

연구노트

생쥐 뇌소교세포주에서 웅담추출활성성분(우르소데옥시콜린산)의 항산화 및 세포보호효과

주성수 · 김성근 · 유영민¹ · 류인왕² · 김정훈² · 이도익*

중앙대학교 약학대학 면역학교실, ¹상지대학교 한의과대학 병리학교실, ²강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Anti-oxidative and Cytoprotective Effect of Ursodeoxycholic Acid, an Active Compound from the Bear's Gall, in Mouse Microglia

Seong-Soo Joo, Seong-Kun Kim, Yeong-Min Yoo¹, In-Wang Ryu², Kyunghoon Kim², and Do-Ik Lee*

Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University

¹Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Sangji University

²Division of Life Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University

Abstract The *in vitro* cytoprotective and anti-oxidative effects of ursodeoxycholic acid, a major active compound from bear's gall were investigated in mouse brain microglia. In the present study, we wished to scrutinize the potential role of UDCA as an anti-neurodegenerative agent in neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease. This concept was supported by the multiple preliminary studies in which UDCA has an anti-inflammatory effect in microglial cells. In the study, we found that 7.5 µg/mL UDCA was effective in the protection of cells from H₂O₂ damage, a reactive oxygen, and the result was coincided with the anti-apoptotic effect in DAPI staining. Moreover, the metal-catalyzed oxidation study showed that UDCA has antioxidant effect as much as ascorbic acid at 50~100 µg/mL. In conclusion, these study results suggested that neuro-degenerative diseases such as Alzheimer's disease probably caused by over-expressed beta amyloid peptide in elderly people can be controlled by UDCA through an anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptotic effect. The evidences showed in the study may be references for more in-depth *in vivo* and clinical studies for a candidate of anti-neurodegenerative therapy in the near future.

Keywords: ursodeoxycholic acid, reactive oxygens, anti-oxidant, microglia, Alzheimer's disease

서 론

노화는 누구에게나 도래하는 필연적인 과정이며 특히 신체의 노화가 진행되면서 뇌세포가 서서히 사멸하여 결국 돌이킬 수 없는 퇴행성 뇌신경 질환이 발생하게 되는데 이러한 질환은 환자 자신뿐 아니라 주변사람들에게도 큰 고통을 주는 하나의 사회적 질병으로 간주된다. 노화와 함께 뇌의 특정부분에서 빠르게 뇌세포가 사멸해가는 정확한 원인이나 병리기전은 확실치 않으나 대개 염증반응이나 활성산소 등이 주요한 원인으로 알려져 있다. 즉, 활성산소(oxygen free radicals)에 의해 조직세포의 지질, 단백질 및 DNA에 영향을 주어 산화적 스트레스의 결과로 과산화지질(lipid peroxide, LPO), 산화단백질(oxidized protein, OP) 등을 생성하면서 노화가 촉진되는 것으로 생각되며(1), 결과적으로 노화현상에 의해 조직세포에 대한 활성산소의 공격으로 체내 대사과정 중에 생성되는 활성산소가 알츠하이머질환과 같은 퇴행성 질환을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다(2-3). 더욱이 대표적인 노인성 뇌질환인 알츠하이머는 신경세포의 사멸에 의한 결과로 활

성산소의 산화적 스트레스에 의하여 뇌 조직에서 지질과산화의 증가, 단백질과 DNA 산화의 증가 및 신경세포 사멸에 의해 유발되는 것으로 알려져 있어(4-5) 세포보호 및 항산화 물질에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

웅담(熊膽)은 예로부터 청심(淸心)이라 하여 심장을 깨끗이 하여주고, 편간(便肝)이라 하여 간을 편안하게 해주며 명목(明目)이라 하여 눈을 맑게 해주는 귀한 약재로 널리 알려져 왔다. 이러한 웅담의 주요성분은 담즙산으로 웅담 특유의 ursodeoxycholic acid(UDCA), chenodeoxycholic acid(CDCA), deoxycholic acid(DCA), amino acid 및 미량의 금속원소 등으로 구성되어 있다(6). 이러한 웅담의 주요 활성성분으로서 UDCA는 주로 간기능, 간질환, 소화기계 및 피부질환의 치료와 예방에 효과적인 것으로 알려져 있으며(7-8), 해독, 진정, 이담, 항염 및 항산화 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(9-11). 특히 UDCA는 손상된 간에서 나타나는 담즙성 간 질환, 고빌리루빈혈증, 브롬셀파레인 배설 장애의 개선에 임상적 및 실험적으로 사용되는 친수성 담즙산이며 programmed cell death(apoptosis)로부터 세포를 보호하는 기전은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않은 상태이나 많은 연구에서 미토콘드리아의 cytochrome c 방출, caspase 활성화, 핵 내 효소 PARP의 분열 등을 포함하는 apoptosis 과정을 억제할 수 있다는 보고가 되고 있다(12). 본 연구에서 수행한 웅담 활성성분 UDCA는 세포보호효과 및 항산화효과로부터 활성산소에 의한 DNA, 단백질 및 지질 등을 손상하여 노화현상과 함께 유발되는 퇴행성

*Corresponding author: Do-Ik Lee, College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Tel/Fax: 82-2-820-5608

E-mail: leedi@cau.ac.kr

Received December 21, 2006; accepted May 15, 2006

뇌질환을 조절할 수 있는 잠재적 효능을 가지는 것으로 생각된다. 특히 알츠하이머형 치매는 전체 치매 중 65% 이상을 차지하는 중요한 노인성질환이며 이러한 알츠하이머를 유발하는 것으로 알려진 베타 아밀로이드(β -amyloid) 펩타이드 및 amyloid plaque(senile plaque)에 의한 자극 및 스트레스로부터 생성되는 염증물질, 활성산소 등을 억제하는 신물질 개발이 중요하며(13), 특히 본 연구에서 사용된 microglia는 알츠하이머질환과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 베타 아밀로이드 펩타이드의 자극에 의한 microglia의 활성화로부터 염증유발물질이 유출되고 이러한 염증반응에 의한 ROI(reactive oxygen intermediates)가 생성되어 신경세포의 기능 손실 및 세포사가 진행되도록 하는 민감한 면역세포이다(13-16). 따라서 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머를 예방하기 위해 베타 아밀로이드에 의한 microglia의 활성을 억제하고 염증반응과 수반하는 활성산소에 의한 세포사를 제어할 때 새로운 개념의 치료요법이 가능할 것이다. UDCA에 의한 항산화효과 및 세포보호효과와 함께 본 연구에 앞서 수행한 UDCA의 항염효과(17-18)를 토대로 하였을 때 UDCA는 염증억제, 항산화효과와 더불어 항세포사효과를 가져 퇴행성 뇌질환을 조절할 수 있는 잠재성을 가지는 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 치매의 예방 및 치료물질 개발의 기초적 자료로서 UDCA에 의한 세포보호 및 항산화효과를 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법

UDCA(Sigma, MO, USA), LPS(lipopolysaccharide) (Sigma, MO, USA) 원액은 마이크로필터(0.2 μ m)를 통과한 배지에 녹여 준비했고, UDCA는 실험농도로서 2.5, 5, 7.5, 10 μ g/mL(in 0.1% DMSO), LPS는 5 μ g/mL의 농도가 되도록 했다. 이 원액들은 이후의 사용을 위해 -20°C에서 보관하거나 세포 배양 실험을 위해 1~5% FBS α MEM 배지에 직접 희석했다. 본 실험에서 사용된 BV-2 cell line은 primary microglial cell에 v-raf/v-myc oncogen을 감염시켜 만들어진 세포주이며 형태, 표현형 및 기능적 특성이 primary microglial cell과 같다. 동결된 BV-2 세포를 해동하여 10% FBS α MEM(Cellgro, VA, USA) 배지에서 3일 동안 배양하고 5% FBS α MEM 배지로 교체 후 4일 동안 배양하였다. 1% 이하의 FBS는 BV-2 세포의 활성화에 영향을 주지 않으므로, 모든 실험에서는 1% FBS α MEM 배지에서 안정화시킨 BV-2 세포를 *in vitro* 모델로 사용하였다.

MTT 측정

MTT assay는 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 형성된 formazan의 양으로 세포의 생존율을 측정하는 방법이다(19). 각 군 별로 적절한 약물이 처리된 세포가 존재하는 96 well plate에 MTT(5 mg/mL in PBS)를 10 μ g/mL 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양하고, 이 때 형성된 dark blue crystal을 10% SDS(in 0.01 N HCl)로 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DAPI 염색

DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindole) staining은 세포의 핵 내 chromosome을 염색하여 형광 현미경 하에서 관찰하는 방법으로 정상적인 세포에서는 원형의 온전한 핵 모양이 관찰되는 반면 손상된 세포에서는 핵의 condensation 및 fragmentation이 관찰된다. Stock solution 으로서 DAPI 2 μ g/mL을 distilled water에 용해한 후 -20°C에서 보관하였다. 염색 시 세포가 분주된 chamber slide에 각 군 별로 적절한 약물을 처리하고 배양한 후 stock solution

을 1X PBS에 1 : 500(4 μ g/mL in PBS)로 희석하여 암실환경에서 약 5분간 염색하였다. 염색 종료 후 1X PBS로 5분간 2회 세척한 뒤 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

금속이온촉매 산화효과(BSA 분해)

BSA(bovine serum albumin) 분해는 reactive oxygen species (ROS)에 의한 손상으로부터 단백질이나 효소를 보호하는 항산화물질의 효과를 금속이온촉매반응을 이용해 확인하는 방법이다(20-21). Target protein으로서 BSA를 0.5 μ g/mL 농도가 되도록 하고 Cu^{2+} (100 μ M), H_2O_2 (2.5 mM)을 첨가하여 각 농도별 UDCA와 함께 방치한 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기 영동하여 BSA protein의 degradation 저해정도를 확인하였다. 양성대조군으로서 항산화 효과가 우수한 ascorbic acid(0.25 μ g/mL)를 사용하였다.

통계처리

결과분석은 GraphPad Prizm 4 software를 이용하여 $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의성(t-test)이 있음을 인정하였고, gel electrophoresis는 UVIDocMW program을 통해 band intensity의 상대비교 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 응답 활성성분인 UDCA를 각 농도별(2.5, 5, 7.5 10 μ g/mL)로 안정화 상태의 microglial cell line에 전 처리하여 UDCA의 세포보호 및 항산화효과를 관찰하였으며 정상대조군으로서 비처리 영양배지군, 양성대조군으로서 LPS 5 μ g/mL 또는 SNAP(NO donor) 0.2~1 mM을 사용하여 실험을 하였다. UDCA의 세포보호효과 검색을 위해 cell viability, MTT 및 DAPI assay를 실시하였으며 항산화효과를 위해 BSA degradation assay를 수행하였다.

UDCA의 세포보호 효과

세포활성(cell viability): UDCA의 세포보호효과를 검색하기 위해 외부자극인자로서 LPS를 처리한 세포군과 UDCA를 처리한 세포군간(24 hr) cell viability를 현미경하에서 관찰하였다(Fig. 1). MTT assay 결과로부터 UDCA 7.5 μ g/mL에서 우수한 세포보호효과를 가지는 것으로 나타나 cell viability 실험에서 같은 농도를 적용하였다. Microglial cell은 resting과 activation 상태의 형태학적 변화가 쉽게 일어나므로 외부자극물질에 의한 cell activation을 원활히 관찰할 수 있었으며 Fig. 1A(C)에서 보이는 바와 같이 UDCA에 의한 세포활성도는 정상군보다도 우수한 것으로 관찰되었다. 반면 LPS군에서는 cell activation에 따른 점진적인 세포사가 일어나고 있는 것으로 관찰되었고, 특히 MTT 실험결과 nitric oxide donor로서 사용되는 0.2 mM SNAP(S-nitroso-N-acetylpenicillamine)과 UDCA를 동시에 투여하였을 때 NO에 의한 cell damage를 차단하였다. 본 실험에 적용된 농도 중(2.5~10 μ g/mL) UDCA 7.5 μ g/mL 이상의 농도에서 정상군과 유사한 cell viability 결과를 나타내어(Fig. 2) UDCA에 의한 세포보호효과를 예측할 수 있었다.

항 세포사(anti-apoptosis): 선행의 세포보호효과와 결과는 DNA와 결합하여 nuclear status를 보여주는 DAPI 염색으로부터 확인하였다. 즉, 고농도의 SNAP(1 mM) 처리로 cell damage를 유도하여 DNA의 fragmentation을 형광현미경하에서 관찰함으로써 UDCA의 항 세포사(anti-apoptosis) 효과를 관찰하였다. Fig. 3에서 보이

A. Cytoprotective effect (UDCA)

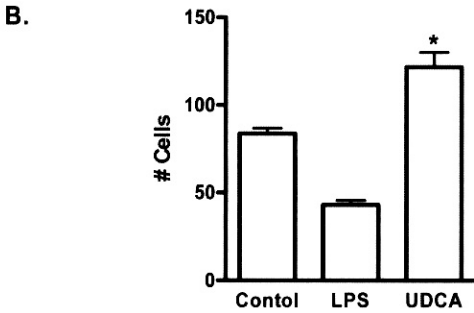
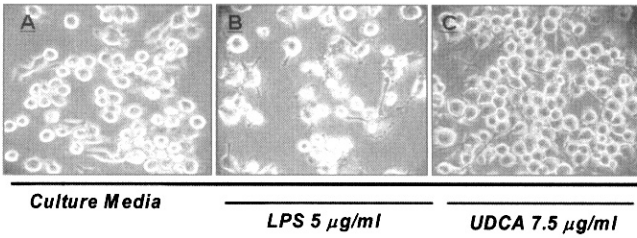


Fig. 1. Cytoprotective effect. Microglial cells (BV-2) were plated on the chamber slide in 5% FBS αMEM and incubated for 24 hr at 37°C in a 5% CO₂ environment. Cells were treated with 5 µg/mL lipopolysaccharide, 7.5 µg/mL UDCA. Cell morphology was compared with non-treated normal culture under phase contrast microscopy at × 100 magnification (A) and the cells were counted and quantified (B). **p* < 0.05 vs. control.

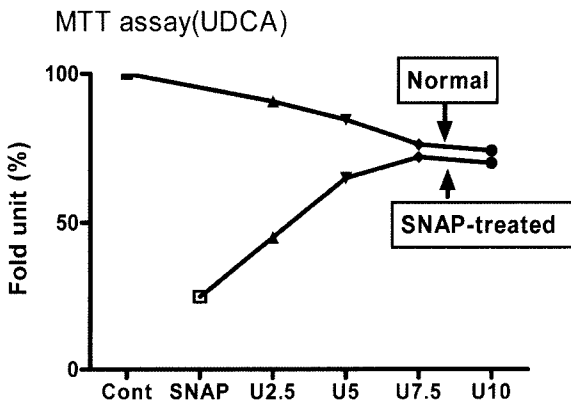


Fig. 2. Cell viability assay (MTT assay). BV-2 cells were prepared in 96-well plate and incubated in 1% FBS αMEM for 24 hr at 37°C in a 5% CO₂. Cell damages were induced by adding SNAP (0.2 mM) to UDCA-treated wells. SNAP-UDCA co-treated cells were compared with non-treated normal cells. Cont: control, SNAP: S-nitroso-N-acetylpenicillamine, U: UDCA. Data are presented as mean ± SD arbitrary units (n = 3).

는 것과 같이 SNAP 단독처리 시 cell damage에 의한 apoptosis가 일어나고 있는 반면(Fig. 3B) UDCA 처리 시 SNAP에 의한 cell damage가 차단되어 정상군과 유사한 nuclear status를 보여주었다(Fig. 3C). 이는 MTT결과와 일치하는 결과로서 UDCA가 microglial cell에 대한 anti-apoptosis효과가 있음을 확인할 수 있었다.

UDCA의 항산화 효과

세포내에서 생성되는 활성산소의 하나인 과산화수소(H₂O₂)에 의한 BSA degradation을 검색하는 방법으로 UDCA에 의한 BSA

Anti-apoptotic effect

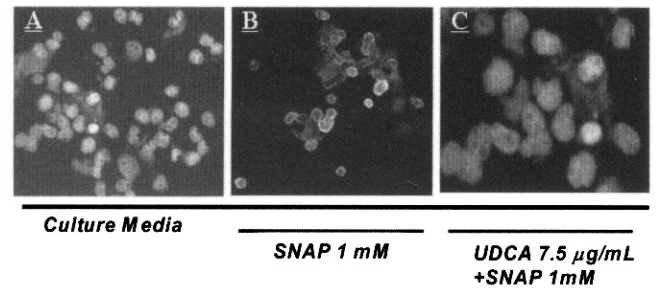


Fig. 3. Chromatinal changes of microglial cells (DAPI staining). Anti-apoptotic effect of UDCA was investigated in DAPI staining. The BV-2 cells were treated with 1mM SNAP (B) or 1 mM SNAP + 7.5 µg/mL UDCA (C) in serum free media. The cells then were incubated for 6 hr at 37°C in a 5% CO₂. After incubation, the cells were observed under fluorescent microscope at × 100 or × 200 magnification by comparing the DNA fragmentation of cells presented in the untreated normal cells (A). Fields used for comparison were selected at random throughout the chamber slides and focused using contrast optics before viewing the fluorescence.

A. BSA degradation

H ₂ O ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ascorbic acid	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
UDCA (µg/mL)	-	-	-	-	0.5	1	5	10	50	100
Gel separation										

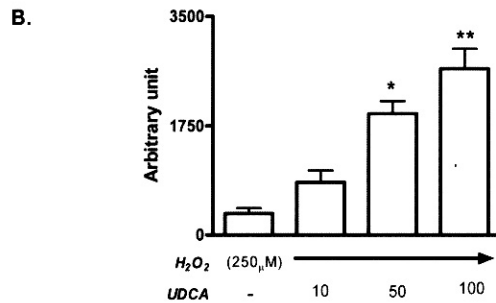


Fig. 4. Anti-oxidant effect. PAGE profiles of the BSA protein showed the anti-oxidant potency of UDCA. Gels electrophoresis of a representative experiment of BSA showed the protein bands obtained from without treatment, with the Cu²⁺/H₂O₂ and various concentrations (0.5-100 µg/mL) indicated for the potential antioxidant UDCA, or ascorbate. DMSO was used for a vehicle control which was a solvent for UDCA (A). The band intensity was analyzed by a gel documentation system, UVIDocMw. (B). Data are presented as mean ± SD arbitrary units (n = 3). **p* < 0.05, ***p* < 0.01, vs. H₂O₂ single group.

degradation 저해능을 관찰하여 UDCA의 간접적인 항산화효과를 측정하고자 하였다. 특히, 이러한 ROS(reactive oxygen species)는 DNA 손상, 지질 과산화, 단백질의 산화적 변성을 초래하여 노화 및 여러 질병에 관여하므로 최근 비타민C(ascorbic acid)와 같은 항산화 물질에 대한 관심이 증가되고 있어(22) UDCA가 이에 견줄만한 효과를 보이는 경우 노화예방 및 이로 인한 신경세포를 보호하여 결국 퇴행성뇌질환으로의 진전을 차단할 것으로 판단된다. Fig. 4에서 UDCA에 의한 BSA degradation 저해는 농도

의존적으로 나타났으며 100 µg/mL 이상에서 ascorbic acid와 유사한 효과를 보였다. H₂O₂ 비처리 정상군과 비교시 항산화효과를 나타내는 ED₅₀은 50 µg/mL에서 관찰되었으며 10 µg/mL 주변의 농도에서도 항산화효과가 있음을 알 수 있었다.

요 약

퇴행성뇌질환인 치매의 정확한 원인은 아직 불분명하나 빠른 뇌세포사멸이 주요한 원인으로 알려져 있다. 특히, 알츠하이머형 치매는 다량 생성되는 활성산소에 의한 뇌세포사멸이 주요원인인 것으로 입증되고 있다. 따라서 본 연구에서는 응담활성성분인 UDCA의 세포보호 및 항산화효과로부터 알츠하이머형 치매와 같은 퇴행성 뇌질환억제 또는 치료물질로서의 가능성을 입증하고자 하였고 뇌의 대식세포인 소교세포(microglia)를 cell model로 하였다. MTT 실험결과 UDCA에 의한 세포보호효과는 7.5 µg/mL 주변 농도에서 관찰되었고 NO에 의한 세포손상 유도억제효과를 확인하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 형광현미경하에서 보다 명확히 관찰되어(Fig. 3) 결국 UDCA에 의한 항세포사멸효과가 있음을 알 수 있었다. UDCA의 항산화효과는 활성산소인 H₂O₂의 단백질 분해 저해능을 관찰하는 금속이온촉매 산화효과를 통해 확인하였다(Fig. 4). 즉, UDCA는 농도의존적으로(1~100 µg/mL) 단백질 분해억제능을 보였으며 100 µg/mL 이상의 농도에서 양성대조군인 ascorbic acid와 유사한 억제효과를 나타냈다. 이와 같은 UDCA의 항산화효과는 10 µg/mL 전후에서 관찰되어 세포보호효과를 나타내는 농도(7.5 µg/mL)와 큰 차이가 없는 것으로 사료되었고 따라서 UDCA의 농도범주는 일괄적 적용이 가능할 것으로 판단된다. 결론적으로 응담활성성분인 UDCA는 일반적으로 사용하였던 간질환 및 소화계질환의 보조요법의 개념을 벗어나 항염 및 항산화효과에 잠재능을 가지며 나아가 뇌신경세포를 보호하고 세포사를 차단하여 알츠하이머와 같은 퇴행성뇌질환 조절 후보물질로 적용이 가능할 것으로 판단되나 보다 심도 있는 *in vivo* 및 임상적 차원의 연구가 요구된다.

문 헌

- Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human. *Mayo Clin. Proc.* 63: 390-408 (1988)
- Hu F, LU R, Ming L. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected chinese medical plants. *Fitoterapia* 75: 14-23 (2004)
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 626-632 (2001)
- Montine TJ, Diana NM, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 620-626 (2002)
- Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging: Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 23: 759-807 (2002)
- Yamaguchi S, Qian ZZ, Nohara T. Bile acids of Fel Ursi. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46: 1653-1655 (1998)
- Zhang HY, Chen YD, Zhuang, G.L. Pharmacological action of bear bile extract in mice. *Chinese Trad. Herb. Drugs* 27: 10-12 (1996)
- Jin ZG, Zhang TY, Liang WB, Liang CG. Effects of bear bile injection on blood lipid. *Chinese Trad. Herb. Drugs* 28: 4-5 (1997)
- Kavamura T, Koiaumi F, Ishimori A. Effect of ursodeoxycholic acid on water immersion restraint stress ulcer of rats. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 86: 2373-2378 (1989)
- Cho TS, Lee SM, Yeom JH, Yu EJ, Lim SW, Jang BS, Kim YH, Yu YM, Park MH. Anti-stress effects of ursodeoxycholic acid on the restraint stress in rats. *Yakhak Hoeji* 39: 548-553 (1995)
- Cho TS, Lee JC, Cho SI, Lee SM. A study on anti-stress activities of cholic acid derivatives. *J. Appl. Pharmacol.* 6: 232-241 (1998)
- Rodrigues CM, Ma X, Linehan-Stieers C, Fan G, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid prevents cytochrome c release in apoptosis by inhibiting mitochondrial membrane depolarization and channel formation. *Cell Death Differ.* 6: 842-854 (1999)
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81: 741-766 (2001)
- Petrova TV, Akama KT, Van Eldik LJ. Selective modulation of BV-2 microglial activation by prostaglandin E(2). Differential effects on endotoxin-stimulated cytokine induction. *J. Biol. Chem.* 274: 28823-28827 (1999)
- Kim WK, Jang PG, Woo MS, Han IO, Piao HZ, Lee K, Lee H, Joh TH, Kim HS. A new anti-inflammatory agent KL-1037 represses proinflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in activated microglia. *Neuropharmacology* 47: 243-252 (2004)
- Min KJ, Pyo HK, Yang MS, Ji KA, Jou I, Joe EH. Gangliosides activate microglia via protein kinase C and NADPH oxidase. *Glia* 1548: 197-206 (2004)
- Joo SS, Won TJ, Lee DI. Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Arch. Pharm. Res.* 27: 954-960 (2004)
- Joo SS, Won TJ, Hwang KW, Lee DI. Inhibition of iNOS expression via ursodeoxycholic acid in murine microglial cells, BV-2 cell line. *Immune Network* 5: 45-49 (2005)
- Stevens MG and Oslen SC. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitative bovine neutrophil bactericidal activity. *J. Immunol. Meth.* 157: 225-231 (2001)
- Kocha T, Yamaguchi M, Ohtaki H, Fukuda T, Aoyagi T. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochem. Biophys. Acta.* 1337: 319-326 (1997)
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Natarajan M, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochem. Biophys. Acta.* 1620: 139-150 (2003)
- Kim YS, Han JA, Cheong TB, Ryu JC, Kim JC. Protective effect of heat shock protein 70 against oxidative stresses in human corneal fibroblasts. *J. Korean Med. Sci.* 194: 591-597 (2004)