

Protective Effect of Crataegi Fructus Extract on the Neurotoxicity Induced by Reactive Oxygen Species in Cultured C6 Glioma Cell

Dae-Ho Ha¹ and Sun-Mi Yoo^{2,*}

¹Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gunpo 435-040, Korea.

²Department of Cosmetology, Dongkang College, Kwangju 500-714, Korea

To clarify the antioxidant effect of Crataegi Fructus (CF) extract on reactive oxygen species (ROS), The C6 glioma cells were treated with various concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂). The H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by XTT assay for the cell viability. For the protective effect of CF extract on the cytotoxicity induced by H₂O₂, cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and the inhibitive activity of lipid peroxidation of CF extract were performed. In this study, H₂O₂ decreased cell viability dose- and time-dependent manners and increased LDH activity compared with the control. In the protective effect on H₂O₂, CF extract increased cell viability and decreased LDH activity on H₂O₂-induced cytotoxicity, lipid peroxidation by FTC assay. From these results, It is suggested that H₂O₂ was highly toxic on cultured C6 glioma cells, and also, CF extract showed the protective effect on H₂O₂-mediated cytotoxicity.

Key Words: Hydrogen peroxide, Crataegi Fructus extract, Lipid peroxidation

서 론

활성산소를 구성하고 있는 자유라디칼 (free radical)은 불안정한 화합물로 이들은 모두 산소분자를 가지고 있어 일명 산소라디칼이라고도 하며 이는 산화적 손상을 유발하는 원인으로 작용하고 있다 (Choen, 1978; Chung et al., 2000). 자유라디칼은 대식세포의 살균작용과도 밀접한 관련이 있지만 오래된 대사산물의 분해에도 중요한 역할을 하고 있다 (Asbeck, 1990). 따라서 정상적인 대사과정 중 자유라디칼은 소량이 인체내에서 생성되지만 인체의 방어체계인 항산화계에 속하는 catalase나 superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소가 작용하여 물로 변환시킴으로서 인체에는 아무런 손상을 주지 못한다 (Przyklenk and Kloner, 1986). 그러나 과도한 자유라디칼의 생성은 세포의 손상에 따른 병변은 물론 노화를 진행시킴으로서 인체의 강력한 유해요인의 하나로 알려져 있다 (Franceschi, 1989; Rosen et al., 1993). 특히, 자유라디칼은 사립체내의 지질과산화물을 비롯하여

핵산물질을 손상시켜 돌연변이나 암을 유발하는 원인이 되고 있다 (Nishio and Uyeke, 1985; Boczkowski et al., 1999; Tsou et al., 1999). 또한 세포막의 지질과산화반응 (lipid peroxidation)을 유발하여 막손상을 초래함은 물론 세포막에 위치하고 있는 칼슘통로의 하나인 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과자극 함으로서 세포내 칼슘증가에 의한 대사이상과 세포손상을 유발하여 결국 세포를 사멸로 유도한다 (Mattson et al., 1993; Park et al., 1996). 세포내 비정상적인 칼슘의 증가는 phospholipase A나 endonuclease와 같은 효소의 활성을 유발하여 그 결과 세포독성을 나타내게 된다 (Deshpande et al., 1987; Mattson et al., 1993). 그러므로 자유라디칼에 의하여 유발되는 각종 질환의 예방이나 이의 치료를 위하여 항산화제를 비롯한 자유라디칼제거제 등을 투여하는 방법이 시도되고 있다 (Ganther, 1980; Harata et al., 1998). 최근 한약제나 허브 및 식물추출물 등에 강력한 항암작용을 비롯하여 항노화, 항독성 및 항산화 작용을 나타내는 성분들이 들어 있다고 제시되면서 이들 성분의 추출에 대한 관심이 높아지고 있다 (Heilmann et al., 2000; Han et al., 2006; Kim et al., 2006). 한약제의 하나인 산사 (Crataegi Fructus, CF)는 장미과 식물에 속하는 낙엽교목의 일종인 산사나무 (Crataegus pinnatifida Beg.)의 과실로 우리나라에 널리 분포하고 있다. 산사의 효능으로는 소화건위를

*논문 접수: 2008년 2월 25일

수정재접수: 2008년 3월 14일

†교신저자: 유선미, (우) 570-714 광주광역시 북구 두암동 771, 동강대학교 피부미용과

Tel: 062-520-2391, e-mail: hbdoobae@naver.com

비롯하여 과기산어, 소아유적 등과 같은 효능이 있으며 (Bae and Kim, 2003), 그 밖에도 심장기능부전에 대한 병변의 치료에도 널리 사용되고 있다 (Nasa et al., 1993). 한편, 산사에 대한 최근의 연구에서 혈관확장과 같은 각종 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있다 (Hecker, 2000; Bae and Kim, 2003). 그러나 산사가 항산화 작용이 있다고 제시되고 있지만 이에 대한 실질적인 연구는 소수로써 활발히 이루어지지 않고 있는 실정이며 더욱이 배양세포를 재료로한 시험관내에서의 연구는 흔하지 않다 (Bae and Kim, 2003). 최근 각종 배양세포를 모델로한 병변모형을 제작하여 병변에 대한 기전규명이나 이의 치료적 방법을 개발하기 위하여 시험관내 분석기술이 널리 적용되고 있다 (Mosmann, 1983; Michikawa et al., 1994). 배양세포를 이용한 시험관내 연구는 생체실험에 비하여 실험재료 확보의 용이성과 동일한 실험의 반복성이 뛰어나는 뿐만 아니라 실험단계별에 따른 형태관찰 및 정량분석이 용이하다는 장점이 있다 (Halliwell and Gutteridge, 1984; Mei et al., 2003).

본 연구는 활성산소에 대한 산사의 항산화 효과를 조사하기 위하여 먼저 배양된 C6 glioma세포에 활성산소의 일종인 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 처리한 후 이에 대한 신경독성을 조사하였으며 또한 활성산소의 신경독성에 대한 산사의 보호효과를 항산화 측면에서 조사하기 위하여 세포생존을 lactate dehydrogenase (LDH) 활성 및 지질과산화능 (lipid peroxidation inhibition)을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 제조

활성산소의 일종인 hydrogen peroxide (H_2O_2)는 무혈청의 DMEM (Dulbeccos' minimum essential medium, Sigma) 배양액에 첨가하여 각각 10 μ M, 30 μ M, 60 μ M, 80 μ M, 100 μ M 500 μ M 및 1 mM의 최종농도가 되도록 저장액을 만들어 냉장고에 보관한 후 실험 당일 실험목적에 필요한 농도로 배양액에 넣어 희석한 후 사용하였다. XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt, Sigma)는 실험 전날 0.5 mg/ml의 저장액을 만들어 냉장고에 보관한 후 실험 당일 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 약제 추출

약제 추출을 위하여 산사 (Crataegi Fructus, CF) 350 g을

냉각기가 부착된 환저플라스크에 1,000 ml의 증류수와 함께 넣은 후 2 시간 동안 가열하였다. 가열 완료 후 3,000 rpm에서 30 분간 원침하였으며 원침 완료 후 진공농축기로 감압농축한 다음 24 시간 동안 동결건조기에서 건조시켜 30.2 g의 분말시료를 얻었다.

3. 세포 배양

신경아교세포종 (C6 glioma)의 배양은 Durham 등 (1993)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 일정 시간 동안 배양된 세포는 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척 후 trypsin에 의한 효소해리술에 의하여 배양용기로 부터 분리하였다. 분리 후 DMEM (Gibco)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 1×10^5 cells/well의 밀도로 96 배양용기 (well plate)에 산정하여 넣은 후 48 시간 동안 배양하였으며 배양이 완료된 세포는 분석에 사용하였다.

4. Hydrogen peroxide (H_2O_2) 처리

C6 glioma세포를 10 μ M 부터 40 μ M 까지의 H_2O_2 가 농도별로 각각 포함된 배양액에서 9 시간 동안 배양한 후 H_2O_2 가 C6 glioma세포에 미치는 영향을 분석하였다.

5. 추출물 처리

H_2O_2 에 대한 산사추출물의 영향을 조사하기 위하여 H_2O_2 를 배양세포에 처리하기 전에 110~140 μ g/ml의 산사추출물이 포함된 배양액에서 2 시간 동안 C6 glioma세포에 처리한 후 대조군과 비교 조사하였다.

6. 세포생존을 조사

세포생존율정량은 XTT에 의한 비색분광법에 의하였다. 즉 H_2O_2 를 처리하지 않은 배양 C6 glioma 세포를 5×10^5 /well의 밀도로 하여 96 배양용기에서 48 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 H_2O_2 나 추출물을 처리하여 일정 시간 동안 배양한 후 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 세척 완료 후 실험 전날 제조하여 최종농도로 희석한 XTT액을 well당 200 μ l씩 넣어 37°C, 5% CO_2 /95% air로 조절된 정온기에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 효소산물추출액으로 처리한 다음 spectrophotometer로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

Table 1. XTT value of the cell viability of cultured C6 glioma cells treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) by XTT assay

Treatment Concentration of H ₂ O ₂ (μM)	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Control	4.91±0.36	100
10	3.43±0.27	69.9
25	2.98±0.18	60.7
40	2.43±0.20	49.5*

The XTT values of cultured C6 glioma cells treated with 10~40 μM of hydrogen peroxide (H₂O₂) for 9 hours. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from control. *P<0.05

7. 지질과산화 분석

지질과산화정량은 Kikuzaki와 Nakatani (1993)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 농도별 에탄올 (EtOH) 시료를 2.52% linoleic acid와 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)의 혼합용액에 넣고 40℃의 암소에서 96 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 0.1 ml 반응액을 취하여 30% ammonium thiocyanate와 0.02 M ferrous chloride를 각각 첨가하여 실온에 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하여 증류수인 대조군과 비교 조사하였다. 지질과산화 값은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

8. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성 분석

LDH 활성정량은 CytoTox detection kit (Takara)를 사용하여 측정하였으며, 반응액내에 NAD의 산화로 의해 형성된 formazan을 490 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

9. 통계 처리

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test를 사용하였으며 P가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 세포생존율 분석

1) 농도에 의한 H₂O₂의 영향

배양중인 C6 glioma세포에 10~40 μM H₂O₂가 각각 포함된 배양액에서 9 시간 배양한 다음 10 μM 처리에서 세포생존율은 대조군인 100% (4.91±0.36)에 비하여 69.9% (3.43±0.27)로 나타났으며 25 μM의 처리에서는 60.7%

Table 2. The Cell viability of time-response relationship of hydrogen peroxide (H₂O₂) on cultured C6 glioma cells

Treatment Concentration of H ₂ O ₂ (hour)	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Control	6.18±0.43	100
3	5.44±0.36	88.0
6	3.99±0.27	64.6
9	3.07±0.31	49.7*

C6 glioma cells were cultured in the media containing hydrogen peroxide (H₂O₂) for 3, 6, and 9 hours, respectively. Cell viability was determined by XTT assay. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from control *P<0.05

(2.98±0.18)로 나타났다. 또한, 40 μM의 처리에서는 49.5% (2.43±0.20)로 나타나 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였으며 (P<0.05), XTT₅₀ 값은 40 μM에서 나타났다 (Table 1).

2) 시간에 의한 H₂O₂의 영향

H₂O₂의 처리 시간에 따른 세포생존율을 조사하기 위하여 C6 glioma세포를 H₂O₂의 XTT₅₀ 농도에서 3~9 시간 동안 처리하였다. 그 결과 3 시간 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (6.18±0.43)에 비하여 88.0% (5.44±0.36)로 나타났으며, 6 시간 배양에서는 64.6% (3.99±0.27)로 나타났다. 또한, 9 시간 배양에서는 49.7% (3.07±0.31)로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며 (P<0.05), 이 때 XTT₅₀ 값은 9 시간 배양에서 나타났다 (Table 2).

3) H₂O₂에 대한 산사추출물의 영향

배양한 C6 glioma세포를 110 μg/ml에서 140 μg/ml의 산사추출물이 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전배양한 다음 세포생존율을 조사하였다. 40 μM H₂O₂만 처리한 경우 대조군인 100% (3.19±0.25)에 비하여 47.6% (1.52±0.08)로 나타났으나 110 μg/ml 산사추출물의 처리에서는 77.1% (2.46±0.13)로 나타났다. 또한, 140 μg/ml 산사추출물의 처리에서는 세포생존율이 79.0% (2.52±0.18)로 나타나 이는 모두 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의하게 증가하였다 (P<0.05) (Table 3).

2. LDH 활성 분석

H₂O₂에 대한 산사추출물의 LDH 활성 조사를 위하여 170~200 μg/ml 농도로 각각 포함된 산사추출물을 C6 glioma세포에 2 시간 동안 전배양한 후 LDH 활성을 조사하였다. 그 결과 40 μM H₂O₂만을 처리한 경우 대조군

Table 3. The cell viability of Crataegi Fructus (CF) extract on H₂O₂ in cultured C6 glioma cells by XTT assay

Concentration of CF (μg/ml)	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Control	3.19±0.25	100
40H ₂ O ₂	1.52±0.08	47.6
110	2.46±0.13	77.1*
140	2.52±0.18	79.0*

Cultured C6 glioma cells were preincubated with 110~140 μg/ml CF extract, respectively. The values were determined by XTT assay in cultured C6 glioma cells. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from H₂O₂-treated group *P<0.05

Table 4. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of Crataegi Fructus (CF) on cultured C6 glioma cells

Concentration of CF (μg/ml)	LDH activity (490 nm)	
	% of control	
Control	100±8.4	
40H ₂ O ₂	126.3±10.7	
170	110.3±9.2	
200	105.2±8.6*	

Cultured C6 glioma cells were preincubated with 170~200 μg/ml CF extract, respectively. The values were determined by LDH activity assay in cultured C6 glioma cells. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from H₂O₂-treated group. *P<0.05

인 100%에 비하여 126.3%로 나타남에 비하여, 170 μg/ml 산사추출물을 처리한 경우 LDH 활성은 110.3%로 나타났다. 또한 200 μg/ml 산사추출물을 처리한 경우 LDH 활성이 105.2%로 나타나 이는 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의하게 감소하였다 (P<0.05) (Table 4).

3. 지질과산화 분석

Ferric thiocyanate (FTC) 분석방법에 의하여 산사추출물이 지질과산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 산사추출물 100~160 μg/EtOH 시료에 대하여 분석한 결과 100 μg/EtOH 시료에서는 지질과산화값은 대조군에 비하여 71.4%로 나타났다. 또한, 130 μg/EtOH와 160 μg/EtOH의 산사추출물의 시료에서는 각각 48.4%와 30.8%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다 (Table 5).

고 찰

최근 한약제나 식물추출물에 항암이나 항균 및 항산

Table 5. The activity of lipid peroxidation (LP) of Crataegi Fructus (CF) extract measured at a wavelength of 500 nm

Concentration of CF (μg/Etoh)	LP activity (500 nm)	
	% of control	
Control	100±7.8	
100	71.4±5.4	
130	48.4±3.6*	
160	30.8±2.7*	

CF extract dissolved with ethanol (Etoh) were assessed by lipid peroxidation assay. The values were determined by the a wavelength of 500 nm. The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from control. *P<0.05

화 효과가 뛰어난 약리활성을 나타내는 물질이 함유되어 있다고 보고되면서 이에 대한 연구가 진행되고 있다 (Heilmann et al., 2000; Bac and Kim, 2003). 이중 산사는 심장기능 강화를 비롯하여 혈관확장기능에 대한 유효한 약리작용을 나타낸다고 보고되었으며 (Nasa et al., 1993; Bac and Kim, 2003), 또한 항산화 작용에도 유효한 활성을 가지고 있다고 제시된 바 있다 (Bac and Kim, 2003). 본 연구에서는 산사추출물에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 우선 배양중인 C6 glioma세포에 hydrogen peroxide (H₂O₂)를 10~40 μM의 농도로 각각 처리한 후 이에 대한 영향을 세포생존율에 의하여 조사하였다. 그 결과 H₂O₂는 C6 glioma세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포생존율의 감소를 보였으며, 40 μM H₂O₂의 처리에서는 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였다. 본 실험결과는 H₂O₂가 신경독성을 가지고 있다는 것을 제시하고 있으며 Forman 등 (1987)이 H₂O₂가 대식세포 기능 저하와 막손상을 줌으로서 세포독성을 나타냈다는 보고와 일치함을 알 수 있었다. 또한, 본 실험결과에서 H₂O₂가 C6 glioma세포의 생존율을 감소시킨 것은 세포내 DNA의 손상이나 (Tsou et al., 1999), 세포내 항산화 효소의 활성 저하의 가능성도 있겠지만 (Przyklenk and Kloner, 1986; Harata et al., 1998), 본 실험에서 적용한 XTT assay가 세포소기관의 효소활성과 깊은 관련이 있다고 볼 때 아마도 H₂O₂의 산화적 손상이 세포소기관을 손상시킴으로서 세포생존율을 감소시켰을 것으로 생각된다 (Christopher et al., 1992). 한편, H₂O₂에 대한 산사추출물의 보호효과를 알아보기 위하여 산사추출물이 110~140 μg/ml로 각각 포함된 배양액에서 C6 glioma세포를 2 시간 동안 전처리한 결과 H₂O₂만을 처리한 실험군에 비하여 세포생존율이 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (P<0.05). 본 실험결과는 산사추출물이 H₂O₂로부터 세포의 손상을 보호

하였다는 것을 알 수 있으며 이는 산사추출물이 항산화 효과가 있음을 증명하고 있다고 하겠다. 따라서 본 실험에서는 산사추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 H₂O₂와 같은 자유라디칼에 의하여 유발되는 막손상이나 지질과산화반응에 대한 산사추출물의 영향을 조사하였다. LDH 활성 조사는 막손상 정도를 판단할 수 있는 가장 적합한 분석지표로 알려져 있다. 이를 위하여 170~200 µg/ml의 산사추출물이 각각 포함된 배양액에서 C6 glioma세포를 2 시간 동안 전배양한 후 LDH 활성을 조사한 결과 H₂O₂만을 처리한 경우 대조군인에 비하여 126.3%로 다소 높은 LDH 활성을 보였다. 그러나 170 µg/ml 산사추출물의 처리에서는 LDH 활성이 110.3%로 다소 낮게 나타났으나 200 µg/ml의 처리에서는 105.2%로 나타나 이는 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P < 0.05$). 본 실험의 결과에서 H₂O₂에 의하여 LDH 활성이 대조군에 비하여 증가한 것은 H₂O₂가 막손상을 유발하여 세포손상을 초래하였음을 말해 주고 있다. 이 결과는 Forman 등 (1987)에 의한 H₂O₂의 막손상의 보고와 일치하였으며 본 실험에서 행하였던 H₂O₂에 의한 세포생존율의 감소와도 일치하였음을 알 수 있었다. 또한, 산사추출물의 처리군이 H₂O₂의 처리에 비하여 LDH 활성이 유의하게 감소된 것은 산사추출물이 H₂O₂의 지질과산화반응으로 인한 막손상으로 부터 세포를 보호한 결과라 생각되며 이는 본 실험의 세포생존율의 정량과도 일치함을 알 수 있었다 (Bae and Kim, 2003). 활성산소에 의한 막손상은 막을 구성하고 있는 지질성분이 산화적 손상에 의하여 산화되어 나타나는 지질과산화반응 (lipid peroxidation)의 결과이다 (Park et al., 1996). 따라서 본 실험에서는 산사추출물이 지질과산화억제능이 있는지를 알아보기 위하여 FTC assay에 의하여 지질과산화능을 조사하였다. 그 결과 100~160 µg/EtOH 산사추출물시료에서 대조군에 비하여 지질과산화반응이 점점 감소한 것으로 나타났다. 특히 130 µg/EtOH 추출물시료와 160 µg/EtOH의 산사추출물시료에서는 각각 48.4%와 30.8%로 나타나 이는 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 본 실험결과는 산사추출물이 지질과산화억제능을 가지고 있다는 것을 제시하고 있다. 그러나 산사추출물성분의 보호효과를 항산화 측면에서 더욱 자세히 규명하기 위해서는 산사추출물성분과 항산화 효소간의 분자적 구조분석을 비롯하여 이에 따른 약리활성에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 될 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Asbeck BSV. Role of hydrogen peroxidase and iron. *Antioxi Thera Preven.* 1990. 264: 235-241.
- Bae MH, Kim HH. Mechanism of Crataegi Fructus extract induced endothelium-dependent vasorelaxation in rabbit carotid artery. *Kor J Herbology.* 2003. 18(3): 169-180.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, Poderoso JJ. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J.* 1999. 13: 1637-1646.
- Christopher HK, Daniel FC, Gray WW, William AP. t-Butyl hydroperoxide-induced radical production in rat liver mitochondria. *Free Rad Med.* 1992. 12: 381-386.
- Chung HY, Soung DY, Kim A, Choin HR, Kim HJ, Choin JS, Yang R, Lee KH, Yu BP. Generatio, Toxicity and Scavenging of ONOO⁻: Its Involvement in the Aging Process. *Kor J Gerontol.* 2000. 10(1): 46-59.
- Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. *Photobiol.* 1978. 28: 669-674.
- Deshpande JK, Siesjc BK, Wieloch T. Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metabol.* 1987. 7: 89-95.
- Durham HD, Dahrouge S, Cashman NR. Evaluation of the Spinal Cord Neuron X Neuroblastoma Hybrid Cell Line NSC-34 as a Model for Neurotoxicity Testing. *Neurotoxicology.* 1993. 14(4): 387-396.
- Forman H, Dorio RJ, Skelton DC. Hydroperoxide-induced damage to alveolar macrophage function and membrane integrity. *Arch Biochem.* 1987. 259: 457-463.
- Franceschi C. Cell proliferation, cell death and aging. *Aging.* 1989. 1: 3-8.
- Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci.* 1980. 355: 212-225.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and anti-oxidant therapy. *Lancet.* 1984. 23: 1396-1397.
- Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, Song HJ. The Effect of Poncirin on Hexavalent Chromium in NIH3T3 Fibroblasts in Vitro. *The Korea J Herbology.* 2006. 21(1): 101-107.

- Harats D, Chevion S, Nahir M, Norman Y, Sagee O, Berry EM. Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamin C and E in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998. 67(2): 240-245.
- Hecker M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor-fact or fiction? *News Physiol Sci.* 2000. 25: 665-673.
- Heilmann L, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med.* 2000. 66(8): 746-748.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993. 58: 1407-1410.
- Kim EJ, Ahn SY, Nam GW, Lee HK, Moon SJ, Kim YM, Oh MS, Kim NS. The Anti-aging Effect of the Cosmetic Products Containing the Needles of Red pine on Human Skin. *Kor J Herbology.* 2006. 21(1): 25-31.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 1993. 121: 1-13.
- Mei Y, Wei D, Liu J. Reversal of cancer multidrug resistance by tea polyphenol in KB cells. *J Chemother.* 2003. 15(3): 260-265.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induce neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994. 37: 62-70.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983. 65: 55-63.
- Nasa Y, Hashizume H, Ehsanul Hoque AN, Abiko Y. Protection Effect of Crataegus Extract on the Cardiac Mechanical Dysfunction in Isolated Perfused Working Rat Heart. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 1993. 43(II): 945-949.
- Nishio A, Uyeki EM. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J Toxicol Environ Health.* 1985. 15(2): 237-244.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 1996. 17: 37-46.
- Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of stunned myocardium. *Cir Res.* 1986. 58: 149-157.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London).* 1993. 362: 59-62.
- Tsou TC, Lai HJ, Yang JL. Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damage by chromium(VI) reduction with ascorbate. *Chem Res.* 1999. 12(10): 1002-1009.