

## 석곡 MeOH 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 신경세포 보호효과에 미치는 영향

윤미영 · 김주영 · 황지환 · 차미란 · 이미라 · 조경진 · 박해룡\*

경남대학교 식품생명학과

## Protective Effect of Methanolic Extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Neurotoxicity in PC12 cells

Mi-Young Yoon, Ju-Young Kim, Ji-Hwan Hwang, Mi-Ran Cha, Mi-Ra Lee, Kyung-Jin Jo and Hae-Ryong Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received December 11, 2006; Accepted February 20, 2007

The neuroprotective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. (DME) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neurotoxicity in PC12 cells was investigated. The treatment of PC12 cells with various DME concentrations under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in the induction of protective effect in a dose-dependent manner, as determined by the results of an MTT reduction assay, an LDH release assays, and a morphological assay. Interestingly, we also detected reduction of apoptotic bodies and inhibition of caspase-3 activity by DME in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cells. These data show that the neuroprotective effect of DME against PC12 cells might be related to the suppression of caspase-3 activation. Therefore, these results suggest that DME could be a new potential candidate as chemotherapeutic agents against neuronal diseases.

**Key words:** *Dendrobium nobile* Lindl., neuroprotective, oxidative stress, PC12 cells

### 서 론

생물체는 물질의 대사와 에너지 생산을 위하여 필수적으로 산소가 이용되고 있으며 정상적으로는 물과 이산화탄소로 배출된다. 그러나 이 중 일부 2~3%의 산소가 불완전하게 전자를 흡수하려는 반응과정에서 세포의 파괴 작용을 초래하는데, 이를 활성산소(free radical, oxygen radical)라고 한다.<sup>1-7)</sup> 이러한 활성산소는 항산화효소들의 작용에 의해 제거되며 생리적으로 정상적인 상태에서는 활성산소 생성과 항산화효소에 의한 제거 작용이 균형을 이루고 있다. 그러나 활성산소의 생성이 증가하거나 항산화효소의 작용이 감소하게 되면 불균형이 초래되고 이로 인하여 세포는 소위 산화적 스트레스 상태에 빠지게 되어<sup>8,9)</sup> 생체 내의 고분자 물질인 불포화 지방산, 단백질, DNA 등과 반응하여 다양한 기전을 통해 세포의 노화와 변형을 유도함으로써 여러 가지 질병을 초래하게 된다.<sup>10-14)</sup> 특히, 다른 장기에 비해서 뇌는 대사를 위한 산소 이용률이 높고 과산화지질의 합량도 높은 반면에 활성산소에 대한 산화방지 효소계나 저분자

의 산화방지제가 타 조직에 비해 상대적으로 적은 관계로 유해 활성산소나 라디칼에 의한 산화적 손상에 대하여 매우 약하기 때문에 신경세포의 사멸 유도로 인한 퇴행성 신경질환과 관련이 큰 것으로 최근 여러 연구를 통해 보고되어지고 있다.<sup>15-17)</sup> 현재 이러한 퇴행성 신경 질환을 치료하기 위해서 항산화물 처리, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만 대부분이 위험요소와 부작용을 나타내고 있으며 또한 뇌 조직의 경우 일단 손상이 되면 기능 회복이 어렵기 때문에 퇴행성 신경질환에 있어서 신경세포를 보호 할 수 있는 치료제의 개발이 요구된다.

본 연구팀에서는 국내·외에서 자생하고 있는 435가지의 약용식물 추출물을 대상으로 PC12 신경 세포주를 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로부터 신경세포 보호효과를 갖는 천연추출물의 탐색을 시도하였다. 그 결과 석곡(*Dendrobium nobile* Lindl.) 추출물로부터 강력한 신경세포 보호효과를 확인 할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 석곡은 난초과에 속한 금채석곡(*Dendrobium nobile* Lindley) 또는 기타 동속 근연식물의 지상부를 건조한 것으로, 주요성분은 dendrobine, dendramine, nobilonine, dendrine 등이 있으며, 약리작용으로는 해열작용, 호흡 억제 작용, 심장흥분 억제 작용 등이 알려져 있다.<sup>18,19)</sup> 하지만 석곡에 관한 생리·약리학적 연구는 아직 초보적인 단계에 불과하며,<sup>20)</sup> 특히 신경세

\*Corresponding author  
Phone: 82-55-249-2689; Fax: 82-55-249-2995  
E-mail: parkhy@kyungnam.ac.kr

포 보호 효과와 관련된 연구는 수행된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로부터 유도되는 신경 세포의 사멸을 보호할 수 있는 생리활성물질을 탐색하기 위한 목적으로 석곡의 추출물을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 손상된 PC12 신경 세포주에 대한 세포 보호효과를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 실험재료.** 본 실험에서 사용된 석곡은 2006년 11월 경남 마산시 (주)금강제약으로부터 제공받아 추출하여 실험에 사용하였다. 신경세포 보호효과 실험에 사용된 시약으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogen peroxide solution)와 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였으며, LDH(Lactate dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NT, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

**추출물 및 분획물 제조.** 석곡 5g에 메탄올 용매를 100 ml 가하여 2일 동안 상온에서 정치시켜 추출한 후, 여과지(5C, 110 mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaish, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 추출여액을 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 농축하여 용매 추출물을 얻었다. 석곡 메탄올 추출물은 5 mg/ml로 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 적당한 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며 이 추출물을 DME라고 명명하였다.

**세포주 및 배양.** 본 실험에 사용된 세포주는 rat pheochromocytoma PC12로써 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 사용된 배지는 DMEM medium에 10% fetal bovine serum(FBS), 5% horse serum(HS) 및 100 unit/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

**산화적 스트레스 유도.** 신경세포에서의 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 시간별로 처리하였다. 96-well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml 농도로 세포를 분주 한 후, 24시간 동안 배양하고 0.1, 0.5, 1 mM의 농도로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30, 60, 90, 120분간 노출 시킨 뒤 산화적 스트레스를 받아 50% 이하의 세포사멸을 유도하는 적절한 농도와 시간을 결정하였다.

**MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정.** 석곡 추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다. 세포주를 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 맞추고 96-well plate에 각각 100 μl씩 첨가하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 석곡 추출물을 각각 1, 5, 10, 50 μg/ml의 농도로 처리하였다. 30분 동안 배양한 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 2시간 배양하고 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT(5 mg/ml) 용액을 10 μl씩 첨가하여 2시간 동안 다시

배양하였다. 반응 후 well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 100 μl 첨가하여 녹이고 ELISA reader(Model 680, BioRad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

**LDH 측정에 의한 세포독성 확인.** 석곡 추출물의 신경세포 보호효과를 측정하기 위한 방법으로 LDH(lactate dehydrogenase) release assay를 실시하였다. PC12 세포주를 1 × 10<sup>5</sup> cells/ml로 맞추고 후, 100 μl씩 96-well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤, 1, 5, 10, 50 μg/ml의 농도로 제조한 석곡 추출물을 세포주에 처리하였다. 30분 후 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 2시간 배양한 다음, 배양액을 새로운 96-well plate에 50 μl 분주하고, 이 배양액에 LDH reagent를 50 μl씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후, 20분간 반응하였다. 반응이 완료되면 stop solution인 1 N HCl을 100 μl씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 살아남은 세포의 LDH 측정을 위해 배양액을 제거한 후, 0.5% Triton X-100용액을 50 μl 첨가하여 40 rpm으로 10분 동안 shaking시켜 세포벽을 깨트린 다음, 같은 방법으로 LDH reagent 50 μl를 첨가하여 반응 시키고, 반응이 끝나면 반응 정지액을 넣은 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 의한 세포독성의 백분율은 배양액과 살아있는 세포에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 값으로 계산하여 무처리 대조군과 비교한 값을 나타내었다.

**신경세포의 형태학적 변화 관찰.** 석곡 추출물에 대한 PC12 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6-well plate에 2 × 10<sup>5</sup> cells/well로 24시간 동안 배양하였다. 석곡 추출물을 농도별(1, 5, 10, 50 μg/ml)로 처리한 후 0.5 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 노출시켜 phase-contrast microscope(TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포형태를 관찰하고 100배로 사진 촬영하였다.

**Hoechst 33342 염색.** 6-well plate에 2 × 10<sup>5</sup> cells/well로 24시간 동안 배양하여 추출물 10, 50 μg/ml 농도로 처리한 후, 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 2시간 반응하였다. PBS 완충액으로 2회 세척하고 10% formalin을 처리하여 4시간 고정한 후 다시 PBS로 세척하고 Hoechst 33342(Sigma, MO, USA)로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 PBS로 세척하고 형광 현미경 하에서 400배로 관찰하였다.

**Caspases-3 colorimetric assay.** 6-well plate에 1 × 10<sup>6</sup> cells/ml로 24시간 배양 후, 농도별로 석곡 추출물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 2시간 배양한 다음 250 g로 원심 분리하여 상등액을 버리고 세포만을 얻었다. 세포에 차가운 lysis buffer 25 μl를 첨가하여 10분간 얼음위에서 반응 후 4°C 10,000 g로 1분간 원심 분리하였다. 이것의 상등액 50 μl를 96-well plate에 옮기고 2 × reaction buffer/DTT 용액과 caspase-3 colorimetric substrate (DEVD-pNA)를 첨가하여 2시간 동안 37°C에서 incubation한 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하고 실험군의 활성을 대조군에 대한 상대적인 활성 정도로 나타내었다.

**통계처리.** 모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(SD)를 구하고 각 추출물의 세포독성 정도를 비교하기 위해

one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Scheffe's test를 이용하여 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

**결과 및 고찰**

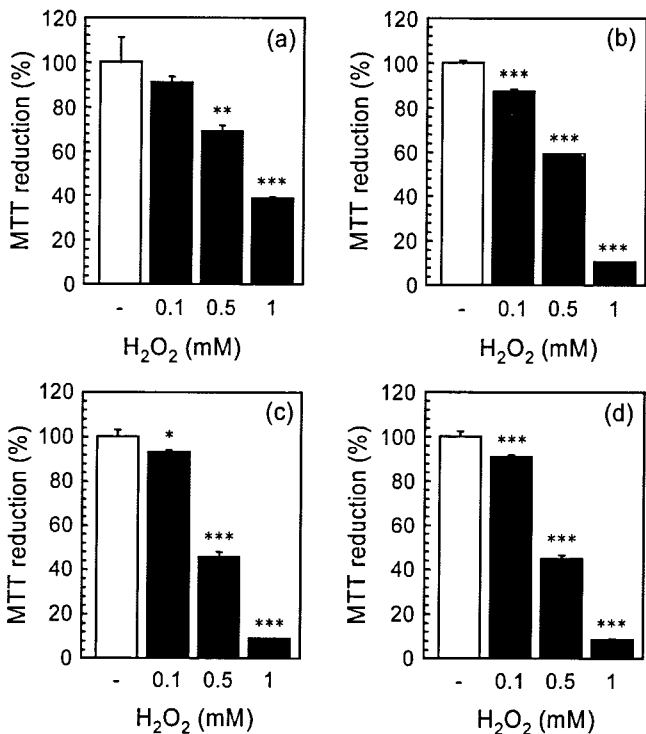
**석곡 추출물의 신경세포 보호효과.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 스트레스의 적당한 농도 및 시간을 결정하기 위하여 PC12 세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별, 시간별로 처리한 결과는 Fig. 1과 같다. 0.1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에서는 시간이 경과함에 따라(30, 60, 90, 120 분) 세포생존율(90.2, 87.7, 93.2, 91.3%)에는 거의 변화가 없었으며 0.5 mM의 농도에서는 시간이 경과함에 따라 각각 68.6, 59.0, 45.6, 44.6%를 가장 높은 농도인 1 mM의 농도에서는 38.9, 10.6, 9.3, 8.6%의 세포생존율을 보였다. 따라서 가장 적당한 산화적 스트레스 조건으로 45.6%의 생존율을 보인 0.5 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 처리하는 것으로 결정하였다.

이러한 조건에서 석곡 추출물의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 세포주에 대한 신경세포 보호효과에 대한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되는 PC12 세포주의 손상에 대한 신경세포 보호효과를 확인하기 위해 MTT reduction assay 방법을 이용하여 아무것도 처리하지 않은 정상군과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 대조군 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 석곡 추출물을 농도별로 처리한 실험군을 비교하였다. Fig. 2A의 결과와 같이,

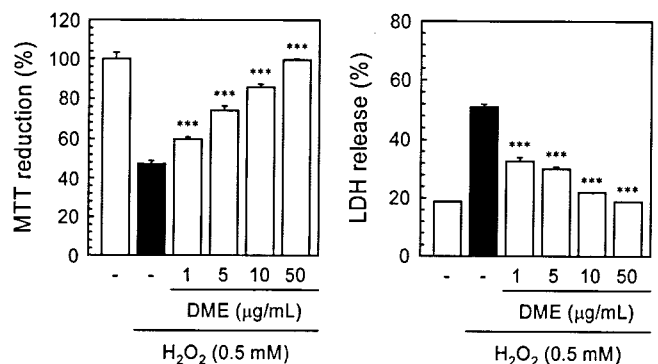
대조군의 세포 생존율은 47% 수준으로 떨어졌으나, 이 때 석곡 추출물 1, 5, 10, 50 µg/ml로 세포주에 처리했을 때 신경세포 생존율은 59.6%, 74.0%, 85.6%, 99.5%의 농도 의존적으로 세포가 회복되는 수준을 확인할 수 있었다. 또한 동일한 조건 하에서 세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 배양액 중에 들어 있는 LDH(lactate dehydrogenase)의 방출 양을 측정된 결과는 Fig. 2B와 같다. 정상군에 비해 대조군은 약 50% 정도의 LDH 방출을 확인 할 수 있는데 반해 석곡 추출물 1, 5, 10, 50 µg/ml를 처리했을 때는 32.8, 29.9, 21.9, 18.9%로 감소하였다. 이 결과는 석곡 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 PC12 신경세포 손상을 강력하게 억제한다는 것을 시사한다.

**신경세포의 세포 형태학적 영향.** 신경세포가 외부환경에 민감하게 자극을 받으면 신경상해를 입는 것과 동시에 세포사의 발생으로 인한 세포의 형태학적인 변화가 나타난다.<sup>21)</sup> 따라서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 스트레스 상태의 PC12 세포주에서 석곡 추출물이 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 광학 현미경 하에서 관찰하였다(Fig. 3). 정상군에 비해 대조군은 스트레스로 인하여 신경돌기가 거의 소멸된 양상을 보임으로써 신경세포의 형태학적으로 큰 변화가 유도된 것을 확인할 수 있으나, 석곡 추출물을 10 µg/ml, 50 µg/ml 처리하였을 때는 농도 의존적으로 신경세포의 생존을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 신경세포의 형태학적인 변화를 통하여 석곡 추출물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 신경세포 손상을 억제하거나 보호하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

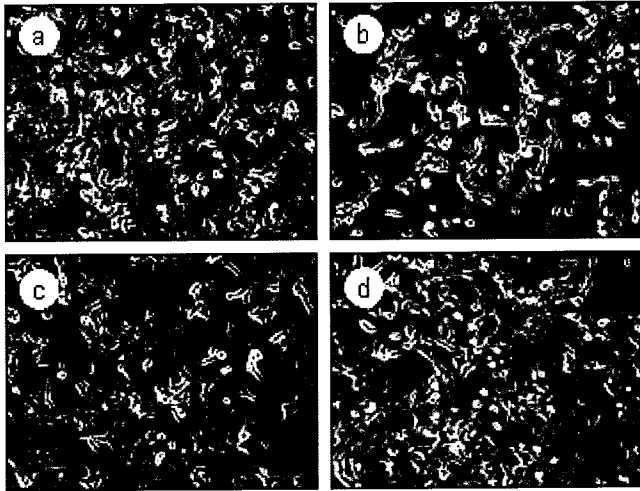
**석곡 추출물의 apoptosis 억제효과.** 일반적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 신경세포의 사멸은 caspase-3을 활성화시키는 apoptosis 경로로 유도 된다고 알려져 있다.<sup>22)</sup> 본 논문에서는 석곡 추출물이 가지는 신경세포 보호 효과의 기전 연구를 위하여 산화적 스트레스로부터 유도되는 PC12 세포의 apoptosis의 활성 여부를 확인 하였다. Apoptosis의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위해서 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염



**Fig. 1. Concentration- and time-dependent effect of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on PC12 cell viability.** Cells were treated with various concentrations (0.1, 0.5, 1 mM) of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and cell count after (a: 30 min, b: 60 min, c: 90 min, d: 120 min) incubation. After MTT assay, the MTT reduction rate (mean ± S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.001.



**Fig. 2. Protective effect of *Dendrobium nobile* Lindl. extracts (DME) on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress cell death in PC12 cells.** Cell survival effects of DME was determined using MTT reduction assay (A) and LDH release assay (B). After MTT assay, the MTT reduction rate (means ± S.D. of triplicate determination) were calculated by setting each of control survivals in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DME methanol extracts. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cells (100%) and expressed as percentage of the control (obtained separate plating).\*\*\*significant vs. control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells (p < 0.001).



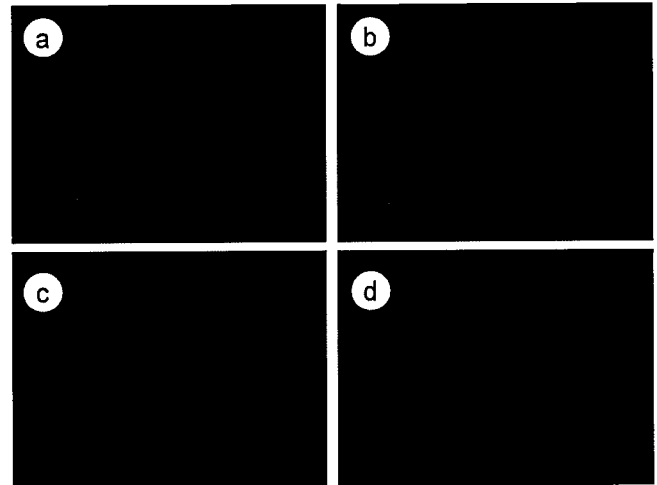
**Fig. 3.** Analysis of phase-contrast microscopic morphological changes by DME in PC12 cells. The cells were exposed to various concentrations of DME and morphological changes were monitored for 2 hours (a: control, b: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DME 10 µg/ml, d: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DME 50 µg/ml). Photographs were taken with a phase-contrast microscope at 100× magnification. This data was repeated at least two independent experiments.

색제인 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다(Fig. 4A). 정상 세포의 핵은 타원형의 온전한 핵 모양을 나타낸 반면 산화적 손상을 입은 세포의 핵은 condensation과 fragmentation으로 인한 apoptotic body가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis 특징을 나타내었다. 그러나 석곡 추출물을 처리한 결과 핵의 condensation현상과 fragmentation이 현저히 감소함을 형광 현미경을 통하여 확인하였다(Fig. 4A). 이러한 결과는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 독성이 apoptosis에 기인함을 나타내며, 석곡은 이러한 조건에서 신경 세포를 보호하는 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

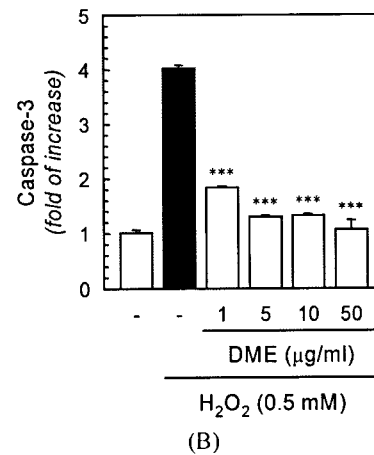
다음으로 석곡에 의한 신경 세포의 apoptosis 감소가 caspase-3과 관련이 있는지 확인하기 위하여 caspase-3의 활성을 확인해 보았다(Fig. 4B). Apoptosis를 유도하는 caspase-3는 cystein protease family로써 활성화 되어 기질 결합체인 DEVD-pNA를 분해하여 p-nitoranilin (pNA)를 생성하는데 이러한 성질을 이용하여 pNA의 푸른빛으로 활성정도를 측정할 수 있는 방법인 caspase-3 colorimetric assay를 실시하였다. PC12 세포에 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리 하면 산화적 손상이 가해져서 약 4배 정도 높은 caspase-3 활성을 확인하였다. 이에 비해 석곡 추출물을 1, 5, 10, 50 µg/ml로 처리한 경우에는 농도 의존적으로 caspase-3의 활성이 감소하였으며 가장 높은 농도 50 µg/ml 처리 시에는 그 활성도가 대조군에 비하여 1.1배 이하로 감소하였다. 이는 석곡 추출물이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 신경세포의 apoptosis 과정 중 caspase-3의 전 단계 신호전달 과정에 작용하여 신경세포의 산화적 손상을 억제한다는 것을 시사한다.

## 초 록

본 연구에서는 석곡(*Dendrobium nobile* Lindl.) 추출물에 대



(A)



(B)

**Fig. 4.** Inhibitory effect of apoptosis by DME in PC12 cells. (A) The cells were treated with various concentration of DME for 2 hours. Fixed cells were stained with Hoechst 33342 (10 mM) and examined by fluorescence microscope (Magnification ×400, a: control, b: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DME 10 µg/ml, d: 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + DME 50 µg/ml). (B) Dose-dependent inactivation of caspase-3 after DME treatment. Aliquots were incubated with DEVD-pNA for *in vitro* caspase-3. The caspase-3 activity of cell extracts was measured by the colorimetric assay. Data are shown as the means ± S.D. of three independent experiments. \*\*\*significant vs. control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells ( $p < 0.001$ ).

한 신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 스트레스 상태의 PC12 세포주에서 MTT-dye reduction assay와 LDH release assay를 이용하였다. MTT reduction assay 결과, 스트레스 상태에서는 47%의 생존율을 보인데 반하여 석곡 추출물 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때 99.5%의 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 이 결과는 LDH release assay에서도 일치하는 결과를 확인하였다. 그리고 광학 현미경을 이용한 형태학적 변화를 관찰한 결과에서도 신경돌기의 출현 유도를 통한 신경세포 생존을 확인 할 수 있었다. 또한 핵의 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상 세포의 핵은 타원형의 온전한 핵 모양을 나타낸 반면 산화적 손상을 입은 세포는 apoptotic body가 핵 주변에 나타나는 전형적인 apoptosis를 나

타내었고 석곡 추출물을 처리한 결과 핵의 condensation현상과 fragmentation이 현저히 감소함을 확인 할 수 있었다. 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 caspase-3의 활성화는 석곡 추출물을 50 µg/ml 처리 후 약 1.1배 이하로 감소함을 보였다.

### 감사의 글

본 연구는 2005학년도 경남대학교 학술진흥연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Branen, A. S. (1975) Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **52**, 59-63.
2. Oberley, T. D., Schultz, J. L., Li, N. and Oberley, L. W. (1995) Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol. Med.* **19**, 53-65.
3. Gutteridge, H. B. JMC. (1993) Free Radicals in Biology and Medicine (2nd ed.) 86-133, Glarendon Press. Oxford, UK.
4. Kim, A. K. and Cha, E. J. (2004) Effect of pharbitidis seed extract on the antioxidant enzyme activity in B16F10 murine melanoma cells by oxidative stress. *Yakhak Hoeji.* **48**, 93-98.
5. Kim, S. J. and Han, D. (2005) Effect of plants extracts on lipid peroxidation of rat brain tissue induced by reactive oxygen species. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 976-982.
6. Bae, K. S., Hwang, E. C., Kwon, C. H., Kim, S. H. and Choi, S. W. (2005) Antioxidant activity of extract from walnut (*Juglans sinensis* Dode) and Its protective effect on cell injury and lipid peroxidation in renal cortical slices. *J. Life Sci.* **15**, 106-111.
7. Joo, S. S., Kim, S. K., Yoo, Y. M., Ryu, I. W., Kim, K. and Lee, D. I. (2006) Anti-oxidative and cytoprotective effect of ursodeoxycholic acid, an active compound from the Bear's Gall, in mouse microglia. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**, 452-455.
8. Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
9. Wu, L. L., Chiou, C. C., Chang, P. Y. and Wu, J. T. (2004) Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin. Chim. Acta* **339**, 1-9.
10. Leibovitz, B. E. and Siegel, B. V. (1980) Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *J. Gerontol.* **35**, 45-56.
11. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1990) Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
12. Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
13. Choi, H. J., Han, H. S., Park, J. H., Son, J. H., Bae, J. H., Seung, T. S. and Choi, C. (2003) Antioxidative, phospholipase A<sub>2</sub> inhibiting, and anticancer effect of polyphenol rich fractions from *Panaxginseng* C. A. Meyer. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **46**, 251-256.
14. An, B. J., Park, J. M., Bae, H. J., Pyun, J. R. and Song, M. A. (2006) Antioxidant and antibacterial effects of Korean *Isodon japonicus* H. J. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 129-134.
15. Omodeo-Sale, F., Gramigna, D. and Campaniello, R. (1997) Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Neurochem. Res.* **22**, 557-582.
16. Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W. and Perl, D. P. (1996) Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **149**, 21-28.
17. Choi, W. H., Oh, Y. S., Ahn, J. Y., Kim, S. R. and Ha, T. Y. (2005) Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonica* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 479-483.
18. Han, H. J., Kim, J. H., Cho, H. B. and Choi, G. S. (2000) Effects of Herba Dendrobii on the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J. Orient. Gynecol.* **2**, 120-135.
19. Mizue, O., Wenzhe, F., Koji, H., Quanbo, X., Yasuhiro, T., Katsuko, K., Tsuneo, N., Tomohiro, S., Kenji, T. and Shigetoshi, K. (1999) Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishing- tonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. *J. Ethnopharmacol.* **67**, 111-119.
20. Kim, Y. G., Yang, G. H. and Cho, S. I. (2005) Anti-oxidative effects of Dendrobii herba on toxic agent induced kidney cell injury. *Kor. J. Herbology.* **20**, 53-60.
21. Kim, S. T., Ahn, S. H., Kim, J. D. and Kim, Y. K. (2003) Protective effect of MeOH extract of *Evodia officinalis* on cyanide-induced neurotoxicity in cultured neuroblastoma cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**, 282-287.
22. Oh, D. H., Koh, S. H., Chung, B., Park, K. H., Kim, H. Y., Song, C. W., Kim, Y. C., Kim, J. H., Kim, M. H. and Kim, S. H. (2006) Cytoprotective effect of 15-deoxy-delta(12,14) prostaglandin J2(15d-PGJ2) against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced death of neuronally-differentiated PC12 cells. *J. Korean Neurol. Assoc.* **24**, 58-65.