

염산과 트립신으로 처리한 노니(*Morinda citrifolia*) 추출물의 항산화 효과

최혜영 · 최병철 · 심상수[#]

중앙대학교 약학대학

(Received August 12, 2005; Revised October 4, 2005)

Antioxidant Effects of Noni (*Morinda citrifolia*) Extracts Treated with HCl and Trypsin

Hye Young Choi, Byung Chul Choi and Sang Soo Sim[#]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Abstract — To investigate biological activity of noni extracts treated with HCl and trypsin, we measured the antioxidant activity through vitro assay and cellular system. Both water and lipid soluble fraction of noni extracts dose-dependently scavenged DPPH radical. Superoxide scavenging activity of lipid soluble fraction after treating HCl and trypsin was significantly more potent than those of other fractions in NBT/xanthine oxidase assay, which suggests that antioxidant activity of noni extracts was increased by the treatment with HCl and trypsin. In antioxidant assay using RBL 2H3 cells, water soluble fraction of noni extracts had little effect on silica-induced reactive oxygen species generation, whereas lipid soluble fraction inhibited in a dose dependent manner. In non-treated noni extracts, effect of water soluble fraction on silica/CuSO₄-induced lipid peroxidation was more potent than that of lipid soluble fraction. However, the effects of noni extracts were reversed in noni extracts treated with HCl and trypsin. These data suggest that water soluble substances may be converted into lipid soluble substances by the treatment with HCl and trypsin. From the above results, it is suggested that lipid soluble fraction of noni extracts contain antioxidant used in vitro assay and RBL 2H3 cellular system. Such an effect of noni extracts may be increased by the treatment with HCl and trypsin.

Keywords □ noni, antioxidant, ROS, lipid peroxidation

Morinda citrifolia(Rubiaceae)는 열대성 식물로서 하와이나 타 이티 섬에서 노니(noni)로 불리고 있으며, 지역에 따라 indian mulberry, Ba Ji Tian, nono, nonu, cheese fruit, nhau로 불리기도 한다. 노니는 2000년 넘게 폴리네시아인들의 식량과 민간 요법제로서 사용되어 왔는데 지금 까지 노니는 항균성, 항 바이러스성, 항균, 항암, 감기, 알레르기, 저혈압, 항염증, 면역성을 높 이는데 효력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2)}

노니가 함유하고 있는 주요 구성 성분을 살펴보면 scopoletin, octanoic acid, vitamin C, terpenoids, alkaloids, anthraquinones (nordamnacanthal, morindone, rubiadin, rubiadin-1-methylether, anthraquinone glycoside), β -sitosterol, carotene, vitamin A, flavone glycosides, linoleic acid, alizarin, amino acids, acubin,

L-asperuloside, caproic acid, caprylic acid, ursolic acid, rutin, 외에 가칭 proxeronine들이 있다.^{3,4)} 한편 노니 잎으로부터 새로운 flavonol 배당체로서 iridoid glycoside를 발견하였으며 이 물질은 mouse epidermal JB6. cell에서 AP-1 활성화와 세포의 변형을 억제한다고 보고하였다.^{5,6)}

노니의 항암 효과도 근본적으로 유리산소 라디칼을 제거하여 지방과산화물의 생성을 억제하는 것과 연관성이 있다.⁷⁾ 노니 추출물이 *in vitro* assay인 tetrazolium nitroblue assay나 TBARS (thiobarbituric acid reagent substances) assay에서 superoxide anion의 소거와 lipid peroxidation을 억제한다는 결과가 보고되었다.^{8,9)} 한편 노니 추출물의 항산화 작용은 vitamin C 보다 2.8 배, pycnogenol 보다는 1.4배, 포도씨 분말보다는 1.1배 강한 항산화 작용이 있다는 것이 밝혀졌다. 사염화탄소에 의한 간세포의 lipid hyperoxidation은 노니 추출물을 12일간 투여 시 사염화탄소 투여 3시간 후 지질과산화를 20~50% 감소시켰다.^{9,10)}

노니에 함유된 성분중 가칭 proxeronine은 Heinicke가 처음으로

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) simss@cau.ac.kr

로 xeronine system을 도입하면서 나온 용어이다. proxeronine은 xeronine의 전구물질로서 생체내에 존재하는 proxeronidase라는 효소에 의해 생리활성이 강한 alkaloid로 전환되는 물질을 지칭한다.¹¹⁾ Heinicke의 가설에 따르면 xeronine은 효소나 수용체, 신호전달계에 관여하는 단백질의 분자 구조를 변형시켜 다양한 생리활성을 일으키는 물질로 설명하였다. 이러한 가설은 호밀을 주식으로 하는 북유럽 사람들이 대장암이나 직장암 발병율이 다른 유럽 사람에 비해 적게 발생하는 원인이 바로 호밀에 있는 물질이 인체내 소화과정에서 항암활성이 강한 물질로 전환되면서 암 발생율을 감소시킨다는 설을 뒷받침하고 있다. 위와 같이 노니 추출액이 다양한 생리활성을 나타내고 있지만 작용기전은 아직 잘 알려져 있지 않은 상태이다. 지금까지 노니 추출물이 나타내는 생리활성 기전을 살펴보면 대표적인 작용으로 항산화 작용을 볼 수 있다. 본 연구는 사람이 노니를 복용시 소화기계에 소화되는 과정과 유사한 처리를 하였을 때 *in vitro* assay와 cell system에서 항산화 작용의 변화를 관찰하였다.

실험 방법

재료

노니 열매를 건조시킨 분말은 Huong Thanh Co.(Viet Nam)로부터 구입하였다. DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrozyl), xanthine oxidase(XO), NBT(nitroblue tetrazolium chloride), hypoxanthine, 2-thiobarbituric acid, malonyldialdehyde, hexadecyltrimethyl ammonium bromide(HTAB), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB), N,N-dimethylformamide (DMF)들은 Sigma사로부터 구입하였으며, dihydrorhodamine, dihydroethidium, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Molecular Probe Co.에서 구입하였다. RBL 2H3 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

노니 추출액

노니 열매를 건조시켜 얻은 분말(20 g)을 증류수 100 ml에 분산시킨 후 1 N HCl 1 ml를 가하여 상온에서 3시간 배양하고 1 N NaOH 1 ml를 가하여 중화시켰다. Trypsin(1: 250; 400 mg/100 ml)을 가하여 37°C에서 2 시간 방치하였다. methanol 400 ml를 첨가하여 최종 80% methanol 용액에서 하루 밤 진탕하고, 상층액을 분리한 후 다시 80% methanol 300 ml를 가하여 3시간 진탕한 후 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축한 후 freeze-dryer로 동결 건조하여 분말을 얻었다. 산처리와 trypsin 처치를 하지 않은 균을 대조군으로 삼아 상기와 같은 절차를 거쳐 분말을 얻었다. 동결 건조한 분말을 증류수에 녹여 수용성 분획을 얻었으며, 증류수에 녹지 않은 침전물은 다시 건조시킨 후 DMSO에 녹여 지용성 분획으

로 간주하여 실험하였다.

세포 배양

RBL 2H3(rat basophilic leukemia) 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50 µg/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Histamine을 유리하는 비만 세포인 RBL 2H3 세포를 이용하여 superoxide 생성, 세포내 H₂O₂ 생성, 세포내 hydroperoxide 생성 및 지질과산화를 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 정량

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180 µl와 각 농도별로 조제한 노니 추출액 20 µl를 가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 FL600 spectrofluorometer(Bio-Tek, Winooski, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NBT/XO(superoxide 소거) 정량

0.6 mM hypoxanthine, 1 mM EDTA, 0.2 mM NBT를 함유하는 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4) 400 µl에 노니 추출액 5 µl를 가하여 잘 혼합하였다. 반응은 xanthine oxidase (1 U/ml) 100 µl를 가하면서 시작하였다. 반응 혼합액을 37°C에서 5분간 배양한 후 96 well plate에 200 µl 씩 소분하고 FL600 spectrofluorometer를 이용하여 645 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹²⁾

세포내 superoxide와 H₂O₂ 및 hydroperoxide 생성 측정

세포내에서 생성되는 superoxide와 H₂O₂ 및 hydroperoxide를 측정하기 위하여 각각 dihydroethidium¹³⁾과 DCF-DA¹⁴⁾ 및 DHR¹⁵⁾를 이용하였다. RBL 2H3 세포를 10 ml의 Krebs buffer 용액(mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl₂ 1.8, glucose 5)에 분산시킨 후 10 µM dihydroethidium과 20 µM DCF-DA 및 10 µM DHR를 각각 가하고 1시간 빛을 차단한 곳에서 배양하였다. Krebs 용액으로 한번 세척한 후 10⁵ cells/ml로 분주하고 노니추출액을 전처리 한 후 silica 1 mg/ml를 가하여 30분간 superoxide와 H₂O₂ 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 µl의 Krebs 용액에 분산시켰다. Superoxide는 Ex: 480 nm/Em; 586 nm에서 H₂O₂는 Ex: 485 nm/Em; 535 nm에서, hydroperoxide는 Ex: 488 nm/Em; 515 nm에서 형광을 측정하였다.¹³⁾

지질과산화 측정

세포막의 지질과산화를 측정하기 위하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 형광을 이용하였다. 노니 추출물

을 처리한 RBL 2H3 세포를 0.5 mM DTT를 함유한 PBS buffer로 세척한 후 sonication하고 50% trichloroacetic acid를 가하여 최종 5% 농도로 조절하였다. 동량의 0.325% 2-thiobarbituric acid(in 50% acetic acid)를 첨가하여 95°C에서 30 min 배양하였다. 원심분리 후 200 μ l를 96 well plate에 옮기고 Ex: 485 nm, Em: 535 nm에서 형광 측정하였다. 표준물질로서는 malonyldialdehyde(1,1,3,3-tetraethoxypropane, Sigma)를 사용하였다.¹⁶⁾ 조직내 lipid peroxidation은 균질액을 이용하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험 성적은 unpaired Student's t-test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

노니 추출물의 항산화 작용

노니 추출물의 항산화 작용을 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거반응과 xanthine oxidase에 의한 superoxide의 소거 반응을 관찰하였다. DPPH 라디칼 소거반응에 있어서 노니의 수용성 분획과 지용성 분획 모두 농도 의존적으로 라디칼을 소거하였다. 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid 100 μ M은 78%의 라디칼 소거 반응을 보였지만, 노니의 수용성 분획과 지용성 분획 1 mg/ml은 각각 45%, 50%의 소거 반응을 나타냈다(Fig. 1) 한편 산과 trypsin을 처리한 노니 추출물은 산과 trypsin을 처리하지 않은 추출물과 유사한 라디칼 소거반응을 보였다. 그러나 통계적으로 유의하지는 않지만 수용성 분획에서는 산과 trypsin을 처리한 노니 추출물이 라디칼 소거 반응이 약하게 나타났으며, 지용

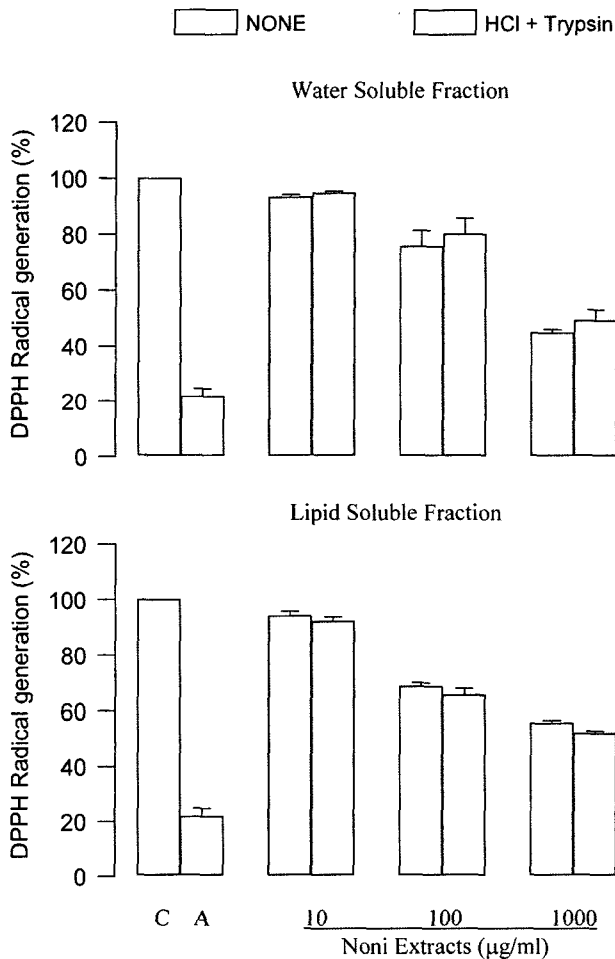


Fig. 1 - Antioxidant effect of noni extracts in the DPPH assay. A solution of 180 μ l of 100 μ M DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μ l of noni extracts for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means \pm SD from 6 separate experiments (C: control; A: ascorbic acid 100 μ M).

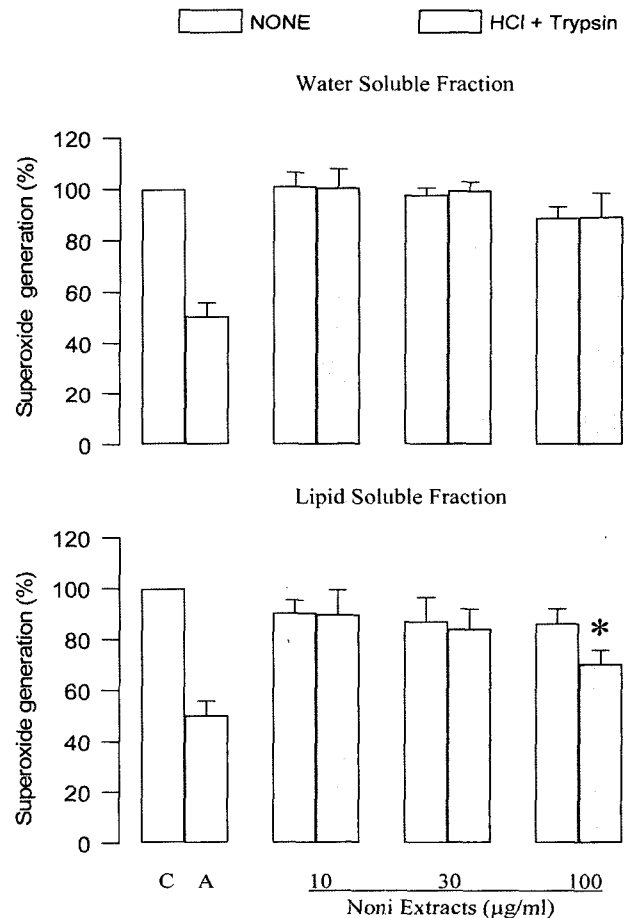


Fig. 2 - Antioxidant effects of noni extracts in NBT/xanthine oxidase assay. The scavenging potential for superoxide radicals was analyzed via a hypoxanthine/xanthine oxidase generating system coupled with nitroblue tetrazolium. Results are means \pm SD from 6 separate experiments (C: control; A: allopurinol 10 μ M). * Significantly different from non-treated noni extracts ($p < 0.05$).

성 분획에서는 반대 현상이 나타났다.

Xanthine oxidase에 의한 superoxide의 소거 반응에 있어서 수용성과 지용성 노니 추출물은 100 µg/ml 농도에서 각각 10%와 15% 라디칼 소거 활성을 보였다. 양성 대조군으로 사용한 allopurinol은 10 µM에서 50% 소거 활성을 보였다. 한편 산과 trypsin을 처리한 노니 추출물은 수용성 분획은 별 다른 차이가 없었지만 지용성 분획은 통계적으로 유의하게 30% 소거 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이러한 결과는 산과 효소를 처리한 노니 추출물에서 항산화 작용이 강화되는 것을 시사하여 준다. DPPH assay와 NBT/XO assay에서 각각 양성 대조물질로 사용한 ascorbic acid 100 µM와 xanthine oxidase 억제제로 알려진 allopurinol 10 µM의 항산화 작용에 비하여 노니 추출물의 항산화 작용은 미약한 것으로 나타났다.¹²⁾

Silica에 의한 세포내 superoxide anion 생성에 미치는 영향

위 실험에서는 시험관에서 노니 추출물의 직접적인 항산화 활성을 측정하였다. 세포내에서 생성되는 superoxide anion 생성을 DHE를 이용하여 측정하였다.¹³⁾ Silica 1 mg/ml은 RBL 2H3 세포에서 superoxide 생성을 2.7배 증가시켰다. 수용성 노니 추출물은 silica에 의한 세포내 superoxide 생성에 별 다른 영향을 주지 않았다. 그러나 지용성 분획은 silica에 의한 세포내 superoxide의 생성 증가를 60% 감소시켰다(Fig. 3). 한편 산과 trypsin을 처리한 추출물과 처리하지 않은 추출물 사이에 있어서 유의한 차이는 없었다.

Silica에 의한 세포내 H₂O₂ 생성에 미치는 영향

DCF-DA를 이용한 세포내 H₂O₂ 생성을 측정할 실험에 있어서¹⁴⁾ silica 1 mg/ml은 RBL 2H3 세포에서 H₂O₂ 생성을 4.5배

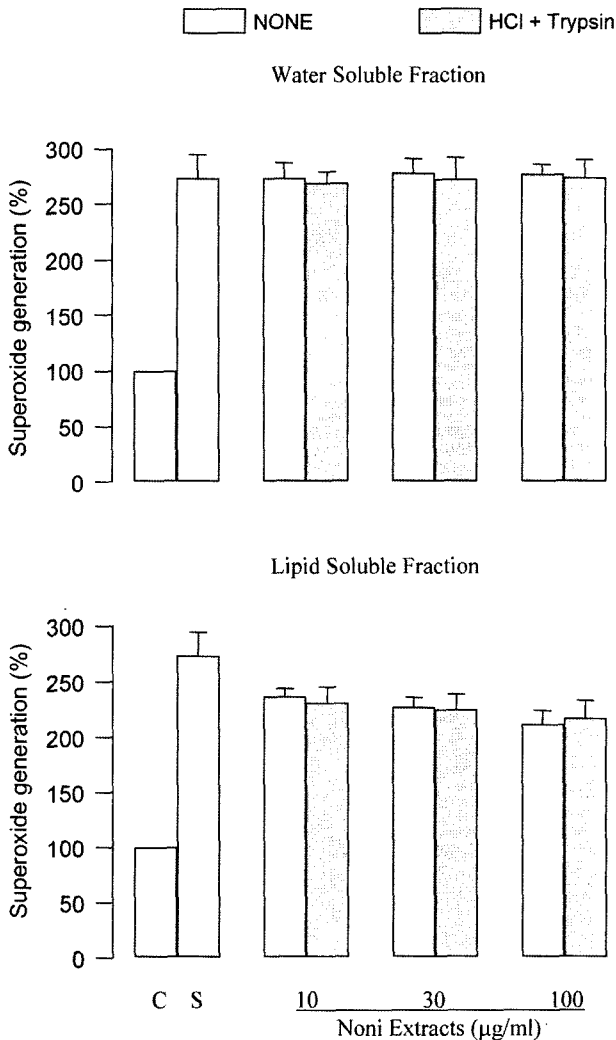


Fig. 3 – Effects of noni extracts on silica-induced intracellular superoxide anion generation in RBL 2H3 mast cells. Results are means±SD from 6 separate experiments (C: control; S: silica 1 mg/ml).

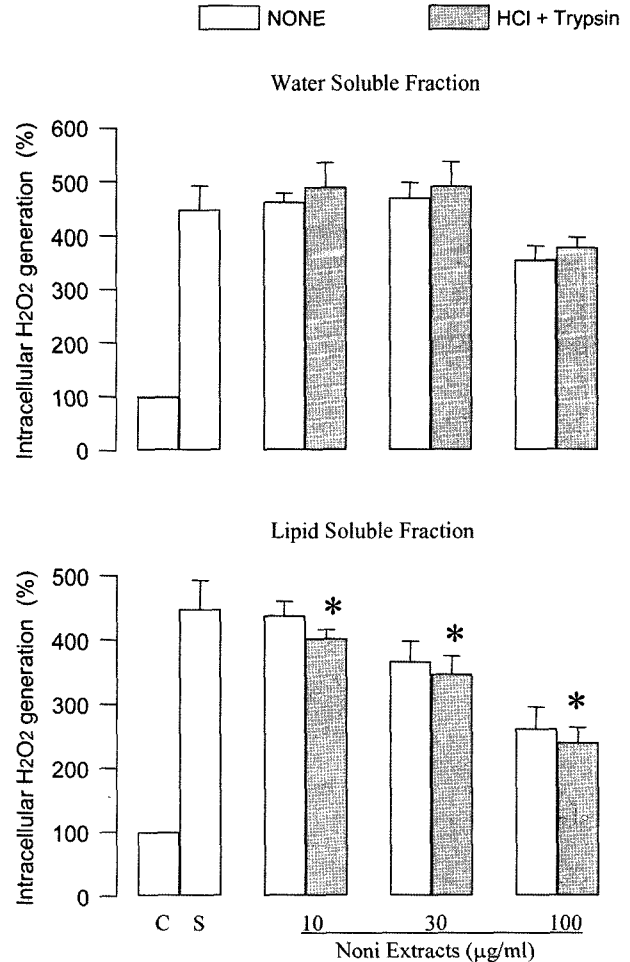


Fig. 4 – Effects of noni extracts on silica-induced intracellular H₂O₂ generation in RBL 2H3 mast cells. Results are means±SD from 6 separate experiments (C: control; S: silica 1 mg/ml). * Significantly different from non-treated noni extracts (p<0.05).

증가시켰다. 수용성 노니 추출물은 30 μM 이하 농도에서는 silica에 의한 세포내 H_2O_2 생성에 별 다른 영향을 주지 않았지만 100 μM 농도에서 silica에 의한 H_2O_2 생성을 27% 억제하였다. 지용성 분획은 silica에 의한 세포내 H_2O_2 생성을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 4). 한편 산과 trypsin을 처리한 추출물과 처리하지 않은 추출물 사이에 있어서 유의한 차이는 없었지만 지용성 분획에 있어서 산과 trypsin을 처리한 분획이 더 많은 억제 경향을 나타냈다.

Silica에 의한 세포내 hydroperoxide 생성에 미치는 영향

DHR를 이용한 세포내 hydroperoxide 생성을 측정한 실험에서¹⁵⁾ silica 1 mg/ml은 RBL 2H3 세포에서 hydroperoxide 생성을 4.7배 증가시켰다. 수용성 노니 추출물은 silica에 의한 세포

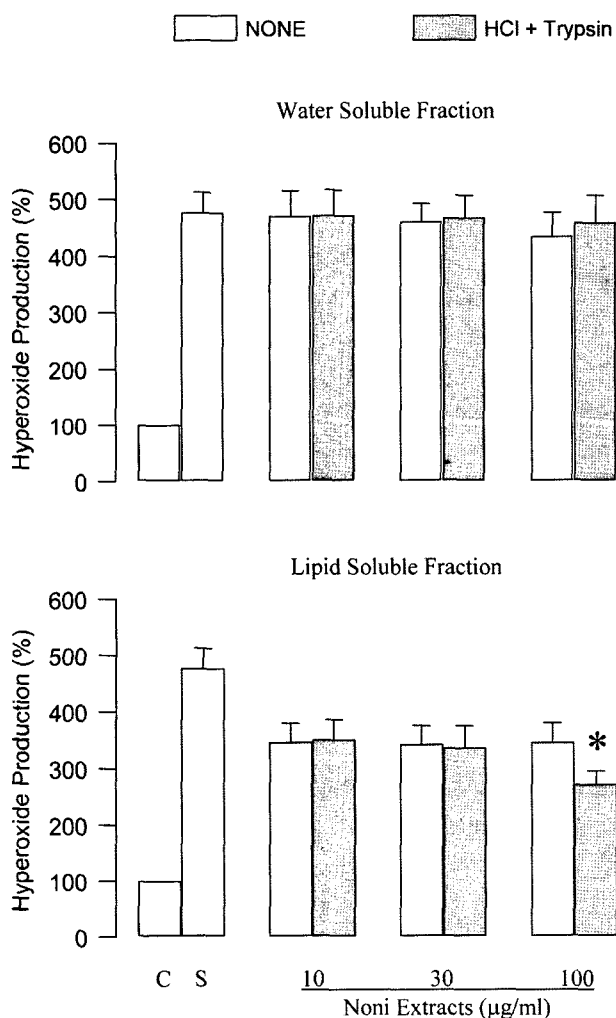


Fig. 5 - Effects of noni extracts on silica-induced intracellular hydroperoxide generation in RBL 2H3 mast cells. Results are means \pm SD from 6 separate experiments (C: control; S: silica 1 mg/ml). * Significantly different from non-treated noni extracts ($p < 0.05$).

내 hydroperoxide 생성에 별 다른 영향을 주지 않았다. 그러나 지용성 분획은 농도 의존적으로 silica에 의한 세포내 hydroperoxide 생성을 억제하였다(Fig. 5). 한편 산과 trypsin을 처리한 추출물과 처리하지 않은 추출물 사이에 있어서 유의한 차이는 없었지만 지용성 분획 100 $\mu\text{g/ml}$ 에 있어서 산과 trypsin을 처리한 분획이 유의성 있게 더 많이 억제하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 산과 trypsin을 처리하면 지용성 분획에서 세포내에서 항산화 작용이 더 강한 물질이 많이 생성되는 것을 제시하여 준다.

RBL 2H3 세포에서 CuSO_4 /silica에 의한 지질과산화에 미치는 영향

세포에서 생성되는 reactive oxygen species들은 세포막이나 세포내 소기관의 막을 산화시키게 되는데 지질과산화를 thiobarbituric acid를 이용하여 생성된 TBARS를 측정하였다.¹⁶⁾ Silica 1 mg/ml과 CuSO_4 10 μM 은 RBL 2H3 세포에서 유의한 지질과산화를 유발하지 않지만 동시에 투여시 안정상태의 지질과산화 0.43 μM 에서 1.01 μM 로 2.3배 증가시켰다. 수용성 노니 추출물에서 산과 trypsin을 처리한 추출물보다 처리하지 않은 추출물이 유의하게 억제하였으나, 지용성 분획에서는 수용성 분획과 반대로 산과 trypsin을 처리한 분획이 유의하게 더 많이 억제하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 산과 trypsin 처리시 지질과산화물의 생성을 억제하는 물질이 수용성 분획에서 지용성 분획으로 전환되었다는 것을 시사하여 준다.

산과 trypsin을 처리한 노니 추출물과 처리하지 않은 대조물질의 수용성 분획과 지용성 분획에 있어 구성 성분의 차이가 있는

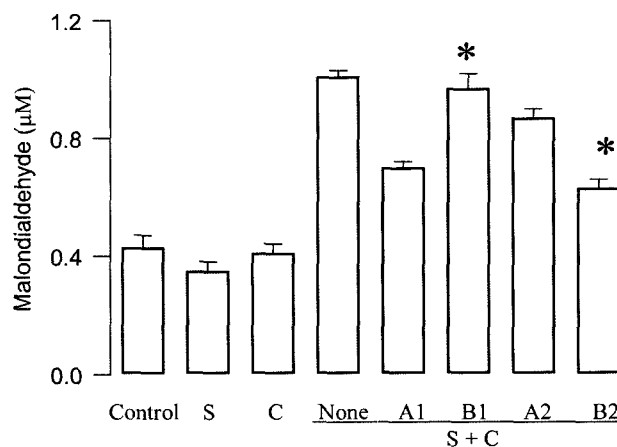


Fig. 6 - Effects of noni extracts on CuSO_4 /silica-induced lipid peroxidation in RBL 2H3 mast cells. Results are means \pm SD from 4 separate experiments (S: silica 1 mg/ml; C: CuSO_4 10 μM ; A1: water soluble fraction of non-treated noni extracts; A2: lipid soluble fraction of non-treated noni extracts; B1: water soluble fraction of HCl/trypsin-treated noni extracts; B2: lipid soluble fraction of HCl/trypsin-treated noni extracts). * Significantly different from non-treated noni extracts ($p < 0.05$).

지를 thin layer chromatography(TLC)를 한 결과 두 추출물 사이에 있어서 특이한 spot의 차이나 density 차이를 발견하지 못했다(미발표 결과). 시험관 시험과 세포를 이용한 항산화 실험에서 산과 trypsin을 처리한 노니의 추출물이 더 강한 항산화 작용을 나타내고 있다. 이에 대한 기전은 이 실험의 결과만으로는 설명하기가 어려운 상태이다. 이러한 현상은 배당체 형태가 가수분해되거나 단백질 결합형보다는 유리형으로 전환될 가능성이 있으며 앞으로 단일 물질을 분리하는 실험을 진행하면서 산과 효소 처리에 의한 새로운 물질의 형성을 확인하는 것이 필요할 것이다.

결 론

산과 trypsin을 처리한 노니 추출물의 생리활성 변화를 관찰하기 위하여 *in vitro* assay와 cellular system을 이용한 항산화 작용을 관찰하였다. DPPH 라디칼 소거반응에 있어서 노니의 수용성 분획과 지용성 분획 모두 농도 의존적으로 라디칼을 소거하였다. xanthine oxidase에 의한 superoxide의 소거 반응에 있어서 대조군의 수용성과 지용성 노니 추출물은 100 µg/ml 농도에서 각각 10%와 15% 라디칼 소거 활성을 보였으나 산과 trypsin을 처리한 지용성 분획은 대조군의 지용성 분획에 비하여 통계적으로 유의하게 30% 소거 활성을 증가시켰다. 이러한 결과는 산과 효소를 처리한 노니 추출물에서 항산화 작용이 강화되는 것을 시사하여 준다. 수용성 노니 추출물은 silica에 의한 세포내 ROS 생성에 별 다른 영향을 주지 않았으나 지용성 분획은 silica에 의한 세포내 ROS 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 지질 과산화에 있어서 수용성 분획에서는 산과 trypsin을 처리하지 않은 추출물이, 지용성 분획에서는 수용성 분획과 반대로 산과 trypsin을 처리한 추출물이 지질과산화를 억제하였다. 이러한 결과는 산과 trypsin 처리시 지질과산화물 생성을 억제하는 물질이 수용성 분획에서 지용성 분획으로 전환되었다는 것을 시사하여 준다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 *in vitro* assay와 cellular system에서 노니의 항산화 작용은 산과 trypsin 처리시 지용성 분획에서 항산화 작용이 더 강하게 나타는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Whistler, W. A. : Traditional and herbal medicine in the Cook Islands. *J. Ethnopharmacol.* **13**, 239 (1985).
- 2) Singh, Y. N., Ikaahifo, T., Panuve, M. and Slatter, C. : Folk medicine in Tonga. A study of the use of herbal medicines for obstetric and gynaecological conditions and disorders. *J. Ethnopharmacol.* **12**, 305 (1984).
- 3) McClatchey, W. : From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integr. Cancer Ther.* **1**, 110 (2002).

- 4) Carr, M. E., Klotz, J. and Bergeron, M. : Coumadin resistance and the vitamin supplement "Noni". *Am. J. Hematol.* **77**, 103 (2004).
- 5) Wang, M., Kikuzaki, H., Csiszar, K., Boyd, C. D., Maunakea, A., Fong, S. F., Ghai, G., Rosen, R. T., Nakatani, N. and Ho, C. T. : Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4880 (1999).
- 6) Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Wang, M., Jhoo, J. W., Stark, R. E., Badmaev, V., Ghai, G., Rosen, R. T. and Ho, C. T. : Iridoid glycosides from the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Nat. Prod.* **64**, 799 (2001).
- 7) Bartsch, H. and Nair, J. : New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur. J. Cancer.* **36**, 1229 (2000).
- 8) Auerbach, B. J., Kiely, J. S. and Cornicelli, J. A. : A spectrophotometric microtiter-based assay for the detection of hydroperoxy derivatives of linoleic acid. *Anal. Biochem.* **201**, 375 (1992).
- 9) Wang, M. Y. and Su, C. : Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **952**, 161 (2001).
- 10) Burns, D. M. : Cigarette smoking among the elderly: disease consequences and the benefits of cessation. *Am. J. Health Promot.* **14**, 357 (2000).
- 11) Heinicke, R. : The pharmacologically active ingredient of noni. *Bulletin of The National Tropical Botanical Garden* (1985).
- 12) Waters, S., Fae, A., Gondalia, J., Holm, J., Karlstrom, L., Nilsson, U. and Jonsson, O. : Effects of pretreatment with a xanthine oxidase inhibitor on free radical levels during carotid endarterectomy. *Free Radic. Res.* **38**, 283 (2004).
- 13) Siegel, D., Gustafson, D. L., Dehn, D. L., Han, J. Y., Boonchoong, P., Berliner, L. J. and Ross, D. : NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1238 (2004).
- 14) Woo, C. H., Eom, Y. W., Yoo, M. H., You, H. J., Han, H. J., Song, W. K., Yoo, Y. J., Chun, J. S. and Kim, J. H. : Tumor necrosis factor- α generates reactive oxygen species via a cytosolic phospholipase A2-linked cascade. *J. Biol. Chem.* **275**, 32357 (2000).
- 15) Nomura, K., Imai, H., Koumura, T., Kobayashi, T. and Nakagawa, Y. : Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* **351**, 183 (2002).
- 16) Boland, A., Delapierre, D., Mossay, D., Hans, P. and Dresse, A. : Propofol protects cultured brain cells from iron ion-induced death: comparison with trolox. *Eur. J. Pharmacol.* **404**, 21 (2000).