

음나무 추출물의 세포 내 산화 스트레스와 항산화 활성*¹

김세현*^{2†} · 박영기*² · 장용석*² · 한진규*² · 정헌관*²

Oxidative Stress in the Cell and Antioxidant Activity of *Kalopanax pictus* Extracts*¹

Sea-Hyun Kim*^{2†} · Youngki Park*² · Yong-Seok Jang*² ·
Jingyu Han*² · Hun-Gwan Chung*²

요약

음나무의 새로운 용도 개발을 위하여 다양한 항산화 측정법을 이용하여 생리활성을 측정하였다. 즉, 음나무 수피 및 근피의 온수 추출물과 메탄올 추출물에 대한 세포 내 활성산소 농도를 측정하여 세포수준에서의 산화 스트레스 억제효과를 측정하였으며, DPPH법 및 NBT법을 이용하여 각 추출물의 화학적인 측면에서의 항산화력을 측정하여 이들 간의 차이를 비교하였다. NR assay와 MTT assay에 의해 측정된 세포독성 실험결과, 음나무 근피의 메탄올 추출물의 세포독성이 가장 강했으며, 50%의 세포 생존율을 나타내는 NR50과 MTT50은 각각 0.0018%와 0.0029%였다. 산화 스트레스 억제효과는 근피의 불용성 온수 추출물이 15분 처리에서 57.9%로 가장 우수하였다. DPPH법과 NBT법을 이용한 음나무 추출물에 대한 항산화 활성 측정결과, 각각 수피의 메탄올 추출물이 96% (0.1% 농도)이고, 수피의 불용성 온수 추출물이 95% (0.5% 농도)를 나타내어 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

ABSTRACT

This study reviewed the application of an extract from *Kalopanax pictus* stem bark and root bark as natural antioxidants. To investigate the effect on cell toxic level against transformed mouse fibroblast L929 in formula added with various extracts from *Kalopanax pictus* stem bark and root bark, this experiment was carried out by *in vitro* cytotoxicity method. Using DCFA-DA

*¹ 접수 2007년 6월 18일, 채택 2007년 7월 24일

*² 국립산림과학원 특용수과, Div. Special Purpose Tree, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

† 주저자(corresponding author) : 김세현(e-mail: goldtree@foa.go.kr)

method, oxidative stress in cell was measured with other antioxidant activity methods including DPPH assay and NBT assay. Active oxygen inhibition rate for root bark insoluble hot water extracts showed the highest with 57.9% for 15 min treatment. In DPPH and NBT test, antioxidant activities of methanol extract from stem bark and insoluble hot water extract from stem bark were 96% (at 0.1%) and 95% (at 0.5%), respectively.

Keywords: *Kalopanax pictus*, cell toxicity, antioxidative stress, antioxidant activity

1. 서 론

최근, 산림자원인 수목의 이용에 있어 용재로서 건축자재, 구조재로 사용하거나 펄프의 원료로 사용하는 것에서 벗어나 여러 방법으로 이용하여 고부가가치를 창출하려는 노력이 여러 분야에서 이루어지고 있다. 이 중 산림자원으로부터 유용한 기능을 가진 물질을 분리하여 구조를 밝히거나 다양한 효과를 탐색하여 기능성 식품이나 천연물 신약으로 사용하려는 방안은 산림자원을 고차원적으로 이용하고자 하는 것이다.

수목으로부터 유래한 추출성분의 여러 가지 효능 중에서 항산화 효과는 노화 및 각종 성인병 질환을 예방하는 기능과 밀접하게 관련이 있다. 일반적인 생리작용인 호흡 등에 의해 세포에서 생성되는 배기가스인 활성산소는 생리계 내에서 세균을 살균하는 생체 방어작용을 하기도 하지만 일반적으로는 생체 내에서 산화를 일으켜 질병의 원인이 되는 유해한 작용을 한다(Afonso 등, 2007). 또한, 활성산소는 암이나 동맥경화증, 혹은 심혈관계 질환과 관련이 있으며, 생물분자를 공격하여 세포나 조직에 피해를 주며, 이로 인해 노화에도 관여한다는 보고가 있다(Maxwell, 1995). 따라서 항산화 효과를 평가하는 여러 방법 중에서 세포 내에 형성된 활성산소의 양을 측정하는 방법은 효과적인 항산화제의 개발에 있어 중요하다.

본 연구에서는 세포 내 활성산소의 양을 측정하는 대표적인 평가방법인 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate)를 이용한 fluorimetric assay를 사용하여 읍나무 추출물의 항산화 활성을 평가하

였다. DCFH-DA는 비극성분자로 세포 내로 쉽게 침투할 수 있으며 세포 내의 esterase에 의해 비형광성 극성분자인 DCFH로 분리되고 세포 내에 존재하는 활성산소에 의해 산화되면 형광성 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)로 전환되는데, 이때 형성된 형광물질을 fluorometer로 측정하는 방법이다(Trayner 등, 1995).

다양한 수목 중에서 전통적으로 약용하게 이용되어 온 읍나무의 수피(stem bark)와 근피(root bark) 추출물에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 읍나무(*Kalopanax pictus* Nakai = *Kalopanax septemlobus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 낙엽성 수목으로 동아시아에 분포한다(정 등, 2004). 예로부터 읍나무의 수피는 해동피라 하고 근피는 해동수근이라 하여 풍습의 제거, 경락소통 등으로 널리 사용되어 왔으며 최근에는 항돌연변이원성과 세포독성에 효과가 뛰어나다는 보고가 있다(김 등, 2002). 읍나무로부터 여러 종류의 사포닌과 리그난 그리고 페놀성 항산화 물질 등이 분리되어 보고되었다(Lee 등, 2000). 읍나무에서 분리된 사포닌은 Kalosaponin이라 하며, 이것은 triterpenoid 계의 oleanane형 사포닌이며 이것의 아글리콘은 hederagenin과 kalosaponin A, B, C, D, F, J 등이 있다(이 등, 2002). 또한, 홍 등(2001)은 읍나무 수피로부터 β -sitosterol, oleanolic acids, 3,3'-bis(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-meyhoxy-2H-1-benzopyran), 그리고 (-)-balanophonin 등을 분리하여 그 구조를 구명하였다.

본 연구에서는 생리활성이 우수한 수목으로 알려진 읍나무의 새로운 용도 개발을 위하여 다양한 항산화 측정법을 이용하여 생리활성을 측정하였다.

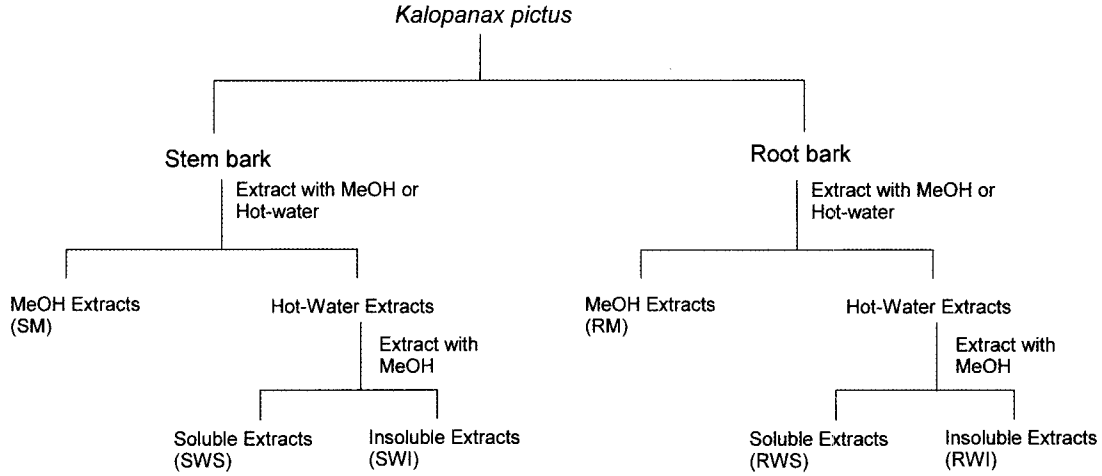


Fig. 1. Flow diagram of sample preparation from *Kalopanax pictus*.

즉, 음나무 수피와 근피의 온수 추출물과 메탄올 추출물에 대한 세포 내 활성산소 농도를 측정하여 세포수준에서의 산화 스트레스 억제효과를 측정하였으며, DPPH법 및 NBT법을 이용하여 각 추출물에 대한 화학적인 측면에서의 항산화력을 측정하여 이들 간의 차이를 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

공시수종으로는 2004년 9월 흥정산(강원도 홍천군)에서 채취한 음나무(수령: 15년, 흉고직경: 10 cm)를 사용하였다.

2.2. 추출 및 시료조제

음나무의 수피와 근피를 구분하여 음건한 후 분쇄하였다. 수피와 근피 분말을 메탄올(MeOH)과 온수(hot-water)로 추출하여 농축하였다. 온수 추출물은 다시 메탄올에 녹여 가용부와 불용부로 나누어서 온수 가용부와 온수 불용부로 나누었다. 따라서 본 실험에 사용된 시료는 Fig. 1과 같이 6개(SWS, SWI, SM, RWS, RWI, RM)로 구분하였다.

2.3. 세포독성 실험(Cell Toxicity)

세포독성 실험에 사용된 transformed mouse fibroblast L929는 5% bovine calf serum이 함유된 Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 5% CO₂ 및 37°C 조건으로 배양하였다. 배양된 세포는 80% confluent 시에 DMEM으로 세척한 후 trypsinization (0.25%)에 의해서 세포를 회수하였다.

2.3.1. NR (Neutral Red) Assay

Trypsinization에 의해 harvest된 cell을 1×10^5 cells/ml가 되도록 희석하여 96-well microplate에 100 μ l씩 접종한 다음, 5% CO₂ incubator에서 37°C로 24시간 배양하였다. 시료는 멸균된 0.22 μ m membrane 필터로 여과한 후 DMEM에 농도별로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. DMEM을 사용하여 50 μ l/ml의 농도로 조제한 neutral red 0.1 ml를 각 well에 첨가한 후 3시간 동안 반응시키고 배지를 제거하였다. Microplate 내에 있는 cell의 부착력을 촉진시키기 위해 1% formalin-1% CaCl₂로 고정시킨 후 생세포에 축적되어 있는 neutral red를 1% 초산-50% 에탄올로 추출한 다음 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.2. MTT Assay

시료 첨가 과정까지는 NR assay의 방법과 동일하게 처리하였다. Phosphate buffer solution (PBS)을 사용하여 5 mg/ml의 농도로 조제한 methylthiazyl tetrazolium (MTT) 0.01 ml를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 반응시켜 내용물을 제거하였다. Microplate에 형성된 formazan 결정을 용해시키기 위해 0.04 N HCl을 함유하는 isopropanol을 첨가하여 20분간 교반한 후 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 산화 스트레스(Oxidative Stress)

Trypsinization에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929를 5% bovine calf serum (BCS)이 함유된 DMEM · F'10 배지로 현탁시킨 후 96 well tissue culture plate 각각의 well에 세포현탁액(100 μ l)을 접종하였다. 37°C에서 5% CO₂조건으로 24시간 배양한 후 serum free medium 90 μ l로 교체한 다음 각각의 well에 시료를 10 μ l를 처리하였다. 각각의 시간별로 배양한 후 각각의 well에 10 μ l의 DCFH-DA를 첨가하여 15분간 배양하였다. 반응액의 fluorescence를 측정하여 산화 스트레스를 측정하였다(Rosenkranz 등, 1992).

2.5. 항산화 활성(Antioxidant Activity)

2.5.1. DPPH Assay

농도가 다른 시료 용액 1 ml에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 (513 nm에서 흡광도가 0.6이 되도록 농도를 조정한다.) 2 ml를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 513 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 메탄올만을 사용하여 측정하였다. 항산화 활성인 자유 라디칼 소거능은 다음의 식에 의해서 구하였다(유 등, 2004).

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample at 513 nm}}{\text{Absorbance of control at 513 nm}} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.5.2. NBT Assay

시험관에 300 mM phosphate buffer (pH 7.8) 1 ml와 substrate/reactive solution 0.5 ml를 첨가하였다. 0.5%로 조제한 각각의 시료 100 μ l와 enzymatic solution 0.5 ml를 혼합액에 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 superoxide anion 저해율을 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Anti-superoxide anion activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Rate of test sample}}{\text{Rate of control}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Substrate/reactive solution은 300 mM phosphate buffer (pH 7.8)와 triton X-100 1.6 ml, EDTA 2.9 ng, NBT (Nitro-blue-tetrazolium) 1 mg, Hypoxanthine 5.4 mg을 혼합하여 만들었다. Enzymatic solution은 Xanthine oxidase 12 μ l와 300 mM phosphate buffer (pH 7.8) 10 ml를 혼합하여 조제하였다(Kirby & Schmidt, 1997).

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

화학물질이나 천연물의 안전성 평가를 위해 실시되는 동물실험은 비용이 많이 드는 등 여러 가지 문제점이 있어 본 연구에서는 배양세포를 이용한 독성 시험법을 이용하였다. 현재 여러 가지 분석 assay가 사용되기는 하지만 그중 neutral red (NR) assay와 MTT assay가 흔히 사용되고 있다.

NR assay (Borenfreund 와 Puerner, 1985)는 수용성의 적색인 neutral red가 정상인 plasma membrane을 통해서 생세포의 lysosome에 축적되며, 축적된 neutral red의 양은 생세포수에 비례함을 원리로 하는 것이다. MTT assay (Mosmann, 1983)는 중성 pH에서 그 수용액이 황색인 MTT가 대사활성을 가진 생세포의 미토콘드리아에 의해 대사되어 청색의 formazan 유도체로 환원된다. 생성된 formazan

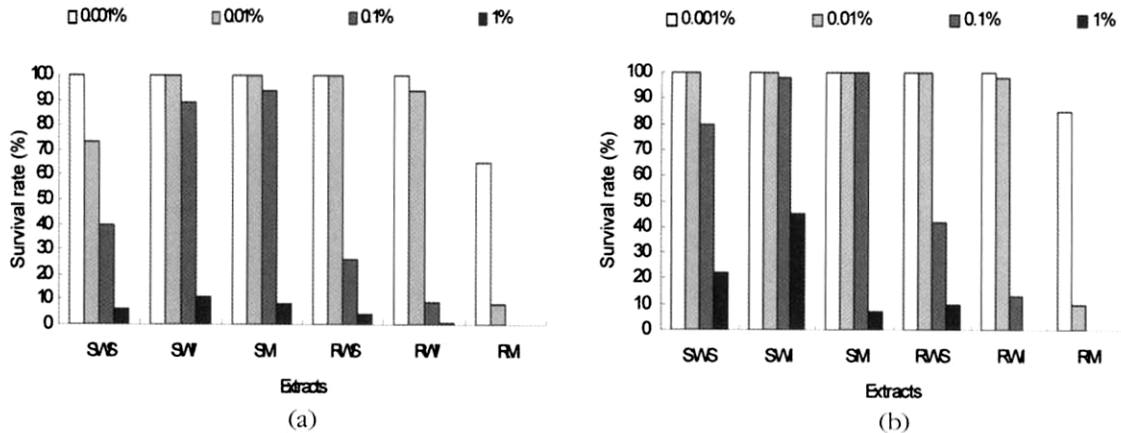


Fig. 2. Survival rate changes of L929 Fibroblast by *Kalopanax pictus* extracts treatment using NR assay (a) and MTT assay (b). SWS: water soluble extract from stem bark, SWI: water insoluble extract from stem bark, SM: methanol extract from stem, RWS: water soluble extract from root bark, RWI: water insoluble extract from root bark, RM: methanol extract from root bark.

Table 1. NR50 and MTT50 of L929 Fibroblast by *Kalopanax pictus* extracts treatment using NR assay and MTT assay

| Extracts ^{a)} | Cell cytotoxicity | |
|------------------------|-------------------|--------|
| | NR50 | MTT50 |
| SWS | 0.05 | 0.33 |
| SWI | 0.32 | 0.8 |
| SM | 0.33 | 0.35 |
| RWS | 0.047 | 0.073 |
| RWI | 0.037 | 0.037 |
| RM | 0.0018 | 0.0029 |

^{a)} SWS: water soluble extract from stem bark, SWI: water insoluble extract from stem bark, SM: methanol extract from stem, RWS: water soluble extract from root bark, RWI: water insoluble extract from root bark, RM: methanol extract from root bark

의 양은 생세포수에 비례함을 원리로 한 것이다.

읍나무 수피와 근피의 온수 추출물과 메탄올 추출물을 각 농도(0.01~1%)별로 처리하여 120분이 경과된 후의 세포 생존율을 측정할 결과 NR assay에 의한 측정결과 근피 메탄올 추출물인 RM을 제외한 모든 시료가 0.001%에서 100%의 세포 생존율을 보여주었으며, MTT assay에 의한 결과도 동일하였다. 하지만 각각의 추출물을 1%로 처리한 결과에서는

NR assay에서는 SWI를 제외한 모든 시료가 10% 미만의 생존율을 나타내었고, MTT assay의 경우에는 SWI와 SWS를 제외하고는 모두 10% 이하의 생존율을 나타내었다.

Table 1에서는 NR assay와 MTT assay에 의해 측정된 세포 생존율을 근거로 하여 이 중 50%의 생존율을 보일 때의 농도를 나타낸 것이다. 사용된 여러 시료 중에서 NR assay의 경우는 RM의 NR50 값이 0.0018%로 가장 적었으며, MTT assay에서는 RM의 MTT50 값이 0.0029%로 가장 적은 값을 나타내었다. 즉, NR assay와 MTT assay에 의한 세포 독성 실험 결과, RM의 세포독성이 가장 강하였으며, SWI와 SM에 대한 세포독성이 적게 나타났다.

3.2. 산화스트레스 활성

항산화 활성을 평가하는 여러 방법 중에서 세포 내에 형성된 활성산소의 양을 측정하는 항산화 활성 측정법은 노화 방지에 있어 세포를 산화스트레스로부터 보호하는 과정과 관련하여 중요하다. 따라서 이러한 항산화 활성 측정법은 세포 내부에서 발생하는 활성산소 노출과정을 감소시키는 물질을 탐색하

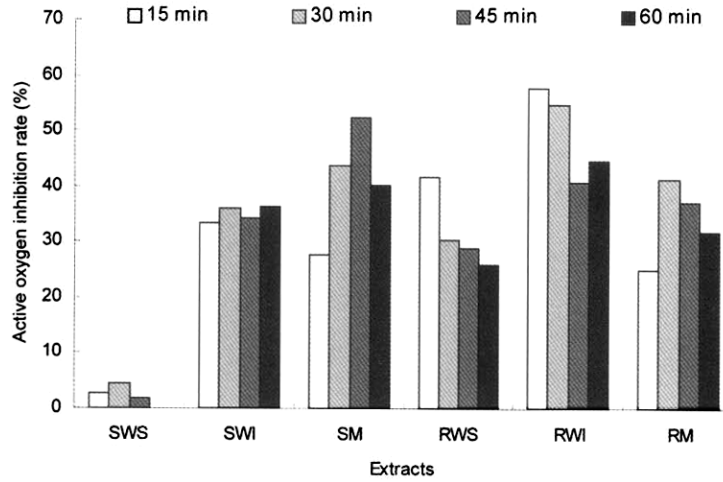


Fig. 3. Change of active oxygen inhibition rate by *Kalopanax pictus* extracts determined by DCFH-DA method. The extracts concentration used in this experiment was 0.01%. SWS: water soluble extract from stem bark, SWI: water insoluble extract from stem bark, SM: methanol extract from stem, RWS: water soluble extract from root bark, RWI: water insoluble extract from root bark, RM: methanol extract from root bark.

는 데 있어 유용하다. 본 연구에서는 세포 내 형성된 활성산소의 억제율을 측정하는 방법을 도입하였다. 즉, 활성산소 억제율은 비형광성의 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)가 세포 내의 활성산소에 의해 산화되면 형광성의 DCF로 전환되며 이것을 fluorometer로 측정하여 계산하였다(Kumar, 2004).

읍나무 수피와 근피를 메탄올과 온수로 추출하여 추출물 농도를 0.01%로 조절하여 시간대별(15, 30, 45, 60분)로 DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하여 세포 내의 산화스트레스 억제효과를 측정하였다(Fig. 3).

읍나무 수피의 온수추출물인 SWS와 SWI는 30분 동안 각각 4.5%와 35.9%의 활성산소 저해율을 보여 주었으며, 메탄올 추출물인 SM은 35.9%의 활성산소 저해율을 보여 주었다. 또한 읍나무 근피의 온수 추출물 RWS와 RWI는 30분 동안 각각 30.5%와 54.8%의 활성산소 저해율을 나타내었다. 근피의 메탄올 추출물인 RM의 활성산소 저해율은 30분이 지난 후에 41.5%이었다. 추출물들의 시간별 활성산소 저해율은 대체로 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였지만 SWI는 시간이 지나도 변화가 거의

없었다. 이상의 결과로 보아 읍나무 수피와 근피의 다양한 추출물 중에서 수피의 온수 추출물 중 메탄올 불용성 추출물인 SWS를 제외하고 나머지 추출물 모두는 활성산소 억제효과를 보였다(Fig. 3). 그 중 읍나무 근피 온수 추출물 메탄올 불용성 추출물인 RWI의 활성산소 억제효과가 57.9%로 가장 높았다. 이상에서 세포수준에서의 산화스트레스 억제 효과를 DCFH-DA를 이용하여 측정된 결과 수피 추출물 보다는 근피 추출물의 활성산소 억제효과가 우수함을 알 수 있었다.

3.3. 항산화 활성

자유 라디칼은 산화에 의해 형성된 화학적 물질로서 항산화제는 이러한 자유라디칼을 소거하는 능력을 가지고 있다. DPPH는 513 nm에서 흡광도를 보이는 보라색의 화합물로 항산화 활성의 측정에 사용된다(Blois, 1958).

Fig. 4에서는 읍나무 수피와 근피 추출물의 각 농도별에 따른 자유라디칼 소거능을 측정하여 항산화 활성을 계산하였다. Fig. 4의 결과에서 나타낸 것과

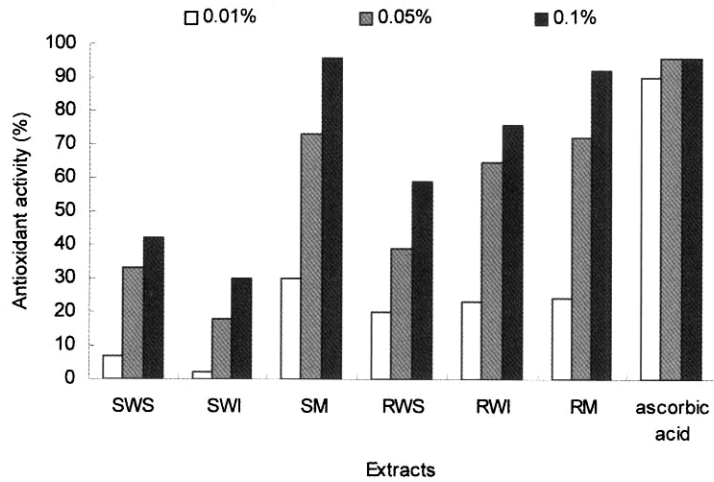


Fig. 4. The effect of free-radical scavenging activity for *Kalopanax pictus* extracts by DPPH method. SWS: water soluble extract from stem bark, SWI: water insoluble extract from stem bark, SM: methanol extract from stem, RWS: water soluble extract from root bark, RWI: water insoluble extract from root bark, RM: methanol extract from root bark.

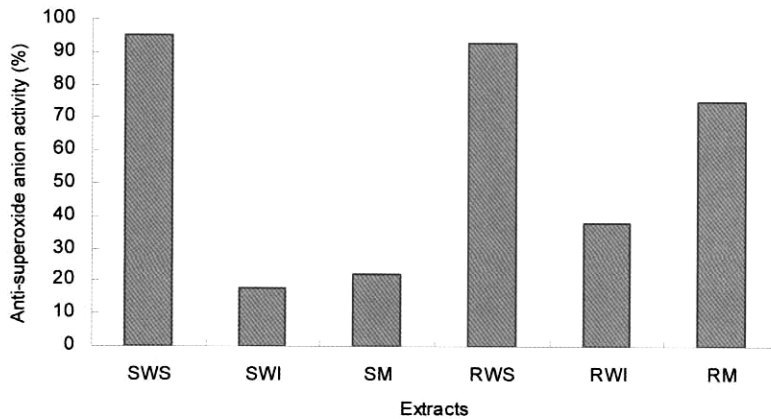


Fig. 5. The effect of anti-superoxide anion activity for *Kalopanax pictus* extracts by NBT method. The extracts concentration used in this experiment is 0.5%. SWS: water soluble extract from stem bark, SWI: water insoluble extract from stem bark, SM: methanol extract from stem, RWS: water soluble extract from root bark, RWI: water insoluble extract from root bark, RM: methanol extract from root bark.

같이 수피의 메탄올 추출물인 SM의 항산화 활성이 가장 우수하였으며, 수피의 불용성 온수 추출물인 SWI의 항산화 활성이 가장 저조하게 나타났다.

생체계에서 발생하는 활성산소 중에는 superoxide anion ($\cdot O_2^-$), 수산화 라디칼($\cdot OH$), 그리고

과산화 수소(H_2O_2) 등이 있다(Batteli 등, 1973). 항산화 활성 측정법 중의 하나인 NBT assay는 이러한 superoxide anion의 소거능을 알 수 있는 실험법이다. 본 실험에서는 음나무 수피와 근피의 추출물 0.5%를 사용하여 측정하였다. Fig. 5에 나타낸 결과

와 같이 음나무 수피와 근피의 가용성 온수추출인 SWI (95%)와 RWI (93%)가 우수한 항산화 활성을 보여주었다.

음나무 추출물에 대한 활성연구로는 항당뇨 효과 (Park 등, 1998)나 병원성 균류에 대한 저해 활성 (Kim 등, 1998) 등에 대한 연구는 행해졌지만 세포 내 활성산소의 제거율에 의한 세포수준 및 화학적 측면에서의 항산화 활성에 대한 연구는 실시되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 음나무 추출물에 대한 다양한 항산화 활성을 측정하여 비교하였다. 세포독성은 RM이 가장 높았으며, 반면에, SWI와 SM의 세포독성이 낮았다. 세포 내 활성산소를 가장 잘 제거하는 추출물은 RWI이었으며 화학적 측면에서 측정된 항산화 활성의 경우, DPPH법에 의한 항산화 활성의 측정에서는 RM의 활성이 우수한 반면, NBT법에 의한 항산화 활성의 측정에서는 SWS가 우수한 활성을 나타내었다. 따라서 앞으로는 이러한 활성을 나타내는 각 성분에 대한 자세한 연구가 필요하다.

4. 결 론

음나무의 용도 개발을 위하여 음나무 수피와 근피 온수 추출물 및 메탄올 추출물에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

측정한 세포독성 실험결과, 음나무 근피의 메탄올 추출물의 세포독성이 가장 강했는데, 50%의 세포 생존율을 나타내는 NR50과 MTT50은 각각 0.0018%와 0.0029%였다. 산화 스트레스 억제효과는 근피의 불용성 온수 추출물인 RWI의 15분 처리에서 57.9%로 가장 우수하였다. DPPH법에 의한 항산화 활성의 측정에서는 1% 추출물에 대해 RM이 96%, SM이 92%, 그리고 RWI가 76%로 활성이 우수한 반면, NBT법에 의한 항산화 활성의 측정에서는 SWS가 95%, RWS가 93%, 그리고 RM이 75%로 우수한 활성을 나타내었다. 즉, 음나무의 여러 추출물 중에서 음나무 근피 불용성 온수추출물 RWI가 여러 항산화 활성 측정법으로 검정한 결과 천연의 항산화제로 이용하기 가장 적절한 추출물이라 여겨진다.

참 고 문 헌

1. 김명조, 김주성, 강원희, 연규동. 2002. 음나무 내피 추출물의 항돌연변이원성 및 세포독성 효과. 약작지. 10: 132~138.
2. 유영근, 정민석, 이윤희, 최종환, 김중희, 백기엽. 2004. 산삼부정근 추출물의 효능·효과에 관한 연구. 대한화장품학회지. 30: 377~383.
3. 이철호, 조동광, 이갑연, 권기원, 최명석. 2002. 한국산 음나무의 Kalosaponins 함량과 이에 영향을 미치는 몇 가지 생장요인. 한국식물생명공학회지. 29: 209~215.
4. 정용진, 노정은, 박난영. 2004. 음나무 껍질 추출물의 저장성에 관한 연구. 한국식품저장유통학회지. 11: 299~303.
5. 홍성수, 한두일, 황방연, 최우희, 강호상, 이명구, 이돈구, 이경순, 노재섭. 2001. 음나무 수피의 화학적 성분. 생약학회지. 32: 302~306.
6. Afonso, V., R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, and A. Lomri. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. Joint Bone Spine. 74: 324~329.
7. Batteli, N. G., E. Lorenzoni, and F. Stripe. 1973. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase): purification and interconversion and some properties. The Biochemical Journal. 131: 191~198.
8. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. Nature. 181: 1199~1200.
9. Borenfreund E. and J. A. Puerner. 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alternations and neutral red absorption. Toxicology Letters. 24: 119~124.
10. Kim, D. W., K. H. Bang, Y. H. Rhee, K. T. Lee, and H. J. Park. 1998. Growth inhibitory activities of kaopanaxsaponins A and I against human pathogenic fungi. Archives of Pharmacal Research. 21: 668~691.
11. Kirby, A. J. and R. J. Schmidt. 1997. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. J. Ethnopharmacol. 56: 103~108.
12. Kumar, S. S., B. Shankar, and K. B. Sainis. 2004. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo.

- Biochim. Biophys. Acta. 1672: 100~111.
13. Lee, C. H., M. S. Choi, and K. W. Kwon. 2000. Variation of kalosponin contents in plant parts and population of native *Kalopanax stemlobus* (Tumb.) Koidz. Kor. J. Pharmacogn. 31: 203~208.
 14. Maxwell, S. J. 1995. Prospects for the use of anti-oxidant therapies. Drugs. 49: 345~361.
 15. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunological Methods. 65: 55~62.
 16. Park, H. J., D. H. Kim, J. W. Choi, J. H. Park, and Y. N. Han. 1998. A potent anti-diabetic agent from *Kalopanax pictus*. Archives of Pharmacal Research. 21: 24~29.
 17. Rosenkranz A. R., S. Schmaldienst, K. M. Stuhlmeier, W. Chen, W. Knapp, and G. J. Zlabinger. 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2,7-dichlorofluorescein-diacetate. J. Immunological Methods. 156: 39~45.
 18. Trayner, L. D., A. P. Rayner, G. E. man, and F. Farzanch. 1995. Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorohydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H₂R123). J. Immunological Methods. 186: 275~284.