

# 배양섬유모세포에서 산소유리기의 세포독성에 대한 진피의 항산화효과에 관한 연구

오용열<sup>#\*</sup>

원광대학교 의과대학 산본병원

## Effect of Antioxidant of Citri Reticulatae Pericarpium on Cytotoxicity of Oxygen Free Radicals in Cultured NIH3T3 Fibroblast

Yong-Leol Oh<sup>#\*</sup>

Sanbon Medical Center, Wonkwang University,  
Gyeonggido, Gunpo, 435-040, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : It is demonstrated that oxygen free radicals have cytotoxic effect on NIH3T3 fibroblast cells. Recently, many of herb extracts have an effect of antioxidant in oxygen free radical-induced cytotoxicity. But, the toxic mechanism of oxygen free radical is left unknown. The purpose of this study was to examine the cytotoxicity of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and antioxidant effect of Citri reticulatae pericarpium (CRP) on NIH3T3 fibroblasts.

**Methods** : The cytotoxicity was measured by cell viability by XTT assay in NIH3T3 fibroblasts. XTT assay is regarded as a very sensitive screening method for the determination of the cell viability on various chemicals.

**Results** : In this study,  $H_2O_2$  decreased cell viability according to the dose- and time dependent manners after NIH3T3 fibroblasts were treated with various concentrations of  $H_2O_2$  for 4 hours. And also, CRP showed the effect of antioxidant on  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts.

**Conclusion** : These results suggest that  $H_2O_2$  has highly cytotoxic effect on cultured NIH3T3 fibroblasts by the decrease of cell viability, and the herb extract such as CRP was showed the effect of antioxidant on  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity in these cultures.

**Key words** : Oxygen free radicals, Hydrogen peroxide, Citri reticulatae pericarpium

## 서론

산소유리기는 뇌졸중을 비롯한 고혈압, 당뇨병 및 치매와 같은 난치성 질환의 병인으로 잘 알려져 있다<sup>1)</sup>. 특히, 산소유리기는 이의 산화적 손상에 의하여 세포의 퇴화나 세포고사를 초래하며 이로 인해 인체에 각종 질환을 유발하는 병인으로 작용하고 있다<sup>2)</sup>. 산소유리기는 인체의 정상적인 대사과정에서 소량 생성되어지나 이는 인체내에 위치하고 있는 항산화계에 의하여 물로 변환됨으로서 인체에는 아무런 영향을 주지 않는다<sup>3)</sup>. 그러나 병적상태에서 항산화계가 손상될 경우 미처 처리되지 못한 과잉의 산소유리기는 세포에 손상을 줌으로서 병변을 유발하게 된다<sup>4)</sup>. 산소유리기는 해마와 산소유리기의 연구에서 신경세포로 하여금 흥분성 아미노산을 분비함으로서 세포의 칼슘 채널에 이상을 초래한다고 보고된 바 있다<sup>5)</sup>. 즉, 산소유리기는 흥분성 아미노산의 분비유도를 통하여 세포 표면에 위치하고 있는 글루탐산 (glutamic acid)의 수용체를 자극하여 과활성화 시킴으로서 세포내 칼슘유입을 촉진시키며 그 결과 세포는 칼슘항상성이 파괴됨으로서 세포의 고사를 초래하게 된다<sup>1,6)</sup>. 더욱이 산소유리기는 세포막을 구성하고 있는 지질성분을 과산화시킴으로서 세포막의 손상을 초래할 뿐만 아니라 나아가서 세포내의 여러 소기관이나 효소활성에 영향을 미침으로서 결국 세포의 퇴화를 유발하게 된다<sup>7)</sup>. 그 밖에도 산소유리기는 phospholipase A2의 활성과 nitric oxide (NO)와 결합하여 독성이 매우 강한 peroxynitrate라는 물질을 생성함으로서 가속적으로 세포손상을 유도하기도 한다<sup>2,8)</sup>. 특히, 산소유리기는 세포내에 존재하는 항산화계에 손상을 줌으로서 항산화효소의 활성저하나 효소의 사멸을 초래하기도 한다<sup>9)</sup>. 이 결과 처리되지 못한 산소유리기는 세포를 손상시켜 병변을 유발하게 된다<sup>10)</sup>. 이와같은 예의 하나로 근위축성측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)이 있는데 이는 환자의 뇌속에 superoxide dismutase (SOD) gene-1이 돌연변이 된 결과 SOD의 활동저하로 환자의 뇌속에 산소유리기가 축적되는 결과이다<sup>11,15)</sup>. 따라서 이와같은 병변의 치료에는 항산화제나 또는 산소유리기제거제와 같은 약제를 투여함으로써 치료적 접근을 시도하고 있다<sup>9,12)</sup>. 그러나 이들의 효능에도 한계가 있어 이보다 효능이 더욱 높은 신약 개발이 필수적이지 아닐수 없다<sup>13)</sup>. 최근에 인삼이나 홍삼과 같은 한약추출물이나 각종 동식물의 천연추출물 등에 항암이나 항산화효과가 높은 물질들이 들어 있다는 보고들이 되어지고 있다<sup>14,15)</sup>. 특히, 한약추출물에

는 항산화효과가 뛰어난 성분들이 들어 있어 이들의 추출에 많은 관심이 쏠려 있다<sup>16)</sup>. 진피는 운향과에 속하는 귤나무의 성숙과일의 건조과피로서 오래전부터 한약재로 널리 사용되어 왔다<sup>17)</sup>. 즉, 껍은 맛은 쓰고 매우나 성은 온하다. 옛부터 진피는 진해거담을 비롯하여 구풍이나 소화불량, 조습 및 식욕부진등의 처방으로 사용되어 왔다<sup>14,17)</sup>. 더욱이 진피에는 심혈관 확장작용이 있어 심혈관 수축으로 인한 심질환은 물론 항염 및 항궤양작용이 강하여 염증으로 인한 각종 질환의 치료에도 사용되어 왔다<sup>16)</sup>. 그러나 진피의 항산화작용에 대한 연구는 아직 많이 이루어져 있지 않으며 이에 대한 기전도 자세히 밝혀져 있지 않은 실정이다<sup>13,15)</sup>. 근래에 세포배양에 대한 기술이 널리 알려지면서 각종 배양세포를 이용해 실험목적에 맞는 병변의 모델이나 또는 신약제에 대한 효능분석은 물론 한약재의 추출물이나 이들의 성분내에 대한 약리활성을 정량적으로 분석할 수 있는 실험적 도구로 널리 적용되고 있다<sup>18)</sup>. 배양된 세포는 생체실험에 비하여 동물의 도살없이 실험재료를 구할수 있을뿐만 아니라 배양시 실험에 필요한 충분한 양의 실험적 재료를 손쉽게 구할수 있다는 장점이 있다. 더욱이 생체에 비하여 약물흡수에 대한 방어기전이 없어 소량의 약물효과와 정량적 분석도 가능하다는 잇점도 있다<sup>18)</sup>. 최근에는 배양세포를 이용하여 독성물질이나 화학약제에 대한 독성효과는 물론이며 일부 세포를 배양하여 병변치료의 재료로 사용하기도 한다. 특히, 줄기세포 역시 세포배양기술에 의한 세포분화에 관한 영역의 한 분야이다. 본 연구는 진피의 항산화효과를 알아보기 위하여 배양된 섬유모세포에 여러 농도의 산소유리기를 처리한 후 이의 독성효과를 조사하였으며 또한 진피가 산소유리기에 미치는 영향을 세포생존을 측면에서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약제 제조

본 실험에 사용한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Co.)는 각각 1 M, 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2) 약재 추출

한약재와 증류수를 환저플라스크에 넣고 여기에 냉각장치를 부착한 후 2 시간 동안 전열기로 진탕하였다. 진탕완료후 3,000 rpm에서 20 분 동안 원심분리하였으며 진공 농축기로 감압하여 농축한 후 동결건조기에서 24 시간 동안 동결건조 하였다. 동결건조 후 이를 건조시켜 분말시료를 얻었다.

2. 실험방법

1) 세포배양

배양용기에 단단히 부착된 NIH3T3 섬유모세포의 분리는 효소해리술에 의하여 행하였다. 세포는 혈구계산기를 이용하여 배양액에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 5 일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 실험군과 비교 조사하였다.

2) 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 처리

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 배양 NIH3T3 섬유모세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10 μM에서 50 μM 까지의 농도로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 각각 포함된 배양액에서 NIH3T3 섬유모세포를 4 시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

3) 진피 (Citri reticulatae pericarpium, CRP)의 처리

배양이 완료된 NIH3T3 섬유모세포에 CRP가 100~300 ug/ml로 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처리한 다음 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 배양액에서 4 시간 동안 처리한 후 이의 영향을 XTT assay에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

4) XTT 정량

PBS (phosphate buffered saline)에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 μl씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켰다. 건조 완료후 PBS로 3 회 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin,

Sigma Co.)를 각 well당 200 μl씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두 세 번 세척하였다. 배양된 NIH3T3 섬유모세포를  $5 \times 10^5$  cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각의 농도를 처리하여 4 시간 동안 배양한 다음 PBS로 3 회 세척하였다. 세척 완료후 XTT와 혼합후 각 배양용기에 200 l씩을 주입하여 4 시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

3. 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포생존율 정량

1) 농도에 따른 세포생존율

NIH3T3 섬유모세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 1~30 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 4 시간 동안 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군인 100% (5.06±0.48) 비하여 94.3% (4.77±0.36)로 나타났으며 15 μM의 처리에서는 86.6% (4.38±0.41)로 나타났다. 또한 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포생존율이 48.0% (2.43±0.15)로 나타났다. 특히, 30 μM 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (p<0.05) (Table 1).

Table 1. The cell viability of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Concentration of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)	Group	
	Mean±SD	(% of control)
control	5.06±0.48	100
1	4.77±0.36	94.3
15	4.38±0.41	86.6
30	2.43±0.15	48.0*

NIH3T3 fibroblasts were incubated with or without 1~30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \*p<0.05 (Student's t-test).

2) 처리시간에 따른 세포생존율

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 30 μM의 농도로 포함된 배양액에서 NIH3T3 섬유모세포를 2~6 시간 동안 배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성효과를 XTT 분석법에 의하여 조사한 결과 2 시간 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (9.87±0.78)에 비하여 68.9% (6.80±0.54)로 나타났으며 4 시간의 처리에서는 49.4% (4.88±0.39)로 나타났다. 또한 6 시간 동안의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포생존율이 26.5% (2.62±0.20)로 나타나 4 시간과 6 시간 동안 처리에서 모두 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다 (p<0.05). 또한, 4 시간 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서 XTT50 값을 나타냈다 (Table 2).

Table 2. The cell viability of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on NIH3T3 fibroblasts in incubation time by XTT assay

Incubation time of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (hour)	Group	
	Mean±SD	(% of control)
control	9.87±0.78	100
2	6.80±0.54	68.9
4	4.88±0.39	49.4*
6	2.62±0.20	26.5*

NIH3T3 fibroblasts were incubated with or without 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2~6 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \*p<0.05 (Student's t-test).

2. 산소유리기에 대한 진피 (CRP)의 세포생존을 정량

NIH3T3 섬유모세포에 CRP가 100~300 μg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전배양한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 독성에 대한 CRP의 영향을 XTT 분석법에 의하여 조사하였다. 결과 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (4.33±0.34) 비하여 48.0% (2.08±0.18)로 나타났으며 100 μg/ml CRP의 처리에서는 세포생존율이 56.4% (2.44±0.21)로 나타났다. 또한 300 μg/ml CRP의 처리에서는 세포생존율이 78.3% (3.39±0.38)로 나타났다. 특히, 300 μg/ml 농도의 CRP의 처리에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (p<0.05) (Table 3).

Table 3. The cell viability of Citri reticulatae pericarpium (CRP) on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced cytotoxicity on NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Concentration of CRP (μg/ml)	Group	
	Mean±SD	(% of control)
control	4.33±0.34	100
30μM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.08±0.18	48.0
100	2.44±0.21	56.4
300	3.39±0.38	78.3*

NIH3T3 fibroblasts were preincubated with or without CRP for 2 hours before exposure of 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 hours. The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \*p<0.05 (Student's t-test).

고 찰

최근 육미지황탕과 같은 한약추출물에 의한 한 방처방약제들이 혈압이나 뇌병변과 같은 난치성 질환에 매우 뛰어난 항산화효과를 가지고 있다고 알려진 바 있다<sup>13)</sup>. 또한, 자단과 같은 한약재에는 항암작용이나 중독, 진통에 대한 효능이 높으며 면역력 증강에도 매우 유효한 약리활성성분이 있다고 알려진 바 있다<sup>16)</sup>. 그러나 아직도 많은 한약추출물의 성분에 대한 약리활성의 규명은 잘 알려져 있지 않으며 더욱이 항산화나 항암 기전 역시 많은 연구가 되어 있지 않다<sup>9,17)</sup>. 본 연구에서 적용한 진피는 운향과에 속하는 굴나무의 열매과피로서 굴나무는 우리나라에서 자생하고 있으며 10월에 채취하여 과피를 햇빛이나 그늘에 건조하여 사용한다. 지금까지 밝혀진 진피의 성분으로는 limonene를 비롯하여 nobiletin 및 citral과 같은 성분을 함유하고 있어 평활근의 이완작용을 비롯하여 이담작용과 같은 약리활성을 가지고 있어 호흡기계통의 질환에 많이 사용되어 왔다<sup>17)</sup>. 그러나 최근에 진피가 항산화작용이 있다는 것이 제시되면서 이에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 본 연구는 진피의 항산화작용을 알아보기 위하여 먼저 NIH3T3 섬유모세포를 배양한 후 여러 농도의 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 처리하여 세포생존율 측면에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성을 조사하였다. 그 결과 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소한 것으로 나타났다. 특히, 30 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포생존율이 48.0%로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (p<0.05). 본 실험의 결과는 산소유리기가 NIH3T3 섬유모세포에 독성효

과를 가지고 있다는 것을 말해주고 있다.<sup>17,19)</sup> Borenfreun와 Puerner<sup>20)</sup>는 세포독성판정기준에서 중간독성값 (midcytotoxicity value, MCV)이 100 uM 이하이면 고독성인 것으로 판정하였다. 이를 근거로 본 실험에서 NIH3T3 섬유모세포에 대한 XTT<sub>50</sub> 값이 30 uM로 나타남으로서 이는 고독성인 것으로 나타났다. 이같은 세포독성효과에 대한 세포사멸현상은 산소유리기가 세포내의 핵산인 DNA나 또는 RNA의 합성을 억제하여 그 결과 세포생존율을 감소시켰을 가능성도 배제할 수는 없겠으나<sup>1)</sup>, 아마도 세포내 소기관을 손상시킴으로서 세포생존율을 감소시켰을 것으로 생각된다<sup>18,20)</sup>. 이러한 이유로는 XTT assay가 세포소기관의 하나인 사립체의 활성과 매우 밀접한 관련이 있는 것을 감안할 때 산소유리기와 세포소기관 간의 상호작용의 원인으로 생각된다<sup>18)</sup>. 또 하나의 가능성은 산소유리기가 세포내 항산화계를 손상시킴으로서 세포내에 존재하고 있는 glutathione peroxidase를 비롯하여 catalase 및 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소의 활성을 저해하였을 가능성도 클 것으로 생각된다<sup>3)</sup>. 한편, 산소유리기의 처리 시간에 따른 세포생존율을 조사한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 시간에 비례하여 세포생존율의 감소를 나타냈다. 이는 아마도 실험적으로 세포에 처리한 산소유리기를 세포내 항산화효소가 이를 충분히 분해하지 못해 그 결과 시간이 경과할수록 지속적으로 세포내에 쌓인 산소유리기가 세포를 손상하였을 결과라고 생각된다<sup>10,15)</sup>. 즉, 산소유리기는 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포내의 항산화계를 손상시킴으로서 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰을 것으로 생각된다. 한편, 진피가 산소유리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 처리하기 전에 진피 (CRP)가 100~300 ug/ml의 농도로 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처리한 후 이의 영향을 세포생존율 측면에서 정량분석 하였다. 그 결과 300 ug/ml 농도의 CRP 처리에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다 (p<0.05). 본 실험의 이러한 결과는 CRP가 산소유리기에 대한 항산화작용이 있다는 것을 말해주고 있다<sup>4,14)</sup>. 이는 아마도 처리한 CRP가 세포막을 통해 세포속으로 침투한 후 세포속에 들어있는 산소자유기를 제거하여 산소유리기에 의하여 손상되는 세포를 방어하였을 것으로 생각된다<sup>11,17)</sup>. 그러나 이에 대한 자세한 기전규명을 위해서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 세포독성이 칼슘이온채널을 비롯하여 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 및 DNA의

합성이나 세포내 신호전달체계와 같은 측면에서 더욱 많은 분석이 필요할 것으로 생각한다.

## 결론

배양 NIH3T3 섬유모세포를 이용하여 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)의 세포독성을 세포생존율 측면에서 조사하였으며 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 유도에 의한 세포독성에 대한 진피 (CRP)의 영향을 colorimetric assay에 의하여 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 배양 NIH3T3에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈으며 또한 진피는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 산소유리기에 의하여 유도된 세포독성에 대하여 항산화효과를 나타냈다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

## 참고문헌

- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992;59:1609-1623.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 1994;37:62-70.
- Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned myocardium". *Cir Res* 1986;58:149-157.
- Park ST. Study on the effect of iron-chleter on oxygen radical-induced neurotoxicity. *Korean J Phys Anthrop* 1995;8:113-121.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 1990;10:1035-1041.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp*

- Neurol. 1993;121:1-13.
7. Jain SK. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem.* 1989;264:21340-21345.
  8. Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem.* 1989;53:3383-3389.
  9. Decker EA. The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr Rev.* 1995;53:49-58.
  10. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature (London).* 1988; 336:68-70.
  11. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 1993;362:59-62.
  12. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK. Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem.* 1987;49:24-31.
  13. 임종필, 서은실, 김훈, 송영철. 육미지황탕이 카드뎀 중독된 흰쥐의 혈압에 미치는 영향. *생약학회지.* 1999;30(3):250-254.
  14. 이규철, 박선화, 전용혁. Retinoid의 최기형성 효과에 대한 인삼의 영향-기형발생율을 중심으로. *대한해부학회지.* 1993;26:428-434.
  15. 김성자, 전용혁, 라복영. 백서태자의 간조직에 미치는 인삼 및 Chlorambucil의 영향. *대한해부학회지.* 1981;14:99-105.
  16. 안규석, 최승훈, 김정범, 박종현. 한의학적 진단 모형에 따른 한방제제의 항암 및 면역조절작용에 미치는 영향. *동의병리학회지.* 1994;9(1):1-20.
  17. 황도편. 증맥. 방약합편. 서울, 남산당. 1980;234-264.
  18. Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63.
  19. Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975;32:374-354.
  20. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984;9:7-9.