

원 저

허혈/ 재관류 세포 손상에서 청폐사간탕의 보호 효과

홍성길*, 강봉주*, 김윤진*, 강상모**, 조동욱*

*한국한의학연구원 의료연구팀 **건국대학교 미생물공학과

Abstract

Protective effects of Chungpesagan-tang against ischemia/reperfusion induced cell injury

Hong Seong-Gil* · Kang Bong-Joo* · Kim Yun-Jin* · Kang Sang-Mo** and Cho Dong-Wuk*

*Korea Institute of Oriental Medicine

**Konkuk University

Free radicals are thought to be the most important cause of the reperfusion injury subsequent to ischemia. The antioxidant status of the tissue affected by ischemia-reperfusion is of great importance for the primary endogenous defense against the free radical induced injury. Therefore, antioxidant therapy has been shown to be beneficial in neurological disorders such as Alzheimer's disease and cerebral ischemia. In this study, the protective effects of Chungpesagan-tang (CST) was investigated against ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity in SK-N-MC neuronal cells. It was found out that low concentration of CST was highly effective in protecting neuronal cells against ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity. The inhibitory effect of CST on malondialdehyde formation during ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in SK-N-MC cells showed obvious dose-dependent responses. Also, CST showed relatively high inhibitory activity to xanthine oxidase induced by ischemia/reperfusion environment. Therefore, it is thought that CST has both antioxidant and xanthine oxidase inhibitory effect and can be used for clinical applications for protection of neuronal cells from ischemia-reperfusion injury.

Keywords : Korea traditional prescription · Lipid peroxidation · Free radical · Ischemia · Xanthine oxidase

1. 서 론

허혈(ischemia) 상태는 혈관의 이상 상태로 혈류가 제한되어지는 현상으로 중풍, 조직이식등의 과정에서 세포 손상을 일으키는 중요한 인자로서 알려져 있다. 허혈이 발생한 조직은 빠른 시간내에 혈액을 공급시켜주지 못하면 빠른 속도로 조직이 괴사되고 재생되지 않기에 다양한 부작용을 발생한다. 이러한 허혈상태에 대해 근육 조직등은 강한 저항력을 가

지고 있는 반면 뇌조직은 허혈상태에 높은 감수성을 가질뿐 아니라 일단 파괴되면 재생이 되지 않기 때문에 중풍등의 질병에서 뇌 손상의 원인으로 받아들여지고 있다.¹⁾

허혈 상태는 조직내 산소 농도가 정상적 상태보다 낮은 상태로 되는 저산소증(hypoxia) 및 영양성분의 결핍 상태로 대표된다. 이중 영양 성분의 결핍 상태는 세포내의 다량의 ATP를 소모시키며 hypoxanthine의 생성을 촉발하고 허혈 상태에서

xanthine dehydrogenase를 xanthine oxidase로 변환과정 또한 빠르게 진행되어 혈액의 재개통으로 인한 산소와 영양 성분 공급에서 다량의 활성 산소(reactive oxygen species)를 발생시킨다. 활성 산소는 반응성이 높은 free radical의 일종으로 세포내 주요 구성성분인 단백질, 지질 및 DNA등을 파괴하여 세포 항상성을 붕괴시키고 종래에 세포 괴사를 유도하며, 허혈/재관류 손상을 일으키는 중요한 원인중 하나로 받아들여진다. 따라서, 허혈/재관류 하에서 이러한 활성 산소를 제거해주는 항산화제(antioxidant)의 투여나 또는 xanthine oxidase의 활성을 억제할 수 있는 물질의 투여는 매우 중요한 일이라 할 수 있다.²⁻⁴⁾

본 연구에서는 신경 세포열인 SK-N-MC cell line을 이용하여 *in vitro*상에서 유도된 허혈/재관류 환경하에서의 세포 독성 및 활성 산소에 의한 세포 손상을 확인하고 허혈성 질환의 치료제로 이용되는 한방처방인 청폐사간탕의 방어 효과를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양 및 허혈/재관류 환경 조성

허혈성 실험에 사용된 cell line은 human neuroblastoma인 SK-N-MC cell line을 이용하였다. SK-N-MC cell line의 계대배양은 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 RPMI media(Gibco, BRL)를 사용하였다.

허혈 환경은 영양분 결핍 상태인 hypoglycemia 환경과 산소 결핍 상태인 hypoxia 상태를 조합하는 방식으로 행하였다. 즉, glucose가 제거된 RPMI media(Gibco, BRL)로 세포의 배양액을 교체한후 5% CO₂ / 95% N₂로 대기 조성된 배양기내에서 배양하여 허혈상태를 의태하였다. 이후 정상 배지로 교체한 후 5% CO₂ / 95% air 의 대기 환경의 배양기로 옮겨 재관류 상태를 의태하였다.

2. 청폐사간탕의 준비

청폐사간탕(Chungpesagan-tang, CST)의 준비는 다음과 같이 하였다. 400g의 약재를 증류수에 담그어 overnight한 후, 약탕기에서 30분간 boiling 한 후, 다시 재탕으로 2시간동안 boiling 한다. 그후, mesh로 걸러낸 후, rotary evaporator로 농축한 뒤, 원심 분리하여 상정액을 수거한다. 이 상정액을 3MM paper로 filtering한 후 동결 건조기를 이용하여 분말화시킨 후 -20°C에서 보관하며 사용하였다. 이 추출물의 항산화 활성 검색을 위해 각 분말을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 10 mg/ml의 농도로 용해하여 이용하였다.

3. 세포생육도의 측정

96well plate에 2×10⁵cell/well 농도로 배양 한 후 200µl의 배지를 넣어 24시간동안 추가 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 후 glucose-free RPMI media를 넣고 5% CO₂/95% N₂ 상태를 조성한 후 다시 5% CO₂/95% air 환경에서 배양한 뒤 세포 생육도를 조사하여 허혈 상태에서 세포 생존율을 조사하였다. 세포 생존율은 MTT assay를 통해서 행하였다. 즉, 배양 상층액을 제거하고 3차례 D-PBS로 washing 한 후, RPMI로 희석된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution 200µl (500 µg/ml)를 첨가하고 3시간동안 추가 배양한 뒤, 상층액을 다시 제거하고 200µl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 mitochondria 내의 succinate dehydrogenase의 활성으로 생성되는 불용성의 formazane crystal을 용해하였고, 이를 540 nm에서 흡광도를 측정하여 cell viability를 결정하였다. 측정 결과는 대조군에 대한 상대적 세포 생육도(relative cell viability, %)로 표기하였다.⁵⁾

4. 항산화력 측정

DPPH (diphenylpicryl hydrazyl)는 파란색을 띄는 안정한 free radical 형태로서 존재하며, 항산화제 또는 환원제에 의해서 전자 또는 수소 원자를 받아들

임으로써 diphenylpicryl hydrazine의 형태로 전환되면서 탈색되는 특징을 가지고 있기 때문에 시료중의 항산화제의 활성을 측정하는 대표적인 물질로서 사용된다.⁶⁾

당제 시료를 DPPH solution (16 mg DPPH/100 ml EtOH:Na-phosphate buffer (pH 5.6), 1:1, v/v)에 첨가한 후 초기 흡광도를 517nm에서 측정하고, 5분간 실온에서 반응시킨 후 탈색 정도를 측정하여 당제 시료의 항산화제 활성을 측정하였다.

Peroxyl radical의 소거능 측정은 다음과 같이 행하였다. Linoleic acid sodium salt (3mg/1ml) 50 μ l에 각 농도의 시료 20 μ l 와 10mM의 peroxy radical 발생제인 2,2'-azobis(amidinopropane) dhydrochloride (AAPH) 30 μ l를 첨가한 후 37에서 30분간 shaking incubation을 행하였다. 그후, 1.2% thiobarbituric acid 100 μ l와 8.1% SDS 20 μ l, glacial acetic acid 30 μ l를 첨가하고, 85에서 30분간 반응시킨 후 생성된 malondialdehyde-thiobarbituric acid conjugate dye를 540 nm에서 흡광도를 측정, 정량 하여 첨가된 시료의 peroxy radical 소거 활성을 비교하였다.⁷⁾

5. 세포의 산화적 손상의 측정

세포의 산화적 손상의 측정은 세포내 지질과산화물의 산물은 malondialdehyde를 측정하는 TBA법을 사용하여 측정하였다.⁸⁾ 즉, tissue culture dish(\emptyset 100mm)에 2×10^5 cell을 48시간동안 배양한 뒤, 허혈/재관류 환경에서 추가 배양하였다. 그후, 상정액을 제거하고 8.1% SDS로 세포를 파쇄한 뒤 1% thiobarbituric acid:glacial acetic acid:d.H₂O(1:1:3, v/v/v) 용액을 5ml 가한 후 100°C 에서 60분간 증탕시킨 뒤 n-butanol 2ml 첨가하여 원심 분리하 뒤 butanol 층을 취하여 excitation 515nm, emission 553 nm에서 형광도를 측정하여 정량하였다.

6. Xanthine oxidase 활성 측정

세포에서의 xanthine oxidase의 측정은 세포를 수거한 뒤 0.05% Triton X-100이 함유된 PBS로 세포를

파쇄한 뒤 10,000rpm에서 5분간 원심 분리하여 불용성 물질을 제거한 후 상정액을 시료로서 사용하였다. 이 시료액에 potassium phosphate buffer(pH 7.8) 과 0.5mM xanthine을 첨가한후 25°C에서 5분간 반응시킨후 292nm에서 흡광도를 통하여 측정하였다.⁹⁾

III. 결 과

1. 당제 추출물의 항산화력과 세포 보호 효과

당제 추출물의 항산화력을 DPPH에 의한 전자공여능 측정법과 AAPH로 발생되는 peroxy radical 소거능을 측정한 결과는 Table 1과 같이 나타났다. 대조물질로 사용된 ascorbic acid (ASA)가 각기 215 μ g/ml과 148 μ g/ml에 비하여 CST의 추출물은 각각 422 μ g/ml와 287 μ g/ml를 나타내어 ASA에 비하여 낮은 항산화 활성을 나타내었다.

Table 1. Antioxidant activity of CST determined by DPPH radical quenching assay and scavenging capacity for peroxy radical produced by AAPH decomposition. Each value represents 50% scavenging concentration(SC₅₀) for free radical of drugs.

	DPPH radical quenching capacity (μ g/mL)	Peroxy radical scavenging activity (μ g/mL)
CST	422	287
ASA	215	148

이 CST를 SK-N-MC 세포열에 투여한 후 허혈/재관류 환경하에서 세포 보호능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. 허혈/재관류 조건인 8시간 허혈 상태와 24시간 재관류 상태에서 세포 생존율은 허혈/재관류 비처리군에 대비하여 35.4%의 세포 생존율을 보였으며 이에 대한 세포 생존율 비교에서 CST와 ASA의 첨가에 의해서 모두 세포 생존율의 증가를 보여 허혈/재관류 환경에서 CST의 세포 보호능이 있는 것으로 추측된다. 특히 CST가 ASA에 비하여 낮은 항산화력을 보였음에도 불구하고 250 μ g/

ml과 500 μ g/ml의 농도에서 ASA에 비하여 유의적 ($p<0.05$)으로 높은 세포보호능을 보였으며 이는 CST가 항산화력에 의존하여 세포 보호능을 나타내지는 않았던 것으로 추측 된다.

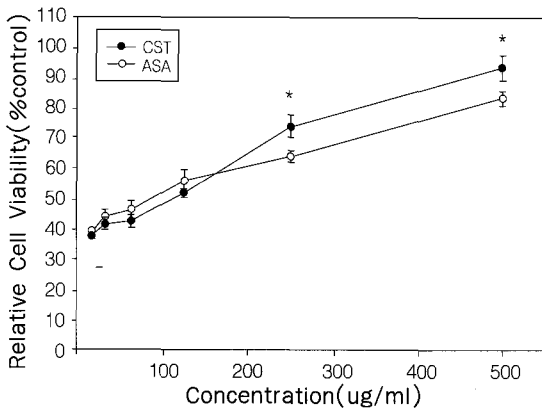


Fig. 1. Protective effects of CST against ischemia/reperfusion-induced human neuroblastoma SK-N-MC cell death. Cells treated with ischemia condition for 8 hour and reperfusion condition for 24 hours. Cell viability were not treated with drug was determined 35.4%. * $p<0.05$ compared with ASA at same drug concentration.

2. 산화적 손상 억제효과

이와 같은 세포 생육도하에서 산화적 손상의 지표로 사용되는 TBARS의 측정 결과는 Fig. 2와 같다. CST 및 ASA를 처리하지 않은 대조군의 경우 TBARS는 22.4 ± 1.4 nmol/mg protein으로 측정되었다. ASA와 CST 처리군 모두 농도 의존적으로 TBARS의 형성을 억제하는 경향을 보였으나 62.5 μ g/ml 이하의 농도에서는 TBARS의 형성 농도는 대조군과 비교하여 차이가 나타나지 않았으며, 이는 세포 생육도의 측정에서 같은 농도에서 세포 보호 능이 현저히 떨어지는 것과 일치하는 결과였다. 즉, TBARS가 활성 산소로 인해 발생하는 세포의 산화적 손상의 지표라는 것을 고려할 때, 허혈/재관류 환경하에서 발생하는 세포 독성은 활성 산소에 의

한 것임을 추측할 수 있으며 ASA와 CST의 보호 능력은 이러한 활성 사소의 독성을 억제시킴으로서 나타난 것으로 생각된다. 그러나 세포 보호능에서 CST가 ASA에 비해서 250 μ g/ml 이상의 농도에서 유의적으로 높은 효과를 나타낸 반면 TBARS 형성에서 ASA와 CST는 유의적 차이가 나타나지는 못하였다.

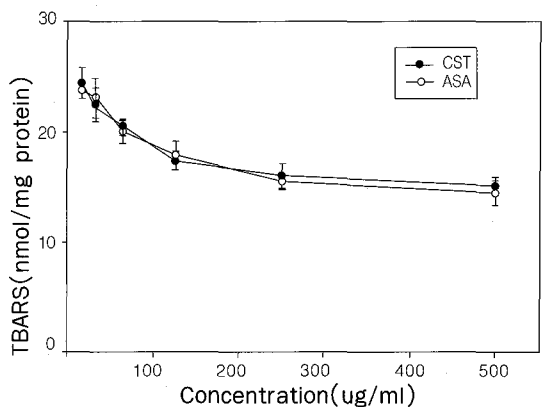


Fig. 2. Inhibitory effects of CST against ischemia/reperfusion-induced TBARS formation in human neuroblastoma SK-N-MC cell. Cells treated with ischemia condition for 8 hour and reperfusion condition for 24 hours. TBARS concentration were not treated with drug in SK-N-MC cell was determined 22.4 ± 1.4 nmol/mg protein

3. Xanthine oxidase의 활성 측정

동일 환경에서 SK-N-MC 세포열의 xanthine oxidase의 활성을 측정한 결과는 Fig. 3에 허혈/재관류 환경하에서 당제 비처리군의 xanthine oxidase 활성을 100%로 하여 상대적 활성으로서 나타내었다. CST와 ASA 처리군은 농도 의존적으로 xanthine oxidase의 활성을 억제시키는 것으로 나타났으며 세포생육도에서와 유사하게 250 μ g/ml과 500 μ g/ml의 농도에서 CST 첨가군이 ASA 첨가군에 비하여 유의적 ($p<0.05$)으로 낮은 xanthine oxidase 활성을 보이는 것으로 나타났다.

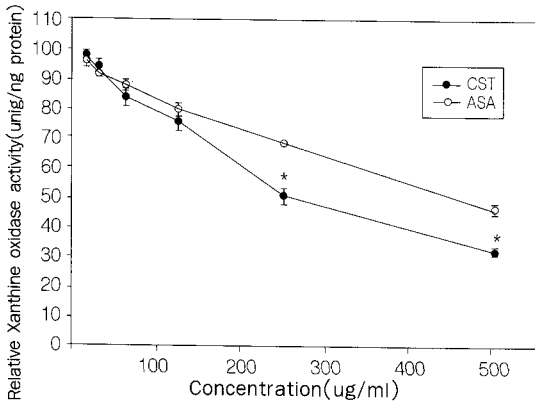


Fig. 3. Inhibitory effects of CST against ischemia/reperfusion-induced xanthine oxidase activation in human neuroblastoma SK-N-MC cell. Cells treated with ischemia condition for 8 hour and reperfusion condition for 24 hours.
* p<0.05 compared with ASA at same drug concentration.

이 결과는 CST가 상대적으로 높은 xanthine oxidase 활성 저해를 낮은 항산화 활성에도 불구하고 ASA보다 높은 세포 보호능을 나타내었던 것으로 추측된다. 이런 결과를 확인하기 위하여 동일 약제 농도에서 xanthine oxidase 표품을 이용한 효소 활성 억제능을 측정된 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

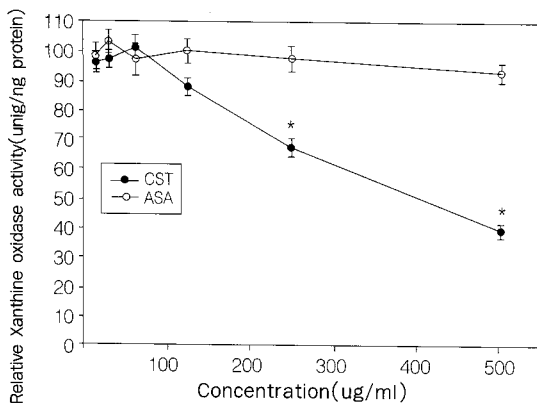


Fig. 4. Xanthine oxidase inhibitory effects of CST and ASA. Xanthine oxidase was treated with each concentration of CST and ASA for 1 hour at 25 .
* p<0.05 compared with ASA at same drug concentration.

ASA에서 xanthine oxidase 활성은 나타나지 않았으며 CST의 경우 125ug/ml에서 88.4%, 250ug/ml에서 68% 및 500ug/ml에서 41.5%의 활성만을 나타내어 xanthine oxidase 저해 물질이 탕제 추출물내에 함유되었던 것으로 추측된다.

IV. 고 찰

조직은 허혈(ischemia) 상태에서도 상당 시간 생존이 가능하며, 조직에 따라서 이러한 생존 가능 시간은 많은 차이를 보인다. 그러나 모든 조직에서 오랜 시간동안 허혈 상태에 존재하게 되면 더 이상 복구가 불가능한 비가역적 손상을 입어 사멸된다.¹⁰⁾ 이러한 허혈 상태에서 조직이 보이는 일반적 반응으로는 glycogen의 분해와 glycolysis 및 젖산의 함량이 증가하고, 세포내 ATP 농도가 저하되면서 또한 AMP의 과도한 분해가 발생하여 hypoxanthine의 축적이 발생하며, 세포내 Ca²⁺의 급격한 증가와 이에 따른 Ca²⁺ 의존성 protease의 활성화와 그에 따른 xanthine oxidase의 활성화 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 활성 증가가 나타난다.¹⁰⁻¹³⁾ iNOS 및 xanthine oxidase의 부산물인 활성 산소의 발생은 산소 공급이 이루어지지 않는 상태이기에 매우 제한적인 독성만을 나타낸다. 그러나 이러한 허혈 상태에서 다시금 영양분과 산소가 공급되는 재관류(reperfusion)가 발생하면 이들 활성화 된 효소 및 대사 체계에 의하여 다량의 활성 산소가 발생되면서 세포에 산화적 손상을 입히게 된다. 재관류 과정은 허혈 상태의 조직을 다시 정상으로 돌려 놓기 위한 필수적 진행과정인만큼 재관류상에서 나타나는 이러한 세포 독성을 억제하는 것은 필수적 일이다.¹⁴⁻¹⁵⁾

허혈 상태는 크게 산소가 결핍된 hypoxia와 영양분이 결핍된 hypoglycemia 상태로 나누어지며, 각각의 환경은 대기 조성 조절이 가능한 배양기와 주요 에너지원인 glucose가 제거된 배지를 통해서 의태(擬態)가 가능하다. Hypoxia와 hypoglycemia의 상태에

서 human neuroblastoma인 SK-N-MC cell line을 배양한 후 전통 한약 당제인 청폐사간탕의 보호능을 측정된 결과 세포보호능에서 대표적 수용성 항산화제인 ascorbic acid에 비하여 비교적 높은 활성을 보임을 관찰하였으며, 산화적 손상의 지표로서 사용되는 TBARS의 측정에서도 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 CST의 항산화 활성을 측정된 결과에서는 ASA에 비하여 낮은 항산화 활성을 나타내어 CST에 의한 허혈/재관류 환경에서 세포 보호능은 항산화 활성에 의존하는 것으로 생각되지 않았다. 그러나 CST 투여군에서도 ASA와 유사한 산화적 손상 억제능을 보인 결과에서 CST의 활성이 ASA와 유사함을 보여 CST의 세포 보호능은 직접적 항산화작용과 더불어서 활성 산소를 발생을 억제하는 효과가 있었을 것으로 추측되었으며, 허혈/재관류 환경에서 주요 활성 산소 발생원으로 생각되는 xanthine oxidase의 활성을 관찰하였다. Xanthine oxidase는 세포내 purine 대사를 담당하는 효소로 산화적 손상을 일으키는 원인중 하나로 규명되어 있으며, 허혈 발생시 활성 증가가 발견된다. Xanthine oxidase는 xanthine dehydrogenase의 형태로 발현되며, 세포의 산화적 손상, 산소의 결핍, 독성 물질의 유입등이 원인이 되어 post-translational modification 과정을 거쳐 xanthine oxidase로 변환된다. 이러한 변환은 효소의 아미노산 잔기 변화에 따른 가역적 변환(reversible modification)과 Ca^{2+} 의존성 protease의 작용에 의한 NAD 결합 부위 절단에 의한 비가역적 변환(irreversible modification)으로 구분되며, 허혈 발생시 xanthine oxidase로의 변환은 두가지 변환 과정 모두가 적용된다.¹⁶⁾ 이 결과에서 CST는 ASA에 비하여 비교적 높은 xanthine oxidase 활성 억제능을 보여주어 CST내에 xanthine oxidase 저해제가 포함되어 있는 것으로 추측되었다. 이를 확인하기 위하여 정제된 xanthine oxidase 표품과 당제 추출물을 혼합한 뒤 xanthine oxidase의 활성을 측정된 결과 ASA가 xanthine oxidase 활성 억제 효과를 나타내지 못한 반면 CST는 세포내 xanthine oxidase 활성

측정 결과와 유사하게 ASA에 비하여 매우 높은 활성 억제능을 보였다. ASA가 xanthine oxidase 활성 억제능을 보이지 못하였지만 세포 실험에서는 농도에 따른 xanthine oxidase 활성 억제 효과도 관측되었던 것은 xanthine dehydrogenase에서 xanthine oxidase로의 활성 변환의 한 경로인 xanthine dehydrogenase의 -SH 그룹의 산화를 억제한 것에 기인한 것으로 추측된다. CST의 경우 활성 산소 소거능에 의한 xanthine oxidase 변환 억제와 더불어서 이러한 xanthine oxidase의 직접적 활성 억제능을 보유한 것으로 추측되며, 이러한 활성이 ASA에 비하여 낮은 항산화 활성에도 불구하고 더 높은 세포 보호능을 보여주었던 이유로서 사료된다.

V. 요약

세포열을 이용한 허혈/재관류 환경에서 청폐사간탕의 세포보호능을 측정하였다. 청폐사간탕 추출물은 허혈/재관류 환경하에서 발생하는 세포 독성으로부터 대표적 수용성 항산화제인 ascorbic acid보다 높은 세포 보호 활성을 나타내었으며, 산화적 손상의 지표로서 사용되는 지질과산화물(TBARS)를 측정된 결과에서도 ASA와 유사한 활성을 나타내었다. 또한, 허혈/재관류 환경하에서 활성이 증가하여 세포에 산화적 손상을 일으키는 활성 산소종을 유발하는 것으로 알려진 xanthine oxidase 활성 측정에서는 청폐사간탕이 ASA보다 높은 xanthine oxidase 활성 억제능을 보였으며, xanthine oxidase 효소 표품을 이용한 활성 억제능 측정에서도 ASA보다 뛰어난 결과를 보였다. 따라서, 청폐사간탕은 허혈/재관류 환경하에서 세포 보호능이 있는 것으로 추측되며, 이러한 보호능은 항산화 활성과 더불어서 xanthine oxidase 활성 억제능이 공동 작용의 결과로 사료된다.

색인어 지질과산화, 허혈, 유리반응기차방, 크산틴 산화효소

참고문헌

1. Halliwell, B. and Gutteridge, J. 『Free radicals in biology and medicine』 3rd Ed. Oxford press. 1997: 645-662
2. Bulkey, G.B. 「The role of oxygen radicals in human disease process」. 『Surgey』, 1993: vol. 94 No. 3 : 407-411
3. Halliwell, B. 「Oxidant and human disease: Some new concepts」. 『FASEB J』, 1989: vol 1 : 358-364
4. De Groot, H. and Littauer, A. 「Hypoxia, reactive O₂ and cell injury」. 『Free Rad. Biol. Med』, 1989: vol. 173: 541-552.
5. Mossaman, T. 「Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assay」. 『J. Immuno. Method』, 1983: vol. 65: 55-63
6. Tomohiro, T, Kitatani, F. and Yagi, A. 「A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish」. 『Biol. Biotech. Biochem』, 1994: vol. 58: 1780-1782
7. Niki, E. 『Free radical initiators as source of Water- or Lipid-soluble peroxy radicals. In Oxygen radicals in biological system』, Packer, L. eds. Academic press. 1993: 112-135
8. Yagi, K. 「A simple fluorometric assay for lipid peroxide in blood plasma」. 『Biochem. Med』, 1976: vol. 15 : 212-216
9. Guerrero, R.O and Guzman, A.L. 「Inhibition of xanthine oxidase by Puerto Rican plant extracts」. 『Health Sci J』 1998: vol. 17 No. 4 : 359-64
10. Sims, N.R and Zaidan, E. 「Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischemia」. 『Int. J. Biochem. Cell. Biol』, 1995: vol. 27: 531-542
11. Tombaugh, G.C and Sapolsky, R.M. 「Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology」. 『J. Neurochem』, 1993: vol. 61: 793-802
12. Coyle, J.T and Puttfarcken, P. 「Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders」. 『Science』, 1996: vol. 262: 689-691
13. Crawford, R.M.M. and Braendel, R. 「O₂ deprivation stress in a changing environment」. 『J. Exp. Bot』, 1996: vol. 47: 145-153
14. Liu, P.K et al. 「Damage, repair and mutagenesis in nuclear genes after mouse forebrain ischemia-reperfusion」. 『J. Neurosci』, 1996: vol. 16: 6795-6799
15. Folbergrova, J. et al. 「Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain?」 『J. Cereb. Blood. Flow. Metab』, 1993: vol. 13: 145-152
16. McCord, J.M and Turrens, J.F. 「Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion」. 『Curr. Top. Bioenerg』, 1994: vol. 17: 173