

The Effect of *Chrysanthemum morifolium* L. Extract on Cultured Neuroglial Cells Damaged by Glucose Oxidase

Young-Mi Seo¹, Seung-Taeck Park², Yo-Sup Rim³,
Ok-Bong Chung⁴, and Seung-Joo Jekal⁵

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea¹

Department of Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea²

Department of Bioenvironment, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea³

Department of Clinical Pathology, Jeonju Kijeon College, Jeonju 560-701, Korea⁴

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea⁵

To clarify the oxidative stress of reactive oxygen species (ROS) and the effect of *Chrysanthemum morifolium* L. (CM) flower extract on the cultured neuroglial cells (C6 glioma) damaged by ROS, cell adhesion effect was measured by colorimetric assay after cultured C6 glioma cells were treated with various concentrations of glucose oxidase (GO) for 5 hours. For the antioxidative effect of CM flower extract, cell adhesion activity (CAA), superoxide dismutase (SOD)-like activity and lactate dehydrogenase (LDH) activity were assessed against GO-induced cytotoxicity on same cultures. In this study, GO remarkably decreased CAA dose-dependently, and the XTT₉₀ and XTT₅₀ values were measured at 15 mU/mL and 50 mU/mL following the treatment of C6 glioma cells with 5~60 mU/mL of GO. The CM flower extract significantly increased cell adhesion activity damaged by GO-induced cytotoxicity, and it also showed the SOD-like activity and the decrease of LDH activity. From these results, it is suggested that GO was cytotoxic on cultured C6 glioma cells, and CM flower extract showed antioxidative effects as shown by the increased CAA, SOD-like activity and the decrease of LDH activity on GO-induced cytotoxicity on the same cultures.

Key Words : Cell adhesion activity, Antioxidative effect, Oxidative stress

서 론

국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 국화과(*Compositae*)에 속하는 여러 해살이 식물로써 거의 1 m 정도로 성장

Corresponding author: Jekal, Seung-Joo, Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea.

Tel: 063-840-1215.

E-Mail: sjjei@wkhc.ac.kr

본 연구는 2010년도 순천만 청정자원 특성화 사업단(RIS)의 연구지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

Received : 3 June 2011

Return for modification : 16 June 2011

Accepted : 20 June 2011

하게 된다(Moon과 Park, 1995). 국화는 현화식물 중 진화가 가장 잘 된 식물군으로서 오랫동안 관상식물로 이용되어 왔을 뿐만 아니라 다른 식물보다 사람과 가장 친근한 식물중의 하나이다(Lee 등, 2009). 국화를 비롯한 국화과 식물에는 각시취(*Saussurea pulchella*)를 비롯하여 톱풀(*Achillea sibirica*), 목향(*Inula helenium*) 및 민들레(*Taraxacum platycarpum*)등 다양한 종들이 있으며 우리나라에서 만도 대략 80속 379종이 서식하고 있다(Woo 등, 2009). 대부분 국화과 식물은 정유를 가지고 있어 향이 좋으며, 그 밖에도 alkaloid를 비롯한 glycoside, flavonoid 및 polyphenol 등 다양한 성분들이 포함되어 있다(Lee 등, 2008). 국화는 가을에 개화하며 그 해에 채취하는데 주로 꽃을 약용으로 사용하고 있다(Han, 2003; Woo 등, 2009). 잎은 서로 어긋나게 달리

며 잎자루를 가지고 있을 뿐만 아니라 난원형의 깃꼴을 하고 있다(Moon과 Park, 1995; Kim 등, 2006). 국화의 꽃과 줄기에는 아데닌이나 스타키드린과 같은 성분을 가지고 있으며(Lee 등, 2009), 그 밖에도 중추신경을 마비시키거나 또는 해열작용에도 효과적인 성분 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Han, 2003; Kobayasi 등, 2003). 국화의 성질은 서늘하면서도 달고 쓰며, 해독, 소염, 진통, 해열, 두통 및 거풍작용 등에 효과적인 다양한 성분들이 함유되어 있어 각종 질환의 치료에 널리 사용되어 왔다(Yoon 등, 2007; Woo 등, 2009). 예로서, 고혈압 초기의 현기증 완화를 비롯하여 관상동맥의 확장과 같은 활혈작용, 눈의 염증에 대한 항염작용, 열발산의 청열작용과 같은 다양한 질환에 적용되어 왔다(Velioglu 등, 1998; Lee 등, 2009). 국화는 주로 꽃을 약용으로 사용하여 왔는데 주로 흰꽃과 노란꽃이 사용되었으며 단맛이 날수록 더욱 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다(Han, 2003; Ju 등, 2006). 한편, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 손상은 세포를 손상시켜 세포자멸사(apoptosis)와 관련이 있는 protein kinase C (PKC) 나 mitotic activation protein (MAP) kinase 등을 자극할 뿐만 아니라(Mucial 등, 1995), c-fos 발현이나 caspase-1과 같은 신호전달체계를 활성화시킴으로서 세포퇴화를 유발하는 동시에 노화의 요인으로도 작용한다고 알려져 있다(Mattson 등, 1993; Ozdil 등, 2004). 더우기, 이들은 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)을 비롯한 치매 및 고혈압등과 같은 각종 난치병의 병인으로도 작용한다고 알려져 있다(Rosen 등, 1993; Lima 등, 2002). 인체 내에는 ROS의 산화적 손상에 대한 방어수단으로 항산화계가 있는데(Kikuzaki와 Nakatami, 1993), 이는 인체 내에 ROS가 생성될 경우 즉시 이를 제거할 수 있는 항산화효소(antioxidant)들을 가지고 있다(Ding 등, 2004). 예를 들면 대사과정 중 hydroxyl radical (OH^\cdot)이나 superoxide (O_2^\cdot)와 같은 자유기(free radicals)가 형성될 경우(Michikawa 등, 1994; Loft 등, 1994), superoxide dismutase (SOD)나 catalase 또는 glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소에 의하여 물로 변환됨으로서 인체를 보호하게 된다(Park 등, 1995; Ding 등, 2004). 최근 다양한 식물 추출물들에서 항산화 효과가 뛰어난 성분들이 다량 함유되어 있다고 보고되

서 이를 이용한 노화나 질환에 대한 치료적 접근이 시도되고 있다(Han 등, 2006; Gates 등, 2007). 국화꽃차나(Lee 등, 2009), 또는 국화과 식물인 홍화(*Carthamus tinctorius*)(Lee 등, 2004), 톱풀(*Achillea sibirica*) 등과 같은 추출물에 대한 항산화 활성이 보고됨에도 불구하고(Moon과 Park, 1995; Han, 2003), 아직까지 국화꽃추출물의 항산화나 또는 항독과 같은 효능기전이나 작용에 대한 연구는 그리 많이 되어 있지 않다.

본 연구는 국화꽃(*Chrysanthemum morifolium*, CM)추출물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 신경교종세포(C6 glioma)를 배양한 후 ROS의 일종인 glucose oxidase (GO)에 대한 추출물의 영향을 세포부착율(cell adhesion activity, CAA)을 비롯하여 superoxide dismutase (SOD)-유사활성 및 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 배양세포

본 실험에 사용한 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양한 신경교종세포(C6 glioma)를 사용하였다.

2) 시약 제조

본 실험에 사용한 glucose oxidase (GO)와 pyrogallol은 Sigma사(St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 혈청이 들어 있지 않은 minimum essential medium(MEM, Gibco Co. U.S.A.)으로 각각 10 mU/mL, 50 mU/mL, 100 mU/mL 및 200 mU/mL 등의 stock solution을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석한 후 본 실험에 사용하였다. XTT(2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt, Sigma Co. USA.)는 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하여 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 필요한 양을 직접 배양액에 넣어 사용하였다.

2. 방법

1) 국화꽃 추출

국화꽃은 전남 함평군 수호리에 위치하고 있는 농장에서 재배중인 국화(*Chrysanthemum morifolium L.*, CM)꽃을 채취하여 원광대학교 생명과학연구소에서 동정 확인하였다. 국화꽃 34.8 g을 3배가량의 에탄올을 가하여 24시간 동안 4회 반복하여 추출 냉각하였다. 추출이 완료된 후 여과된 액을 모아 진공농축기에서 감압 농축시킨 후 3.2 g의 시료를 얻었다.

2) 세포 배양

본 실험에 사용한 C6 glioma세포의 배양은 Leung 등(2007)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 효소 해리술을 이용하여 배양용기에 부착된 세포를 배양용기로 부터 분리하였다. 분리된 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma)이 함유된 MEM 배양액에 부유시킨 다음 세포밀도가 1×10^5 가 되도록 산정하여 96-well plate에 넣었다. 일정 수 만큼 배양용기에 심어진 세포들은 96시간 동안 36°C, 5% CO₂/95% O₂로 조절된 정온기 내에서 배양하였다.

3) GO의 처리

GO를 배양 중인 C6 glioma세포에 5 mU/mL에서 20 mU/mL까지의 농도를 각각 처리한 후 5시간 동안 배양한 다음 세포부착률로 이의 영향을 조사하였다.

4) 세포부착률(CAA) 분석

세포부착률은 Borenfreund 등(1988)의 방법에 따라 배양 중인 C6 glioma세포에 GO나 또는 국화꽃추출물을 농도별로 처리한 세포에 실험 전에 만든 XTT 50 µg/mL를 well당 100 µL씩 넣은 후 4시간 동안 배양하였다. 배양완료 후 물질추출액을 넣고 상온에서 10분간 정지한 다음 450 nm로 조절된 ELISA reader에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

5) SOD-유사활성 측정

Superoxide dismutase (SOD)-유사활성의 측정은 Marklund와 Marklund (1974)의 방법에 따라 행하였다. 국화꽃

추출물의 에탄올시료에 Tris-HCl 완충액과 7.2 mM pyrogallol을 넣은 후 10분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 반응정지액을 넣어 반응을 정지시킨 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 양성대조군으로 vitamin E를 사용하였으며 SOD-유사활성 측정은 시료 첨가군과 시료 무첨가군의 흡광도 차이에 의한 백분율로 표시하였다.

6) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정

GO나 국화꽃추출물을 배양 C6 glioma세포에 일정 시간 동안 처리한 후 배양액을 250 µg에서 10분간 원침시킨 후 50 µL의 상층액을 취하여 LDH CytoTox detection kit(Asan Co, Seoul Korea)의 반응용액(0.05 U/mL) 50 µL를 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응완료 후 490 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

7) 국화꽃추출물 처리

GO에 대한 국화꽃추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 C6 glioma세포에 GO를 처리하기 2시간 전에 국화꽃추출물이 각각 130 µg/mL와 150 µg/mL로 포함된 배양액에서 배양한 다음 이의 영향을 조사하였다.

3. 통계처리

실험 자료에 대한 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며 자료의 유의성은 p-value가 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 세포부착률(CAA)의 CAA₉₀ 값 측정

배양 C6 glioma세포에 GO가 미치는 초기독성 농도인 CAA₉₀ 값을 측정하기 위하여 GO가 5, 15, 20 mU/mL의 농도로 각각 포함된 배양액에서 C6 glioma세포를 5시간 동안 처리한 후 이에 대한 영향을 대조군과 비교 조사하였다. 본 실험에서 GO는 배양 세포에 처리한 농도에 상응하여 세포부착율이 감소시켰으며, 이 때 세포에 독성을 나타내기 시작하는 CAA₉₀ 농도는 각각 15 mU/mL의 처리에서 나타났다 (Table 1).

Table 1. The cell adhesion activity (CAA₉₀) of glucose oxidase (GO) on cultured C6 glioma cells

Treatment Concentration of GO (mU/mL)	CAA ₉₀ assay (450 nm)	
	Mean ± SD*	(% of control)
Control	5.58 ± 0.47	100
5	5.41 ± 0.63	97.0
15	5.02 ± 0.51	90.0
20	4.86 ± 0.39	87.1

*The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

2. 세포부착률 (CAA)의 CAA₅₀ 값 측정

GO가 배양 C6 glioma세포에 미치는 중간값(midcytotoxicity value, MCV)인 CAA₅₀을 세포부착률에 의하여 측정하기 위하여 GO가 40, 50, 60 mU/mL의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양 세포를 처리한 후 이에 대한 영향을 대조군과 비교 조사하였다. 본 실험에서 GO는 처리 농도에 비례하여 세포부착율을 감소하였으며, 특히 50 mU/mL ($p < 0.01$)와 60 mU/mL ($p < 0.001$)의 농도에서는 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 이 때 세포에 독성을 나타내기 시작하는 CAA₅₀ 농도는 50 mU/mL의 처리에서 나타났다(Table 2).

3. 국화꽃추출물이 GO의 산화적 손상에 미치는 영향

국화꽃추출물이 GO의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 GO의 ACC₅₀ 농도를 배양 C6 glioma세포에

Table 2. The cell adhesion activity (CAA₅₀) of glucose oxidase (GO) on cultured C6 glioma cells

Treatment Concentration of GO (mU/mL)	CAA ₅₀ assay (450 nm)	
	Mean ± SD*	(% of control)
Control	3.23 ± 0.30	100
40	2.53 ± 0.17	78.3
50	1.64 ± 0.18	50.8 [†]
60	1.29 ± 0.11	39.9 [‡]

*The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

[†] and [‡] are significantly different from the control at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Table 3. The protective effect of *Chrysanthemum morifolium* L. (CM) flower extract on cultured C6 glioma cells injured by glucose oxidase (GO)-induced cytotoxicity

Concentration CM flower extract (μg/mL)	CAA assay (450 nm)	
	Mean ± SD*	(% of control)
Control	0.36 ± 0.04	100
GO(CAA ₅₀)	0.15 ± 0.01	41.7
130	0.27 ± 0.03	75.0 [†]
150	0.30 ± 0.05	83.3 [‡]

*The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

[†] and [‡] are significantly different from the control at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

처리하기 전에 130 μg/mL와 150 μg/mL의 국화꽃추출물이 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 처리한 세포부착률을 조사하였다. 그 결과 GO만의 처리에 있어서 세포부착률은 대조군인 100% (0.36 ± 0.04)에 비하여 41.7% (0.15 ± 0.01)로 나타났다. 반면, 130 μg/mL과 150 μg/mL의 국화꽃추출물을 각각 처리한 경우 세포부착률이 75.0% (0.27 ± 0.03) ($p < 0.01$)와 83.3% (0.30 ± 0.05) ($p < 0.001$)로 GO만을 처리한 경우에 비하여 모두 유의한 증가를 보였다(Table 3).

4. LDH 활성 측정

GO에 대한 국화꽃추출물의 LDH 활성을 측정하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 각각 120 μg/mL와 150 μg/mL의 국화꽃추출물을 2 시간 동안 전처리한 후 LDH 활성을 조사하였다. GO만의 처리에서는 LDH 활성이 134.4%로 대

Table 4. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of *Chrysanthemum morifolium* L. (CM) flower extract on GO-induced cytotoxicity measured at a wavelength of 570 nm

Concentration of CM flower extract (μg/mL)	Lactate dehydrogenase activity* (570 nm)	
	% of control	
Control	100 ± 7.8	
GO (CAA ₅₀)	134.4 ± 14.1	
120	97.9 ± 9.2 [†]	
150	71.3 ± 8.6 [‡]	

*The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments.

[†] and [‡] are significantly different from the control at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Table 5. Superoxide dismutase (SOD)-like activity of *Chrysanthemum morifolium* L. (CM) flower extract GO-induced cytotoxicity measured at a wavelength of 420 nm

Concentration of CM flower extract ($\mu\text{g/mL}$)	SOD-like activity* (420 nm)
	% of control
25 μM vitamin E	25.0 \pm 2.13 [†]
100	43.5 \pm 3.75 [†]
130	45.5 \pm 4.10 [‡]

*The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. † and ‡ are significantly different from the control at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

조균에 비하여 매우 증가한 반면, 120 $\mu\text{g/mL}$ 과 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 국화꽃추출물의 처리에서는 LDH 활성이 각각 97.9% ($p<0.01$)와 71.3% ($p<0.001$)로 GO만의 처리에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 4).

5. SOD-유사활성 측정

국화꽃추출물이 SOD-유사활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 국화꽃추출물의 시료 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 130 $\mu\text{g/mL}$ 를 각각 배양 C6 glioma 세포에 각각 2시간 동안 전처리한 후 SOD 활성을 조사하였다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 국화꽃추출물 시료에서는 SOD-유사활성이 대조군에 비하여 43.5%로 유의한 증가를 나타냈다($p<0.01$). 또한 130 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리에서는 45.5%로 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다($p<0.001$). 특히, 100 $\mu\text{g/mL}$ 과 130 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리에 있어서 SOD-유사활성은 비교군인 25 μM vitamin E의 활성인 25.0% ($p<0.05$)에 비하여 약 2배 정도의 활성을 나타냈다(Table 5).

고 찰

GO의 세포독성을 조사하기 위하여 GO가 5-60 mU/mL로 각각 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 결과 GO의 처리농도에 비례하여 세포부착률(CAA)이 감소하였으며 특히, 50 mU/mL ($p<0.01$)와 60 mU/mL ($p<0.001$)의 농도에서는 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. 또한 CAA₅₀과

CAA₅₀ 값은 각각 15 mU/mL와 50 mU/mL의 농도에서 나타났다. 본 실험 결과는 Bak 등(2003)이 배양 혈관내피세포에서 GO의 세포독성을 보고한 결과와 일치하였으며, 이 같은 GO의 세포독성은 GO의 산화적 손상에 의한 세포내 소기관의 손상이나 또는 지질과산화반응에 의한 세포막에 손상을 줌으로서 세포손상을 초래하여 그 결과 세포부착률을 감소시켰을 것으로 생각된다(Mosmann, 1983; Borenfreund와 Puerner, 1984). 이에 대한 또 하나의 가능성은 GO의 산화적 손상이 세포내의 항산화효소의 활성을 저해시킴으로서(Kim 등, 2002), 그 결과 세포손상이 초래되어 세포가 퇴화 내지는 세포사멸사된 결과일 가능성도 배제 할 수는 없다.

한편, GO의 산화적 손상에 대한 국화꽃추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 국화꽃추출물이 130 $\mu\text{g/mL}$ 와 150 $\mu\text{g/mL}$ 로 포함된 배양액으로 전처리한 결과 GO만의 처리인 41.7%에 비하여 세포부착률이 각각 75% ($p<0.01$)와 83.3% ($p<0.001$)로 나타나 모두 유의한 증가를 나타냈다(Table 3). 본 실험에서 국화꽃추출물이 GO의 산화적 손상에 대한 방어효과를 보인 것은 아마도 국화꽃추출물에 함유된 폴리페놀이나 플라보노이드와 같은 성분들의 항산화능으로 인하여 GO의 산화적 손상을 방어한 결과이거나(Lavid 등, 2001; Lee 등, 2009), 또는 국화꽃추출물이 GO에 의하여 활성이 감소된 세포내 항산화효소의 활성을 증가시킨 결과일 것으로 생각된다(Lee 등, 2008). 한편, GO의 산화적 손상에 대한 국화꽃추출물의 영향을 막의 지질과산화 측면에서 알아보기 위하여 LDH 활성을 조사하였다. 그 결과 국화꽃추출물이 120 $\mu\text{g/mL}$ 와 150 $\mu\text{g/mL}$ 로 포함된 배양액으로 배양 세포를 전처리한 결과 GO만의 처리인 134.4%에 비하여 LDH 활성이 각각 97.9% ($p<0.01$)와 71.3% ($p<0.001$)로 나타나 모두 유의한 감소를 나타냈다(Table 3). 본 실험 결과는 국화꽃추출물이 GO에 대한 항산화 효과를 가지고 있다는 것을 증명하고 있으며(Woo 등, 2009), 이는 국화꽃추출물이 GO의 산화적 손상에 의한 막의 지질과산화(Yamamoto 등, 1983)를 방어함으로써 LDH 활성을 감소시켰을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 국화꽃추출물에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 SOD-유사활성을 조사하였다. 본 실험에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 130 $\mu\text{g/mL}$ 의 국화꽃시료의 처리에서 SOD-유사활성은 대조군에 비하여 각

각 43.5%와 45.5%로 나타나 이는 모두 유의한 활성증가를 나타냈다($p < 0.01$). 특히, 비교군으로 사용된 vitamin E는 25 μM 에서 25% ($p < 0.05$)의 SOD-유사활성을 보임으로서 본 실험에서 분석한 국화꽃시료활성의 절반 정도의 활성을 보였다(Table 5). 위의 결과는 국화꽃추출물이 SOD-유사활성을 나타냄으로서 항산화 효과를 가지고 있음을 증명하고 있다.

본 실험 결과로 부터 국화꽃추출물이 GO의 산화적 손상을 효과적으로 방어함으로서 항산화 효과가 있음을 말해 주고 있다(Krizkova 등, 2000; Han, 2003). 그러나 GO와 같은 활성산소의 산화적 손상에 대한 세포독성이나 천연추출물의 성분에 대한 약리활성에 대한 기전규명은 세포내 전자전달계를 비롯한 세포수용체 및 항산화계와 같은 측면에서 더 많은 연구가 되어야 할 필요성이 있다고 생각한다.

참고문헌

- Bak SM, Lee JH, Yang HW, Lee KC. Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* on the Vasculotoxicity induced by glucose oxidase in cultured Pumonary Endothelial cells. *Korean J Oriental Physiol Pathol.* 2003, 17(1):136-139.
- 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.
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro.* 1988, 2(1):1-6.
- Ding WQ, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Mol Cancer Ther.* 2004, 3(9):1109-1117.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J cancer.* 2007, 121(10):2225-2232.
- Han WS. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Chrysanthemum boreale Makino*. *Korean J Med Crop Sci.* 2003, 11:1-4.
- Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, Song HJ. The Effect of Poncirin on Hexavalent Chromium in NI-H3T3 Fibroblasts in Vitro. *Korean J Herbol.* 2006, 21(1):101-107.
- Ju JC, Shin JH, Lee SJ, Cho HS, Sung NJ. Antioxidant activity of hot water extracts from medicinal plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006, 35:7-14.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993, 58:1470-1410.
- Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeog JM. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2006, 49:328-333.
- Kim HS, Lee YS, Oh SK, Lee KC, Lee GM, Lee J, Lee SB, et al. Effect of *Ramulus et Uncus Uncariae* on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons. *Korean J Oriental Physiol Pathol.* 2002, 16(5):1016-1019.
- Kobayasi Y, Nakano Y, Inayama K, Sakai A, Kamiya T. Dietary intake of the flower extracts of german chamomile (*Matricaria recutita L.*) inhibited compound 48/80-induced itch-scratch responses in mice. *Phytomedicine.* 2003 10:657-664.
- Krizková L, Nagy M, Polónyi J, Dobias J, Belicová A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res.* 2000, 469(1):107-114.
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta.* 2001, 212:323-331.
- Lee MS, Lee SH, Song KB. Effect of various natural antioxidants on the safflower oil. *Korean J Food Preserv.* 2004, 11:126-129.
- Lee SE, Sung JS, Jang IB, Kim GS, Ahn GH, Han HS, Kim JE, et al. Investigation on antioxidant activity in plant resources. *J Med Crop Sci.* 2008, 16:356-370.
- Lee SH, Hwang IG, Nho ZW, Chang YD, Lee CH, Woo KS, Jeong HS. Quality characteristics and antioxidant activity of *Chrysanthemum indicum, L.*, *Chrysanthemum boreale M* and *Chrysanthemum zawadskii K.* powdered teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009, 38:824-831.
- Leung HW, Lin CJ, Hour MJ, Yang WH, Wang MY, Lee HZ. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol.* 2007, 45(10):2005-2013.
- Lima TM, Kanunfire CC, Pompeia C, Verlengia R, Curi R. Ranking the toxicity of fatty acids on jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro.* 2002, 16(6):741-747.
- Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* 1994, 8:534-537.
- 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.

22. 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, 121:1–133.
23. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res*. 1994, 37:62–70.
24. Moon JH, Park KH. Functional components and physiological activity of tea. *J Korean Tea Sci*. 1995, 1:175–191.
25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 1983, 65:55–63.
26. Musial A, Mandal A, Coroneos E, Kester M. Interleukin-1 and endothelin stimulate distinct species of diglycerides that differentially regulate protein kinase C in mesangial cells. *J Biol Chem*. 1995, 270:21632–21638.
27. Ozdil S, Yanardag R, Koyuturk M, Bolkent S, Arbak S. Protective Effects of Ascorbic Acid, di-a-Tocopherol Acetate, and Sodium Selenate on Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury of Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2004, 99(1–3):173–190.
28. Park YJ, Kang MH, Kim JL, Park OJ, Lee MS, Jasng HD. Changes of vitamin C and superoxide dismutase (SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition. *Korean J Food Sci Technol*. 1995, 27:281–285.
29. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, *et al*. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)*. 1993, 362:59–62.
30. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem*. 1998, 46:4113–4117.
31. Woo JH, Shim SL, Chang YD, Lee CH. Screening for Antioxidant Effects of Part Extracts Obtained from Sixteen Compositae Species. *Flower Res J*. 2009, 17(4):271–278.
32. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpha-tocopherol administration. *Stroke*. 1983, 14:977–982.
33. Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, Park HR. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. *Korean J Pharmacogn*. 2007, 38:84–89.