

## 薑黃 桂枝 복합물이 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성에 미치는 영향

최지<sup>1#</sup>, 박해진<sup>2</sup>, 정일하<sup>3</sup>, 김민주<sup>4</sup>, 신미래<sup>3</sup>, 노성수<sup>3</sup>, 박순애<sup>5</sup>, 김미림<sup>5\*</sup>

1 : 대구한의대학교 한방식품학과, 2 : 대구한의대학교 바이오융복합시험센터  
3 : 대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실, 4 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터  
5 : 대구한의대학교 푸드케어학부

### Effects of Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus Mixture on Anti-inflammatory Activities in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cells

Ji Choi<sup>1#</sup>, Hae-Jin Park<sup>2</sup>, Il-ha Jeong<sup>3</sup>, Min Ju Kim<sup>4</sup>, Mi-Rae Shin<sup>3</sup>  
Seong-Soo Roh<sup>3</sup>, Soon-Ae Park<sup>5</sup>, and Mi-Lim Kim<sup>5\*</sup>

1 : Department of Herbal Food and Nutrition, Daegu Haany University  
2 : DHU Bio Convergence Testing Center  
3 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University  
4 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University  
5 : Department of Foodcare YAKSUN, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives :** A persistent inflammatory response can cause diseases such as fibrosis, cancer, and allergies. This study aimed to investigate the anti-inflammatory activity of Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus Mixture (CCM) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 cells.

**Methods :** The total polyphenol and flavonoid contents of CCM were confirmed through an *in vitro* experiment. Also, radical scavenging activities of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and Hydroxyl were confirmed. Moreover, ferric reducing antioxidant power (FRAP) activity were confirmed. After, CCM (50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were applied to 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS-stimulated RAW264.7 cells. The levels of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines in the supernatant fraction were determined. Also, the expressions of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) pathways were detected using Western blot.

**Results :** As a result of *in vitro* experiments, there was an excellent antioxidant activity in CCM-treated cells. In addition, in RAW264.7 cells stimulated with LPS, the increased NO level was inhibited in a concentration-dependent manner by the treatment of CCM. In addition, inflammatory cytokines production were significantly inhibited in a concentration-dependent manner in CCM-treated group. CCM treatment significantly decreased the protein expressions of MAPKs. Moreover, the expressions of NF- $\kappa\text{B}$ p65 and cyclooxygenase-2 (COX-2) were significantly decreased when 200 mg/kg of CCM was applied, and phospho-inhibitor of nuclear factor kappa B- $\alpha$  (p-I $\kappa\text{B}\alpha$ ) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were significantly decreased at all concentrations treated with CCM.

\*Corresponding author : Mi-Lim Kim, Department of Foodcare YAKSUN, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38609, Korea.

· Tel : +82-53-819-1453

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : mlk8742@dhu.ac.kr

#First author : Ji Choi, Department of Herbal Food and Nutrition, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38609, Korea.

· Tel : +82-53-819-1453

· Fax : +82-53-768-6340

· E-mail : jiyany@naver.com

· Received : 10 February 2023

· Revised : 03 March 2023

· Accepted : 25 March 2023

**Conclusion** : Our findings show that CCM exhibited excellent antioxidant activity and exhibited superior anti-inflammatory effect through the MAPKs and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

**Key words** : Curcuma longae Rhizoma, Cinnamomi Ramulus, RAW264.7, Lipopolysaccharide, Inflammation

## I. 서 론

염증은 외부 물질 또는 병원균과 같은 유해한 자극으로부터 몸을 보호하기 위한 생물학적 방어 기작이다<sup>1, 2)</sup>. 과도한 염증 반응이 지속적으로 유지되면 동맥경화증, 암, 패혈증, 알레르기 등과 같은 질환을 일으킬 수 있다<sup>3)</sup>. 이러한 염증은 염증 매개체 분비에 관여하는 대식세포에 의해 일어나게 된다<sup>4)</sup>. 대식세포는 선천적 면역의 주요 면역세포로 체내에서 항원제시, cytokine 생산, 식세포 작용, 염증의 면역 조절 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>5, 6)</sup>. Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성균의 세포막을 구성하는 요소 중 하나로 염증반응에서 핵심 경로인 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 및 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 경로를 자극하게 된다<sup>7)</sup>. 그 결과, 염증 매개체인 nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)가 활성화되고 이는 interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등과 같은 염증성 cytokines의 증가로 이어지게 된다<sup>8)</sup>. 그렇기에 LPS로 유도된 대식세포는 새로운 항염증 소재 개발을 위한 연구에서 일반적으로 사용된다<sup>9)</sup>.

薑黃(Curcuma longae Rhizoma)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 초본인 *Curcuma longa* L.의 뿌리줄기 부위를 건조한 것으로 성질이 따뜻하고 독이 없으며 맛은 맵고 쓰다<sup>10)</sup>. 肝 및 脾經으로 歸經하며 破血, 通經, 止痛, 行氣하는 효능을 지니고 있다<sup>11)</sup>. 또한 최근에는 항염증, 항암, 항산화, 항돌연변이 등의 약리효능에 대한 연구들이 보고되었다<sup>12-15)</sup>.

桂枝(Cinnamomi Ramulus)는 녹나무과(Lauraceae)에 속한 상록교목인 *Cinnamomum cassia* Presl의 어린가지 부위를 건조시킨 것으로 성질은 따뜻하며 독이 없고 맵고 쓴맛을 지니고 있으며, 心, 肺 및 膀胱經으로 歸經하며 發汗解肌, 溫經通脈 및 助陽化氣하는 효능이 있다<sup>16)</sup>. 최근에는桂枝의 항비만, 항암, 항염증 등의 약리효능에 대하여 연구들이 보고되었다<sup>11, 17, 18)</sup>.

李時珍이 편찬한 '本草綱目 上篇' 기록에 의하면 6~10g 동량의 두 약재를 相使藥으로 함께 사용하게 되면 桂枝의 따뜻한 성질로 인하여 血脈이 잘 흐르도록 하고 薑黃의 活血止痛하는 효능이 증가한다고 하였다<sup>19)</sup>. 이러한 기록에 근거하여 1:1 비율의 薑黃 桂枝 복합물이 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성에 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였으며, 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 추출

본 실험에서 사용된 薑黃과 桂枝는 옹기한약국(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 100 g의 薑黃 또는 桂枝에 10배수의 증류수에 넣고 100℃에서 2시간동안 끓여서 추출하였다. 그 후, 여과와 농축을 하여 완전한 분말 형태로 만들었으며, 수율은 薑黃 추출물 6.92%, 桂枝 추출물 4.66%로 실험에 사용할 薑黃과 桂枝 추출물은 1:1 비율로 증류수에 녹여서 사용하였으며, 10 mg/mL의 stock을 만들어 실험직전까지 냉동실에서 보관하였다(Curcuma longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture, CCM).

### 2. 실험재료

본 실험에 사용된 L-ascorbic acid, BCA protein assay kit, aluminium chloride 및 diethylene glycol은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 LPS, sodium carbonate, gallic acid, diethylene glycol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), quercetin, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium hydroxide, 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium ferricyanide, thiobarbituric acid (TBA), 2-deoxy-D-ribose, 1,1-diphenyl-2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium monobasic, FeCl<sub>3</sub> 및 potassium phosphate dibasic은 Sigma aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Duksan (Gyeonggido, Korea)에서 trichloroacetic acid (TCA)를 구입하여 사용하였다. 실험에서 사용한 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 penicillin/streptomycin (p/s), fetal bovine serum (FBS) 및 dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구매하여 사용하였다. 1 M ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) (pH 8.0)는 Biosesang (Gyeonggido, Korea)에서 구입하였으며, TNF- $\alpha$ 와 IL-6 ELISA kit는 Komabio (Seoul, Korea)에서 구매하였다. Western blot 분석을 위해 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)와 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 2차 항체는 Gene Tex Inc. (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 Boston Bio Products

(Ashland, MA, USA)에서 RIPA buffer를 구입하였으며, nitrocellulose blotting membrane과 ECL western blotting detection reagents를 GE Healthcare (Freiburg, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)와 protease inhibitor cocktail는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

薑黃 桂枝 복합물의 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 Folin Ciocalteu's의 방법을 응용하였다<sup>20)</sup>. E-tube에 100  $\mu$ L의 sample과 10배로 희석된 Folin-ciocalteu's phenol reagent 500  $\mu$ L 및 7.5% sodium carbonate 400  $\mu$ L를 잘 혼합하여 넣고 빛을 차광하여 30분간 반응한 후, UV 분광광도계(Infinite M200, Tecan, Männedorf, ZH, Switzerland)로 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 gallic acid를 사용하였다(Gallic acid equivalents (GAE)).

Aluminum chloride를 사용한 비색법을 응용하여 薑黃 桂枝 복합물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다<sup>21)</sup>. E-tube에 sample 100  $\mu$ L, 10% aluminium chloride solution 20  $\mu$ L, 1M potassium acetate solution 20  $\mu$ L 및 증류수 560  $\mu$ L를 넣어준 후 잘 혼합하여 빛을 차광한 상태로 30분간 반응시킨 후, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 사용하였다(Quercetin equivalents (QE)).

### 4. DPPH 자유 라디칼 소거능

薑黃 桂枝 복합물의 항산화 활성을 측정하기 위해 Blois의 DPPH 자유 라디칼 소거법을 응용하였다<sup>22)</sup>. 96-well plate에 농도별로 희석된 薑黃 桂枝 복합물 100  $\mu$ L와 60  $\mu$ M DPPH 100  $\mu$ L를 넣고 잘 혼합하여 빛을 차광한 상태로 30분간 반응시킨 후, UV 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sample을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데, 필요한 sample의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 하여 나타내었다. 양성대조시약으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

### 5. ABTS 라디칼 소거능

薑黃 桂枝 복합물의 항산화 활성을 측정하기 위해 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다<sup>23)</sup>. 먼저 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 증류수에 녹인 후 약 15시간 동안 빛을 차광하여 ABTS+를 만든 다음, ethanol로 415 nm에서 흡광도 0.70 $\pm$ 0.02의 값이 나오도록 희석하였다. 96-well plate에 ABTS 용액 95  $\mu$ L와 농도별로 희석된 薑黃 桂枝 복합물 5  $\mu$ L를 넣고 잘 혼합하여 15분 반응 후 UV 분광광도계로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sample을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데, 필요한 sample의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 하여 나타내었다. 양성대조시약으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

### 6. Ferric reducing antioxidant power

Rahman 등의 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 방법을 응용하여 薑黃 桂枝 복합물의 총 항산화력을 측정하였다<sup>24)</sup>. 1% potassium ferricyanide와 0.2 M sodium phosphate buffer 500  $\mu$ L를 넣고 혼합한 후 농도별로 희석된 薑黃 桂枝 복합물 200  $\mu$ L를 넣고 50 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응하였다. 그 다음, 10% TCA 500  $\mu$ L를 첨가하여 10분간 3000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 그 후 분리된 상층액 720  $\mu$ L, 증류수 720  $\mu$ L, 0.1% ferric chloride 144  $\mu$ L를 e-tube에 넣고 잘 혼합한 다음 UV 분광광도계로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조시약으로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

### 7. Hydroxyl 라디칼 소거능

薑黃 桂枝 복합물의 항산화 활성을 측정하기 위해 Rahman 등의 방법을 응용하여 Hydroxyl 라디칼 소거능을 측정하였다<sup>24)</sup>. 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 400  $\mu$ L와 1.04 mM EDTA 100  $\mu$ L에 농도별로 희석된 薑黃 桂枝 복합물과 1 mM FeCl<sub>3</sub> 100  $\mu$ L 및 20 mM 2-deoxy-D-ribose 100  $\mu$ L를 넣고 잘 혼합하였다. 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 1 mM ascorbic acid를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후, 1% TBA와 TCA 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 UV 분광광도계로 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조시약으로는 D-mannitol를 사용하였다. Hydroxyl 라디칼 소거능을 IC<sub>50</sub> 값으로 계산하였다.

### 8. 세포 생존율

마우스 유래 대식세포주인 RAW264.7 세포를 well당 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells로 24-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, 농도별로 희석한 薑黃 桂枝 복합물을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후, 배양액을 교체하고 1 mg/mL의 MTT 용액을 분주하고 2시간 동안 배양하였다. 2시간 후, DMSO 100  $\mu$ L를 첨가하여 생성된 formazan을 녹인 다음, UV 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군에 대한 비율(%)로 나타내었다.

### 9. Nitric oxide

Griess 방법을 응용하여 薑黃 桂枝 복합물이 nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향을 측정하였다. RAW264.7 세포를 well당 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells로 6-well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, 농도별로 희석한 薑黃 桂枝 복합물을 분주하여 1시간 배양한 후 0.1  $\mu$ g/mL의 LPS를 처리하여 24시간 반응시켰다. 그 후 상등액과 griess reagent를 1:1 비율로 잘 혼합하여 실온상태에서 10분 동안 반응시켜 UV 분광광도계로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 후, sodium nitrite를 표준 곡선으로 NO 생성량을 산출하였다.

## 10. 염증성 cytokines

薑黃 桂枝 복합물이 염증성 cytokine에 미치는 영향을 알아보았다. 먼저 6-well plate에 RAW264.7 세포를  $2 \times 10^6$  cells/well로 분주한 후 24시간 배양하였다. 그 다음, 농도별로 희석한 薑黃 桂枝 복합물을 1시간 처리한 후  $0.1 \mu\text{g/mL}$ 의 LPS로 24시간 동안 배양하였다. 상층액을 사용하여 염증성 cytokines (TNF- $\alpha$  및 IL-6)를 ELISA kit로 분석하였다.

## 11. Western blot

RAW 264.7 세포에서 MAPKs의 발현에 薑黃 桂枝 복합물이 미치는 영향을 측정하였다. 먼저 dish에 세포를  $2 \times 10^6$  cells로 분주하고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 가 유지되는 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 새롭게 교체한 다음, 농도별로 희석한 薑黃 桂枝 복합물을 분주하고 1시간 배양한 후  $0.1 \mu\text{g/mL}$  LPS를 넣고 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 그리고 RIPA buffer를 사용해 단백질을 분리하였다.  $10 \mu\text{g}$ 의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 loading 하고 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 membrane을 5% skim milk에 넣고 blocking한 다음, 분석하고자하는 1차 항체를 처리하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight 시킨 다음 membrane을 TBS/T로 세척하였다. 그 다음, membrane에 각각의 1차 항체(PBS-T로 1:1000로 희석 후 사용)에 맞는 2차 항체(PBS-T로 1:3000로 희석 후 사용)로 1시간 상온에서 처리하고 TBS/T로 세척하였다. 세척한 membrane을 ECL solution에 노출시킨 후, Sensi-Q 2000 Chemidoc을 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. 발현된 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램으로 정량하였다.

## 12. 통계분석

실험에 사용된 값들은 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였으며, SPSS (Version 26, IBM, Chicago, IL USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후검정을 실시하여 유의수준  $p < 0.05$ 일 경우 유의성이 있다고 판단하였다.

# III. 결 과

### 1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

실험에 사용된 薑黃 桂枝 복합물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하였다. 그 결과, 총 폴리페놀 함량은  $57.38 \pm 0.26 \text{ mg GAE/g}$ 으로 나타났으며, 총 플라보노이드 함량은  $6.02 \pm 0.08 \text{ mg QE/g}$ 으로 측정되었다(Table 1).

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid content in CCM

Sample name	Total polyphenol (mg GAE/g)	Total flavonoid (mg QE/g)
CCM	$57.38 \pm 0.26$	$6.02 \pm 0.08$

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM, gallic acid equivalents; GAE, and quercetin equivalents; QE. All values are represented using 3 independent experiments expressed mean  $\pm$  SEM.

### 2. DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능

실험에 사용된 薑黃 桂枝 복합물의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 薑黃 桂枝 복합물의 DPPH 자유 라디칼 소거능  $\text{IC}_{50}$  값은  $46.66 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, ABTS 라디칼 소거능  $\text{IC}_{50}$  값은  $64.23 \pm 0.30 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다 (Table 2).

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity of CCM

Sample name	DPPH $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABTS $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
CCM	$46.66 \pm 0.47$	$64.23 \pm 0.30$
L-ascorbic acid	$1.34 \pm 0.02$	$3.95 \pm 0.03$

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM, half-maximal inhibitory concentration;  $\text{IC}_{50}$ . All values are represented using 3 independent experiments expressed mean  $\pm$  SEM.

### 3. FRAP

薑黃 桂枝 복합물의 총 항산화력을 알아보기 위해 FRAP 측정결과,  $250 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 양성대조약물로 사용한 L-ascorbic acid는  $1.52 \pm 0.01$ , 薑黃 桂枝 복합물은  $0.36 \pm 0.01$ 로 나타났다 (Table 3).

Table 3. FRAP activity of CCM

Sample name	FRAP activity (sample concentration $250 \mu\text{g/mL}$ )
CCM	$0.36 \pm 0.01$
L-ascorbic acid	$1.52 \pm 0.01$

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All values are represented using 3 independent experiments expressed mean  $\pm$  SEM.

### 4. Hydroxyl 라디칼 소거능

Hydroxyl 라디칼 소거능을 측정한 결과, 양성대조약물로 사용한 D-mannitol의  $\text{IC}_{50}$  값은  $321.56 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 薑黃 桂枝 복합물의  $\text{IC}_{50}$  값은  $326.56 \pm 6.80 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다 (Table 4).

Table 4. Hydroxyl radical scavenging activity of CCM

Sample name	Hydroxyl IC <sub>50</sub> (μg/mL)
CCM	326.56 ± 6.80
D-mannitol	321.56 ± 0.98

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM, half-maximal inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>. All values are represented using 3 independent experiments expressed mean ± SEM.

### 5. 세포 생존율 측정

RAW 264.7 세포에서 薑黃 桂枝 복합물의 세포 생존율 측정 결과, 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 생존율을 기준으로 모든 농도의 薑黃 桂枝 복합물 처리 세포들에서 세포 독성이 나타나지 않았다(Figure 1). 이에 50, 100 및 200 μg/mL의 농도에서 모든 세포 실험을 진행하였다.

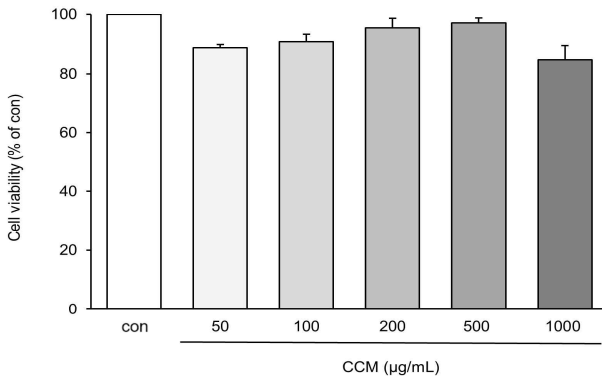


Figure 1. Effects of CCM on RAW 264.7 cell viability. Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean ± SEM (n=3).

### 6. NO 생성량 측정

NO의 생성량을 측정한 후 대조군의 NO 생성량을 기준으로 값을 나타내었다. 그 결과, LPS만 처리한 군은 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 약 5배의 수치로 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다( $p < 0.001$ ). 그러나 薑黃 桂枝 복합물의 경우, 50 μg/mL에서 446.91 ± 2.17%, 100 μg/mL에서 404.95 ± 10.43%, 200 μg/mL에서 329.85 ± 1.64%로 모든 농도에서 LPS 단독 처리군과 비교하여 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 ( $p < 0.001$ )(Figure 2).

### 7. 염증성 cytokines 측정

세포배양액에서 염증성 cytokines (TNF-α 및 IL-6) 분비량을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다(Figure 3). TNF-α 측정결과, 대조군 수치에 비하여 LPS 처리군의 수치가 약 5.49배 유의하게 증가하였으며( $p < 0.001$ ), 이를 薑黃 桂枝 복합물 100 μg/mL 처리군( $p < 0.05$ )과 200 μg/mL 처리군( $p < 0.01$ )에서 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3a). IL-6 측정결과, 대조군에 비해 LPS 처리군에서

약 31,36배 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 반면에 薑黃 桂枝 복합물 50 μg/mL 처리군, 100 μg/mL 처리군, 200 μg/mL 처리군의 수치는 LPS 처리군의 약 0.75배, 0.59배, 0.30배로 유의하게 IL-6 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3b).

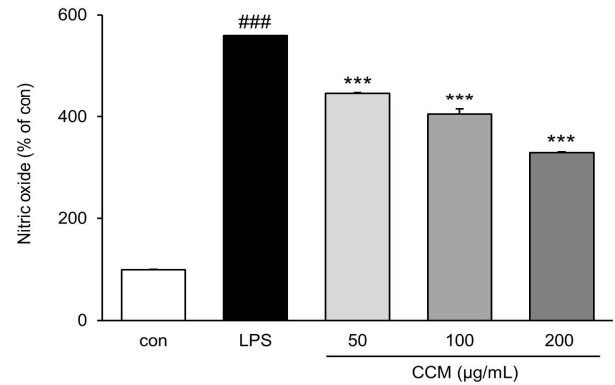


Figure 2. Effects of CCM on the NO production in RAW 264.7 cells. Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean ± SEM (n=3). Significance: ### $p < 0.001$  compared vs. con group and \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS group by LSD test.

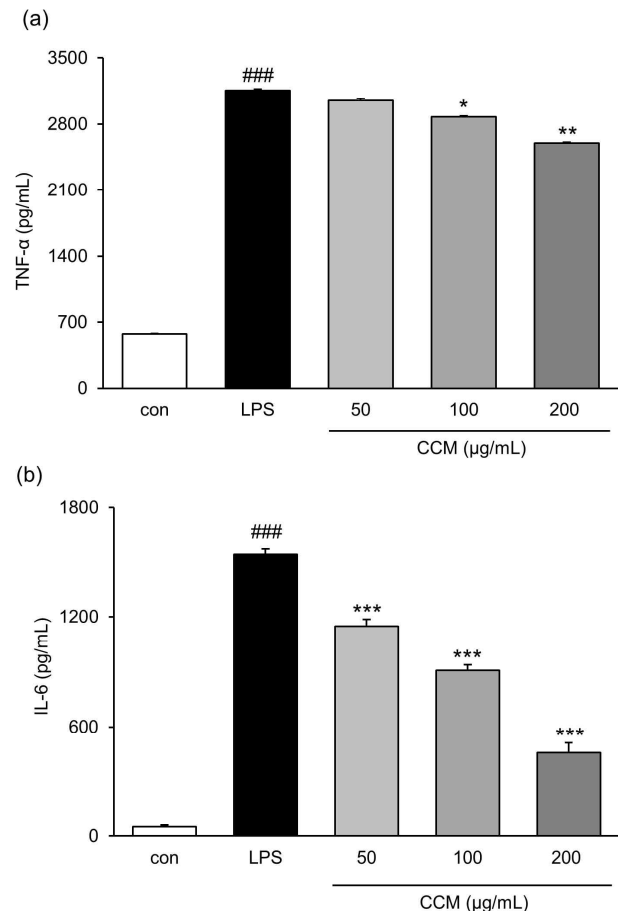


Figure 3. Effects of CCM on the inflammatory cytokines levels in RAW 264.7 cells. (a) TNF-α and (b) IL-6. Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean ± SEM (n=3). Significance: ### $p < 0.001$  compared vs. con group and \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. LPS group by LSD test.

### 8. Western blot

#### 1) Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

염증을 조절하는데 중요한 역할을 하는 MAPKs (JNK, ERK, p-38)의 인산화를 western blot으로 분석하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 LPS 처리군에서 MAPKs의 인산화가 유의하게 증가하는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). 증가된 MAPKs의 인산화는 薑黃 桂枝 복합물 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군에서 유의하게 감소하였으며( $p < 0.001$ ), 특히 p38의 인산화의 경우 LPS 처리군에 비하여 薑黃 桂枝 복합물 처리군들에서 각각 24.1%, 22.9%, 32.1% 감소율을 나타냄으로써 대조군 수준까지 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

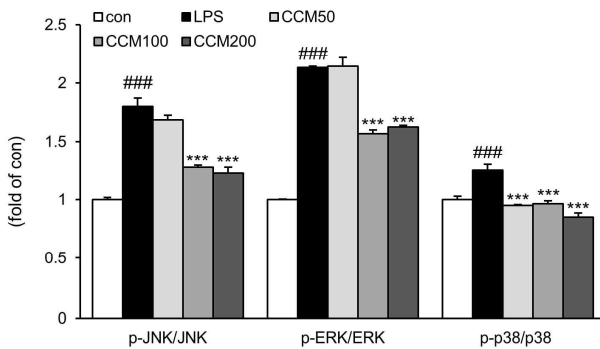
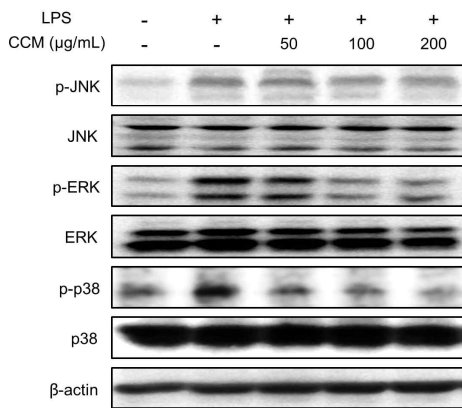


Figure 4. Effect of CCM on MAPKs activation in RAW 264.7 cells, Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ###  $p < 0.001$  compared vs. con group and \*\*\*  $p < 0.001$  vs. LPS group by LSD test.

#### 2) NF- $\kappa$ B 및 I $\kappa$ B $\alpha$

Western blot으로 전사인자인 NF- $\kappa$ B와 이를 돕는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 분석하였다. 그 결과, 두 인자 모두 LPS 처리군에서 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비해 유의하게 인산화가 증가하였다( $p < 0.001$ ). 반면에 증가한 NF- $\kappa$ B의 인산화를 薑黃 桂枝 복합물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군에서 LPS 처리군 보다 16.2% 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ), 그리고 모든 薑黃 桂枝 복합물 처리군에서 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 LPS 처리군 보다 유의하게 감소시켰으며( $p < 0.001$ ), 薑黃 桂枝 복합물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군의 경우 LPS 처리군에 비해 16.4% 감소시켰으므로 대조군 수준까지 감소하는 것으로 나타났다(Figure 5).

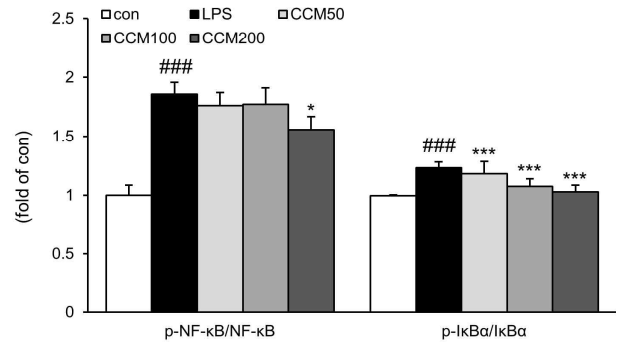
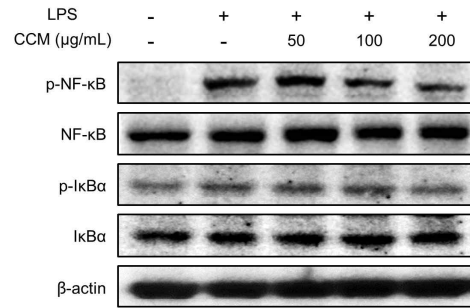


Figure 5. Effect of CCM on p-NF- $\kappa$ B and p-I $\kappa$ B $\alpha$  activation in RAW 264.7 cells.

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ###  $p < 0.001$  compared vs. con group and \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. LPS group by LSD test.

#### 3) iNOS 및 COX-2

염증반응에 관여하는 iNOS 및 COX-2를 western blot으로 분석한 결과, 두 인자 모두 LPS 처리군에서 대조군과 비교하여 유의하게 증가하는 것을 확인하였다( $p < 0.001$ ). 그리고 iNOS의 경우 LPS 처리로 증가한 발현을 薑黃 桂枝 복합물 처리로 인하여 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰으며, COX-2의 경우 薑黃 桂枝 복합물 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군에서만 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다(Figure 6).

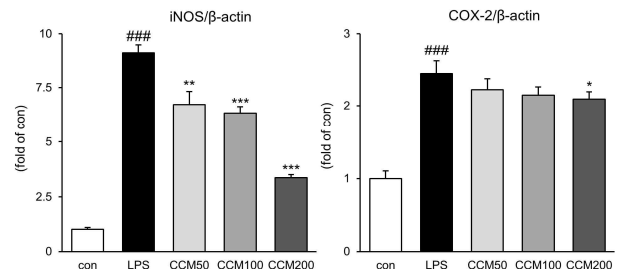
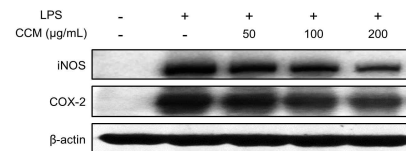


Figure 6. Effect of CCM on iNOS and COX-2 activation in RAW 264.7 cells.

Curcumae longae Rhizoma and Cinnamomi Ramulus mixture; CCM. All data are expressed mean  $\pm$  SEM (n=3). Significance: ###  $p < 0.001$  compared vs. con group and \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. LPS group by LSD test.

## IV. 고 찰

염증은 체내에서 일어나는 기본적인 면역반응으로 지속적으로 염증반응이 나타나면 대식세포, 혈장세포, 단핵구 등의 침윤이 일어나게 된다<sup>25)</sup>. 또한 조직의 손상과 회복과정에 의해 섬유화로 이어지기도 한다<sup>26)</sup>. 현재 사용되는 항염증제들은 소화 불량, 속쓰림 등과 같은 부작용으로 인해 환자에 따라 제한적으로 사용되고 있다<sup>27)</sup>. 그렇기에 부작용은 최소화되면서 항염증 효과가 우수한 소재의 개발이 필요한 실정이다<sup>28)</sup>.

이에 본 연구에서는 薑黃 桂枝 복합물의 항산화능과 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 미치는 항염증 활성에 대하여 알아 보았다. 사용한 薑黃 桂枝 복합물은 동량의 두 약재를 사용할 경우 經脈을 잘 통하게 함으로써 血의 운행을 활발하게 하여 통증이 줄어드는 효능이 증가한다는 '本草綱目'의 기록에 따라 1:1로 비율을 조성하여 사용하였다<sup>19)</sup>.

먼저, 薑黃 桂枝 복합물의 항산화 효과를 알아보기 위해 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH, ABTS, Hydroxyl 라디칼 소거능, FRAP를 평가하였다. 薑黃 桂枝 복합물의 총 폴리페놀 함량은  $57.38 \pm 0.26$  mg GAE/g이었으며, 이 중 총 플라보노이드 함량은  $6.02 \pm 0.08$  mg QE/g으로 나타났다. 라디칼 소거능은 DPPH IC<sub>50</sub>  $46.66 \pm 0.47$   $\mu$ g/mL, ABTS IC<sub>50</sub>  $64.23 \pm 0.30$   $\mu$ g/mL, Hydroxyl IC<sub>50</sub>  $321.56 \pm 0.98$   $\mu$ g/mL로 나타났으며, FRAP의 결과, 250  $\mu$ g/mL의 농도에서  $0.36 \pm 0.01$ 로 나타났다. 이러한 결과들은 薑黃과 桂枝 각각의 추출물의 총 폴리페놀 함량 (薑黃 24.74 mg GAE/g, 桂枝 2.03 mg GAE/g), DPPH 라디칼 소거능 (薑黃 188.5  $\mu$ g/mL, 桂枝 317.12  $\mu$ g/mL) 등과 같은 기존의 항산화 연구와 비교하였을 때 薑黃 桂枝 복합물이 우수한 항산화능을 발휘하는 것으로 나타났다<sup>29,30)</sup>.

RAW 264.7 세포에 薑黃 桂枝 복합물 처리 후 생존율을 측정 한 결과, 모든 농도에서 대조군 세포와 비교하여 80% 이상의 생존율이 측정되었기에 세포독성은 없는 것으로 나타났다.

그 후 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 일으켜 薑黃 桂枝 복합물의 항염증 활성을 알아보았다. 염증이 유발되면 과량의 NO, COX-2 등의 염증성 매개인자들이 생성되게 된다<sup>31)</sup>. NO는 전염증성과 항염증성 작용에 영향을 미치는데 과하게 생성되면 숙주세포를 파괴하고 혈관확장 및 염증반응을 유도하여 장기조직의 손상을 초래할 수 있다<sup>32, 33)</sup>. 기존 연구들에 따르면 薑黃 물추출물과 桂枝 80% 에탄올 추출물이 LPS로 자극받은 세포에서 NO 생성을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>10, 34)</sup>. 이에 薑黃 桂枝 복합물이 NO 생성에 미치는 영향을 측정 한 결과, 薑黃 桂枝 복합물 처리군들에서 농도 의존적으로 유의하게 NO 생성이 감소하는 것을 확인하였다.

염증성 cytokine은 급성염증반응이 유발할 때 중요한 역할을 한다<sup>35)</sup>. 이러한 염증성 cytokine은 여러 염증매개체들의 유도와 면역반응 조절에 관여한다고 알려져 있다<sup>36)</sup>. 특히 TNF- $\alpha$ 와 IL-6의 경우 여러 염증성 질환에서 중요한 역할을 하며, 염증성 질환이 유발되면 장기로 침입하여 장기의 손상을 일으킨다고 한다<sup>37)</sup>. 이에 薑黃 桂枝 복합물이 염증성 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성에 미치는 영향을 알아보았으며, 그 결과 두 인자 모두 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 비교하여

LPS 처리군에서 생성량이 유의하게 증가하였다. 반면에 薑黃 桂枝 복합물의 처리는 농도 의존적으로 생성량을 감소시켰으며, 특히 IL-6의 경우 모든 농도에서 유의하게 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

염증반응에서 MAPK와 NF- $\kappa$ B 경로는 염증 조절을 위해 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>38)</sup>. MAPKs는 p38 kinase (p38), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)가 잘 알려져 있으며 세포에 LPS와 같은 스트레스 자극을 주게 되면 염증반응으로 인하여 활성화가 일어나 핵 내로 이동 후 인산화되어 염증성 cytokine 생성에 영향을 미치게 되는데, 특히 JNK의 경우에 inhibitor of nuclear factor kappa B- $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )의 인산화를 통해 NF- $\kappa$ B를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 복합체 형태로 세포질에서 존재하는데 RAW 264.7 세포에 LPS의 처리는 I $\kappa$ B $\alpha$ 를 활성화시켜 인산화를 유도하여 NF- $\kappa$ B와 분리되어진다<sup>40)</sup>. 분리된 NF- $\kappa$ B는 핵 내로 이동하여 염증성 매개인자와 cytokine의 활성화를 유도하게 된다<sup>41, 42)</sup>. 이에 western blot으로 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로의 발현을 측정하였다. MAPKs 측정 결과, LPS 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 인산화가 증가하였으며, 이를 薑黃 桂枝 복합물 처리로 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 薑黃 桂枝 복합물 100  $\mu$ g/mL 처리군과 200  $\mu$ g/mL 처리군의 경우 MAPKs의 인산화를 유의적으로 감소시켰으며, 그 중에서도 p38의 인산화를 대조군 수준까지 낮추는 것으로 나타났다. 또한 薑黃 桂枝 복합물의 처리는 LPS로 인해 증가한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 유의적으로 억제하여 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 감소시킴으로써 NF- $\kappa$ B의 인산화를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 薑黃 桂枝 복합물은 LPS로 인한 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로의 활성화를 억제함으로써 염증성 매개인자인 COX-2와 iNOS의 활성을 억제시키는 것으로 나타났다.

이러한 결과들을 종합해보면, 薑黃 桂枝 복합물은 단일 추출물 보다 항산화능이 우수하게 나타났으며, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MAPKs와 NF- $\kappa$ B 경로의 활성을 억제 시킴으로써 염증성 매개인자와 염증성 cytokines의 생성을 효과적으로 억제하여 항염증 효과를 조절하는 것으로 사료되며 향후 항산화 기전에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

## V. 결 론

이에 본 연구에서는 薑黃 桂枝 복합물의 항산화능과 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 항염증 활성에 대하여 확인하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 薑黃 桂枝 복합물의 항산화능을 측정하기 위해 DPPH, ABTS 및 Hydroxyl 라디칼 소거능과 FRAP를 측정하였다. 그 결과, FARP에서는 미비하게 나왔으나, DPPH, ABTS 및 Hydroxyl 라디칼 소거능에서 우수한 소거능을 지니는 것으로 나타났다.

2. RAW 264.7 세포의 생존율은 여러 농도의 薑黃 桂枝 복합물을 처리하였을 때 모든 농도에서 세포 생존율이 80% 이상으로 세포 독성을 지니고 있지 않는 것으로 나타났다.
3. RAW 264.7 세포에서 LPS 처리에 의해서 증가된 NO 생산량을 측정된 결과, 薑黃 桂枝 복합물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.
4. 세포 배양액에서 염증성 cytokine (TNF- $\alpha$  및 IL-6)의 활성을 측정된 결과, 薑黃 桂枝 복합물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 IL-6의 경우 모든 농도의 薑黃 桂枝 복합물 처리군에서 유의하게 감소하는 것을 확인하였다.
5. 또한, western blot 결과, LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에 薑黃 桂枝 복합물을 처리함으로써 MAPK와 NF- $\kappa$ B 경로의 인산화를 억제함으로써 염증성 매개인자인 iNOS 및 COX-2를 감소시키는 것으로 나타났다.

결과적으로 薑黃 桂枝 복합물은 우수한 항산화능을 지니므로 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 MAPK와 NF- $\kappa$ B 경로의 활성화를 억제하여 염증반응을 조절하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제번호: PJ01425103)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Mangmool S, Limpichai C, Han KK, Reutrakul V, Anantachoke N. Anti-Inflammatory Effects of Mitrephora sirikitiae Leaf Extract and Isolated Lignans in RAW 264.7 Cells. *Molecules*. 2022;27(10):3313. doi: 10.3390/molecules27103313.
2. Yoojam S, Ontawong A, Lailerd N, Mengamphan K, Amornlerdpison D. The Enhancing Immune Response and Anti-Inflammatory Effects of Caulerpa lentillifera Extract in RAW 264.7 Cells. *Molecules*. 2021;26(19):5734. doi: 10.3390/molecules26195734.
3. Shin JY, Kang ES, Park JH, Cho BO, Jang SI. Anti-inflammatory effect of red ginseng marc, Artemisia scoparia, Paeonia japonica and Angelica gigas extract mixture in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Biomed Rep*. 2022;17(1):63. doi: 10.3892/br.2022.1546.
4. Shim JH. Anti-inflammatory Effect of Galium aparine Extract in RAW 264.7 Cells. *Asian J Beauty Cosmetol* 2018;16(2):233-42. doi.org/10.20402/ajbc.2017.0195.
5. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):281-6. doi: 10.2174/1568010054022024.
6. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci*. 2016;107(4):391-7. doi: 10.1111/cas.12901.
7. Kim JH, Kim M, Hong S, Kwon B, Song MW, Song K, Kim EY, Jung HS, Sohn Y. Anti-inflammatory effects of Fritillaria thunbergii Miquel extracts in LPS-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells. *Exp Ther Med*. 2021;21(5):429. doi: 10.3892/etm.2021.9846.
8. Hankittichai P, Buacheen P, Pitchakarn P, Na Takuathung M, Wikan N, Smith DR, Potikanond S, Nimlamool W. Artocarpus lakoocha Extract Inhibits LPS-Induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophage Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1355-73. doi: 10.3390/ijms21041355.
9. Wang Z, Guan Y, Yang R, Li J, Wang J, Jia AQ. Anti-inflammatory activity of 3-cinnamoyltribuloside and its metabolomic analysis in LPS-activated RAW 264.7 cells. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):329-41. doi: 10.1186/s12906-020-03115-y.
10. Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative Study of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities between Curcumae longae Radix and Curcumae longae Rhizoma. *Kor. J. Herbology*. 2010;25(1):83-91. doi:10.6116/KJH.2010.25.1.083.
11. Cho SI, Jung S, Kim HW, Park JE, Kim YG. Inhibition of Cellular Proliferation by CURCUMAE LONGAE Rhizoma Extracts on MCF-7. *Kor. J. Herbology*. 2006;21(1):71-7.
12. Lee YS, Lee DY, Kwon DY, Kang OH. Improvement Effect of Non-alcoholic Fatty Liver Disease by *Curcuma longa* L. Extract. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 2020;28(4):276-86. doi:10.7783/kjmcs.2020.28.4.276.
13. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*. 1991;57(1):1-7. doi: 10.1055/s-2006-960004.
14. Ahsan H, Parveen N, Khan NU, Hadi SM. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem Biol Interact*. 1999;121(2):161-75. doi: 10.1016/s0009-2797(99)



- 00096-4.
15. Kim DS, Park SY, Kim JK. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from betaA(1-42) insult. *Neurosci Lett*. 2001;303(1):57-61. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01677-9.
  16. Kim YS, Lee GS, Kim JH, Choi GY, Jeong SI, Cho SI, Ju YS, Kim HJ. A Study of Cutting Methods by Comparing the Contents of Cinnamic acid and Cinnamaldehyde in Different Parts of Cinnamomi Ramulus. *Kor. J. Herbology*. 2011;26(2):11-5.
  17. Yang H, Cheng X, Yang YL, Wang YH, Du GH. Ramulus Cinnamomi extract attenuates neuroinflammatory responses via downregulating TLR4/MyD88 signaling pathway in BV2 cells. *Neural Regen Res*. 2017;12(11):1860-4. doi: 10.4103/1673-5374.219048.
  18. Jeung WH, Nam W, Kim HJ, Kim JY, Nam B, Jang SS, Lee JL, Sim JH, Park SD. Oral Administration of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 with Cinnamomi Ramulus Extract Reduces Diet-Induced Obesity and Modulates Gut Microbiota. *Prev Nutr Food Sci*. 2019;24(2):136-43. doi: 10.3746/pnf.2019.24.2.136.
  19. Lee SJ. Bonchogangmok part one. Peoples Medical Publishing House. 1982:880-1.
  20. Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:221. doi: 10.1186/1472-6882-12-221.
  21. Malla MY, Sharma M, Saxena RC, Mir MI, Mir AH, Bhat SH. Phytochemical screening and spectroscopic determination of total phenolic and flavonoid contents of *Eclipta Alba* Linn. *J. Nat. Prod. Plant Resour*. 2013;3(2):86-91.
  22. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199-200. doi:10.1038/1811199a0.
  23. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999;26(9-10):1231-7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
  24. Rahman MM, Islam MB, Biswas M, Khurshid Alam AH. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Res Notes*. 2015;8:621. doi: 10.1186/s13104-015-1618-6.
  25. Min JY, Park YK. Effect of *Dipsaci Radix* Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages. *Kor. J. Herbology*. 2009;24(4):189-95.
  26. Cline MJ. Leukocyte function in inflammation: the ingestion, killing, and digestion of microorganisms. *Ser Haematol*. 1970;3:3-16.
  27. Kim KS. Clinical Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Korean J Otolaryngol*. 2004;47(2):91-8.
  28. Yoon KR, Kim YJ, Lee E, Lee JM. Anti-inflammatory Effect of *Coptidis Rhizoma*. *Kor. J. Herbology* 2009;24(3):79-86.
  29. Jeong HJ, Kim ST, Park JJ, Kim KH, Kim KM, Jun WJ. Antioxidant Activities and Protective Effects of Hot Water Extract from *Curcuma longa* L. on Oxidative Stress-Induced C2C12 Myoblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2017;46(11):1408-13. doi: 10.3746/jkfn.2017.46.11.1408.
  30. Park JH, Park JY, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of 7 Herbal Extracts and Methods of Herbal Formula Compositioning. *Herbal Formula Science*. 2014;22(2):87-103. doi:10.14374/HFS.2014.22.2.087.
  31. Ajizian SJ, English BK, Meals EA. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J Infect Dis*. 1999;179:939-44. doi: 10.1086/314659.
  32. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:434-56. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00092-6.
  33. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*. 2000;47:6-9. doi: 10.1136/gut.47.1.6.
  34. Park HJ, Lee JS, Lee JD, Kim NJ, Pyo JH, Kang JM, Choe IH, Kim SY, Shim BS, Lee JH, Lim SBN. The Anti-inflammatory Effect of Cinnamomi Ramulus. *J Korean Oriental Med*. 2005;26(2):140-51. doi: 10.4184/jkss.2005.12.2.140.
  35. Lee SH, Yoo JH, Kil KJ. Anti-inflammatory Activity of *Cynanchi Atrati Radix Et Rhizoma* Water Extracts via Regulation of MAPK in LPS-induced Murine Macrophage Cell Line, RAW 264.7. *Kor. J. Herbology* 2022;37(6):19-28.
  36. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide - induced

- inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology*. 2013;28(2):67-73.
37. Kim MJ, Bae GS, Choi SB, Jo IJ, Kim DG, Shin JY, Lee SK, Kim MJ, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Taraxacum coreanum* on lipopolysaccharide induced inflammatory response on RAW 264.7 cells. *Kor. J. Herbology* 2014;29(6): 21-6.
38. Kim EA, Kim SY, Ye BR, Kim J, Ko SC, Lee WW, Kim KN, Choi IW, Jung WK, Heo SJ. Anti-inflammatory effect of Apo-9'-fucoxanthinone via inhibition of MAPKs and NF- $\kappa$ B signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. *Int Immunopharmacol*. 2018;59:3 39-46. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.034.
39. Oh CH. Translation. simple immunology. 3rd rev. ed. seoul : Medical korea. 2006:161-200.
40. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell*. 1996;78(5): 773-85. doi: 10.1016/s0092-8674(94)90482-0.
41. Zhu Z, Gu Y, Zhao Y, Song Y, Li J, Tu P. GYF-17, a chloride substituted 2-(2-phenethyl)-chromone, suppresses LPS-induced inflammatory mediator production in RAW264.7 cells by inhibiting STAT1/3 and ERK1/2 signaling pathways. *Int Immunopharmacol*. 2016;35:185-92. doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.044.
42. Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(3):431-41. doi: 10.1016/j.intimp.2007.11.003.