

약용곤충 무당벌레류 추출물의 항산화활성과 Cyclooxygenase-2 Promoter 억제활성 비교

허진철 · 박자영 · 황재삼¹ · 박해철¹ · 강석우¹ · 황석조¹ · 윤치영² · 권택규³ · 이상한[†]
경북대학교 식품공학과, ¹농업과학기술원, ²대전대학교, ³계명대학교 의과대학

Comparison of *In Vitro* Antioxidant Activity and Cyclooxygenase-2 Promoter Inhibitory Activity in *Harmonia axyridis* Pallas and *Coccinella septempunctata* Linné

Jin-Chul Heo, Ja-Young Park, Jae-Sam Hwang¹, Hae-Cheol Park¹, Seok-Woo Kang¹, Seok-Jo Hwang¹, Chi-Young Yun², Taeg-Kyu Kwon³ and Sang-Han Lee[†]

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

²Department of Biology, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

³Department of Immunology, Keimyung University, Daegu 700-712, Korea

Abstract

Insect resources have been widely recognized that several millions of insects exhibit its own biological activity by whole body or its metabolic intermediates. In order to investigate antioxidant activity and compare the cyclooxygenase-2 promoter activity from insect extracts, we tested *in vitro* antioxidant assays and cyclooxygenase-2 promoter assay in *Coccinella septempunctata* Linné and *Harmonia axyridis* Pallas, for possible medicinal food biomaterials. To determine whether *Coccinella septempunctata* Linné and *Harmonia axyridis* extracts have the anti-oxidant and cyclooxygenase-2 inhibition activities, we examined the anti-oxidant assays including DPPH, FRAP and linoleic acid, and, inhibition of cyclooxygenase-2 expression using a cyclooxygenase-2 promoter-inserted stable cell line. We found that *Harmonia axyridis* Pallas extract had potentials to anti-oxidant activity and inhibited about 25% of cyclooxygenase-2 transcription activity. These findings indicate that *Coccinella septempunctata* Linné and *Harmonia axyridis* Pallas extracts could be an useful insect resource for agrobiotechnological purposes.

Key words : *Harmonia axyridis* Pallas, *Coccinella septempunctata* Linné, anti-oxidant, Cyclooxygenase-2 promoter assay

서론

곤충은 지구상에서 가장 많은 종류의 종을 가지고 있으며, 뛰어난 환경 적응력으로 전 세계에 넓게 분포하고 있다. 이러한 다양성이 풍부한 곤충자원을 이용하려는 많은 시도가 있는데 이는 곤충을 유용한 생물자원으로 인식하고 활용하고자 하는데 있다. 이러한 곤충자원은 많은 분야에 응용

되고 있는데 유용물질 생산, 인간의 질병연구 수단, 생물소재 개발, 약용곤충으로 이용, 친환경 농업 등에 이용이 되고 있다 (1,2).

예로부터 곤충은 동양에서 약용/식용으로 많이 이용이 되었는데 고서의 기록에 의하면 동의보감(東醫寶鑑)은 약 95종의 약용곤충(藥用昆蟲)이,本草綱目拾遺(本草綱目拾遺)에는 106종의 약용곤충이 기록되어 있다. 대표적인 것으로는 식품으로 이용되는 곤충으로는 딱정벌레류(Coleoptera), 벼메뚜기(*Oxya velox*), 누에(*Bombyx mori*), 매미(Cicadidae), 꿀벌유충(*Apis indica*), 흰개미(Isoptera), 여치(Tettigoniidae),

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

풍뎅이(*Scarabaeidae*) 등이 있으며, 약용으로 이용되는 곤충으로는 동충하초(*Cordyceps sinensis*), 백강잠(*Batrachys bassiana*), 굼벵이(*Protaetia brevitarsis Seulensis*), 지렁이(*Oligochaeta*), 거머리(*Hirudo nipponica*), 지네(*Centipede*), 전갈(*Scorpion*), 거미(*Spider*) 등이 있다(3).

최근 생명공학기술의 발달은 곤충자원의 이용 가치를 다양화 시켜주고 있는데, 그중 주목받는 부분이 산업적으로 이용이다. 각종 유용물질을 생산하는 누에(실크, 누에가루, 동충하초), 꿀벌(꿀, 로얄제리, 프로폴리스) 곤충의 외골격(chitin의 추출) 등이 좋은 예라 할 수 있다. 또한 곤충의 추출물은 전통적인 생약으로 이용이 되었는데 최근 이에 대한 효능 및 유효성분 분석연구는 최근 많은 연구가 진행되고 있다. 이 외에도 곤충자원은 유용생물자원으로 현재 세계적으로 여러 분야에서 매우 광범위하게 개발, 활용되고 있다(4-8).

무당벌레(*Harmonia axyridis Pallas*)는 딱정벌레목(*Order Coleoptera*) 무당벌레과(*Family Coccinellidae*) 곤충으로 몸은 반구형으로 붉은색 혹은 주황색에 검은 점무늬가 있는 개체에서 검은 바탕에 주황색 얼룩무늬가 있는 것까지 다양하다. 같은 과에 속하는 칠성무당벌레(*Coccinella septempunctata Linné*)는 등에 7개의 검은 점을 가지는 특징이 있다. 이 두 종은 무당벌레과 중 우리나라에서 많은 개체를 가지는 종으로 알려져 있다(9,10).

이용적인 측면에서는 무당벌레는 농업에서 진딧물의 천적으로 이를 이용하여 농사를 짓는 방법이 있으나(11), 아직 무당벌레 자체를 이용한 약용 및 식용 관련 연구는 보고되어 있지 않다. 그 이유는 이들은 약용 및 식용으로 이용하기에 그 수요가 많지 않으며, 재료의 건조 상태에 따른 활성이 상이할 수 있고, 또 보존이나 보관도 상대적으로 어려운 것으로 판단된다. 그러나 번식 면에서 무당벌레는 사육하기가 쉬워 약용 및 식용으로 가치가 있을 때 산업적으로 활용하기가 매우 유효하다. 이에 본 연구는 생물학적으로 유용한 자원으로 무당벌레 추출물의 생물학적 활성 중 특히 항산화활성과 분지염증에 대표적인 분지표적인 Cyclooxygenase-2의 활성을 promoter assay system의 일종인 stable cell line에 의한 비교실험을 수행하였다.

재료 및 방법

무당벌레 추출 시료 조제

칠성무당벌레(*Coccinella septempunctata Linné*)는 2004년 9월 14일 충남 영동군 양산면 일대에서, 무당벌레(*Harmonia axyridis Pallas*)는 전북 무주군 설천면 일대에서 채집을 하였다. 채집에 관련된 전문 장비 및 분류는 대전대학교 곤충생리학교실의 주도로 수행 하였으며, 채집된 개체는 실험실로 운반 후 1달간 자연 건조시켰다. 그 후, 4가지

용매 즉 증류수(distilled water; DW), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethyl alcohol, methyl alcohol을 이용하여 24시간동안 추출과정을 거쳤으며, DW 추출물은 섭씨 60°C에서 열수 추출을 하였다. 추출 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 실험에 이용하였다(Fig. 1).

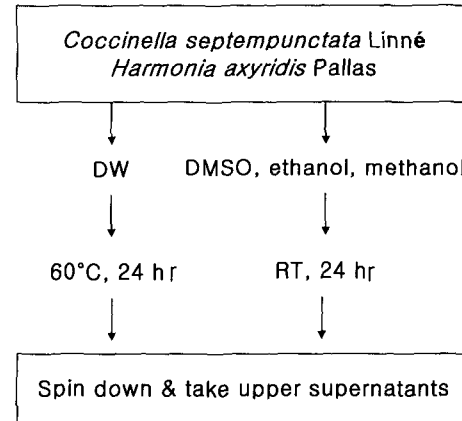


Fig. 1. A diagram of insect extract condition.

Diphenylpicrylhydrazyl assay

Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) assay는 radical 소거활성능 측정방법으로 매우 간단하면서도 강력한 측정 방법으로 많이 이용되어 진다. 각 추출물의 시료에 0.2 mM DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 1/20의 비율로 해서 실온에서 30분간 incubation한 후 517 nm (Victor3, PerkinElmer, Turku, Finland)에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 아래와 같이 계산하였다(12).

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (A : \text{Absorbance at O.D 517 nm})$$

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

경시적 시간에 따른 환원력을 알아보기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM FeCl₃·6H₂O를 10 : 1 : 1의 비율로 섞어 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액과 추출물을 1/20의 비율로 혼합한 후 2분 30초 간격으로 약 20여 분간 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

Linoleic acid의 산화 억제 활성

Linoleic acid의 산화 억제실험은 과산화지질을 기질로 하여 이를 억제하는 방법을 이용하였다. 과산화지질(Linoleic acid)에 의해 Fe^{II}가 Fe^{III}로 산화가 되고 이때 Fe^{III}의 반응물인 ammonium thiocyanate을 넣어 이를 ELISA reader

에서 정량하였다. 반응은 과산화 지질 (linoleic acid)에 의해 Fe^{II}가 Fe^{III}로 산화되게 되고 Fe^{III}는 ammonium thiocyanate와 반응해서 붉은색으로 변하게 되는데 이것을 490 nm에서 정량하였다. 시료 (10 µL)와 linoleic acid (100 µL)를 혼합한 다음, 50 mM sodium phosphate buffer (100 µl)를 넣고 40-60°C의 암소에서 반응시켰다. 반응물은 각각 시간별로 취하여 반응을 정지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다 (14).

Cox-2 promoter luciferase assay

Cox-2의 활성을 알아보기 위하여 유전자의 promoter 부분을 활용하였다. Promoter 부분을 luciferase activity를 확인할 수 있는 pGL3 (Promega) vector의 EcoRI과 Xho 1 site에 cloning한 후 glioma cell(U-118MG, ATCC, Manassas, VA)에 lipopectamine으로 transfection한 뒤, G418으로 serial dilution 하여 single cell만 나타나도록 single colony를 선별하였고, stable cell line으로 안정화시켰다. 이후 무당벌레와 칠성무당벌레의 추출물(10 µ/mL)을 넣은 다음 24시간 37°C 5% CO₂ incubator에서 배양을 하여, luciferase assay에 의하여 Victor3 (PerkinElmer)를 사용하여 활성을 확인 하였다 (15). Luciferase assay는 Promega 사의 Luciferase Assay System (E1500, Promega)을 사용하였다(15).

결과 및 고찰

생물산업은 최근 그 수와 규모가 폭발적으로 늘어가고 있다. 그중 곤충은 미래의 가장 유용한 생물자원의 하나로 식량, 약품, 산업 등에 많은 연구가 진행 되고 있다(16,17). 생물자원으로서의 곤충은 주로 천적, 화분 등에 주로 이용이 되어 왔지만 최근에는 곤충의 산업적 활용 측면이 강하게 부각되는데, 주로 이들이 만들어 내는 생리활성물질에 관심이 쏠리고 있다. 거미줄의 이용과 이들이 만들어내는 강력한 소화제의 연구는 그 대표적인 예로 들 수 있다(18). 이러한 이용 가능한 곤충자원의 활용이라는 측면에서 딱정벌레과의 하나인 무당벌레류를 이용하여 이들의 생물학적 활성을 항산화 및 염증과 관련하여 알아보려 하였다.

생물은 공기 중의 산소를 호흡하고 유기물을 산화시켜 에너지를 생산한다. 그 과정에 다량의 활성산소가 만들어 지게 되는데, 이 활성 산소는 많은 세포내 방어 관련 효소에 의하여 scavenging이 되나 일부는 세포내 DNA와 단백질에 손상을 입히게 된다. 이 과정에 세포는 SOD (superoxide dismutase)를 이용하여 활성산소를 제거하게 된다. 최근 들어 이러한 활성산소에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 이를 제거하기 위한 식/음료들도 일부 개발되어 있고 또 개발하려고 노력하고 있다. 대표적인 항산화제로는 vitamin C와 E가 알려져 있으며, 식/음료로의 첨가제로 많이 사용되

어 지고 있다(19,20,21). 본 실험은 곤충자원의 이용을 극대화하기 위하여 먼저 칠성무당벌레와 무당벌레의 추출물을 이용하여 항산화 실험을 실시하였다. DPPH, FRAP, linoleic acid 활성/억제 실험은 매우 간단하면서도 항산화와 관련되어 널리 알려진 실험이다.

DPPH를 이용한 활성 실험 결과, 무당벌레의 DW추출물에서 상대적으로 다른 용매 추출물에 비하여 높은 활성이 나타났으며, 칠성무당벌레와 무당벌레의 다른 군에서는 20% 이하로 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 2. a). 시간에 따른

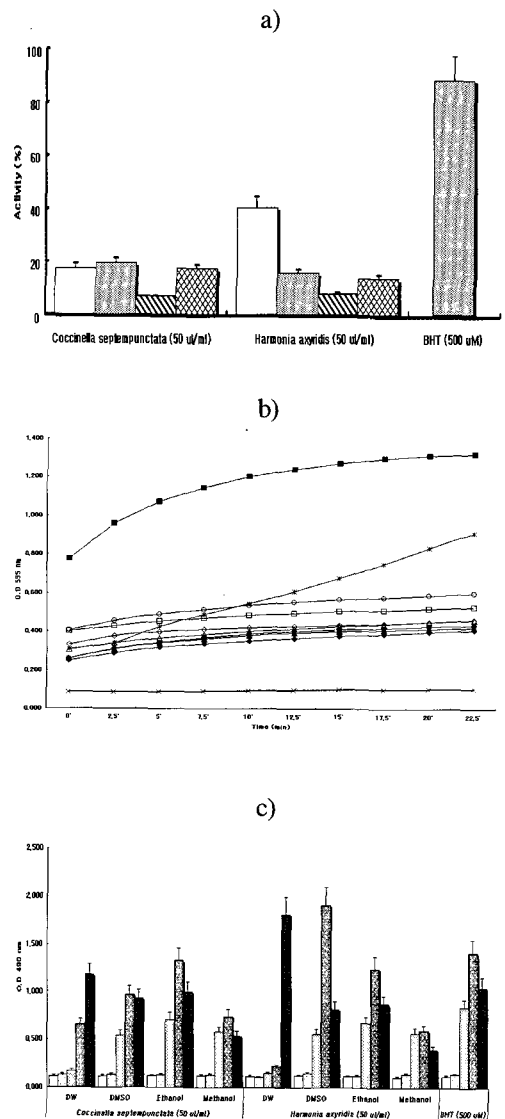


Fig. 2. Anti-oxidant assay with the extracts of *Coccinella septempunctata* Linné and of *Harmonia axyridis* Pallas.

- (a) DPPH radical scavenging activity for the extracts (DW, □; DMSO, ▢; Ethanol, ▣; Methanol, ▤).
- (b) Ferric ion reducing anti-oxidant power (FRAP) assay for the extracts, *Coccinella septempunctata* (DW, ▨; DMSO, ▩; Ethanol, ▴; Methanol, ▾), or *Harmonia axyridis* (DW, ▸; DMSO, ▹; Ethanol, ▴; Methanol, ▾) BHT (—*) and no treated (—x—).
- (c) Inhibition for Linoleic acid oxidation for the extract of *Coccinella septempunctata* (15 min, □; 5 hr, ▢; 17 hr, ▣; 26 hr, ▤; 42 hr, ▥).

활성의 정도를 FRAP assay로 확인해 보았다. 실험 결과 DPPH 활성과 마찬가지로 무당벌레의 DW추출물에서 높은 활성을 보였다. 무당벌레의 DW 추출물 이외의 추출물에서는 시간에 따른 활성정도가 positive control로 사용한 butylated hydroxytoluene (BHT)보다 상대적으로 낮았으나 specific activity는 BHT 보다 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. 다른 군에서는 시간에 따른 활성 정도가 조금씩 증가하는 것을 알 수 있었지만 그 활성 정도는 미미한 수준을 나타내었다(Fig. 2b). 이는 BHT가 매우 정제된 표준물질이나, 실험에 사용한 추출물의 경우는 다른 성분이 혼입되어 있어서 경시적인 FRAP assay에서 specific activity의 차이를 보인 것으로 추측된다. 따라서 항산화물질이 분리/정제되면 상당한 수준의 항산화능을 나타낼 수 있을 것으로 판단된다. Linoleic acid 산화 억제에 대한 활성의 경우, 시간에 따른 활성은 칠성무당벌레와 무당벌레의 DW 추출물을 제외하고 26시간을 기점으로 하여 42시간이 경과하여 산화가 줄어드는 것을 알 수 있었다. 칠성 무당벌레 추출물의 경우 시간에 따른 산화 속도의 차이는 있으나 methanol 추출물에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 무당벌레 추출물의 경우도 methanol 추출물에서 가장 좋은 활성을 나타내었다. 특히 DMSO 추출물의 경우 26시간 경과 후 산화물의 양이 매우 증가하는 것으로 나타나지만 42시간 경과후 상대적으로 큰 폭의 감소를 보이는 것으로 나타났다. 실험 군별 활성 정도가 가장 높게 나타난 군은 칠성무당벌레와 무당벌레의 methanol 추출물이었다(Fig. 2c).

산화물의 일종인 hydrogen peroxide (H_2O_2)는 매우 큰 확산성을 가지고 있으며, 거의 모든 신체 부분에 존재하는 물질이다. 또한 매우 빨리 합성이 되고, 빠르게 생체 내에서 여러 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이들은 세포의 신호전달과정 중 MAPK (mitogen activated protein kinase), EGF (epidermal growth factor) 등의 많은 부분에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(22,23). 또한 산화스트레스는 호흡기질환에서 염증현상을 일으키는 것으로 보고된 바 있다. 최근 늘어나는 대기오염 또한 산화스트레스의 요인이 되고 있다(24). 이런 맥락에서 항산화제의 개발은 이러한 일부의 퇴행성 질환에 대한 예비 활성을 보유할 수 있다는 중요한 의미를 가지며, 실제 이에 대한 연구는 활발히 진행 중이다.

산화스트레스에 의한 대표적인 질병의 하나인 천식 (asthma)에 있어서 염증은 매우 중요한 문제인데 최근 천식의 발병 원인중의 상당수는 대기오염에 의한 산화물(SOx, NOx)에 의해 발생한다고 한다. 본 연구는 칠성무당벌레와 무당벌레의 추출물을 이용하여 항산화 실험과 연관 지어 염증관련 분자 표적 유전자인 Cox-2의 promoter 영역의 활성억제를 비교하여 보았다. 면역질환의 경우 가장 널리 알려진 표적유전자 중의 하나인 Cox-2는 관절염(arthritis) 치료제의 중요한 타겟으로 알려져 있으며, 최근 위암과 관련

된 많은 연구결과가 보고되고 있다(25, 26, 27). Cox-2 억제제 또한 치료제로서 일부 기업에서 생산을 하고 있는 실정이다. 본 연구는 약용곤충을 이용하여 Cox-2의 활성 억제제를 스크리닝 하기 위하여 유전자의 promoter 부분을 이용하여 Cox-2의 transcription을 억제 할 수 있는지를 알아보았다. 실험 결과 칠성무당벌레와 무당벌레의 DW추출물과 DMSO추출물에서 약 25% 정도의 억제효과를 알 수 있었다(Fig. 3).

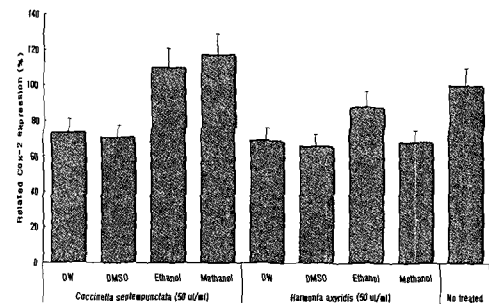


Fig. 3. Cox-2 promoter activity by the insect extracts.

Cells harboring pcDNA3.1-Cox-2 promoter legion(from -1432 to +52) were transfected with Lipofectamine reagent according to the manufacturer's instructions. A stable cell line is established by limited dilution method for stability of the cells. To assess the luciferase reporter activity, cell were collected and disrupted by sonication in lysis buffer. After centrifugation, aliquots of the supernatants were carried out for luciferase activity using the luciferase assay system (Promega, Madison, WI).

In vitro antioxidant assay 실험 결과 무당벌레의 DW추출물, Cox-2의 경우에 있어서는 DW추출물과 DMSO추출물에서 상대적으로 활성이 높게 나타났다. 특히 항산화 활성 중 FRAP assay 실험에서는 시간에 따른 지속적인 활성의 증가를 보여 준 무당벌레의 DW추출물의 경우는 분리정제에 상당한 어려움이 예상되지만, 이 부분은 앞으로 산업화 과정에서 매우 중요한 요인이 될 것으로 판단된다.

실험 결과 추출물의 용매에 따른 활성의 정도가 기복이 매우 심하게 나오는 것을 알 수 있었다. 이는 추출 용매의 물리/화학적 성질에 기인한다고 판단이 되어 진다. 실제 물과 같은 비유기성 용매의 경우 유기성용매에 녹는 물질을 추출하기가 쉽기 않다. 이런 경우 최초 유기성 용매를 이용한 다음 이를 제거한 후 다시 물을 이용하여 녹이거나 농축하여 사용을 하게 된다. 본 실험에서의 활성은 DW를 이용한 추출물에서 가장 좋은 활성을 볼 수 있었는데 이는 추후 이들 추출물의 산업적 이용시 이점으로 작용하는 한편 유용한 물질 분리에는 그만큼 어려움이 있을 것으로 사료된다. 흔히 약용으로 사용되는 곤충류는 보존이나 보관시 이들 약용성분의 변화가 예상된다. 따라서 서식지의 차이, 개체 차이, 계절적인 차이 등도 활성에 많은 차이를 나타내며 이러한 기초적인 결과도 생물활성과 유용성분의 분리정제에 많은 영향을 미치게 되리라 추측된다.

요 약

최근 곤충자원은 약용 및 식용으로 활용하려고 많은 연구가 되고 있으며 미래의 자원으로 발전할 수 있는 가능성은 충분하다. 본 연구는 곤충자원 중 칠성무당벌레와 무당벌레를 이용하여 생물학적 활성과 함께 약용 및 식용으로의 활용가능성을 알아보려고 하였다. 생물학적 활성을 알아보기 위하여 이들 추출물을 이용하여 항산화관련 실험인 DPPH, FRAP, linoleic acid 산화 억제실험을 하였으며, 분자염증에 관련된 유전자인 Cyclooxygenase-2(Cox-2)의 promoter의 유전자 발현의 억제 유무를 알아보았다. 항산화 효과에 있어서는 무당벌레의 DW추출물에서 높은 활성을 나타내었으며, Cox-2의 promoter 활성을 조사한 결과 DW추출물에서 Cox-2의 promoter 활성을 약 25% 정도 억제하는 무당벌레의 DW추출물을 발견하였는데 추출물의 산업적인 활용가능성을 확인하기 위하여 보다 많은 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20050301-034-474-116)의 지원에 의해 이루어진 것입니다. Cox-2 promoter assay는 농림부/농림기술관리센터 지정 포도연구사업단의 일부 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cudjoe, E., Wiederkehr, T.B. and Brindle, I.D. (2005) Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3- methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst.*, 130, 152-155
2. Sivagnaname, N., and Kalyanasundaram, M. (2004) Laboratory evaluation of methanolic extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against immature stages of mosquitoes and non-target organisms. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 99, 115-118
3. Wang, C. and St, Leger, RJ. (2005) Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Eukaryot. Cell.*, 4, 937-947
4. Li, N.G., Osakovskii, V.L. and Ivanova, S.S. (2003) Chemical composition and cryoprotective activity of ethanol extract from winter caterpillars *Aporia crataegi* L. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, 5, 547-552
5. Kurioka, A. and Yamazaki, M. (2002) Purification and identification of flavonoids from the yellow green cocoon shell (*Sasamayu*) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1396-1399
6. Nakatani, T., Konishi, T., Miyahara, K. and Noda, N. (2004) Three novel cantharidin-related compounds from the Chinese blister beetle, *Mylabris phalerata* Pall. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 807-9
7. Kou, J., Ni, Y., Li, N., Wang, J., Liu, L. and Jiang, ZH. (2005) Analgesic and anti-inflammatory activities of total extract and individual fractions of Chinese medicinal ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 176-180
8. Ma, Y., Wang, X., Zhao, Y., Kawabata, T. and Okada, S. (1997) Inhibitory effects of Chinese ant extract (CAE) on nephrotoxicity induced by ferric-nitritolriacetate (Fe-NTA) in Wistar rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 96, 169-178
9. Majerus, T.M., Graf. von. der. Schulenburg, J.H., Majerus, M.E. and Hurst, G.D. (1999) Molecular identification of a male-killing agent in the ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas) (*Coleoptera: Coccinellidae*). *Insect. Mol. Biol.*, 8, 551-555
10. Haubruge, E., Vanlerberghe-Masutti, F., Collignon, P. and Francis, F., (2002) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of *Coccinella septempunctata* in Belgium. *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.*, 67, 557-561
11. Raudonis, L., Surviliene, E. and Valiuskaite, A. (2004) Toxicity of pesticides to predatory mites and insects in apple-tree site under field conditions. *Environ. Toxicol.*, 19, 291-295
12. Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. and Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free. Radic. Res.*, 36, 177-187
13. Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 3396-3402
14. Mun'im, A., Negishi, O. and Ozawa, T. (2003) Antioxidative compounds from *Crotalaria sessiliflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 410-414
15. Spinella, F., Rosano, L., Di, Castro V., Nicotra, M.R., Natali, P.G. and Bagnato, A. (2004) Inhibition of

- cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clin. Cancer. Res.* 10, 4670-4679
16. Boggs, C.L. and Freeman, K.D. (2005) Larval food limitation in butterflies: effects on adult resource allocation and fitness. *Oecologia.*, 11, 1-9
 17. Botha, B.M. and McCrindle, C.M. (2000) An appropriate method for extracting the insect repellent citronellol from an indigenous plant (*Pelargonium graveolens* L'Her) for potential use by resource-limited animal owners. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 71, 103-105
 18. Craig, C.L. (2004) Broad patterns of speciation are correlated with the evolution of new silk proteins in spiders but not in the lepidoptera. *Biomacromolecules.*, 5, 739-743
 19. Jaxa-Chamiec, T., Bednarz, B., Drozdowska, D., Gessek, J., Gniot, J., Janik, K., Kawka-Urbaneck, T., Maciejewski, P., Ogorek, M., Szpajer, M., and MIVIT Trial Group. (2005) Antioxidant effects of combined vitamins C and E in acute myocardial infarction. The randomized, double-blind, placebo controlled, multicenter pilot Myocardial Infarction and VITamins (MIVIT) trial. *Kardiol. Pol.*, 62, 344-350
 20. Misso, N.L., Brooks-Wildhaber, J., Ray, S., Vally, H. and Thompson, P.J. (2005) Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. *Eur. Respir. J.*, 26, 257-264
 21. El-Demerdash, F.M., Yousef, M.I. and Zoheir, M.A. (2005) Stannous chloride induces alterations in enzyme activities, lipid peroxidation and histopathology in male rabbit: Antioxidant role of vitamin C. *Food, Chem, Toxicol.*, 43, 1743-1752
 22. Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Baines, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 272, 217-221
 23. Han, H J., Lee, Y J., Park, J Y., Kim, E J., Lee, J H. and Taub, M L. (2005) Effect of EGF on H₂O₂-induced inhibition of alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of MAPK and AA release. *J. Cell. Physiol.*, 20, 217-225
 24. MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207
 25. Shafiq, N., Malhotra, S., Pandhi, P. and Nada, R. (2005) Comparative gastrointestinal toxicity of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. *Indian. J. Exp. Biol.*, 43, 614-619
 26. Biswas, P.S., Banerjee, K., Kim, B., Kinchington, P.R. and Rouse, B.T. (2005) Role of inflammatory cytokine-induced cyclooxygenase 2 in the ocular immunopathologic disease herpetic stromal keratitis. *J. Virol.*, 79, 10589-10600
 27. Luth, P., Herold, M. and Mur, E. (2005) The medical reason for the prescription of COX-2 selective cyclooxygenase inhibitor rofecoxib for the treatment of rheumatoid arthritis. *Wien. Med. Wochenschr.*, 155, 211-216

(접수 2006년 4월 7일, 채택 2006년 7월 21일)