

# 구진의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 보호 기전 연구

안성훈<sup>1</sup> · 안영남<sup>1</sup> · 백대봉<sup>1</sup> · 송문영<sup>1</sup> · 김경식<sup>1</sup> · 손인철<sup>1</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 경혈학교실

## A Study on the Protective Mechanism of Moxi-tar on Cytotoxicity Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C<sub>6</sub>-glioma

Seoung-Hoon Ahn<sup>1</sup>, Young-Nam Ahn<sup>1</sup>, Dae-Bong Baek<sup>1</sup>, Moon-Young Song<sup>1</sup>,  
Kyoung-Sik Kim<sup>1</sup>, In-Cheul Sohn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Acupoint & Meridian, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

### Abstract

**Objective** : This study was produced to examine the effects of moxibustion that had been played important role to traditional oriental medical treatment on disease. Recently, it was reported that moxi-tar which is generated in the process of moxibustion as burning combustibles decreased NO and iNOS generation in C<sub>6</sub>-glioma and RAW 264.7 cells in our lab. The purpose of this research was to investigate the protect reaction on cell injury induced by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C<sub>6</sub>-glioma cells.

**Methods** : C<sub>6</sub>-glioma cells were cultured in RPMI 1640 with FBS 10% in CO<sub>2</sub> incubator. To study the protective effects of moxi-tar, we observed cell viability, DPPH activity, SOD activity, catalase activity and cell morphology after injury with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Results** : Moxi-tar increased cell viability about twice as much as that of being injury by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (moxi-tar 40 µg/ ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µ M). And the results of free radical scavenger activity (80 µg/ ml : 78.91 ± 4.4%), SOD activity and catalase activity (80 µg/ ml : 21.6 unit/ mg protein) were increased by moxi- tar as dose-dependent manner.

**Conclusion**: we concluded that the effects of moxibustion which is played important role in Oriental medicine, might be free radical scavenger effects induced by moxi-tar.

**Key words** : C<sub>6</sub>-glioma, Moxi-tar, cytotoxicity

## I. 서 론

艾灸療法은 침구치료방법 중의 하나로 內經<sup>1)</sup> 異法方宜論에 “北方者. 天地之所閉藏之域也. 其地高陵居. 風寒水冽. 其民藥野處而乳食. 藏寒生滿病. 其治宜艾炳. 故艾炳者. 亦從北方來.”에서

· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경혈학교실, Tel. 063-850-6448, Fax. 063-857-6458,

E-mail : ichsohn@wonkwang.ac.kr

· 접수 : 2005/06/15 · 수정 : 2005/06/20 · 채택 : 2005/06/21

찾아볼 수 있으며, 艾灸療法の 주재료인 艾葉은 국화과에 속하는 다년생 초목인 황해쑥 (Artemisia argyi. Levet Vant), 약쑥 (Artemisia asiatica Nakai.)과 野艾 (Artemisia vulgaris L.)의 잎을 건조한 것으로서, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되었다<sup>2)</sup>고 알려져 있다.

최근에 보고된 艾灸療法의 치료작용에 대한 연구결과에 있어서, 우선 온열자극에 대한 연구로 林<sup>3-4)</sup>은 문헌적 고찰을 통하여 애옹의 연소과정 중에 발생하는 溫熱刺戟이 경혈부위의 국소 조직에 가해짐으로써 열분해물질을 생성되어 치료효과를 나타낸다 하였고, 化學的 刺戟에 대한 연구에 있어서 西谷有子는 온열자극을 배제한 후 艾絨의 燃燒生成物만을 이용한 疣贅治驗의 症例를 보고하여<sup>5)</sup> 애옹의 연소생성물의 화학적 자극에 의한 애구요법을 치료효과를 증명하였고 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 과산화지질을 저하는 작용은 艾灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 증명하였다<sup>6)</sup>. 이 외에 안<sup>7)</sup>과 안<sup>8)</sup> 등은 애옹의 연소생성물을 구진이라 칭하고 구진이 NO 억제와 iNOS 생성을 억제한다고 보고하여 애구요법의 항염 효과에 대한 기전을 설명하였고 김<sup>9)</sup> 등은 백회에서 구진약침이 일과성 전뇌 허혈 손상에 있어서 BDNF (brain derived neurotrophic factor) 단백질의 증가를 유도하고 따라서 일과성 전뇌 허혈 손상을 예방하고 치료하는데 효과적이라고 보고하였다. 아울러 大西基代 등은 돌연변이 억제현상, 혈당조절 및 항균작용, 항위궤양효과, 혈소판 응집 억제작용 등을 보고<sup>10)</sup>하였으며, 이러한 구진의 유효성분으로는 tricosanol, thujone, arachinalkol, hentriacontane, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tanine 및 그 이성체, catechol, 포화지방족 탄화수소 등이 확인되었다<sup>11)</sup>.

Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)는 superoxide (O<sup>2-</sup>), hydroxy radical(OH<sup>·</sup>) 등을 포함하는 활성 산소종(reactive oxygen species)의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다<sup>12-13)</sup>. 활성산소는 phospholipase A2의 활성화와 arachidonic acid의 대사과정을 통하여 발생하거나<sup>14)</sup>, xanthine oxidase에 의한 활

성산소의 생성<sup>15)</sup>, 활성산소에 의한 glutamate 수용체 과활성에 기인한 산소라디칼의 증가<sup>16)</sup> 등 다양한 기전을 통하여 생성된다.

뇌신경세포에 있어서 활성산소에 의한 산화적 손상은 노인성 치매를 비롯하여 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)이나 뇌졸중과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀져 있다<sup>17)</sup>. 특히, ALS와 같은 병변은 superoxide dismutase(SOD)-1 유전인자의 돌연변이에 의하여 환자의 뇌속에 괴량의 활성산소가 축적됨으로서 초래되는 질환<sup>18)</sup>으로 산소라디칼에 의한 뇌조직의 손상과 지질과산화를 통하여 중추신경 내 고분자물질의 손상을 초래할 뿐만 아니라<sup>19)</sup>, 대뇌의 항산화효소인 glutathione peroxidase나 catalase의 활성의 감소 등이 관찰되었으며<sup>19-20)</sup>, 산화적 손상에 의한 뇌조직의 손상은 이차적으로 세포의 신호전달체계나 칼슘의 항상성 및 효소의 활성변화와 같은 현상을 유발할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 활성산소에 의한 산화적 손상은 병변의 유발기전과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 제시되었다<sup>21-22)</sup>.

이에 저자는 애옹의 연소생성물인 구진이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여하여 산화적 손상을 유도된 뇌신경세포를 보호할 것이라 추정하여 다음의 실험을 진행하였다. 뇌신경세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 투여하여 산화적 손상을 유도하고 애옹의 연소생성물인 구진을 처리한 후 세포생존율, DPPH, SOD, catalase activity과 세포의 형태학적 관찰, catalase와 구진과의 혼합투여 등을 통하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 구진 취득

구진은 애옹의 연소생성물로서 안의 방법<sup>7-8)</sup>

## 구진의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 보호 기전 연구

을 근거하여 취득하였다. 간기하면 삼각 플라스크 입구에 링을 올려놓고, 뜸썩(봉래구관, 서울) 5 g을 원뿔 모양으로 만들어 연소한 후 삼각 플라스크 바닥으로 흐르는 연소생성물을 모은다. 플라스크 바닥에 모인 연소생성물을 methanol 100 %로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고 40± 2 °C를 증발증류기를 이용하여 methanol을 90 % 증발시킨다. 구진과 methanol 혼합물을 -70 °C의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨 후, culture용 DMSO (sigma)를 용매로 100 mg/ml의 농도로 분류하여 실험에 사용하였다.

### 2. 세포배양

C<sub>6</sub>-glioma 세포는 10 % FBS와 Penicillin/streptomycin (10 µl/ml)을 첨가한 RPMI1640배양액으로 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양완료 후 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리된 96-multiwell에 세포를 3×10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양 후 본 실험에 사용하였다.

### 3. 세포생존율 측정

C<sub>6</sub>-glioma 세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 희석하여 24 well plate에 1 ml 씩 분주한 후 24시간 배양한 다음 10~100 µg/ml 농도의 구진 농도별과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리 30분전에 구진 처리한 후 16 hr 배양하여 MTT assay를 시행하였다. MTT(5 mg/ml) assay 용액을 50 µl 씩 세포배양액에 첨가하고, 4시간동안 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양액을 흡입하여 제거한 다음

dimethylsulfoxide 용액 1 ml를 첨가하고 shaker에서 10 분간 흔들여 준 후 ELISA reader로 540 nm에서의 흡광도를 판독하였다<sup>19)</sup>.

### 4. 광학현미경 세포형태 관찰

C<sub>6</sub>-glioma 세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포를 24 well plate에 배양하여, 구진 단독 처리와 구진과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 같이 처리하여 4 시간 후에 세포형태를 광학현미경(Leica DMIRB)으로 관찰하였다.

### 5. DPPH 법에 의한 항산화력 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 사용한 항산화 활성검정법으로 여러 농도의 시료를 methanol에 녹여 1.5×10<sup>-4</sup> M DPPH methanol 용액 1 ml를 첨가한 후, 30 분간 실온에서 방치하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는 데 필요한 시료의 양(µg)을 RC<sub>50</sub>으로 나타냈다<sup>20)</sup>.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \frac{\{(OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) / OD_{\text{control}}\} \times 100}$$

### 6. Catalase (CAT) activity 측정

C<sub>6</sub>-glioma 세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포 seed 하여 24 시간 배양하였다. 그 후 구진을 농도별 처리하여 1 시간 동안 배양하였다. 그 후 1 시간 배양하여 세포를 수집한다. CAT활성은 Carrillo(1991)의 방법<sup>21)</sup>에 준하여 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12 µl와 세포균질화 시킨 상층액 100 µl와 혼합하여 2 분 동안 37 °C에 배양하였다. 배양된 sample은 5 분 동안 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. CAT의

1 unit는 1 mg 단백질이 1 분 동안 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시킨 것을 240 nm에서 측정된 흡광도 변화( $\Delta A_{240}/\text{mg protein}/\text{min}$ )와 같다.

### 7. Superoxide dismutase(SOD) activity 측정

C<sub>6</sub>-glioma 세포를 1.5×10<sup>5</sup> cells/ml의 세포를 100 mm plate에 배양하여 구진 농도별 처리하여 1 시간 동안 배양하였다. SOD 활성은 Beachamp 등의 방법<sup>22)</sup>에 준하여 0.1M phosphate buffer(pH7.0)에 3 mM xanthin, 0.75 mM NBT, 3 mM EDTA, 1.5 mg/ml BSA 에 세포를 균질화시켜 원심분리한 상층액을 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어 혼합한다. 그리고 50  $\mu\text{l}$  xanthine oxidase(0.1 mg/ml)를 넣고 실온에 30 분 방치한 후 6 mM copper(II) chloride을 넣어 주면 반응 멈춘다. 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 560 nm의 흡광도에서 측정한다. SOD의 1 unit는 1 mg 단백질이 1 분 동안 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시킨 것을 240 nm에서 측정된 흡광도 변화( $\Delta A_{560}/\text{mg protein}/\text{min}$ )와 같다

### 8. Annexin-V FITC 결합에 의한 Flow-Cytometric 분석

세포를 구진과 함께 12시간 동안 배양 후 수거한 다음, 상온에서 annexin V-FITC와 PI를 포함하는 결합완충액(10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)에서 annexin-V FITC와 특이반응을 약 15 분간 실행하였다. 배양이 끝난 후, 수건된 세포는 FACScan analyzer(Becton Dickinson, San Jones, CA, USA)로 분석 되었으며, annexin<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>는 세포괴사로 annexin<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>는 세포고사로 판정하였다.

### 9. 통계처리

실험결과는 Mean $\pm$  SD로 나타내었고, 통계검

정은 unpaired student t-test를 사용하였다.

## III. 실험 결과

### 1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 뇌신경 세포 상해 효과

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포상해 정도를 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처리한 후, 대조군을 100 %로 환산하였을 경우, 각기 다른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에 대한 세포 상해정도는 Fig. 1과 같다. IC<sub>50</sub>은 443.48  $\pm$  0.09  $\mu\text{M}$  (initial 102.93  $\pm$  2.02, final 18.08  $\pm$  1.70) 이었다.

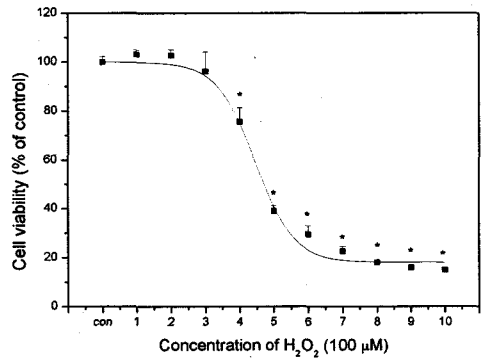


Fig. 1. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell viability in C<sub>6</sub>-glioma Cells (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr without any treatment for stable condition. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 hr. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the means  $\pm$  SD of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*P<0.05.

### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 세포 상해에 대한 구진의 보호효과

구진(Moxi-tar)은 애용의 연소생성물로 한방의 구 치료시 환자의 피부에 직접적으로 노출되는 물질이다. Fig. 1에서 알아본 바와 같이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서 뇌신경세포는 용량 의존적으로 상해

## 구진의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 보호 기전 연구

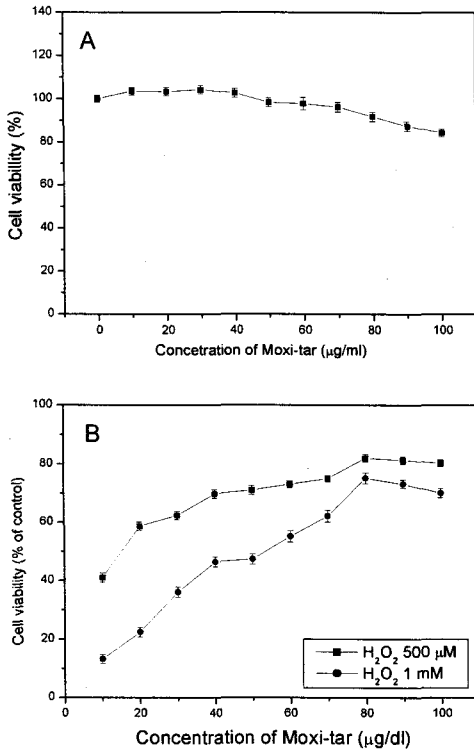


Fig. 2. The protective effects of Moxi-tar on cytotoxicity induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr without any treatment for stable condition. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Moxi-tar for 12 hr as dose dependent manner. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the means  $\pm$  S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*P<0.05.

A : Effect of Moxi-tar on cell viability in C<sub>6</sub>-glial cell.

B : The protective effect of Moxi-tar on cytotoxicity in C<sub>6</sub>-glial cell.

를 받는데 구진은 이를 효과적으로 방어한다 (fig. 2). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μ M을 처리한 후 12 시간이 경과하면 약 40%의 세포생존율을 보여 약 60%의 세포독성을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 실험결과를 바탕으로 구진을 단독 처리하

였을 경우, 40 μg/ml까지 다소 증가하였음을 관찰할 수 있었으나 구진 100 μg/ml까지 농도의존적으로 다소 감소하였으며 구진 100 μg/ml에  $84.31 \pm 1.89$  %로 구진에 의하여 약간의 상해작용이 있음이 관찰되었다(Fig. 2-A).

구진과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μ M, 100 μ M), 를 동시처리 하였을 경우, 구진의 농도가 증가함에 따라 세포생존율 또한 증가하여 구진의 농도 80 μg/ml에서는  $82.01 \pm 1.23$  % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μ M),  $75.12 \pm 1.87$  % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μ M)의 세포생존율을 각각 나타내어 양성대조군 대비 1.99 배 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μ M), 5.68 배 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μ M)의 세포생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2-B).

### 3. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 항산화 활성 효과

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 세포상해작용을 막는 구진의 보호작용을 알아보기 위하여 항산화 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 free radical scavenging activity는 구진 10 μg/ml에서  $9.71 \pm 3.5$  %로 나타내었고, 구진 80 μg/ml에서  $78.91 \pm 4.4$  %로서 최고치를 나타내었고 그 후 다시 감소하는 결과를 나타내어 구진 10 μg/ml에서 80 μg/ml까지 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 3).

### 4. 구진이 Catalase 활성도에 미치는 영향

다음은 농도 의존적으로 구진이 catalase 성도에 미치는 영향을 알아보았다. 각각 구진의 농도 0, 20, 40, 60, 80 μg/ml에서 catalase 활성도는  $12.0 \pm 0.3$ ,  $15.2 \pm 1.2$ ,  $17.2 \pm 1.3$ ,  $19.2 \pm 0.7$ ,  $20.4 \pm 0.8$  unit/mg protein로 농도 의존적으로 catalase 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다.

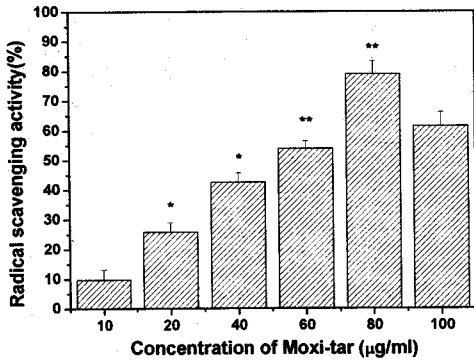


Fig. 3. The Radical scavenging effects of moxi-tar on C<sub>6</sub>-gliial cell.

Cells (1×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr without any treatment for stable condition. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar for 12 hr as dose dependent manner. Results are represented as the means ± S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

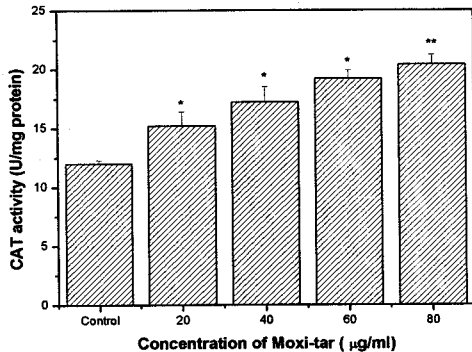


Fig. 4. The effects of moxi-tar on catalase activity in C<sub>6</sub>-gliial cell.

Cells (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar for 1 hr as dose dependent manner. Subsequently catalase activity was assayed as described in methods and materials. Results represented as the means ± S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

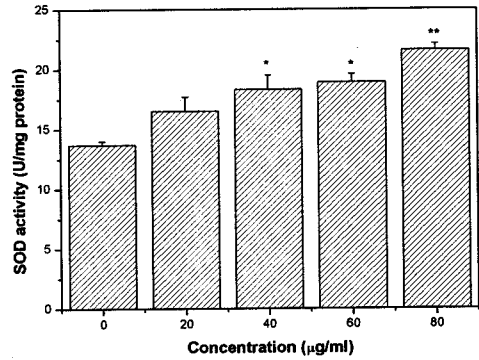


Fig. 5. The effects of moxi-tar on Superoxide dismutase activity in C<sub>6</sub>-gliial cell.

Cells (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr in 10 cm ø dish. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar for 1 hr as dose dependent manner. Subsequently SOD activity was assayed as described in Methods and materials. Results represented as the means ± S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## 5. 구진이 Superoxide dismutase (SOD)에 미치는 영향

Control group에서의 SOD 활성도 값은 13.7 ± 0.3 unit/mg protein이었지만 구진 농도 20, 40, 60, 80 µg/ml에서 각각 16.5 ± 1.2, 18.3 ± 1.2, 18.9 ± 0.7, 21.6 ± 0.5 unit/mg protein으로 농도 의존적으로 SOD 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다. (fig.5)

## 6. Flow-cytometric 분석결과

Control 군에서 세포괴사율은 26.49 %로 비교적 양호한 수치를 나타내었으나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 군에서의 세포괴사율은 71.05 %로 비율이 증가하였음을 알 수 있었다. 이때의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 구진의 혼합군에서는 25.87 %의 세포괴사율을 보여 구진이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도한 세포상해에 대해서 보호효과가

있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

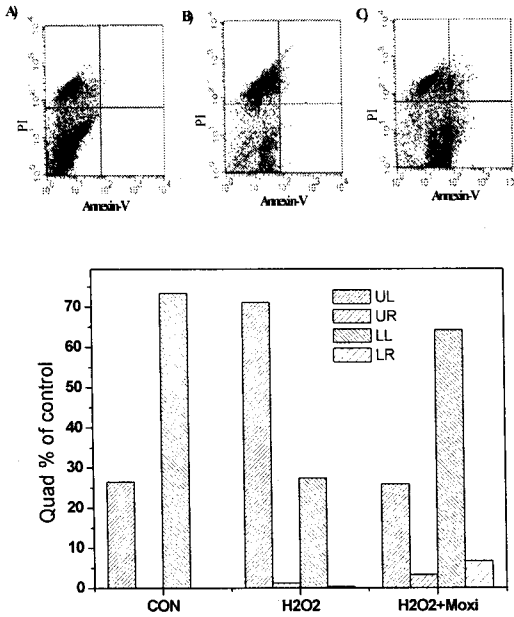


Fig. 6. The effects of moxi-tar on flow- cytometric of annexin-V in C6-glioma cell.  
 A) Control  
 B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM  
 C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM + Moxi-tar 40 µg/ml

### 7. 광학 현미경을 통한 광학적 관찰 결과

다음은 C6-glioma의 세포형태적 관찰 결과이다. 먼저 control 군에서는 세포의 분화과정이 보이고 정상적일 뿐 건강한 축삭돌기의 모습이 관찰되었다(A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 군에서는 세포의 수가 현저히 줄어들었음을 알 수 있었고, 관찰되는 세포의 축삭돌기가 매우 작고 적음을 알 수 있었으며(B), 구진 자체만의 자극으로는 control 군과 유사한 형태와 수를 나타내 세포자체에 영향이 없음을 알 수 있었으며(C), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 구진의 혼합 군에서는 control 군과 구진군보다는 못하지만 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>군의 상해정도를 대부분 회복하고 있음을 알 수 있었다(D).

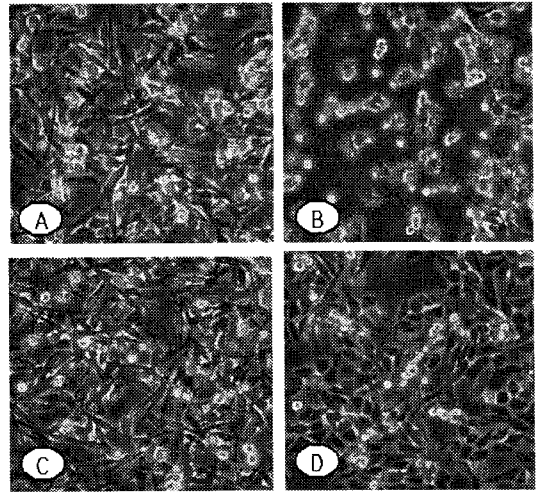


Fig. 7. The protective effects of moxi-tar on injury induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cells were treated for 12 hours with Moxi-tar and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
 A) Control  
 B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM  
 C) Moxi-tar 40 µg/ml  
 D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM + Moxi-tar 40 µg/ml

### 8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 세포상해에 대한 구진의 보호 기전

다음은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 세포상해로부터 구진의 세포 보호 기전을 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. 실험방법은 free radical scavenger 라고 알려져 있는 catalase를 이용하였으며, 구진과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독 또는 혼합처리하여 그 결과를 관찰하였다.

실험결과, 대조군을 100.0 ± 1.52 %로 환산되었을 경우, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에서는 43.11 ± 2.65 %로 약 57 %의 세포사망율을 기록하였다. Catalase 단독처리군에 있어서는 103.0 ± 2.5 %로 대조군과 비교하여 다소 증가하였으나 유의성은 없었다. Catalase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합처리군에서는 96.3 ± 4.5 %를 보여 대조군과 비교하여 거의 세포사망율에 대한 차이가 없는 결과가 관찰되었다. Catalase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 구진(40 µg/ml, 80 µg/ml)

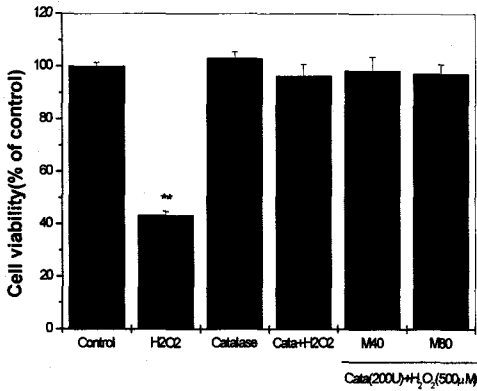


Fig. 8. The protect mechanism of moxi-tar on cytotoxicity induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C<sub>6</sub>-glioma cell.

Cells (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar and Glucose Oxidase for 12 hr as dose dependent manner. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the means ± S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, \*\*P<0.01.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 µ M

Catalase ; catalase 200 unit

M40 ; Moxi-tar 40 µg/ml

M80 ; Moxi-tar 80 µg/ml

ml)에서는 각각 98.2 ± 5.4 %와 97.2 ± 3.6 %로 관찰되어 대조군과 거의 유사한 세포생존율을 기록하였다.

### 9. 구진이 Glucose Oxidase(GO)의 세포독성에 미치는 영향

GO의 세포독성에 대한 구진의 보호효과를 알아보았다. 실험방법은 GO 20 nM을 처리한 후, 구진을 용량 의존적으로 처리하여 12시간 배양 후 세포생존율을 알아보았다.

대조군은 100 ± 2.6 %로 환산되었다. GO 20 nM 단독처리군에서는 22.72 ± 4.1 %로 관측되어 약 80%의 세포사망율을 보여 ZnCl<sub>2</sub>보다 다소 높은 세포 독성작용을 보였다. 여기에 구진을

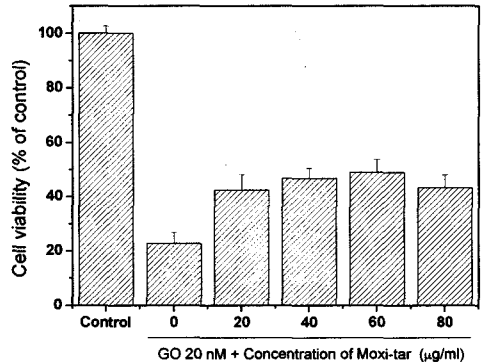


Fig. 9. The effects of moxi-tar on cytotoxicity of Glucose Oxidase in C<sub>6</sub>-glioma cell.

Cells (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar and Glucose Oxidase for 12 hr as dose dependent manner. The viability of cells was measured by MTT assay. Results are represented as the means ± S.D. of three experiments. Asterisks indicate a significant difference compared with GO 20 nM group, \*P<0.05.

용량 의존적으로 혼합처리하면 즉, GO 20 nM + 구진 20 µg/ml에서는 42.48 ± 5.6 %의 세포생존율이 관측되었고, GO 20 nM + 구진 40 µg/ml에서는 46.66 ± 3.8 %가 관찰되었다. 아울러 GO 20 nM + 구진 60 µg/ml에서는 48.66 ± 4.8 %가 관찰되었고 GO 20 nM + 구진 80 µg/ml에서는 43.21 ± 4.8 %가 관찰되어 GO 20 nM의 22.72 ± 4.1 %와 비교하여 유의성있는 세포생존율이 관찰되었다.

### 10. 구진이 ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 구진의 보호효과를 알아보았다. 실험방법은 ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml을 처리한 후, 구진을 용량 의존적으로 처리하여 12시간 배양 후 세포생존율을 알아보았다.

대조군을 100 ± 2.9 %로 환산되었을 경우, ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml 단독 처리군에서는 31.46 ± 4.5



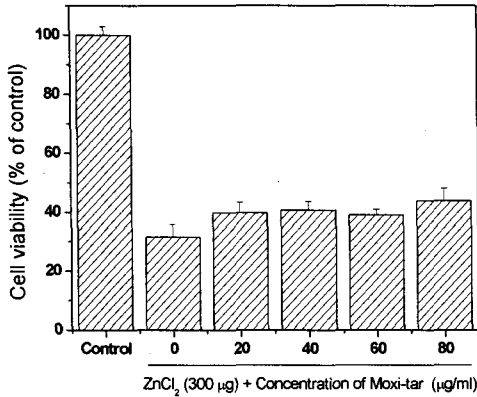


Fig. 10. The effects of moxi-tar on cytotoxicity of ZnCl<sub>2</sub> in C<sub>6</sub>-glioma cell.

Cells (1.5×10<sup>5</sup> cells/ml) were seeded and cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 24 hr. After C<sub>6</sub>-glioma were treated with Moxi-tar and ZnCl<sub>2</sub> for 12 hr as dose dependent manner. The viability of cells was measured by MTT assay. Results represented as the means ± S.D. of three experiments.

%로 관측되어 약 70 %의 세포사망율을 보였다. 여기에 구진을 용량 의존적으로 혼합처리하면 즉, ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml + 구진 20 µg/ml에서는 39.88 ± 3.5 %의 세포생존율이 관측되었고, ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml + 구진 40 µg/ml에서는 40.71 ± 2.9 %가 관찰되었다. 아울러 ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml + 구진 60 µg/ml에서는 39.07 ± 19 %가 관찰되었고 ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml + 구진 80 µg/ml에서는 43.88 ± 4.2 %가 관찰되었으나 ZnCl<sub>2</sub> 300 µg/ml의 31.46 ± 4.5 %와 비교할 때, 유의성은 보이지 않았다.

#### IV. 고 찰

인체는 출생, 성장, 성숙, 노화의 신진대사 과정을 거치게 되는데, 노화란 인체의 생성과 성장 및 성숙 과정 후 시간의 흐름에 따라 진행되는 일련의 퇴행성 변화로서, 형태적, 기계적으로 쇠

퇴하여 사망에 귀착되는 생리적인 현상을 의미한다. 서양의학에서 노화에 대한 가설은 지금까지 약 200여 가지가 제안되었으나 그 중에서 가장 유력시되고 있는 것은 자유유리기설이다. 자유유리기는 신진대사 과정 중 부산물로 생성되는 산소자유기를 말하는 것으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 구조적인 특성상 생체 내 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하게 된다<sup>23-26</sup>).

산소자유기는 세포를 손상시키는 유해인자의 하나로 다른 물질과 반응력이 강하여 세포내 핵산물질을 비롯하여 단백질을 손상시키며 동시에 세포의 정상적인 대사를 방해 한다<sup>27</sup>. 이의 산화적 손상은 세포막의 지질과산화반응을 활성화시키고 항산화효소계에 영향을 주며, 특히 lipofuscin이나 malondi- aldehyde 및 carbonyl group 등을 세포나 조직에서 증가시킴으로서 세포손상을 가속화시킨다. 또한 superoxide anion 이나 hydroxyl radical로서 인체의 조직이나 기관을 구성하고 있는 세포에 산화적 손상을 줌으로서 세포의 고사나 세포사멸을 유도하여 결국 병변을 초래하게 된다. 산소자유기는 다른 물질과 반응력이 강하여 세포내 핵산물질을 비롯하여 단백질을 손상시키며 동시에 세포의 정상적인 대사를 방해함으로써 질환의 병리적 원인의 하나로 밝혀지고 있다<sup>27-30</sup>).

자유유리기설은 1956년 Harman이 자유유리기로 인해 생성된 해로운 물질의 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성질환의 근본적인 원인이라고 주장한 이래로 많은 연구가 진행되고 있다. 자유유리기설은 생체 내 정상대사 과정에서 생긴 자유유리기가 생분자와 반응하여 세포에 손상을 주는데 이러한 자유유리기의 생성은 나이가 증가함에 따라 증가하고 따라서 세포기능이 점차 감소되어 노쇠현상을 초래하게 된다는 가설이

다. 자유유리기에 의한 손상을 최소화하기 위해서는 superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 등의 산소자유기를 대사과정에서 형성 되는대로 제거해야 한다<sup>26)</sup>.

艾灸療法은 침구치료방법 중의 하나로 內經<sup>1)</sup> 異法方宜論에 “北方者. 天地之所閉藏之域也. 其地高陵居. 風寒水冽. 其民藥野處而乳食. 藏寒生滿病. 其治宜艾熯. 故艾熯者. 亦從北方來.”에서 찾아볼 수 있으며, 艾灸療法의 주재료인 艾葉은 국화과에 속하는 다년생 초목인 황해쑥 (*Artemisia argyi*. Levet Vant), 약쑥 (*Artemisia asiatica* Nakai.)과 野艾 (*Artemisia vulgaris* L.)의 잎을 건조한 것으로서, 調理氣血, 逐寒濕, 溫經止血, 安胎하여 心腹冷痛, 泄瀉, 久痢, 下血, 月經不調, 帶下, 胎動不安, 癰瘍, 疥癬 등에 사용되었다<sup>2)</sup>고 알려져 있다.

최근에 보고된 艾灸療法의 치료작용에 대한 연구결과에 있어서, 우선 온열자극에 대한 연구로 林<sup>3-4)</sup>은 문헌적 고찰을 통하여 애용의 연소과정 중에 발생하는 溫熱刺戟이 경혈부위의 국소조직에 가해짐으로써 열분해물질을 생성되어 치료효과를 나타낸다 하였고, 化學的 刺戟에 대한 연구에 있어서 西谷有子는 온열자극을 배제한 후 艾絨의 燃燒生成物만을 이용한 疣贅治驗의 症例를 보고하여<sup>5)</sup> 애용의 연소생성물의 화학적 자극에 의한 애구요법을 치료효과를 증명하였고 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 과산화지질을 저하는 작용은 艾灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 증명하였다<sup>6)</sup>. 이 외에 안<sup>7)</sup>과 안<sup>8)</sup> 등은 애용의 연소생성물을 구진이라 칭하고 구진이 NO 억제와 iNOS 생성을 억제한다고 보고하여 애구요법의 항염 효과에 대한 기전을 설명하였고 김<sup>9)</sup> 등은 백회에서 구진약침이 일과성 전뇌 허혈 손상에 있어서 BDNF (brain derived neurotrophic factor) 단백질의 증가를 유도

하고 따라서 일과성 전뇌 허혈 손상을 예방하고 치료하는데 효과적이라고 보고하였다. 아울러 大西基代 등은 돌연변이 억제현상, 혈당조절 및 항균작용, 항위궤양효과, 혈소판 응집 억제작용 등을 보고<sup>10)</sup>하였으며, 이러한 구진의 유효성분으로는 tricosanol, thujone, arachinalkol, hentriacontane, n-nonacosanne, n-hentriacontane, C37H76, tanine 및 그 이성체, catechol, 포화지방족 탄화수소 등이 확인되었다<sup>11)</sup>.

따라서, 본 연구는 애구요법시 생성되는 연소생성물인 구진이 애구효과의 주 인자임을 가정하고 뇌신경교세포에서  $H_2O_2$ 로 유도된 세포상해에 대한 보호기전을 알아보기 위하여 실험을 진행하였다.

$H_2O_2$ 에 의한 세포상해 정도를 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처치한 후, 대조군을 100 %로 환산하였을 경우,  $IC_{50}$ 은  $443.48 \pm 0.09 \mu M$ 로 관찰되었다(Fig. 1). 구진(Moxi-tar)은 애용의 연소생성물로 한방의 구 치료시 환자의 피부에 직접적으로 노출되는 물질로  $H_2O_2$ 에 의해서 발생하는 상해를 효과적으로 차단함이 관찰되었다(fig. 2). 보호효과 정도는  $H_2O_2$  500  $\mu M$  12시간 처리 시 약 40 %의 세포생존율을 보여 약 60 %의 세포독성을 보이는 데 비하여 구진과  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ , 100  $\mu M$ ), 를 동시처리 하였을 경우, 구진의 농도가 증가함에 따라 세포생존율 또한 증가하여 구진의 농도 80  $\mu g/ml$ 에서는  $82.01 \pm 1.23 \%$  ( $H_2O_2$  500  $\mu M$ ) 세포생존율을 각각 나타내어 양성대조군 대비 약 200 % 세포생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2).

이러한 실험결과는 西谷有子<sup>5-6)</sup>와 안<sup>7)</sup>, 안<sup>8)</sup> 등의 결과와 유사한 결과로 사료되며, 이는 구진의 항산화 작용 때문일 것으로 유추되었다. 따라서, 구진의 항산화 활성도를 측정된 결과, free radical scavenging activity는 구진 80  $\mu g/ml$ 에

## 구진의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 보호 기전 연구

서  $78.91 \pm 4.4 \%$ 의 수치가 관찰되었다(Fig. 3). 구진이 Catalase 활성도에 미치는 영향은 구진 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 20.4 unit/mg protein로 catalase 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 4).

생체 내 각종 염증반응에서 활성산소가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 생체는 이러한 활성산소에 의한 산화적 손상에 대하여 이를 방어하는 1차적 항산화제로서 가장 먼저 항산화 반응에 관여하는 것이 SOD라고 알려져 있다<sup>31)</sup>. 구진의 SOD 활성도 값은 구진 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 21.6 unit/mg protein으로 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 5). Fig. 5의 결과는 西谷有子<sup>5)</sup>의 치험사례보고와 인<sup>7)</sup>과 인<sup>8)</sup> 등의 항염 효과에 대한 보고와 일치한다고 사료된다.

또한 annexin-V를 이용한 flow-cytometric 분석결과에서 구진은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포상해에 대해서 보호효과가 있음이 관찰되었으며(Fig. 6), 세포의 형태학적 관찰결과 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포상해에 대해서 보호효과가 있다고 관찰되었다(Fig. 7).

다음은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 세포상해로부터 구진의 세포 보호 기전을 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. 실험방법은 free radical scavenger라고 알려져 있는 catalase를 이용하였으며, 구진과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독 또는 혼합처리하여 그 결과를 관찰하였다.

실험결과, 음성 대조군을  $100.0 \pm 1.52 \%$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군인 양성대조군에서는  $43.11 \pm 2.65 \%$ 의 세포생존율을 관찰할 수 있었다. Free radical scavenger라고 알려진 Catalase 단독처리군에 있어서는  $103.0 \pm 2.5 \%$ 로 음성대조군과 비교하여 다소 증가하였으나 유의성은 없어 음성대조군과 유사하다는 결론을 얻었다. Catalase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합처리군에서는  $96.3 \pm 4.5 \%$ 를 보여 음성대조군과 비교하여 거의 세포사망율에 대한

차이가 없는 결과가 관찰되었으며, 양성대조군과 비교할 경우 약 53 %의 세포생존율의 증가를 기록하여 유의성있는 세포생존율이 관찰되었다. 다음은 Catalase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 구진(40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서는 각각  $98.2 \pm 5.4 \%$ 와  $97.2 \pm 3.6 \%$ 의 세포생존율이 관찰되었다. 이 결과는 catalase + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 혼합처리군의 결과( $96.3 \pm 4.5 \%$ )와 비교할 경우, 다소의 증가가 관찰되었지만 유의성은 없어 같은 결과라고 사료되어 진다(Fig. 8). 따라서, 구진의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유발된 세포상해에 대한 보호효과는 catalase의 보호효과와 같은 항산화 효과라고 사료되며 이는 西谷有子<sup>5-6)</sup>의 보고와 일치한다고 사료된다.

신진대사 산화제인 GO의 세포독성에 대한 구진의 보호효과를 알아보았다. 음성대조군은  $100 \pm 2.6\%$ 로 환산되었으며, 양성대조군인 GO 20 nM 단독처리군에서는  $22.72 \pm 4.1 \%$ 로 관측되어 약 80%의 세포사망율을 보여 ZnCl<sub>2</sub>보다 다소 높은 세포 독성작용을 보였다. 여기에 구진을 혼합처리하면 즉, GO 20 nM + 구진 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는  $43.21 \pm 4.8 \%$ 가 관찰되어 GO 20 nM의  $22.72 \pm 4.1$ 과 비교하여 유의성있는 세포생존율이 관찰되었다.

Zn은 천이원소로서 생체 내 존재하는 각종 효소의 cofactor로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>32-33)</sup>, 최근 신경변증환자의 뇌회백질내에 Zn의 함량이 정상인보다 많다는 보고<sup>34)</sup> 등과 함께 중금속으로 신경세포에 대한 상해작용의 한 인자로서 알려져 있다. ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 구진의 보호효과를 알아보았다. 실험결과, 음성대조군을  $100 \pm 2.9 \%$ 로 환산되었을 경우, 양성대조군인 ZnCl<sub>2</sub> 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  단독처리군에서는  $31.46 \pm 4.5 \%$ 로 관측되어 약 70 %의 세포사망율을 보였다. 여기에 구진을 용량의존적으로 혼합처리하면 즉, ZnCl<sub>2</sub> 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + 구진 20  $\mu\text{g}/$

ml에서는  $39.88 \pm 3.5$ 의 세포생존율이 관측되었고,  $ZnCl_2$  300  $\mu g/ml$  + 구진 40  $\mu g/ml$ 에서는  $40.71 \pm 2.9$  %가 관찰되었다. 아울러  $ZnCl_2$  300  $\mu g/ml$  + 구진 60  $\mu g/ml$ 에서는  $39.07 \pm 19$  %가 관찰되었고  $ZnCl_2$  300  $\mu g/ml$  + 구진 80  $\mu g/ml$ 에서는  $43.88 \pm 4.2$  %가 관찰되었으나 양성대조군의  $31.46 \pm 4.5$  %와 비교할 때, 유의성은 보이지 않았다.

이상의 실험 결과로서 구진이  $H_2O_2$ 로 유도된 세포상해작용에 대해서 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 그 기전은 free radical scavenger 효과에 의해서 세포상해 보호효과가 발생한다고 사료된다. 이러한 결과는 西谷有子<sup>5-6</sup>, 안<sup>7</sup>과 안<sup>8</sup> 등의 결과와 일치하는 결과라고 사료된다. 이어서, 구진의 성분학적 분석에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며 또한, 구진 자체의 cell membrane 투과성의 여부, 열과의 융합되었을 경우의 치료효과 등의 연구가 진행된다면 애구요법의 치료효과를 보다 객관화 할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

애구요법의 치료효과를 객관화하기 위하여 C6-glia cell에  $H_2O_2$ 를 투여하여 산화적 손상을 유도하고 애구의 연소생성물인 구진을 처리한 후 세포생존율, DPPH, SOD, catalase activity와 세포의 형태학적 관찰 등을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 구진은 C6-glioma에서  $H_2O_2$ 의 세포 상해 유발 시, 용량 의존적으로 세포생존율을 증가시켰다.
2. DPPH에 의한 항산화 활성 측정 결과, 구진은 용량 의존적으로 free radical scavenging activity를 증가시켰다.
3. Catalase 활성도 측정 결과, 구진은 용량

의존적으로 catalase activity를 증가시켰다.

4. 구진이 Superoxide dismutase (SOD)에 미치는 영향에 대한 실험 결과, 구진은 용량 의존적으로 SOD activity를 증가시켰다.
5. Annexin-V를 이용한 flow-cytometric 분석결과, 구진은  $H_2O_2$ 에 의한 세포상해에 대해서 보호효과가 있음이 관찰되었다.
6. 광학 현미경을 통한 광학적 관찰 결과, 구진은  $H_2O_2$ 에 의한 세포상해에 대해서 보호 효과가 있음이 관찰되었다.
7. Glucose Oxidase로 세포의 세포독성 유발 시, 구진은 세포상해에 대한 보호효과가 있음이 관찰되었다.
8.  $ZnCl_2$ 에 의한 세포독성 유발 시, 구진은 세포상해에 대한 보호효과가 없음이 관찰되었다.

이상의 실험 결과로서 구진이  $H_2O_2$ 로 유도된 세포상해작용에 대해서 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이 효과는 Glucose Oxidase로 세포의 세포독성 유발 시에도 관찰되었으나, 중금속인  $ZnCl_2$ 에 의한 세포독성 유발 시에는 관찰되지 않았다. 또한 catalase와 혼합처리 결과 구진은 catalase 단독처리군 이상의 세포보호효과를 보이지 않는 결과로서 구진의 세포보호 기전은 free radical scavenger 효과에 의해서 세포상해 보호효과가 발생한다고 사료된다. 이어서, 구진의 성분학적 분석에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되며 또한, 구진 자체의 cell membrane 투과성의 여부, 온열자극과의 융합되었을 경우의 치료효과 등의 연구가 진행된다면 애구요법의 치료효과를 보다 객관화 할 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. 張馬合註 黃帝內經 素問 靈樞. 裕昌德書店. 1960 : 100.
2. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1995 : 405-6.
3. 林鍾國. 灸治療의 文獻的 觀察. 서울 : 동양의학. 1976 : 2(1).
4. 林鍾國. 艾灸의 生體反應에 관한 文獻的 考察. 서울 : 동양의학. 1976 : 2(3).
5. 西谷郁子. 灸およびモグサし燃焼生成物による疣贅治験2症例報告. 全日本灸學會雜誌. 1987 : 37(3).
6. 西谷郁子, 植田伸夫. 艾の燃焼生成物に含まれる抗酸化作用物質について. 全日本灸學會雜誌. 1988 : 38(1).
7. 안성훈, 구성태, 도진우, 김종성, 김광수, 양법식 외. 구진(Moxi tar)이 면역세포에서 iNOS 합성에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(1) : 33-46.
8. 안영남, 안성훈, 양기중, 김풍식, 김광수, 김종성 외. 구진(Moxi tar)이 뇌신경세포에서 Nitric Oxide 생성에 관하여 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(2) : 25-44.
9. 김재효, 이관형, 안영남, 김용득, 김경식, 손인철. 애엽 및 구진 약침이 일과성 전뇌 허혈 손상에 미치는 효과. 대한경락경혈학회지. 2003 ; 20(3) ; 61-80.
10. 大西基代 戶田靜男, 菅田良仁, 東家一雄, 黒巖共一, 木村通郎. 艾葉의 燃焼 生成物이 過酸化脂質에 미치는 作用. 全日本鍼灸學會誌. 1990 : 40(2) ; 228-31
11. 지형준, 이상인. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울 : 한국메디칼인텍스사. 1989 ; 242-3.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford : Clarendon Press. 1989 : 22-31.
13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford : Clarendon Press. 1989 : 86-9.
14. Krause SM, Jacobus WE, Becker LC . Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the post-ischemic "stunned myocardium. Circ Res. 1989 ; 65 : 526-30.
15. Hoffman P, Muller SP, Heinroth K, Buchner E, Richards R, Toraason M . Cardiotoxicity of dichromomethane in rats and in cultured rat cardiac myocyte. Toxi in Vitro. 1995 ; 9 : 489-92.
16. Pellegrini-Glampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slice as a consequence of free radical formation. J Neurochem 1988 ; 51 : 1960-3.
17. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. Diabetes. 1991 ; 40 : 405-12.
18. Rosen D, Siddiqure T, Patteron D, Figlewicz D, Sapp P, Hentti A et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol. 1993 ; 28 : 18-25.
19. Jang YJ, Park H, Kim HS, Hong HN, Kim MK. The role of increased oxidative stress in the development of diabetic nephropathy.

- Korean J Pharmacology. 1995 ; 31 : 95-102.
20. Park ST. Study on the effect of iron-chelator on oxygen radical-induced neurotoxicity. Korean J Phys Anthrop. 1995 ; 8 : 113-121.
  21. Jain SK. Hyperglycemic can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. J Biolo Chem. 1989 ; 264 : 21340-5.
  22. Camerone NE, Cotter MA, Maxfield EK. Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin- diabetic rats. Diabetologia. 1993 ; 36 : 299-304.
  23. 徐舜圭. 성인병 노인의학. 서울 : 고려의학. 1992 : 10-13, 225-8.
  24. 이정복. 장수학. 서울 : 의성당. 1993 : 1325-88.
  25. 최진호. 노화의 메카니즘과 연구방향. 생화학 뉴스 : 한국생화학학회. 1997 ; 5(3) : 39-53.
  26. 김숙희, 김화영. 노화. 서울 : 민음사. 1995 : 83-5.
  27. Chuyen NV, Utsunomiya N, Hodaka A, Kato H. Antioxidantive effect of Maillard reaction products in vivo. In: Pinot PA, ed. The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. New York : Birkhauser Verlag Basel. 1990 : 285-90.
  28. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with consumption in human. FASEB J. 1994 : 8 ; 534-7.
  29. Jacobson JM, Michael JR, Jafri MH, Gurtner GH. Antioxidants and actioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. J Appl Physiol. 1990 : 68 ; 1252-9.
  30. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. Diabetes. 1991 : 40 ; 405-12.
  31. 김덕준. 중이저류액에서 Superoxide Dismutase의 발현. 한이인지. 1999 : 42 ; 284-9.
  32. Schuhmacher M, Domingo JL, Llobet JM, Corbella J. Chromium, copper, and zinc concentrations in edible vegetables grown in Tarragona Province, Spain. Bull Environ Contam Toxicol. 1993 ; 50(4) : 514-21.
  33. Yokoyama M, Koh J, Choi DW. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. Neuroscience Letters. 1986 : 71 ; 351-5.
  34. Jun-ichi Sawada, Yutaka Kikuchi, Makoto Shibutani, Kunitoshi Mitsumuri, Kazuhide Inoue, Tadashi Kasahara. Induction of Metallothionein in Astrocytes by Cytokines and Heavy Metals. Biol Signal. 1994 ; 3 : 157-68.