

여주 활성 물질 Protocatechuic Acid의 신경세포의 산화적 스트레스에 대한 개선 효과

최정란¹ · 최지명¹ · 이상현² · 조계만³ · 조은주^{1*} · 김현영^{3*}

¹부산대학교 식품영양학과, ²중앙대학교 식물시스템과학과, ³경남과학기술대학교 식품과학부

The Protective Effects of Protocatechuic Acid from *Momordica charantia* against Oxidative Stress in Neuronal Cells

Jung Ran Choi¹, Ji Myung Choi¹, Sanghyun Lee², Kye Man Cho³, Eun Ju Cho^{1*} and Hyun Young Kim^{3*}

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

³Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

Abstract – Protocatechuic acid is an active phenolic acid compound from *Momordica charantia*. In this study, we investigated the protective effect of protocatechuic acid against oxidative stress under cellular system using C6 glial cell. The oxidative stress was induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) and amyloid beta 25-35 (A β ₂₅₋₃₅), and they caused the decrease of cell viability and overproduction of reactive oxygen species (ROS). However, the treatment of protocatechuic acid significantly elevated the decreased cell viability and inhibited the overproduction of ROS by H₂O₂. In addition, protocatechuic acid significantly recovered the cellular damage induced by A β ₂₅₋₃₅. In particular, protocatechuic acid at the concentration 10 μ g/mL decreased the elevated ROS level to normal level. These results indicate that protocatechuic acid may have neuroprotective effect through attenuating oxidative stress.

Key words: Protocatechuic acid, Hydrogen peroxide, Amyloid beta 25-35, C6 glial cell, Oxidative stress

생명체가 에너지를 생산하는 과정에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산소의 환원 대사물질로서 mitochondria나 peroxysome 등의 정상세포 내 대사과정 및 세포질 내 일부 효소들에 의해 자연적으로 생성되므로 ROS의 생성은 불가피하다.¹⁾ Superoxide, hydroxyl radical(\cdot OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) singlet oxygen 등과 같은 ROS는²⁾ superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등의 항산화 효소에 의해 제거되지만³⁾ 과도한 ROS의 생성은 산화적 스트레스를 유발하고, 산화적 스트레스는 DNA변형 등을 일으켜 세포사멸을 유도하여 뇌질환, 심혈관계 질환, 당뇨, 암 및 노화의 원인이 된다.⁴⁾ 특히 뇌는 불포화지방산과 순환하는 산소가 풍부하나 활성산소에 대한 항산화 효소가 상대적으로 다른 조직에 비해 작아 ROS에 의한 손상에 약하기 때문에 신경세포의 사멸로 인한 Alzheimer's disease(AD)와 Parkinson disease같은 퇴행성

신경성 질환과 관련이 크다.^{5,6)} 따라서 과도하게 생성된 ROS를 제거하기 위해 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나 인공합성항산화제에 대한 안전성 논란이 있어, 오래 전부터 먹어왔던 식품으로부터 유해성이 적으면서 우수한 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.⁷⁾

여주(*Momordica charantia*)는 박과의 덩굴식물로 인도, 중국, 중앙아메리카에서는 당뇨의 민간요법 치료제로써 사용되어지고 있다.⁸⁾ 여주는 K, Ca, Mg, Fe, Zn 등의 미네랄과 vitamin C, β -carotene을 다량 함유하고 있고⁹⁾ 여주의 주요 활성성분으로는 flavan-3-ol류와 phenolic acid류 종류들이 있다. 그 종류로는 flavan-3-ol류에는 epigallocatechin, catechin, epicatechin이 있으며 phenolic acid류에는 gallic acid, protocatechuic acid, tannic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanilic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid가 있다.¹⁰⁾ 활성성분은 여주의 열매, 잎, 줄기, 뿌리 등의 부위별로 그 함량이 조금씩 다른데,

*교신저자(E-mail): hykim@gntech.ac.kr, ejcho@pusan.ac.kr
(Tel): +82-55-751-3277, +82-51-510-2837

함량의 차이에 따라 기능도 다양하다. 여주 식물 전체는 “식물성 인슐린”이라 불릴 만큼 뛰어난 항당뇨 효과가 있으며,^{11,12)} 열매는 항발암성과 항콜레스테롤 효과를 가지고 있다.^{13,14)} 잎의 경우는 항바이러스, 항박테리아 효과가 보고되어 있다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 여주의 phenolic acid에 대한 연구로는 여주의 부위별 주요 phenolic acid의 분석과, 추출 용매차이에 따른 항산화 효과를 비교한 결과들이 보고되었다.^{12,18,19)} 몇몇 연구는 식물·식품에 함유된 다양한 종류의 phenolic acid 구성물질과 항산화 활성과 밀접한 관련이 있어 함유한 phenolic acid의 종류에 따라 항산화 능력에 차이가 있을 것으로 보고 하였다.^{20,21)} Protocatechuic acid는 주로 여주의 열매에 함유되어 있으나¹⁰⁻¹²⁾ 함유된 양은 재배환경의 차이에 따라 성장하는 동안 다양한 생화학적 작용에 의해 phenolic acid 구성물질이 달라지므로 그 양은 일정하지 않다. 하지만 열매를 가공하지 않은 상태보다 열을 가하여 조리하면 그 함량은 더 증가하게 된다.¹⁰⁾ Protocatechuic acid에 대한 연구로는 익지인(*Alpinia oxyphylla*)²²⁾과 도복령(*Smilicis chiniae rhizome*)²³⁾에 함유된 protocatechuic acid가 PC12 cell과 cortical neuron cell에 대한 neuroprotective 효과를 알아본 결과가 있으나 여주에 함유된 phenolic acid 구성물질에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 신경교세포인 C6 glial cell에 H₂O₂와 A β ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 산화적 스트레스로부터 여주에 함유된 protocatechuic acid의 신경세포 보호효과를 연구함으로써 여주가 가지고 있는 phenolic acid 구성물질의 우수성과 천연 기능성 물질로서의 가능성에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 여주(*Momordica charantia*)는 함양(Hamyang, Korea)에서 구입하여 음건한 후 사용하였다. 실험에 사용된 protocatechuic acid는 여주의 주요성분 중의 하나이며,¹⁰⁾ Sigma(Sigma St. Louis, MO, USA)사에서 추가 구입하여 실험에 사용하였다.

추출 - 여주 100 g을 메탄올로 추출하여 메탄올 추출물로 만들어 실험에 사용 하였다.

세포 종류 및 시약 - 실험에 사용한 C6 glial cell은 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, South Korea)에서 분양 받았으며 배양을 위한 100 units/mL의 penicillin streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지(Welgene, Daegu, South Korea)를 사용하였다. 산화적 스트레스를 유발 시키기 위한 H₂O₂는 Junsei(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)사 제품을, A β ₂₅₋₃₅는 Sigma사 제품을 사용하였다. 세포생존율과 ROS 생성률 측정을 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,3-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO)와 2'-dichlorofluorescin

diacetate(DCF-DA)는 Sigma사 제품을 구입하였다.

세포배양 - C6 glial cell은 100 units/mL의 penicillin streptomycin과 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 2-3일에 한번 배지를 교환하면서 배양하여 세포증식이 최대에 도달하였을 때 phosphate buffered saline으로 세척한 후 0.05% trypsin과 0.02% EDTA 혼합액을 이용하여 세포를 분리한 후 원심분리하여 세포를 집적시킨 다음 세포에 배지를 넣고 세포가 곧고루 분산되도록 잘 혼합하여 계대 배양 하며 사용하였다.

Cell Viability 측정 - 세포가 flask에 80-90%의 confluence 상태가 되면 5×10⁴ cells/mL로 seeding하여 세포를 부착시킨 후 산화적 스트레스를 유발하기 위해 H₂O₂(100 μM)와 A β ₂₅₋₃₅(25 μM)를 첨가하여 배양한 뒤 시료를 처리하여 24 시간 후 5 mg/mL의 MTT solution을 각 well에 주입하여 37°C에서 4시간 재배양 한 후 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.²⁴⁾

ROS 생성률 측정 - 세포가 confluence 상태가 되면 black 96 well plate를 이용하여 5×10⁴ cells/mL로 seeding하여 2시간 동안 37에서 배양하였다. 세포 부착이 잘 이루어 지면 H₂O₂(100 μM)를 및 A β ₂₅₋₃₅ (25 μM)를 처리하여 24시간 배양하여 산화적 스트레스를 유발 시킨 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 뒤 80 μM의 DCF-DA용액을 각 well에 주입하여 37°C에서 30분 동안 재배양 한 후 FLUOstar OPTIMA(BMG labtech, Ortenberg, Germany)에서 excitation-480 nm, emission-535 nm로 측정하였다.²⁵⁾

통계 분석 - 각 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, SAS 4.3을 이용하여 실험 결과로부터 ANOVA(analysis of variance)를 구한 후 Duncan's multiple test($P < 0.05$)를 이용하여 각 군의 평균간의 유의성을 검정하였다

결과 및 고찰

H₂O₂는 산소를 이용하는 생체의 대사 산물로 biological membrane를 자유롭게 통과하며 모든 세포의 조직에 apoptosis와 necrosis를 일으켜 세포 손상을 가져오는 산화제이다.²⁶⁾ 또한 H₂O₂는 구리나 철 이온 등과 Fenton반응에 의해 hydroxyl radical로 전환되어 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상, 지질과산화, 혈뇌장벽의 파괴 등을 일으키는 생체 독성 물질이다.^{27,28)} 특히, 이런 산화적 스트레스는 신경 세포의 사멸을 일으켜 신경퇴행성 질환의 원인이 된다. 따라서 H₂O₂는 *in vitro*에서 산화적 스트레스에 의한 신경퇴행성질환의 원인을 연구하기 위한 중요한 물질이다.²⁹⁾

H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 신경 세포 보호효과를 알아보기 위해 C6 glial cell을 이용하여 MTT assay를 시행하였다. 세포생존율 측정 결과, 정상군의 세포

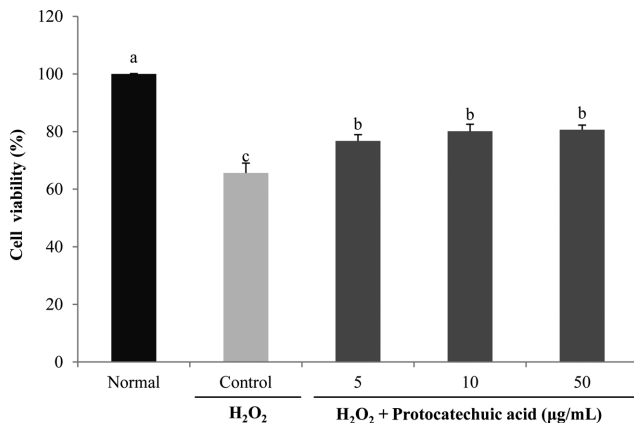


Fig. 1. Effect of protocatechuic acid on cell viability of C6 glial cell treated with H₂O₂. Values mean ± SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different (*P*<0.05) by Duncan's multiple range test.

생존율을 100%로 보았을 때 H₂O₂를 처리한 control군의 경우 65.50%로 감소하여 산화적 스트레스에 의한 손상을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 여주 활성물질인 protocatechuic acid를 농도별(5, 10, 50 µg/mL)로 처리하였을 때 control군에 비해 유의적으로 세포생존율이 증가하였으며, 특히 10 µg/mL의 농도에서 80%이상의 높은 생존율을 보여 H₂O₂에 의한 세포 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

오랜 전부터 ROS 검출에 사용되어지고 있는 DCF-DA는 세포막을 자유롭게 통과 할 수 있고 esterase에 의해 acetate group이 제거되어 세포 내에서 DCFH가 된다. 이 DCFH는 H₂O₂와 같은 ROS에 의해 산화되어 강한 형광성을 가지는 DCF가 되는 원리를³⁰⁾ 바탕으로 H₂O₂를 처리하여 C6 glial cell에서의 활성산소종 억제효과에 대해 알아보았다. ROS의 경우 정상적인 세포의 활동에 의해서 자연적으로 생성됨으로¹⁾ 시간이 지남에 따라 모든 군에서 ROS 생성량은 증가 하지만 산화적 스트레스를 유도한 control군의 경우 초기에 생성된 ROS자체가 많은 것을 알 수 있다(Fig. 2A). 실험 종료 시간 60분을 기준으로 control군의 ROS 생성량을 100%로 보았을 때 protocatechuic acid를 처리한 군은 control군에 비해 ROS 생성량이 감소한 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2B). 따라서 protocatechuic acid는 H₂O₂에 의한 세포 산화에 대한 세포 보호 효과와 활성산소종의 생성을 억제하거나 제거함으로써 신경세포에 사멸에 대한 보호 효과를 가지는 것으로 생각된다.

Amyloid beta(Aβ)는 40-42개의 아미노산 peptide로 정상적인 인체에서 소량씩 만들어지나 빠르게 분해되어 쌓이지 않지만 AD환자의 경우 Aβ의 비정상적인 과생성으로 인해 amyloid plaque가 형성되어 뇌 속에 축적되어 있다. 이 plaque들은 뇌세포에 세포독성을 가지고 있어 결국에는 뇌세포 사멸에 의한 AD를 유발하게 된다.³¹⁾ 특히 Aβ₂₅₋₃₅는

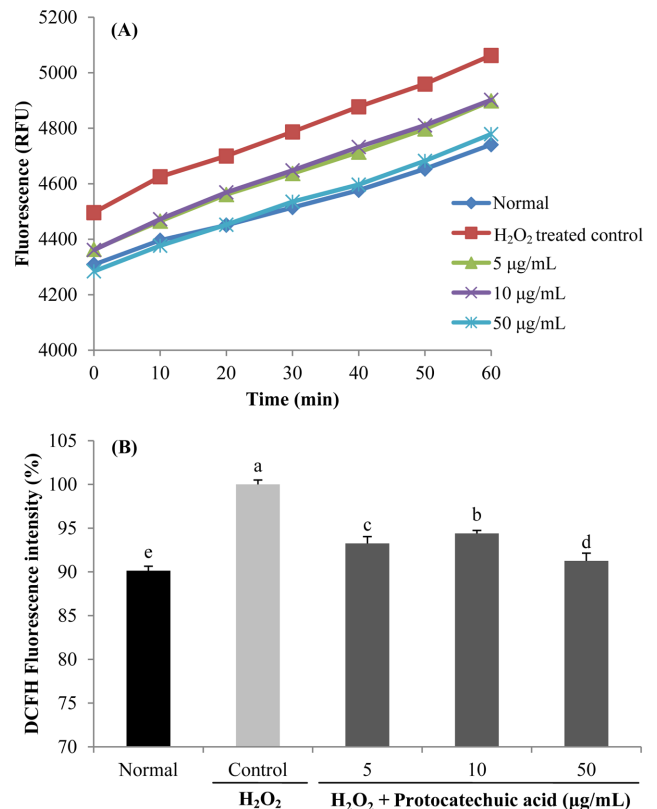


Fig. 2. Effect of protocatechuic acid on level of ROS in C6 glial cell treated with H₂O₂ (A: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with the protocatechuic acid, B: The production of ROS treated with the protocatechuic acid). Values mean ± SD. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different (*P*<0.05) by Duncan's multiple range test.

산화적 스트레스 매개성 뇌손상으로 인한 hippocampal 변화를 유발하고 신경세포사를 유발시키는 독성 물질로 알려져 있으며³²⁾ Aβ를 *in vitro*상에서 신경세포에 처리하였을 때 신경세포사를 유도하며 세포사를 일으키는 기전이 AD환자에게 나타나는 유형과 유사하다는 보고들이 있다.^{33,34)} 또한 PC12 cell에 Aβ₂₅₋₃₅(25 µM)를 처리하였을 때 세포생존율이 감소되었고 ROS의 양은 증가하였으며, PARP의 cleavage를 일으키고 Bax/Bcl-X_L의 비율을 증가시켜 세포 사멸을 유도한 것을 확인한 결과가 있다.³⁵⁾ 따라서 C6 glial cell에 Aβ₂₅₋₃₅(25 µM)를 처리하여 산화적 손상에 대한 protocatechuic acid의 신경세포 보호 효과에 대해 알아보았다. Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 세포사멸을 유도한 control군은 normal군 100%에 비해 50.13%로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 protocatechuic acid를 농도별로 처리한 결과 모든 농도에서 control군 보다 유의적으로 높은 세포생존율을 보였으며, 특히 농도 10 µg/mL의 농도에서 65.73%의 가장 높은 세포생존율을 보였다(Fig. 3). 또한 DCF-DA assay를 통한 ROS 생성억제 및 제거율을 측정된 결과 유의적으로 우수한 ROS

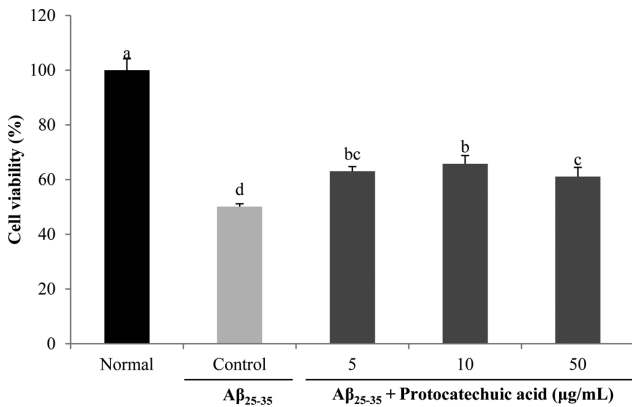


Fig. 3. Effect of protocatechuic acid on cell viability of C6 glial cell treated with Aβ₂₅₋₃₅. Values mean ± SD. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

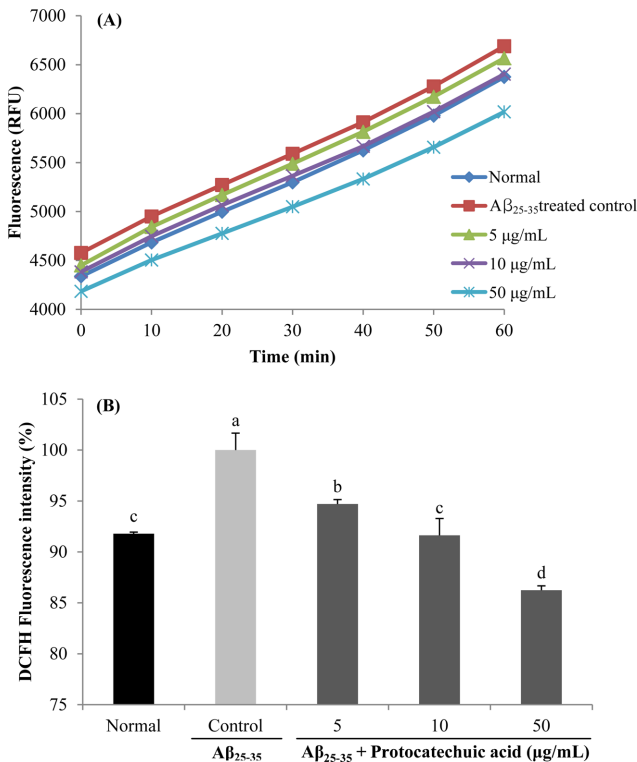


Fig. 4. Effect of protocatechuic acid on level of ROS in C6 glial cell treated with Aβ₂₅₋₃₅ (A: Time course of change in intensity of ROS fluorescence with the protocatechuic acid, B: The production of ROS treated with the protocatechuic acid). Values mean ± SD. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different (P<0.05) by Duncan's multiple range test.

생성 억제율을 보였다. 특히, protocatechuic acid 10 μg/mL 의 농도에서 normal군 수준으로 감소됨을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 protocatechuic acid는 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 산화적 스트레스와 ROS에 대한 신경세포 보호 효과를 나타

내어 신경세포 사멸에 영향을 미치는 인자들로부터 신경세포를 보호하는 작용이 있을 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 C6 glial cell을 이용하여 여주(*Momordica charantia*)의 활성물질인 protocatechuic acid의 산화적 스트레스에 의한 신경세포 보호효과에 대해 알아보았다. 산화적 스트레스를 유발하기 위해 H₂O₂를 처리한 결과 protocatechuic acid는 모든 농도에서 유의적으로 세포생존율을 증가시켰으며, ROS생성을 억제시키는 것을 알 수 있었다. 또한 AD의 원인물질로 알려져 있는 Aβ₂₅₋₃₅를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 유의적으로 세포생존율의 증가와 ROS생성을 억제함을확인 할 수 있었다. 이는 여주의 phenolic acid 구성물질인 protocatechuic acid가 신경세포 손상에 강력한 영향을 미치는 H₂O₂와 Aβ₂₅₋₃₅로부터의 산화적 스트레스를 개선함으로써 신경세포 손상에 대한 보호효과가 있음을 보여준다.

사사

본 연구는 2010년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2010-0005480).

인용문헌

- Valko, M. D., Leibfritz, J., Moncol, M. T., Cronin, M. M. and Telser, J. (2007) Free radical and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**: 44-84.
- Wiseman, H. and Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17-20.
- Kim, T. S., Kang, S. J. and Park, W. C. (1999) Changes in antioxidants and antioxidants enzymes activities of soybean leaves subject to water stress. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biol.* **42**: 246-251.
- Stadtman, E. R. and Berlett, B. S. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 485-494.
- Knott, A. B., Perkins, G., Schwarzendacher, R. and Bossy-Wetzell, E. (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**: 505-518.
- Reynolds, A., Lauriea, C., Mosleya, L. R. and Gendelmana, E. H. (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**: 297-325.
- Choi, U., Shin, D.-W., Chang, Y.-S. and Shin, I.-J. (1992)

- Screening of natural antioxidant from plant and their anti-oxidative effect. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**: 142-148.
8. Grover, J. K., Yadav, S. and Vats, V. (2002) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J. Ethnopharmacol.* **81**: 81-100.
 9. Lee, H. J., Moon, J. H., Lee, W. M., Lee, S. G., Kim, A. K., Woo, Y.H. and Park, D. K. (2012) Charantin contents and fruit characteristics of bitter melon (*Momordica charantia* L.) accessions. *J. Bio-Environment Control* **21**: 379-384
 10. Choi, J. S., Kim, H. Y., Seo, W. T., Lee, J. H. and Cho, K. M. (2012) Roasting enhances antioxidant effect of bitter melon (*Momordica charantia* L.) increasing in flavon-3-ol and phenolic acid contents. *Food Sci. Biotechnol.* **21**: 19-26.
 11. Horax, R., Hettiarachchy, N. and Islam, S. (2005) Total phenolic contents and phenolic acid constituents in 4 varieties of bitter melon (*Momordica charantia*) and antioxidant activities of their extracts. *J. Food Sci.* **70**: 275-280.
 12. Ghaima, K. K., Nader, M. I., Tauqi, R. A. and Ghraibit, S. A. (2013) Extraction and identification of phenol compounds from bitter melon *Momordica charantia* fruits and their role as antioxidants. *J. Biotechnology research center* **7**: 41-47.
 13. Ali, L., Khan, A. K. A., Mamun, M. I. R., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Alam, M. N. and Rokeya, B. (1993) Studies on hypoglycemia effects of fruit pulp, seed and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Med.* **59**: 408-412.
 14. Srivastava, Y., Venkatadrihna-Bhatt, H., Verma, Y., Venkaiah, K. and Raval, B. H. (1993) Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momordica charantia* extract: and experimental and clinical evaluation. *Phytother. Res.* **7**: 785-789.
 15. Cheng, L. Y. Tang, L., Yan, F., Wang, S. and Chen, F. (2004) The effects of the total saponin extract from the shoots of *Momordica charantia* L. on anti-virus HSV-II activity. *J. Sichuan. Univ. (Nat. Sci. Ed.)* **41**: 641-643.
 16. Hu, Q. S., Yang, Y. C. and Xia, H. (2004) Studies on inhibiting-bacteria of nature substance extracted from leaves and rattan of *Momordica charantia* Linn. *Jiangxi. Huagong.* **2**: 70-74.
 17. Zhang, R. Q., Ma, L. L., Lu, J. H., Hu, Y. Q. and Yu, J. F. (2003) A bacteriostatic test of leaf of *Momordica charantia* L. *J. Gannan. Med. Coll.* **23**: 272-273.
 18. Kubola, J. and Siriamorpun, S. (2008) Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*. *Food Chem.* **110**: 881-890.
 19. Divya, D., Hettiarachchy, N. S., Ganesh, V., Kanna, A. and Rayaprolu, S. (2013). Phenolic extracts from leaves of bitter melon (*Momordica charantia*) with antioxidant properties. *JASA.* **2**: 28-34.
 20. Aljajadi, A. M. and Kamaruddin, M. Y. (2004) Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacity of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.* **85**: 513-518.
 21. Reyes, L. F. and Cisneros-zevallos, L. (2003) Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5296-5300.
 22. An, L. J., Guan, S., Shi, G. F., Bao, Y. M., Duan, Y. L. and Jiang, B. (2006) Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food Chem. Toxicol.* **44**: 436-443.
 23. Ban, J. Y., Cho, S. O., Jeon, S-Y., Bae, K., Song, K-S. and Seong, Y. H. (2007) 3,4-dihydroxybenzoic acid from *Smilacis chiniae* rhizome protects amyloid β protein (25-35)-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **420**: 184-188.
 24. Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
 25. Byun, Y. J., Kim, S. K., Kim, Y. M., Chae, G. T., Jeong, S. W. and Lee, S. B. (2009) Hydrogen peroxide induces autophagic cell death in C6 glioma cells via BNIP3-mediated suppression of the mTOR pathway. *J. Neurosci.* **461**: 131-135.
 26. Diguiseppi, J. and Fridovich, I. (1984) The toxicity of molecular oxygen. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **12**: 315-342.
 27. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1991) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-504.
 28. Crack, P. J. and Taylor, J. M. (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 1433-1444.
 29. Kim, J. Y., Ju, H. S., Ban, J. Y., Song, K-S., Bae, K. H. and Seong, Y. H. (2009) Protective effect of *Vitis amurensis* stems and leaves extract on hydrogen peroxide-induced oxidative neuronal cell damage in cultured neurons. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **17**: 68-74.
 30. Kim, G., Lee, Y. K., Xu, H., Philbert, M. A. and Kopelman, R. (2010) Nano-encapsulation method for high selectivity sensing of hydrogen peroxide inside live cells. *Anal. Chem.* **82**: 2165-2169.
 31. Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C. and Castegna, A. (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role of amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* **7**: 548-554.
 32. Trubetskaya, V. V., Stepanichev, M. Y., Onufriev, M. V., Lazareva, N. A., Markevich, V. A. and Gulyaeva, N. V. (2003) Administration of aggregated beta-amyloid peptide (25-35) induces changes in long-term potentiation in the hippocampus *in vivo*. *Neurosci. Behav. Physiol.* **33**: 95-98.
 33. Yan, S. D., Fu, J., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., Mohanna, F., Collison, K., Ahu, A., Stern, E., Saido, T., Tohyama, M.,

- Ogawa, S., Roher, A. and Stern, D. (1997) An intracellular protein that binds amyloid-peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **75**: 1039-1042.
34. Rike, C. J., Ramezan-Arab, N. and Cotman, C. W. (1997) Beta-amyloid neurotoxicity *in vitro*: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J. Neurochem.* **69**: 1601-1611.
35. Jang, J. H. and Surh, Y. J. (2002) β -Amyloid induces oxidative DNA damage and cell death through activation of c-Jun N terminal kinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**: 228-236.
(2013. 11. 26 접수; 2014. 1. 16 심사; 2014. 2. 3 게재확정)