

# Hydrogen Peroxide에 의해 유도된 남성생식세포의 세포독성에 미치는 鎖陽의 효과

오명숙<sup>1)</sup>, 김도림<sup>1)</sup>, 양웅모<sup>1)</sup>, 장문석<sup>2)</sup>, 박수연<sup>3)</sup>, 강순아<sup>4)</sup>, 박성규<sup>1)</sup>  
경희대학교 한의과대학 방제학교실<sup>1)</sup>, 하버드대학교 의과대학 소아병원<sup>2)</sup>, 경희대학교  
체육과학연구소<sup>3)</sup>, 건국대학교 응용생물화학과 생명분자정보학센터<sup>4)</sup>

## Abstract

### Protective effect of Cynomorii Herba extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity

Myung Sook Oh<sup>1)</sup>, Do Rim Kim<sup>1)</sup>, Woong Mo Yang<sup>1)</sup>,  
Mun Seog Chang<sup>2)</sup>, Soo Yeon Park<sup>3)</sup>, Soon Ah Kang<sup>4)</sup>, Seong Kyu Park<sup>1)</sup>  
Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, #1  
Hoeki-dong Dongdaemoon-gu, Seoul 130-701, Korea<sup>1)</sup>  
Dept. of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard Medical School<sup>2)</sup>  
Research institute of Physical education, Kyung Hee Univ.<sup>3)</sup>  
Dept. of Applied Biology & Chemistry, Konkuk University<sup>4)</sup>

The purpose of this study is to examine the protective effect of Cynomorii herba on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in male germ cells. The effects were studied by a modified MTT assay. Hydrogen peroxide significantly induced cytotoxicity in GC-1 spg cells, and co-treatment or pre-treatment of Cynomorii herba extract has reduced the cytotoxicity in a dose dependant manner. These results suggest that Cynomorii herba extract increases

---

교신저자 : 박 성 규

130-701 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 방제학교실

Tel: 02-961-0330, Fax: 02-961-0536, E-mail: cervus@chol.com)

접수 : 2004/ 12/ 02 채택 : 2004/ 12/ 10

the survival rate of GC-1 spg cells through the antioxidant effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity.

**Key Word** : Cynomorii herba, MTT assay, Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cytotoxicity, GC-1 spg cells

## I. 緒 論

鎖陽은 鎖陽科 (Cynomoraceae)에 속한 多年生 肉質寄生 草本인 쇠양 *Cynomorium songaricum* RUPR.의 肉質莖을 건조한 것이다<sup>1)</sup>.

鎖陽은 味가 甘하고, 性은 溫, 無毒하며, 脾, 腎, 大腸經으로 歸經한다<sup>2)</sup>. 補腎壯陽, 益精血, 潤腸通便의 효능으로 腎虛陽痿, 遺精早泄, 下肢痿軟, 虛人便秘 등의 증상에 사용한다. 《本草衍義補遺》에 처음 기재되었으며, 이후 여러 本草書에 수록되어져 왔다. 그 主治와 效能에 대하여 《本草原始》에 “補陰血虛火, 興陽固精, 強陰益髓”, 《內蒙古中草藥》에 “治陽痿遺精, 腰腿酸軟, 神經衰弱, 老年便秘”, 《本草衍義補遺》에 “補陰氣, 治虛而大便燥結用”, 《本草綱目》에 “潤燥養筋, 治痿弱” 이라 기재되어 있다<sup>1)</sup>.

鎖陽의 성분은 全草에 cynoterepene, acetylursolic acid, ursolic acid가 포함되어 있고, 脂肪酸에 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, β-sitosterol, campesterol, β-sitosterol palmitate, daucosterol, aspartic acid, proline, serine, alanine 등이 포함되어 있다<sup>3,4)</sup>. 이 외에 K, Na, Fe, Mn, Zn 등 15종의 금속원소와 가용성 무기물 등이 함유되어 있다<sup>5)</sup>.

鎖陽의 약리작용과 관련하여 체내 free

radical의 소거효과가 있어 superoxide dismutase (SOD) 활성을 촉진하고 lipid peroxide (LPO)의 생성을 저해하는 작용이 밝혀졌다<sup>2)</sup>. 또한 潤腸通便의 효능에 대하여 위장운동을 증강시키고 장관운동을 촉진하는 작용과<sup>5)</sup> 이 외에 면역력 증진, 혈소판 응집 억제와 항혈전 작용 및 내분비 계통에 대한 작용이 보고되어 있다<sup>5)</sup>. 그러나 鎖陽이 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포 (spermatogonia) 등 생식세포에 미치는 산화 스트레스의 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다.

이에 鎖陽이 생식세포의 일종인 GC-1 spg cell에 미치는 항산화작용을 hydrogen peroxide에 의해 유도된 산화 스트레스에 대한 GC-1 spg cell의 생존율에 미치는 변화를 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 시약 및 기기

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL사 (USA)에서 구입되어 사용되었으며, 그 외 ethanol (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2

-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporatory (Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

## 2. 약재 및 시료의 제조

### 1) 약재

본 실험에서 사용된 鎭陽은 쇠양 *Cynomorium songaricum* Rupr.으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 방제학교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 방제학 교실에 보관하였다.

### 2) 시료의 제조

쇠양 50 g을 정확하게 중량을 측정하고 환류추출기에 1차 증류수 1,000 ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 15.6 g을 얻었으며, 수율은 31.2%이었다.

## 3. Cell line 및 culture

### 1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 GC-1 spg (spermatogonia, mouse)로서 America Tissue Cell Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다.

### 2) 세포 배양

GC-1 spg cell line은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. GC-1 은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37 °C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양 하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 4. MTT assay

시료의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann (1983), Kotnik (1990) 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다<sup>6,7)</sup>.

### 1) 약재 동시처리

96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고

배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ 와 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 각각의 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 남은 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu\text{l}$  처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times A_T / A_C,$$

$A_C$  ; absorbance of control,

$A_T$  ; absorbance of tested extract solution.

## 2) 약제 전처리

96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ 와 동량의 media를 처리 후 18시간 동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20  $\mu\text{l}$ 씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu\text{l}$  처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate

spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times A_T / A_C,$$

$A_C$  ; absorbance of control,

$A_T$  ; absorbance of tested extract solution.

## 5. 통계처리

실험성적은 평균치  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's *t*-test로 검정하여  $p < 0.05$ 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## Ⅲ. 實驗 結果

### 1. 쇄양과 hydrogen peroxide의 동시처리에 대한 항산화효과 측정

쇄양의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 측정하기 위해 시료 10, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ 와 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 24시간 동안 동시배양하였다. Hydrogen peroxide만 처리된 군에서는 cell viability가 20.7%로서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.001$ ). Hydrogen peroxide와 시료가 동시에 처리된 군에서는 10, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 21.8%, 24.6%, 28.9%, 39.1%, 57.2%로 cell viability가 농도 의존적으로 증가되었다. 특히 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 hydrogen peroxide만 처리된 군에 비해 cell viability가 200%이상 증가되어 높은 항산화 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

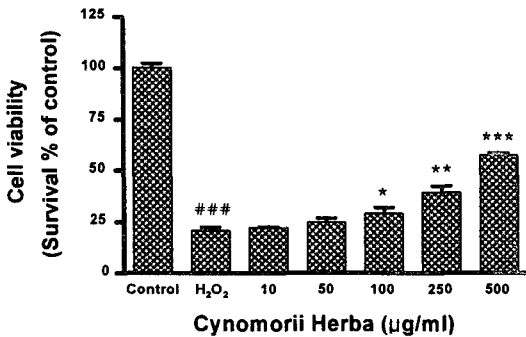


Fig. 1. Protective effect of aqueous extract from Cynomorii herba on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. GC-1 spg cells treated were incubated with 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of Cynomorii herba at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean value ± S.E. (n = 6). # Significantly different from the control value (###: p<0.001) and \* Significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001)

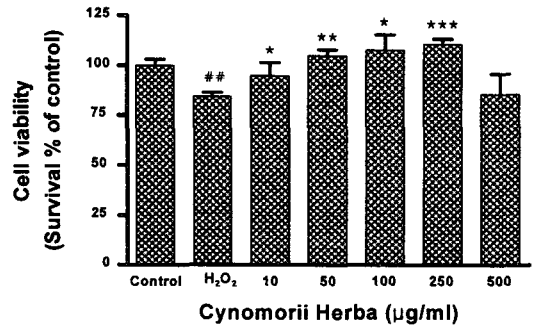


Fig. 2. Preventive effect of aqueous extract from Cynomorii herba on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. GC-1 spg cells were incubated in the presence or absence of Cynomorii herba at 37 °C for 18 h. Cells were exposed to 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 h. Each column or point represents the mean value ± S.E (n = 6). # Significantly different from the control value (##: p<0.01) and \* Significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 and \*\*\*: p<0.001)

## 2. 쇠양 전처리 후 hydrogen peroxide 처리에 대한 항산화효과 측정

쇠양의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 예방효과를 측정하기 위해 시료 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml를 18시간동안 배양한 후 200 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. Hydrogen peroxide만 처리된 군에서는 cell viability가 84.4%로서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (p<0.01). 쇠양을 전처리한 후 hydrogen peroxide을 처리한 군에서는 10, 50, 100, 250 µg/ml에서 94.8%, 104.8%, 107.6%, 110.6%로 cell viability가 농도 의존적으로 증가되었다. 반면 500 µg/ml의 농도에서는 cell viability가 감소되어 거의 hydrogen peroxide만 처리된 군의 수치를 보였고, 통계적으로도 유의하지 않았다 (Fig. 2).

## IV. 考 察

정자는 정세관에서 정모세포의 감수분열에 의하여 형성되게 된다. 정세관 (seminiferous tubule)은 정소 중격 (septula testis)에 의해 구분된 수개의 소엽 (lobule)내에 나선형으로 배치되어 있고 정세관 사이에는 결합조직으로 채워져 있으며 여기에 leydig 세포가 집단으로 분포하고 정세관은 기저막 (basement membrane)에 의하여 결합조직과 정세관의 생식상피 (germinal epithelium)로 구분된다. 생식상피의 기저막에 따라 분포된 정원세포 (spermatogonia)가 1 또는 2층으로 구성되고 그 위에 제 1 정모세포 (primary spermatocyte), 제 2 정모세포 (second spermatocyte), 정자세포 (sperm-

atid) 및 정자 (spermatozoon)로 구성되어 있으며 이들 세포 사이에 지지 및 영양공급 기능을 하는 sertoli 세포로 구성되어 있다<sup>8)</sup>. 이러한 정세관의 생식상피 내 정모세포는 감수분열에 의하여 정자가 형성되게 되며 이러한 과정은 생식상피에서 끊임없이 일어나고 있으며 정조세포에서 정자로 분화 성숙되는 기간을 정자 형성기간 (duration of spermatogenesis)이라 한다.

정자형성과정 (spermatogenesis)은 체세포 분열과 감수분열 단계, 그리고 정자로의 분화 (spermiogenesis) 등을 포함하는 복잡한 과정을 포함하고 있다. 세포 내 항산화성 능력과 redox potential은 oxidative stress로부터 세포를 보호하는데 필수적임을 알 수 있는데, 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포 및 sertoli 세포 등 생식세포들도 산화 스트레스에 민감한 반응을 보이며, 심각한 경우 불임까지 초래할 수 있다는 보고가 있다<sup>9)</sup>. 특히, 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 흥미로운 보고는 이들 샘플에서 고농도의 reactive oxygen species (ROS)가 관찰되는 경우가 있다는 점이다. 전립선염이나 다른 감염질환 등은 염증을 초래하게 되는데 이들은 정자의 질이나 생존력에 영향을 줌으로서 불임의 원인이 될 수 있으며<sup>10)</sup>, 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다<sup>11)</sup>. 이러한 요인들은 정자의 운동성 및 acrosome membranes에 손상을 가져오며, 몇몇의 환자의 경우는 seminal plasma에서 antioxidant scavengers가 결핍되어 있는 것으로 보고되었다<sup>12)</sup>.

그 밖에도  $O_2^-$  등에 의한 ROS 생성과 이에 대항하는 세포 내 방어체계로서 항산

화 효소 및 glutathione (GSH)과 같은 thiol redox potential이 세포사멸을 방지하는데 중요하다는 많은 보고가 있다<sup>13,14,15,16)</sup>. 세포수준에서 산화물에 의한 손상은 세포 분열에서부터 성장 억제, 세포 노화 및 세포 사멸에 이르기까지 다양한 반응을 유도한다. 최근의 보고들에 의하면 oxidative stress를 야기하는 oxidant들이 세포 내 신호전달 체계 (signal transduction)를 통해 유전자 발현에 영향을 미치며 세포는 이러한 산화적 독성으로부터 적응을 위해 다양한 반응성을 나타낸다<sup>17)</sup>. 실제로  $H_2O_2$ 는 cytochrome C 의존적인 방법과 lysosome을 매개로 하는 경로, 그리고 poly (ADP-ribose) polymerase-p53 pathway를 통해 Jurkat T lymphocytes, HL60 cells, human airway epithelial cells 등에서 apoptosis를 유발한다고 보고되었다<sup>18,19)</sup>. 또한 전사조절인자인 AP-1이 세포내의 redox balance 및 oxidative stress에 민감하게 반응하는 매개체 역할을 함이 다양한 세포 형태에서 입증되었다<sup>20,21)</sup>.

기존의 실험에서 쇄양이 GC-1 spg cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정할 결과 10-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 GC-1 spg cell에 대하여 농도 의존적으로 세포생존율을 증가시킴이 관찰되었다. 이에 근거하여 쇄양이 GC-1 spg cell에 대한 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하기 위하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. 50  $\mu\text{M}$  Hydrogen peroxide를 쇄양과 24 시간 동시 처리하거나, 쇄양을 전처리한 후 200  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide를 6 시간 처리한 경우 모두 hydrogen peroxide에 의해 GC-1 spg cell에 cytotoxicity가 유발되었다. 이

는 GC-1 spg cell line이 hydrogen peroxide에 의해 apoptosis가 유도됨을 의미한다. 쇄양과 hydrogen peroxide가 동시에 처리된 군은 농도 의존적으로 cell viability가 증가되어 쇄양이 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성을 보호하는 효과가 있음을 보여 주었다. 특히 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 hydrogen peroxide만 처리된 군에 비해 cell viability가 각각 189%, 276% 증가되어 높은 항산화 효과를 나타내었다. 쇄양을 전처리 후 고농도의 hydrogen peroxide을 후처리한 경우는 쇄양 농도 10-250  $\mu\text{g/ml}$ 에서 hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성이 현저하게 감소하였다. 250  $\mu\text{g/ml}$ 에서 110.6%로 가장 우수한 효과를 보였으며, hydrogen peroxide만 처리된 군에 비해 cell viability가 131% 증가되었다. 따라서 쇄양은 hydrogen peroxide와 약재를 동시에 처리하거나 전처리한 경우 모두 hydrogen peroxide에 의한 세포독성에 대하여 보호효과가 있었으며, 특히 약재를 전처리한 예방효과 (preventive effect)보다 동시에 처리한 보호 효과 (protective effect)가 우수함이 확인되었다.

## V. 結 論

補腎壯陽의 효능으로 활용되고 있는 鎖陽이 남성불임에 미치는 기전을 밝히기 위하여, 정자 발생과정 상 B type의 정원세포 (spermatogonia)와 제 1정모세포 (primary spermatocytes) 사이에 속하는 GC-1 spg cell에 미치는 항산화작용을 연

구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GC-1 spg cell에 대해 hydrogen peroxide와 쇄양을 동시에 처리한 경우 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가되었으며, 특히 쇄양 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 처리군에서 가장 높고 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.
2. GC-1 spg cell에 대해 쇄양을 전처리한 후 hydrogen peroxide을 후처리 한 경우 10-250  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가되었으며, 특히 쇄양 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 처리군에서 가장 높고 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

따라서 鎖陽은 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대하여 유의성 있는 보호 효과가 있음이 확인 되었다.

## 參 考 文 獻

1. 國家中醫藥管理局 中華本草 編委會. 中華本草, 上海, 上海科學技術出版社, 1999, pp.722-724
2. 鄭虎占 等. 中藥現代研究與應用, 北京, 學苑出版社, 1998, pp.4402-4406
3. 張百舜 等. 中藥材, 北京, 國家醫葯管理局, 1991, p.36
4. 張百舜 等. 中草葯, 北京, 國家醫葯管理局, 1992, p.577
5. 王本祥 等. 現代中藥藥理學, 天津, 天津科學技術出版社, 1997, pp.1272-1273
6. Mosmann T. Rapid colorimetric

- assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63
7. Kotnik V, Fleischmann WR Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *Immunol Methods*. 1990;129(1):23-30
  8. 박영호, 김동윤. 慢性 Ethanol 中毒이 흰쥐 精巢의 精子發生에 미치는 影響. *J. Hanyang Med. Coll.* 1985;5(1):87-90
  9. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, Herr JC. Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J. Reprod Immunol*. 2002;53(1-2):25-36
  10. Ludwig M, Dimitrakov J, Diemer T. Prostatitis syndrome. Changes in the ejaculate and effects on fertility. *Der Urologe A*. 2001;40:18-23
  11. Pasqualotto FF, Sharma RK, Potts JM. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*. 2000;55(6):881-885
  12. Smith R, Vatman D, Ponce J. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Biology of Reproduction*. 1984;30:323-332
  13. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J. Neurobiol*. 1992;23:12
  14. Watson RW. Redox regulation of neutrophil apoptosis. *Antioxid. Redox Signal*. 2002;4:97-104
  15. Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;216(1-2):47-54
  16. Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int. J. Androl*. 2002;25:191-194
  17. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 2002;192(1):1-15
  18. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*. 1997;414:552-556
  19. Ishisaka R, Utsumi K, Utsumi T. Involvement of lysosomal cysteine proteases in hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 2002;66:1865-1872
  20. Pinkus R, Weiner L, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem*. 1996;271:13422-13429
  21. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol* 1997;9:240-246