

환경호르몬 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl의 신경세포 독성에 대한 인삼의 방어효과

황상구 · 김지수 · 이형철 · 이영찬 · 정영목 · 정우열 · 전병훈*

원광대학교 한의과대학 병리학교실

Protective Effect of Korean Ginseng on Cytotoxicity Induced by 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl in Human Neuronal SK-N-MC Cells

Sang-Gu Hwang, Ji Su Kim, Hyung Chul Lee, Young Chan Lee,
Young Mok Jeong, Woo Yeal Jeong, Byung Hun Jeon*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Polychlorinated biphenyls(PCBs) are large scale industrial chemicals which are using in diverse applications. The goal of this study was to determine if exposure to 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (PCB 52) leads to an increase in the production of active oxidants, and subsequently promotes apoptosis of neuronal SK-N-MC cells. Reactive oxygen species (ROS) formation was examined in SK-N-MC cells after treatment of PCB 52 by concentrations and incubation times, respectively. It showed that the rate of ROS production in the cells was increased in a dose-dependent manner to 45 min, followed by a return towards control levels after 120 min treatment. We also examined the association of PCB-induced apoptosis with the modulation of biomarkers of oxidative damage to lipids (malondialdehyde [MDA]) in SK-N-MC cells. Increased MDA was observed in a dose-dependent manner in groups treated with 10, 15, and 20 $\mu\text{g/ml}$ of PCB 52 for 24 h. After treatment of PCB 52, the cells did not show any significant change in the rate of Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) activity. Whereas, the cells had a two-fold greater rate of change in catalase activity at 20 $\mu\text{g/ml}$ of PCB 52 for 24 h when compared to control group. Korean Ginseng is one of the most important crude drugs which has been used as a traditional Oriental medicine. We next investigated protective effect of extracts of ginseng on cytotoxicity induced by PCB 52 in SK-N-MC cells. Pretreatment of SK-N-MC cells with 25-200 $\mu\text{g/ml}$ of ginseng were reduced cell death in a dose-dependent manner in PCB 52-treated cells. To examine the sensitivity of beta-catenin to ginseng, the protective effect of a range of ginseng concentrations was examined in SK-N-MC cells treated with PCB 52. The result demonstrated that ginseng efficiently blocked PCB 52 inducible beta-catenin proteolysis in a concentration dependent manner. The ROS formation was also measured in the presences of extract of ginseng and superoxide dismutase (inhibitor of oxygen free radical production). The both SOD (400 U/ml) and ginseng (200 $\mu\text{g/ml}$) significantly inhibited ROS generation in PCB 52-treated group.

Key words : PCB 52, neuronal SK-N-MC cells, oxidative stress, cytotoxicity, ginseng

서 론

환경호르몬은 공식적으로 '내분비교란물질(endocrine disrupting chemicals)'이라고 하며, 생체 내 호르몬의 합성, 분비, 체내 수송, 결합, 작용 또는 분해에 개입하여 생체의 항상성의 유지, 생식, 발달 또는 행동에 영향을 주는 외래물질이라고 정의한다¹⁾. 내분

비교란물질은 플라스틱류, 비닐류 등의 생활용품 및 농·공산품 그리고 농약류의 유기화합물 등에 함유되어 있으며, 공기·물·흙 등의 환경 속에 광범위하게 존재한다²⁾. 이들 유기화합물은 박테리아 등의 미생물 대사작용에 의해서 쉽게 분해되지 않아 자연계에서 불용성물질로 존재하며, 동물의 지방에는 쉽게 용해되는 성질을 가지고 있다. 따라서 이러한 화합물이 미생물에 흡착되면 이들을 섭취하는 동물에 의해 먹이사슬에 따라 단계적으로 고농도로 생체 내에 농축되는 특징을 가지고 있다. 이들 화합물들은 생체 내에서 에스트로젠과 같은 호르몬 효능을 흉내내어

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr Tel: 063-850-6843
접수: 2001/12/24 · 수정: 2002/01/26 · 채택 : 2002/02/09

인체의 생식과 성발달 과정을 파괴하고 면역계에 영향을 미치며, 피부병이나 정자감소증, 기형아 출산 뿐만 아니라 특정 암을 유발하는 등 인류의 건강에 심각한 피해를 주고 있는 것으로 여겨진다³⁾. 현재까지 보고된 내분비교란물질은 142 종으로 이 중에서 특히 인체에 강력한 독성을 보이는 물질로는 polychlorinated biphenyl(PCB), polychlorinated dibenzo-p-dioxin(PCDD), polychlorinated dibenzofuran(PCDF) 등이 있으며, 이 중에서도 화학적으로 안정성이 매우 뛰어난 PCB는 인체에 축적됨은 물론, 모유를 통해 2 세대에도 전이된다는 사실이 밝혀지고⁴⁾, 천연 에스트로겐을 분해해서 성호르몬의 균형을 바꾼다는 것이 보고되고 있으며⁵⁾, 이 물질이 뇌에서 도파민에 의해 활성화되는 신경전달물질에 영향을 미쳐서 도파민의 생성을 억제하며 두통이나 신경전달 속도를 감소시키는 등 신경독성효과를 가지고 있음이 제기되고 있다⁶⁾. 또한 PCB는 다양한 오염물체가 넓게 분포되어 있고 생체 내에서 산화성 스트레스 생성물질을 유도하고 면역계에 손상을 입히고, 결국 DNA의 손상으로 이어져 독성에 대한 반응을 증가시킨다는 등의 보고가 있다^{7,8)}. 이러한 내분비교란물질로 유발된 산화성 스트레스는 인체에서 각종 염증, 류마티스관절염, 종양, 퇴행성 뇌질환과 같은 다양한 만성질환과 깊은 관련이 있는 것으로 생각된다^{9,10)}. 한의학에서 만성질환의 주된 원인으로 氣虛, 血虛, 陽虛, 陰虛 등의 虛證 개념 및 邪氣의 有無와 盛衰로 설명할 수 있다. 이러한 虛證의 치료에 대표적인 약물이 인삼이며 다양한 만성적 질환의 치료에 널리 이용될 뿐 아니라 단일 약물로도 많이 사용되고 있다. 인삼의 性味는 微溫無毒·甘微苦하며 歸經은 肺·脾·胃·腎의 4 經이고, 大補元氣·調營衛, 補脾益氣, 寧神益智, 止渴生津 등의 효능을 가지고 있어 현대 의학적 개념의 만성적 퇴행성질환 치료에 사용될 수 있는 것이다. 인삼 효능에 대한 실험적 연구로는 protopanaxtriol계 단일성분 중의 하나인 Rg₁이 약물대사 및 항산화계에 미치는 영향¹¹⁾, 뇌의 노화와 관련된 과산화지질 억제 및 유해산소를 제거하는 효소활성의 촉진¹¹⁾, 순수사포닌의 항산화활성의 증가 작용¹²⁾, ginsenoside Rb₂의 칼슘 channel 활성 억제¹²⁾, 심근세포에서 xanthine oxidase로 유도된 free radical 증가 억제¹³⁾, 혈관내피세포의 산화적손상 방어효과 및 ginsenoside-Rb₂의 Cu/Zn-SOD 유전자 전사조절능력을 증가시키는 효과¹⁴⁾가 있음을 보고하였다. 내분비교란물질은 여러 가지 만성적 질환에 관련되지만 그 독성의 위험도와 기전이 정확하게 알려지지 않고 있는 실정이다. 이 중에서 PCB의 경우에 coplanar 구조를 가진 물질은 신경독성을 유발하는 것으로 밝혀져 있지만 noncoplanar 구조 물질의 신경독성에 대한 연구가 이루어지지 않았다. 이에 저자는 내분비교란물질로서 noncoplanar 구조의 하나인 PCB 52 (2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl)를 이용하여 사람의 뇌신경세포주인 SK-N-MC 세포에 처치하고, 산화산물의 증가에 의한 산화적 스트레스 유발과 항산화 효소활성의 변화를 살펴보았으며, 이로 인한 SK-N-MC 세포고사(apoptosis) 및 세포 내 신호전달 기전에 관한 영향을 관찰하였다. 그리고 이러한 실험결과를 기초로 하여 PCB 52의 산화적손상에 의한 세포독성에 대하여 인삼추출물의 세포독성 방어효과와 그 기전을 연구하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세포배양

한국세포주은행에서 사람의 뇌로부터 유래한 neuronal SK-N-MC 세포를 분양 받아 실험실에서 37℃, 5% CO₂ 공급 조건을 갖춘 배양기에서 배양하였다. 세포 배양을 위한 배지는 MEM 배지를 사용하였고 여기에 2 mM 글루타민, 10% 혈청, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM 필수아미노산을 첨가하였다. 항생제로는 100 units/ml 페니실린과 100 µg/ml 스트렙토마이신을 사용하였다.

2. 인삼 시료의 준비

인삼 200 g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 2,000 ml을 넣은 후 3 시간 동안 가열, 추출하고 침전물을 3M 여과지를 이용하여 3 회 여과하였다. 이 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압, 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 12 시간 동안 방치하고, 30 시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 10%의 수율인 20 g의 분말을 얻었다.

3. 항체와 시약

본 실험에 사용한 시약 및 구입처는 다음과 같다. Monoclonal beta-catenin 항체는 Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA), monoclonal Cu/Zn-SOD 항체는 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하였다. 상업용 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl (PCB 52)는 AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA)으로부터 구입한 후 DMSO에 녹여 20 mM의 저장용액으로 보관하여 사용하였다. Superoxide dismutase는 Sigma-Aldrich Co. 으로부터 구입하여 400 U/ml 농도로 희석하여 사용하였다.

4. Western blot analysis

실험에 이용된 세포를 고무 scraper로 긁어서 15 ml 튜브에 모은 후 4 ℃의 PBS로 2~3 번 씻고 2000 rpm에서 3 분간 원심 분리하였다. 상침액을 없앤 후 세포 pellet에 EBC lysis buffer를 넣고 20 분간 얼음 위에 놓아두면서 5 분마다 강하게 진탕하였다. 세포균질액은 13,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리하였고, 상침액은 실험을 위하여 다른 튜브에 옮겨졌다. 각 실험군마다 동일 양의 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였으며, 젤상에 있는 모든 단백질은 그 후 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membranes은 0.5% Tween-20을 포함한 TNT buffer를 이용하여 만들어진 5% nonfat milk solution에 넣어서 전처리 하였다. Anti-Cu/Zn-SOD 및 anti-beta-catenin 일차 항체를 1 µg/ml 농도로 만들어 1 시간 동안 실온에서 membrane과 반응시켰다. 배양 후 membrane은 TNT buffer로 10 분 동안 3 번씩 씻었고 이차 항체로 1 시간 동안 실온에서 membrane과 반응시켰다. Membrane을 TNT buffer로 세척한 후 enhanced chemiluminescence reagent를 이용하여 2분간 반응시킨 후, 필름을 이용하여 그 강도를 측정하였다.

5. 활성산소 형성 측정

산화 및 항산화 효소를 측정하기 위하여 대조군 및 실험군의 단백질 농도를 동일하게 만들었다. 이 때 이용된 단백질 측정법은 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 사용하는 Lowry 법¹⁵⁾으로 단백질 양을 결정하였다. 활성산소 형성의 측정에는 nonfluorescent probe 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes, USA)을 이용한 방법¹⁶⁾에 따라 시행하였다. 배양 접시의 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2-3번 세척하였다. 고무 scraper을 이용하여 세포 배양 접시로부터 세포를 긁어내어 40 mM Tris buffer(pH 7.4)가 2 ml 들어있는 튜브에 모았다. 메탄올에 녹아있는 DCFH-DA (최종농도 5 μM)를 튜브에 첨가하고 20 분간 37 °C에서 배양하였다. 20 분 후 5, 10, 15 μg/ml 농도의 PCB 52를 각각 40 mM Tris buffer를 가진 튜브에 첨가하였다. 형광물질의 생성비율을 Shimadzu spectrofluorometer (excitation wavelength = 488 nm, emission wavelength = 525 nm)를 이용하여 매 15 분마다 120 분까지 측정하였다. free radical 제거제가 있는 조건하에서 활성산소의 총량을 측정하기 위하여 먼저 세포를 DCFH-DA로 20 분간 배양 후 인삼(최종농도 200 μg/ml)과 SOD(최종농도 400 U/ml)를 첨가하고 5 분간 더 배양하였다. 그 후 실험 계획에 따라 PCB 52를 처리하였다.

6. MDA 측정

Suematsu 등의 방법¹⁷⁾에 따라 standard로 malondialdehyde를 사용하였으며, 시험관에 20 % acetic acid 1.5 ml, 8.1 % SDS 0.225 ml, 3차 증류수 0.075 ml, 1.2% thiobarbituric acid(TBA) 용액 1 ml, 그리고 PCB 52를 투여한 SK-N-MC 세포균집액 0.2 ml를 넣었다. 그 용액이 들어있는 시험관을 30 분 동안 가열하여 끓이고, 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상정액을 취해서 532 nm에서 흡광도를 측정하고 TBA 반응성 물질의 함량을 결정하였다.

7. SOD 및 catalase 활성 측정

SOD 활성도 측정은 McCord 등의 방법¹⁸⁾에 따라 xanthine과 xanthine oxidase의 존재 하에 생성되는 superoxide anion이 cytochrome C의 환원을 억제시키는 반응원리를 이용하였다. 즉, 시험관에 0.1 mM EDTA를 함유하는 50 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.8) 2.1 ml와 0.5 mM xanthine 0.3 ml 및 0.1 mM ferric cytochrome C 0.3 ml를 가한 다음, cytochrome oxidase에 의한 환원형의 cytochrome C의 재산화를 막기 위해 반응액에 50 μM potassium cyanide 0.1 ml를 가하였다. 반응액의 미립자를 분해시키기 위해서 sodium deoxycholate(10 mg/ml)를 0.1 ml 넣었다. 이 혼합액을 잘 섞은 다음 xanthine oxidase 0.1 ml 와 PCB 52를 투여한 SK-N-MC 세포 용액 20 μl를 가한 후 550 nm에서 흡광도의 증가율을 측정하였다. 흡광도의 증가율에 대한 기준은 xanthine oxidase의 농도를 조절하여 흡광도 증가를 분당 0.021이 되도록 하였다. Catalase의 활성 측정은 Aebi의 방법¹⁹⁾에 따라 시험관에 130 mM sodium phosphate(pH 7.0) 0.5ml, PCB 52 (2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl)를 투여한 SK-N-MC

세포 용액 0.4 ml, 3차 증류수 0.66 ml 와 기질인 15 mM H₂O₂ 용액 1.8 ml를 가하였다. 용액을 잘 혼합한 다음 파장 240 nm에서 3 분 동안 H₂O₂ 농도에 의한 흡광도의 감소율을 측정하였다. 효소의 활성도는 1 분 동안에 1 μmol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit으로 표시하였다.

8. 통계처리

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

1. PCB 52 투여에 의한 세포 내 활성산소종의 증가

활성산소종으로 알려진 O₂, OH, H₂O₂ 등의 자유 라디칼들은 반응성이 강하고 활성이 매우 커서 세포 구성물질이나 세포막 등에 독성 물질로서 작용하여 세포 내에서 산화적 스트레스를 일으킨다²⁰⁾. 그러므로 SK-N-MC 세포에 PCB 52를 투여한 후 유발되는 세포고사 현상이 이러한 활성산소의 발생에 기인한 것인지를 알아보았다. SK-N-MC 세포들이 들어있는 현탁액에 활성산소와 반응하면 형광색을 띠는 상업용 DCFH-DA를 넣어 20 분간 먼저 반응시킨다. 그러면 세포막에 존재하는 에스테라제에 의해 DCFH-DA 형태가 DCFH 형태로 변하게 된다. 그 후 5, 10, 및 15 μg/ml의 다양한 농도로 PCB 52를 각각의 현탁액에 투여한 후 PCB 52에 의해 유발되는 총 활성산소의 양을 측정하였다. 즉 활성산소와 결합하는 DCFH 형태는 DCF 형태로 변하면서 형광색을 나타내게 되는데 이 형광물질의 강도를 spectrofluorometer를 이용하여 15 분 단위로 최대 2 시간 동안 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 시간에 따른 형광의 강도에 변화가 거의 없었으나, 실험군에서는 투여 농도가 높으면 높을수록 DCF 형광물질의 강도가 상대적으로 높았다(Fig. 1).

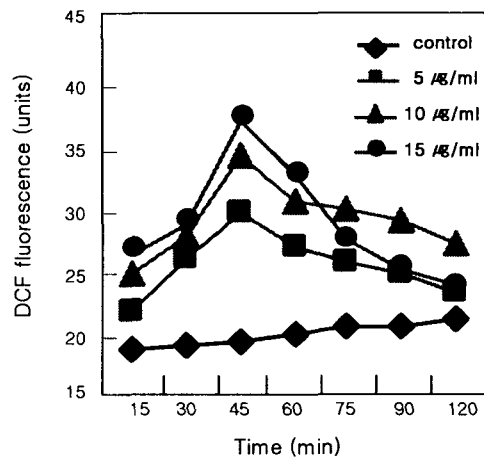


Fig. 1. Reactive oxygen species (ROS) generation in SK-N-MC cells by exposure to PCB 52. Cell suspensions were loaded with DCFH-DA for 20 min and then various concentrations of PCB 52 were added. DCF fluorescence was monitored over a 2 h period.

PCB 52 투여 후 45 분까지는 농도에 비례하여 형광의 강도가 점점 강하였으나, 이후 2 시간까지는 형광 강도의 상대적인 증가 수치는 떨어졌으나 대조군보다는 계속 높은 수치를 보여주었다(Fig. 1). 이런 결과는 PCB 52가 세포 내 활성산소의 양을 증가시켰고, 이로 인해 산화적 손상을 입은 세포들이 고사되는 것을 보여준 것이다.

2. PCB 52 투여에 의한 세포막 지질과산화의 증가

일반적으로 생체 또는 세포 내에서 활성산소종이 과다하게 생성되면 산화적 스트레스에 의해 세포막의 지질과산화 반응이 가속화되고 결국 세포는 막의 손상이 초래되어 세포사멸이 진행된다²¹⁾. 그러므로 PCB 52를 투여한 후 세포 내 지질과산화 정도를 측정해 보면 SK-N-MC 세포에서의 활성산소 증가와 그에 따른 산화적 스트레스 정도를 뒷받침 할 수 있는 증거가 되는 것이다. 따라서 지질과산화 반응 척도를 malondialdehyde(MDA)의 양으로 측정하였다. 10, 15, 20, 25, 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 PCB 52를 다양한 농도로 세포배양 배지에 투여한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 대조군과 실험군 사이의 흡광도를 측정해 mg protein 당 MDA의 양을 계산한 결과, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 농도의존적으로 MDA의 양이 계속 증가하다가 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 최고치를 이루다가 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 증가율이 감소함을 보이지만 대조군 보다는 계속 높은 수치를 보이며, 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 대조군의 값보다도 낮은 수치를 보였다(Fig. 2). 이것은 25 $\mu\text{g/ml}$ 과 30 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여했을 때는 PCB 52 자체의 독성에 의해 세포의 생존율이 극히 낮아져서 평균적인 값이 낮아져 발생한 현상이라 할 수 있다.

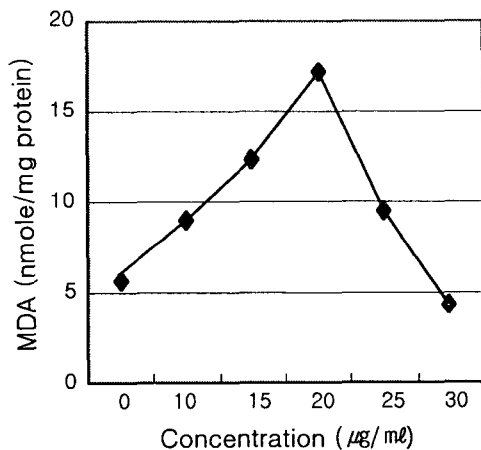


Fig. 2. Lipid peroxidation in SK-N-MC cells by exposure to PCB 52. Cells were incubated with various concentrations of PCB 52 for 24 h and MDA was analyzed by spectrophotometer.

3. PCB 52 투여에 의한 항산화효소의 활성 변화

PCB 52를 SK-N-MC 세포에 투여하였을 때 항산화효소들의 활성도에 어떠한 변화가 나타나는 지를 알아보았다. PCB 52를 10, 15, 20, 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 세포배양 배지에 투여한 후 SOD의 활성도 변화를 측정하기 위하여 8 시간과 24 시간

동안 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 배양시켰다. 세포로부터 얻어진 동일량의 단백질을 이용하여 Cu/Zn-SOD의 단백질 발현 정도를 Western blot으로 조사를 하였으며, Cu/Zn-SOD의 활성도 변화는 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 대조군과 SK-N-MC 세포에 PCB 52를 처리한 실험군들에서 단백질 발현 정도를 비교해 본 결과 PCB 52 투여 농도 별뿐만 아니라 배양 시간 별 차이점도 없었다(Fig. 3A). 이와 마찬가지로 대조군과 실험군 모두에서 Cu/Zn-SOD 활성도 변화가 많지 않음을 보여주었다(Fig. 3B).

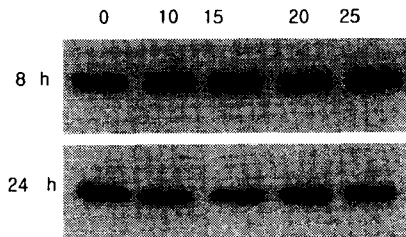


Fig. 3A. Effects of PCB 52 on protein level of Cu/Zn-SOD in SK-N-MC cells. Cells were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ with PCB 52 by concentrations (10, 15, 20, and 25 $\mu\text{g/ml}$) and times (8 and 24 h), respectively. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for Cu/Zn-SOD.

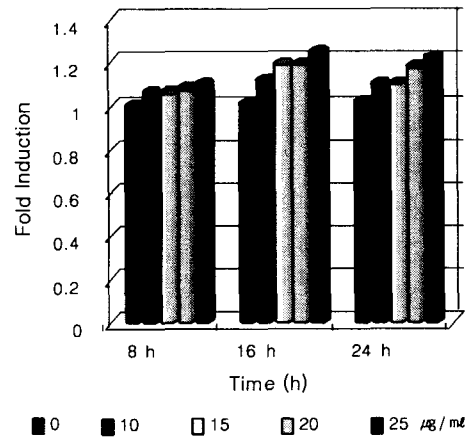


Fig. 3B. Effect of PCB 52 on Cu/Zn-SOD activity in SK-N-MC cells. Cells were incubated with various concentrations of PCB 52 for 8, 16, and 24 h, respectively. Assay was analyzed by spectrophotometer.

Catalase는 세포 내에서 발생하는 hydrogen peroxide를 H_2O 와 O 로 분해시키는 효소이다. 그러므로 catalase는 생물학적 산화반응 과정에서 생성되는 H_2O_2 가 세포막을 손상시키는 것을 막아주어 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다. PCB 52를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 단일 농도로 세포 배양 배지에 투여한 후 8, 16, 및 24 시간 동안 세포를 37 $^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 배양시켰다. 세포로부터 얻어진 동일량의 단백질을 이용하여 catalase의 활성도 변화를 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 그 결과 PCB 52를 투여한 후 8 시간 때에는 대조군과 비교하여 실험군에서는 별 차

이점이 없었으나 16 시간 후에는 약 1.2배의 활성이 증가하였고, 24 시간 후에는 약 2 배의 활성이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 4). Catalase의 활성이 증가하는 것은 PCB 52의 투여에 의해 세포 내 독성이 시간이 지날수록 강해지는 것을 알 수 있었다.

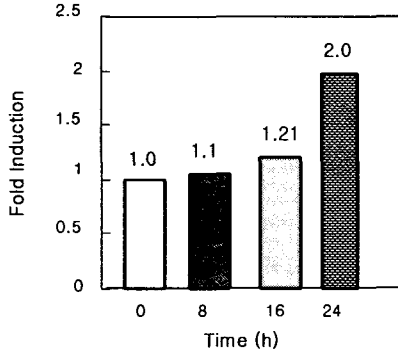


Fig. 4. Effects of PCB 52 on activity of antioxidant enzyme, catalase in SK-N-MC cells. Cells were incubated at 37 °C with 10 µg/ml of PCB 52 for the indicated times. Catalase values were assayed at 240 nm using Perkin Elmer spectrophotometer.

4. SK-N-MC 세포 증식에 대한 인삼 물추출물의 효능

SK-N-MC 세포의 성장과 증식에 대한 인삼의 효과를 알아보기 위하여, 인삼 물추출물을 시간 별 및 농도 별로 세포배양 배지에 투여하고 5 % CO₂와 37°C의 조건을 갖춘 배양기로 배양 하였다. 인삼 물추출물을 25, 50, 100, 150, 및 200 µg/ml 농도로 투여한 후 12 시간과 24 시간 배양 후 세포의 사망률과 증식율을 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과, 인삼은 처리 된 농도 범위 내에서 12 시간과 24 시간 동안 세포독성 및 증식율에 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Fig. 5). 단지 200 µg/ml의 농도로 처리된 세포에서 24 시간 동안 배양한 경우 세포사멸이 일어난 것을 볼 수 있으나 유의성이 없었다(Fig. 5). 그러나 300 µg/ml의 농도 이상으로 처리된 세포에서 24시간 동안 배양 할 경우 대조군과 비교하여 유의성이 있는 세포사멸이 일어났다 (data not shown).

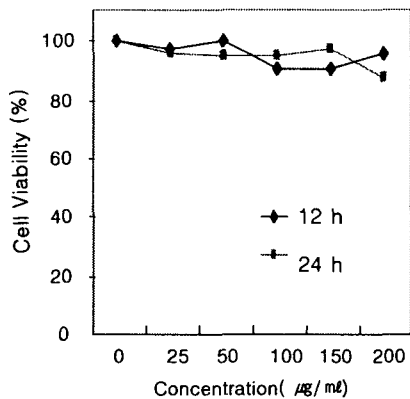


Fig. 5. Effects of extract of ginseng on growth of neuronal SK-N-MC cells. Cells were incubated for 12 and 24 h at 37 °C with the 25, 50, 100, 150, and 200 µg/ml of extract and MTT assay was carried out.

5. PCB 52 투여로 인한 세포독성 및 증식억제에 대한 효능

SK-N-MC 세포에 PCB 52를 투여하면 활성산소종에 의해 세포독성이 유발되고 그에 따라 세포 증식이 억제되는 것을 이미 알아보았다. PCB 52 처리 후 세포의 성장률에 대한 인삼의 효과를 알아보기 위하여, 인삼 물추출물을 시간별 및 농도별로 세포의 배양 배지에 30 분간 먼저 투여하고 그 후 PCB 52를 투여하여 5 % CO₂와 37 °C의 조건을 갖춘 배양기로 배양하였다. 인삼 물추출물을 25, 50, 100, 150, 및 200 µg/ml 농도로 30 분간 먼저 투여한 후 20 µg/ml 농도의 PCB 52를 나중에 투여하고 12 시간과 24 시간 더 배양 후 세포의 사망률과 증식율을 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 그 결과, PCB 52를 단독 처리한 대조군에서는 아무 것도 처리하지 않은 정상군과 비교하여 12 시간에서 61 %, 24시간에서 64 %의 세포사멸을 보여주었고, 인삼을 단독 처리한 대조군에서는 정상군과 비교하여 12시간과 24시간 모두에서 별 영향을 끼치지 않았다(Fig. 6). 그러나 PCB 52를 단독 처리한 대조군에 비교하여 인삼을 선처리한 후 PCB 52를 처리한 실험군에서는 처리된 농도 범위 내에서 12 시간과 24 시간 동안 모두 세포독성을 억제하였으며 그 결과 세포의 증식율이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

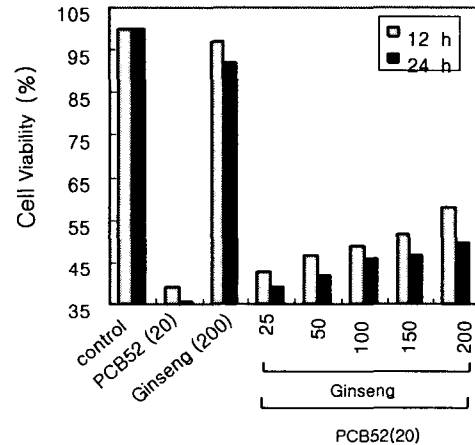


Fig. 6. Effects of extract of ginseng on growth in PCB 52-treated SK-N-MC cells. Cells were preincubated for 30 min at 37 °C with the 25, 50, 100, 150, and 200 µg/ml of extract and then added 20 µg/ml of PCB 52 for more 12 and 24 h. MTT assay was carried out.

6. PCB 52로 유도된 beta-catenin의 가수분해 증가의 억제 효능

PCB 52를 SK-N-MC 세포에 투여하여 유발되는 beta-catenin의 가수분해 패턴에 대한 인삼 물추출물의 효능을 관찰하였다. 이를 위하여 인삼 물추출물을 25, 50, 100, 150, 및 200 µg/ml 농도로 30 분간 먼저 투여한 후 20 µg/ml 농도의 PCB 52를 나중에 투여하고 24 시간 더 배양한 후 표본을 분석하였다. 그 후 정상군, 대조군 및 실험군 사이의 beta-catenin의 단백질 분해 양상을 Western blot으로 각각 비교해 본 결과, 정상군에 비교하여 PCB 52를 단독 처리한 대조군에서는 단백질 분해현상이 상당히 많이 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 7). 그러나 대조군에 비교하여 인삼을 30 분 먼저 처리한 실험군에서는 beta-catenin의 가수분해

가 줄어드는 현상이 인삼 농도에 의존하여 나타났다(Fig. 7). 인삼 농도 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가수분해 억제효과가 나타나기 시작하였으며, 200 $\mu\text{g/ml}$ 인삼 농도에서는 정상군 수준으로 회복시켰다(Fig. 7). 이런 결과는 PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포는 세포괴사를 통해 세포사멸을 초래함을 보여주고 있으며, 인삼에 의해 여러 단계의 신호기전이 반응하여 활성화된 caspase들이 기능을 수행할 수 없음을 보여준다. 즉, 인삼은 Caspase-3가 세포의 생존에 필수적인 단백질을 가수분해시키지 못하도록 Caspase-3의 기능을 억제하여 세포의 사멸을 억제하였음을 보여준다.

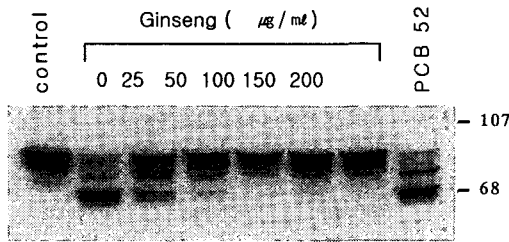


Fig. 7. Effects of extract of ginseng on proteolysis of beta-catenin in PCB 52-treated SK-N-MC cells. Cells were preincubated for 30 min at 37 °C with the 25, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{g/ml}$ of extract and then added 20 $\mu\text{g/ml}$ of PCB 52 for more 24 h. Whole cell lysates were prepared using EBC lysis buffer. The samples were resolved on a 7.5% SDS-PAGE gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and the blot was probed for beta-catenin.

7. PCB 52, 인삼 물추출물 및 SOD가 활성산소 발생에 미치는 효과

앞의 실험을 통하여 PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포들은 과다한 활성산소를 발생시켜 산화적 스트레스를 유발하는 것을 알 수 있었다. 본 실험은 이를 재검증하고, 인삼 물 추출물과 활성산소 제거제의 일종인 SOD를 이용하여 PCB 52에 의해 생성된 활성산소의 인위적인 감소 및 제거 여부를 알아보고자 하였다. SK-N-MC 세포가 들어있는 현탁액에 활성산소와 반응하면 형광색을 띠게되는 상업용 DCFH-DA를 먼저 넣어 20 분간 반응 시켜서 DCFH-DA가 DCFH 형태로 변하게 하였다.

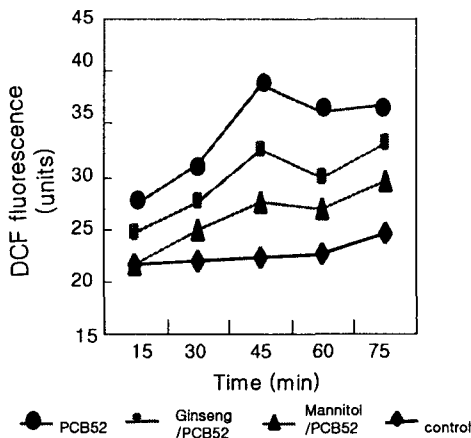


Fig. 8. Effects of extract of ginseng and SOD on ROS generation in SK-N-MC cells exposed to PCB 52. Cell suspensions were loaded with DCFH-DA for 20 min and then ginseng (200 $\mu\text{g/ml}$) or SOD (400 U/ml) were added in the presence of PCB 52. DCF fluorescence was monitored every 15 min over 75 min period.

그 후 인삼 200 $\mu\text{g/ml}$ 과 SOD 400 U/ml를 각각 투여한 후 5 분간 더 반응시켰다. 여기에 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 PCB 52를 현탁액에 투여한 후 15 분 단위로 75 분간 DCF 형광물질의 검출량을 spectrofluorophotometer로 측정하였다. 그 결과 PCB 52를 단독 투여한 대조군에서는 아무것도 처리하지 않은 정상군에 비해서 시간에 따른 형광의 변화가 점점 높아져 활성산소종의 생성량이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 8). 그러나 대조군에 비교하여 PCB 52와 인삼 또는 SOD를 함께 투여한 실험군에서는 DCF 형광물질의 양이 감소하여 활성산소종의 생성이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 8). 특히 400 U/ml 농도의 SOD를 처리한 실험군에서 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 인삼을 처리한 실험군보다 활성산소의 감소 비율이 많았으며, 활성산소 제거제의 기능을 갖춘 두 종류 모두에서 활성산소의 발생 비율을 정상군 수준으로는 회복시키지 못하였다(Fig. 8).

고 찰

환경 호르몬 (내분비계 장애물질)이란 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 화학물질 (endocrine disruptors)로서 환경 중 배출된 화학물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다. 내분비계 장애물질로 알려진 물질의 대부분은 산업용 화학물질이 차지하고 있으며, 그밖에 에스트로젠 기능약물, 식물에서 생산되는 식물성 에스트로젠 등이 포함된다. 이들 내분비계 장애물질은 생태계 및 인간의 생식기능저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 물질로 추정되고 있으며 생태계 및 인간의 호르몬계에 영향을 미쳐 전세계적으로 생물 종에 위협이 될 수 있다는 경각심을 일으켜 오존층 파괴, 지구온난화 문제와 함께 세계 3대 환경문제로 등장하였다^{22,23}. 미국 등 주요선진국에선 이미 환경호르몬의 폐해에 대한 대책을 세우기 위해서 많은 연구를 하고 있으며, 우리도 우리의 후손을 위하여 각자가 환경호르몬에 대하여 지대한 관심을 기울일 필요가 있을 것이다. 지금 분명한 것은, 우리의 산업화가 엄청나게 진행된 상태이고 그에 따른 폐해를 절대 무시 못한다는 것이다. 우리가 일상적으로 대하고 있는 달걀, 우유, 닭, 돼지 등에서도 소량이지만 환경호르몬 의심물질이 항상 있고, 이와 같이 환경호르몬은 인간 몸 속에도 필연적으로 누적될 수밖에 없다는 것이다. 이처럼 우리가 늘 접하는 음식과 물건에 대해서도 다시 한번씩 생각해보는 기회를 가져야 할만큼 위기의 시대를 살아가는 우리들은 가급적이면 환경호르몬의 폐해(기형유발, 발암, 암수변이 등)가 우리의 후손에게 가급적 조금이라도 미치지 않도록 노력해야 할 것이다.

본 연구에서는 내분비교란물질이 뇌의 퇴행성 진행에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고 oxidative stress 관련 기전을 규명하고자 하였다. 이를 위해 환경호르몬의 일종인 PCB 52를 사람의 뇌에서 유래한 neuronal SK-N-MC 세포에 투여한 후 산화산물의 증가에 의한 oxidative stress 정도를 조사하고, 이것이 원인이 되어 SK-N-MC 세포의 apoptosis가 촉진되는지를 검토하였다. ROS는 hydrogen peroxide, superoxide anion, single oxygen 및 hydroxyl radical을 포함하며 cell-free system과 in vivo 동물

실험에서 여러 가지 기술적인 방법으로 검출될 수 있었다²⁴). 최근의 연구 자료에 의하면 ROS는 생물학적인 반응의 중요한 중간산물로서, 여러 가지 병리생리화학적 과정에서 세포 손상 및 세포 사멸의 일차적인 원인으로 잘 알려져 왔다²²). 즉, 생체 내 ROS의 과도한 유도는 세포의 oxidative stress 상태를 초래하고 그 결과 lipid peroxidation, DNA damage, 및 protein alteration을 유도한다. 이러한 결과는 gap junction communication의 감소, transcription factors (AP-1, NF- κ B)의 활성화, 세포 내 칼슘 및 pH의 변화를 가져와 세포의 기능을 파괴시킨다^{25,26}). 또한 ROS는 죽상동맥경화증, 암, 심혈관질환, 재관류 손상, 및 뇌질환과 같은 질병에 관련되어 있음이 밝혀지고 있다^{27,28}). 더욱 최근 ROS는 programmed cell death의 주요한 기전이 될 수 있음이 밝혀졌으므로^{29,30}), PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포의 apoptotic 세포 사멸이 oxidative stress에 의해 영향을 받은 것인지를 조사하기 위해 PCB 52 투여 후 산화산물의 증가정도와 lipid peroxidation의 변화를 조사하였다. 그림 1에서 보듯이 PCB 52의 투여 농도와 반응시간에 따라 활성산소와 결합한 DCF 형광물질의 양이 늘어나는 결과를 볼 수 있었고, 최고 120분까지 모든 처리군에서 대조군보다는 높은 수치를 나타내는 결과는 PCB 52에 의해 활성산소의 발생량이 증가하여 oxidative stress가 일어나고 있음을 뒷받침해 준다. 또한 그림 2에서 보듯이 PCB 52의 투여 농도에 따라 24시간 후 lipid peroxidation의 결과로서 나타난 부산물인 MDA의 발생량을 측정해 본 결과 20 μ g/ml 농도까지는 MDA 발생량이 증가하다가 25 μ g/ml부터는 발생량이 줄어들면서 30 μ g/ml에서는 대조군의 수치보다도 오히려 줄어들었다. 이러한 결과는 적정 수준의 세포생존이 있는 실험군에서는 MDA 값이 계속 증가하다가 PCB 52의 세포독성에 의해 세포사멸이 많이 일어난 그룹에서는 절대적인 값이 평균에 미치지 못하기 때문에 대조군보다도 MDA 수치가 적은 것으로 생각된다. 이러한 사실은 PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포가 apoptotic cell death를 진행하는 것은 과도한 ROS의 증가에 의한 oxidative stress가 원인이 되었으며, 최후의 신호기전에 의한 핵 속의 DNA에 까지 영향을 미쳐 결국은 세포의 사멸을 유도한다고 할 수 있다. 생물학적인 계는 병리학적 및 생리학적 변화뿐만 아니라 여러 독성 물질에 노출되어 나타나는 oxidative stress 생성물에 대한 여러 가지 방어기작을 가지고 있다. 이들 기작은 손상 제거와 수선 기작 뿐만 아니라 endogenous antioxidants, 즉 glutathione을 포함한 많은 항산화효소들과 관련이 있다^{31,32}). 본 연구에서는 PCB 52의 적정 수준의 농도에 반응하면 SK-N-MC 세포 내에서 항산화 효소들의 반응기작에 변화가 있을 것이라는 가능성을 추정하기 위하여 실험을 행하였다. 특히, 생체 내에서 발생한 superoxide 자유 라디칼은 자발적인 dismutation에 의해서 분해되기도 하지만 대부분 SOD에 의해서 제거되기 때문에, 자유 라디칼에 의해 유발되는 독성은 SOD 방어기전에 의해 생체를 보호하게 된다. 그러므로 생체내에 이상대사가 발생하면 SOD의 활성도가 증가하게 된다. 본 연구의 실험 결과에서는 PCB 52 투여 후 핵과 세포질에 존재하는 Cu/Zn-SOD³³ 단백질 발현 정도와 활성도 변화에 대한 유의성을 찾아내지는 못하였다(Fig. 3A, B). 추측하건데

미토콘드리아에 존재하는 Mn-SOD³⁴의 활성이 PCB 52의 실험과 관련되어 있을 것으로 생각되지만 실험을 통한 어떠한 결과를 얻지는 못 하였다. 또 다른 항산화효소인 catalase는 세포 내에서 발생하는 hydrogen peroxide를 H₂O와 O로 분해시키는 효소이다. 그러므로 catalase는 생물학적 산화반응 과정에서 생성되는 H₂O₂가 세포막을 손상하는 것로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다. PCB 52를 투여한 후 catalase의 활성도 변화를 측정된 결과 그림 4에서 보여지듯이 시간이 지남에 따라 활성이 증가함을 알 수 있었다. 즉, catalase의 활성이 증가하는 것은 PCB 52의 세포 내 독성이 시간이 지날수록 강해져서 hydrogen peroxide의 생성에 의한 oxidative stress가 발생하고 있으며 이러한 활성산소를 제거하기 위한 세포 내 항산화효소의 방어기작이 나타남을 알 수 있다. 그러나 총 활성산소 중 차지하는 hydrogen peroxide의 비율이 높지 않으므로 catalase의 증가 비율 또한 대조군에 비교하여 그렇게 높지 않은 것으로 사료된다.

인삼의 각종 성분에 대한 생화학적 및 약리학적 작용에 관하여는 현재 많은 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 사포닌(saponin)은 유효성분으로서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다. 최근에 이르러서는 사포닌 이외에도 항암작용이 있는 것으로 알려진 석유에테르(petroleum ether) 추출물, insulin과 같은 작용을 갖는 펩티드, 폐놀계 항산화성 물질들이 인삼에서 추출된 것으로 보고되고 있어서 인삼 사포닌과 더불어 유효성분으로서 크게 기대된다. 특히 인삼에서 γ -pyrone 유도체를 추출하여 이것이 in vivo에서 항산화작용을 나타냄으로서 인삼은 노화방지에 효능이 있음을 보고하였고³⁵), 인삼의 에탄올 및 에틸에테르 추출물 또한 항산화작용이 있다고 하였으며³⁶), 홍삼이 백삼에 비하여 항산화작용이 강하다고 보고한 바 있다³⁷). 그러나 인삼의 항산화물질의 본태를 파악하기에는 아직도 많은 연구가 기대되는 실정이지만 본 연구에서는 우리나라 고유의 건강 식품인 인삼이 PCB 52에 의해 유발되는 세포독성을 억제하는지를 알아보려 하였다. 먼저 이 실험을 위해서는 PCB 52에 의해서만 독성이 유발되어야 하므로, 인삼에 의해서 세포독성을 일으키지 않는 농도 범위를 알아야 한다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 인삼 단독으로 SK-N-MC 세포에 독성을 유발하는 경우는 200 μ g/ml 농도 이상으로 24시간 동안 세포를 배양할 경우 나타날 수 있으므로 본 실험을 위해서는 200 μ g/ml 이하의 농도로 사용하였다. 인삼 물 추출물을 이용하여 PCB 52에 의해 유도되는 세포사멸을 감소시키는지 알아본 결과, 그림 6에서 볼 수 있듯이 인삼농도가 200 μ g/ml까지는 인삼 농도에 의존하여 PCB 52로 유도되는 세포사멸을 억제하였다. 이 결과를 뒷받침하기 위해서 세포사멸이 증가할 경우 단백질 분해가 유도되는 beta-catenin을 대상으로 인삼을 처리할 경우 단백질 분해가 감소하는지를 조사해 보았다. 그 결과를 그림 7과 같이 western blot으로 확인해 본 결과, 인삼 농도에 의존적으로 beta-catenin의 분해가 회복되었으며, 높은 인삼 농도에서는 거의 정상적인 수준까지 회복되는 것을 살펴보았다. 이는 곧 인삼이 환경호르몬인 PCB 52에 의해 유도되는 뇌신경 세포의 퇴행성에 좋은 영향을 미칠 수 있음을 시사한 것이다. 인삼에 의한 세포독성의

감소가 인삼이 가지는 항산화작용에 의한 것인지를 알아보기 위하여 PCB 52를 투여한 그룹과 PCB 52와 인삼을 혼합 투여한 그룹사이에서 발생하는 ROS 양을 비교해 보았다. 항산화제인 SOD를 positive control group으로 이용하였고, PCB 52와 함께 투여했을 때 정상군보다는 DCF 형광물질의 양이 높게 측정되었지만, PCB 52 단독 투여한 그룹보다는 낮게 측정된 그림 8의 결과는 PCB 52에 의해 발생된 활성산소의 양을 인삼이 감소시키는 것임을 알 수 있었다. 이런 결과는 SOD의 경우와 일치하는 결과로서 oxidative stress를 감소시키는 작용으로 해석할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구의 목적은 환경호르몬으로 알려져 있는 PCB 52를 이용하여 사람의 뇌로부터 유래한 신경세포인 SK-N-MC 세포에서의 산화산물의 증가가 진행되는지를 먼저 알아보고 이것이 원인으로 하여 세포 내에서 독성을 유발하고 세포고사가 초래되는 기전을 밝히고자 한 것이다. 또한 PCB 52에 의해서 유도되는 세포사멸이 인삼에 의해서 억제될 수 있는지를 조사하였고 그 기전이 인삼의 항산화 효과와 관련된 것인지를 규명하고자 하였다. 활성산소의 형성은 PCB 52를 5, 10, 및 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 투여로 45분까지는 농도가 높을수록 활성산소의 발생량이 증가하였고, 그 이후에는 활성산소 발생량의 상대적인 수치가 감소하는 경향을 보여주었으며, PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포는 초기에 활성산소가 발생함을 알 수 있었다. PCB 52를 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 투여한 후 24시간 동안 배양했을 때 MDA의 발생량이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 그리고, PCB 52 투여 후 Cu/Zn-SOD의 활성도는 대조군과 비교하여 실험군들에서 별 차이점을 보이지 않았으며, PCB 52를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 투여한 후 24시간동안 배양했을 때 catalase의 활성도가 대조군에 비하여 2 배 이상의 증가를 보였다. 인삼추출물은 최고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 24시간 배양 시 SK-N-MC 세포에 세포독성을 유발하지 않았으며, 25 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 PCB 52로 초래되는 SK-N-MC 세포의 세포사멸을 농도 의존적으로 감소시켰고, PCB 52에 노출된 SK-N-MC 세포는 beta-catenin의 가수분해가 증가하였으나, 인삼추출물에 의해서 가수분해가 억제되었으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 고농도에서는 거의 정상수준으로 회복되었다. 인삼추출물은 PCB 52를 투여한 그룹에서 활성산소의 발생량을 크게 감소시켰다.

이상의 결과를 볼 때 PCB 52는 활성산소 등으로 유발되는 사람 뇌의 퇴행성 변화에 관련이 있을 것으로 생각되며, 인삼추출물이 PCB 52에 의해 유도되는 뇌의 퇴행성 변화를 억제시킬 수 있음을 암시한다.

감사의 글

이 논문의 일부는 2001년도 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(PJ9-PG1-01CO04-0002)과 2000년 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 이카타 요시토, 환경호르몬, 서울, 아카데미서적, pp 13-14
2. Safe, S. H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, 87-149, 1994.
3. Swanson, G. M., Ratcliffe, H. E., and Fischer, L. J. Human exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs): a critical assessment of the evidence for adverse health effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 21, 136-150, 1995.
4. WHO/Europe. PCBs, PCDDs, and PCDFs in Breast Milk: assessment of Health Risk. *Environmental Health Series* 29, 1998.
5. Peterson, R. E., Theobald, M. H., Kimmel, G. L. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev.* 46, 283-335, 1993.
6. Colborn, T., vom Saal, F. S., and Soto, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 378-384, 1993.
7. Aruoma, O. I., Kaur, H., and Halliwell, B. Oxygen free radicals and human diseases. *J. Roy. Soc. Health* 111, 172-177, 1991.
8. Diplock, A. T. Antioxidant nutrient and disease prevention: an over view. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 189-192, 1991.
9. Fahn, S., and Cohen, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32, 804-812, 1992.
10. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724, 1994.
11. Zang, J. T., Qu, Z. W., Liu, Y., and Deng, H. L. Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1. *Clin. Med. J.* 103, 932-938, 1990.
12. Chung, Y. H., Kim, K. W., and Oura, H. Effects of ginsenoside Rb2 on the anti-oxidants in senescence-accelerated mice (SAM-R/1). *Proc. 6th Int'l Ginseng Korea Ginseng and Tobacco Research Institute*, 30-32, 1993.
13. Wang, D. H., Ishi, K., Zhen, K., and Taketa, K. Enhanced liver injury in actatasemic mice following expose to carbontetrachloride. *Arch. Toxicol.* 70, 189-194, 1994.
14. Kim, H. S., Kang, J. K., Seong, Y. H., Nam, K. Y., and Oh, K. W. Blockade by ginseng total saponin of the development of cocaine induced reverse tolerance and dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharm. Biochem. Behav.* 50, 23-27, 1995.
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. T. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
16. LeBel, C. P., Bondy, S. C. Sensitive and rapid quantitation

- of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. *Neurochem. Int.* 17, 435-440, 1990.
17. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., and Yagi, K. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. *Clin. Chim. Acta.* 79, 267-770, 1977.
 18. McCord, J. R., Colby, M. D., and Fridovich, I. Superoxide dismutase, Enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 231, 6049-6055, 1972.
 19. Aebi, H. Catalase. In *methods of enzymatic analysis.* Bergmeyer, H., Bergmeyer, J., Gral, M. Eds., 3rd. ed. Verlag Chemie. 3, 273-286, 1983.
 20. Freeman, B. A., and Crapo, J. D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47, 412-426, 1982.
 21. Stohs, S. J., Hawwan, M. Q., and Murrau, W. J. Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 854-859, 1983.
 22. Halliwell, B., and Cross, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.* 102, 5-12., 1994.
 23. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now. *J. Lab. Clin. Med.* 119, 598-620, 1992.
 24. Shi, X., Castranova, V., Halliwell, B., and Vallyathan, V. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health Part B.* 1, 181-197, 1998.
 25. Klaunig, J. E. Alterations in intercellular communication during the stage of promotion. *Soc. Exp. Biol. Med.* 102, 688-692, 1991,
 26. Schmidt, K., Amstad, P., Ceruti, P., and Baeuerle, P. The role of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-KB. *Chem. Biol.* 2, 13-22, 1995.
 27. Sparrow, C. P., Doebber, T. W., Olszewski, J., Wu, M. S., Ventre, J., Stevens, K. A., and Chao, Y. S. Low density lipoprotein is protected from oxidation and the progression of atherosclerosis is slowed in cholesterol-fed rabbits by the antioxidant N,N'-diphenyl-phenylenediamine. *J. Clin. Invest.* 89, 1885-1891, 1992.
 28. Caraceni, P., Rosenblum, E. R., Van, T. D., and Borle, A. B. Reoxygenation injury in isolated rat hepatocytes: Relation to oxygen free radicals and lipid peroxidation. *Am. J. Physiol.* 266, G799-G806, 1994.
 29. Lander, H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 11, 118-124, 1997.
 30. Schulze-Osthoff, K., Bauer, M. K. A., Vogt, M., and Wasselborg, S. Oxidative stress and signal transduction. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 67, 336-342, 1997.
 31. Davies, K. J. A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, G. G. Eds. *Free radicals and Oxidative Stress: Environmental, Drugs, and Food Additives.* Portland Press, London, pp. 7-18, 1995.
 32. Martinez-Cayuela, M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.* 77, 147-161, 1995.
 33. McCord, J. M., and Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055, 1969.
 34. Weisiger, R. A., and Fridovich, I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial location. *J. Biol. Chem.* 248, 4793-4796, 1973.
 35. Choi, J. H., and Oh, S. K. Studies on the anti-aging action of Korean ginseng (I): comparative study of red and white ginsengs on anti-aging action. *Korean J. Food and Nutrition* 12, 323-335, 1983.
 36. Paik, T. H., Hong, J. T., and Hong, S. Y. Studies on the antioxygenic substances in Panax ginseng roots. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 130-135, 1982.
 37. Choi, K.-J., Kim, M.-W., Hong, S.-K., and Kim, D.-H. Effect of solvents on the yield, brown color intensity, UV absorbance, reducing and antioxidant activities of extracts from white and red ginseng. *J. Korean agricultural chemical society* 26, 8-18, 1983.