

## 계혈등 물추출물의 항산화 및 간보호효과

이재준, 최홍식\*, 김승모

대구한의대학교 한의학과 간계내과학교실

### Antioxidant Effect and Liver Protection Effect of *Spatholobi Caulis* Water Extract

Jae-Jun Lee, Hong-Sik Choi\*, Seung-Mo Kim

Department of Oriental Internal Medicine, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study investigated whether the water extract of *Spatholobi Caulis* (SCE) has the ability to protect hepatocyte against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide (tBHP) in vitro and CCl<sub>4</sub> in vivo.

**Methods :** In vitro, HepG2 cells pre-treated with *Spatholobi Caulis* water extract (1, 3, 10, 30 μg/ml) for 12h and further incubated with tBHP (100 μM) for the next 12h. Cell viability was assessed by MTT assay. In vivo, rats were orally administrated with the aqueous extract of *Spatholobi Caulis* (SCE; 50, 100 mg/kg) for 4 days and then, injected with CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg body weight to induce acute liver damage.

**Results :** Treatment with SCE inhibited cell death induced by tBHP, as evidenced by alterations in the levels of the proteins associated with apoptosis: SCE prevented a decrease in Bcl<sub>2</sub>, and cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase and pro-caspase-3. Moreover, SCE inhibited the ability of tBHP to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, thereby restoring GSH content. Moreover, SCE treatments in rats effectively decreased liver injuries induced by a single dose of CCl<sub>4</sub>, as evidenced by decreases in hepatic degeneration and inflammation as well as plasma alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase activities. Consistently, treatments of SCE also protected liver in rats stimulated by CCl<sub>4</sub>, as indicated by restoration GSH and prevention of MDA in the liver.

**Conclusions :** SCE has the ability 1) to protect hepatocyte against oxidative stress induced by tBHP and 2) to prevent CCl<sub>4</sub>-inducible acute liver toxicity. Present findings may be informative not only in elucidating the pharmacological mechanism of *Spatholobi Caulis*, but in determining its potential application for oxidative cellular damage in the liver.

**Key words :** *Spatholobi Caulis*, oxidative stress, hepatoprotective activity

## 서론

음주 및 다양한 외부 자극에 의한 만성간질환의 증가로 국내 간암 발생률은 2007년을 기준으로 전체 암 중에서 5위를 차지하고 있으며, 특히 50대 남성의 경우 질병으로 인한 사망 원인 중 간암으로 인한 경우가 1위에 이른다<sup>1)</sup>. 이로 인한 사회경제적 손실이 막중하여 만성 간질환의 치료 및 간보호를 위한 새로운 약물의 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

간은 단백질 합성과 해독 기능을 포함하여 말초기관과 생체 에너지 대사를 균형있게 통합 조절하는 인체대사의 중심 기관으로, 간의 기능은 전사인자의 활성화 내지 불활성화를

매개한 유전자의 발현을 통해 조절된다<sup>2-4)</sup>. 간이 약물이나 독성물질을 해독하는 과정에서 반응성이 높은 중간물질 및 활성 산소 (ROS : reactive oxygen species)가 생성되어 단백질 및 DNA의 변형을 유도하고 독성에 대한 감수성을 증가시킨다. 또한 만성적인 간손상에서는 반복되는 상처와 치유의 과정을 거치면서 염증반응이 유발되고, 다양한 염증인자들에 의해 세포막이 과산화 되어 세포사멸신호를 개시한다<sup>5-9)</sup>. 따라서 염증 및 산화적 스트레스는 지방간, 간염, 간경화, 간암을 포함하는 만성 간질환에서 전형적으로 발현되는 특징이라고 할 수 있다.

산화적 스트레스가 병적인 상태를 유발하게 되면, 체내 항

\*교신저자 : 최홍식, 대구시 수성구 신천동로 136, 대구한의대학교 한의학과 간계내과학교실.  
· Tel : 010-5116-1461, · Fax : 053-770-2189, · E-mail : cheldu@unitel.co.kr.  
· 접수 : 2011년 7월 25일 · 수정 : 2011년 9월 5일 · 채택 : 2011년 9월 17일

산화 시스템은 산화적 스트레스를 제거하여 항상성을 유지하게 한다. 이러한 항산화 시스템은 항산화 유전자의 발현을 통해 과도한 활성산소를 제거함으로써 정상적인 세포기능을 유지시킨다. Glutathione (GSH)는 포유동물의 세포에서 가장 흔하게 존재하는 nonprotein thiol로서 산화적 스트레스에 대항하여 electrophiles 및 ROS를 제거하는 등 중요한 기능을 담당한다. GSH는 산화환원 항상성을 유지하고 peroxide를 제거하며 xenobiotics의 해독작용에도 중요하다<sup>10)</sup>. 이외에도 인체에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) 등을 포함하는 항산화 관련 해독 효소 및 Vitamin C,  $\alpha$ -tocopherol 등을 포함하는 항산화 물질들이 존재한다<sup>9,11-13)</sup>. 이러한 항산화 효소 및 물질은 체내 대사과정에서 발생하는 활성산소를 적극적으로 억제함으로써, 이를 손상시키는 체외의 어떤 요인이 발생하지 않을 경우 산화-환원의 균형을 유지한다.

계혈등 (*Spatholobi Caulis*)은 콩과 (Leguminosae)에 속한 落葉 木質大藤本인 密花豆 (*Spatholobus suberectus* DUNN)의 등경(藤莖)을 건조한 것으로, 일부 연구에서 항산화 효과가 보고되어 있지만 산화적 스트레스에 의한 간세포의 손상에 대한 효과 연구 보고가 아직 없는 상태이다.

본 연구에서는 계혈등의 물추출물 (SCE; *Spatholobi Caulis* Water Extract)의 산화적 스트레스에 의해 유도되는 간독성에 대한 세포보호효과를 평가하고자, *in vitro* 모델에서 HepG2 cell의 *tert*-butylhydroperoxide (tBHP)로 유도되는 세포독성에 대한 SCE의 억제효과를 평가하였고, *in vivo* 모델에서 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)로 유발되는 rat의 급성 간손상에 대한 SCE의 간보호효과를 평가해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. SCE의 제조

계혈등은 대원약업사 (대구, 한국)에서 구입하여 관능평가를 한 후, 200 g을 물 1.5 L에 넣고 3시간 전탕한 후 추출물을 거여조로 1차 여과하고 3000×g에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후의 상층액만을 취하여 0.2  $\mu$ m filter (Nalgene, New York, USA)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하고, 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에서 동결시켰다. 동결된 계혈등 추출물을 동결건조기 (Labconco, USA)로 동결 건조하여 추출물 15.36 g을 얻었으며, 사용 때까지 -20°C에서 보관하였다. SCE의 수율은 7.68 %였으며 *in vitro*처리시에는 배지 (DMEM; Dulbecco's modified eagle's medium)에 녹여 사용하였으며, *in vivo*실험에서는 H<sub>2</sub>O에 녹여 사용하였다.

### 2. 시약

DMEM, fetal bovine serum (FBS), penicillin 및

streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. tBHP, metaphosphoric acid (MPA), -(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), CCl<sub>4</sub> 및 olive oil은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. BCl<sub>2</sub> antibody는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였고, Poly ADP ribose polymerase (PARP), pro-caspase-3 및 actin antibody는 Santacruz Biotechnology Inc. (Santacruz, CA, USA)에서 구입하였다. Nitrocellulose transfer membrane (NC membrane)은 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)에서 구입하였다.

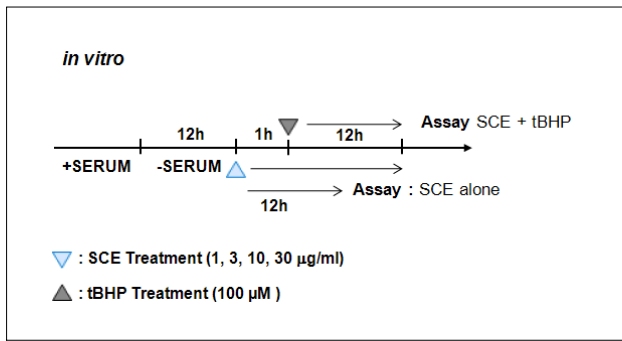
### 3. HepG2 Cell과 tBHP를 활용한 *in vitro* 모델의 SCE 효과 실험

#### 1) 세포배양

사람 간암 세포 유래 hepatocyte cell line인 HepG2 cell은 American Type Culture Collection (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 환경이 유지되는 incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

#### 2) 세포 생존율 측정

HepG2 cell을 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 FBS가 10% 함유된 DMEM 배지로 24 h 동안 배양하고, 약물(SCE)의 효능을 최대한으로 관찰하기 위해 FBS가 고갈된 배지로 12 h 동안 더 배양하였다. SCE는 1, 3, 10, 30  $\mu$ g/ml의 농도로 tBHP를 처리하기 1 h 전에 처리하였고 100  $\mu$ M의 tBHP를 처리 후에 12시간 동안 배양하였다. 세포 생존율은 MTT (1 mg/ml in PBS)를 300  $\mu$ l 씩 넣어 4시간 배양한 후에 MTT를 완전히 제거시킨 다음, 살아있는 세포에 의해 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. SCE 단독처리에 대한 독성은 HepG2 cell을 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 FBS가 10% 함유된 DMEM 배지로 24 h 동안 배양하고 FBS가 고갈된 배지로 12 h 동안 더 배양한 후에 SCE를 1, 3, 10, 30  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 12시간 후에 MTT assay로 측정하였다(Scheme 1). 세포의 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. (Scheme 1) [i.e. cell viability (% control) =  $100 \times (\text{absorbance of treated sample}) / (\text{absorbance of control})$ ].



Scheme 1. Schedule of SCE and tBHP treatment *in vitro*

3) Total cell lysates 준비

HepG2 cell을 10 cm<sup>2</sup> plastic dish에 1×10<sup>6</sup> cells/dish로 분주한 다음 SCE를 10, 30 µg/ml의 농도로 1시간 전처치한 후 tBHP 100 µM을 처치하여 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 HepG2 cell을 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 2차례 세척하고, cell을 scrapper로 수거하여 tube에 넣고, 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mg/ml leupeptin와 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 함유하는 buffer 100 µl를 넣어 용해하였다. Buffer와 cell이 들어 있는 tube를 얼음 위에 방치하면서 vortex한 후, 10,000×g로 4℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

4) 핵분획의 준비

HepG2 cell을 10 cm<sup>2</sup> plastic dish에 1×10<sup>6</sup> cells/dish로 분주한 다음 SCE를 10, 30 µg/ml의 농도로 1시간 전처치한 후 tBHP 100 µM을 처치하여 12시간 동안 배양하였다. 배양 후 HepG2 cell을 차가운 PBS로 2차례 세척하고, cell을 scrapper로 수거하여 tube에 넣고, 3000×g로 10분간 원심분리한 후 10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT와 0.5 mM PMSF를 함유하는 buffer 100 µl를 넣어 용해하였다. Buffer와 cell이 들어 있는 tube를 얼음 위에 10분간 방치한 후 7800×g로 4℃에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT와 1 mM PMSF를 함유하는 buffer 50 µl를 넣고 1시간 동안 얼음 위에 방치하면서 vortex하고 14,000×g로 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다.

5) 단백질의 분석

단백질의 발현을 관찰하기 위하여, 정량화된 용량으로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에 전기영동시킨 후 단백질을 NC membrane으로 transfer하였다. 이 membrane을 blocking buffer (5% non-fat milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS 용액)로 2시간 blocking한 후, Bcl<sub>2</sub>, PARP, pro-caspase-3, actin의 antibody를 PBS에 희석하여 반응시켰다. 반응 후

0.1% Tween 20을 함유한 PBST 용액으로 세척한 다음, secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis를 위해 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

6) ROS 측정

HepG2 cell을 24 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 배양한 후 PBS로 2차례 세척하고 SCE를 30 µg/ml의 농도로 12시간 동안 배양하였다. 배양한 HepG2 cell에 tBHP 100 µM을 1시간 동안 처치한 뒤에 DCFH-DA 10 µM로 30분간 반응시켜 생성된 DCF의 형광도를 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model infinite M200, Huntsville, AL)를 사용하여 여기 파장 485 nm, 방출 파장 530 nm에서 측정하였다.

7) GSH의 측정

HepG2 cell을 10 cm<sup>2</sup> plastic dish에 1×10<sup>6</sup> cells/dish로 분주한 다음 SCE를 30 µg/ml의 농도로 12시간 전처치한 후 tBHP 100 µM을 처치하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 수거한 HepG2 cell의 pellet에 5% MPA buffer 500 µl를 넣고 glass homogenizer로 마쇄하여 균질화시킨 후 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)를 사용하여 측정하였다.

4. rat와 CCl<sub>4</sub>를 이용한 급성 간손상 *in vivo* 모델의 SCE 효과 실험

1) 실험동물의 사육

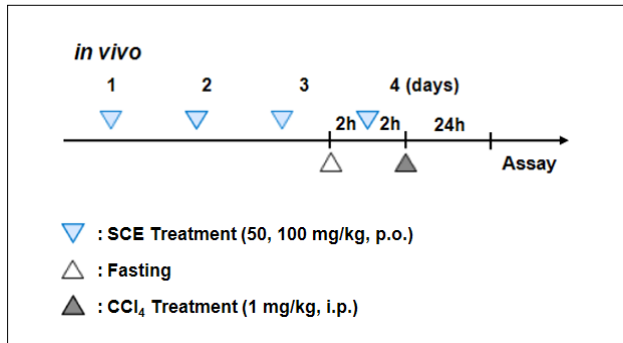
실험동물은 6주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (180-200 g)를 효창사이언스 (대구, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 동물실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23℃, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 실험동물의 처치

각 실험군은 5마리로 배정하였으며, 아무런 처리를 하지 않은 군을 Normal군으로 하고 간손상을 유도하는 CCl<sub>4</sub> (1 mg/kg, i.p.)만을 투여한 군을 CCl<sub>4</sub>군으로 하였으며, CCl<sub>4</sub>(1 mg/kg, i.p.)와 SCE를 50 mg/kg로 투여한 50 mg/kg SCE군, CCl<sub>4</sub>(1 mg/kg, i.p.)와 SCE를 100 mg/kg로 투여한 100 mg/kg SCE군으로 나누어 실시하였다.

SCE는 50 mg/kg와 100 mg/kg의 농도로 총 4일 동안 경구투여 하였다. 3일 동안은 하루 1회씩 식이를 자유롭게 공급하는 상황에서 SCE를 경구투여하였고, 4일 째에는 SCE 투여 2시간 전부터 사료섭취를 중지시킨 후에 SCE를 경구투여 하였다. 또한 4일 째에는 SCE 투여 후 2시간이 더 지난 다음에 CCl<sub>4</sub> (1 mg/kg, i.p.)를 투여하여 급성 간독성을 유발하였다. CCl<sub>4</sub> 투여 24시간 후에 모든 실험동물을 희생하여

혈액과 장기를 적출하여 혈액학적 및 조직병리학적 분석에 사용하였다. (Scheme 2)



Scheme 2. Schedule of SCE and CCl<sub>4</sub> treatment *in vivo*

### 3) 혈액생화학적 검사

혈액은 실험동물의 복대정맥으로부터 3 ml 이상을 채취한 후 3000×g, 4℃에서 10 분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청중 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) lactate dehydrogenase (LDH)는 Analysis kits (Pointe Scientific Inc., Canton, MI, USA) 와 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany) 를 사용하여 분석하였다.

### 4) 조직학적 평가

간 실질조직의 일부를 채취하여 10% 중성포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 방법으로 탈수 및 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm의 절편을 제작하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시한 후 광학현미경 (Nikon, Japan) 하에서 관찰하였다. 간 실질 중 변성부위의 비율 (%/mm<sup>2</sup> of hepatic parenchyma) 및 변성 간세포의 수 (N/1000 hepatocytes) 를 자동영상분석장치 (DMI-300 Image Processing; DMI, Korea)를 이용하여 각각 평가하였다.

### 5) Pro-caspase-3 단백질 발현 측정

분리한 간 조직 0.1 g에 1ml의 total lysis buffer를 넣고 균질화시킨 후 4℃에서 20분 동안 15,000×g로 원심분리하여 얻은 상층액을 bicinchoninic acid assay로 정량하여 실험에 사용하였다. 정량하여 얻은 protein 20 μg을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 gel의 단백질을 transfer시켰다. Blocking 후 pro-caspase-3 antibody와 반응시킨 후 secondary antibody로 반응시키고 ECL chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis를 위해 Image analyzing system

(Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하였다.

### 6) GSH 함량 측정

적출한 간 조직 0.1 g을 0.9% NaCl에 세척하여 간 조직의 물기가 없도록 하였다. 1 ml의 5% MPA buffer를 넣고 glass homogenizer로 마쇄하여 균질화시킨 후 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 7) Malondialdehyde (MDA) 측정

분리한 간 조직 1 g에 9 ml의 1.15% KCl을 넣고 균질화시킨 후 균질화액 500 ul에 1% phosphoric acid, 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid (TBA), 1 ml을 넣고 섞은 후 95° C에서 45분간 끓였다. 차갑게 식힌 후 4 ml의 *n*-butanol을 넣고 3000×g로 4° C에서 20분간 원심분리한 후 *n*-butanol층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 5. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검증한 후 Newman-Kleuls test로 검증하였다. 통계적 유의성 검증은 p<0.05 또는 p<0.01로 하였다.

## 실험결과

### 1. tBHP를 활용한 *in vitro* 모델에서의 실험결과

#### 1) tBHP에 의해 유도된 세포 독성 및 생존율에 대한 SCE의 효과

SCE가 tBHP로 유발되는 세포독성에 대한 효과를 MTT assay로 관찰하고자 12시간 동안 serum을 제거한 배지에서 cell을 배양한 후, SCE를 1시간 농도별로 처리하고, 이후 tBHP를 100 μM로 12시간 처리하였다.

Normal은 100.00 ± 1.51%였으며, tBHP는 49.45 ± 1.17%로 유의한 세포독성을 나타내었다. 그러나, 이러한 tBHP의 세포독성은 SCE 1, 3, 10, 30 μg/ml의 농도에서 각각 81.30 ± 2.49, 97.49 ± 1.73, 101.36 ± 5.76, 102.37 ± 2.08 (%)로서 모두 유의한 세포독성의 억제를 나타내었다. (Fig. 1A)

또한, SCE의 단독처리가 세포의 생존율에 미치는 영향은 Normal에서 100.00 ± 1.64%, SCE 1, 3, 10, 30 μg/ml의 농도에서 각각 107.55 ± 1.82, 109.97 ± 3.93, 109.77 ± 3.97, 110.11 ± 0.92 (%)로서 어떠한 세포독성도 나타나지 않았다. (Fig. 1B)

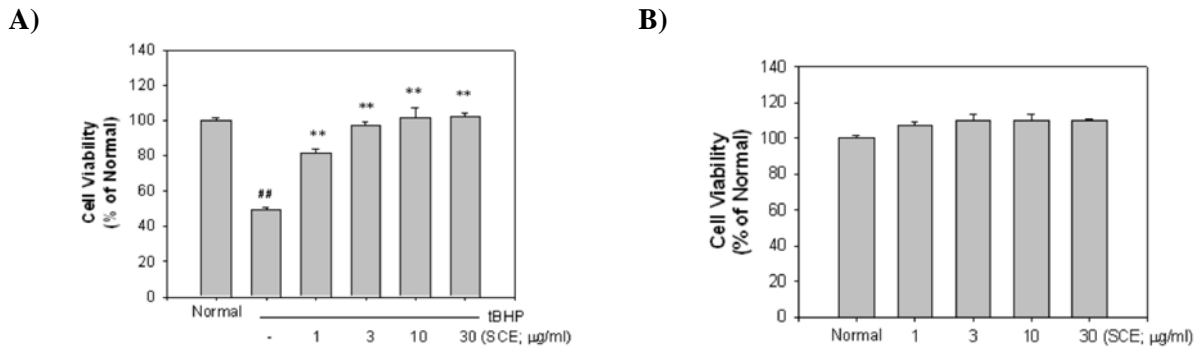


Figure 1. The cell viability of HepG2 cells exposed to SCE with/without tBHP. HepG2 cells were pre-treated with SCE for 1 h and further incubated with SCE + tBHP (100 μM) for the next 12 h (A). HepG2 cells were treated with SCE alone for 12 h (B). Cell viability was assessed by MTT assay. Data represent the mean ± SD of eight separate experiments. (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to tBHP alone, \*\* P<0.01)

2) tBHP에 의해 유도된 Apoptosis에 대한 SCE의 효과

SCE가 tBHP에 의해 유도되는 apoptosis에 미치는 효과를 살펴보기 위해 apoptosis의 표지단백질인 pro-caspase-3, Bcl<sub>2</sub> 및 PARP의 발현변화를 확인하였다. 그 결과, tBHP가 유도하는 Bcl<sub>2</sub>의 감소를 SCE가 10, 30 μg/ml의 농도에서 증가시켰으며, pro-caspase-3는 tBHP에 의하여 현저하게 감소되었으나, SCE 10, 30 μg/ml의 농도에서 pro-caspase-3의 발현을 증가시켰다. 또한 핵분획에서 116 kDa의 PARP는 tBHP에 의하여 현저히 감소하였고, 이러한 감소 역시 SCE 10, 30 μg/ml에 의하여 발현이 현저히 증가하였다. (Fig. 2)

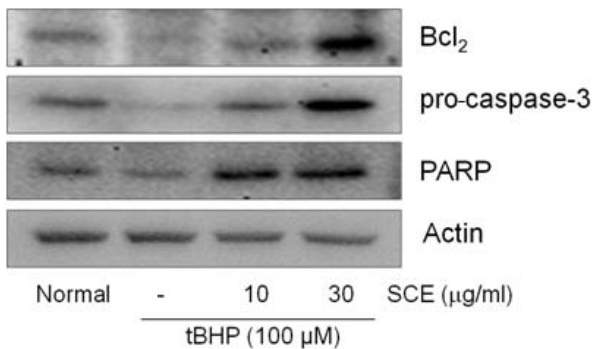


Figure 2. Effect of SCE on the expression of apoptosis-related proteins. HepG2 cells were pre-treated with SCE for 1 h and further incubated with SCE + tBHP (100 μM) for the next 12 h. The proteins were monitored by immunoblot analysis. Equal loading of proteins was verified by actin protein immunoblotting.

3) tBHP에 의해 유도된 ROS의 증가에 대한 SCE의 효과

DCFH-DA (dichlorofluorescein diacetate)는 세포내의 활성산소 (ROS)와 반응하여 강한 형광물질인 DCF (dichlorofluorescein)로 전환되게 된다<sup>14</sup>. 따라서 DCF에 의한 형광도를 측정함으로써 ROS의 상대적인 양을 추측할 수 있다. 본 실험에서는 ROS 생성에 대한 SCE의 효과를 규명

하기 위하여, SCE를 30 μg/ml의 농도로 12시간 동안 배양하고 tBHP 100 μM을 1시간 동안 처리하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 여기에 10 μM의 DCFH-DA를 30분 동안 넣은 후에 DCF의 형광도를 측정하였다. 그 결과, normal에 비해 tBHP 처리에 의해 241.37 ± 14.44%로 형광도가 증가하였으나, SCE 전처리에 의해서 60.77 ± 6.30%로 억제되어 SCE에 의한 활성산소 감소효과를 확인할 수 있었다. SCE를 단독 처리한 경우에는 96.86 ± 8.92%로 normal과 유사한 수준으로 나타났다. (Fig. 3)

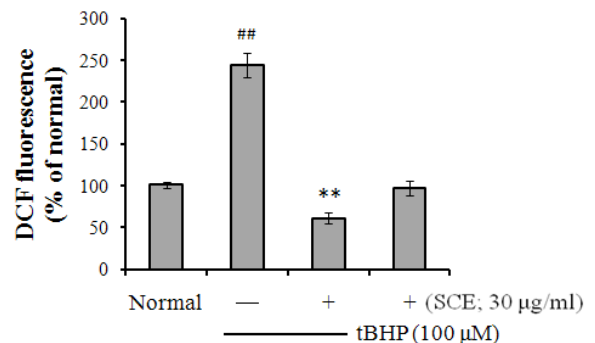


Figure 3. Effect of SCE on ROS in tBHP-induced oxidative stress. HepG2 cells were pre-treated with SCE for 12 h and further incubated with SCE + tBHP (100 μM) for the next 1 h. DCFH-DA was assessed as described in materials and methods section. Data represent the mean ± SD of eight separate experiments. (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to tBHP alone, \*\* P<0.01)

4) tBHP에 의해 유도된 GSH 감소에 대한 SCE의 효과

SCE의 항산화 효과를 관찰하기 위해서 세포내의 GSH 함량을 측정된 결과, tBHP의 처리에 의해 GSH가 61.21 ± 2.57%로 현저하게 감소한 반면, SCE를 처리하였을 때 감소된 GSH가 103.00 ± 1.48%로 회복되었다. SCE를 단독 처리한 경우에는 95.17 ± 1.72%로 normal과 유사한 수준으로 나타나, SCE에 의한 GSH의 변화는 관찰되지 않았다. (Fig. 4)



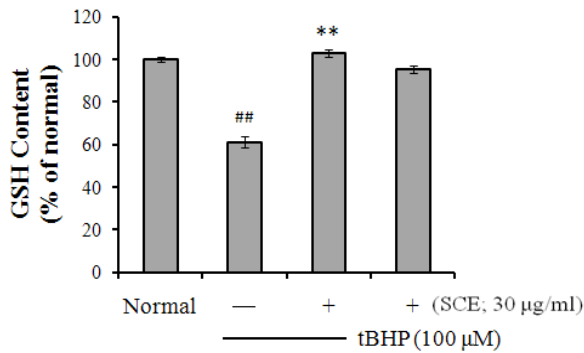


Figure 4. Effect of SCE on GSH depletion induced by tBHP. HepG2 cells were pre-treated with SCE for 12 h and further incubated with SCE + tBHP (100 µM) for the next 3 h. GSH was measured as described in materials and method section. Data represent the mean ± SD of eight separate experiments. (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to tBHP alone, \*\* P<0.01)

## 2. CCl<sub>4</sub>를 이용한 *in vivo* 모델에서의 실험결과

### 1) SCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 혈액생화학적 변화에 미치는 영향

SCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 급성 간손상에 대한 간세포 보호효과를 평가하기 위하여 혈액학적인 변화를 관찰한 결과, ALT는 Normal에서는 100.00 ± 8.46%였으나, CCl<sub>4</sub>로 간손상을 유도한 경우는 564.04 ± 122.41%로 유의하게 증가하였다. 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 188.46 ± 59.52, 149.51 ± 15.81 (%)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 5A). AST는 Normal에서는 100.00 ± 26.23%였으나, CCl<sub>4</sub>로 간손상을 유도한 경우는 912.28 ± 134.16%로 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 343.33 ± 134.38, 133.89 ± 31.03 (%)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 5B). LDH는 Normal에서는 100.00 ± 23.00%였으나, CCl<sub>4</sub>로 간손상을 유도한 경우는 335.15 ± 74.77%로 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 SCE 50, 100 mg/kg의 투여로 각각 138.98 ± 50.09, 110.21 ± 39.65 (%)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 5C).

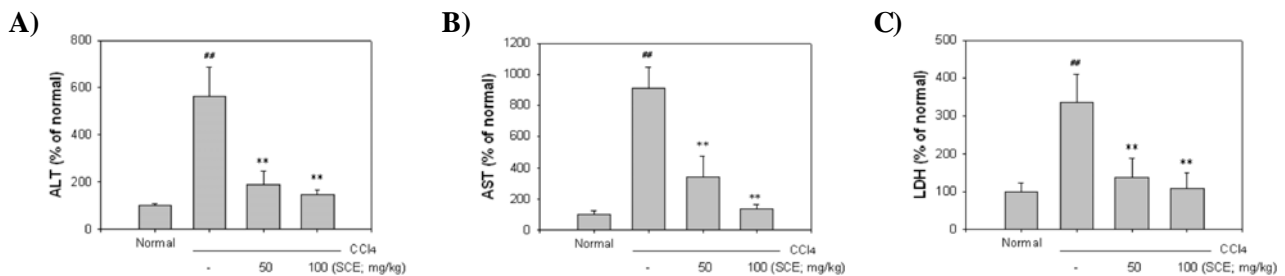


Figure 5. Effect of SCE on Enzyme levels in CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity. ALT(A), AST(B) and LDH(C) activities were monitored in the serum of rats that had been orally pretreated with SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. Blood samples were obtained 24 h after CCl<sub>4</sub> (injected with CCl<sub>4</sub>, 1 mg/kg, body weight, i.p.) treatment. Values represent mean ± SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ## P<0.01; \*, significant as compared to CCl<sub>4</sub> alone, \*\* P<0.01)

### 2) SCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간의 조직학적 변화에 미치는 영향

CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 간독성에 미치는 SCE의 효과를 평가하기 위하여 조직학적 평가를 한 결과, CCl<sub>4</sub>를 투여한 경우 간세포의 공포화, 지방소적의 간세포내 축적 및 염증세포 침윤과 같은 소엽중심성 괴사 소견이 관찰되었으나, 이들 CCl<sub>4</sub> 투여에 의한 간 손상은 SCE의 투여에 의해 현저하게 감소되었다 (Fig. 6).

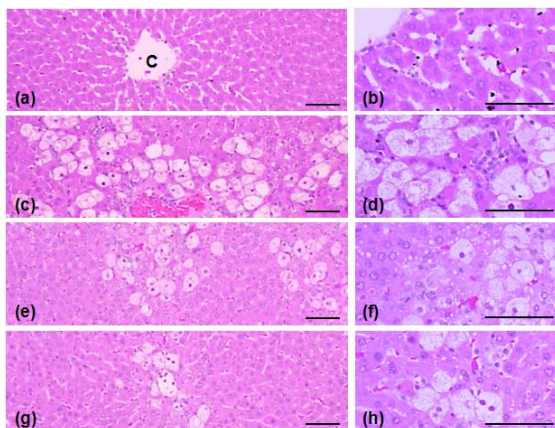


Figure 6. Changes on Histological Profiles of the Liver. Note that vacuolation, degenerative changes – ballooning and fatty changes of hepatocytes with inflammatory cell infiltrations, were detected in CCl<sub>4</sub> alone. However, dramatically decreases of severity of these CCl<sub>4</sub>-intoxicated hepatopathies were detected in the both 50, 100 mg/kg dosages of SCE treated rats as compared with CCl<sub>4</sub> alone, respectively. Normal (a, b), CCl<sub>4</sub> alone (c, d), SCE 50 mg/kg (e, f) and SCE 100 mg/kg (g, h). C, central vein. All HE stain; Scale bars = 160 µm.

간 변성부위의 비율은 Normal에서는 3.74 ± 2.45 %를 나타내었으며, CCl<sub>4</sub>에 의해서는 55.07 ± 11.23 %로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 간 변성부위 비율의 증가는 SCE 50, 100 mg/kg에서 37.32 ± 5.33, 18.18 ± 5.00 (%)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 7A). 염증세포의 침윤 수는 Normal에서는 14.20 ± 6.35 cell을 나타내었으며, CCl<sub>4</sub>에 의해서는 375.20 ± 60.73 cell로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 염증세포의 침윤은 SCE 50, 100 mg/kg에서 181.40 ± 57.40, 98.60 ± 65.89 (cell)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 7B). 변성 간세포의 수는 Normal에서는 18.00 ± 10.20 cell을 나타내었으나, CCl<sub>4</sub>에 의해서는 250.40 ± 93.39 cell로 유의하게 증가되었다. 그러나, 이러한 변성 간세포의 수의 증가는 SCE 50, 100 mg/kg에서 118.40 ± 26.36, 44.80 ± 15.12 (cell)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 7C).

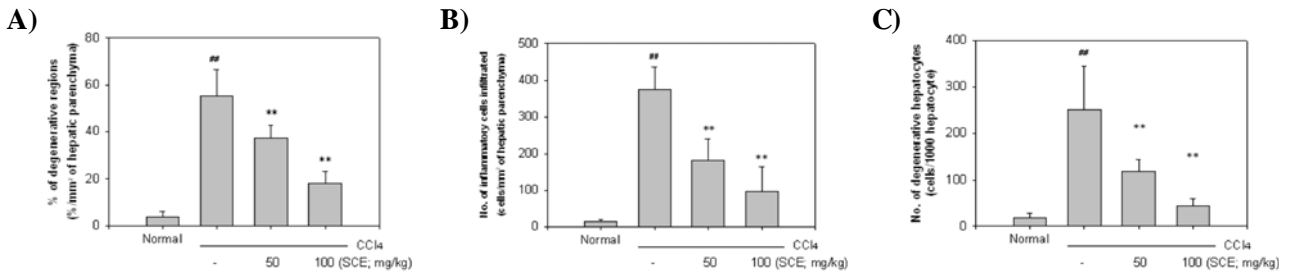


Figure 7. Effect of SCE on hepatopathies in CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity. Hepatopathies were observed in the liver of rats that had been orally pretreated with SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. The liver samples were obtained 24 h after CCl<sub>4</sub> (injected with CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg body weight, i.p.) treatment. (A) Percentage of hepatic degenerative regions (%), (B) Numbers of inflammatory cells (cells/mm<sup>2</sup>), (C) Number of degenerative hepatocytes (N/1000 cells). Values represent mean ± SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ##P<0.01; \*, significant as compared to CCl<sub>4</sub> alone, \*\*P<0.01)

3) CCl<sub>4</sub>로 유도된 Pro-caspase-3 감소에 대한 SCE의 효과

CCl<sub>4</sub>로 유도된 간세포 apoptosis에 미치는 SCE의 효과를 살펴보기 위하여 Immunoblot analysis를 통해 pro-caspase-3의 양을 관찰한 결과, CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된

pro-caspase-3는 Normal과 비교시 33,51 ± 5.19%로서 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 이러한 감소는 50 및 100 mg/kg의 SCE 전처리에 의해 각각 45.52 ± 7.70와 88.72 ± 17.18 (%)로 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 8)



Figure 8. Effect of SCE on apoptosis marker protein in CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity. Pro-caspase-3 level was observed in rats treated with CCl<sub>4</sub> +/- SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. Immunoblot assessed in the liver samples, which were obtained 24 h after CCl<sub>4</sub> treatment. The representative blot was presented. Actin verify the equal loading. Values represent mean ± SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ##P<0.01; \*, significant as compared to CCl<sub>4</sub> alone, \*\*P<0.01)

4) CCl<sub>4</sub>로 유도된 GSH 감소에 대한 SCE의 효과

SCE의 *in vivo* 수준에서의 항산화 효능을 측정하기 위하여, 간 조직내의 GSH 함량을 관찰한 결과, CCl<sub>4</sub>의 처치에 의해 58.39 ± 5.76%로 감소된 GSH가 50과 100 mg/kg SCE의 전처리에 의해 119.71 ± 7.31, 122.08 ± 6.26 (%)로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 9)

5) CCl<sub>4</sub>로 유도된 MDA 증가에 대한 SCE의 효과

SCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 지질 과산화에 대한 효과를 관찰하기 위하여 MDA의 발현을 통해 살펴 본 결과, 1 mg/kg의 CCl<sub>4</sub>는 간조직내의 MDA양을 224.03 ± 18.33%로 현저히 증가시키는 것을 관찰할 수 있었고, 50, 100 mg/kg의 SCE 전처리는 이렇게 증가된 MDA양을 132.15 ± 20.42, 123.76 ± 5.06 (%)로 유의하게 감소시켰다. (Fig. 10)

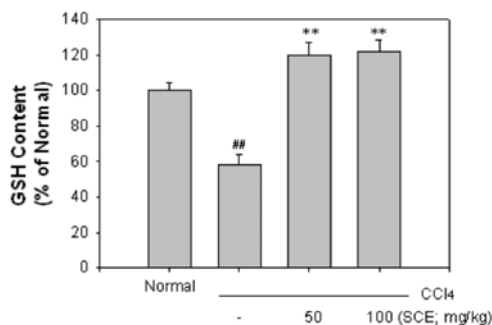


Figure 9. Effect of SCE on GSH depletion in CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity. Hepatic GSH were observed in rats treated with CCl<sub>4</sub> and/or SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. The liver samples were obtained 24 h after CCl<sub>4</sub> (injected with CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg body weight, i.p.) treatment. Values represent mean ± SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ##P<0.01; \*, significant as compared to CCl<sub>4</sub> alone, \*\*P<0.01)

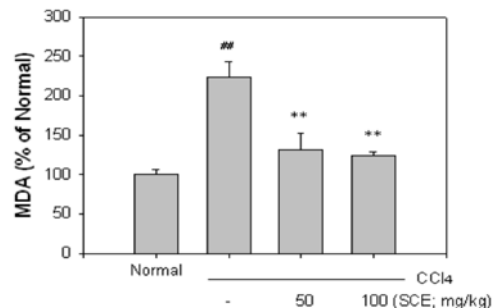


Figure 10. Effect of SCE on MDA in CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity. Hepatic MDA level were measured in rats treated with CCl<sub>4</sub> with or without SCE (50 or 100 mg/kg for 4 days) treatment. The liver samples were obtained 24 h after CCl<sub>4</sub> (injected with CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg body weight, i.p.) treatment. Values represent mean ± SD (n = 5) (#, significant as compared to normal, ##P<0.01; \*, significant as compared to CCl<sub>4</sub> alone, \*\*P<0.01)

## 고찰

계혈등은 중국의 복건, 광둥, 광서, 운남 등지에 분포하는 콩과 (Leguminosae)에 속한 落葉 木質大藤本인 密花豆 (*Spatholobus suberectus* DUNN)의 등경(藤莖)을 건조한 것으로, 性은 溫 無毒하고 味는 苦微甘하다. 주로 肝, 腎經에 작용하며 行血補血, 活血去瘀, 舒筋活絡하는 효능이 있어 月經不調, 痛經, 血虛經閉, 關節痠痛, 手足麻木, 風濕痺痛 등을 치료한다<sup>15)</sup>. 계혈등의 약리작용으로는 항응고작용, 혈압 강화 작용이 있어, 고혈압, 심장질환 등에 응용되고 있다<sup>16)</sup>.

계혈등에 관련된 연구로는 지질대사조절작용<sup>17)</sup>, 항균작용<sup>18)</sup>, 항염증작용<sup>19-21)</sup>, 항산화작용<sup>22,23)</sup>, 뇌혈류개선작용<sup>19,24)</sup>, 항노화작용<sup>23)</sup>, 세포주기억제 및 세포사멸유도작용<sup>25-30)</sup>, 등 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있으며, 계혈등의 성분으로는 formononetin, daidzein, isoliquiritigenin, licochalcone A, (2*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-flavanone, friedelin, friedelan-3β-ol, sativan, β-sistosterol, stigmasterol, campesterol, (3*R*, 4*R*)-2', 4'-dihydroxy-6, 7-methylenedioxyisoflavan-4-ol, genistein, medicagol, pseudobaptigenin, (3*R*, 4*R*)-7', 2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavan-4-ol 등이 알려져 있다<sup>31,32)</sup>.

계혈등에 관련된 연구들 중, 최 등<sup>18)</sup>은 계혈등이 vibrio spp. lactococcus spp. 및 lactococcus garviae에 대하여 항균작용을 가짐을 보고하였으며, 차 등<sup>22)</sup>은 계혈등에서 분리한 (-)-epicatechin이 항산화활성에 우수함을 보고하였다. 또한 이 등과 최 등은 계혈등이 항염증 cytokine의 생성을 촉진시키며<sup>19,20)</sup>, 염증매개 cytokine 생성 및 염증매개 단백질의 발현을 억제함을 보고하였으며, 최 등<sup>21)</sup>은 계혈등이 활액막세포를 활성화시키고, 골파괴를 억제하며, 골막의 형성을 촉진시킴을 보고하였다. 김<sup>28)</sup>은 계혈등의 성분중 isoliquiritigenin이 인간 자궁근종세포의 증식을 억제함을 보고하였으며, 박<sup>29)</sup>은 계혈등의 성분중 β-sistosterol이 인간자궁근종세포의 증식을 억제하고, 세포사멸사를 유도함을 밝혔다.

그러나, 위의 연구들에서도 산화적 스트레스에 의해 유도된 간손상에 미치는 계혈등의 연구결과는 아직 보고된 것이 없기에 계혈등의 간보호효과를 평가하기 위해 *in vitro*에서 HepG2 cell에 tBHP를 처리하여 유도된 세포독성 모델에 대해 SCE의 효과를 평가하였고, 또한 *in vivo*에서 CCl<sub>4</sub>에 의해 유발되는 rat의 급성 간손상 모델에 대한 SCE의 간보호효과를 평가하게 되었다.

*in vitro* 모델에 사용된 tBHP는 hydroperoxide 유사체로서 강력한 산화제이다. tBHP는 미토콘드리아 막전위 손실에 의한 세포 ATP 생성 억제를 통해 세포사멸을 유도한다<sup>33)</sup>. 또 다른 작용기전으로는 GSH를 고갈시키고 미토콘드리아 단백질 sulfhydryl기를 산화시키는 것으로 알려져 있다<sup>34)</sup>. 따라서, tBHP는 산화적 스트레스 상황을 모방하여 세포사멸을 유도하는 물질로 알려져 있으므로, 항산화물질의 탐색 모델로 널리 쓰인다.

본 연구에서는 SCE가 tBHP에 의한 독성에 대해 세포보호 작용을 할 수 있는지, SCE 단독으로는 세포생존율에 어떠한 영향을 미치는지를 MTT assay로 평가하였고, 또한 SCE가 tBHP가 유도하는 apoptosis에 대하여 어떠한 연관성을 가지는지를 western blot으로 확인하였으며, SCE의 항산화작용

을 평가하기 위하여 DCFH-DA 및 GSH를 평가하였다.

연구결과 MTT assay를 통한 세포 생존을 측정에서 Fig. 1A에서 보듯이 SCE는 tBHP에 의해 유도한 세포사멸을 유의하게 억제함을 확인할 수 있었으며, Fig. 2에서 세포사멸의 표지단백질인 Caspase-3, Bcl<sub>2</sub> 및 PARP의 발현변화를 관찰한 결과에서도 tBHP가 apoptosis를 유도하고 SCE는 이를 유효하게 억제함을 확인하였다. 또한 DCFH-DA를 관찰한 결과, Fig. 3에서 보듯이 SCE가 세포 독성의 원인인 ROS 생성을 억제하는 것이 확인되었으며, 이는 tBHP가 유도한 산화적 스트레스에 의해 발생한 apoptosis를 SCE가 유효하게 억제함을 의미한다. 그리고 Fig. 4에서 보듯이 tBHP에 의해 현저하게 감소된 GSH의 함량을 SCE가 유의하게 증가시키는 것이 확인되었으며 이는 SCE가 tBHP에 의한 세포 독성을 방어하는 데에 있어서 항산화 효과가 기여한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하면 SCE는 산화적 스트레스에 의해 유발된 간세포의 사멸사에 대해 ROS 생성억제와 항산화 효과를 통해 세포보호작용을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

*in vivo* 모델에서 사용된 대표적인 간독성 유발물질인 CCl<sub>4</sub>는 체내에서 trichloromethyl radical을 생성하고, 생성된 CCl<sub>3</sub>는 O<sub>2</sub>와의 결합을 통해 trichloromethyl peroxy radical을 만들며, 이들은 세포막의 인지질을 공격하여 지질의 과산화를 유발한다. 이러한 지질의 과산화는 lipid peroxidation chain reaction 및 미토콘드리아나 DNA, 세포막을 포함하는 주요 세포구조물에 유독한 영향을 미쳐 간세포의 괴사를 일으킨다. 이러한 ROS 생성 및 세포사멸은 알코올성 및 비알콜성 지방간염, 혈액소증 및 간독성 등의 여러 간질환에 기여한다<sup>35)</sup>.

본 연구에서는 rat의 급성 간독성을 유발하기 위하여 CCl<sub>4</sub>를 1 mg/kg로 1회 복강 주사하였으며, SCE는 CCl<sub>4</sub>투여 전 4일간 50, 100 mg/kg로 구강 투여하였다. CCl<sub>4</sub>투여 후 24시간 후에 실험동물을 희생시키고, 혈액학적 평가, 조직학적 평가, pro-caspase-3, MDA, GSH를 평가하였다.

연구결과 Fig. 5에서 보듯이 SCE는 CCl<sub>4</sub>로 유도한 간독성 모델에서 혈액학적 지표인 ALT, AST, LDH를 개선하였고, Fig. 6과 Fig. 7에서와 같이 조직학적 지표인 간세포의 변성 및 염증세포의 침윤을 억제하였다. 이러한 간독성의 유발이 산화적 스트레스에 의한 것임을 Fig. 10에서 MDA의 발현변화를 통해 살펴보고, MDA의 조직내 증가도 SCE에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 또한 Fig. 8에서 SCE는 CCl<sub>4</sub>로 저하된 pro-caspase-3의 발현을 유의하게 증가시켰으며, 이는 CCl<sub>4</sub>가 apoptosis를 유도하고 SCE는 이를 유효하게 억제함을 의미한다. 또한 Fig. 9에서 GSH의 증가는 SCE의 항산화 효능을 보여준다. 즉, SCE는 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 산화적 스트레스에 의한 간조직내 손상 및 이로 인한 염증을 억제하였고, 항산화 효능과 apoptosis의 억제를 통해 간세포의 보호작용을 나타내었다.

본 연구에서는 SCE가 tBHP, CCl<sub>4</sub>와 같은 강력한 산화물에 대해 간세포의 보호 작용이 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 Fig. 4와 Fig. 9에서 보는 바와 같이 SCE는 tBHP에 의해 유도되는 세포내 GSH 고갈 및 CCl<sub>4</sub>에 의한 간조직내 GSH 고갈을 억제하였다. 과도한 ROS의 생성은 지질, 단백질 및 DNA 등의 세포 구성요소에 손상을 초래하여<sup>37,36)</sup> 종양



의 발생 및 진행, 심혈관질환, 신경변성질환 등을 유발하게 되므로<sup>38)</sup>, 산화적 스트레스에 대항하는 항산화물질 및 2상 효소에 의한 ROS의 조절이 매우 중요한데, 항산화물질인 GSH의 고갈에 대한 억제는 ROS에 의한 세포의 손상을 방어하는 측면에서 의미가 있다.

SCE가 GSH 고갈을 억제한다는 것은 SCE가 GSH 항산화 효소의 합성 단계를 보호하는 물질임을 나타내고 있다. GSH 합성은 생합성단계의 첫 번째 효소이자 속도조절효소인 glutamate-cysteine ligase (GCL)에 의해 촉매된다<sup>39)</sup>. 따라서, GCL의 catalytic (GCLC) 및 modifier (GCLM) 소단위의 유전자 발현을 조절하는 것은 산화적 스트레스에 대한 세포 방어 기전에 중요한 역할을 한다. 그러므로 SCE가 GSH 합성에 필요한 유전자 발현에는 어떠한 영향을 미치는지에 대해서도 앞으로 연구가 필요하다고 하겠다.

## 결론

본 연구는 Reactive oxygen species (ROS)에 의한 간독성에 대한 계혈등 물추출물 (SCE; *Spatholobi Caulis* Water Extract)의 항산화 및 간보호 효과를 평가하기 위하여, HepG2 cell과 *tert*-butylhydroperoxide (tBHP)를 활용한 *in vitro* 모델과 rat와 CCl<sub>4</sub>를 이용한 급성 간손상 *in vivo* 모델에서 효능을 평가하였다.

그 결과 계혈등 물추출물(SCE)의 병행투여로 *in vitro* 모델에서는 세포생존율 증가, apoptosis 억제, hydrogen peroxide의 감소, GSH의 함량의 증가를 보였으며, *in vivo* 모델에서는 혈청중 ALT, AST, LDH 수치의 유의한 감소, rat 간조직내 손상 및 염증의 억제, 간세포 apoptosis 억제, 肝内 GSH의 유의한 증가, MDA의 유의한 감소가 나타났다.

이러한 결과는 SCE가 *in vivo*와 *in vitro* 모델에서 산화적 손상에 대해 세포 보호 효능과 간보호 효과가 있음을 나타낸 것으로, 향후, 항산화 효과와 더불어 간을 보호하는 유효한 약물 후보로서 계혈등에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Korean Central Association of Cancer Registries of Ministry of Health and Welfare. 2006 and 2007 cancer rates.
2. Ramadori G, Moriconi F, Malik I, Dudas J. Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair. *J Physiol Pharmacol*. 2008 ; 59 Suppl 1 : 107-117.
3. Effendi K, Sakamoto M. Molecular pathology in early hepatocarcinogenesis. *Oncology*. 2010 ; 78/2 : 157-160.
4. Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease : cross-talk between the NF- $\kappa$ B and JNK pathways. *Biol Chem*. 2009 ; 390/10 : 965-976.
5. Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 ; 238/3 : 209-214.
6. Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol*. 2010 ; 41/2-3 : 256-266.
7. Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver : ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2007 ; 462/2 : 124-131.
8. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver : Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res*. 2010 ; 162/1 : 95-109.
9. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem*. 2010 ; 17/28 : 3262-3288.
10. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999 ; 27 : 916-921.
11. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med*. 2009 ; 30/1-2 : 29-41.
12. Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol*. 2004 ; 3/3 : 86-92.
13. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system : role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 2002 ; 40/11 : 1233-1239.
14. Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*. 2001 ; 55/4 : 236-248.
15. Colleges of Oriental Medicine. Herbology professor's association. *Herbology*. Herbology. Seoul : Young-Lim Publisher. 1992 : 445-446.
16. Hu-Zhan Zheng (鄭虎占). *Modern study of traditional chinese medicine (中藥現代研究與應用)*. Beijing : xue-yuan Publisher (學苑出版社). 1998 : 2539-2546.
17. Wang W, Wang J, Zhao D, Liu H, Zhou W, Chen K. Comparison of *Spatholobus suberectus* Dunn *Euonymus alatus* (Thunb.) Sied. and *Eupolyphage sinensis* Walkeron regulation of plasma lipid. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1991 ; 16 : 299-301, 320.
18. Choi HS, Kim YC, Lee JS, Jo MR, Seo CH, Park SI. Antibacterial Activities of Hot-water and Ethyl Alcohol Extracts of Medicinal Herbs on Fish Pathogenic Bacteria. *J. Fish Pathol*. 2004 ; 17(1) : 39-55.

19. Lee SL, Choi CH, Baek JU, Youn DH, Jeong SH, Han U, et al. Experimental Study of *Patholobi Caulis* on the Transient Cerebral Ischemia in Rats. *Korean J. Oriental Phyology & Pathology*. 2007 ; 21(5) : 1127-1134.
20. Choi SI, Park SJ, Byun SH, Lee JR, Park MK, Kim SC. Effects of *Spatholobi Caulis* MeOH Extract on the Production of NO and Pro-inflammatory Cytokines in LPS-activated Raw264.7 Cells. *Korean J. Herbology*. 2009 ; 24(2) : 21-27.
21. Choi JS, Song TW, Kim DH. A Study on the Effects of *Spatholobus suberectus* Dunn on the Inhibition of Arthritis Induced by Collagen on the Mouse. *Korean J. Herbology*. 2003 ; 18(3) : 79-99.
22. Cha BC, Lee EH, Noh MA. Antioxidant Activity of *Spatholobus suberectus* Dunn. *Kor. J. Phamacogn* 2005 ; 36(1) : 50-55.
23. Sim GS, Kim JH, Lee DH, Park SM, Pyo HB, Zhang YH, et al. Effects of the *Spatholobi calulis* extract on Antioxidation and Inhibition of Matrix Metalloproteinase in Human Skin Fibroblasts. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 2005 ; 20(1) : 40-45.
24. Lee SL, Jeong HW. Experimental Effects of *SPATHOLOBI CAULIS* on the Cerebral Blood Flow and Lactate Dehydrogenase Activity. *Korean J. Oriental Phyology & Pathology*. 2006 ; 20(1) : 25-30.
25. Lee HK, Kim DC, Back SH. The Effect of *Millettia Reticulatas* on the Proliferation Inhibition of Human Uterine Leiomyoma Cell and Expression of Apoptosis. *Korean J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2006 ; 19/3 : 135-149
26. Kim BH, Back SH, Kim BH. The effect of the stem of *Spatholobus suberectus* Dunn on the proliferation and gene expression related apoptosis in human cervical cancer cells. *Korean J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2005 ; 18/1 : 169-180.
27. Jun YG, Back SH. Growth inhibition and induction of apoptosis in endometrial cancer cell line by *Spatholobus suberectus* Dunn. *Korean J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2005 ; 18/2 : 40-51.
28. Kim DC, Ramachandran S, Baek SH, Kwon SH, Kwon KY, Cha SD, Bae I, Cho CH. Induction of growth inhibition and apoptosis in human uterine leiomyoma cells by isoliquiritigenin. *Reprod Sci*. 2008 ; 15/6 : 552-558.
29. Park YS, Baek SH. The effect of  $\beta$ -sitosterol proliferation and apoptosis in human uterine leiomyoma cells. *Korean J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2005 ; 18/1 : 181-191.
30. Hwang SG, Lee HC, Kim CK, Kim DG, Song HJ, Park YJ, et al. *Spatholobus suberectus* Water Extract induces Apoptotic Cell Death via Inhibition of Cell Cycle in p53-Dificient Human Leukemia Cell Line Jurkat. *Korean J. Oriental Phyology & Pathology*. 2001 ; 15(6) : 887-892.
31. Cui YJ, Liu P, Chen RY. Studies on the chemical constituents of *Spatholobus suberectus* Dunn. *Yao Xue Xue Bao*. 2002 ; 37/10 : 784-787.
32. Zhu You Ping. *Chinese materia medica*. Harwood academic publisher. The Netherlands. 1998. 468-470.
33. Chen HW, Chiang T, Wang CY, Lii CK. Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by alpha-tocopherol and glutathione. *Food Chem Toxicol* 2000 ; 38 : 1089-1096.
34. Alia M, Sonia Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Biochem Mol Toxicol* 2005 ; 19 : 119-128
35. Kim TH, Kim YW, Shin SM, Kim CW, Yu IJ, Kim SG. Synergistic hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide with carbon tetrachloride in association with endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact* 2010 ; 184 : 492-501.
36. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992 ; 257 : 1220-1224.
37. Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 ; 96 : 4820-4825.
38. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 ; 281 : 1135-1139.
39. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002 ; 64 : 1019-1026.