

쥐 전뇌세포 배양에 있어서 천연 생리활성물질이 하이드록실 라디칼에 의한 세포독성에 미치는 영향

이정채 · 임계택*

전남대학교 생물공학연구소, 생활성물질부

Effects of Natural Bioactive Substances on Hydroxyl Radical Mediated Cytotoxicity in Mouse Forebrain Cell Culture

Jeong-Chae Lee and Kye-Taek Lim*

Department of Bioactive Substances, Institute of Biotechnology, Chonnam National University
Kwangju city, 300 Youngbong-Dong, 500-757, Korea

(Received March 18, 1998)

(Accepted May 28, 1998)

ABSTRACT : The biological effects of the water extracts of *Rhus Verniciflua Stokes* (RVS) were evaluated by protection against hydroxyl radicals. Antioxidative activities were measured using both 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and thiocyanate method. Also we used the Glucose oxidase (GO) 20 mU/ml hydroxyl radical generating system in mouse forebrain cell culture. Water was used for extraction from RVS as a solvent which has high polarity especially. In DPPH method, the antioxidative activities of the crude water extract were stronger than any other extracts of low polar-solvents. In the antioxidative effects of mouse forebrain culture using 20 mU/ml GO, cell viabilities were evaluated 65.6%, 68.8% at 1 μ l, 5 μ l addition of crude water extracts (30 mg/ml) respectively. 10 μ l addition of crude water extracts had more than 86.1% cell viabilities, $P < 0.01$ significantly, compared with the group treated with GO alone. In comparison with the antioxidative activities of several commercial antioxidants (ascorbic acid, α -tocopherol, catalase, serum), 273 μ l/ml addition of crude water extracts (300 μ g/ml) showed equivalent antioxidative effect to 25 μ M ascorbic acid.

Key Words : Natural antioxidant, *Rhus Verniciflua Stokes* (RVS) water extract, Mouse forebrain cell

I. 서 론

정상적인 대사과정에서 생성되는 산소자유기 (oxygen free radical)는 O_2^- (superoxide anion), $\cdot OH$ (hydroxyl radical), RO_2 (peroxyl radical), RO (alkoxyl radical) 등이 있으며, 잘 알려진 활성산소 (active oxygen)로서는 H_2O_2 (hydrogen peroxide), $HOCl$ 등이 있다. 하지만 일반적으로 생명체는 catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, heat shock protein, selenium, metallothionein, superoxide dismutase, ascorbic acid, α -tocopherol, vitamin A 등에 의해 어느 일정수준의 라디칼에 의한 산화적 스트레스는 생명현상에 큰 문제가 되지 않는다 (Adams and Odunze 1991; Barry and Okezie 1993). 그러나 비 정상적인 대사과정

이나 혹은 물리, 화학적인 외부적 자극에 의한 강한 산화적 스트레스는 산화-항산화의 불균형을 초래하며, 결국에는 라디칼에 의한 대사장해 및 각종 질병의 유발과 더불어 DNA 변성, 세포막의 지방산 산화, 단백질의 산화 및 변성등을 야기시킨다. 따라서 세포의 정상적인 기능이 억제되어 결과적으로는 세포는 사멸된다 (Shacter *et al.*, 1988; Spina and Cohen 1989). 그러나 이에 반하는 최근의 보고로써, 산소자유기 중 $\cdot OH$ 라디칼은 세포질내에서 신호전달과 면역체계 등에 관여한다고 알려졌다 (Burdon 1995; Yuchiro *et al.*, 1997).

오래 전부터 많은 학자들은 생명체에 활성을 줄 수 있는 합성항산화제를 개발해 왔지만 이들의 안정성과 유해성 여부는 논란의 대상이 되고 있다. 특히 몇몇 합성항산화제는 이취가 있고 고온에서 불안정하며 (Chang *et al.*, 1977; 이 1978), 기형발생인자 및 발암

*To whom correspondence should be addressed

물질이 될 수 있고(Schafer and Arnrich 1984), 과용은 간, 위장점막, 폐, 신장, 순환계 등에 심각한 독성작용을 일으키는 것으로도 알려졌다(Branen 1975; Choe and Yang 1982; 최 등 1982). 그러므로 최근에는 생체에 부작용이 없고 항산화력이 강한 천연항산화제를 동·식물로부터 찾으려는 많은 연구들이 다각도로 진행되고 있다(이 등 1993; 이 1993; 박 등 1995).

본 연구실에서도 생리활성물질로써 율나무 에탄올 추출물이 산소자유기에 원인하는 쥐의 뇌세포막 지방산의 산화를 억제한다는 것을 연구하였는 바, 특이하게도 여러추출용매 중 극성이 강한 용매에 의한 율나무 추출물이 다른 추출용매에 비해 항산화 효과가 크다는 것을 입증했다(임 등 1997). 이러한 결과는 극성이 큰 용매에 의한 율나무 추출물이 천연 생리활성물질로써 기능을 할 수 있다는 것을 시사하여 주는 것이다(김 1996).

따라서 본 연구는 극성이 에탄올 보다 큰 용매인 물로써 율나무에서 추출된 물질을 생쥐 전뇌세포를 배양하여 그 생활성기능인 항산화력을 알아 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

율나무는 전남 화순군 화순읍 이십곡리에서 자생한 것을 96년 가을에 채취하여 잘게 세절한 후 물에 6개월 정도 침지하여 지하실에 보관한 다음 본 실험에 시료로 사용하였다. 쥐의 품종은 ICR 이었고 실험동물의 사육조건은 Lee 등(1996)의 사육방법에 따랐다.

2. 시약

본 실험에서는 특급 시약을 구입하여 사용했으며, Glucose oxidase(GO), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide(MTT), linoleic acid, ammonium thiocyanate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferrous chloride, minimum essential medium (MEM), serum 등은 Sigma로부터 구입하였다.

3. 시료제조

시료의 추출, 분리, 정제 등은 Lim 등(1997)의 방법에 따라 제조하였고 이 때 사용된 용매는 이온이 포함되지 않는 증류수를 사용했다.

4. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 항산화력 검색

물로 율나무에서 추출 건조된 시료의 항산화력 유무를 검색하기 위해 추출물을 일정농도(30 mg/ml)로 nanopure 물로 희석한 후 Tomohiro 등(1994)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, Whatman 여과지를 대략 지름이 2 cm 크기로 절단, 멸균하여 건조시킨 후 용매의 추출물을 200 μ l 분무하고 건조시킨 후 그 위에 DPPH용액 200 μ l(80 μ g/ml in EtOH)를 분무하여 건조시켰다. 그 다음 10분이 경과한 후 발색(진한 자주색 일수록 높은 항산화력)에 의하여 항산화력의 유무를 검증했다.

5. Thiocyanate를 이용한 항산화력 측정

Thiocyanate를 이용한 항산화력 측정은, 먼저 다음의 용액을[linoleic acid(25 mg/ml in EtOH), ferrous chloride(2.45 mg/ml 3.5% hydrochloric acid), ammonium thiocyanate(0.3 g/ml H₂O), phosphate buffer(pH 7.0)] 제조하여 이를 stock solution으로 사용하였다. 시험용액은 sample 용액(율나무 물 추출물) 200 μ l, linoleic acid 200 μ l을 시험관(1.5×4.3 cm)에 넣고 섞은 후 phosphate buffer 400 μ l와 증류수 200 μ l를 혼합하여 40°C에서 은박포장한 후 30분간 보관하였다. 혼합용액에서 100 μ l를 취하여 colorimetric tube에 넣고 ethanol 3 ml와 ammonium thiocyanate 용액 100 μ l, ferrous chloride 용액 100 μ l를 혼합한 후 3분 뒤에 500 nm에서 spectrophotometer(LKB)로 흡광도를 측정했다(Tomohiro *et al.*, 1994).

6. 쥐 전뇌세포 배양

생쥐 전뇌세포 배양은 Lim 등(1995)의 방법에 따라 수행했다. 즉, 확대현미경하에서 임신 13일째인 ICR 생쥐의 embryo에서 전뇌를 분리하여 잘게 세절한 후 0.25% trypsin과 20 μ g/ml DNase를 혼합하여 37°C에서 15분간 배양하고 원심분리(1,000×g)후 상층액을 제거하였다. 이 때 남아있는 전뇌세포 조직을 인산완충용액(pH 7.2)으로 재부유시킨 다음 다시 원심분리(800×g)하여 상층액을 버리고 단일세포(single cell)로 만들었다. 단일세포를 5% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 MEM 배지를 사용하여 96 multiwell에 대략 10⁵ cells/ml로 균일하게 분주한 후 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 배양 3일째 기존의 배지를 제거하고 FBS가 포함되어 있지 않은 MEM 배지를 첨가하여 10일간

배양하였다. 이 때 각 well의 MEM 배지 최종 부피는 100 μ l였다.

7. 옷나무 물 추출물의 항산화 효과

생쥐 전뇌세포를 10일간 배양한 후 세포배양액에 0.5% D-glucose, 20 mU/ml glucose oxidase 및 일정량의 옷나무 물 추출물(30 mg/ml)을 MEM과 함께 첨가하여 37°C에서 4시간 배양했다(Lim *et al.*, 1995). 4시간 배양 후 각각의 well에 50 μ l(5 mg/ml) 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazolium bromide(MTT)를 첨가하여 다시 4시간 배양한 다음 기존의 배지를 버리고, 70 μ l의 isopropanol을 첨가하여 microelisa reader(Molecular Devices Corp. Tmax)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포수를 대조군에 대하여 percentage(%)로 환산하였다.

III. 결과 및 고찰

1. DPPH 및 thiocyanate를 이용한 항산화력 측정

생쥐 전뇌세포에 대한 옷나무 물 추출물(30 mg/ml)의 생리적인 효과를 규명하기 위해 항산화력을 측정한 결과는 다음과 같으며, Lim 등(1997)의 연구와 비교할 때 극성의 정도에 따라 항산화력에 차이를 나타냈다.

먼저 DPPH를 이용한 항산화력 측정으로써, 물 또는 용매 추출물에 대한 발색의 변화를 본 결과, 일반적으로 극성이 큰 물 추출물이 강한 자주색(white-on-purple spot)을 나타냈다. 반면 chloroform이나 n-hexane의 추출물은 물 추출물에 비해 그 발색정도가 경미했다. 한편 추출용매와 항산화력과의 상관관계를 알아볼 때 이와같은 결과는 Lim 등(1997)의 옷 에탄올 추출물에 대한 항산화 효과와 유사한 것으로 보여지며, 이는 극성이 큰 용매 추출물이 비극성 용매 추출물 보다 강한 항산화력을 나타내는 것을 보여준다(결과 생략).

한편 화학적인 분석인 thiocyanate 방법에 의한 항산화력의 결과는 DPPH에 의한 측정과는 다소 상이한 결과로서 catalase 및 에탄올 추출물과 항산화력을 비교했을 때 catalase 보다는 3.8배, 에탄올 보다는 2.3배 정도의 더 낮은 수치를 보였다(Fig. 1). 이 결과는 thiocyanate에 의한 물 추출물의 항산화력가는 극성이 큰 물 추출물이 chloroform이나 hexane과 같은 비극성 용매보다는 항산화력이 보다 높다는 윤 등(1993)과 이 등(1993)의 결과와는 상반된 경향을 나타냈다. 아마도 이러한 경향은 페놀계 항산화제에 있어서는 thiocya-

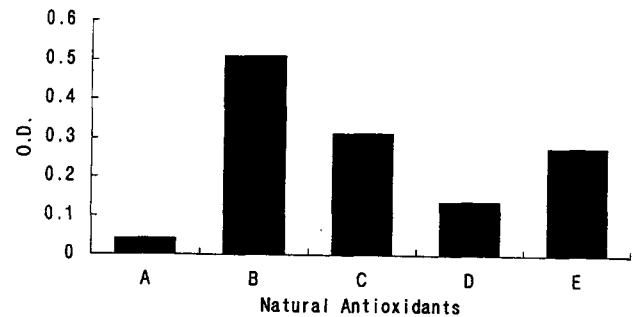


Fig. 1. Antioxidative activities of the water extract from *Rhus Verniciflua Stokes* (RVS) by thiocyanate method. Antioxidative activity was measured at 500 nm. A; 50 μ M α -tocopherol, B; 10 μ g/ml catalase, C; 200 μ l extract with ethanol from RVS, D; 200 μ l extract with water from RVS, E; 200 μ l extract with chloroform from RVS.

nate 방법에 대해 민감하지만, 본 실험실에서 추출한 물질은 성격상 glycoprotein으로서 dimer로 되어 있을 것으로 보여지고(Lim 등 1997), 같은 물질간에도 추출용매의 성격에 따라 thiocyanate 방법을 이용한 항산화력 측정은 그 결과가 다소 상이할 수 있기 때문인 것으로 생각된다.

2. 옷나무 물 추출물의 항산화 효과

화학적인 방법을 이용한 항산화력 측정 결과를 기초로 산소자유기에 아주 민감한 쥐 전뇌세포를 배양하여 hydroxyl radical generation system으로 물 추출물의 항산화 효과를 측정하였다(Lim *et al.*, 1995). 일반적으로 hydroxyl radicals의 생성기전은, D-glucose와 글루코스 산화효소의 반응에 의해 H₂O₂가 생성되고 이것은 다시 Haber-Weiss reaction(Amram *et al.*, 1981)에 의해 hydroxyl radical을 생성한다. 추출물의 항산화 효과는 hydroxyl radical에 물 추출물을 30 mg/ml로 희석하여 사용하였고, 이 때 GO의 농도는 20 mU/ml이었다. 한편 배양된 전뇌세포에 대한 가장 적당한 GO 처리시간을 알아본 바 GO 20 mU/ml 수준의 4시간 배양일 때 약 45%가 생존하는 것을 볼 수 있었으며, 이 수준이 전뇌세포에 대한 항산화 효과실험시 가장 적당한 것으로 여겨진다(Michikawa *et al.*, 1995)(Fig. 2).

항산화 효과를 비교하는데 있어서 살아있는 세포수는 MTT처리 후 대조군에 대해 %로 계산하였다. 항산화 효과에 있어서 GO 20 mU/ml 처리군은 대조군에 비해 처리 후 4시간에 약 48%의 전뇌세포가 살아있는 것을 볼 수 있었으며, GO 20 mU/ml 처리 후 쥐 전뇌세포에 물 추출물(30 mg/ml)을 stock solution으로 하여 총 세포배양액 100 μ l/well에 1 μ l, 5 μ l 첨가시 뇌세포 생

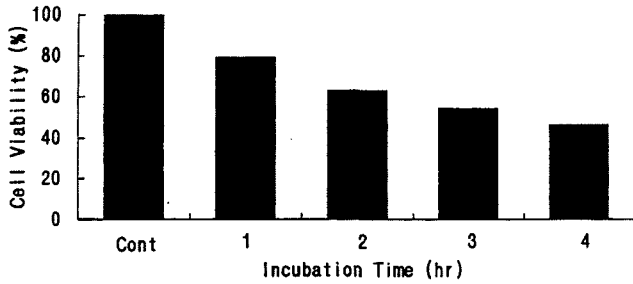


Fig. 2. Time dependency of GO-mediated oxygen free radical cytotoxicity as measured by MTT assay in embryonic forebrain culture. The concentration of GO was 20 mU/ml and incubation time was for 4 hrs. Values represent the mean and SD of determinations made in four separate culture.

존률은 대조군에 비해 65.6%, 68.8% 였다. 또한 6 μ l와 7 μ l 첨가시 각각 79%, 80% 이었고 10 μ l 첨가시엔 86.1%로서 매우 높은 생존률을 보였다(Fig. 3). 본 실험에서 사용된 1 μ l의 물 추출물의 용적률은 배지의 총량(100 μ l)에 대하여 1%에 해당하며, 이 때 물 추출물의 농도는 297 μ g/ml이고 물 추출물의 첨가는 10 μ l 이하로 제한하였다. 덧붙여 serum은 항산화력이 있는 것으로 알려져 있기 때문에 hydroxy radical에 대한 serum의 영향을 최대한 배제하기 위해 쥐 전뇌세포 배양 3일 부터는 serum이 없는 MEM 배지를 사용하였다. 한편 GO 20 mU/ml 첨가없이 10 μ l 물 추출물만을 배양세포에 첨가시 97%의 생존율을 보였으며, 순수한 물 10 μ l(9% 물에 상당) 첨가시 쥐 전뇌세포 생존률은 96%였다. 이 의미는 물 추출물을 배지 총량에 대하여

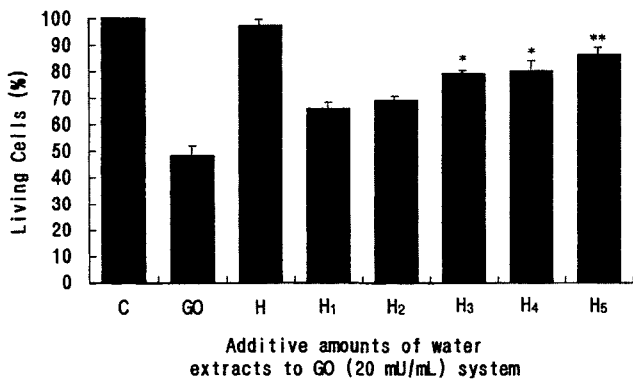


Fig. 3. Antioxidative effects of the water extract from RVS to hydroxyl radical. Mouse forebrain cells were exposed to hydroxyl radical generated by 20 mU/ml glucose oxidase for 4 hr. Cell viability was determined by MTT assay. C; Control, GO; 20 mU/ml glucose oxidase, H; 10 μ l crude water extract, H₁; 1 μ l crude water extract + GO 20 mU/ml, H₂; 5 μ l crude water extract + GO 20 mU/ml, H₃; 6 μ l crude water extract + GO 20 mU/ml, H₄; 7 μ l crude water extract + GO 20 mU/ml, H₅; 10 μ l crude water extract + GO 20 mU/ml. The results are mean \pm SEM (n=5). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, significantly differ from the cultures exposed to GO alone, single factor ANOVA analysis.

9% 까지 첨가하여도 쥐 전뇌세포 생존률에 대해 큰 영향을 주지 않는다는 것이다.

Fig. 3는 생쥐 전뇌세포에 물 추출물(30 mg/ml)의 첨가에 따른 항산화 효과를 MTT 방법으로 알아본 결과이며, 물 추출물 6 μ l 첨가시 항산화 효과는 P \leq 0.05 수준에서 유의성을 보여주었다.

3. 항산화 효과 비교

Fig. 4는 물 추출물의 항산화효과를 GO 20 mU/ml, 4시간 배양하여 잘 알려진 천연항산화제와 비교한 결과이다. 항산화제의 농도 25 μ M, 50 μ M ascorbic acid; 50 μ M, 100 μ M α -tocopherol; 10 μ g/ml, 20 μ g/ml catalase, 5 μ l serum을 넣어 hydroxy radical에 대한 항산화 효과를 측정된 결과 GO 20 mU/ml 만을 처리한 군에 있어서 쥐 뇌세포 생존율이 48% 이었지만 25 μ M, 50 μ M ascorbic acid에서는 87%, 90%, 50 μ M, 100 μ M α -tocopherol에서는 각각 72%, 77%였으며, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml catalase, 5 μ l serum 첨가시 각각 98%, 99%, 70%였다(Fig. 4). 이것은 생쥐 뇌세포 86.1% 이상의 생존율을 가진 물 추출물 10 μ l는, 25 μ M의 ascorbic acid 항산화 효과와 상응하며, 10 μ g/ml의 catalase 보다는 약한 항산화 효과를 가진 것을 보여주는 것이다. 따라서, 이러한 결과에 대한 몇가지 가능한 추론은 옳나 무 물 추출물이 hydroxy radical을 바로 물로 전환시키는 catalase와는 다른 mechanism이거나, 항산화에 관여하는 원인물질의 화학적 조성이 다르기 때문인 것으로

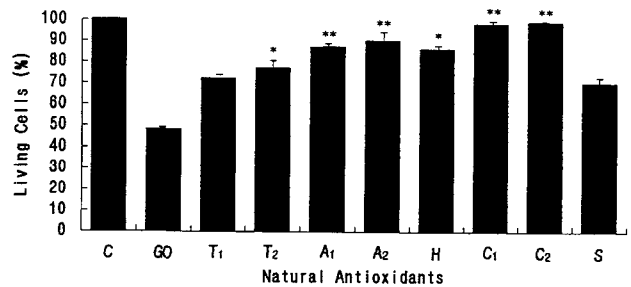


Fig. 4. Comparison to antioxidative effects between the crude water extract and natural antioxidants. Mouse forebrain cells exposed to hydroxyl radical generated by 20 mU/ml glucose oxidase and then added different antioxidants separately, for 4 hr. Cell viability was evaluated by MTT assay. C; control, GO; 20 mU/ml glucose oxidase, T₁; 50 μ M α -tocopherol + GO 20 mU/ml, T₂; 100 μ M α -tocopherol + GO 20 mU/ml, A₁; 25 μ M ascorbic acid + GO 20 mU/ml, A₂; 50 μ M ascorbic acid + GO 20 mU/ml, H; 10 μ l of crude water extracts + GO 20 mU/ml, C₁; 10 μ g/ml catalase + GO 20 mU/ml, C₂; 20 μ g/ml catalase + GO 20 mU/ml, S; 5% serum + GO 20 mU/ml. The results are mean \pm SEM (n=5). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, significantly differ from the cultures exposed to GO alone, single factor ANOVA analysis.

추출된다. 그러나 물 추출성분 중 항산화에 관여하는 주 물질은 아마도 당단백질일 가능성이 높기 때문에 기질특이성에 견주어 볼 때 GO에 대한 직접적으로 작용하기는 어려울 것으로 보여진다. 한편 α -tocopherol의 낮은 항산화 효과는 아마도 지용성인 비타민이기에 녹이는 용매에 따라 그 역가가 다르기 때문인 것으로 보여지며, 상용적으로 α -tocopherol은 멸균된 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하지만 DMSO 그 자체는 세포독성을 가지고 있어 본 실험에서는 에탄올로 용해시킨데 따른 결과로 추측된다.

지금까지의 연구결과를 종합해 볼 때, 추출하는 용매에 따라 항산화 효과가 크게 달라지며 그 중에서도 용매로서 chloroform이나 n-hexane 보다는 물 추출물이 매우 높은 항산화 효과를 가지는 것을 알 수 있었다. 이러한 추출용매에 따른 항산화 효과의 변화는 용매의 극성정도에 기인한 추출성분의 차이로 보여진다. 또한 GO 20 mU/ml 만을 처리한 군에서는 쥐 뇌세포의 생존율이 48%인데 반하여 10 μ l 물 추출물 처리군은 86.1%의 생존률로서 항산화 효과가 컸고, 일반적인 경향은 물 추출물 첨가량의 증가에 따라 점차적으로 hydroxyl radical에 의한 쥐 뇌세포의 손상이 보호되어 살아있는 세포수가 증가하는 것을 보여주었다.

결론적으로 물 추출물은 hydroxyl radical에 대한 강력한 scavenger로서 작용할 가능성이 보여지며, 이는 전뇌세포에 있어서 라디칼에 의한 손상에 의해 야기되는 여러 질병의 예방에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시해준다.

따라서 앞으로의 연구로서 항산화 효과의 원인 물질의 동정과 In vivo 차원의 생리적 효과를 알아보아야 할 것으로 본다.

IV. 결 론

웃나무를 극성이 큰 물로 침지한 후 추출물을 먼저 화학적인 방법인 DPPH 및 thiocyanate 방법으로 항산화력을 측정했으며, 그 다음 생쥐 전뇌세포를 배양하여 glucose oxidase에 의해 생성되는 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과를 측정하였다.

DPPH에 의한 항산화력은 물 추출물의 항산화력이 다른 용매로 추출한 것에 비해 일반적으로 높았으나, thiocyanate 방법에 있어서는 일반적으로 낮은 수치를 보였다. 한편 생쥐 전뇌 배양세포에 물 추출물(30 mg/ml)과, GO 20 mU/ml system으로 4시간 배양 후 항산화 효과를 측정한 결과는 GO 20 mU/ml만을 처리한 군에서는 쥐 전뇌세포의 생존률이 48.0%인데 반하여,

웃나무 물 추출물을 1 μ l와 5 μ l 첨가시 생존률은 대조군에 비해 각각 65.6%와 68.8% 였으며, 6 μ l 첨가시 79.0%, 7 μ l와 10 μ l 첨가시 각각 80.0% 및 86.1%로서 높은 생존률을 보였다. 물 추출물 10 μ l 첨가에 있어서 hydroxyl radical에 대한 항산화 효과를 대조군이 아닌 GO 단독 처리군과 비교할 때 $P \leq 0.01$ 의 유의성을 보여주었다. 한편 물 추출물과 천연항산화제인 ascorbic acid, α -tocopherol, catalase 및 serum의 항산화 효과를 비교한 결과 쥐 전뇌세포 생존율이 GO 20 mU/ml 처리구가 48%인데 반하여, 10 μ l 물 추출물 첨가시 86.1% 이었고, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml catalase에서는 각각 98.0%와 99.0%였으며, 25 uM, 50 uM ascorbic acid는 각각 87.0%와 90.0%, 50 uM, 100 uM α -tocopherol 및 5% serum에서는 각각 72.0%, 77.0%, 70.0%로 나타났다. 결론적으로 물 추출물 300 μ g/ml은 25 uM ascorbic acid에 상응되는 항산화력을 가지고 있지만 10 μ g/ml catalase에는 그 활성이 미치지 못했다.

감사의 글

본 연구는 1997년 학술진흥재단 지역개발연구과제 학술연구 조성비 지원으로 이루어진 결과로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Adams, Jr. J.D. and Odunze, I.N. (1991): Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.*, 10, 161-169.
- Amram Samuni, Mordechai Chevion and Gidon Czap-ski. (1981): Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* 256, 12632.
- Barry, H. and Okezie, I.A. (1993): DNA and free radicals. Ellis Horwood, NEW YORK LONDON TORONTO SYDNEY TOKYO SINGAPORE p. 1.
- Branen, A.L. (1975): Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *J. Amer. Oil Chem. SOC.*, 52, 59.
- Burdon, R.H. (1995): Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 775.
- Chang, S.S., Matijasevic, B.O., Hsieh, O.A.L. and Hwang, C.H. (1977): Natural antioxidants rosemary and sage. *J. Food Sci.* 42, 1102.
- Choe, S.Y. and Yang, K.H. (1982): Toxicological studies of antioxidants butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). *Korean J. Food Sci. Technology*, 14, 283-288.

- Kensuke Okusa, Tetsuo Miyakoshi and Chen-Loung Chen. (1996): Comparative studies on dehydrogenative polymerization of coniferyl alcohol by laccase and peroxidases. *Holzforschung*, 50, 15-23.
- Lee, J.C. and Lim, K.T. (1996): Stress response by copper, selenium as environmental pollutant in mouse tissues. *Korean J. Environ. Biol.* 14, 177.
- Lim, K.T., Park, S.T., Chol, M.K. and Chung, Y.T. (1995): Neuronal cytotoxicity of oxygen radical in newborn mouse forebrain culture. *Korean J. Toxicol.* 11, 187-192.
- Michikawa, M., Lim, K.T., Mclarnon, J.G. and Kim, S. U. (1994): Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 37, 62-70.
- Schafer, E. and Arnrich, L. (1984): Effects of dietary vitamin E on serum and pulmonary fatty acid as prostaglandins in rats fed excess linoleic acid. *J. Nutr.* 144, 1130.
- Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W. and Potter, M. (1988): Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis*, 9, 2297.
- Spina, M.B. and Cohen, G. (1989): Dopamine turnover and glutathione oxidation: Implication for parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1398.
- Tomohiro, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. (1994): A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biolo. Biotech. Biochem.* 58, 1780-1783.
- Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, S.S. Vartanov. and Varfolomeyer, S.D. (1994): Laccase; property, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-280.
- Yuichiro, S., Henry J.F. and Sevanian, A. (1997): Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 269-285.
- 김태정 (1996): 한국의 자원식물(II). 서울대학교 출판부, pp. 292-294.
- 박원봉, 김덕숙 (1995): 저장조건에 따른 신선초 생즙의 베타 카로틴과 비타민 C의 함량 및 항산화능의 변화. *한국식품과학회지*, 27, 375-379.
- 윤석권, 김정환, 김재욱(1993): 탈지들깨박 에탄올 추출물의 항산화효과. *한국식품과학회지*, 25, 160-164.
- 이연재, 신동화, 장영상, 강우석 (1993): 불나무 순차용매 추출물의 항산화 효과 비교. *한국식품과학회지*, 25, 677-682.
- 이준석 (1978): TBHQ, BHA/BHT 및 methyl silicone이 식유의 저장성과 고온에서의 안정성에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 10, 250.
- 이형욱 (1993): 토코페롤류의 항산화 작용과 linoleic acid methylester에서 생성된 cis/trans, trans/trans-hydroperoxide isomer. *한국식품과학회지*, 25, 307-312.
- 임계택, 심재한 (1997): 옷나무 에탄올추출물의 쥐 뇌세포에 대한 항산화효과. *한국식품과학회지*. 29, 1248-1254.
- 최석영, 양규환 (1982): 항산화제 BHT와 BHA의 안정성. *한국식품과학회지*, 14, 283-288.
- 최영전 (1992): 한국민속식물. 아카데미, pp. 247-248.