이 생성된다¹⁸⁾. 이들은 다시 SOD에 의하여 과산화수소로 변환되며, 식작용과정 중 이 과산화수소는 용해소체(lysosome)안에서 생성된다. 세균 사멸작용이 끝나면 과산화수소는 catalase에 의하여 결국 물과 산소로 분해된다. 이와 같이 ROS는 염증과정에서 세균을 사멸시키는 유익한 역할을 담당하기도 하지만, 이들에 의하여 주변의 정상적인 조직과 세포 또한 손상을 입는다. 특히 자가면역질환이나 대사성질환, 만성폐쇄성 폐질환과 같은 만성염증성질환에서 ROS는 조직손상의 주요한 역할을 담당하고 있다.

세포가 산화적 스트레스 상황을 맞이하게 되면 글루타치온 (GST), 헴옥시게나아제-1(heme oxygenase-1; HO1), NADPH quinone oxidoreductase-1(NQO1)등을 포함하는 일련의 항산화해독 유전자들의 전사가 활성화된다. 이러한 유전자들의 전사는 이

들 유전자들로부터 약 0.5–10 kb upstream에 존재하는 antioxidant responsive element(ARE)에서 시작된다. ROS를 생성하는 화학물질을 포함한 다양한 자극들은 ARE를 통하여 항산화 유전자들의 전사를 활성화시킨다. 이러한 ARE 활성화에 관여하는 주된 전사인자가 바로 Nrf2이다. 산화적 스트레스가 없는 상황에서 Nrf2는 Kelch-like ECH-associated protein-1(Keap1)이라는 억제 단백질과 결합하여 세포질에 머무른다. 이 과정에서 Keap1은 cullin-3 E3-ubiquitin ligase(Cul3)와 작용하여 Nrf2를 ubiquitination시킨 후 결국 분해한다. 그러나 산화적 스트레스상황에서는 ROS가 Keap1의 cystein 잔기를 산화시켜 Keap1/Cul3로부터 Nrf2를 분리시킨다. 이 후 안정화된 Nrf2는 핵안으로 이동하여 Maf 단백질과 heterodimer를 이룬 후 ARE enhance에 결합하여 항산화 작용을 하는 표적유전자들의 전사를 활성화시킨다^{19,20}.

CJGPT는 淸나라 喻昌이 편찬한 종합의서인 『醫門法律』(1658년)에 최초로 수록된 처방으로9) 임상에서는 친식과 만성기관지염을 비롯한 만성 호흡기 질환에 널리 응용되고 있다¹³⁻¹⁶. 본 연구에서는 항염, 항암, 항알러지 작용이 있는 것으로 보고되고 있는 CJGPT의 Nrf2의 활성화에 미치는지의 여부를 관찰하여 그 효능을 평가하고자 하였다. 우선 CJGPT는 200 µg/ml의 농도에서까지 세포독성을 유도하지 않았으며(Fig. 1), 이 이하의 농도에서 모든 실험을 진행하였다. CJGPT를 선 처리한 후 LPS로 세포를 자극시킨 후 핵 내 NF-κB 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. LPS로 유도한 세포에서 핵 내 NF-κB의 발현을 50 µg/ml 농도의 처리군에서 억제함을 관찰하였다(Fig. 2A). CJGPT만 처리한 군에서는 농도의존적으로 핵 내 NF-κB 단백질의 발현이 증가되고 있음을 확인하였다. 이에 CJGPT가 염증반응을 촉발시키는지 확인하고자 NF-κB dependent gene 들의 발현을 관찰한 결과 이들의 발현을 높이지는 않았다. CJGPT가 핵 내 NF-κB 발현을 증가시키더라도 염증성 사이토카인의 유전자들의 발현이 증가되지 않는 이런 결과는 CJGPT가 전형적인 NF-κB 이외의 다른 기전을 통하여 염증반응의 촉발을 막고 있음을 추정할 수 있었다. CJGPT가 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell의 NF-κB dependent gene들의 발현을 억제하는지 RT-PCR로 조사하였다. CJGPT를 16 시간 처리한 RAW 264.7 cell의 mRNA의 발현을 관찰한 결과 대부분 농도의 처리군에서 TNF-α, IL-1-β, iNOS, COX-2, IL-6의 발현이 줄어들지 않았다(Fig. 2B). 그러나 고농도의 처리군에서 iNOS와 IL-6 mRNA의 발현은 미약하게 줄어들었다. 이는 Fig. 2A의 실험과 일관된 결과로 고농도에서 항염능력이 있음을 시사한 것으로 판단하였다. 이러한 CJGPT의 항염 능력이 NF-κB의 직접적인 전사활성을 억제하는 능력이 있는지 관찰하고자 reporter gene assay를 시행한 결과 흥미롭게도 50, 100 µg/ml의 고농도 처리군에서 전사활성이 억제되지 않았다(Fig. 2C). 이에 저자는 이러한 항염 능력이 항산화 활성화와 관련이 있는지 조사하기 위하여 항산화 유전자 발현조절 전사인자로 잘 알려진 Nrf2의 핵내 발현과 이들이 주관하는 유전자들의 발현 및 이들의 전사활성을 관찰하였다. 다양한 농도의 CJGPT를 16 시간 동안 처리한 RAW 264.7 cell에서 핵 내 Nrf2 단백질의 발현은 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 3A). Nrf2 dependent gene인 Heme oxygenase-1 (HO-1)과 NADPH: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) mRNA의 발현을 조

사하였다. Nrf2의 표적 유전자 가운데 HO-1는 산화적 스트레스 상황에서 강력한 항산화 활동을 하는 것으로 알려져 있으며^{21,22}, FAD-dependent flavoprotein으로 항산화효소로서의 역할을 담당하는 것으로 알려진 NQO1의 활성화 또한 산화적 스트레스상황과 밀접히 연관되어 있고, ROS의 생성을 억제하는 것으로 보고되었다^{23,24}. CJGPT는 HO-1과 NQO1의 발현을 농도의존적으로 증가시켰으며, 특히 NQO1의 발현은 50 µg/ml의 처리군에서 두드러졌다(Fig. 3B). 이에 저자는 CJGPT가 Nrf2전사인자 활성을 증가시키는 지 확인하고자 reporter gene assay를 시행한 결과 예측한 바와 같이 Nrf2의 전사활성이 농도의존적으로 높아졌다(Fig. 3C). 이상의 결과 CJGPT는 LPS로 자극한 RAW 264.7세포의 염증반응을 고농도에서 미약하게 억제시켰고, 같은 세포에서 Nrf2의 전사활성을 증폭 시킴으로써, 항산화 유전자들의 발현을 증가시켰다.

결론

RAW264.7 cell을 이용하여 淸燥救肺湯(CJGPT)의 Nrf2 매개 항산화 활성을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

CJGPT는 200 µg/ml의 농도에서까지 세포독성을 나타내지 않았다.

CJGPT는 LPS로 활성화시킨 RAW 264.7 cell에서 핵 내 NF-κB의 발현을 50 µg/ml 농도의 처리군에서 억제하였으나, NF-κB dependent gene인 TNF-α, IL-1-β, iNOS, COX-2, IL-6의 발현은 대부분의 농도에서 억제되지 않았다.

CJGPT는 NF-κB의 직접적인 전사활성을 억제하지 않았다.

CJGPT는 RAW 264.7 cell에서 핵 내 Nrf2 단백질의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다.

CJGPT는 RAW 264.7 cell에서 Nrf2 dependent gene인 HO-1과 NQO1의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다.

CJGPT는 Nrf2의 직접적인 전사활성을 증가시켰다.

따라서 본 결론을 종합해 볼 때 CJGPT의 기존 보고된 항염, 항암, 항알러지 효능은 Nrf2매개 항산화기전의 활성화와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음

References

- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120(4):483–495, 2005.
- Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuiji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5):981–990, 2012.
- Shukla, V., Mishra, S.K., Pant, H.C. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci* 2011: 572634,

- 2011.
4. Trachootham, D., Alexandre, J., Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8(7):579–591, 2009.
 5. Andersen, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl: S18–25, 2004.
 6. Shukla, V., Mishra, S.K., Pant, H.C. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci* 2011: 572634, 2011.
 7. Paravicini, T.M., Touyz, R.M. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71(2):247–258, 2006.
 8. Haigis, M.C., Yankner, B.A. The aging stress response. *Mol Cell* 40(2):333–344, 2010.
 9. Yu, C. *EuiMunBeopRyul*. Changsha, C.N., Hunan Science & Technology Press. p 55, 1998.
 10. Rao, F.U., Ling-ling, K. The Clinical Observation of Prevention and Treatment Radiation Pneumonitis using radiation Qingzao Jiufei Soup. *Guide of Chinese Med* 11: 29–30, 2011.
 11. Zeng, Q.M., Jing, G.G., Jiang, L.F. Shang, X.M. Clinical Application of Qing Zao Jiu Fei Decoction. *J Jiangxi Univ TCM* 25(2):89–92, 2013.
 12. Wu, S.J., Zhao, Y.P. 31 Cases of Decoction for Reliving Dryness of the Lung Treating Resistant Dry Cough. *Chinese J Basic Med TCM* 17(8):928, 2011.
 13. Kim, H., Park, D.I. Antiproliferative effect of Chungjogupae-tang treatment was associated with the inhibition of prostaglandin E2 release and Tteleromere active in human lung carcinoma cells. *J Korean Orient Med Ophthalmology & Otolaryngo & Dermato* 19(2):26–39, 2006.
 14. Park, M.C., Jeong, H.S., Lee, K.G. Effect of Chungjokupye-tang on the Anti-cancer Property. *Korean J Orient Physio & Patho* 17(6):1441–1447, 2003.
 15. Na, H.U., Jeong, H.S., Lee, K.G. Anti-allergic Property of Chungjokupye-tang. *Korean J Orient Physio & Patho* 17(6):1376–1382, 2003.
 16. Park, W.Y., Seo, U.K. Effects of Chungjogupye-tang and Yieum-jeon on Secretion of Mucin from Respiratory Epithelial Cells. *Korean J Orient Int Med* 29(2):318–333, 2008.
 17. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63, 1983.
 18. Lambeth, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181–189, 2004.
 19. Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G., Yamamoto, M. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci* 101: 2046–2051, 2004.
 20. Itoh, K., Tong, K.I., Yamamoto, M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208–1213, 2004.
 21. Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C.M., Cuadrado, A. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J Biol Chem* 279(10):8919–8929, 2004.
 22. Maines, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557–2568, 1988.
 23. Siegel, D., Gustafson, D.L., Dehn, D.L., Han, J.Y., Boonchoong, P., Berliner, L.J., Ross, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 65: 1238–1247, 2004.
 24. Prawn, A., Buranrat, B., Kukongviriyapan, U., Sripana, B., Kukongviriyapan, V. Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin* 135: 515–522, 2009.