

# 補中益氣湯加味方이 신경교세포의 세포사멸보호 및 항산화에 미치는 영향

황귀성 · 김형우<sup>1</sup> · 최찬헌 · 정현우\*

동신대학교 한의과대학, 1: 부산대학교 한의학전문대학원

## Effects of BojunglkkiTang-Gamybang on Protective of Cell Death and Anti-Oxidative in C6 Glioma Cell

Gui Seong Hwang, Hyung Woo Kim<sup>1</sup>, Chan Hun Choi, Hyun Woo Jeong\*

College of Oriental Medicine, Dongshin University, 1: School of Korean Medicine, Pusan National University

This study was designed to investigate the effects of BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder (BITG) on proliferation, protective of cell death induced by chemicals such as paraquat, hydrogen peroxide etc and anti-oxidative effects in C6 glioma cells. In our results, BITC accelerated proliferation rates of C6 cells in vitro. In addition, protective effects on cell death induced by paraquat and hydrogen peroxide. And, BITC did not have effects on SOD and total glutathione activities, but decreased malone dialdehyde activity. In conclusion, these results suggest the possibility of BojunglkkiTang-Gamybang to protect brain cell or neuronal cell from damage induced by oxidative stress. And also suggest that related mechanisms are involved in malone dialdehyde activity.

Key words : BojunglkkiTang, cell death, SOD, total glutathione, malone dialdehyde

### 서 론

최근, 생활 습관의 서구화와 노인 인구의 증가 등 여러 가지 사회적 환경 변화에 따라 고령화에 따른 노화 및 뇌혈관 질환의 발생빈도나 사망률 등도 크게 증가하고 있다<sup>1,2)</sup>.

노화는 산화촉진 물질과 산화억제 물질이 균형을 이루고 있다가 나이가 들면서 산화적 스트레스가 증가됨으로써 나타나는 반응으로<sup>3)</sup>, 이것의 주원인으로 대두되는 것이 산화 촉진 물질인 활성산소이며<sup>4)</sup>, 대표적인 것으로는 superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical와 hydrogen peroxide 등으로, 이들은 쉽게 다른 조직과 결합함으로써 산화적 스트레스를 유발한다<sup>5)</sup>. 그러나 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등은 이러한 산화적 스트레스를 억제하거나 제거하는 항산화 효소들로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

산화적 스트레스는 인체의 세포나 조직을 손상시키기 때문에 인체는 이를 제거하기 위해서 산소를 이용한 효율적인 항산

화 체계를 갖고 있고<sup>7)</sup>, 또한 항산화제를 통해서 만성질환을 예방하거나<sup>8)</sup> 뇌혈관질환 및 허혈성 심혈관계질환 등의 위험을 감소시킬 수 있다<sup>9)</sup>.

補中益氣湯은 『脾胃論』<sup>10)</sup>에 元氣가 소모될 때 사용하는 방제로 수록된 이래 許<sup>11)</sup> 등<sup>12,13)</sup>은 中氣不足 등 각종 氣虛證에 補氣升提와 益氣升陽의 목적으로 사용하였고, 최근에는 中氣不足으로 인한 중풍과 심장질환<sup>14,15)</sup>, 만성질환 및 면역력 저하로 인한 질환<sup>16)</sup>에도 응용하고 있다.

補中益氣湯의 연구 동향을 살펴보면, 노화촉진 생쥐의 간장 내에서 항산화작용이<sup>17)</sup>, 혈관 내피세포의 노화 지연 효과가<sup>18)</sup>, 고혈당 흰쥐에서 항산화 효과가<sup>19)</sup>, 중풍치료 효과가<sup>20)</sup> 있음이 보고되어 있고, 補中益氣湯加味方도 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량 증가에 효과가 있음이<sup>21)</sup> 보고되어 있다. 또한 補中益氣湯을 구성하는 약물을 살펴보면<sup>22-28)</sup>, 항산화 작용뿐 아니라 미백효과, nitric oxide 활성 등이 있음이 보고되어 있다. 그러나 補中益氣湯加味方이 뇌혈류량에 유의한 효과를 보였음에도 불구하고 항산화관련 연구 보고는 아직까지 접할 수 없었다.

이에 저자들은 補中益氣湯 원방에 항산화 효과 있는 川芎<sup>29)</sup>, 防風<sup>29)</sup>, 荊芥<sup>30)</sup>, 蘇葉<sup>30)</sup>, 薄荷<sup>31)</sup>을 가미한 補中益氣湯加味方(東醫

\* 교신저자 : 정현우, 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : hwdolsan@dsu.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2010/05/04 · 수정 : 2010/06/07 · 채택 : 2010/06/07

寶鑑春方)이 신경교세포에 미치는 항산화 효과를 관찰하기 위하여 신경교세포주인 C6 glioma cell를 이용하여 세포 증식율 및 생존율, 산화 촉진 물질인 산화적 스트레스 유발 물질을 처리한 후 세포 사멸 보호에 미치는 효과, 산화 억제 물질 활성에 미치는 항산화 효과 등을 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 補中益氣湯加味方은 『東醫寶鑑』<sup>11)</sup>에 기록된 방제를 근거로 삼았으며, 구성약물은 동신대학교 부속 광주한방병원에서 구입하였고, 분량 및 생약명<sup>32)</sup>은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Prescription of BojunglkkiTang-Gamybang

Herbs	Quantity(g)	
黃 芪	<i>Astragali Radix</i>	6.0
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
白 朮	<i>Atractylodis macrocephalae Rhizoma</i>	5.0
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4.0
當歸身	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	2.0
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	2.0
升 麻	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	1.2
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4.0
防 風	<i>Ledebouriellae Radix</i>	4.0
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4.0
荊 芥	<i>Schizonepetae Herba</i>	4.0
紫蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4.0
薄 荷	<i>Menthae Herba</i>	4.0
Totally		48.2

#### 2) 세포주

원위의 뇌세포에서 유래한 신경교세포주 C6 glioma cell은 한국 세포주 은행 (서울, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 조제

補中益氣湯加味方 2첩 분량 (96.4 g)을 3,000 ml 환저 플라스크에 증류수 1,500 ml와 함께 120분 가열하여 얻어진 추출액을 거르로 거른 다음, 원심분리기 (ependrof, Germany)를 이용하여 5,000 rpm으로 30분 원심 분리한 후 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 감압농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축한 다음, 동결건조하여 최종적으로 21.1 g (수득율 21.9%)의 補中益氣湯加味方 건조분말(BITG)을 얻어 시료로 사용하였다.

#### 2) 세포주

신경교세포주인 C6 glioma cell은 RPMI 배지에 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제 (Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양기에서 배양하였

다. 세포는 T-75 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세척한 다음, Trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 처리한 후 37°C에서 5분간 방치하였다가 세포를 채집하였다. 계대 배양은 2~3일에 1회씩 시행하였다.

#### 3) 세포 증식율에 미치는 영향 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 세포의 증식율에 미치는 영향은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay<sup>33)</sup>를 통해 확인하였다. C6 glioma cell을 96 well plate에 5×10<sup>3</sup> cell/well의 농도로 분주하고 배양기에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 24시간 동안 pre-incubation 시킨 후 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml의 농도로 각각의 시료를 처리한 다음 24시간 배양하였다. 그 후 MTT를 처리하여 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹이고, Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 세포 생존율에 미치는 영향 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 세포의 생존율에 미치는 영향은 trypan blue exclusion assay를 이용하였다. 100 mm dish에 각각 1×10<sup>6</sup> 개의 C6 glioma cell를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation 시킨 후 0, 250, 500, 1000 µg/ml 농도의 각각의 시료를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝난 후 세포를 부유시킨 다음 trypan blue (Sigma, USA)를 1:1 비율로 첨가하고 세포계수기 (Hemocytometer) 위에서 광학현미경으로 관찰하였다. 살아있는 세포의 갯수는 총 세포 갯수에서 trypan blue에 염색된 세포의 갯수를 차감하여 계산하였다.

#### 5) 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)의 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과는 MTT법<sup>33)</sup>을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 glioma cell를 96 well plate에 well 당 1×10<sup>4</sup>개씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 환경에 4시간 동안 방치한 다음 부착을 시행하였다. 세포의 부착이 끝난 후 각각의 시료를 처리하고 동일한 환경에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간 배양이 끝난 후 15 mM의 paraquat, 0.8 mM의 sodium nitroprusside (SNP), 0.5 mM의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 그리고 0.8 mM의 rotenone을 각각 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 환경에 4시간 동안 방치하였다. 4시간 동안의 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

#### 6) SOD 활성 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 미치는 superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 100 mm dish에 각각 1×10<sup>6</sup> 개의 C6 glioma cell를 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 24시간 동안 pre-incubation 시킨 후 500 µg/ml 농도로 각각의 시료를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, 세포를

수집한 다음 -20℃에서 20분간 냉동 후, 항온 수조를 이용하여 37℃에서 10분간 방치하기를 2회 반복하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄가 끝난 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 제조자가 제시한 지침에 따라 진행하였다. 측정된 Optical density (OD) 값으로부터 SOD 활성도를 계산하였으며, 계산 공식은 아래와 같다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \frac{(S1-S3)-(SS-S2)}{S1-S3} \times 100$$

S1: slope of enzyme blank  
S2: slope of sample blank  
S3: slope of blank SS: slope of Samples

### 7) Total glutathione 함량 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 미치는 total glutathione 함량은 Total glutathione Quantification kit (Dojindo, Japan)를 이용하여 측정하였다. SOD 활성 측정과 동일한 방법으로 효소액을 제조한 다음, Pseudo-end point method를 이용하여 glutathione 함량을 측정하였으며, 측정 과정은 제조사가 제시한 지침에 따라 진행되었다.

### 8) 지질과산화도 측정

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 미치는 지질과산화도 측정은 lipid peroxidation assay kit (Oxford, Englan)을 이용하여 malone dialdehyde (MDA) 함량을 발색반응을 통하여 측정하였다<sup>34,35</sup>. 지질과산화도 측정을 위하여 100 mm dish에 각각  $1 \times 10^6$  개의 C6 glioma cell를 분주하고 37℃, 5% CO<sub>2</sub>를 유지하면서 24시간 동안 pre-incubation시킨 후 250 μg/ml 농도로 각각의 시료를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, 세포를 수집한 다음 -20℃에서 20분간 냉동 후, 항온 수조를 이용하여 37℃에서 10분간 방치하기를 2회 반복하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄가 끝난 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 기질로 사용하였으며, 측정 과정은 제조사가 제시한 지침에 따라 진행하였다. 상층액의 단백질 함량 측정은 BCA protein assay kit (PIERCE, USA) 사용하였으며, 측정된 단백질 함량으로 결과값을 보정하였다. OD (optical density)값은 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 562 nm에서 광도를 측정하였으며, 단백질을 보정한 다음, 아무것도 처리하지 않은 처리군에 대한 백분율 (%)로 나타내었다.

### 3. 통계처리

제시된 모든 결과에 대한 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였다. 모든 결과에 대한 통계처리 방법은 Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 p-value가 0.05 미만일 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

## 실 험

### 1. 세포 증식율에 미치는 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 신경교세포주의 증식

율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 BITG를 농도별 (62.5, 125, 250, 500, 1000 μg/ml)로 처리하고 24시간 후 세포 증식율을 측정하였다. BITG를 처리하지 않았을 때의 세포 증식율을 100.00±0.97%라 하였을 때, BITG를 62.5, 125, 250, 500 μg/ml을 처리한 군에서는 각각 102.36±0.53%, 103.06±1.56%, 103.28±1.34%, 102.94±0.65%로 유의성 (p<0.05, p<0.01) 있는 증식율 향상을 보였으나 BITG 1000 μg/ml 처리군에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1).

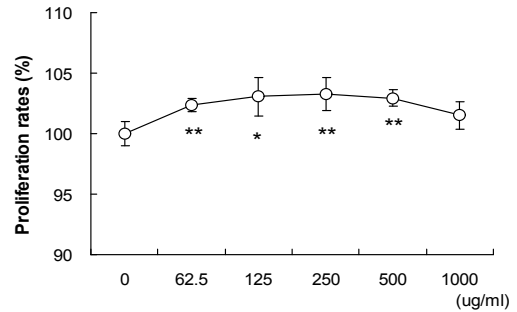


Fig. 1. Effects of BITG on proliferation rates of C6 glioma cells in vitro. C6 glioma cells were attached 96 well plate, and added BITG as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, proliferation rates were measured using MTT methods. BITG was BojunglkkkiTang-Gamybang freeze dried powder. The data were expressed as Means±SD of three independent experiments. \* : Statistically significant compared with Normal (non-treated) (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01).

### 2. 세포 생존율에 미치는 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 세포 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 BITG를 농도별 (250, 500, 1000 μg/ml)로 처리한 후 세포 생존율을 관찰하였다. BITG를 처리하지 않았을 때의 세포 생존율을 97.08±2.10%라 하였을 때, BITG를 농도별로 처리한 군에서는 각각 96.37±1.40%, 96.37±1.40%, 95.48±2.20%로 유의할 만한 세포 생존율 감소가 나타나지 않았다(Fig. 2).

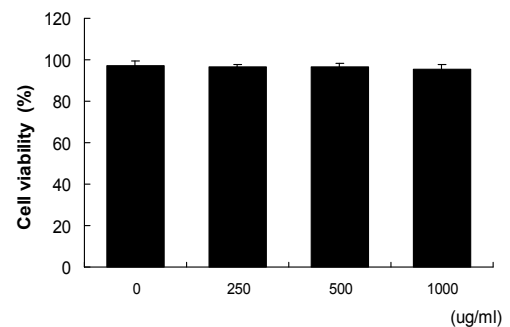


Fig. 2. Effects of BITG on cell viability of C6 glioma cells in vitro. C6 glioma cells were attached 100 mm plate, and added BITG as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, cell viabilities were measured using trypan blue exclusion methods. BITG was BojunglkkkiTang-Gamybang freeze dried powder. The data were expressed as Means±SD of three independent experiments.

### 3. Paraquat에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의한 세포 사

멸 방지 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 paraquat에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포 사멸을 방지할 수 있는지에 대하여 알아보고자 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BITG를 전처리하고, 15 mM의 paraquat를 처리한 다음 BITG의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. Chemical 단독 처리군에서는 chemical을 처리하지 않은 Naive군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.01$ ) 있게 감소하였고, 시료를 전처리한 후, paraquat를 처리한 군에서는 paraquat만 처리한 군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 증가하였다(Fig. 3).

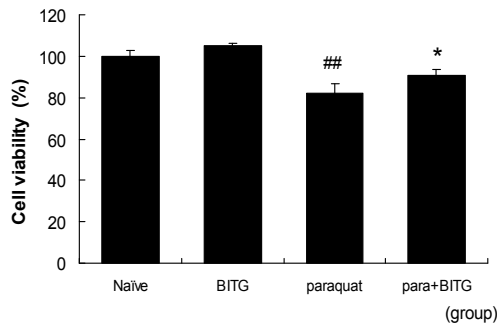


Fig. 3. Protective effects of BITG on Oxidative stress induced by paraquat in C6 glioma cells. C6 glioma cells were attached 96 well plate, and added 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BITG for 24 hrs. After 24 hrs incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hrs. BITG was BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder. Naive : non-treated normal BITG : only BITG treated, paraquat : only paraquat treated, para+BITG : BITG pre-treated then paraquat treated. The data were expressed as Means $\pm$ SD of three independent experiments. ## : Statistically significant compared with Naive ( $p<0.01$ ). \* : Statistically significant compared with chemical treated control ( $p<0.05$ ).

4. SNP에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 SNP에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포 사멸을 방지할 수 있는지에 대하여 알아보고자 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BITG를 전처리하고, 0.8 mM의 SNP를 처리한 다음 BITG의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. Chemical 단독 처리군에서는 chemical을 처리하지 않은 Naive군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 감소하였고, 시료를 전처리한 후, SNP를 처리한 군에서는 paraquat만 처리한 군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

5. Hydrogen peroxide에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포 사멸을 방지할 수 있는지에 대하여 알아보고자 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BITG를 전처리하고, 0.5 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 다음 BITG의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. Chemical 단독 처리군에서는 chemical을 처리하지 않은 Naive군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 감소하였고, 시료를 전처리

한 후,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 군에서는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만 처리한 군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 증가하였다(Fig. 5).

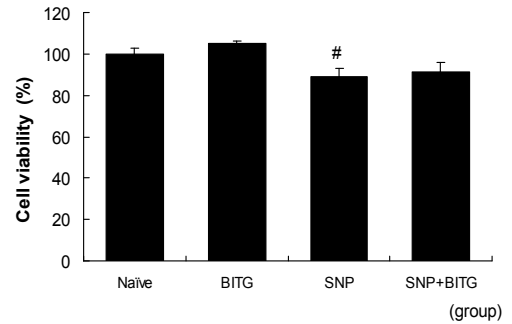


Fig. 4. Protective effects of BITG on Oxidative stress induced by SNP in C6 glioma cells. C6 glioma cells were attached 96 well plate, and added 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BITG for 24 hrs. After 24 hrs incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hrs. BITG was BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder. Naive : non-treated normal BITG : only BITG treated, SNP : only paraquat treated, SNP+BITG : BITG pre-treated then SNP treated. The data were expressed as Means $\pm$ SD of three independent experiments. # : Statistically significant compared with Naive ( $p<0.05$ ).

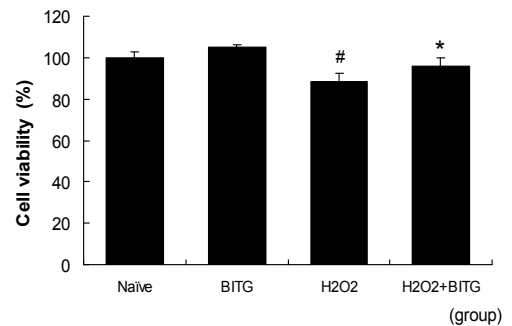


Fig. 5. Protective effects of BITG on Oxidative stress induced by Hydrogen peroxide in C6 glioma cells. C6 glioma cells were attached 96 well plate, and added 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of BITG for 24 hrs. After 24 hrs incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hrs. BITG was BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder. Naive : non-treated normal BITG : only BITG treated,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : only  $\text{H}_2\text{O}_2$  treated,  $\text{H}_2\text{O}_2$ +BITG : BITG pre-treated then  $\text{H}_2\text{O}_2$  treated. The data were expressed as Means $\pm$ SD of three independent experiments. # : Statistically significant compared with Naive ( $p<0.05$ ). \* : Statistically significant compared with chemical treated control ( $p<0.05$ ).

6. Rotenone에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 rotenone에 의하여 발생하는 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 세포 사멸을 방지할 수 있는지에 대하여 알아보고자 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 BITG를 전처리하고, 0.8 mM의 rotenone을 처리한 다음 BITG의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. Chemical 단독 처리군에서는 chemical을 처리하지 않은 Naive군에 비하여 세포 생존율이 유의성 ( $p<0.01$ ) 있게 감소하였고, 시료를 전처리한 후, rotenone을 처리한 군에서는 rotenone만 처리한 군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

7. SOD 활성에 미치는 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 SOD 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BITG를 처리한 후 기질의 산화에 대한 SOD의 저해율을 측정함으로써 SOD 활성도를 관찰하였다. 시료를 투여하지 않은 Naive군의 SOD 활성도는 75.25 $\pm$ 2.09%로 조사되었고, BITG군은 71.82 $\pm$ 2.60%로 나타나 두 군간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

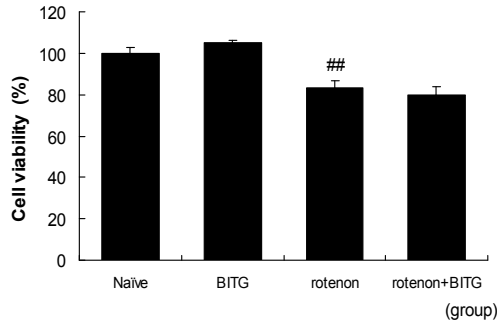


Fig. 6. Protective effects of BITG on Oxidative stress induced by rotenone in C6 glioma cells. C6 glioma cells were attached 96 well plate, and added 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of BITG for 24 hrs. After 24 hrs incubation, indicated concentration of paraquat was treated for 4 hrs. BITG was BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder. Naive : non-treated normal BITG : only BITG treated, rotenone : only rotenone treated, roten+BITG : BITG pre-treated then rotenone treated. The data were expressed as Means $\pm$ SD of three independent experiments. ## : Statistically significant compared with Naive ( $p < 0.01$ ).

8. Total glutathione 함량에 미치는 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 total glutathion 함량에 미치는 효과를 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BITG를 처리한 후 total glutathion 함량을 측정하였다. 시료를 투여하지 않은 Naive군의 total glutathion 함량은 26.32 $\pm$ 2.40 mM이었다. 그러나 BITG 처리군의 total glutathion 함량은 각각 23.83 $\pm$ 6.38 mM로 Naive군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의한 변화는 인정되지 않았다.

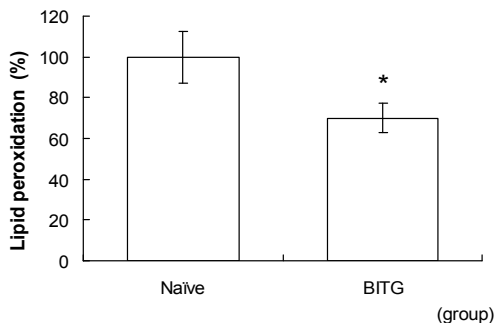


Fig. 7. Effects of BITG on levels of lipid peroxidation in C6 glioma cells. C6 glioma cells were attached 100 mm plate, and added 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of BITG for 24 hrs. BITG was BojunglkkiTang-Gamybang freeze dried powder. Naive : non-treated normal group, BITG : BITG treated sample group. The data were expressed as Means $\pm$ SD of three independent experiments. \* : Statistically significant compared with non-treated normal ( $p < 0.05$ ).

9. 지질과산화도에 미치는 효과

補中益氣湯加味方 건조분말 (BITG)이 lipid peroxidation에

미치는 효과를 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 BITG 건조분말을 처리한 후 lipid peroxidation 정도를 측정하였다. 시료를 투여하지 않은 Naive군의 lipid peroxidation을 100.00 $\pm$ 12.69%라 하였을 때, BITG를 처리한 군의 lipid peroxidation은 70.04 $\pm$ 7.20%로 나타나 Naive군에 비해 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

고찰

補中益氣湯은 東垣의 『脾胃論』<sup>10)</sup>에 “飲食失調, 寒溫不適, 則脾胃內傷, 喜怒憂恐, 勞役過度, 而損耗元氣”라 최초로 수록된 이래 許<sup>11)</sup>는 “治勞役太甚, 或飲食失調, 身熱而煩, 自汗倦怠”에 사용한다 하였고, 尹<sup>12)</sup>은 補氣升提와 益氣升陽의 基本方劑로 中氣下陷으로 인한 下垂 증상과 眩暈 등에 사용된다 하였으며, 鄭<sup>13)</sup>은 中氣不足 및 諸般 氣虛證에 사용되는 方劑로 脾胃氣虛로 인한 食少, 疲勞, 畏寒, 自汗, 發熱, 脈虛大無力, 中氣下陷, 內臟下垂 및 崩漏 등에 사용한다 하였다. 이 외에도 補中益氣湯은 中氣不足으로 인한 中풍, 심장질환 등에도 활용되었고<sup>14,15)</sup>, 근래에는 만성 두통, 만성위장염, 만성출혈증, 만성치관지염 등의 만성질환과 면역력 저하로 인한 각종 질환에도 응용되고 있다<sup>16)</sup>.

補中益氣湯에 관련된 연구 동향을 살펴보면, 박 등<sup>17)</sup>은 노화 촉진 생쥐에 補中益氣湯을 투여한 결과 간장 내 항산화작용이 있음을, 成<sup>18)</sup>은 rat의 피부섬유아세포, 사구체 메산지움세포 및 혈관 내피세포의 노화 지연에 대한 연구에서 세포 노화를 지연시키는 효능이 있음을, 박 등<sup>19)</sup>은 少陰人 補中益氣湯이 高血糖 白鼠의 항산화 작용에 효과가 있음을, 崔<sup>20)</sup>은 中風환자에 補中益氣湯 및 그 加味方을 투여한 결과 氣虛로 인한 中風 환자의 主症 및 兼症이 好轉되었음을 보고하였다. 또한 黃<sup>21)</sup>은 『東醫寶鑑』에 수록된 補中益氣湯加味方(春方)을 이용하여 정상 흰쥐의 국소 뇌혈류량과 평균 혈압에 유의한 효과가 있음을 보고하였다.

補中益氣湯加味方을 구성하고 있는 구성약물들의 항산화 관련 연구를 살펴보면, 黃芪<sup>22,23)</sup>의 항산화, 항당뇨 및 미백작용이, 人蔘<sup>24)</sup>의 항산화 작용이, 白朮<sup>25)</sup>의 항산화 및 미백효과가, 甘草<sup>25)</sup>의 항산화 활성 및 안정성 조사가, 當歸<sup>26)</sup>의 항산화 효과가, 陳皮<sup>27)</sup>와 川芎<sup>27)</sup>의 항산화 활성과 미백효과가, 升麻<sup>28)</sup>의 항산화 활성 및 nitric oxide 생성 억제 활성이, 防風<sup>29)</sup>의 항산화 효능이 보고되었다. 또한 柴胡<sup>30)</sup>가 고지방식을 급여한 흰쥐의 혈청지질 및 항산화계에 미치는 효과가, 荊芥<sup>30)</sup>와 紫蘇葉<sup>30)</sup>의 정유성분이 생물활성 작용이, 薄荷<sup>31)</sup>가 in vitro상에서 항산화 활성작용이 있음이 보고되어 補中益氣湯을 구성하는 藥物 모두 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다.

최근, 우리나라는 생활 습관의 서구화와 노인 인구의 증가로 노화의 속도가 빠르게 진행되고 있으며, 뇌혈관 질환의 발생빈도나 사망률 등도 증가하고 있다<sup>1)</sup>. 특히 여러 가지 사회적 환경 변화 등으로 고령화에 따른 허혈성 뇌혈관 장애가 증가되다<sup>2)</sup>.

노화에 대한 이론은 자유 유리기이론 (the free-radical theory)으로 주요원인은 산화 촉진 물질인 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 이 외에도 cyclooxygenase-2 (COX-2),

xanthine dismutase oxidase, NADPH oxidase와 같은 ROS를 생성하는 효소들이 중요한 역할을 하고 있다<sup>4)</sup>. 인체는 이러한 산화 촉진 물질과 산화억제 물질들이 균형을 이루고 있다가 나이가 들면서 이러한 평형이 깨져 산화촉진 쪽으로 반응이 기울면 세포 내 반응성이 큰 산소 화합물의 생성이 증가되면서 산화적 스트레스가 증가되어 노화반응이 나타난다<sup>3)</sup>. 이들을 억제 또는 제거하는 항산화 효소로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH) peroxidase 등이 있다<sup>6)</sup>. 이러한 항산화제를 통해 Biesalski 등<sup>8)</sup>은 만성질환을 예방할 수 있다 하였고, Fairfield 등도 뇌혈관질환, 허혈성 심혈관계질환 등의 위험율을 감소시킨다<sup>9)</sup> 하였다.

이를 토대로 노화 등의 만성질환과 심뇌혈관계 질환들이 항산화제를 통해 예방 또는 억제할 수 있다는 보고 및 補中益氣湯 구성 약물들과 같이 단일약물을 활용해 항산화 효과가 있음을 보고하고 있으나 복합제제를 이용한 항산화 효과 및 세포사멸 효과 등은 미흡한 실정이다. 또한 補中益氣湯加味方이 뇌혈류량에 유의한 효과를 보임에도 불구하고 항산화 효과에 대한 보고는 아직까지 접하지 못하였다.

이에 補中益氣湯加味方을 이용하여 신경교세포주인 C6 glioma cell에 투여한 후 세포 증식율 및 생존율, 산화 촉진 물질인 각종의 산화적 스트레스 유발 물질을 처리한 후 세포 사멸 보호에 미치는 효과, 산화 억제 물질 활성화에 미치는 항산화 효과 등을 관찰하고자 하였다.

補中益氣湯加味方을 이용하여 C6 glioma cell에 미치는 효과를 관찰한 결과, 補中益氣湯加味方 건조분말은 C6 glioma cell에 대하여 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에서 유의한 수준의 세포 증식율 증가가 나타났고 이러한 증가추세는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  투여군까지 지속되었다. 그러나 최고 농도인 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하 농도의 補中益氣湯加味方 건조분말 처리군보다 세포 증식율이 낮아져 아무것도 처리하지 않은 처리군 수준으로 돌아갔다(Fig. 1). 또한, 세포 생존율을 조사한 결과, 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 3가지 농도에서 특별한 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 補中益氣湯加味方이 각종 자극으로 인한 뇌신경 세포의 손상을 회복시킬 가능성이 있음을 시사하며, 생체 내에서 특별한 독성이 없이 비교적 안전하게 사용될 수 있음을 시사한다. 또한 상기 결과에 따라 補中益氣湯加味方 건조분말의 최소 유효 농도는 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상으로 결정할 수 있었으며, 이후 모든 실험에서는 가장 좋은 효과를 보인 농도인 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 사용하였다.

생물체는 대사를 통하여 에너지를 얻는 과정에서 산소 호흡을 필요로 하고, 이때 소모되는 산소의 2~3%는 필연적으로 활성 산소(ROS)로 전환된다<sup>37,38)</sup>. 생체 대사 과정에서 발생하는 대표적인 활성 산소로 Superoxide, Singlet oxygen, hydroxyl radical와 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 등이 있으며, 이들은 화학적으로 매우 불안정하여 쉽게 다른 조직과 결합으로써 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발한다<sup>5)</sup>. 생체 내에서 산화적 스트레스는 세포나 조직을 손상시키기 때문에 제거되어야 하며, 이를 위해 산소를 이용하는 생체는 효율적인 항산화 체계를 갖고 있다<sup>7)</sup>. 그러나 생체가 가진 항산화 체계의 한계를 벗어나는 정도

의 산화적 스트레스가 발생하면 세포 단위에서 apoptosis 등과 같은 방법을 통하여 세포가 사멸하게 되고, 이러한 기전은 노화 뿐 아니라 암, 심장질환, 염증 및 radiation injury 등의 여러 가지 질병 전변에 관여된다<sup>39,40)</sup>.

신경교세포주 증식율에 증가 효과를 나타낸 補中益氣湯加味方 건조분말이 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있는 4가지 chemical의 처치에 의해 발생하는 세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 살펴보았다. 본 연구에 사용된 산화적 스트레스 유발 물질로는 그라목손(Gramoxone)으로 알려져 있는 강력한 제초제 중 주로 중독 작용 및 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 일으키는 자극원으로 실험실에서 사용되는 paraquat<sup>41,42)</sup>, 산화적 스트레스를 일으켜 신경세포나 혈관 내피세포에 손상을 주는 것으로 알려진 sodium nitro-prusside (SNP) 및 hydrogen peroxide<sup>43)</sup>, 그리고 농약이나 살충제 용도로 사용되면서 생체 내 각종 세포에 산화적 손상을 주어 apoptosis를 유발하는 rotenone<sup>44,45)</sup> 등 4가지의 chemical을 사용하였다.

본 연구 결과, paraquat는 C6 glioma cell의 생존율을 유의한 수준으로 감소시켰지만 補中益氣湯加味方 건조분말을 전처리하였을 때는 유의한 수준의 세포 사멸 보호 효과를 발휘하였다(Fig. 3). 또한, 직접적인 세포살해 효과를 가지는 hydrogen peroxide 역시 유의한 수준으로 세포 생존율을 감소시킨데 대하여 補中益氣湯加味方 건조분말을 전처리하였을 때는 유의한 수준의 세포 사멸 보호 효과를 발휘하였다(Fig. 5). 그러나 SNP 및 rotenone 처리군에서는 補中益氣湯加味方 건조분말의 전처리가 특별한 세포 사멸 보호효과를 발휘하지 못하였다(Fig. 4, 6). 이러한 결과는 補中益氣湯加味方의 항산화 효과에 대한 증거로 해석될 수 있으며, 각각의 chemical에 대하여 서로 다른 효과를 낸 것에 대해서는 해당 chemical이 가지는 특정한 기전에 대한 억제나 제어 효과 관련한 후속 연구를 통하여 명확한 기전을 연구해야 할 것으로 생각된다.

본 연구 결과에서 補中益氣湯加味方 건조분말 전처리는 paraquat 및 hydrogen peroxide에 의하여 발생하는 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지하는 효과를 보였다(Fig. 3, 5). 따라서 이러한 세포 사멸 방지 효과가 어떤 기전을 통하여 발휘되는지 확인하기 위하여 생체 내의 대표적인 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)와 glutathione (GSH) 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

생체 내에서 가장 대표적 항산화 효소인 SOD는 세포에 해로운 superoxide를 hydrogen peroxide로 전환시키는 반응에 관여하는 효소이다<sup>2)</sup>. GSH는 대표적인 항산화제로 free radical과 hydrogen peroxide와 같은 ROS로부터 세포를 보호해 주는 역할을 하고, 대부분은 환원형으로 존재하며, ROS에 의하여 산화되면서 항산화 활성을 발휘하게 된다<sup>47)</sup>.

본 연구 결과, 補中益氣湯加味方의 건조분말 처리는 SOD 및 total glutathione의 농도에 특별한 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과로부터 補中益氣湯加味方의 세포 사멸 방지 효과가 항산화 효과에 기인하기는 하지만, SOD나 GSH와 같은 세포내 항산화 효소계와는 무관한 기전을 통하여 이루어 질 수 있다는 가

설을 세울 수 있었다. 또한, SOD나 GSH를 제외한 또 다른 항산화 효소가 세포 사멸 방지 기전에 관여할 가능성도 생각할 수 있어 계속적인 연구를 통해 補中益氣湯加味方の 생체 내 항산화 관련 기전 연구는 계속되어야 할 것으로 생각된다.

지질과산화는 세포의 지질성분인 불포화 지방산에 활성산소가 첨가되어 과산화된 지질을 말하는 것으로, 이러한 현상은 세포막의 주요 구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성 산소와 결합하여 생기게 된다<sup>48)</sup>. 생체조직 중에서 산화를 받기 쉬운 불포화지방산을 많이 함유하고 있는 곳은 생체막으로, 생체막의 산화는 자동산화로 free radical 연쇄반응에 의하여 malone dialdehyde (MDA)가 생성되고, 지질과산화도는 이를 측정함으로써 항산화 효과를 판단하는 하나의 지표로 활용된다<sup>49)</sup>. 본 연구 결과, 補中益氣湯加味方 건조분말 처리군은 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 유의한 수준으로 지질과산화도를 감소시켰다(Fig. 7). 이러한 결과 역시 補中益氣湯加味方이 항산화 효과를 가지고 있음을 시사하며, 지질막인 세포막의 파괴 정도가 감소한 것으로도 해석되기 때문에 상기한 chemical에 대한 연구 결과와 동일한 맥락으로 해석된다.

복합처방을 이용한 연구 중, 이<sup>50)</sup>는 가미소요산을 활용해 DPPH free radical 소거능 및 ABTS radical cation 생성 등을 위주로 항산화 효과를 관찰하였고, 하<sup>51)</sup>는 스트레스로 위점막을 손상시켰을 때 귀비탕보다는 자음견비탕, 자음견비탕보다는 분심기음이 우수한 항산화 효과가 있음을 보고하였으나 본 연구와는 상이한 방법으로 진행된 결과로 비교 관찰하기는 어려웠다. 그러나 다양한 연구기법을 활용해 항산화 효과 및 세포사멸 보호효과를 관찰할 수 있는 만큼 이후에도 補中益氣湯加味方을 활용해 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과, 補中益氣湯加味方은 세포독성은 없으면서도 오히려 세포의 증식을 촉진시켜주며, 또한 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포의 손상을 방지해 주는 것으로 나타났다. 이와 같은 세포 손상 방지 효과는 SOD나 glutathione과 무관한 것으로 생각되지만 지질과산화도를 낮추는 것으로 보아 다양한 항산화 관련 기전을 앞으로도 더욱 진행해야 할 것으로 보인다. 또한, 補中益氣湯加味方이 뇌신경세포의 손상을 보호하는 것으로 보아 뇌허혈시 나타나는 뇌손상에도 효과가 있을 것으로 보여 이에 대한 연구도 진행되어야 할 것으로 판단된다.

## 결 론

補中益氣湯加味方이 신경교세포주인 C6 glioma cell에 미치는 세포 증식을, 세포 생존율, 산화적 스트레스에 의한 사멸 보호 및 항산화 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

補中益氣湯加味方이 세포 증식을 및 생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과, 補中益氣湯加味方 (62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상) 처리군은 세포 증식을 유의성 있게 증가시켰으나 세포 생존율에서는 補中益氣湯加味方 처리군 모두에서 세포 독성이 나타나지 않았다. 補中益氣湯加味方이 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지 효과를 관찰한 결과, 補中益氣湯加味方은 paraquat와 hydrogen

peroxide의 자극에 의한 세포 사멸을 유의성 있게 방지하였으나 SNP와 rotenone에 대해서는 특별한 보호 효과를 나타내지 않았다. 補中益氣湯加味方이 항산화 효소계에 미치는 영향을 관찰한 결과, SOD의 활성 및 total glutathione 함량에 대하여 특별한 영향을 나타내지 않았다. 그러나 지질과산화도에 미치는 영향을 관찰한 결과에서는 補中益氣湯加味方 처리군은 유의성 있게 지질과산화도를 감소시켰다.

이러한 결과로부터 본 저자들은 補中益氣湯加味方이 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포의 손상을 방지해 줄 것으로 생각하며, 이러한 세포 손상 방지 효과는 SOD나 glutathione과는 다른 항산화 관련 기전이 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 통계청. 사망원인 통계 연보. 통계청, 2008.
2. 김영석. 임상중풍학. 서울, 서원당, pp 67, 303-308, 317-329, 345, 431, 436-453, 545-546, 1997.
3. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922, 1993.
4. Kim, H.J., Kim, K.W., Yu, B.P., Chung, H.Y. The effects of age on cyclooxygenase-2 gene expression ; NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. Free Radical Biol. Med. 28: 683-692, 2000.
5. PaPa, S. and Skulachev, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol. Cell. Biochem. 174: 305-319, 1997.
6. Adelman, R., Saul, R.L., Ames, B.N. Oxidative damage to DNA ; relation to species metabolic rate and life span. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 2706-2708, 1988.
7. Slavić, M., Appiah, I., Nikolić-Kokić, A., Radojčić, R., Jones, D.R., Spasić, M.B., Milovanović, S., Blagojević, D. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. Acta Physiol Hung. 93(4):335-339, 2006.
8. Biesalski, Hans, K. 만성질환과 항산화비타민의 예방 효과. 대한약사회지 27: 79-87, 1997.
9. Fairfield, K.M., Flecher, R.H. Vitamin for Chronic Disease prevention in Adults-Scientific review. JAMA. 287(23):3116-3126, 2002.
10. 李東垣. 東垣十種醫書. 서울, 大星文化社, pp 35-37, 86-87, 635-636, 1983.
11. 許 浚. 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp 106, 359-366, 433-434, 1983.
12. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說, 서울, 醫聖堂, pp 485-502, 2002.
13. 鄭光油. 東垣學說論文集. 북경, 인민위생출판사, pp 13-24, 178-182, 1983.

14. 朴炳昆. 漢方臨床40年. 서울, 대광문화사, pp 38-46, 276-278, 1992.
15. 유지윤. 中醫臨床特講. 서울, 書苑堂, pp 148-151, 1986.
16. 神戸中醫研究學會, 天真處方解説, 서울, 成輔社, pp 45-49, 1995.
17. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 大韓本草學會誌 18(4):175-191, 2003.
18. 성기원. 六味地黃湯 및 補中益氣湯이 rat의 피부섬유아세포, 사구체 메산지움세포 및 혈관내피세포의 노화지연에 미치는 영향. 경희대학교 대학원, 2002.
19. 朴宣東, 徐教洙, 朴元煥. 補中益氣湯과 少陰人 補中益氣湯 및 그 構成藥物群이 高血糖 白鼠의 抗酸化 效果에 미치는 影響. 大韓本草學會誌 16(2):113-126, 2001.
20. 최인선. 補中益氣湯 및 그 加味方을 투여한 중풍환자에 대한 임상적 고찰. 동의대학교 대학원, 2004.
21. 황귀성. 加味補中益氣湯 추출물이 흰쥐의 국소 뇌혈류량과 평균 혈압에 미치는 영향. 동신대학교 대학원, 2008.
22. 윤 유, 허성일, 정미정, 왕명현. 연근별 황기의 항산화 및 항당뇨 활성 평가 고찰. 생약학회지 40(1):1-5, 2009.
23. 김일출, 허상선. 황기, 백출 및 오가피의 항산화성 및 미백효과에 관한 연구. 韓國油化學會誌 26(2):110-116, 2009.
24. 김은혜, 이동권. 인삼의 항산화 작용. 고려인삼학회지 33(1):1-7, 2009.
25. 김수정, 권대혁, 이종화. 감초의 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 안정성 조사. 한국식품과학회지 38(4):584-588, 2006.
26. 안준철, 문진영, 임종국. 當歸 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 13(2):254-262, 1996.
27. 김성환, 김일출. 두충, 단삼, 진피 및 천궁의 항산화 활성 및 미백 효과. 동아시아식생활학회지 18(4):618-623, 2008.
28. 조향순. 촛대 승마와 황새 승마 뿌리의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성 억제 활성. 중앙대학교 의약식품대학원, 2007.
29. 민상홍. 사삼, 양유근 및 해방풍의 항산화 효능 비교 연구. 경원대학교 대학원, 2006.
30. 오장근, 해표약 정유성분의 생물활성에 관한 연구. 전남대학교 대학원, 2005.
31. 이승은, 한희선, 장인복, 김금숙, 신유수, 손영득, 박충범, 성낙술. 박하의 in vitro 항산화활성. 대한약용작물학회지 13(6):255-260, 2005.
32. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 125-128, 131-132, 142-144, 149-152, 347-349, 409-410, 531-533, 534-537, 540-541, 578-580, 1999.
33. Mari, M., Seiji, K., Kenji, F., Airo, T. and Toshimasa, N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MfT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 209(5):413-421, 2006.
34. Esterbauer, H. and Cheesman, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 186: 407-421, 1990.
35. Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Rad. Biol. Med. 9(6):515-540, 1990.
36. 이 은, 이장천. 柴胡(Bupleuri Radix)추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청지질 및 항산화계에 미치는 影響. 大韓韓方方劑學會誌 11(1):151-159, 2003.
37. Lee, S.O., Kim, M.J., Kim, D.K and Choi, H.J. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from Inonotus obliquus. Korean J. Food Sci. Nutr. 34: 139-147, 2005.
38. 조숙현, 최용조, 노치웅, 최철웅, 김덕송, 조성환. 대나무수액의 활성산소 소거활성과 세포독성. 한국식품저장유통학회지 15(1):105-110, 2008.
39. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. Alcohol-related cirrosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. Arch. Immunol. Ther. Exp. 49: 19-22, 2001.
40. Sranely Mainzen Princem, P. and Menon, V.P. Antioxidant action of Tinospora cordifolia root extract in alloxan diabetic rats. Phytother. Res. 15: 213-217, 2001.
41. Wills, B.K., Aks, S., Maloney, G.E., Rhee, J., Brand, R., Sekosan, M. The effect of amifostine, a cytoprotective agent, on paraquat toxicity in mice. J Med Toxicol. 3(1):1-6, 2007.
42. Krasowska, A., Sigler, K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds-phenolics and amine N-oxides. Folia Microbiol (Praha). 52(6):585-592, 2007.
43. Thais, P. Maria, B.M., Alcir, L.D., Marcelo, F., Joao, B.T. da R., Cristina, W.N., Gilson, Z., Jovino, dos S.F., Rodrigo, B.L., Jeferson, L.F. Antioxidant effects of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes ; An in vitro evaluation. Chemico-Biological Interactions 164: 126-135, 2006.
44. Molina-Jiménez, M.F., Sánchez-Reus, M.I., Andres, D., Cascales, M., Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Brain Res. 29, 1009(1-2):9-16, 2004.
45. Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F.A., Tirmenstein, M.A., Fariss, M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. Chem Biol Interact. 21, 138(3):267-284, 2001.
46. Corpas, F.J. The expression of different superoxide



- dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physio.* 47(7):984-994, 2006.
47. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1499-1503, 2003.
48. McCord, J. M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163, 1985.
49. Ostrea, E.M.Jr., Cepeda, E.E., Fleury, C.A., Balun, J.E. Red Cell Membrane Lipid Peroxidation and Hemolysis Secondary to Phototherapy. *Acta Paediatr Scand.* 74(3):378-381, 1985.
50. 이성한, 가미소요산의 항산화 교과 및 신경세포 보호효과. 경희대학교 대학원, 2009.
51. 하 장, 귀비탕, 자음건비탕, 분심기음이 stress로 유발된 위점막 손상의 치료효과에 대한 비교연구. 상지대학교 대학원, 2006.