

## The *Camellia sinensis* Inhalation Effects of Pulmonary Structure Protection and Anti-oxidants Enzyme from Cigarette Smoking

Sang Gi Kim<sup>1</sup>, Hyuk Jung<sup>1</sup>, Bo Ae Kim<sup>1</sup>, Yoong Suk Choi<sup>1</sup>, Sang Kook Kim<sup>1</sup>,  
Gui Hyang Choi<sup>1</sup>, Jong Seok Park<sup>2</sup>, Tae Soo Suh<sup>3</sup> and You Young Kim<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea.

<sup>2</sup>Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea.

<sup>3</sup>Department of Physical Therapy, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Cigarette smoke causes atypical structure of pulmonary and oxidative damage. Therefore, we carried out to determine if exposure to cigarette smoke alters pulmonary structure and anti-oxidant related enzyme in a animal model, when natural product extracts using by Nebulizer. The rat were divided into four groups: H<sub>2</sub>O-treated (Control), natural product (*Camellia sinensis*) extracts-treated (CS), natural product extracts-treated with cigarette smoke-exposed (CS+SM) and cigarette smoke-expose (SM). All groups are similar to Control group in weight, but SM group is lower than the other groups. Microscopic image of the pulmonary structure in SM group showed deleterious alterations in the morphology, but the other groups are maintained in normal structure. In anti-oxidant related enzymes, SOD (superoxide dismutase) and catalase, SM group represents the lowest enzyme activity among all groups. But G6PD (glucose-6-phosphate dehydrogenase) and LPO (lipid peroxidation) is SM group represents the highest enzyme activity among all groups. These result indicate that the natural product extracts is an efficient tissue protective substance against smoke-induced lung injury.

**Key Words:** *Camellia sinensis*, Cigarette smoke, Pulmonary, Nebulizer, Morphology, Anti-oxidant

### 서 론

폐는 혈액에 산소의 공급과 이산화탄소의 제거 등 여러 가지 기능을 가지며 유해물질이 유입될 경우 폐질환을 일으킬 뿐 아니라 혈액의 산소 농도 유지에도 영향을 미치게 된다 (Sohn et al., 1985). 대기 중의 아황산가스, 먼지, 황사, 담배연기 등은 여러 기작을 통해 폐의 기능을 손상시키고 혈액을 산성화하여 질병을 발생시킨다 (Song et al., 1989; Kim, 1987). 특히, 담배연기 속에는 약 4,700여종의 화학물질이 들어 있으며 이중에는 돌연변이를 유발하는 발암물질도 포함되어 있고 또한, 타르, 니코틴, 일산화탄소는 생체에 매우 해로운 성분으로 알려져 있다. 타르 속에는 약 43종의 발암 물질을 비롯하여 여러 가지 독성물질이 함유되어 있고, 니코틴은 뇌신경에 작용해서 각성효과를 가져오며, 기체성분 속에 들어 있는 일산화탄소는 혈액의 산소운반능력을 저하시

켜 저산소증을 가져오게 된다 (Park et al., 1998). 따라서 흡연을 하게 되면 담배연기 속에 있는 혼합물질이 호흡기관에 일차적으로 피해를 주며, 폐로 흡수된 화학물질은 체내를 순환하면서 생체 내의 모든 장기에 암을 포함한 각종 질병을 일으킬 뿐 아니라 모든 조직, 세포에 노화현상을 유발시키게 된다 (Noiton, 2003). 일반적으로 흡연에 의해 발생하는 질병으로는 구강암, 후두암, 식도암, 폐암, 뇌졸중, 심혈관 질환, 만성폐쇄성 호흡기 질환 (COPD), 백혈구 증가에 의한 통풍 폐기종, 동맥경화증, 관상동맥질환 등 여러 질병을 유발하는 것으로 보고 되어 있다 (Cerami et al., 1997; Shim et al., 1994). 특히 흡연 시에는 혈액의 산소운반기능 저하와 면역기능 저하를 가져오며 (Noiton, 2003), 폐 세포의 구조가 변하고, 폐의 표면장력을 조절하는 surfactant protein의 변화를 가져 오게 된다. 또한 흡연 시 발생하는 활성산소종 (reactive oxygen species)으로 인하여 폐포의 지방이 과산화되는 반응을 일으킬 뿐만 아니라 활성산소종을 제거하는 반응에 사용되는 SOD (superoxide dismutase), catalase, G6PD (glucose-6-phosphatedehydrogenase) 등 여러 효소에 영향을 미치게 된다 (Gobran et al., 2001; Bridges et al., 2000; Subramaniam et al., 1996).

녹차의 성분은 다당류, 플라보노이드, 카페인, 비타민 B

\*논문 접수: 2006년 7월 25일

수정재접수: 2006년 9월 8일

†교신저자: 김유영, (우) 702-701 대구광역시 북구 산격동, 경북대학교 생화학과

Tel: +82-53-950-6354, Fax: +82-53-943-2762

e-mail: yykim@knu.ac.kr

복합체, 비타민 C, 비타민 E, R-아미노 브티릭산 같은 다양한 유용 성분을 포함하고 있다. 특히, 대표적인 카테킨 화합물은 에피갈로카테킨 (epigallocatechin; EGC), 에피카테킨 (epicatechin; EC), 에피카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate; ECG), 에피갈로카테킨 갈레이트 (epicatechin gallate; EGCG)으로 나눌 수 있다 (Lin et al., 2003; Yang et al., 1993). 일반적인 성분의 생체 내 효과는 혈액의 항산화 방지능력을 증가시키며 흡연 후 녹차 섭취는 DNA 산화를 감소시킨다 (Rietveld et al., 2003). 그리고 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈압상승 억제작용 및 비만세포에 대한 히스타민 유리활성 억제작용이 있으며, 또한 폴리페놀 화합물인 카테킨류는 항산화 작용, 항게양, 항알레르기, 혈소판응집 억제작용, 혈당상승 억제, 항균, 돌연변이, 혈압강하 작용, 암 발생 억제효과, 휴먼 면역 결핍 바이러스 역전사효소 억제작용, 담배의 니코틴 배출 활성화, 충치 예방, 항혈전 및 혈소판응집 저해활성이 보고 되어 있다. 또한, 인체의 활성산소에 의해 과산화작용을 증가로 인한 질병과 노화 유발에 천연 항산화제로써 이용될 수 있을 것으로 추정하고 있다 (Kang et al., 2001; Kim et al., 2001; Kang et al., 1999; Frei et al., 2003). 본 연구에서는 흡연 시에 발생하는 여러 가지 영향에 대해 카테킨의 여러 유용한 성분을 포함하고 있는 녹차를 열수추출 한 후 일정비율을 혼합하여 Nebulizer를 이용하여 실험쥐에 흡입시킴으로써 질병 예방 효과와 폐기능의 보호 및 흡연으로 인한 폐 세포의 구조 변화와 활성산소종으로 인한 세포 손상에 어떠한 영향을 미치는지 알아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 장비

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pyrogallol, NADPH, thiobarbituric acid (TBA), glucose 6-phosphate, G6PD, trichloroacetic acid (TCA), (N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N'-[2-ethanesulfonic] acid (HEPES), ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)는 Sigma Chemical (St. Louis, USA)사에서, Ammonium persulfate, sodium dodesyl sulfate (SDS), Acrylamide, N,N,N',N'-tetramethylene-diamine (TEMED), Bio-Rad protein assay kit는 Bio-Rad (Hercules, USA)에서 그리고 메탄올, 에탄올과 Tween 20은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Surfactant protein D에 대한 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz, USA)를 구입하여 사용하였으며, enhanced chemiluminescence (ECL) western blot detection kit는 Amersham Pharmacia Biotech. (Oxford, UK)에서 구입하여 사용하였다. EDTA tube는 BD Vacutainer (BD Vacutainer system, UK)를 사용하였으며, hematoxyline, eosin xylene은 shandon (shandon, Japan)사에서, autotechnicon, rotary microtome citadel-1000은 shandon (shandon, Japan) 그리

고 marienfeld histobond slide glass는 superior (superior, Germany)을 구입하여 사용하였다.

### 2. 천연물 재료

본 연구에 사용된 천연물은 경남 보성에서 재배한 녹차 분말을 실험에 사용하였다.

### 3. 추출과정

천연물 1.5 kg에 증류수 15 l를 혼합 50°C에서 6 시간 동안 1,000 rpm 조건으로 추출한 다음, 4°C에서 48 시간 저온 숙성한 후 여과하여 원심분리로 침전시켜 상층액을 다시 5 µm 여과지 (ADVANTEC, Japan)로 여과하고 회전진공농축기 (Laborota 4000, Heidolph, Japan)로 용매를 최대한 제거하였다. 농축된 추출물을 급속 냉동시킨 후 동결건조기 (Neocool, Yamato, Japan)를 사용하여 용매를 완전히 제거하여 분말화하였다. 그 후 3차 증류수로 회석하여 1 µm 여과지 (ADVANTEC, Japan)로 여과 후 사용하였다. 실험에 사용한 추출물 시스템에 관한 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

### 4. 실험동물

실험동물은 12 주령 된 *Sprague-Dawley*종 수컷 흰쥐 (평균 체중 350 g)를 사용하였다. 실험 시작 전 일반고형사료 (삼양사)와 물로 자유식이 하였고, 폴리프로필렌 상자 (453×293×247 mm, 19 l)안에 스테인레스 스틸을 넣어 1 주간 적정 사육 조건 하 [온도 (18±4°C), 습도 (70±10%), 명암 (일일 12 시간 주기)]에서 예비사육을 통해 적응 기간을 두었다 (Jung, 2004).

### 5. 실험군 및 실험 조건

실험동물군은 증류수만 처리한 대조군 (Control), 녹차추출물 처리군 (CS), 흡연한 후 녹차추출물 처리군 (CS+SM) 그리고 흡연군 (SM)으로 나누었다. 각 군에는 7 마리의 쥐를 사용하였으며, 예비실험에서 적정 농도의 추출물 성분 (0.01% 회석된 50 ml 증류수)을 one-jet nebulizer (MIDAS, H-30, Mega medical, Korea)를 사용하여 12 시간 명 상태에서 실험쥐가 흡입할 수 있도록 하였으며, 12 시간 암 상태는 추출물을 투입하지 않았다. SM군과 CS+SM군은 명 상태 동안 20 개피 담배 (THIS, KT&G, Korea, 타르 6.5 mg, 니코틴 0.65 mg/개피)를 흡입 (1 개피/15 min)시켰다. 또한 모든 실험은 암 상태일 때와 7 일 중 하루는 실험을 하지 않았으며, 몸무게 측정은 1 주에 1 회 정해진 시간에 규칙으로 실시하였다. 4 주 후 표본 채취 전 24 시간 동안 안정화 시킨 후 실험하였다.

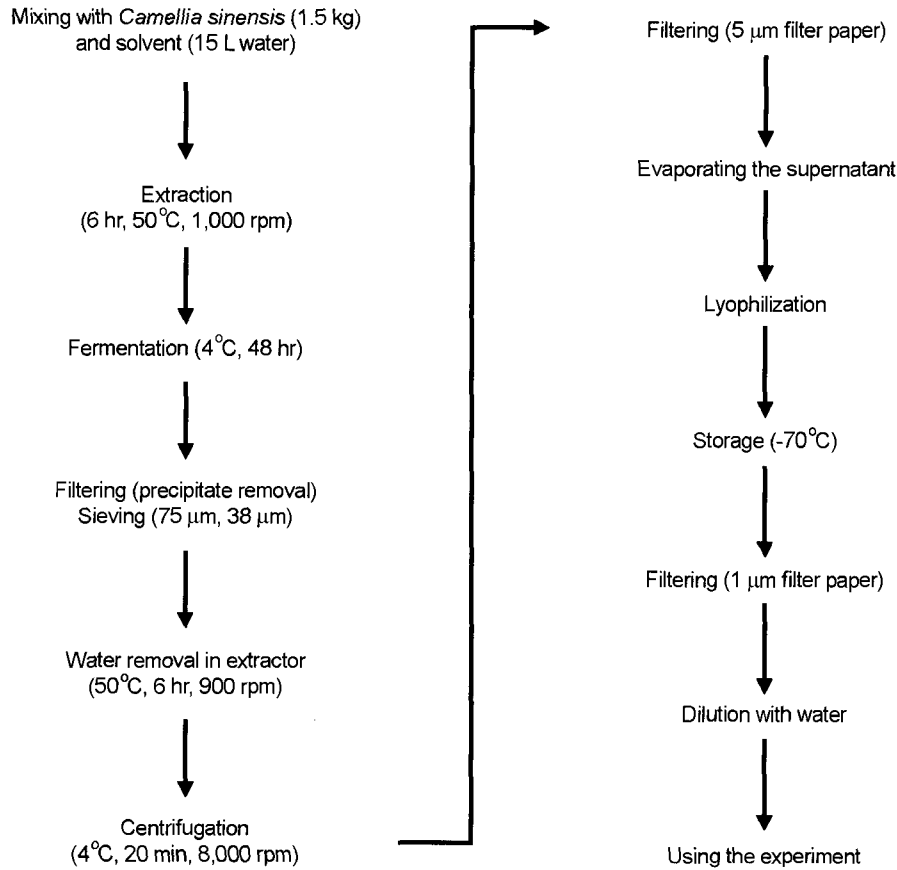


Fig. 1. Schematic view of the natural product extraction system.

## 6. 폐의 채취 및 분리

쥐의 복강에 ketamine hydrochloride (유한양행, 60 mg/kg)를 주사하여 마취시킨 후 우측 서혜부를 절개하여 대퇴 정맥을 노출시킨 후 24 게이지 정맥 삽입관을 통해 heparin (중외제약, 500 IU/kg)을 주입하였다. 흉골 정중절개술로 개흉하고 흉선을 절제한 후 종격 흉막과 심막을 절개하여 양측 폐의 환기 상태가 양호함을 확인하였다. 우심실 유출로를 통하여 21 게이지 정맥 삽입관을 넣은 후 삽입관 끝이 폐동맥판막을 지나 주폐동맥에 위치하게 고정하고 폐 관류를 시행하였다.

폐 관류는 PBS를 20 cm 높이에서 중력으로 주입하면서 하공정맥, 상공정맥, 좌심이 (left atrial auricle)를 절단하고 관류를 마친 후 흡기 말에 기관을 결찰하여 폐가 팽창된 상태에서 심폐 블록을 구득하여 (Perrot et al., 2002) Surgical blade [아이리(주), No.10]로 다듬은 후 구조 관찰용 조직을 일부 취하고 나머지 조직은 sonication buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1% Triton-X 100)에 옮겨 담아 ultrasonic generator sonicator (US-50, Nissei, Tokyo, Japan)를 이용하여 4°C에서 균질화하여 표본을 얻었다. 그 중 일부는 원심분리 없이 일정량을 취해 단백질

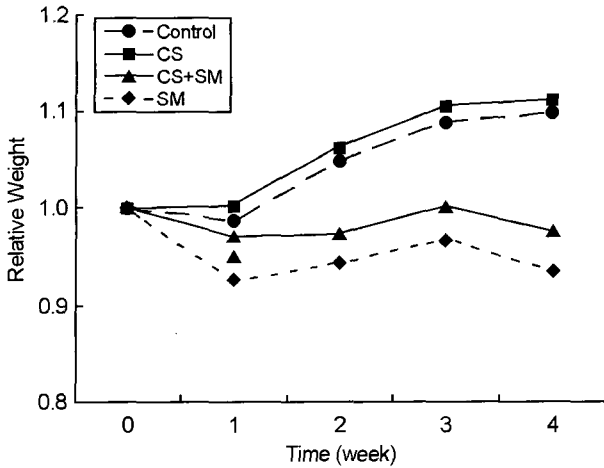
을 정량하여 지질과산화 측정용으로 사용하고, 나머지는 4°C에서 15,000 rpm으로 15 분간 원심분리 하여 상층액을 -70°C 보관하여 사용하였다.

## 7. Hematoxylin & Eosin stain (H&E stain)

폐 조직을 10% 포르말린에 24~48 시간 관류 고정한 후 수세하여 일정한 크기로 잘라서 자동침투기 (Shandon, Japan)를 거친 다음 파라핀 블록을 만들어 Rotary Microtom (Shandon, Japan)으로 4 µm 두께로 자른 후 H&E 염색 조건에 따라 염색하였다. 판독 및 사진은 광학현미경을 사용하여 100배, 400배에서 시행하였다 (Vernooij et al., 2001).

## 8. 지질과산화 측정

지질과산화에 의해 생성되는 malondialdehyde 측정을 위해 thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS)를 이용하였다. 1 Volume sample에 2 Volume TBA 용액 (0.375% TBA/ 15% TCA in 0.25 N HCl)을 가한 후 15~20 분 동안 중탕하여 식힌 다음 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 상층액을 취하여 535 nm에서의 흡광도를 측정하여 지질과산화 정도를 나타내었다 (Dorger et al., 2002).



**Fig. 2.** After experiment, the weight of each mouse was measured at every with the same time. The ordinate in figure is the relative value which means the ratio of the control value to each group. Result represents the mean  $\pm$  SD of 7 mice per group.

## 9. 효소활성 측정

### 1) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

Pyrogallol의 자가 산화를 저해하는 정도로 측정하였다. 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid가 포함된 Tris-HCl (50 mM, pH 8.2) 용액과 pyrogallol stock (10 mM HCl, 20 mM pyrogallol)을 혼합한 후 조직에서 추출한 단백질을 첨가하여 이의 자가 산화를 420 nm에서 측정하였다 (Marklund et al., 1974).

### 2) Catalase 활성 측정

10 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 0.015 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 후 조직에서 추출한 단백질을 첨가하여 240 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Beers et al., 1952).

### 3) G6PD 활성 측정

55 mM Tris-HCl (pH 7.8)에 3.3 mM MgCl<sub>2</sub>를 가한 후 6 mM NADP와 100 mM glucose-6-phosphate, 조직에서 추출한 단백질을 첨가하여 340 nm에서 흡광도에서 NADPH의 증가로 측정하였다 (Jung, 2004).

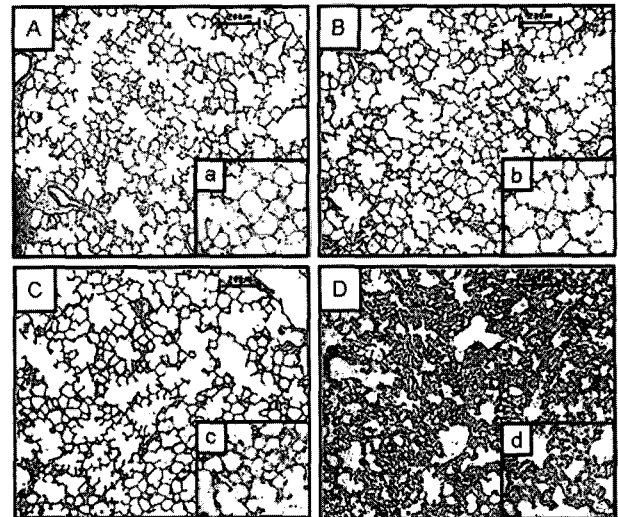
## 결과 및 고찰

### 1. 체중의 변화

Fig. 2에서 각각의 실험군에서 체중 변화는 control군과 CS군은 크게 차이가 없었으나, CS+SM군과 SM군 유의한 차이를 보였다. 즉 녹차 추출물에 의해 체중 증가는 일으키지는 않지만 흡연으로 인한 체중의 감소는 있음을 알 수 있다.

### 2. 폐 조직의 변화

Fig. 3에서 control군의 폐포구조는 배열이 규칙적이었으



**Fig. 3.** The H&E stain of pulmonary structure during 4 week A, a: Control group, B, b: CS group, C, c: CS+SM group, D, d: SM group. capital letter: 100 $\times$ , minuscule: 400 $\times$ .

며, 폐포벽이 전반적으로 얇게 관찰되었다. 이에 반해 SM군은 폐포의 공간이 불규칙하며 폐포벽 사이의 심한 유착과 함께 두꺼워졌으며, 폐 세포의 수가 많아 졌음을 관찰할 수 있었다. 그 외에 CS군은 control군과 비슷한 형태를 나타냈으며, CS+SM군은 폐포공간이 약간 불규칙하게 커지고 폐포벽이 약간 두꺼워져 있을 뿐 다른 구조적 변화는 관찰할 수 없었다. 이는 추출물의 성분이 흡연으로 인한 유해물질로부터 폐 조직을 보호하며, 그 자체로는 조직과 세포 내에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

### 3. 지질과산화 측정

세포를 둘러싸고 있는 세포막의 주된 성분인 인지질은 산화 손상에 의해 지질과산화물을 생성하며 이는 생체 내 산화 손상의 지표가 된다. 대부분의 세포막은 과산화 되는 동안 free malondialdehyde (MDA)를 형성하며 TBA와 반응하여 착화합물을 형성한다. 이를 UV-spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하고 그 상대적인 값을 Fig. 4에 나타내었다. 그래프에서 보듯이 control군에 비해 SM군에서 유의한 증가를 나타냈다. 이는 세포막의 인지질이 SM군에서 더 많은 지질과산화가 일어남을 알 수 있다. CS군과 CS+SM군의 경우 control군에 비해 유의한 증가를 나타내지 않았다. 이는 추출물을 처리함으로써 흡연으로 인한 지질과산화 작용에 대한 억제효과 및 손상으로부터 세포막을 보호한다는 것을 알 수 있다.

### 4. 효소활성 측정

생체 내에는 각종 요인에 의해 생성된 유해 라디칼을 효과적으로 제거하기 위해 여러 항산화 효소 및 항산화제가 존재

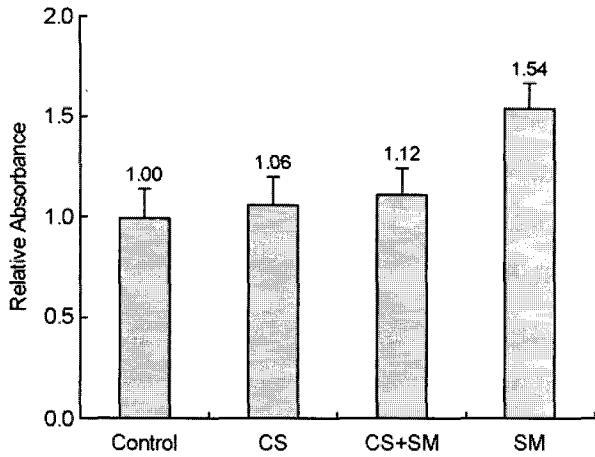


Fig. 4. Relative absorbance of each group in lipid peroxidation. The ordinate in figure is the relative value which means the ratio of the control value to each group. Result represents the mean  $\pm$  SD of four separate experiments.

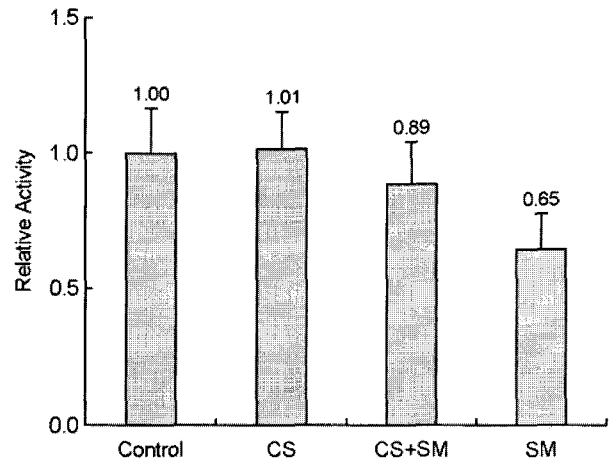


Fig. 6. Relative activity of each group in catalase activity. The ordinate in figure is the relative value which means the ratio of the control value to each group. Result represents the mean  $\pm$  SD of four separate experiments.

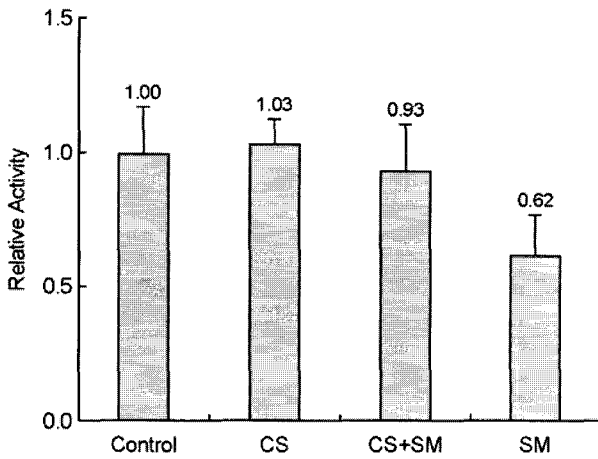


Fig. 5. Relative activity of each group in SOD activity. The ordinate in figure is the relative value which means the ratio of the control value to each group. Result represents the mean  $\pm$  SD of four separate experiments.

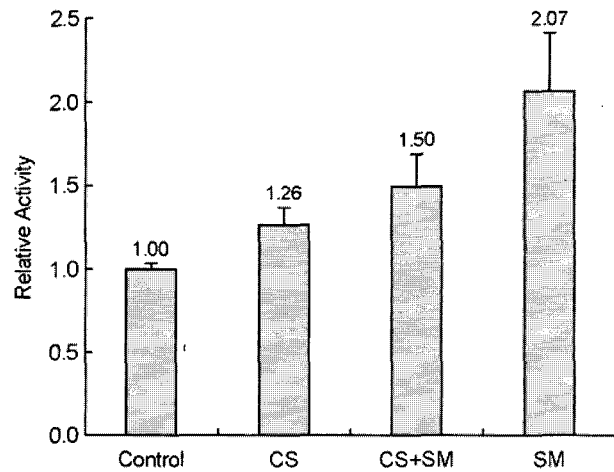


Fig. 7. Relative activity of each group in G6PD activity. The ordinate in figure is the relative value which means the ratio of the control value to each group. Result represents the mean  $\pm$  SD of four separate experiments.

한다. 생체 내 항산화 방어계는 일차적으로 효소들의 광범위한 분포 및 유기적인 관련성에 의해 유지되고 있다.

#### 5. Superoxide dismutase (SOD)활성

여러 요인으로 생성된 유해 라디칼은 생체 내에 존재하는 항산화 효소에 의해 다음의 과정에 따라 제거된다.

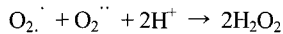


Fig. 5에서 보는 바와 같이 control군과의 비교에서 CS군과 CS+SM군의 경우 활성의 큰 차이는 없었으나, SM군에서는 유의하게 감소하였다. 이는 녹차 추출물이 항산화 효소의 활성에 영향을 미침을 알 수 있다.

#### 6. Catalase 활성

항산화 효소의 작용에 의하여 만들어진  $H_2O_2$ 는 catalase에 의해 물로 변환된다.

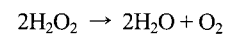


Fig. 6에서 보는 바와 같이 control군과 CS군에서의 활성은 큰 차이가 없었으며, SM군의 활성은 유의하게 감소하였다. 그러나 CS+SM군은 SM군보다는 활성의 감소가 적었다 이는 녹차 추출물이 항산화 효소의 활성에 영향을 미침을 알 수 있다.

## 7. G6PD 활성

Glutathione peroxidase (GPx)는  $H_2O_2$ 를 물로 전환함과 동시에 reduced glutathione (GSH)를 oxidized glutathione (GSSG)으로 전환시키는데, 이렇게 생성된 GSSG는 glutathione reductase (GR)에 의해 다시 GSH로 환원된다. 이때 NADPH가 전자전달자로서 역할을 하여 GSSG에 환원력을 제공해 주게 된다. 이 NADPH는 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)와 isocitrate dehydrogenase (ICDH)에 의해  $NADP^+$ 에서 만들어진다.

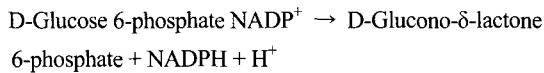


Fig. 7에서 보는 바와 같이 control군에 비해 CS군, CS+SM군 순서로 증가 경향을 보이나, SM군은 활성이 크게 증가하였다. 이는 녹차 추출물이 항산화 효소의 활성에 영향을 미침을 알 수 있다.

## 요 약

본 실험에서 열수 추출한 녹차 추출물을 Nebulizer를 이용하여 호흡을 통해 직접 실험동물에게 투여하였을 경우, 흡연시 생성되는 독성물질들에 의한 폐의 구조 변화와 손상으로 부터 기능과 구조의 항상성을 유지하는데 도움을 주며, 특히, 그 효과가 항산화 효소에도 길항적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, 추출물을 흡입시킴으로서 세포막의 지질과산화물을 억제하여 세포의 구조와 기능을 유지함으로써 흡연으로 인한 세포의 파괴 및 불규칙적인 구조 이상을 줄일 뿐만 아니라 추출물에 포함되어 있는 여러 가지 성분과 polyphenol 성분인 카테킨 등의 항산화제의 작용에 의해 흡연으로 생긴 유해 라디칼의 분해를 촉진시킴으로써 폐의 정상적인 기능에 도움을 주는 것으로 생각된다. 지금까지 연구되어진 *in vitro*나 *in vivo*에서의 경구 투여나 주사를 통한 방법이 아니라 호흡을 통해 직접 폐에 투입함으로써 그 결과가 빠르게 나타날 수 있을 것으로 생각된다.

## REFERENCES

Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1952. 195: 133-135.

Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, Kuroki Y, Howles G, Hui DY, McCormack FX. Pulmonary Surfactant Proteins A and D Are Potent Endogenous Inhibitors of Lipid Peroxidation and Oxidative Cellular Injury. *J Biol Chem.* 2000. 275:

38848-38855.

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Ten SV, Lee A, Ai-Abed Y, Lassara HV, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. 94: 13915-13920.

Dorger M, Allmeling AM, Kieffmann R, Munzing S, Messmer K, Krombach F. Early Inflammatory Response to Asbestos Exposure in Rat and Hamster Lungs: Role of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002. 181: 93-105.

Frei B, Higdon JV. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *Am Soci Nutr Sci.* 2003. 3275S-3284S.

Göbran LI, Rooney SA. Regulation of SP-B and SP-C secretion in rat type II cells in primary culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001. 281: L1413-L1419.

Kang JH, Park YK, Chung ST, Row KH. Extraction and Purification of EGCG from Green Tea. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 1999. 14: 517-522.

Kang WS, Lee YH, Chung HH, Kang MK, Kim TJ, Hong JT, Yun YP. Effects of Green Tea Catechins on the Lipid Peroxidation and Superoxide Dismutase. *J Fd Hyg Safety* 2001. 16: 41-47.

Kim JI, Row KH. Recovery of Catechin Compound from Korean Green Tea by Solvent Extraction and Partition. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2001. 16: 442-445.

Kim KY. Smoking and COPD. *Tuberc Respir Dis.* 1987. 34: 185-191.

Jung H. Inhalation Effects of Natural Product Extracts in Mouse Lung against Cigarette Smoking and Formaldehyde Exposure. 2004. pp 32-39. Kyungpook Natl Univ. Daegu. Korea.

Lin YS, Tsai TJ, Tsay JS, Lin JK. Factors Affecting the Levels of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Leaves. *J Agric Food Chem.* 2003. 51: 1864-1873.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *Eur J Biochem.* 1974. 47: 467-474.

Notion D. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities for Harm Reduction (A Report to the New Zealand Ministry of Health) Manager, Environmental Health Effects Programme, ESR. 2003.

Park EM, Park YM, Gwak YE. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med.* 1998. 25: 79-86.

Perrot M, Imai Y, Volgyesi GA, Waddell TK, Liu M, Mullen B,

- McRae K, Zhang H, Slutsky AS, Ranieri VM, Shaf KS. Effect of ventilator-induced lung injury on the development of reperfusion injury in a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002. 124: 1137-1144.
- Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials 1. *Am Soci Nutr Sci.* 2003. 3285S-3292S.
- Shim HM, Cho DS, Choi JT, Jung ES. The relationship between smoking and a high white blood cell count. *J Korean Acad Fam Med.* 1994. 15: 208-217.
- Sohn HY, Kim SK, Kim KH. Anatomy of the Respiratory System. *Tuberc Respir Dis Assoc.* 1985. 32: 1-18.
- Song JS, Kim YK, Kim KH, Han KD, Moon HS, Park SH. The release of superoxide( $O_2^{\cdot-}$ ) from the neutrophils in pulmonary emphysema patients associated with long-term smoking. *Korean J Intern Med.* 1989. 36: 453-459.
- Subramaniam, SJ, Whitsett A, Hull W, Gairola CG. Alteration of Pulmonary Surfactant Proteins in Rats Chronically Exposed to Cigarette Smoke. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996. 140: 274-280.
- Vernooy JH, Dentener MA, Suylen RJ, Buurman WA, Wouters EFM. Intratracheal Instillation of Lipopolysaccharide in Mice Induces Apoptosis in Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001. 24: 569-576.
- Yang CS, Wang ZY. Tea and Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993. 85: 1038-1049.
-