

## 느릅나무 추출물의 항산화 효과 및 L-glutamate 유래 PC12 세포독성 보호효과

최원희 · 오영상 · 김성란 · 안지윤 · 하태열\*  
한국식품연구원

### Antioxidative and Protective Effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Extracts on Glutamate-Induced Cytotoxicity in PC 12 Cells

Won Hee Choi, Young Sang Oh, Ji Yoon Ahn, Sung Ran Kim, and Tae Youl Ha\*  
Department of Food Function Research Division, Korea Food Research Institute

Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* against oxidative damages induced by glutamate in PC 12 cells were investigated. Inhibitory activity against  $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress and DPPH radical-scavenging activity were detected in ethyl acetate and butanol fractions of ethanol extracts from stems and roots. Ethyl acetate and butanol fractions of ethanol extracts from roots significantly inhibited glutamate-induced cytotoxicity and reactive oxygen species in PC 12 cells. These results demonstrate ethyl acetate and butanol fractions of ethanol extracts of *U. davidiana* var. *japonica* have potent protective effect against glutamate-induced oxidative stress.

**Key words:** *Ulmus davidiana* var. *japonica*, glutamate, ROS, oxidative stress

### 서 론

최근 노화를 비롯한 신경퇴행성질환, 심혈관계질환, 암 및 각종 성인병 질환의 주된 원인이 활성산소에 기인한다는 것이 (1,2) 인정됨에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제의 개발과 연구에 더 많은 관심이 집중되고 있다. Superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및  $\text{H}_2\text{O}_2$  등의 활성산소는 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화 스트레스를 유발하게 되며(3), 이러한 산화 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있으며(1), Qian 등(4)과 Wink 등(5)은 전자전달계에서 생성된 산소분자와  $\text{Fe}^{3+}$ 가 각각 과산화수소와  $\text{Fe}^{2+}$ 로 환원되고 단백질과 복합체를 형성한 후 과산화수소와의 반응에 의하여 단백질이 손상된다고 보고하였다. Glutamate는 흥분성 신경전달 물질로서 신경전달계에서 필수적인 요소로 작용하지만 뇌 속의 과도한 축적은 활성산소종을 축적시킴으로써 뇌세포의 사멸과 변성을 초래하여 인지기능을 손상시켜 알츠하이머와 같은 퇴행성 뇌질환을 야기하는 것으로 알려져 있다(6,7). 한편 느릅나무

(*Ulmus davidiana* var. *japonica*)는 한국을 비롯한 일본 및 중국 등에 주로 분포하는 관엽 교목으로써 예로부터 수종, 임질, 유선염 등을 치료하는 소염제로 이용되어 왔으며(8), 수피의 항염증작용(9)과 메탄올 추출물의 진통, 소염, 항균작용(10) 및 위암 및 대장암에 대한 항암작용(11)이 보고되고 있다. 이 외에 성분에 대한 연구로는 Bae 등(12)이 느릅나무 수피에서 (+)-catechin과 (+)-catechin-7-O-xylopyranose (+)-catechin-7-piofuranose와 같은 (+)-catechin의 배당체 화합물 및 (+)-catechin의 이량체인 소량의 procyanidin B-3 화합물로 구성되어 있음을 밝혀내었고, Lee 등(13)은 근피에서 lyoniside, 5'-methoxyisolariciresinol-9'-O- $\beta$ -D-xylopyranoaside, isolariciresinol-9'-O- $\beta$ -D-ylopyranoaside, rel-trans-dihydrodehydroconiferyl alcohol 4'-O- $\alpha$ -rhamnoside, icariside E3 등의 6개의 lignan 및 neolignan을 분리하였다. 최근에 Jun 등(14) 및 Lee (15) 등은 느릅나무의 아질산염 소거능에 대하여 보고하였는데, 느릅나무 메탄올 추출물의 부탄올획분은 macrophage 내 iNOS 저하에 따른 NO 합성을 억제함으로써 macrophage의 세포사멸을 억제하였다고 보고(14)하였다. 또한 권 등(16)은 왕느릅나무 수피로부터 분리한 flavanonol 및 flavanone 등에서 우수한 항산화 활성이 나타났고, Lee 등(15)은 느릅나무 에탄올 추출물중 부탄올획분에서 높은 항산화 효과가 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서는 느릅나무의 신경세포보호 작용을 검토하기 위하여 근피와 수피 에탄올 추출물의 용매별 분획물의 항산화능을 측정하고 PC 12 cell에서 glutamate에 의한 활성산소의 변화 및 PC 12 세포독성에 미치는 영향을 조사하였다.

\*Corresponding author: Tae Youl Ha, Food Function Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si 463-746, Korea  
Tel: 82-31-780-9054  
Fax: 82-31-780-9225  
E-mail: tyhap@kfri.re.kr

## 재료 및 방법

### 느릅나무 추출물의 조제

본 실험에서 사용한 느릅나무는 얼음골 토종식물 영농조합(경북)에서 구입하여 근피와 수피로 각각 분리하여 세척한 후 건조시켜 사용하였다. 건조된 느릅나무의 근피 및 수피를 40 mesh의 크기로 분쇄하여 시료의 15배에 해당하는 80% 에탄올을 첨가한 다음 상온에서 18시간 동안 추출하여 여과하였다. 그 후에 rotary evaporator로 감압 농축하여 이를 에탄올 추출물로 하였다. 얻어진 에탄올 추출물(뿌리, 줄기 각각 4g)은 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올의 순서로 극성을 달리하여 분획하였으며 순차용매분획으로부터 얻어진 분획물은 감압상태에서 용매를 제거하여 시료로 사용하였다. 얻어진 분획물의 양은 줄기 헥산 회분은 0.118 g, 클로로포름 0.743 g, 에틸아세테이트 0.337 g, 부탄올 1.760 g이었고 뿌리 헥산 회분은 0.458 g, 클로로포름 회분 0.794 g, 에틸아세테이트 회분 0.209 g, 부탄올 회분 0.861 g이었다.

### 산화적 스트레스 억제활성 측정

산화적 스트레스 억제활성은 rat(Sprague-Dawley, 웅성, 6주령)의 whole brain을 적출하여 균질화 시킨 후 산화 스트레스원으로  $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 를 사용하여 생성되는 TBARS 함량을 Ohkawa 방법(17)에 의하여 측정하였다. 즉, 뇌조직에  $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 와 각 시료를 농도별로 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 20% acetic acid 1.5 mL, 8.1% SDS 0.2 mL과 0.8% TBA 1.5 mL을 첨가한 후 100°C에서 40분간 가열하였다. 이후에 원심분리를 통하여 얻은 상층액을 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer, V-530, Jasco, Japan)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다. 산화적 스트레스 저해활성은 시료 첨가군 흡광도와 증류수를 대조군으로 한 흡광도로부터 계산하여 활성을 비교하였다.

### DPPH Free radical 소거능 측정

DPPH free radical 소거능은 Blois(18)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 적절한 농도로 희석된 각 시료 0.2 mL과  $4 \times 10^{-4}$  M의 DPPH(1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)용액 0.8 mL을 첨가한 후 실온에서 15분간 방치한 뒤, 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포배양

본 실험에서 사용한 세포주는 rat pheochromocytoma PC 12 로써 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 10% inactivated horse serum(GIBCO, USA)과 5% fetal bovine serum(GIBCO, USA)이 첨가된 RPMI 1640(GIBCO, USA, 25 unit/mL penicillin, 25 unit/mL streptomycin) 배지를 이용하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건의 배양기에서 배양하였다. 배지는 2일에 한번씩 교체하였으며, 4-5일에 한번씩 계대배양 하였다.

### L-glutamate에 유도된 세포의 생존율 측정

세포 독성은 MTT 환원 방법을 이용하여 측정하였다. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 측정법은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 함유된 dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는 양을 측정하는 방법으로 먼저 적절히 배양된 세포를  $2.5 \times 10^4$  cell/well 수준으로 96 well plate에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 L-glutamate를 20 mM의 농도로 처리하여 세포독성을 유발시켰으며 동시에 각 분획물을 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 첨가하여 48시간

더 배양을 시킨 후 MTT 시약(50  $\mu\text{g}/\text{well}$ )을 첨가하고 4시간이 지난 다음 ELISA microplate reader(Molecular devices, THERBO Emax, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 측정된 대조구의 흡광도를 100으로 하여 percent(%)로 나타내었다.

### Cellular Reactive Oxygen Species(ROS) 측정

적절히 배양된 PC 12 세포를  $2 \times 10^6$  cells 수준으로 60 mm dish에 접종한 다음, 24시간 동안 배양하였다. 배양시킨 후, 20 mM의 glutamate로 산화적 스트레스를 유발시켰으며 동시에 각 분획물을 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 첨가하여 4시간을 배양하였다. 생성된 ROS의 양을 측정하기 위하여 DCF-DA(2,7-dichlorofluorescein diacetate)를 10  $\mu\text{M}$  되도록 첨가하여 30분간 37°C에서 추가로 배양한 다음 fluorescence plate reader(Ex 485 nm, Em 538, Labsystem, USA)을 이용하여 측정하였다. 결과는 측정된 대조구의 형광강도를 100으로 하여 percent(%)로 나타내었다.

### 통계분석

실험결과는 SAS package program을 이용하여 일원배치분산 분석 후, 유의성 검정은  $p > 0.05$ 에서 Duncan's range test로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 산화적 스트레스 억제활성

뇌는 산화적 반응이 쉬운 고도 불포화지방산의 함량이 높고, 조직내 산소 소모량이 다른 장기에 비하여 많아 산화적 손상을 받기 쉬운 것으로 보고(19)되고 있으며, 이로 인한 뇌 중 지질 과산화물의 축적은 뇌세포기능의 이상을 초래하고 중추신경계의 기능을 퇴화시키는 것으로 알려져 있다(20). 본 연구에서는 흰쥐의 뇌 조직에  $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 로 스트레스를 유발시켜 느릅나무 각 추출물 첨가에 따른 산화적 스트레스 억제활성을 측정된 결과(Fig. 1), 수피 및 근피의 모든 분획물에서 농도가 높을수록 높은 억제활성이 나타나 농도 의존적 반응을 나타내었다. 분획물중에서 수피와 근피 모두 에틸아세테이트회분이 가장 높은 활성을 나타내었고, 부탄올 회분에서도 에틸아세테이트 회분과 유사한 억제활성을 나타내었으며, 헥산 회분과 클로로포름회분은 에틸아세테이트 및 부탄올 회분에 비하여 낮은 활성을 나타내었다. 특히 수피의 에틸아세테이트 회분은 0.125 mg/mL에서도 50% 이상의 산화적 스트레스 억제활성을 나타내었다.  $\text{H}_2\text{O}_2$  및  $\text{Fe}^{2+}$  이온과 같은 산화스트레스의 다양한 형태에 따른 느릅나무 추출물의 항산화 효과를 살펴본 이 등(15)의 연구에서는 느릅나무 근피 및 수피의 에탄올 추출물에서  $\text{Fe}^{2+}$ 에 의한 지방의 산화가 효과적으로 억제되었다고 보고하였는데, 이는  $\text{Fe}^{2+}$  이온에 대한 결합능이 우수한 것에 기인하는 것으로 제안하였으며 느릅나무 근피의 부탄올 층에서 역시 높은 항산화효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한  $\text{Fe}^{2+}$  이온 및 dioxygen은 그 자체가 강한 산화촉진작용을 갖으며 자유 유리기와 관련된 생체의 산화를 유도하는 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있고(4), 이에 대한 결합능이 우수할수록 산화를 억제시키는 것으로 보고되고 있다(21,22). 따라서 본 실험에 관찰된 느릅나무 에탄올 추출물 및 각 용매 분획물들의 산화스트레스 억제효과는 산화요인으로 사용된  $\text{Fe}^{2+}$  이온과 oxygen radical에 대한 강한 결합능 또는 이에 의한 연속적인 지방산화를 방어하여 나타난 결과로 사료된다.

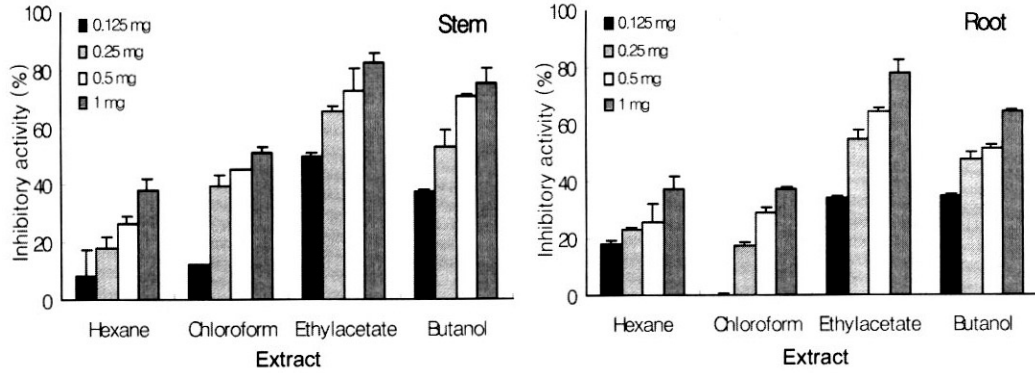


Fig. 1. Effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on FeSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress in rat brain.

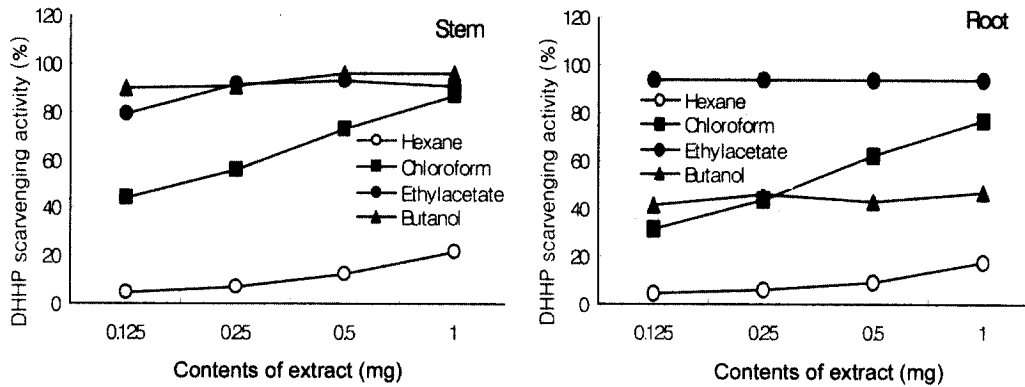


Fig. 2. Effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on DPPH radical scavenging activity.

**Free radical 소거능**

Free radical 소거능 측정에 사용되는 DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 갖고 있으며 그것의 흡수 전자에 의해 516 nm 부근에서 흡수 극대를 나타내는데 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하며 다시 산화되기 어렵다. 따라서 이러한 radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크다면 높은 항산화활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 높은 제거활성을 기대할 수 있기 때문에 특정 물질의 항산화능을 측정하는데 주로 이용되고 있다. 느릅나무 에탄올 추출물의 각 용매 분획물에 대한 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 (Fig. 2) 모든 분획물에서 농도 의존적으로 free radical 소거능을 보였으며, 특히 에틸아세테이트 분획층의 경우 0.125 mg/mL의 농도에서도 90% 이상의 매우 높은 소거능을 나타낸 반면 헥산 획분은 매우 낮은 활성을 보여 1 mg/mL에서도 20%전후의 아주 미약한 활성을 나타내었다. Free radical 소거능을 측정함으로써 나타난 느릅나무 추출물의 항산화 효과는 전반적으로 수피의 에틸아세테이트 분획 및 부탄올 분획에서 높게 나타났으나, 근피의 경우, 에틸 아세테이트 획분에서만 높은 활성을 나타내었다. 느릅나무 근피 및 수피의 각 용매추출물 첨가에 대한 free radical 소거능을 측정한 Lee 등(15)에 의하면 근피, 수피의 에탄올, 메탄올 및 부탄올 추출물에서 각 80% 이상의 높은 소거능을 나타내었는데, 수피 에탄올 추출물의 부탄올 획분에서 활성을 나타낸 본 실험의 결과와도 일치하는 것으로 나타났다.

**L-glutamate에 유도된 세포의 생존율**

Figure 3에서는 PC 12 cell에 있어서 느릅나무 에탄올 추출

물의 각 분획물이 glutamate로 유도된 세포독성에 미치는 영향을 나타내었다. L-glutamate를 20 mM의 농도로 첨가하였을 때 46%의 세포사멸을 유도하여 약 54%의 세포생존율을 나타내었다. 그러나 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분을 첨가함으로써 생존율이 증가하여 에틸아세테이트 획분은 무첨가 세포에 대하여 76.9%, 부탄올 획분은 67.5%의 생존율을 나타내어 glutamate에 의한 세포독성을 억제하였다. 이러한 세포독성의 억제능은 수피의 분획물에서는 나타나지 않았고 오히려 헥산 및 클로로포름 획분에서는 glutamate 첨가 대조군 보다 더 낮은 생존율을 나타내어 세포독성이 오히려 촉진되는 경향을 나타내었다. 뇌 속에 과다하게 축적된 glutamate는 활성산소종을 축적시키고(6,7) 뇌신경 세포벽의 지방산화를 촉진함으로써(23) 뇌신경세포의 사멸을 촉진하고 알츠하이머와 같은 질환을 야기시키는 것으로 알려져 있으며, Choi(24) 및 Murphy 등(25)은 뇌속의 glutamate 과다 축적은 세포내에 Ca<sup>2+</sup> 이온의 항상성의 불균형에 의한다고 보고하였다. 또한 Bondy 등(26)은 kinate와 같은 glutamate receptor agonist에 의하여 뇌세포의 free radical 형성이 증가하였다고 보고하였으며, Seyfreid 등(27)은 glutamate에 의하여 유도된 PC 12 cell의 세포사멸은 flupirtine과 같은 NMDA receptor antagonist에 의하여 감소될 수 있다고 제안하였다. 이러한 점으로 미루어 볼 때 느릅나무 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 및 부탄올 획분은 신경세포의 보호능이 있는 것으로 판단되었다.

**Cellular Reactive Oxygen species (ROS)**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 단순히 호흡과정에서 생성되는 부산물로 여겨져 왔으나 최근에

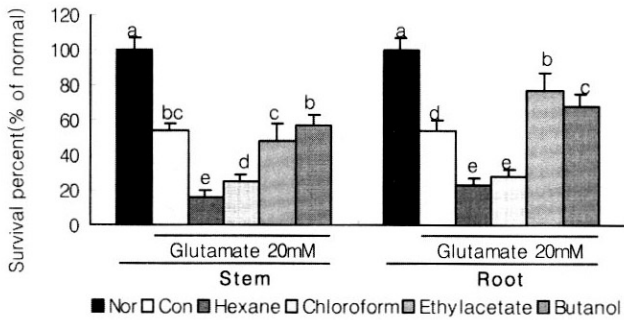


Fig. 3. Effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on L-glutamate induced cytotoxicity in PC 12 cells. Different letters mean significant difference ( $p < 0.05$ ).

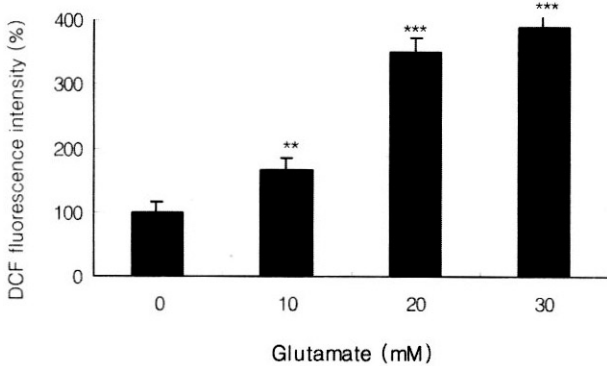


Fig. 4. Effect of L-glutamate on the intracellular ROS formation. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , compared with glutamate negative group.

이러한 활성산소종은 외부자극에 의하여 세포막에 존재하는 수용체를 통하여 일시적으로 생성되며, 세포내 활성산소의 증가는 세포의 사멸과 관계가 있으며(3) 특히, glutamate는 세포내 ROS를 형성함으로써 신경세포사멸을 초래하는 것으로 보고되어 있다(6,7,26,28). 세포내 생성된 ROS는 비형광을 나타내는 DCF-DA(2,7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 산화시켜 형광물질인 DCF로 전환시키는데 이렇게 전환된 형광물질의 양을 세포내 생성된 ROS로 간주하였다(29). 본 실험에서는 glutamate에 의한 ROS 형성의 증가를 억제하는 느릅나무의 효과를 PC 12 세포를 이용하여 검토하였다. Figure 4는 glutamate가 세포내 ROS 형성에 미치는 영향을 나타내었다. Glutamate는 PC 12 세포내의 DCF 형광강도를 유의적으로 증가시켜 10 mM의 농도에서는 무처리구에 비하여 약 1.67배가 증가하였으며, 20 mM 및 30 mM에서는 각각 3.49배, 3.88배로 농도 의존적으로 증가하여 glutamate가 세포내 ROS를 증가시킴을 확인하였다. Figure 5에서는 느릅나무의 수피 및 근피의 각 분획물이 glutamate에 의한 세포내 ROS 형성을 억제하는 효과에 대하여 나타내었다. 20 mM의 glutamate를 첨가함으로써 약 3.6배 증가한 DCF 형광강도는 수피의 부탄올 희분 및 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획물에서 형광강도가 유의적으로 감소하여 세포내 ROS의 형성이 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 느릅나무 에탄올 추출물의 에틸아세테이트 및 부탄올 희분에서의 세포내 ROS의 생성 억제능은 glutamate에 유도되는 세포사멸을 억제하는 한 요인으로 생각할 수 있다. 그러나 핵산 및 클로로포름 희분에서는 glutamate만을 첨가했을 경우보다 더욱 강한 형광강도를 나타내어 세포내 ROS의 형성을 억제하지 못

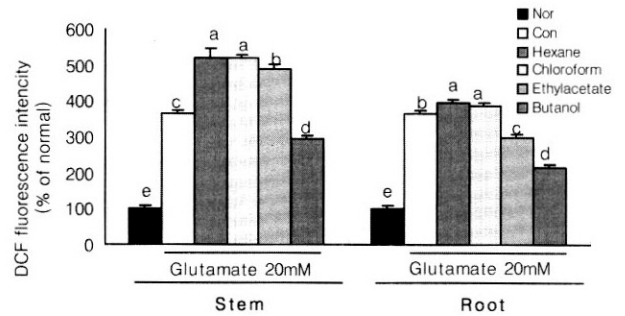


Fig. 5. Effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on the cellular ROS formation in L-glutamate-induced PC12 cells. Different letters mean significant difference ( $p < 0.05$ ).

하는 것으로 나타났다. Figure 3에서 보여진 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 희분에서의 glutamate에 의한 세포사멸의 억제 효과는 세포내 ROS의 형성이 효과적으로 억제된 Fig. 5의 결과에서 일부 설명될 수 있을 것이다. 즉, glutamate에 의한 세포사멸은 세포내 생성된 ROS에 의하여, 이러한 ROS의 형성은 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 희분에 의하여 억제되어 궁극적으로 신경세포의 사멸을 억제하는 것으로 사료되었다.

## 요 약

느릅나무 에탄올 추출물의 각 용매 분획물에 대한 항산화활성과 L-glutamate에 의하여 유도된 PC 12 세포에 대한 세포 독성 및 세포내 활성산소종(ROS)을 측정하였다. 느릅나무 수피의 에틸아세테이트 및 부탄올 분획과 근피의 에틸아세테이트 분획층은 흰쥐 뇌조직에서  $FeSO_4 \cdot H_2O_2$ 로 유도한 산화적 스트레스를 유의하게 억제하였으며 강한 free radical 소거능을 나타내었다. 또한 glutamate에 의하여 PC 12 세포의 생존율이 억제되었고 세포내 ROS가 증가하였으며 이러한 ROS의 증가는 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 희분에 의하여 억제되었다. 따라서 느릅나무 근피의 에틸아세테이트 및 부탄올 희분은 PC 12 세포에서 glutamate로 유도된 세포내 ROS를 억제함으로써 세포의 독성을 보호한 것으로 사료되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행된 과제의 일부로 이에 감사를 드립니다.

## 문 헌

- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922 (1993)
- Totter JR. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1763-1767 (1980)
- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science 221: 1256-1264 (1983)
- Qian SY, Buettner GR. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: An electron paramagnetic resonance spin trapping study. Free Radic. Biol. Med. 26: 1447-1456 (1999)
- Wink DA, Nims RW, Saavedra JE, Utermahlen WE, Ford Jr. PC. The fenton oxidation mechanism: reactivities of biologically relevant substrates with two oxidizing intermediates differ from those

- predicted for the hydroxyl radical. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 6604-6608 (1994)
6. Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. FASEB J. 6: 3338-3344 (1992)
  7. Choi DW. Excitotoxic cell death. J. Neurobiol. 23: 1261-1276 (1992)
  8. Shin MK. Clinical traditional herbalogy. Younglimsa, Seoul, Korea pp. 669-778 (1997)
  9. Lee EB, Kim OK, Jung CS, Jung KH. The influence of methanol extract of *Ulmus davidiana* var. *japonica* cortex on gastric erosion and ulcer and paw edema in rats. Korean. J. Pharmacol. 39: 671-675 (1995)
  10. Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim JS. A study on efficacy of ulmi cortex. Korean. J. Pharmacogn. 21: 217-222 (1990)
  11. Yang Y, Hyun JW, Lim KH, Kim HJ, Woo ER, Park J. Antineoplastic effect of extracts from traditional medical plants and various plants (III). Korean. J. Pharmacogn. 27: 105-110 (1996)
  12. Bae YS, Kim JK. Extractives of the bark of ash and elm as medical hardwood tree species. Mokjae Konhak. 28: 62-69 (2000)
  13. Lee MK, Sung SH, Lee HS, Cho JH, Kim YC. Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. Arch. Pharm. Res. 24: 198-201 (2001)
  14. Jun CD, Pae HO, Kim YC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Chae SW, Park RK, Chung HT. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. J. Ethnopharm. 62: 129-135 (1998)
  15. Lee YJ, Han JP. Antioxidative activities and nitrite scavenging abilities of extracts from *Ulmus davidiana*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 893-899 (2000)
  16. Kwon YM, Lee JH, Lee MW. Phenolic compounds from barks of *Ulmus macrocarpa* and its antioxidative activities. Korean. J. Pharmacogn. 33: 404-410 (2002)
  17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 35-41 (1979)
  18. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 26: 1199-1200 (1958)
  19. Yobimoto K, Matsumoto K, Huang N, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. Suppressive effects of vietnamese ginseng saponin and major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse. Pharmacol. Biochem. Behavior 66: 661-665 (2000)
  20. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R. Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. Biochem. Pharmacol. 57: 199-208 (1999)
  21. Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG<sub>2</sub> cells. Free Rad. Biol. Med. 32: 84-92 (2002)
  22. Lesnefsky EJ. Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. Adv. Exp. Med. Biol. 366: 129-146 (1994)
  23. Naito M, Umegaki H, Iguchi A. Protective effects of probucol against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC 12. Neurosci. Lett. 186: 211-213 (1995)
  24. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci. 11: 465-469
  25. Murphy TH, Malouf AT, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Calcium-dependent glutamate toxicity in a neuronal cell line. Brain Res. 444: 326-332 (1988)
  26. Bondy SC, Lee DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonist. Brain Res. 610: 229-233 (1993)
  27. Seyfreid J, Evert BO, Rundfeldt C, Schulz JB, Kovar KA, Klockgether T, Wullner U. Flupirtine and retigabine prevent L-glutamate toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. Eur. J. Pharmacol. 400: 155-166 (2000)
  28. King N, McGivan JD, Griffiths EJ, Halestrap AP, Suleiman MS. Glutamate loading protects freshly isolated and perfused adult cardiomyocytes against intracellular ROS generation. J. Mol. Cell. Cardio. 35: 975-984 (2003)
  29. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Rad. Biol. Med. 27: 612-616 (1999)

---

(2005년 1월 7일 접수; 2005년 5월 24일 채택)