

# 갈근 메탄올분획의 과산화수소에 의해 유도된 지질과산화와 카드뮴에 대한 독성억제효과 (III)

임진아 · 김연하<sup>1</sup> · 백승화<sup>1\*</sup>

원광보건대학 화장품과학과, 1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

## Inhibitory Effects of the Methanolic Fraction from *Pueraria Radix* on Hydrogen Peroxide-induced Lipid Peroxidation and Cadmium-induced Cytotoxicity(III)

Jin A Lim, Yun Ha Kim<sup>1</sup>, Seung Hwa Baek<sup>1\*</sup>

Department of Cosmetic Science, Wonkwang Health Science.

1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine and Institute of Basic Natural Sciences Wonkwang University

The effects of the methanol subfraction from *Pueraria Radix* on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation and cadmium-induced cytotoxicity were investigated in NIH 3T3 fibroblast cells. After the methanol subfraction treatment, the content of MDA induced by 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly decreased in proportion to the subfraction concentrations as well as 50 μM CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. Especially, 200 μg/mL concentration of methanol subfraction was strongly shown inhibition of lipid peroxidation and detoxification of cadmium. These results suggest that the methanol subfraction from *Pueraria Radix* retains a potential antioxidant and protective effect against cadmium.

Key words : *Pueraria Radix*, lipid peroxidation, antioxidant, cadmium, detoxification

### 서 론

최근 천연물을 이용한 cadmium의 중독예방과 치료에 대한 연구로는 부추와 양파를 이용하여 독성완화에 끼친 영향을 조사하였고<sup>1,2)</sup>, 엽<sup>3)</sup> 등과 이<sup>4)</sup> 등은 cadmium을 마늘과 여러 -SH화합물을 동시 혹은 이후에 투여한 결과 BAL (British Anti Lewisite, 2-3-dimercapto -1-propanol)이나 DMSA (2,3-dimercaptosuccinic acid)를 투여한 군보다 마늘 투여군의 간, 신장 및 고환에서 적은 양의 cadmium이 측정되었다고 보고하였다. 또한 백<sup>5)</sup> 등에 의한 cadmium 축적에 대한 수종 생약재의 해독효과와 토복령<sup>6)</sup>, 산두근<sup>7)</sup>, 녹두<sup>8)</sup> 및 홍화<sup>9)</sup> 등을 이용한 cadmium독성 해독효과에 관한 연구 등 많은 천연물과 한약재를 이용한 cadmium의 해독에 관한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 미비한 실정에 불과하다. ROS (reactive oxygen species)는 지질과산화 (lipid peroxidation),

protein cross-linking 그리고 DNA cleavage 과정을 통해 조직을 손상시키는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>. 조직에서 생성되는 두 주요 ROS는 superoxide anion (O<sup>2-</sup>)와 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)이다<sup>10)</sup>. 특히 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 free radical이 아니고 제한된 반응성 가지고 있으나, O<sup>2-</sup>가 매우 천천히 이동하는 것에 비해 생체막을 바로 가로질러 이동할 수 있기 때문에 병리학적 기전에서 O<sup>2-</sup>보다 더 중요한 원인인자로 알려져 있다<sup>10,11)</sup>. 일반적으로 체내에서 SOD (superoxide dismutase), catalase, peroxidase 등과 같은 효소계와 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화물질은 ROS에 대한 방어기전을 담당하고 있는데, 이상기전으로 인해 과도한 free radical이 생성될 경우 생체내 항상성 유지를 위해 free radical scavenger의 역할을 하는 여러 항산화물질이 널리 사용되고 있다.<sup>12)</sup> 이러한 항산화제로는 α-tocopherol,<sup>13)</sup> butylated hydroxytoluene (BHT),<sup>14)</sup> butylated hydroxyanisole (BHA),<sup>15)</sup> t-butyl hydroxy quinone (TBHQ),<sup>16)</sup> ascorbic acid<sup>17)</sup> 등이 알려져 있으며, 그 중 BHT, BHA 그리고 TBHQ가 변이원성 및 독성이 지적되어 사용량이 제한되면서 최근 안정성과 관상성 문제가 되지 않는 천연물로부터의 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다.<sup>18)</sup>

\* 교신저자 : 백승화, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : shbaek@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6225

· 접수 : 2006/09/26 · 수정 : 2006/10/30 · 채택 : 2006/11/27

취 (*Pueraria thunbergiana* Benth.)은 다년생 덩굴성 목본으로 콩과식물 (Leguminosae)에 속하며, 건조한 뿌리(갈근, *Pueraria Radix*)는 약용 및 식용으로 사용되고 있다. 갈근은 한방생약재로서 고혈압, 관상동맥경화증, 협심증, 노인성당뇨 등에 이용되고 있으며,<sup>19)</sup> 최근 혈압감하작용, 지방의 산화억제작용, 항염작용, 해독작용, 숙취제거의 효과, 항산화작용 및 보간작용 그리고 지질막 보호작용에 대한 연구가 보고되고 있다.<sup>20-25)</sup>

이에 본 연구는 갈근의 메탄올 분획에 대한 전자공여능과 과산화수소에 의해 유도된 지질과산화 저해효과와 카드뮴의 세포독성에 따른 세포생존율을 측정하여 카드뮴 독성에 미치는 영향을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 기기

갈근 (*Pueraria Radix*)은 충남대학교 약학대학에서 음건한 것을 제공받아 외부형태를 검정한 후, blender로 분쇄하여 사용하였다. 갈근을 추출하기 위한 용매는 재증류하여 사용하였고, TLC layer chromatography (TLC)에 이용된 silica gel plate (0.25 mm, polygramasil N-HR/UV254)와 silica gel (Kiesel gel 60, 230-400 mesh)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였으며, Glass column은 47 mm x 800 mm를 사용하였다. NMR spectrophotometer는 JEOL-ECP 500을 사용하였다. 세포배양에 사용된 RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), 그리고 trypsin-EDTA는 Gibco BRL (Life Technologies Inc., U.S.A)제품을 사용하였고, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), DMSO, 2-thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), malondialdehyde (MDA),  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene 그리고 butylated hydroxyanisole (BHA)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였으며, total protein 측정시 약은 BioRad laboratory 제품을 사용하였다.

### 2. 시료의 추출 및 분리

갈근 5.0 kg을 평량한 후, n-hexane을 사용하여 상온에서 stirring하여 추출하였으며, 추출한 추출물은 0.4  $\mu$ m filter로 여과한 후 30°C에서 감압농축하였다. 그런 다음, n-hexane으로 추출한 갈근은 음건하였고, chloroform, ethyl acetate, methanol 순으로 위의 방법과 동일하게 연속 추출하였다. 그런다음, methanol 추출물 20.0 g을 100 mL 둥근 플라스크에 넣고 methanol (20 mL)을 넣어 녹인 후, 실리카겔 40.0 g을 넣어 용매를 감압·증류시켜 실리카겔로 coating시켰다. Coating된 methanol 추출물을 실리카겔 200.0 g이 충전된 column chromatography에 넣어 chloroform과 methanol로 용리시켜 분획을 얻었으며, TLC로 확인하고 용매를 감압농축시켜, fraction 1 (280 mg), fraction 2 (70 mg), fraction 3 (56 mg), fraction 4 (15,760 mg) 그리고 fraction 5 (2,479 mg)을 얻었다. 분획 중 fraction 4의 7,900 mg을 다시 column chromatography에서 chloroform과 methanol로 용리시켜 subfraction 1 (128 mg), subfraction 2 (823 mg), subfraction

3 (3,720 mg) 그리고 subfraction 4 (3,125 mg)을 분리하였으며, subfraction 3을 시료로 사용하였다. 위 실험에서 추출 및 분리의 지표는 추출물과 fraction의 전자공여능을 측정하여 선정하였다.

### 3. 전자공여능의 측정

전자공여능 (electron donating ability)은 Blois의 방법<sup>26)</sup>에 의해 시료를 methanol에 녹인다음, 0.30 mM DPPH 용액을 첨가하고 실온에서 30분간 방치 한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양을 RC50으로 하여 나타냈으며, 기존의 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene과 BHA를 사용하여 분석하였다.

### 4. 세포배양

본 실험에 사용된 NIH 3T3 섬유모세포는 한국세포주은행 (KCLB, Korea)에서 구입하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 세포배양액으로 배양하였다. 약 48 시간을 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하였고, trypsin-EDTA 용액으로 세포를 포집하여 사용하였다.

### 5. 지질과산화물 측정 (TBARS)

세포의 지질과산화는 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 유도되었으며, thiobarbituric acid (TBA)-reactive products로써 동정되었다.<sup>27)</sup> 즉, NHI 3T3 섬유모 세포를 6 well plate에 4 x 10<sup>5</sup> cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양하였다. 갈근의 메탄올 분획을 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL농도로 처리하여 20분간 배양한 후, 600  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 더 배양하였다. 각 well의 cell을 수집하여 PBS에 resuspend하고 ultrasonicator로 균질화시켰다. 그런 다음 5% TCA와 0.67% TBA를 첨가하여 95°C에서 60 분 동안 가열한 후, 냉수에 5분간 냉각하였다. n-Butanol을 첨가하여 혼합한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 분리된 상층액을 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화의 표준물질로는 malondialdehyde (MDA)를 사용하였고 측정결과는 malondialdehyde ( $\mu$ M)/total protein (mg)으로 나타났다.

### 6. Cadmium (Cd) 독성완화 측정

Cd 독성에 미치는 영향을 측정하기 위해, 갈근의 메탄올 분획이 처리된 NIH 3T3 섬유모 세포에 Cd를 첨가하여 세포생존율을 관찰하였다. NIH 3T3 섬유모 세포를 24 well plate에 1 x 10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 갈근의 메탄올 분획을 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL, 200  $\mu$ g/mL농도로 20분간 처리하고, 50  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>를 각 well에 첨가하여 24시간 더 배양한 후, MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 또한 세포의 형태학적 수준에서 카드뮴독성에 대한 갈근의 메탄올 분획이 미치는 효과를 알아보기 위해 광학현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다.

7. 세포독성 측정

세포 생존율을 측정하기 위해서 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 정량법<sup>28)</sup>을 이용하였다. 배양된 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서, MTT (2 mg/mL) 용액을 각 well에 50 µL씩 가하여 4시간 배양하였다. 배양종료시 상등액을 제거한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 용해시켜 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성의 측정은 실험군의 평균 OD값을 구하여 대조군 (100% 생존율)의 평균 OD값에 대한 백분율로 환산하였다.

8. 통계학적 분석

실험결과의 통계학적 처리는 Student's t-test를 사용하여 mean ± S.D.로 계산하였으며, p-value가 0.05미만일 경우 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 갈근의 메탄올 분획의 분석

갈근의 연속추출물 중 methanol 추출물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법으로 2차에 걸쳐 분리되었으며, 분리된 분획에 대하여 DPPH 활성이 우수한 분획의 <sup>1</sup>H-NMR에 대한 분석결과에 의하면 (Table 1), A환의 oxygenated pattern 가운데 5번이 oxygenate 안되고 7번만되면 5-H는 C환의 C=O group의 anisotropic effect로 인하여 8번 proton이 6번 proton보다 low field에서 나타나며, 5-H는 7.9~8.2 ppm 근방에서 나타난다. B환 proton은 A환보다는 high field로 나타나며, 3', 5' proton이 2', 6'보다 high field에 나타난다. 3', 5' proton은 6.8 ppm 근방에 나타나며, 2', 6' proton은 C-2, C-3위치에 double bond로 인하여 더욱 low field로 shift될 수 있었다.<sup>29,30)</sup> Daidzin의 O-glucose는 C-O bond에 기인된 C-1 proton이 5.1 ppm에서 관찰되었으며, puerarin의 C-glucose C-1 proton이 4.8 ppm의 high field에서 나타났다. 이는 C-glucose에 의한 C-C bond의 sp<sup>3</sup>에 기인된 것이며, 3.1~5.2 ppm에서 관찰된 peak는 glucose의 특징적인 peak로 생각된다. 이상의 실험결과를 종합해보면, 갈근의 메탄올 분획은 daidzin과 puerarin 화합물에 의하여 생리활성이 나타나는 것으로 사료된다.

2. 전자공여능 측정

전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 식품 중의 지방질의 산화를 억제하는 목적으로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 인체 내에서 활성라디칼에 의한 노화작용을 억제시키는 작용의 척도로도 이용되고 있다.<sup>31)</sup> 갈근 연속추출물 중 메탄올 추출물의 전자공여능 (IC<sub>50</sub>)은 225.47 µg/mL이었고 silica gel column chromatography에서 chloroform과 methanol로 용리시켜 얻은 fraction 1~5의 IC<sub>50</sub>은 225.61, 242.78, 187.36, 108.81, 441.44 µg/mL의 순으로 나타났으며, 그 중 가장 우수한 fraction 4를 다시 column chromatography에서 chloroform과 methanol로 용리시켜 얻은 subfraction 4-1~4-4의 IC<sub>50</sub>은 263.18, 227.84, 49.69,

215.89 µg/mL로 나타났다(Table 1). 표준물질로 사용된 α-tocopherol, β-carotene과 BHA의 IC<sub>50</sub>은 각각 6.63 µg/mL, 18.02 µg/mL 그리고 18.48 µg/mL으로 나타나 methanol 분획 중 subfraction 3은 효과적인 전자공여능을 보이는 것으로 관찰되었다. 따라서 전자공여능 측정 결과를 토대로 subfraction 3을 본 실험의 실험물질로 사용하였다(Fig. 1).

Table 1. DPPH free radical scavenging activity of methanol extract and each fraction from methanol extract of *Pueraria Radix*.

Mobile phase	Sample	IC <sub>50</sub> * (µg/mL)
	Methanol extract	225.47
0~15 %	Fr. 1	225.61
15~20 %	Fr. 2	242.78
20~30 %	Fr. 3	187.36
30~80 %	Fr. 4	108.81
80~100 %	Fr. 5	441.44
0~25 %	Subfr. 4-1	263.18
25~40 %	Subfr. 4-2	227.84
40~50 %	Subfr. 4-3	49.69
50~100 %	Subfr. 4-4	215.89

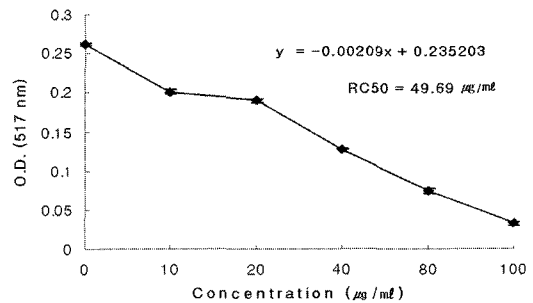


Fig. 1. Electron donating ability of the methanol subfraction from *Pueraria Radix*. The values represent the means±S.D. from triplicate experiments.

3. 지질과산화물 측정

세포의 지질과산화는 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되었으며, TBARs (2-thiobabutaric acid reactive products)수치를 측정하여 MDA 함량으로 나타냈다. 그 결과 대조군에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군의 지질과산화물 (MDA) 함량이 유의성 있게 증가하였으며 (p<0.05), 갈근의 메탄올 분획을 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL농도로 처리했을 때, 100 µg/mL, 200 µg/mL의 농도에서 처리군에 비해 각각 23.45%, 20.77%로 MDA함량이 유의성 있게 감소하였다(p<0.05, Fig. 2). 오 등<sup>21)</sup>이 갈근의 항산화 성분중 isoflavone인 puerarin과 daidzin이 강한 활성을 나타낸다고 보고한 이래, in vivo에서 물추출물을 이용한 지질과산화억제 및 항산화 효소에 미치는 영향 등에 대한 연구가 보고되고 있다<sup>25,32)</sup>. 이러한 결과로 갈근 메탄올 분획 중 함유된 isoflavone 성분이 과산화수소에 의해 유도된 지질과산화를 억제하는 것으로 사료된다.

4. Cadmium (Cd) 독성 경감효과

갈근 메탄올 분획의 Cd 독성 경감 효과를 MTT assay에 의한 세포생존율로 측정한 결과, 대조군에 비해 50 µM CdCl<sub>2</sub>을 처

리한 처리군의 세포 생존율은 55.86%로 나타나 유의성 있게 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ), 갈근의 메탄올 분획을 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리했을 때 처리군에 비해 각각 67.35%, 84.66%, 85.06%로 세포생존율이 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

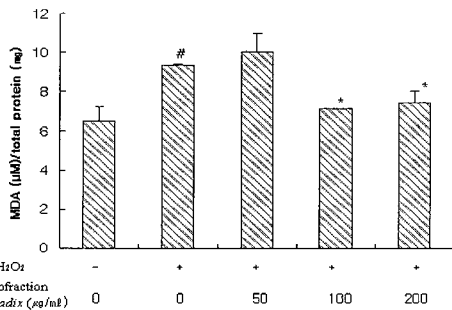


Fig. 2. Effect of the methanol subfraction from *Pueraria radix* on the contents of MDA in NIH 3T3 fibroblast cells treated with 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 hrs. The values represent the means  $\pm$  S.D. from triplicate experiments. <sup>#</sup>Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ). <sup>\*</sup>Significantly different from the 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated group ( $p < 0.05$ ).

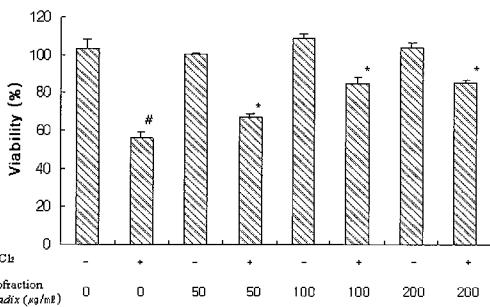


Fig. 3. Effect of methanol subfraction from *Pueraria radix* on cadmium detoxification in NIH 3T3 fibroblast cells treated with 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 hrs. The values represent the means  $\pm$  S.D. from triplicate experiments. <sup>#</sup>Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ). <sup>\*</sup>Significantly different from the 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ -treated group ( $p < 0.05$ ).

최근 정 등<sup>33)</sup>은 카드뮴을 급여한 흰쥐에 갈근 열수추출액을 투여한 결과 카드뮴만을 급여한 흰쥐군과 비교하여 신장내 카드뮴 함량과 GPT 및 LDH 활성도 renin활성도가 유의적으로 감소함을 보임으로써 갈근의 카드뮴 중독작용의 경감효과를 보고하였다. 세포의 형태학적 관찰결과, 대조군은 NIH 3T3 섬유모 세포들이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며 부착되어 있었으나(Fig. 4-A), 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ 를 처리한 처리군에서는 세포수가 감소하였고 세포질이 응축되거나 수축, 또는 불규칙한 모양의 세포양상이 관찰되었다 (Fig. 4-B). 갈근의 메탄올 분획을 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리한 후, 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ 를 처리한 군에서는 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  처리군에 비하여 농도와 비례하여 세포수가 증가하였고 세포의 형태학적 손상도 적었으며, 재생현상이 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 4-C, D, E). 더불어 갈근의 메탄올 분획의 각 농도에 대한 세포독성은 미미한 것을 언급하며, 위의 결과로써 갈근의 메탄올 분획이 카드뮴에 대한 세포독성을 경감시키는 것으로 사료된다.

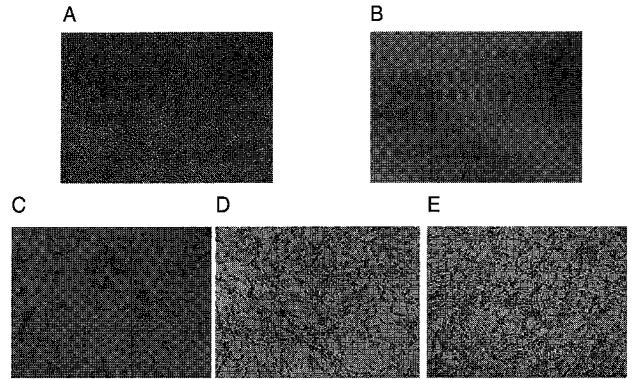


Fig. 4. Morphological changes of cadmium-treated cell by addition of methanol subfraction from *Pueraria radix*. NIH 3T3 fibroblast cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS in the absence (A) and presence (B) of 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . After the methanol subfraction of *Pueraria radix* was added with 50  $\mu\text{g/mL}$  (C), 100  $\mu\text{g/mL}$  (D) and 200  $\mu\text{g/mL}$  (E), NIH 3T3 fibroblast cells were incubated in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS containing 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ .

## 결론

갈근 (*Pueraria Radix*)의 메탄올 분획이 NIH 3T3 섬유모세포의 지질과산화와 카드뮴 독성에 미치는 영향을 실험한 결과, 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  처리군의 지질과산화물 (MDA) 함량은 대조군 보다 유의성 있게 증가하였으며 ( $p < 0.05$ ), 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 갈근의 메탄올 분획을 처리했을 때 MDA 농도는 처리군에 비해 23.45%, 20.77%로 유의성 있게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 또한 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  처리로 카드뮴 독성을 유발한 후 cell viability를 측정 한 결과, 카드뮴이 처리된 처리군은 대조군보다 55.86%로 유의성 있게 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ), 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 갈근의 메탄올 분획을 처리했을 때 처리군에 비해 각각 67.35%, 84.66%, 85.06%로 cell viability가 유의성 있게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 이와 같은 결과는 갈근의 메탄올 분획이 과산화수소에 의해 유도된 지질과산화를 억제할 뿐만 아니라, 카드뮴에 의한 독성을 경감시키는 것으로 생각되어 항산화제나 중금속 독성 경감효과를 위한 천연물제재로서 이용 가능하리라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 원광대학교 2006년도 교비연구비의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 안영미. 흰쥐의 카드뮴 독성에 대한 부추(*Allium odorum* L.)의 방어효과에 관한 연구. 명지대학교 박사학위논문, 1990.
2. 정우일. Mouse의 간과 신장에 흡수되는 카드뮴에 대한 differential pluse stripping polarography 분석. 원광대학교 대학원 석사학위 논문, 1989.
3. 엄순택, 손동민, 차철환. 백서(白鼠)의 카드뮴 중독시 BAL 및 DMSA와 마늘의 방어효과에 대한 비교 연구. 고대의대 논문집 23 p 109, 1986.
4. 이영옥, 차철환. 白鼠의 카드뮴 중독시 마늘, D-penicillamine

- 및 N-acetyl-DL-penicillamine의 방어효과에 관한 연구. 고대 의대 논문집 23, p 43, 1986.
5. 한두석, 유일수, 이종섭, 백승화. 마우스 장기내의 카드뮴 축적에 미치는 수중 생약의 영향. 한국독성학회지 10(2):169-174, 1994.
  6. 강성호. 토복령(土茯苓)추출액이 흰쥐장기에서 카드뮴독성 해독에 미치는 효과. 원광대학교 대학원 석사논문, 1995
  7. 정경진. 산두근(山豆根)추출액이 흰쥐의 급성 카드뮴 중독에 대한 해독 효과. 원광대학교 대학원 박사논문, 1994.
  8. 지정옥. 녹두(綠豆) 전탕액이 랫드의 장기 조직내 카드뮴 독성 해독에 관한 연구. 대한예방의학학회지 2(1):175-192, 1998.
  9. 손인환, 길인호, 이종섭, 이기남. 홍화추출액의 카드뮴 독성 해독효과 연구. 한국전통한의학회지 8(2):86-94, 1998.
  10. Gao, Z., Huang, K., Xu, H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria Baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacol. Res.* 43(2):173-178, 2001.
  11. Multhaupt, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Masters C.L., Beyreuther, K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 54: 533-539, 1997.
  12. YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74:139-162, 1994.
  13. Farombi, E.O., Adaramoye, O.A., Emerole, G.O. Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: protective role of antioxidants. *Pharmacol. Toxicol.* 91(3):129-134, 2002.
  14. Voskoboynik, A., Reznick, A.Z., Rinkevich, B. Rejuvenescence and extension of an urochordate life span following a single, acute administration of an anti-oxidant, butylated hydroxytoluene. *Mech. Ageing Dev.* 123(9):1203-1210, 2002.
  15. Yu, R., Tan, T.H., Kong, A.T. Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. The role of oxidative stress in the activation of mitogen-activated protein kinases by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* 14, 272(46):28962-28970, 1987.
  16. Lee, J.M., Moehlenkamp, J.D., Hanson, J.M., Johnson, J.A. Nrf2-dependent activation of the antioxidant responsive element by tert-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 280(1):286-292, 2001.
  17. Oliveira, C.P., Kassab, P., Lopasso, F.P., Souza, H.P., Janiszewski, M., Laurindo, F.R., Iriya, K., Laudanna, A.A. Protective effect of ascorbic acid in experimental gastric cancer: reduction of oxidative stress. *World J. Gastroenterol.* 9(3):446-448, 2003.
  18. Kim, S.W., Kim, E.S., Kim, Y.S. Studies on the polysaccharide extracted from *Ganderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24(1):147-153, 1995.
  19. Huh, J. *Donguibogam*, Vol. 3, Namsandang, Seoul, 1984.
  20. Tseng, K., Chon, Y., Chang, L., Fan, L. Pharmacologic studies on *Radix Puerariae*. I. Effects of *Puerariae* on blood pressure, vascular reactivity, cerebral and peripheral circulate in dogs. *Chin. Med. J.* 1(5):335-342, 1975.
  21. Oh, M.J., Lee, K.S., Son, H.Y., Kim, S.Y. Antioxidative components of *Pueraria* root. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22:793-798, 1990.
  22. Han, S.H., Kim, J.B., Min, S.G., Lee, C.H. The effects of *Puerariae* radix catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *Korean J. Soc. Food Nutr.* 24:713-720, 1995.
  23. Lee, J.S., Lee, K.H., Jeong, J.H. Effects of extracts of *Puerariae* radix on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28(1):218-224, 1999.
  24. Guerra, M.C., Speroni, E., Broccocoli, M., Cangini, M., Pasini, P., Minghetti, A., Crespi-Perellino, N., Mirasoli, M., Cantelli-Forti, G., Paolini, M. Comparison between chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sci.* 3, 67(24):2997-3006, 2000.
  25. Lee, M.K., Cho, S.Y., Jang, J.Y., Choi, M.S., Jeon, S.M., Jang, M.K., Kim, M.J., Park, Y.B. Effects of *Puerariae* flos and *Puerariae* radix extract on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats. *American J. Chinese Med.* 29(2):343-354, 2001.
  26. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1199-1200, 1958.
  27. Smith, M.T., Thor, H., Hartzell, P., Orrenius, S. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 31:19-26, 1982.
  28. Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63, 1983.
  29. Lee, S.J., Baek H.J., Lee, C.H., Kim, H.P. Antiinflammatory activity of isoflavonoids from *Pueraria* radix and biochanin A derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 17(1):31-35, 1994.
  30. Kang, S.S. Applications of NMR spectroscopy in analysis of flavonoids. *YAKHAK HOEJI* 26(3):139-148, 1982.
  31. Ha, J.U., Ryu, Y.K., Park, H.J. Nitrite scavenging ability and antioxidative activity of water extract and ethanol extract from *Cassia tora* L. and *Pueraria thunbergiana*. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 21(1):1-9, 2001.
  32. Park, J.H., Lee, Y.H., Cho, J.K., Lee, C.H. Effects of *Puerariae* radix root water extracts on the antioxidative activity in rats. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 19(1):65-71, 1999.
  33. Chung, Y.H., Han, S.H., Shin, M.K. Effects of *Pueraria* radix in water extract on the detoxification in rat administered with cadmium. *Korean J. dietary culture* 17(4):456-464, 2002.