고욤 잎 추출물의 항산화 활성 및 적혈구 산화적 손상에 대한 보호 효과

김현수[1] · 강현주[2] · 전인화[1] · 목지예[2] · 박용균[1,3] · 신준호[1] · 김장호[4] · 장선일[1,2]*

1 : 아토큐엔에이 연구소, 2 : 전주대학교 보건관리학과, 3 : 전주비전대학교, 4 : 호남지역사업평가원

Antioxidant Activity and Protective Effect of Leaf Extract from *Diospyros lotus* on Oxidative Stress of Red Blood Cells

Hyeon Soo Kim[1], Hyun Ju Kang[2], In Hwa Jeon[1], Ji Ye Mok[2], Young Kyun Park[1,3], Jun Ho Shin[1], Jang Ho Kim[4], Seon Il Jang[1,2]*

1 : Ato Q&A Incoperation, Jeonbuk, 2 : Department of Health & Science, Jeonju University, 3 : Jeonju Vision University, 4 : Honam institute for Regional Program

This study was to evaluate the antioxidant properties of the leaf extracts of *Diospyros lotus* (DLE) on the chemical-induced free radical and rat red blood cell (RBC) oxidative damage *in vitro*. DLE were prepared by extracting with water. DLE showed the high antioxidant activities on the scavenging of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)-induced radicals. An antioxidant activities of DLE was similar to the reference antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) and (±)6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox). Reducing power of 1,000 μg/mL DLE also was similar to the vitamin C. In RBC, oxidative hemolysis induced by the aqueous peroxyl radical generator (2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)) were significantly suppressed by DLE in a dose-dependent manner. Furthermore, DLE prevented the depletion of cytosolic antioxidant glutathione in RBC damaged with AAPH. These results suggest that DLE may has value as natural product with its high quality antioxidant properties against oxidative stress.

Key words : *Diospyros lotus*, water extract, oxidative stress, antioxidant properties

서 론

산화적 스트레스는 여러 가지 생리 및 병리적 상태에서 중요한 역할을 한다[1,2]. 면역세포에서 생성되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 외부에서 침입한 병원체를 사멸시켜 생리적 항상성을 유지하는데 중요한 요소가 된다[3]. 그러나 체내에서 발생되거나 외부로부터 유입된 과량의 ROS는 지질 과산화반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 피부 항산화제 파괴, 결합조직 성분(콜라젠, 히아루론산 등)의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 피부노화를 가속시킨다[4-8]. 그러므로 이러한 활성산소를 제거하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 천연물에서 우수한 항산화 물질을 발굴하기 위해서는 활성산소에 민감한 세포에서 평가하는 것이 바람직하다.

적혈구(red blood cell, RBC)는 아토피 피부염과 같은 염증성 질환과 심한 운동 상태에서 지질과산화 반응이 촉진되어 세포막 단백질의 변성과 교차결합으로 인해 쉽게 용혈(hemolysis)되는 특성을 가지고 있기 때문에 산화적 손상을 받으면, 회복되기 어려워 수명이 단축된다. 이러한 측면에서 RBC는 산화적 스트레스에 대해서 매우 민감하게 작용하기 때문에 항산화 활성을 평가하는데 많이 활용 된다[1]. 수용성 화합물인 2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)는 생리적 항상성 유지에 필요한 온도에서 적혈구 세포막을 공격할 뿐만 아니라 지질과산화물을 생성하여 용혈을 야기하기 때문에 적혈구의 산화적 손상 유발물질로 사용되고 있다[9-12].

활성산소를 조절할 수 있는 항산화제에는 일반적으로 흔히 사용되는 페놀계 합성 항산화제인 butylated hydroxyanisole

* 교신저자 : 장선일, 전주시 완산구 효자 3가 1200 전주대학교 보건관리학과
· E-mail : songjjang@jj.ac.kr, · Tel : 063-220-3124
· 접수 : 2013/06/25 · 수정 : 2013/08/13 · 채택 : 2013/08/19

(BHA)와 butylated hydroxytoluene (BHT) 등이 탁월한 항산화력과 경제성 등으로 널리 이용되어 왔으나, 발암가능성과 같은 안전성 문제로 인하여 대부분 사용 규제를 받고 있는 실정이다. 화장품에서는 주로 (+)-α-tocopherol 및 L-ascorbic acid가 주목받고 있으며, 제품 중에서의 안정성 때문에 이들 대신 (+)-α-tocopherol 유도체나 L-ascorbic acid 유도체가 많이 사용되고 있다. 그러나 이들 또한 항산화 효과 측면에서 미흡한 점이 많아 새로운 천연 항산화제를 개발하여 응용하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다[13]. 이와 함께 자연 지향적이고 환경 친화적인 소비 추세에 따라 다양한 천연 소재를 이용한 미백, 항노화(주름), 자외선 차단 기능을 가진 기능성화장품의 개발도 활발히 이루어지고 있다.

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)는 감나무과에 속하는 낙엽교목으로 열매를 10-11월에 익은 것을 따서 말려 한약재로 쓰며, 소시(小柿), 우내시(牛奶柿), 연조(軟棗), 정향시(丁香柿)라고도 불린다[14]. 한방을 비롯한 전통의약분야에서는 성숙한 과일인 고욤은 진정, 진통, 수렴 및 변비치료에 사용되어 왔다. 고욤의 생화학적 성분은 지방산, 당, 플라보노이드 및 비휘발성 물질이 보고되었고, 최근에는 혈액의 항응고, 뇌세포 보호 작용, 항산화 및 항암 효과에 대한 보고가 있다[15-19]. 이러한 보고는 주로 고욤 씨와 고욤 껍질을 대상으로 이루어지고 있는 실정이고, 고욤잎 추출물(*D. lotus* leaf extract, DLE)을 대상으로는 추출물 자체의 라디칼 소거 및 항산화 효소의 활성에 대한 연구보고[20]가 있을 뿐, 적혈구에서의 항용혈과 글루타치온(glutathione, GSH)에 대한 연구보고는 없는 실정이다.

이러한 점을 감안하여 본 연구는 DLE를 대상으로 화학물질 유도 라디칼 소거활성과 환원력을 조사한 후 랫트 적혈구를 AAPH로 산화적 손상을 유발한 후 DLE의 항용혈 효과와 세포 내재성 항산화 물질인 GSH의 복원효과를 조사한 결과 매우 흥미로운 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), (±) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, ferric chloride hexahydrate, heparin sodium salt, 2,2′-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), drabkin's reagent, brij L23 solution, 5,5′-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium citrate, meta-phosphoric acid, ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA), sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), 및 기타 시약은 reagent grade로 Sigma-Aldrich사(MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 고욤 잎 추출물

실험에 사용한 고욤 잎 추출물(Diospyros lotus leaf extract; DLE)은 전라북도 진안군 부귀면 수항리 신기마을에서 2012년 6월 30일에 채취하였다. 고욤 잎의 동정은 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수님으로부터 동정을 받았으며 고욤 잎 표본(#2012-0630)은 전주대학교 의과학대학 보건관리 연구실에 보관하고 있다. 채취된 고욤 잎은 즉시 증류수로 세척한 후 5분간 증기찜을 한 후 실온에서 선풍기를 활용하여 건조하였으며, 최종적으로 건조기에서 40℃로 12시간 동안 건조하였다. 건조된 고욤 잎은 200 g으로 정량하여 증류수 2,000 mL를 주입하고 5분간 끓인 후 추출물은 0.45 μm 필터를 사용하여 여과하고 동결건조기(Model, EYELA FDU-2100, Japan)에서 건조하여 19.5 g의 DLE를 회수한 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois[21]의 방법으로 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 31.25-1,000 μg/mL이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μL를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 μL를 넣어 총량이 200 μL가 되도록 하였다. 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성 (%) = {1-(첨가군 흡광도/무첨가군 흡광도)}×100

4. 환원력 측정

환원력(reducing power)은 Oyaizu[22]의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료를 MeOH로 녹여 최종 농도가 31.25-1,000 μg/mL이 되도록 정량하여 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 500 μL, 1% potassium ferricyanide 500 μL를 각각 혼합하여 50℃에서 20분 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각하고 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였다. 위 반응액을 650 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액 500 μL에 증류수 500 μL, 1% ferric chloride 100 μL를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

5. 실험동물

용혈 및 글루타치온 실험에 사용할 혈액 채취에 필요한 실험동물은 무균환경에서 사육된 8주령 수컷 Sprague Dawley rat (SD rat ; 240-290 g)로 중앙실험동물(서울)로부터 10마리를 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 전 실험기간 동안 고형사료와 물을 자유스럽게 섭취하도록 하였으며, 사육환경 온도 23±3℃, 밤낮주기(12시간)가 조절되는 환경에서 사육하였으며 전주대학교 실험동물위원회의 실험 규정에 준하여 실행하였다(#2011-006).

6. 적혈구 부유액의 제조

랫트는 에테르로 마취시켜 간문맥으로부터 헤파린이 처리된 주사기를 이용하여 채혈하였다. 적혈구(red bolld cells, RBC)는 10분간 1,500×g로 원심분리한 후 인산완충액(phosphate buffered saline, pH 7.2)으로 3회 세척하고 인산완충액에

hematocrit가 5% 유지되도록 다시 부유하였다.

7. 적혈구 용혈측정

RBC 부유액에 DLE(최종 농도: 6.25-100 μg/mL)를 가하여 37℃에서 30분간 전 처리한 후 RBC의 자유유리기 사슬 산화를 유도하기 위해서 AAPH(최종농도; 50 mM)를 주입하고 0-6시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 대조군은 인산완충액으로 적정된 적혈구 부유액만 같은 온도 및 시간 조건으로 방치하고 실험하였다. 대조군과 각 실험군의 반응액은 2분간 3,000×g로 원심하여 상층액을 얻은 후 Hseu 등[23]의 방법에 따라 ELISA reader (Molecular Devies, USA)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 적혈구 용혈에 대한 참고 값(100% 용혈)은 AAPH(50 mM)의 흡광도를 기준으로 하여 정하였다.

8. 적혈구의 glutathione 측정

제시된 시간에서 2 mL의 반응액을 원심 침전 시킨 후 적혈구를 용해하기 위해서 0.6 mL 증류수를 가했다. 세포용해물의 glutathione (GSH)는 Hseu 등[23]의 방법에 따라 DTNB로 적정하여 412 nm에서 측정하였다.

9. 통계처리

모든 실험값은 평균±표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 $p<0.05$로 정하였다.

결 과

1. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성에 미치는 DLE의 영향

본 연구는 DLE의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였다. DLE의 DPPH 라디칼 소거 활성을 알아보기 위해 합성 항산화제로 잘 알려진 BHT와 비교하여 조사하였다. 그 결과 Fig. 1A와 같이 31.25-250 μg/mL 농도에서는 BHT보다 DLE의 DPPH 라디칼 소거활성이 매우 우수하였고, 특히 125-1000 μg/mL 농도에서 90 % 이상의 소거활성을 나타냈다. ABTS 라디칼 소거활성(Fig. 1B)은 대조약물로 사용한 Trolox에 비해 그 활성이 낮았지만, 농도 의존적으로 증가하였고, 1000 μg/mL에서는 Trolox와 유사한 수준으로 증가되어 항산화 활성이 매우 우수함을 확인하였다.

2. 환원력에 미치는 DLE의 영향

다음은 DLE의 환원력을 알아보았다. 환원력은 항산화 능력과 관련이 있는 중요한 인자로서 비타민 C 등의 항산화제와 같이 환원력을 가진 물질은 Fe^{3+}-ferricyanide 복합체를 Fe^{2+} 형태로 환원시켜 시료의 환원력을 흡광도 수치로 나타낼 수 있는데, 흡광도 수치가 높을수록 높은 환원력을 제시한다[21]. 본 실험에서는 DLE의 환원력을 비타민 C와 비교조사 하였는데, mL당 500 μg 이하의 농도에서는 비타민 C가 약 2-3배 높았으나, 1000 μg/mL 농도에서는 DLE가 비타민 C 보다 매우 우수한 것으로 나타났다(Fig. 2).

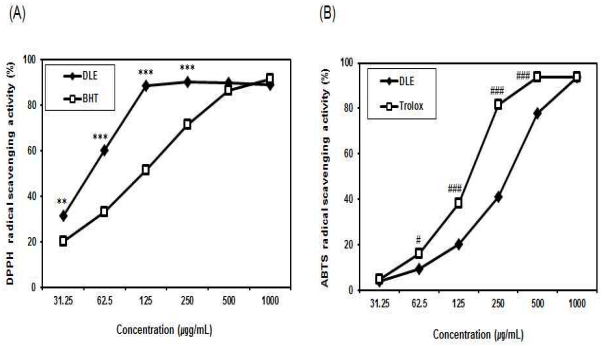

Fig. 1. Effects of DLE on DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity. The effect on DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity was tested with indicated concentration of DLE(31.5-1000 μg/mL). Values are shown as mean ± SD of 3 replicates. **p<0.01 and ***p<0.001 versus BHT group. #p<0.05 and ###p<0.001 versus DLE group.

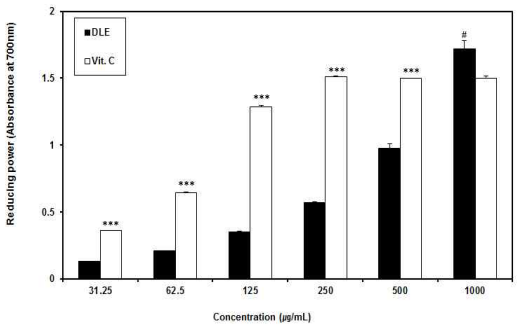

Fig. 2. Effects of DLE on reducing power. The effect on reducing power was tested with indicated concentration of DLE(31.5-1000 μg/mL). Values are shown as mean ± SD of 3 replicates. ***p<0.001 versus DLE group. #p<0.05 versus vitamin C group.

3. 항용혈 작용에 미치는 DLE의 영향

AAPH에 의한 적혈구 용혈에 대한 DLE의 보호효과를 알아보기 위하여 대조약물로 quercetin을 사용하여 비교조사 하였다(Fig. 3). 먼저 적혈구 부유액 (hematocrit가 5 %)에 AAPH를 단독 처리하여 용혈을 유도하였고 4시간째에 79.45±2.37%까지 용혈이 되었다. DLE의 용혈보호 효과를 알아보기 위하여 AAPH로 용혈을 유도하기에 앞서 시료를 농도별(6.25-100 μg/mL)로 전처리한 결과 농도 의존적으로 용혈이 억제된 것을 확인하였다. 특히 25-100 μg/mL에서는 매우 우수한 수준으로 용혈이 억제되었으며 100 μg/mL 농도에서는 정상군과 근접한 수준까지 억제되어 항용혈 효과가 매우 우수함을 확인하였다($p<0.001$).

4. AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량에 미치는 DLE의 영향

DLE가 AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조약물로 quercetin과 비교 조사하였다(Fig. 4). AAPH를 4시간 처리하였을 때 1 L 당 적혈구의 GSH는 0.029 ± 0.01 mM로 나타나 정상군 (0.439 ± 0.01 mM)에 비해 현저히 감소되었다. 그러나 DLE 처리군은 모든 농도에서 quercetin 보다 GSH 함량이 낮았지만, 농도가 증가할수록 AAPH에의해 고갈된 적혈구 내 GSH 함량이 농도가 증가할수록

현저히 증가되었다. 특히 정상군의 GSH 함량을 100%로 하였을 때 mL 당 100 μg 농도에서는 약 73%가 복원되는 우수한 효과를 보였다($p<0.001$).

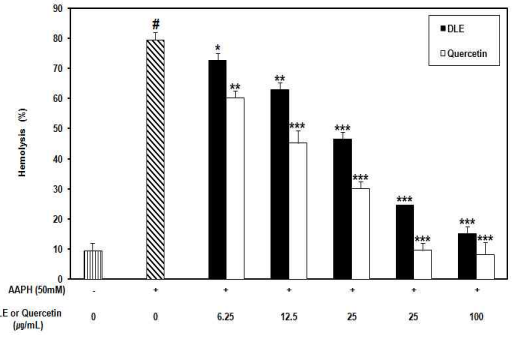

Fig. 3. Effects of DLE on AAPH-induced hemolysis in RBC. RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS (control) or preincubated with the different concentration (6.25-100 ㎍/mL) of DLE or quercetin for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37℃. Values are shown as mean ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus AAPH-treated group.

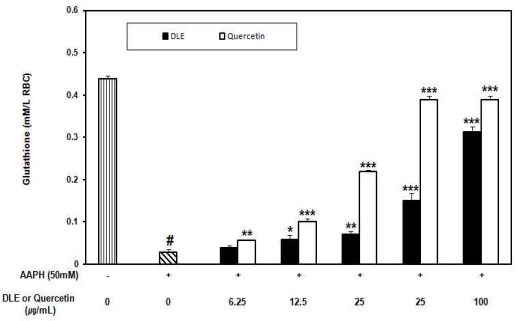

Fig. 4. Effects of DLE on AAPH-induced glutathione (GSH) in RBC. RBC suspension at 5% hematocrit was incubated with PBS (control) or preincubated with the different concentration (6.25-100 ㎍/mL) of DLE or Quercetin for 30 min. Then it was incubated with and without 50 mM AAPH for 4 h at 37℃ Values are shown as mean ± SD of three independent experiments. #p<0.001 versus the non-treated control group. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus AAPH-treated group.

고 찰

본 연구는 고욤 잎 열수 추출물의 생리활성을 알아보고자 DPPH와 ABTS가 유도하는 라디칼 소거 활성을 조사한 결과 31.25-250 μg/mL 농도에서는 합성항산화제로 활용되고 있는 BHT보다 DLE의 DPPH 라디칼 소거활성이 매우 우수하였고, mL 당 500 μg 이하의 농도에서는 Trolox에 비해 DLE의 ABTS 라디칼 소거 활성이 낮았을 지라도 1000 μg/mL에서는 Trolox와 유사한 수준으로 증가되어 항산화 활성이 매우 우수함을 확인하였다. 또한 mL 당 500 μg의 DLE 농도에서의 환원력은 비타민 C보다 낮았지만, 1000 μg/mL 농도에서는 DLE가 비타민 C 보다 환원력이 높아 매우 우수한 항산화 효능을 나타내는 효과가 있었다.

고욤나무는 우리나라를 비롯한 아시아와 지중해 지역에서 자생하는 낙엽성 식물로 과일을 섭취하거나 잎을 차로 가공하여 먹을 수 있다는 점과 생육이 좋고 기후환경에 강하여 감접을 붙여 감나무를 생산할 수 있기 때문에 많은 나라에서 재배되고 있다. 한방을 비롯한 전통의약분야에서는 성숙한 과일인 고욤은 진정, 진통, 수렴 및 변비치료에 사용되어 왔으며, 최근에는 고욤 잎이 아닌 고욤과 그 씨를 대상으로 추출한 추출물의 생리활성 성분은 gallic acid, methylgallate, ellagic acid, kaempferol, quercetin, myricetin, myricetin 3-O-beta-glucuronide, and myricetin-3-O-alpha-rhamnoside 등으로 DPPH, ABTS, Fe^{2+} chelating 활성이 매우 우수한 것으로 보고되었다[15]. 본 연구에서 사용한 고욤 잎 추출물의 DPPH와 ABTS가 유도하는 라디칼 소거 활성은 고욤과 씨의 추출물과 유사하였다. 또한 고욤 씨 추출물은 인간 유래 암세포주인 COR-L23, CaCo-2, C32, ACHN, A375, A549, Huh-7D12, MCF-7과 LNCaP 세포의 성장을 억제하는 효과가 있을 뿐만 아니라 적혈구의 항용혈 및 신경세포 손상에 대한 보호 효과가 있다[17]. 고욤 잎 추출물을 대상으로 한 연구는 추출물 자체의 DPPH 및 nitric oxide (NO) 유사 라디칼 제거 활성과 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase 유사 활성에 대한 보고[20]가 있을 뿐 적혈구의 항용혈 효과에 대한 보고는 없는 실정이다.

적혈구는 인체 내의 심한 염증과 과도한 운동 상태에서 지질과산화 반응이 촉진되어 세포막 단백질의 변성과 교차결합으로 인해 쉽게 용혈되기 때문에 항산화제 발굴에 대한 효능 평가에 주로 활용된다[1]. 그러므로 본 연구는 DLE의 항산화 효과를 밝히기 위해서 랫트 적혈구를 대상으로 AAPH가 유도하는 산화적 손상에 대해서 알아보았다. 그 결과 DLE의 적혈구에 대한 항용혈 효과는 참고약물로 사용한 quercetin 보다는 낮았지만, 농도가 증가할수록 적혈구의 용혈억제효과가 증가하였을 뿐만 아니라 고농도에서는 정상군과 유사할 정도로 그 효과가 매우 우수하였다(Fig. 3). 더욱이 DLE는 AAPH에 의해서 고갈된 세포내 항산화물질인 GSH를 농도 의존적으로 복원하는 효과가 매우 우수하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 본 연구에서 처음으로 밝혔다.

glutathione은 식품으로부터 섭취할 수 없는 기본적은 영양소는 아니지만, L-cysteine, L-glutamine과 glycine으로부터 생체에서 합성되는 물질로 생체에서는 환원된 상태의 GSH의 함량이 약 90%이고, 산화된 상태의 GSSG가 약 10% 이하로 존재하는데, glutathione은 glutathione reductase에 의해 GSSG을 재 생성한다. 생체가 산화적 스트레스에 노출되면, GSH에 대한 GSSG 비율이 증가하여 생체의 산화적 스트레스를 해소하는 항산화제로 작용한다. 이와 같이 생체 내에서 중요한 작용을 하는 GSH는 AAPH와 같은 라디칼에 대량으로 노출되면, 필연적으로 그 함량이 고갈된다. 본 연구에서는 이러한 점을 감안하여 산화적 스트레스에 대해서 민감한 적혈구를 대상으로 AAPH를 처리한 결과 베이스 라인으로 GSH 함량이 감소됨을 확인할 수 있었다[24]. 그러나 DLE 처리군은 모든 농도에서 quercetin보다 GSH 함량이 낮았지만, 농도가 증가할수록 AAPH에 의해 고갈된 적혈구 내 GSH 함량이 농도가 증가할수록 현저히 증가되었다. 특히 정상군의 GSH 함량을 100%로 하였을 때 mL 당 100 μg 농도에서는 약 73%가 복원되는 매우 우수한 효과를 보였다(Fig. 4). 그러므로 AAPH가 유도하는 산화적 손상에 대해서 DLE는 자체의 항산화

작용과 함께 GSH의 고갈을 억제시키는 기전으로 적혈구의 산화적 스트레스를 억제하는 작용이 있음을 밝혔다. 그러나 이러한 DLE의 항산화 작용에 대한 세포 기전은 앞으로 분자수준에서 더 연구해야 할 필요성이 있다.

이상의 결과를 종합해보면, DLE는 DPPH와 ABTS가 유도하는 라디칼을 효과적으로 소거함과 더불어 금속이온을 환원할 수 있는 항산화 작용이 매우 우수하였다. 또한 DLE는 AAPH가 유도하는 적혈구의 산화적 손상에 대한 항용혈 작용은 물론 AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량을 복원하는 효과가 매우 우수하였다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 창업성장기술개발사업으로 중소기업청의 지원을 받아 연구되었다(S2004797).

참고문헌

1. Shiva Shankar Reddy, C.S., Subramanyam, M.V., Vani, R., Asha Devi, S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. Toxicol In Vitro. 21: 1355-1364, 2007.
2. Choi, B.M., Pae, H.O., Jang, S.I., Kim, Y.M., Chung, H.T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. J Biochem Mol Biol. 35: 116-216, 2002.
3. Akhtar, U.S., McWhinney, R.D., Rastogi, N., Abbatt, J.P., Evans, G.J., Scott, J.A. Cytotoxic and proinflammatory effects of ambient and source-related particulate matter (PM) in relation to the production of reactive oxygen species (ROS) and cytokine adsorption by particles. Inhal Toxicol. 2: 37-47, 2010.
4. Wiseman, H. Dietary influences on membrane function ; impotent in protection against oxidative damage and disease. J Nutr Biochem. 7: 2-15, 1996.
5. Park, S.N. Skin Aging and Antioxidant. J Soc Cosmet Scientists Korea. 23: 75, 1997.
6. Park, S.N. Protective effect of isoflavone, genistein from Soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. Korean J Food Sci Technol. 35: 510-518, 2003.
7. Park, S.N. Antioxidative properties of baicalein, component from Scutellaria baicalensis G. and its application to cosmetics. J Kor Ind Eng Chem. 14: 657-666, 2003.
8. Devi, S.A., Vani, R., Subramanyam, M.V., Reddy, S.S., Jeevaratnam, K. Intermittent hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat erythrocytes: protective effects of vitamin E, vitamin C and carnitine. Cell Biochem Funct. 25: 221-231, 2007.
9. Okamoto, K., Maruyama, T., Kaji, Y., Harada, M., Mawatari, S., Fujino, T., Uyesaka, N. Verapamil prevents impairment in filterability of human erythrocytes exposed to oxidative stress. Jpn J Physiol. 54: 39-46, 2004.
10. Nagababu, E., Chrest, F.J., Rifkind, J.M. Hydrogen-peroxide induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta. 1620: 211-217, 2003.
11. Liu, Z.Q., Han, K., Lin, Y.J., Luo, X.Y. Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivatives on free-radical-initiated hemolysis of erythrocytes is due to its distributive status. Biochim Biophys Acta. 1570: 97-103, 2002.
12. Boussenadji, R., Porthault, M., Berthod, A. Microbore liquid chromatography with electrochemical detection for the control of phenolic antioxidants in drugs and foods. J Pharm Biomed Anal. 11: 71-78, 1993.
13. Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. Biosci Biotechnol Biochem. 63: 896-899, 1999.
14. 박진성. 고욤. 서울, 고시계, pp 74-75, 2010.
15. Ayaz, F.A., Kadioglu, A. Fatty acid compositional changes in developing Persimmon (Diospyros lotus L.) fruit. New Zealand J Crop Hort Sci. 27: 257-261, 1999.
16. Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N.G., Menichini, F. Antioxidant and antiproliferative activity of Diospyros lotus L. extract and isolated compounds. Plant Foods Hum Nutr. 64: 264-270, 2009.
17. Azadbakht, M., Hosseinimehr, S.J., Shokrzadeh, M., Habibi, E, Ahmadi, A. Diospyros lotus L. fruit extract protects G6PD-deficient erythrocytes from hemolytic injury in vitro and in vivo: prevention of favism disorder. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 15: 1270-1281, 2001.
18. Moghaddam, A.H., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Bigdellou, R., Mohammadzadeh, S., Ebrahimzadeh, M.A. Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of Diospyros lotus seeds. Acta Pol Pharm. 69: 687-692, 2012.
19. Nabavi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Fazelian, M., Eslami, B. In vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Diospyros lotus and Pyrus boissieriana growing in Iran. Pharmaco Maga. 5: 122-126, 2009.
20. 황성진, 부희옥, 박석천, 배춘식. 고욤나무 잎 추출물의 항산화성과 항암 활성. 한국약용작물학회 2008년도 춘계학술발표회, pp 198-199, 2008.
21. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1199-1200, 1958.

22. Oyaizu, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr. 44: 307-315, 1986.
23. Hseu, Y.C., Chang, W.C., Hseu, Y.T., Lee, C.Y., Yech, Y.J., Chen, P.C., Chen, J.Y., Yang, H.L. Protection of oxidative damage by aqueous extract from Antrodia camphorata mycelia in normal human erythrocytes. Life Sci. 71: 469-482, 2002.
24. Couto, N., Malys, N., Gaskell, S.J., Barber, J. Partition and Turnover of Glutathione Reductase from Saccharomyces cerevisiae: a Proteomic Approach. J Proteome Res. 12: 2885-2894, 2013.