

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.2.389

JCCT 2019-05-49

양배추 추출물의 간보호 및 간기능 개선 효과

The Effects of Protecting Liver and Improving Liver Function on Cabbage Extract

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 본 연구는 인체에 유익한 효과가 있고 부작용 없이 장기간 안전하게 사용할 수 있으며 간보호 및 간기능 개선에 탁월한 효과가 있는지 양배추추출물의 간보호 효과에 대하여 알아보았다. 약물(APAP)에 의해 유도된 간손상 동물 모델에서 수행된 실험에서, 양배추 추출물은 간손상 마커인 AST 및 ALT를 효과적으로 감소시킴으로써 간 보호 및 간 기능 개선 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 양배추 추출물은 간질환의 예방 또는 치료용 약학적 추출물로서 유효하다는 것이다. 특히, 양배추 추출물은 간손상에 수반되는 급성 염증 반응에 관여하는 염증 매개체 iNOS 및 COX-2 및 전염증성 사이토카인 IL-1 β 의 발현을 감소시킴으로써 간염 염증을 치료하는데 효과적이었다. 그 결과, 100 ~ 150 °C에서 열처리 한 배추 추출물은 생배추 추출물에 비해 간기능 개선 효과 또는 항염증 효과가 우수 하였다.

주요어 : 양배추, 간보호, 항염증, 간질환, 사이토카인

Abstract This study investigated the pharmaceutical extraction and the functional health food extraction, which have a beneficial effect on the human body and which can be used safely for a long period of time without adverse side effects and also have excellent effects of protecting liver and improving liver function. As the results, the cabbage extract does not show cytotoxicity, and thus can be used safely. In an experiment performed on an animal model with liver injury induced by a drug (APAP), it could be seen that the cabbage extract exhibited the effects of protecting liver and improving liver function by effectively reducing AST and ALT which are liver injury markers, indicating that the cabbage extract is effective as a pharmaceutical extraction for preventing or treating liver disease. In particular, the cabbage extract was effective in treating inflammation of the liver by reducing the expression of the inflammatory mediators iNOS and COX-2 and the proinflammatory cytokine IL-1 β , which are involved in acute inflammatory reactions accompanying liver injury. In the results, an extract of cabbage heat-treated at a temperature of 100 to 150°C had a better liver function-improving effect or anti-inflammatory effect than an extract of raw cabbage.

Key words : Cabbage, Hepatoprotective activity, Anti-inflammatory, Liver disease, Cytotoxicity

1. 서 론

간은 섭취한 음식물들을 여러 조직에서 필요한 영양소의 형태로 적절하게 변화시키고, 조직에서 이용하고

남은 노폐물들을 처리하는 신체의 대사과정을 담당하는 인체의 중요한 장기 중의 하나이다. 구체적으로는 소화액인 담즙을 분비하고, 단백질과 탄수화물, 지방을

*정회원, 서원대학교 식품공학과
접수일: 2019년 2월 13일, 수정완료일: 2019년 3월 14일
게재확정일: 2019년 4월 17일

Received: February 13, 2019 / Revised: March 14, 2019
Accepted: April 17, 2019

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr
Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ.,
Korea

대사시킴, 글리코젠과 지용성 비타민 등을 저장하고, 혈액응고 인자를 합성하며, 혈액에서 노폐물과 독성물질을 제거하고, 혈액량을 조절하며 노쇠한 적혈구를 파괴하는 등의 기능을 수행한다. 정신적 스트레스, 지방성분이 포함된 음식 또는 알코올의 과다 섭취, 바이러스의 감염, 약물이나 흡연, 공해물질 등의 유해물질에의 노출, 영양부족 등 다양한 요소가 간 기능의 장애를 일으킬 수 있다. 또한 간 기능의 장애는 인체가 방어해독 작용을 하지 못해 면역 체계에 이상을 가져와 다른 질병의 원인이 되기도 한다. 간 기능의 장애는 쇠약, 저혈압, 잦은 좌상과 출혈, 진전, 감정둔마, 뇌파변화, 복강 내 체액 축적과 같은 다양한 증상을 유발한다. 타이레놀의 주성분인 Acetaminophen(APAP)은 전 세계적으로 해열 및 진통에 활용되는 일반의약품으로 치료능도로 사용할 경우 비교적 안전한 약물이다. 그러나 과량의 APAP가 투입되면, 간 괴사, 신경독소, 간경화를 유발할 뿐만 아니라 사망에 이르는 부작용이 있다. 최근에는 생체에 과량의 APAP가 투입되면, 대량의 백혈구가 유입되어 급성 염증을 유발하는 것으로 최근에 알려졌다. 즉, 염증반응을 야기하는 사이토카인으로 잘 알려진 interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1)과 IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)이 10시간 이내에 대량 생산되어 염증반응을 가속화시킨다. 더욱이, cyclooxygenase-2(COX-2)와 prostaglandin E2 (PGE2)와 같은 염증매개물질이 APAP에 의해 유도되어 생체에 치명적인 손상을 야기한다. 이와 같이 APAP에 의한 간질환 환자는 약 10%에 이르고 있는데, 성인보다는 어린이에게 심각한 독성이 나타나고, 비알콜 섭취자에 비해서 알콜 섭취자에게서 그 독성이 심각한 것으로 보고되고 있다[1, 2, 3].

양배추(*Brassica oleracea* var. capitata)는 십자화과 초본으로 세계적으로 Brassica 속 야채는 소비량이 증가하는 경향을 나타내며 영양학적으로 많은 유익을 준다. 십자화과 채소는 glucosinolates, phenolics, 베타카로틴, 비타민 C, lutein, zeaxanthin이 다량 함유되어 있으며, 특히 glucosinolates는 황(sulfur)을 함유하여 휘발성 있는 매운 향기를 가지며 myrosinase에 의해 가수분해 되어 isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, indole-3-carbinol, sulforaphane, butenyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate로 전환되는데 이들은 높은 압

발생 억제 효과를 가진다고 보고되어 있다. 이들의 기능성 연구로는 미생물 번식 저해효과, 항돌연변이 항산화, 항암효과 특히 위암과 같은 소화기계 질환 발생 감소, 실험적으로 유발된 위궤양의 회복효과, 위·십이지장 궤양 치료 효과 등이 보고 되어있다. 따라서 본 연구에서는 양배추 추출물은 약물(APAP)에 의해 유발된 간 손상 동물모델을 대상으로 한 실험에서 간기능 검사의 지표인 AST와 ALT를 효과적으로 감소시키는 간보호 및 간기능 개선 효능을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 열처리된 양배추 추출물(HCE)의 제조

양배추는 농수산물 시장에서 구입하여 세척한 후 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 정도의 크기로 절단하여 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 10 kg/cm² 이상의 압력에서도 견딜 수 있도록 고안, 제작된 열처리장치(Jisco, Seoul, Korea)의 내부 구획 용기에 넣고, 외부 구획의 용기에는 물을 넣어 140~150°C에서 6시간 열처리하였다. 열처리된 시료를 냉각한 후, 분쇄기를 사용하여 마쇄하고 10배(v/v) 증류수를 가하여 60°C에서 2시간 추출하였다. 추출액은 여과한 후 동결건조하여 사용하였다.

2. 세포독성 평가

세포 독성을 측정하기 위해 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10³ cells/100 μ L의 농도로 분주하였다. RAW 264.7 세포는 한국 세포주 은행으로 부터 분양 받았으며, 5% fetal bovine serum(FBS)과 100IU/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin(P/S)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하여 사용하였다. 분주된 세포에 제조한 양배추 추출물을 125, 250, 500 또는 1,000 μ g/ml의 농도로 가하여 24시간 처리한 후 MTT assay 방법을 이용하여, 세포생존율을 측정하였다 [4, 5].

3. Liver homogenate 제조

안락사 후에 간 조직을 즉시 추출하여 균질화 될 때까지 얼음 위에서 생리식염수에 보관하였다. 간 조직의 균질화를 위해 사용된 완충액은 10 mmol Tris-HCl 및 1 mmol ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, pH 7.4)으로 구성되었다. 전체 간 조직을 균질화 완충액

20 mL에서 균질화 시킨 다음, 간 중량 대비 10 % 균질액을 제조 하였다. 4 °C에서 1,500 rpm, 30 분간 원심 분리 한 후, 상등액을 분리하여 추가 분석까지 -80 °C에서 보관 하였다.

4. 간 조직에서 항산화 효소 수치 측정

모든 항산화 효소의 활성은 특정 효소 분석 키트를 사용하여 분석하였다. 촉매를 1 : 1000로 희석하여 Superoxide dismutase(SOD) 활성(Cu/Zn, Mn 및 FeSOD)을 측정하였다. CATase 활성은 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) 및 Glutathione peroxidase(GPx)분석은 glutathione(GSH) 및 oxidized glutathione(GSSG), GPx 글루타티온(GSH) 및 산화된 글루타티온 (GSSG)의 존재 하에서 수행되었고, GPx 활성은 다른 NADPH 수준(1:20의 표본 희석) 흡광도의 차이를 측정하였다.

5. 혈청에서 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OhdG) levels 측정

8-OHdG 측정 및 생화학적 분석을 위해, isoflurane 호흡 마취하에 마우스로부터 혈액 샘플을 수집하고 혈청 튜브에 담근다. 8-OHdG 측정키트 (Cayman chemical, Michigan, USA)를 8-OHdG 수준 측정에 사용하였다. 8-OHdG의 함량은 8-OHdG 단일 클론 항체에 대한 8-OHdG 및 AChE enzyme-labeled 8-OHdG의 경쟁에 기초하여 측정 하였다[6].

6. 양배추 추출물의 간보호 효능 평가

생후 6~8 주령된 체중 19~22 g의 웅성 BALB/c 마우스를 동양 바이오테크놀로지(경기도)로부터 구입하여 무특이 병원체 시설에서 일정한 조건(온도: 21±2°C, 상대습도: 60±10%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 일주일간 순화시킨 후 사용하였다. 실험기간동안 물과 사료는 자유급이 하였다. 실험군은 6마리씩 정상군(무처리군), 음성대조군(APAP만 처리), 양성대조군(APAP+NAC의 처리) 및 시료투여군(APAP+양배추 추출물 처리)으로 나누었다. 양성대조군에는 각각 APAP에 의한 간독성을 치료하는 효과가 있는 것으로 알려진 NAC 75 mg/kg씩을 매일 7일간 경구투여 하였으며, 시료투여군에는 Figure 1에서 제조한 열처리된 양배추 추출물을 500 mg/kg씩을 경구투여

하였다. 양성대조군과 시료투여군에 마지막으로 시료를 경구투여한 2시간 후 정상군을 제외한 모든 군에 간독성 유발을 위한 APAP를 400 mg/kg의 농도로 정맥투여 하였다. 시료투여 24시간 후 꼬리 정맥을 통해 채혈하고, 채취한 혈액으로부터 기질과 효소반응을 이용한 assay kit(Asan Pharm a-nceutical)를 사용하여 혈중ALT와 AST 레벨을 측정하였다[7, 8].

7. 양배추 추출물의 항염 효능 평가

일반적으로 간손상은 급성 염증을 유발하므로, 양배추 추출물이 항염 효능을 갖는지 추가적으로 확인하였다. 이를 위하여, 6웰 플레이트에 RAW 264.7 세포를 5× 10⁵ cells/100µL의 농도로 분주한 후, 0.1 µg/ml의 LPS를 처리하였다. LPS 처리 30분 후 양배추 추출물(CE) 또는 열처리된 양배추 추출물(HCE)을 1 mg/ml의 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 이후, TRIzol 시약(In vitrogen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. 이후, 표 1의 프라이머를 사용하여 qRT-PCR에 의해 전염증성 매개체 및 사이토카인의 발현을 측정하였다[9].

표 1. RT-PCR에 의한 사이토카인 발현 측정

Table 1. Measurement of cytokine expression by RT-PCR

Gene	Primer sequence
GAPDH	F: 5'-CACTCACGGCAAATTCACGGCAC-3'
	R: 5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'
iNOS	F: 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3'
	R: 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
COX-2	F: 5'-CACTACATCCTGACCCACTT-3'
	R: 5'-ATGCTCCTGCTTGAGTATGT-3'
TNF-α	F: 5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'
	R: 5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
IL-1β	F: 5'-CTGTGGAGAAGCTGTGGCAG-3'
	R: 5'-GGGATCCACACTCTCCAGCT-3'
IL-6	F: 5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'
	R: 5'-TGCTGGTGACAACCCAGGCC-3'

8. 간조직에서 Hematoxylin & Eosin (H&E)

간 조직을 안락사 후에 마우스로부터 수확하고 파라핀으로 H & E 염색을 실시하였다.

III. 실험결과

1. 세포독성 평가

Figure 1은 그 결과를 보여주는 그래프로, 양배추 추출물 및 열처리된 양배추 추출물 모두 세포독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 1).

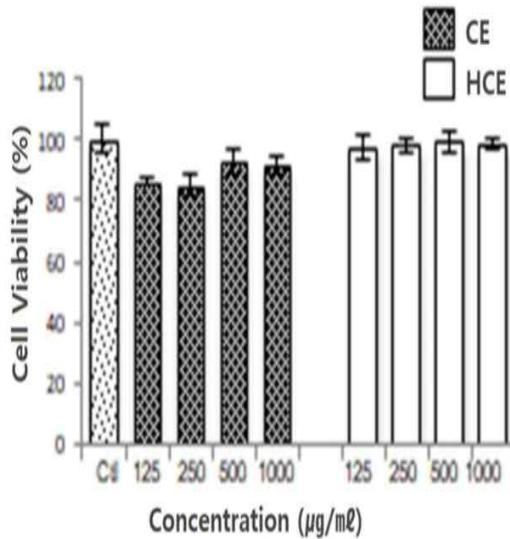


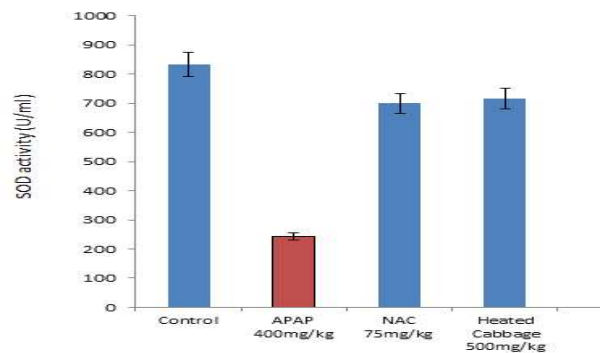
그림 1. 양배추 추출물의 세포독성 (cell Viability) 평가
Figure 1. Cell viability assay in RAW 264.7 cells treated with cabbage extracts.

2. 열처리된 양배추 추출물의 SOD, GPx 및 Catalase activity 활성효과

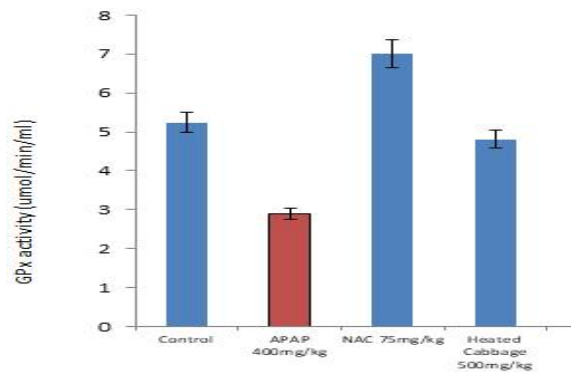
Superoxide Dismutase(SOD)는 superoxide($O_2^{\cdot -}$) 라디칼의 일반 분자 산소 (O_2) 또는 과산화수소 (H_2O_2) 로의 불균일 (또는 분열)을 교대로 촉매하는 효소이다. 그것은 산소 대사의 부산물로 생산되며, 규제되지 않으면 많은 종류의 세포 손상을 일으킨다. 따라서 SOD는 산소에 노출된 거의 모든 살아있는 세포에서 중요한 항산화 방어 물질이다. Figure 2A에서 알 수 있는 바와 같이, APAP는 SOD 수준이 대조군에 비해 현저하게 감소된 다음, 양배추 가공 열처리된 시료가 NAC 양성 대조군에 비해 SOD 수준을 회복시켰다. 글루타티온 퍼옥시다아제 (GPx)는 퍼옥시다아제 활성을 가진 효소 계열의 일반적인 이름으로, 생물학적인 역할은 유기체를 산화적 손상으로부터 보호하는 것이다. 글루타티온 퍼옥시다아제의 생화학적 기능은 lipid hydroperoxides를 상용하는 알콜로 환원시키고 유리 과산화수소를 물로 환원

시키는 것이다. 따라서, GPx는 세포에서 산화 스트레스에 대한 중요한 항산화 효소 역할을 한다. Figure 2b에 나타난 바와 같이, GPx 수준은 APAP 그룹에서 현저하게 감소하는 반면, 양배추 가공 열처리된 시료는 APAP 및 양성 대조군 NAC 그룹 모두와 비교할 때 이 효소의 수준을 회복시켰다. 카탈라아제 (CAT)는 산소에 노출된 거의 모든 생물체(박테리아, 식물 및 동물)에서 발견되는 일반적인 효소이다. 과산화수소의 물과 산소로의 분해를 촉매한다. 그것은 반응 산소종(ROS)에 의한 산화 손상으로부터 세포를 보호하는 매우 중요한 효소이다.

A



B



C

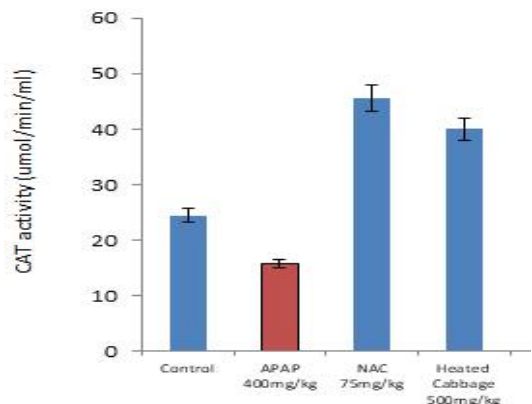


그림 2. 마우스의 혈청에서 (A) Superoxide Dismutase (SOD), (B) 글루타티온 퍼 옥시 다제 (GPx) 및 (C) 카탈라아제 활성 (CAT)

Figure 2. (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) glutathione peroxidase (GPx) and (C) catalase activity (CAT) in the serum of mice. € indicates $p < 0.05$ as compared to the control group, *** indicates $p < 0.001$ compared to acetaminophen, and # indicates $p < 0.01$ as compared to the positive control, NAC.

과산화수소는 많은 정상적인 대사 과정의 해로운 부산물이다. 세포와 조직에 대한 손상을 방지하기 위해 신속하게 다른 덜 위험한 물질로 전환 해야 한다. 이를 위해, 카탈라아제는 세포에 의해 자주 사용되어 과산화수소가 덜 반응성 인 기체 산소 및 물 분자로 빠르게 분해 되도록 촉매 작용을 한다. Figure 2C에서 APAP 및 양성 대조군과 비교하여 APAP 군에서 현저하게 감소된 CAT 활성이 양배추 열처리된 가공 처리군 에서 유의하게 증가함을 명백히 확인 할 수 있었다.

3. 열처리된 양배추 추출물의 8-OHdG 수준 감소 효과

8-Oxo-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)은 deoxyguanosine의 산화 유도체이다. 8-OHdG는 DNA 산화의 주요 생성물 중 하나이다. 세포 내 8-oxo-dG의 농도는 산화 스트레스의 측정값이다. Figure. 3에서 볼 수 있듯이, APAP 산화 스트레스 군에 대해 극도로 증가된 8-OHdG 값은 열처리된 양배추 추출물이 APAP 및 양성 대조군인 NAC 군과 비교할 때 유의하게 감소하는 경향을 확인하였다.

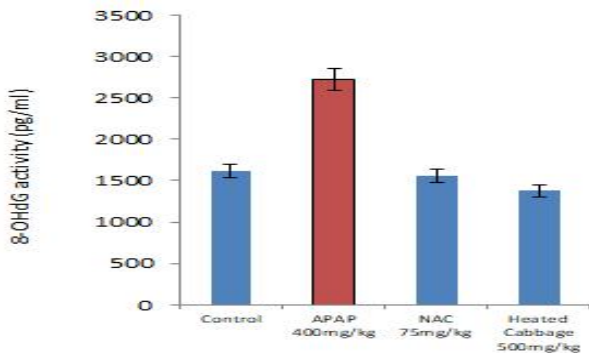


그림 3. 마우스의 혈청에서 8-Oxo-2'-dideoxyguanosine (8-OHdG) 수준 감소 효과

Figure 3. 8-Oxo-2'-dideoxyguanosine (8-OHdG) levels in the serum of mice. \$ indicates $p < 0.05$ as compared to the control group, *** indicates $p < 0.001$ compared to acetaminophen, and # indicates $p < 0.01$ as compared to the positive control, NAC.

4. 양배추 추출물의 간보호 효능평가

Alanine transaminase (ALT)는 transaminase 효소입니다. 그것은 혈장과 다양한 신체 조직에서 발견되지만 간에서 가장 흔하다. 그것은 알라닌 순환의 두 부분을 촉매 한다. 혈청 ALT 수준, 혈청 AST (aspartate transaminase) 수준 및 이들의 비 (AST/ALT 비)는 일반적으로 간 건강을 위한 바이오 마커로서 임상적으로 측정된다. Figure 4은 각각 혈중 ALT와 AST 레벨의 측정 결과로, 양배추 추출물은 APAP에 의한 간 손상에 효과적임을 확인할 수 있었다 (Figure 4). 특히 양배추 추출물은 AST의 발현에 미치는 영향이 현저하여, 급성 간손상에 더욱 효과적임을 시사 하였다.

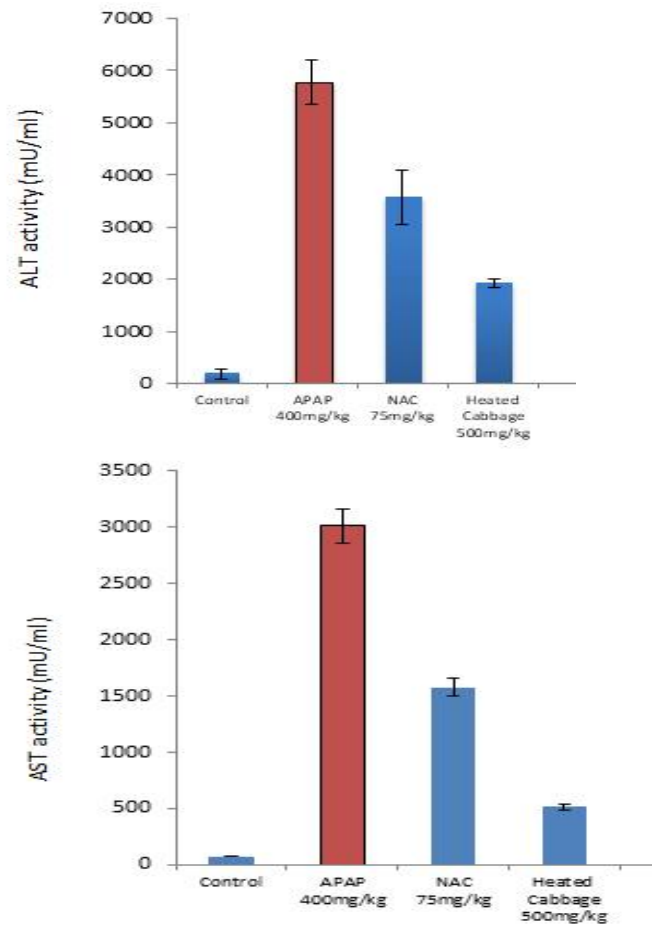


그림 4. 혈청에서 (A) Alanine aminotransferase (ALT) and (B) aspartate transaminase (AST) 레벨 측정

Figure 4. (A) Alanine aminotransferase (ALT) and (B) aspartate transaminase (AST) levels in the serum. # indicates $p < 0.05$ as compared to the control group, *** indicates $p < 0.001$ compared to acetaminophen, and # indicates $p < 0.01$ as compared to the positive control, NAC.

5. 양배추 추출물의 항염증 효능 및 Acetaminophen (APAP)에 대한 양배추 추출물의 간 손상 회복효과

양배추 추출물은 LPS의 자극에 의해 증가된 전염증성 매개체인 iNOS와 COX-2의 발현을 저해하였으며, 생양배추 추출물보다는 열처리된 양배추 추출물의 저해 효과가 더욱 우수하였다(Figure 5A).

학상의 간 손상을 조사하기 위해 수확하고 샘플 처리가 APAP에 의해 야기된 손상에 영향을 알아본 결과. Figure 5 B에서, APAP가 심한 간세포 손상을 유발 한 것과 같이 간엽 소염이 증가 된 호산구 증가와 함께 광범위한 중심 과립성 응고 괴사를 보인 것을 명백히 알 수 있었다. 심한 출혈은 대부분 간엽성 소염에서 관찰되었다.

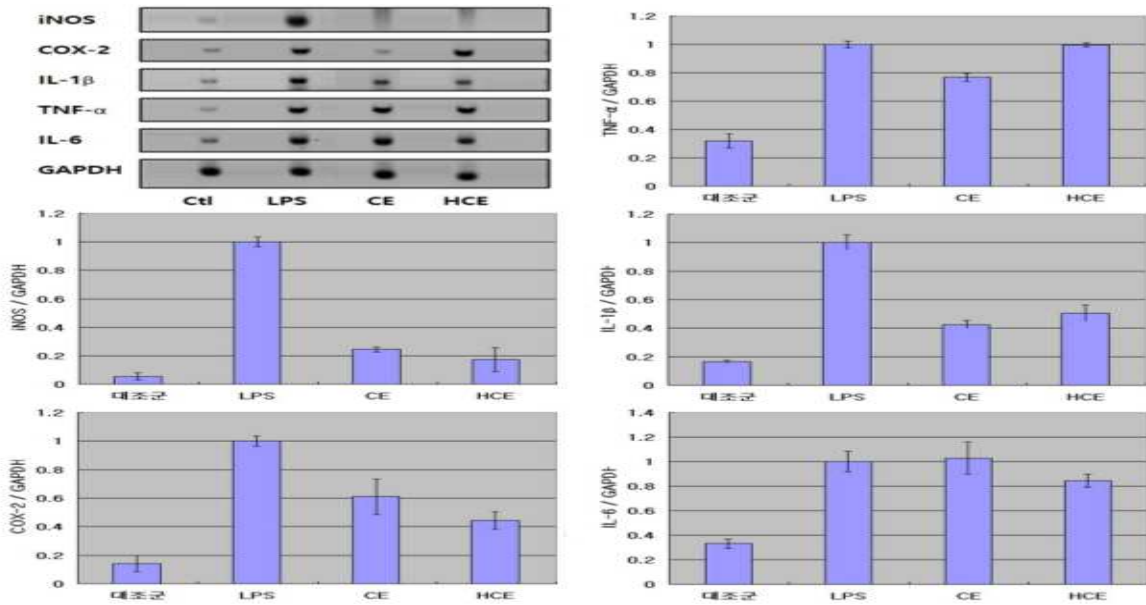


그림 5. 양배추 추출물의 항염증효과 및 간기능 개선 효과
Figure 5. Anti-inflammatory effect and hepatoprotective effect on cabbage extracts.

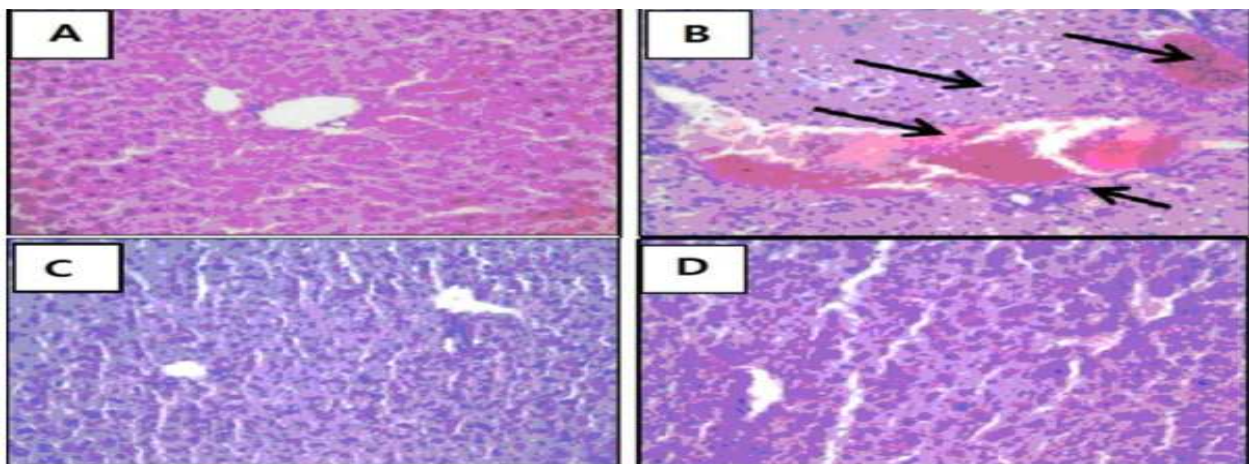


그림 6. 간 조직의 Hematoxylin & Eosin 염색
Figure 6.. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining of sections of the liver of mice in group (A) control, (B) acetaminophen, (C) NAC, (D) cabbage. Images were taken at a magnification of 400x under a microscope.

양배추 추출물의 간 조직을 APAP에 의해 유도된 형태

정현동은 확장되었고 중심 정맥의 내피는 파괴되었

다. 소엽 중심부의 간세포는 심한 풍선 팽창이 나타났다. 정현과는 적혈구와 림프구로 심하게 혼잡해졌다. 세포 경계는 잘못 정의되었고 대부분의 핵은 어둡게 얼룩져 있었다. 헤테로 염색질의 양은 핵 주변에서 증가했다. 핵은 그림에서 화살표로 나타난 바와 같이 광범위한 karyolysis, pyknosis 및 karyorrhexis 호중구 축적, 출혈 및 실질 세포 손상의 존재를 보였다. 그러나, 이들 모든 손상은 양성 대조군 NAC 및 열처리된 양배추추출물을 갖는 생쥐의 처리에 의해 거의 역전되는 결과를 얻었다.

6. 양배추 추출물의 간기능 개선 효능 평가를 위한 간조직의 H&E 염색

체혈 후 마우스를 희생시킨 후 간 조직을 적출한 후 파라핀에 임베딩 후 H&E로 염색하였다. 도 5는 해당 염색 이미지로 A는 정상군, B는 음성대조군, C는 양성대조군, D는 시료 투여군을 나타낸다. Figure 6에서 확인할 수 있듯이, APAP에 의해 심각한 간세포의 손상이 관측되나, NAC나 양배추 추출물에 의해 이러한 손상이 상당히 치유됨을 확인 할 수 있었다.

V. 결 론

본 연구는 식품 소재로서 독성이 없어 안전하게 사용할 수 있으면서, 간보호 효능이 있어 간질환의 예방 및 치료와 간기능 개선에 사용할 수 있는 있는지 양배추 추출물을 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 및 치료와 간기능 개선의 효과를 알아본 결과 양배추 추출물은 세포독성을 나타내지 않아 안전하게 사용할 수 있으며, 약물(APAP)에 의해 유발된 간손상 동물모델을 대상으로 한 실험에서 간기능 검사의 지표인 AST와 ALT를 효과적으로 감소시키는 간보호 및 간기능 개선 효능을 나타내어, 간질환의 예방 및 치료용 약학 조성물로 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

References

[1] Kim HY, "The effects of fruit and vegetable bark extract on learning ability and memory improvement," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(3), pp. 261-267,

2018.

<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.261>.

- [2] Kim DB, Ahn EY and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [3] Kim HK, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018. <http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [4] Guzik TJ, R. Korbut R, and Adamek-Guzik T, "Nitric oxide and superoxide in inflammation", *J physiol pharmacol*. Vol. 54, No. 4, pp. 469-487, December 2003.
- [5] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, and Aggarwal BB, "Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked", *Free radical biology and medicine*, Vol. 49, No.11, pp. 1603-1616, December 2010. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- [6] Heo SK, Yun HJ, Noh EK, Park WH, and Park SD, "Lps induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production", *Immunology letters*, Vol. 120, No.1-2, pp. 57-64, October 2008. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.07.002>.
- [7] Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A., Bishop-Bailey D, Croxtall J, and Willoughby DA, "Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 91, No. 6, pp. 2046-2050, March 1994.
- [8] Kaviarasan S, Naik G, Gangabhairathi R, Anuradha C, and Priyadarsini K, "In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*trigonella foenum graecum*) seeds", *Food chemistry*, Vol. 103, PP. 31-37, 2007. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.064>.
- [9] Libby P, "Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease", *Nutrition reviews*. Vol. 65, No. s3, pp. 140-146, June 2007. <http://d/doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.yb00352.x>.