

Antioxidant Effect of Citri Reticulatae Pericarpium Extract on Oxidative Stress-Mediated Cytotoxicity In Cultures

Dae-Ho Ha[†]

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

In order to examine oxidative stress of reactive oxygen species and the antioxidant effect of Citri Reticulatae Pericarpium (CRP) extract, human skin melanoma cells were treated with various concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂). Antioxidant effect of CRP extract on H₂O₂-induced cytotoxicity, cell viability, DPPH-radical scavenging activity and superoxide dismutase (SOD)-like activity. In this study, H₂O₂ decreased cell viability of cultured human skin melanoma cells in dose- and time-dependent manners, and then, midcytotoxicity value (MCV) was determined at 60 μM after human skin melanoma cells were cultured for 5 hours in the media containing 20~60 μM of H₂O₂, respectively. The H₂O₂ was on cultured human skin melanoma cells because MCV of H₂O₂ was lower than 100 μM. In the antioxidant effect of CRP extract, CRP extract increased cell viability DPPH-radical scavenging activity and SOD-like activity. From these results, it is suggested that H₂O₂ was very toxic on cultured human skin melanoma cells. And also, CRP extract has the antioxidant effect on H₂O₂-induced cytotoxicity.

Key Words: Cytotoxicity, DPPH-radical scavenging activity, Citri Reticulatae Pericarpium

서 론

귤나무 (*Citrus reticulata* Blanco)는 운향과 또는 귤과 (*Rutaceae*) 식물에 속하는 상록수의 교목으로 일명 귤로 더 잘 알려져 있다 (Kim et al., 2004). 운향과에 속하는 나무에는 초본을 비롯하여 교목이나 관목으로 되어 있으며 특히, 이들은 세포내 유선의 발달로 인하여 독특한 향기를 가지고 있는 것이 특징이다 (Hah et al., 2005). 귤은 중국을 비롯한 남반구와 같은 온대나 열대지방에서 잘 자라며 우리나라에서도 따뜻한 남부지방인 제주도뿐만 아니라 전라남도나 경상남도에서 대량 생산하고 있는데 대개 꽃은 6월에 피며 열매는 반월모양으로 되어 있다. 이들은 또한, flavonoid를 비롯하여 hesperidin, phenol, citral과 같은 약리활성 성분을 포함하고 있으며 각각 독특한 약리작용을 나타내고 있다 (Lee and Lee, 1994). 과피인 진피 (*Citri Reticulatae Pericarpium*)는 귤 또는 근연식물의 성숙과피로 이들이 가지고 있는 성분으로는 citral을 위시하여 limonene, hesperidin과 같은 성분을 가지고 있으

며, 오래전부터 한방에서는 오한이나 화염, 구풍 및 소화 불량과 같은 병변치료에 널리 사용되어 왔다 (Hah et al., 2005). 그 밖에도 항궤양이나 이담작용 및 심혈관확장작용과 같은 다양한 약리활성을 가지고 있어 이들 성분작용에 대하여도 많은 관심의 대상이 되어 왔다 (Calomme et al., 1996). 특히, 최근에는 이들 성분에 vitamin C가 풍부히 들어 있어 항산화나 항노화에 효과적인 약리작용을 나타낸다고 알려지면서 이들 성분에 대한 항산화나 항노화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Han et al., 2006). 특히, 산화적 손상에 대한 이들 성분의 약리활성에 대한 연구는 노화와 밀접한 관련이 있기 때문에 매우 중요한 위치를 차지하고 있다 (Kim et al., 2004). 즉, 하나의 예로서 암세포에 있어 약물에 의해 핵산물질의 하나인 DNA에 손상을 유도하거나 또는 p53이나 p21WAF1, Rb 등과 같은 세포분열에 관여하는 인자를 과활성시켰을 경우 노화형질의 발현이 증가되며 (Chen et al., 1998; Song et al., 2005), 또한 p53-Rb 회로와 같은 세포증식의 억제통로가 활성화 되는 경우 세포내에는 과량의 활성산소가 생성되어 노화의 진행을 촉진시키게 된다고 알려져 있다 (Chen et al., 1995; Manna et al., 1998). 이러한 현상은 정상세포나 암세포의 경우에 있어서 모두 해당되는데 이는 세포내 DNA의 손상이 활성산소의 생성촉진과 밀접한 관련이 있다는 것을 증명해 주고 있음을 말해주고 있

*논문 접수: 2008년 2월 25일

수정재접수: 2008년 3월 15일

[†]교신저자: 하대호, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원

Tel: 031-390-2224, e-mail: hdh@wonkwang.ac.kr

다 (Loft et al., 1994; Hwang, 2002). 지금까지 밝혀진 활성산소에 의한 산화적 손상에 대한 현상으로는 세포막의 구성성분인 하나인 지질을 과산화시켜 막손상을 초래할 뿐만 아니라 (Cao et al., 1988; Michikawa et al., 1994), 세포막 위에 존재하고 있는 칼슘이온과 연관된 glutamate 수용체를 과활성시킴으로서 세포내 칼슘농도의 평행과피 (Mattson et al., 1993) 및 세포내 신호전달체계에 관계하고 있는 protein C (PKC)와 같은 이차전달자의 과활성 등을 통하여 세포를 고사 내지는 퇴화시킴으로서 결국 세포의 고사를 유발한다고 알려져 있다 (Matsumoto et al., 1989). 따라서 활성산소의 산화적 손상에 의하여 유발되는 근위축성측삭경화증 또는 뇌졸중과 같은 질환의 치료에 항산화물질이나 항산화효소의 투여에 의한 치료적 접근을 시도하고 있다 (Ganther, 1980; Rosen et al., 1993; Dawdar et al., 2000). 특히, 식물이나 한약제 등에서 추출한 물질에 속하는 페놀화합물이나 flavonoid의 화합물 중에 강력한 항산화작용을 나타내는 성분이 포함되어 있다고 제시되면서 이에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다 (Lee and Lee, 1994; Calomme et al., 1996). 페놀화합물이나 flavonoid 화합물들은 화학적 구조에 수산기나 알데하이드기와 같은 성분을 가지고 있어 이들이 상호 화학적인 결합을 통하여 항산화 등과 같은 약리활성을 나타낸다고 보고된 바 있다 (Duthie, 1999; Dawidar et al., 2000). 특히, vitamin C 나 vitamin E와 같은 활성산소제거제들도 활성산소의 산화적 손상에 대하여 강력한 항산화 효과가 있어 이에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Ganther, 1980). 그러나 아직까지 활성산소의 산화적 손상에 대한 기전규명이 자세히 이루어져 있지 않으며 특히 배양세포를 재료로한 이에 관한 연구는 많이 연구되어 있지 않다 (Buttke and Sandstrom, 1994). 따라서 본 연구에서는 활성산소의 산화적 손상에 대한 세포독성을 규명하기 위하여 인체피부 흑색종세포 활성산소의 일종인 hydrogen peroxide를 여러 농도의 처리하여 활성산소의 산화적 손상을 colorimetric assay 방법으로 세포생존율을 정량분석하였으며 동시에 진피추출물에 대한 DPPH 자유기제거능 및 superoxide dismutase (SOD) 유사활성능을 측정함으로써 활성산소의 산화적 손상에 대한 진피의 항산화능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

배양용기에 가득 자란 인체피부흑색종세포 (SK-MEL-3)

를 Michikawa 등 (1994)의 방법에 따라 분리 배양하였다. 즉, 0.5% trypsin (Sigma)을 이용하여 분리한 세포를 Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 5×10^6 cells/well의 밀도로 96 배양용기 (well plate)에 분주하였다. 분주가 완료된 세포들은 7일 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였으며 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

2. 제 조

본 실험에 사용한 hydrogen peroxide (H_2O_2 , Sigma)는 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM (minimum essential medium, Sigma) 배양액으로 최종 농도가 10 μM , 100 μM , 500 μM 및 1 mM의 저장액을 만들어 냉장소에 보관하였으며 실험 당일 필요한 농도로 희석 후 사용하였다. XTT [2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt, Sigma]는 실험 전날 500 $\mu g/ml$ 의 저장액을 만들어 냉장보관한 후 실험 당일 최적 농도로 희석하여 사용하였다.

3. 약제추출

굴나무의 성숙과실의 건조과피 300 g을 1,000 ml의 증류수와 함께 냉각기가 부착된 환저플라스크에 넣고 2시간 동안 가열한 후 3,000 rpm에서 20분 동안 원침하였다. 원침이 완료된 후 진공농축기로 감압농축한 다음 동결건조기에서 24시간 동안 건조시켜 25.3 g의 분말을 얻었다.

4. 활성산소의 처리

96 배양용기에 분주한 후 48시간 동안 배양이 완료된 세포에 20 μM 부터 60 μM 까지의 hydrogen peroxide (H_2O_2)가 농도별로 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 H_2O_2 가 인체피부흑색종세포에 미치는 영향을 분석하였다.

5. 추출물의 처리

진피 (Citri Reticulatae Pericarpium, CRP) 추출물이 H_2O_2 에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 인체피부흑색종세포에 H_2O_2 를 처리하기 2시간 전에 CRP 추출물이 130~150 $\mu g/ml$ 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 영향을 세포생존율에 의하여 정량분석 하였다.

6. 세포생존을 분석

XTT의 정량분석을 위하여 진피추출물을 처리하지 않은 배양 인체피부흑색종세포를 5×10^6 세포수를 laminin으로 코팅한 배양용기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 약제를 처리하여 72시간 동안 배양한 다음 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 실험 전날 제조한 XTT를 최종 농도로 희석한 다음 well당 200 μ l씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 효소산물을 추출액으로 처리한 다음 분광광도계로 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

7. DPPH 자유기제거능 정량

Blios (1958)의 방법에 따라 메탄올 (MeOH)에 녹인 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올 용액 100 μ l를 가하여 vortex mixer로 10초간 반응시킨 후 실온에서 30분간 방치하였다. 반응 완료 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유기제거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도인 RC₅₀ (reduction concentration₅₀)으로 나타냈으며 대조군의 흡광도와 실험군의 흡광도 차이에 의한 감소율에 의한 백분율로 표시하였다. 또한 항산화제인 vitamin E에 대한 DPPH 자유기 제거능을 측정하여 시료와 비교 조사하였다.

8. SOD 유사활성능 정량

Marklund와 Marklund (1974)의 방법에 따라 에탄올 (EtOH)에 녹인 시료 0.2 ml에 Tris-HCl buffer와 7.2 mM pyrogallol을 넣어 잘 섞은 후 25°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 1 N HCl로 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하여 시료무첨가군과 시료첨가

군과의 비율에 따른 차이를 백분율로 표시하였다. 또한 항산화제인 ascorbic acid에 대한 SOD 유사활성을 측정하여 시료와 비교 조사하였다.

9. 통계 처리

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test로 비교하였으며 *P*가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. H₂O₂의 세포생존을 분석

1) XTT 정량

(1) 농도에 의한 세포생존을

일정 시간 동안 배양한 인체피부흑색종세포를 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 H₂O₂가 20 μ M에서 60 μ M까지의 농도가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 다음 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 20 μ M H₂O₂의 처리에서 대조군인 100% (4.85±0.32)에 비하여 68.9% (3.34±0.27)로 나타났으며, 40 μ M의 경우 62.7% (3.04±0.21)로 나타났다. 또한 60 μ M H₂O₂의 처리에서는 51.3% (2.49±0.17)로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (*P*<0.05). 이 경우 XTT₅₀ 값은 60 μ M에서 나타났다 (Table 1).

(2) 시간에 의한 세포생존을

처리한 시간에 따른 세포생존율을 조사하기 위하여 XTT₅₀ 농도인 60 μ M H₂O₂의 농도에서 배양 인체피부흑색종세포를 2~6시간 동안 각각 처리 후 세포생존율을 측정된 결과 2시간 동안 배양에 있어서 세포생존율은 대조군인 100% (5.24±0.47)에 비하여 61.8% (3.24±0.31)

Table 1. The cell viability of human skin melanoma cells treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) by XTT assay

Exposure Concentration of H ₂ O ₂ (μ M)	XTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Control	4.85±0.32	100
20	3.34±0.27	68.9
40	3.04±0.21	62.7
60	2.49±0.17	51.3*

The XTT values of cultured human skin melanoma cells treated with concentrations of 20~60 μ M H₂O₂ for 6 hours. The results mean the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. **P*<0.05

Table 2. The cell viability in time-response relationship of hydrogen peroxide (H₂O₂) on cultured human skin melanoma cells

Exposure Incubation time of H ₂ O ₂ (hour)	XTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Control	5.24±0.47	100
2	3.24±0.31	61.8
4	2.88±0.17	55.0
6	2.57±0.20	49.0*

The human skin melanoma cells were treated in the media containing 60 μ M H₂O₂ for 2, 4 and 6 hours, respectively. The results mean the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. **P*<0.05

Table 3. The cell viability of Citri Reticulatae Pericarpium (CRP) extract on human skin melanoma cells treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) by XTT assay

Exposure	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Concentration of CRP (µg/ml)		
Control	4.64±0.37	100
60H ₂ O ₂	0.98±0.07	21.1
130	2.86±0.13	61.6**
150	3.36±0.29	72.4**

The XTT values of cultured human skin melanoma cells pretreated with concentrations of 130~150 µg/ml CRP extract for 2 hours. The results mean the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from H₂O₂-treated group. **P<0.01

로 나타났으며 4시간의 배양에서는 55.0% (2.88±0.17)로 나타났다. 또한, 6시간 배양에서는 세포생존율이 49.0% (2.57±0.20)로 나타났으며 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 2).

2. H₂O₂에 대한 진피추출물의 영향

H₂O₂에 대한 진피 (Citri Reticulatae Pericarpium, CRP) 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 인체피부흑색종 세포에 130~150 µg/ml의 CRP가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 배양한 다음 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 60 µM H₂O₂만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (4.64±0.37)에 비하여 21.1% (0.98±0.07)로 나타난데 비하여 130 µg/ml의 CRP 처리에서는 61.6% (2.86±0.13)로 나타났다 (P<0.05). 또한 150 µg/ml의 처리에서는 세포생존율은 대조군에 비하여 72.4% (3.36±0.29)로 나타나 모두 유의하게 증가하였다 (P<0.01) (Table 3).

3. 진피 (CRP) 추출물의 DPPH 자유기제거능

CRP추출물이 190~220 µg/MtOH로 각각 포함된 시료에 대하여 DPPH 자유기제거능을 조사한 결과 190 µg/MtOH CRP추출물의 처리에서는 71.4%로 나타났으며 220 µg/MtOH 처리에서는 79.7%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다 (P<0.01). 또한 100 µg/MtOH vitamin E의 시료에서는 DPPH 자유기제거능이 88.3%로 나타났다 (P<0.01) (Table 4).

4. 진피 (CRP) 추출물의 SOD 유사활성능

SOD 유사활성을 조사하기 위하여 CRP 추출물 300~350 µg/EtOH 시료에 대하여 활성을 분석한 결과 CRP 추출물 300 µg/EtOH 시료처리에서는 21.3%로 나타났으며

Table 4. The DPPH-radical scavenging activity of Citri Reticulatae Pericarpium (CRP) extract on cultured human skin melanoma cells

Concentration of CRP (µg/MtOH)	DPPH radical scavenging activity (517 nm)
	% of control
190	71.4±5.23**
220	79.7±6.38**
100Vit E	88.3±8.15**

DPPH-radical scavenging activity of CRP extract with methanol (MtOH) compared with vitamin E (Vit E). The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. **P<0.01

Table 5. The superoxide dismutase (SOD)-like activity of Citri Reticulatae Pericarpium (CRP) extract on cultured human skin melanoma cells

Concentration of CRP (µg/EtOH)	SOD-like activity (420 nm)
	% of control
300	21.3±1.62*
350	21.8±1.53*
30ASC	23.7±1.45*

SOD-like activity of CRP extract with ethanol (EtOH) compared with ascorbic acid (ASC). The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *P<0.05

350 µg/EtOH 시료처리에서는 21.8%로 나타나 이는 대조군에 비하여 모두 유의하게 높게 나타났다 (P<0.05). 또한 30 µg/EtOH의 ascorbic acid의 처리에서는 SOD 유사활성이 23.7%로 나타났다 (P<0.05) (Table 5).

고 찰

활성산소는 저산소증이나 허혈시와 같은 외적인 요인에 의하여 발생하지만 (Song et al., 2005), 인체의 정상적인 대사과정과 같은 내적인 요인에 의하여서도 발생되는데 특히, 후자는 인체내의 항산화효소인 superoxide dimutase (SOD)나 catalase에 의하여 소멸되지만 전자의 경우 병적상태로서 이는 세포손상을 초래하게 된다 (Loft et al., 1994; Park et al., 1996). 위에서와 같이 활성산소의 생성은 세포내 사립체의 전자전달계와 밀접한 관련이 있으나 이의 소멸은 인체의 항산화계가 관여하고 있다 (Sugano et al., 1974; Duthie, 1999). 특히, 활성산소는 세포막지방의 과산화를 비롯하여 효소와 단백질의 불활성 및 핵산의 변성 등을 유발함으로써 세포손상을 초래한다 (Chen et al., 1995; Song et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 활성산소의 산화적 손상에 대한 세포독성을 조사하기

위하여 인체피부흑색종세포를 배양한 후 20~60 μM 의 hydrogen peroxide (H_2O_2)가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 이들이 세포생존율에 미치는 영향을 XTT assay에 의하여 정량분석하였다. 그 결과 H_2O_2 는 인체피부흑색종세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 감소, 특히 60 μM 의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 유의하게 감소하였다. 본 실험결과는 H_2O_2 가 배양 인체피부흑색종세포에 독성효과를 가지고 있다는 것을 말해주고 있다. 이같은 본 실험결과는 인체피부흑색종세포에 H_2O_2 를 처리한 결과 세포독성에 의한 세포성장을 정지시켰다는 보고나, H_2O_2 나 okadaic acid를 세포에 처리한 결과 세포고사를 유발하였다는 보고와 일치함을 알 수 있었다 (Chen et al., 1998, Manna et al., 1998). 특히, XTT_{50} 값이 60 μM 에서 나타났는데 이는 Borenfreund와 Puerner (1984)의 독성판정기준에 의하여 H_2O_2 는 인체피부흑색종세포에 고독성인 것으로 나타났다. 위의 연구자들은 화학물질의 세포독성중간값 (midcytotoxicity value, MCV)이 100 μM 이하이면 고독성 (highly-toxic)을 나타낸다고 하였으며, 100~1,000이면 중간독성 (mid-toxic), 1,000~2,000 μM 이면 저독성 (lowly-toxic), 2,000 μM 이상이면 무독성 (non-toxic)으로 분류하였다. 이같은 세포독성은 H_2O_2 가 세포내의 DNA의 손상이나 세포내 칼슘유입 및 지질산화 등과 같은 여러 요인에 의한 결과일 것으로 추측할 수 있겠으나 (Mattson et al., 1993, Song et al., 2005), XTT assay가 세포소기관과 밀접한 관련이 있음을 고려해 볼 때 아마도 H_2O_2 가 세포내 사립체나 내형질세망과 같은 세포소기관의 손상 결과일 가능성이 클 것으로 생각된다 (Sugano et al., 1974; Chen et al., 1998). 한편, 식물이나 한약재로부터 추출한 물질중에는 항산화 작용이나 항암효과에 뛰어난 약리활성을 가지고 있다고 알려져 있다 (Dawidar et al., 2000; Hah et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 H_2O_2 의 독성에 대하여 진피추출물이 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양중인 인체피부흑색종세포에 H_2O_2 를 처리하기 2시간 전에 130~150 $\mu\text{g/ml}$ 의 진피추출물을 처리한 후 추출물이 세포생존율에 미치는 조사한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율이 60 μM H_2O_2 만을 처리한 실험군에 비하여 증가하였다. 특히, 진피추출물의 처리에 있어서는 60 μM H_2O_2 만을 처리한 실험군에 비하여 유의하게 세포생존율의 증가를 나타냈다. 이는 진피추출물이 H_2O_2 의 세포독성에 의하여 손상되는 세포생존율을 증가시킴으로서 세포독성을 방어하였다는 것을 제시해 주고 있다 (Calomme et al., 1996;

Kim et al., 2004). 이같은 결과는 H_2O_2 를 세포에 처리하기 전에 미리 처리한 진피추출물이 세포막을 통과하여 있다가 이 후에 들어온 H_2O_2 를 제거하였거나 또는 H_2O_2 의 세포막 통과를 저해하였을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Chen et al., 1998). 한편, DPPH 자유기제거능이나 SOD 유사활성은 화학약제의 성분이나 추출물 등의 항산화능을 척도할 수 있는 가장 적합한 분석법으로 알려져 있다 (Blosis, 1958; Marklund and Marklund, 1974). 따라서 본 실험에서 진피추출물에 대한 DPPH 자유기제거능을 조사한 결과 190 $\mu\text{g/MtOH}$ 와 220 $\mu\text{g/MtOH}$ 의 시료처리에서 대조군에 비하여 70~79% 이상의 제거능을 보였으며 ($P<0.01$), 이는 100 $\mu\text{g/MtOH}$ vitamin E 시료를 처리한 경우인 88.3%와 거의 비슷하게 나타났다. 또한 SOD 유사활성도의 조사에 있어서는 300 $\mu\text{g/EtOH}$ 와 350 $\mu\text{g/EtOH}$ 진피추출물 시료처리에서 대조군에 비하여 약 21.3%와 21.8%의 SOD 유사활성도를 나타냈으며 ($P<0.05$), 이는 30 $\mu\text{g/EtOH}$ ascorbic acid 시료를 처리한 경우인 23.7%와 거의 비슷하게 나타났다. 이러한 결과는 진피추출물이 항산화효과를 가지고 있다는 것을 말해주고 있다. 그러나 활성산소의 산화적 손상으로 유발되는 세포독성에 관한 현상을 더욱 자세히 규명하기 위해서는 분자세포학을 비롯한 신호전달체계 및 효소화학 등과 같은 다양한 측면에서 종합적인 연구가 체계적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Blois MS. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature*. 1958. 26: 1199-1200.
- 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.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 1994. 15: 7-10.
- Calomme M, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med*. 1996. 62: 222-226.
- Cao UJ, Carney M, Duchan A, Floyd RA, Chevian M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to

- brain. *Neurosci Lett*. 1988. 88: 233-238.
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92: 4337-4341.
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J*. 1998. 332: 43-50.
- Dawidar AM, Ezmiriy ST, Abdel-Mogib M, el-Dessouki Y, Angawi RF. New stilbene carboxylic acid from *Convolvulus hystrix*. *Pharmazie*. 2000. 55(11): 848-849.
- Duthie GC. Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants. *Br J Nutr*. 1999. 81: 425-626.
- Ganther HE. Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci*. 1980. 355: 212-225.
- Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS. Antioxidant effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Korean J Vet Res*. 2005. 45: 341-350.
- Han SH, Woo NRY, Lee SD, Kang MH. Antioxidative and Antibacterial Activities of Endemic Plants Extract in Korea. *Korean J Medicinal Crop Sci*. 2006. 14: 49-53.
- Hwang ES. Induced replicative senescence and senescence-like state of cancer-derived cells. *Mech Ageing Dev*. 2002. 123: 1681-1694.
- Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol*. 2004. 36: 333-338.
- Lee JH, Lee SR. Analysis of phenolic substance content in Korean plant food. *Korea J Food Sci Technol*. 1994. 26: 310-316.
- Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J*. 1994. 8: 534-537.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem*. 1998. 273: 13245-13254.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974. 47: 468-474.
- Matsumoto H, Sasaki Y. Staurosporine, a protein kinase C inhibitor interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989. 158: 105-109.
- Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. Mechanism of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury: Implications for treating neurodegenerative disorders. *J Exp Neurol*. 1993. 124: 89-95.
- Michikawa M, Lim KT, McLamorn JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res*. 1994. 37: 62-70.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol*. 1996. 17: 37-46.
- Rosen D, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated lateral familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993. 362: 59-62.
- Song YS, Lee BY, Hwang ES. Distinct ROS and biochemical profiles in cells undergoing DNA damage-induced senescence and apoptosis. *Mech Ageing Dev*. 2005. 126: 580-590.
- Sugano T, Oshino N, Chance B. Mitochondrial functions under hypoxic conditions: The steady state of cytochrome C reduction and energy metabolism. *Biochem Biophys Acta*. 1974. 347: 340-358.