

파인엑솔이 과산화수소로 유도된 SK-N-MC 세포와 뇌졸중 백서 모델에서의 보호효과

홍순오 · 한경훈* · 이승희* · 김도희* · 송관영 · †한성희**

서울의료원 신경외과, * 서울의료원 의학연구소, ** 고려대학교 보건과학대학 생물신소재연구소

Protective Effect of PineXol[®] on Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis on SK-N-MC Cells and Focal Ischemia Rodent Models

Soon-O Hong, Kyung-Hoon Han*, Seung-Hee Lee*, Doh-Hee Kim*, Kwan-Young Song and †Sung-Hee Han**

Dept. of Neurosurgery, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

*Research Institute, Seoul Medical Center, Seoul 02053, Korea

**Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the protective effect of PineXol[®] on H₂O₂-induced cell death in SK-N-MC cells, and in early stage focal ischemia rodent model. SK-N-MC cells were pre-treated with 200 μM H₂O₂ or various concentrations of PineXol[®] (10, 30, and 50 pg/mL) for 24 h, and then exposed to H₂O₂ for 3 h. Cell death was assessed by the CCK-8 assay, reactive oxygen species (ROS) assay, and lactate and dehydrogenase (LDH) release assay. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) expressions were also analyzed by western blotting. Focal ischemia rodent model was used as the *in vivo* model, and different concentrations of PineXol[®] (1, 10, and 100 mg/kg) were administered. One week after administration, reduction of infarct volume was analyzed by TTC staining. Cell viability of H₂O₂-treated SK-N-MC cells significantly increased by pre-treatment of PineXol[®] ($p < 0.05$). PineXol[®] pre-treatment also induced significant decrease of ROS and LDH expressions. However, PineXol[®] did not affect the infarct volume. These results suggest that PineXol[®] has significant neuroprotective effect *in vitro*, but statistical significance was not confirmed in the *in vivo* focal ischemia model.

Key words: PineXol[®], SK-N-MC cell, focal ischemia rodent models, neuroprotection

서 론

생체 내 생성되는 활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 미토콘드리아에서 ATP를 만들어내는 과정에서 일정량 발생하며, 그로 인해 세포 내 유전자 발현, 세포 활동 등을 조절하는 신호전달 물질이지만, 과잉 생성되게 되면 단백질과 DNA 손상, 세포의 사멸과 이상 증식, 그리고 조직이나 기관들을 손상시켜 노화와 각종 질병들을 유발하는 주요 원인으로 알려져 있다(Duran 등 2002; Yong 등 2007; Park & Kweon

2013). 그 중 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병, 심혈관 질환, 암, 노화와 관련성이 높다고 보고되었으며(Alfadda & Sallam 2012), 이에 따라 체내에 생성되는 ROS를 제거하기 위하여 합성 항산화제 등이 초기에는 많이 사용되었으나, 발암과 독성으로 인한 인체에 대한 안정성에 문제가 있다는 것이 알려지게 되면서 그 사용이 감소하고 있다(Branen AL 1975; Ito 등 1983). 최근 들어서 인체에 무해한 비타민(vitamin), 카테킨(catechin), 플라보노이드(flavonoid) 등과 같은 천연 항산화제를 임상에 적용함으로써(Devasagayam 등 2004), 다양한 질병

† Corresponding author: Sung-Hee Han, Institute for Biomaterials, College of Health Science, Korea University, Seoul 02841, Korea. Tel: +82-2-940-2764, Fax: +82-2-2276-7435, E-mail: sungheeh3@gmail.com

에 약제로 사용하려는 노력들이 시도되고 있다(Kalt W 2006; Anna 2011 등; Kamel 2014 등). 국내에서도 복분자 추출물, 윈터체리 추출물, 청국장 추출물 등의 안전성이 확보된 천연 물질들을 이용한 항산화제의 효능이 보고되고 있다(Min 등 2008; Jeon 등 2009; Kim 등 2015).

뇌혈관 질환은 우리나라 사망원인의 단일질환으로 1위를 차지하고 있으며, 5년 이내에 심혈관계 질환과 뇌졸중의 재발률이 증가하는 것으로 알려져 있다(Lee 등 2010). 현재 국내에 발병되는 뇌졸중의 80%는 서구화된 식습관, 흡연, 음주, 운동부족, 스트레스 등으로 인한 허혈성 뇌졸중으로 보고되었다(Sung 등 2009).

이는 환경적 요인들로 인하여 체내의 활성산소의 양이 증가되어 체내의 항산화 시스템이 산화 스트레스에 의해 발생하는 손상을 방어하지 못하기 때문이며(Valko 등 2007), 체내 항산화능을 높이기 위해 과일과 야채를 섭취하는 것(Alexandrova & Bochev 2005)과 생리활성 펩타이드를 섭취해야 하는 것으로 보고되었다(Sarmadi & Ismail 2010).

소나무 껍질은 폴리페놀 성분을 많이 함유하고 있어 항산화 효과, 항염증 작용 그리고 면역력 증진 등과 같은 여러 종류의 생리활성 효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다(Roh-dewald PA 2002). 대표적인 외국인 제품인 피크노제놀(pycnogenol)의 경우, 프랑스산 해송 껍질에서 추출한 추출물로, 카페인산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 등과 같은 다양한 페놀산을 함유하고 있어 항산화 효과가 매우 뛰어나다고 알려져 있으며(Hasegawa N 2002; Saliou 등 2002), 국내에서도 동해안의 적송 껍질 추출물(파인엑셀, PineXol[®])을 개발하여 2006년도에 상품화 하였다(Choi 등 2007). 그러나 피크노제놀의 경우, 여러 나라에서 다양한 생리활성과 임상적 효능에 대한 수백 편의 연구논문들이 보고된 반면에, 국내 적송 껍질 추출물(PineXol[®])의 경우 피부 노화와 지방세포 분화 억제에 관한 연구가 보고되고 있으나, 아직 본격적인 연구는 미흡한 실정이다(Lee 등 2013).

이에 본 논문에서는 PineXol[®]를 이용하여 과산화수소로 유발된 산화 스트레스 상태의 SK-N-MC 신경세포와 허혈성 뇌졸중 백서 모델에서 효과를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 소나무 껍질 추출물(PineXol[®])은 뉴트라팜(주) (NutraPharm Co., LTD, Gangneung, S. Korea)로부터 제공받아 사용하였으며, 농도에 따라서 3차 증류수에 희석한 후, 0.2 µm 실린지 필터를 이용하여 여과한 후 본 실험에 사용하였다. SK-N-MC 신경세포주는 한국세포주은행에서 구입하여 DMEM 배

지(Gibco, Grand Island, NY)에 5% FBS와 1% penicillin과 streptomycin을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 산화 스트레스 유도

SK-N-MC 신경세포에서 과산화수소로 인한 산화 스트레스를 알아보기 위해 96-well plate에 3×10^3 cells/well의 농도로 세포를 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 상태에서 24시간동안 배양하였다. 배양된 SK-N-MC 신경세포에 과산화수소를 100~1,000 µM의 농도로 각각 3시간씩 각각 처리하였다. 이 후 CCK-8 assay kit(CK04-01, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader(SUNRISE BASIC TECAN, TECAN Co., AUSTRIA)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 산화 스트레스로 인하여 세포사멸이 유의적으로 차이가 나는 과산화수소 농도를 본 연구에 사용하였다.

3. 세포 생존율 측정

SK-N-MC 신경세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서 96-well plate에 3×10^3 cells/well의 농도로 세포를 분주한 후, PineXol[®]의 농도가 10, 30, 50 pg/mL인 배양액에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양된 후 각각의 well에 과산화수소를 200 µM 농도로 3시간 동안 처리하였다. 이 후 CCK-8 assay kit 용액을 첨가하고, 2시간 후 microplate reader를 사용하여 흡광도를 측정하였으며, 측정된 값은 비처리군 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. Reactive oxygen species (ROS) 형광 측정

SK-N-MC 신경세포를 24 well plate에 80% 정도 배양하였을 때 배양액에 PineXol[®]을 10, 30, 50 pg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 이 후 과산화수소의 농도가 200 µM인 배양액으로 교체한 후 3시간 뒤 PBS로 2회 세척하였으며, 10 µM의 DCF-DA가 첨가된 PBS를 첨가하여 5분간 반응시켰다. ROS의 형광반응은 IX-70 fluorescence microscope (Olympus Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

5. Lactate dehydrogenase (LDH) 측정

SK-N-MC 신경세포에 PineXol[®]을 24시간동안 전처리 시킨 후, 200 µM의 과산화수소를 3시간 처리하였으며, 원심분리하여 상층액을 새로운 well에 옮겼다. Cell cytotoxicity assay kit(DG-LDH500, DOGEN Co., Ltd, Korea)를 사용하여 흡광도를 측정 후 세포막 손상을 확인하였다.

6. Western blot 분석

SK-N-MC 신경세포에 단백질 추출액을 첨가한 후 4°C에서

30분 동안 처리하였다. 이 후 추출된 단백질은 SDS-PAGE를 실시하였으며, 전기영동 후 단백질은 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 그 다음 5% fat-free milk powder를 전 처리하고, 목적 단백질에 대한 1차 항체 (anti-SOD, anti-GSH-Px, anti-catalase)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, ECL western blotting detection reagent (iNtRON Biotechnolgy Co., Ltd, Korea)를 이용하여 목적 단백질을 검출하였다. Western blot의 밴드는 Bio-1D (VILBER Loumat SAS, Mame-la-Vallée., France)를 이용하여 관찰하였다.

7. 실험동물 및 사육조건

본 실험의 동물실험은 서울의료원 의학연구소 실험동물 운영위원회와 동물실험윤리위원회의 승인(A2016-002)을 받은 후 시행하였으며, 모든 과정은 식품의약품안전처 실험동물제도의 동물실험에 관한 법률 및 수행절차 규정을 준수하였다. 이번 실험에 사용되어진 실험동물은 생후 7주령 수컷 Spague-Dawley(SD) 백서들로 (주)코아텍(KOATECH, Kyunggi-do, Korea)에서 구입하였으며, 동물실험실의 사육 환경은 실험기간 동안 온도(20~22℃), 습도(55~65%), 그리고 명암주기는 12시간 주기로 유지하였으며, 사료와 물은 실험 전까지 자유급이하였다.

8. PineXol®의 급이

실험동물에 경구 투여될 PineXol®은 증류수 1 mL에 1, 10, 그리고 100 mg/kg의 농도로 각각 희석시킨 후, 1주일간 준대를 이용하여 1일 1회 동시간에 허혈성 뇌졸중 모델 실험 전까지 백서에 경구 투여하였다.

9. 허혈성 뇌졸중 동물 모델 제작

본 실험에 사용된 허혈성 뇌졸중 동물모델은 Koizumi (1986) 등이 최초로 사용한 중뇌동맥폐쇄 방법을 변형한 동맥 내 세사 폐쇄 방법(intraluminal filament technique)을 이용하였다(Longa 등 1989). 백서는 질소와 산소를 7:3으로 혼합한 기체와 2% isoflurane를 이용하여 마취를 유도하였으며, 수술이 진행되는 동안 온도조절판을 이용하여 실험동물의 체온을 37℃로 유지하였다. 총경동맥(common carotid artery; CCA)을 수술실을 이용하여 견인시킨 후, 내경동맥(internal carotid artery; ICA)을 견인하였으며, 코팅된 수술용 필라멘트실을 외경동맥(external carotid artery : ECA)에 삽입하여 중뇌동맥(middle cerebral artery)의 기시부를 막아 뇌졸중을 유도하였다. 백서가 마취에서 깨어나면 행동학적 검사를 통해 뇌졸중의 유무를 확인하였다.

10. 뇌경색의 부피 측정

뇌졸중 모델에서 뇌경색의 정도를 알아보기 위해 백서의 뇌를 두개골로부터 분리한 후, 뇌 형상틀(JEUNG DO BIO & PLANT CO., LTD, Seoul, Korea)을 이용하여 2 mm 간격으로 절편하였다. 절편들은 실온에서 2% 2,3,5-TTC(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가된 phosphate-buffered saline(PBS)에 실온으로 1시간 동안 보관한 후, 10% neutral buffered formalin으로 고정하였다. 뇌경색의 면적은 Image J(Freeware from the National Institutes of Health)를 이용하여 측정하였고, 부피(mm³)는 뇌절편의 경색 부피(뇌절편경색면적×두께)들의 합으로 계산하였다(Kim 등 2011).

11. 통계처리

모든 실험 결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차로 표시하였다. 통계적 분석은 SPSS 20.0 K를 이용하여 one way ANOVA를 시행하였으며, $p < 0.05$ 의 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 과산화수소(H₂O₂) 처리에 따른 세포사

활성산소들은 화학적인 반응도가 매우 높아서 세포를 구성하고 있는 유전자, 단백질, 지질 등 여러 중요물질들과 반응하여 손상을 줌으로써 세포의 기능에 장애를 주고 염증, 노화, 암, 당뇨병, 고혈압 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Ryu SE 2013). 연구에 사용될 과산화수소의 세포 내 처리 농도를 알아내기 위하여 성장배양액에 과산화수소를 100~1,000 μM

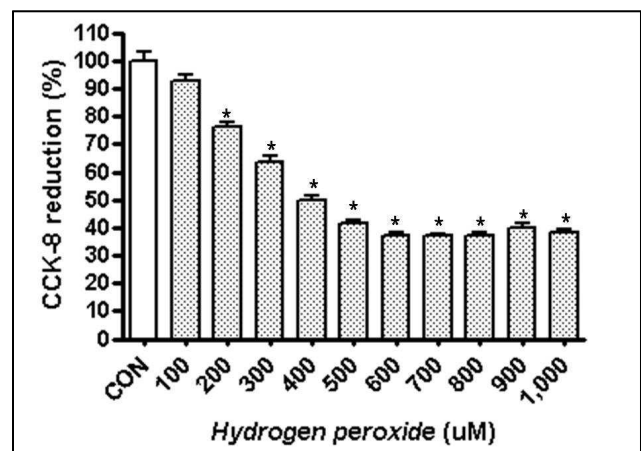


Fig. 1. Concentration dependent effects of H₂O₂ on SK-N-MC cell viability. Cells were treated with various concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, and 1,000 μM) of H₂O₂ and cell viability were measured by CCK-8 assay. The data shown are means±S.D. *Statistical significant difference between groups ($p < 0.05$).

의 농도에 따라 각각 세포에 첨가하였으며, 24시간 후 세포 생존율을 CCK-8 assay를 이용하여 측정하였다. Fig. 1에서와 같이 과산화수소를 200 μM 이상의 농도로 SK-N-MC 신경세포에 처리하였을 때, 세포 생존율은 비처리군과 비교 시 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 연구에서는 신경세포 손상을 유도할 위한 과산화수소 처리농도를 200 μM 로 결정하였다.

2. PineXol[®] 신경세포 보호 효과

과산화수소에 의해 유도된 산화 스트레스 상태의 SK-N-MC 신경세포에서 PineXol[®]의 처리에 따른 보호효과를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 과산화수소 단독처리군과 PineXol[®] 전처리군과의 비교 시 PineXol[®] 전처리군 30, 50 pg/mL에서 세포 생존율이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 식물이 가지고 있는 항산화능으로 인한 세포의 보호효과가 알려진 것처럼(Suh 등 2013), PineXol[®]이 가지고 있는 항산화 물질들로 인하여 산화 스트레스 상태의 SK-N-MC 신경세포를 보호할 수 있음을 확인하였다.

3. Reactive oxygen species(ROS) 발현

PineXol[®]을 SK-N-MC 신경세포에 24시간동안 전처리한 후, 과산화수소를 3시간동안 처리하였다. 그 이후 발생하는 ROS의 양을 형광 현미경을 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

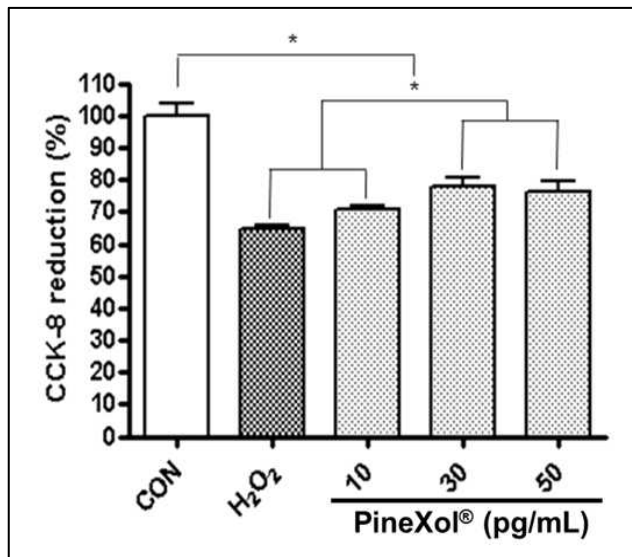


Fig. 2. Neuroprotective effects of PineXol[®]. SK-N-MC cell was pretreated for 24 h with various concentrations of PineXol[®]. The cells were then treated with 200 μM H₂O₂ for 3 h. The cell viability was measured by CCK-8 assay. The data shown are means \pm S.D. *Statistical significant difference between groups ($p < 0.05$).

생성된 ROS의 발현은 과산화수소 단독처리군에서 매우 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, PineXol[®] 전처리군과 비교 시 30, 50 pg/mL 농도에서 ROS의 발현이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 세포 수준에서 PineXol[®]이 과산화수소로 인한 ROS의 생성을 억제할 수 있는 것을 확인하였다.

4. 세포막 보호 효과

인간의 뇌는 전체 산소 소비량의 20% 정도를 소모하기 때문에 체내에서 가장 많은 활성산소를 생성한다. 신경세포의 세포막은 다른 세포보다 지질 함량이 높아 산화 스트레스에 의해서 더욱 쉽게 파괴되는 구조를 가지고 있으며, 뇌에는 활성산소를 제거해주는 항산화제가 적기 때문에 쉽게 산화 스트레스 상태에 놓이게 되며, 이로 인하여 신경세포가 사멸하게 된다(Lenaz 등 1998). 따라서, 과산화수소를 이용하여 SKN-MC 신경세포를 산화 스트레스 상태로 유도함으로써 PineXol[®]의 세포막 보호 효과를 알아보기 위한 연구를 진행하였다. 세포질 성분인 Lactate dehydrogenase(LDH)를 측정된 결과는 Fig. 4와 같으며, PineXol[®]의 증가에 따라서 LDH의 생성량이 과산화수소 단독처리군과 비교 시 감소하는 경향을 보였으며, PineXol[®] 50 pg/mL 전처리군에서 LDH의 발현이 과산화수소 단독처리군보다 유의적으로

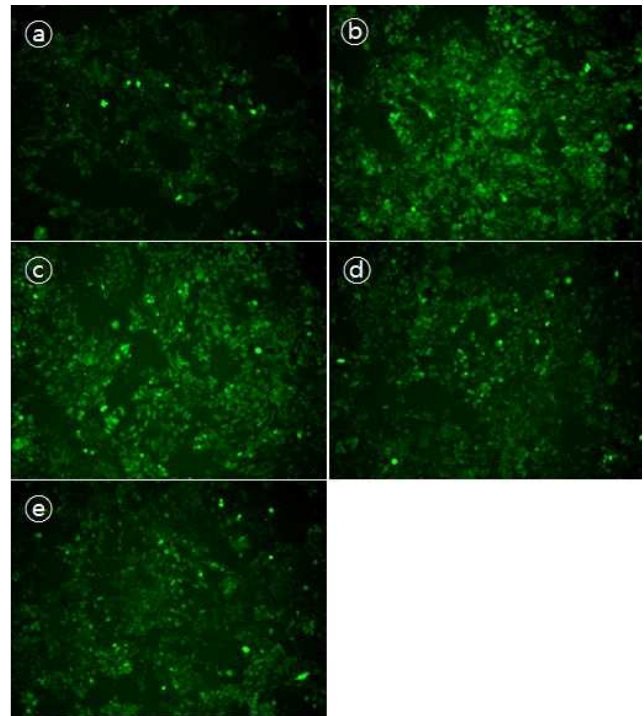


Fig. 3. PineXol[®] induced decrease of ROS expression in SK-N-MC cell. a : None-treatment $\times 10$, b : H₂O₂ 200 μM $\times 10$, c : PineXol[®] 10 pg/mL $\times 10$, d : PineXol[®] 30 pg/mL $\times 10$, e : PineXol[®] 50 pg/mL $\times 10$. ROS : reactive oxygen species, DCF-DA : dichlorofluorescein diacetate.

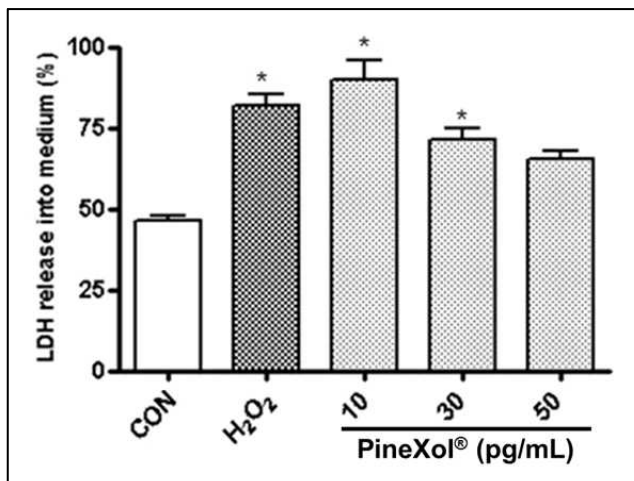


Fig. 4. Effects of PineXol[®] against H₂O₂ induced cell membrane toxicity in SK-N-MC cell. The cells were pretreated for 24 h with various concentrations of PineXol[®] and then treated with 200 μM of H₂O₂ for 3 h. The inhibition effect of LDH release on H₂O₂ induced cell was measured by cell membrane toxicity assay kit. The data shown are means±S.D. *Statistical significant difference between groups (*p*<0.05).

감소하는 것을 확인하였다.

5. 항산화 단백질 분석

생체 내 세포는 지질과산화물의 체내 축적을 억제하기 위해 1차 방어기전으로 효소계 산화방어기전을 가지고 있다. 이는 항산화 효소가 활성산소를 제거하는 것을 말하며, 중요 항산화 효소로는 SOD(superoxide dismutase)와 CAT(catalase) 그리고 GPx(glutathione peroxidase) 등이 있다. 이에 본 실험에서는 SOD, CAT 그리고 GPx의 세포내 단백질 발현을 조사하였다. SK-N-MC 신경세포에 PineXol[®]을 24시간 전처리 후 과

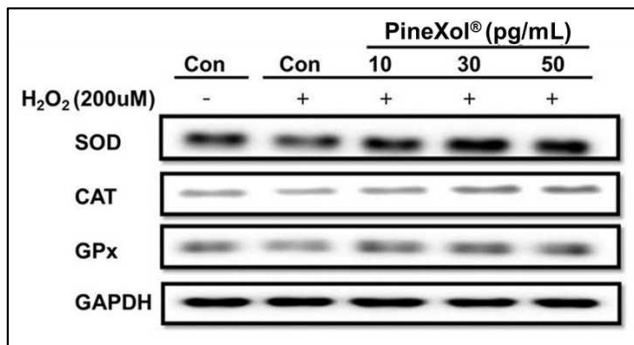


Fig. 5. Protein expression of SOD, CAT and GPx in SK-N-MC cell was gradually increased with rise of PineXol[®] concentration. SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase and GPx: glutathione peroxidase.

산화수소를 처리하였을 때, SOD, CAT, 그리고 GPx의 발현은 PineXol[®]의 농도에 따라서 증가하였다(Fig. 5). 이는 PineXol[®]이 세포 내에서 과산화수소의 1차적인 방어기전에 효과가 있는 효소들의 생산을 증가시키기 때문인 것으로 사료된다.

6. 뇌병변 부피 측정

뇌졸중모델에서 각 그룹에서 적출된 뇌 조직 절편은 TTC 염색을 실시한 후 Image J 프로그램을 사용하여 각각의 조직 손상 정도를 뇌 피질을 통하여 측정하였다. 측정 결과, 뇌졸중 모델과 PineXol[®] 투여군의 비교 시 1, 10, 100 mg/kg에서 뇌조직의 손상 정도에서 유의적인 차이가 나타나지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 6). 이는 본 연구에서 PineXol[®] 급이 기간과 농도가 적절하지 않아 유의적 차이를 나타내지 않은 것으로 사료된다.

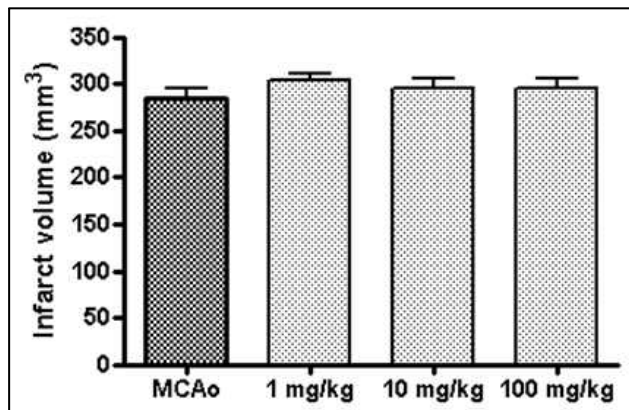


Fig. 6. Representative brain sections stained with TTC showing the ischemic core and penumbra at 3 hours after MCAo brain injury in control and PineXol[®] treatment group (n=5/group). PineXol[®] was not induced decrease of infarct volume. The densitometric analysis of the infarct volume (mm³) was calculated in TTC-stained brain section with Image J analyzer of NIH.

요약 및 결론

프랑스 해안송의 껍질을 추출하여 만들어진 피크노제놀은 비타민 C나 E보다 강력한 항산화 효능을 가지고 있으며, 생체 내에서 비타민 C와 E의 활성을 증강시키는 작용을 하고, 항산화 관련기전 중 효소계 산화방어기전을 촉진시켜준다고 보고 되었다(Ni 등 2002). 이뿐만 아니라 뇌세포에 작용하는 산화질소(NO)를 증가시켜 산소 공급과 영양소 운반을 개선하는 것으로도 해외에서 보고되었다(Zhang 등 1998; Nishioka 등 2012). 이에 본 연구에서는 국산 적송 껍질에서 추출한 PineXol[®]을 이용하여 *in vitro* 실험과 허혈성 뇌졸중 백서 모델을 이용한 *in*

in vivo 모델 실험을 통하여 그 효과를 알아보고자 하였다. 과산화수소로 세포사를 유도한 SK-N-MC 신경세포의 실험에서 PineXol[®] 30 pg/mL와 50 pg/mL 전처리군에서 과산화수소 단독 처리군 보다 세포 생존률에 있어서 유의적인 차이를 확인할 수 있었다. 또한 산화 스트레스에 대한 세포막 보호 효과를 알 수 있는 LDH와 ROS의 발현 감소 또한 본 연구를 통하여 확인할 수 있었으며, western blot을 이용한 세포 내 단백질 발현에서도 PineXol[®]의 농도 증가에 따라서 SOD, CAT, 그리고 GPx의 발현이 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 PineXol[®]이 가지고 있는 여러 항산화 물질들이 과산화수소로 유도된 산화 스트레스 상태의 SK-N-MC 신경세포를 보호하고 있음을 확인할 수 있는 결과라고 말할 수 있겠다. 하지만 본 실험에서는 PineXol[®]이 가지고 있는 항산화능을 세포 수준에서 확인할 수 있었지만, 백서를 이용한 *in vivo* 실험에서는 PineXol[®]을 여러 농도로 일주일간 경구 투여한 결과에서 뇌병변 감소와 같은 효과는 확인할 수 없었다. 이는 경구 투여되는 식품의 유효 성분이 체내에 작용하기에 저농도이었거나, 짧은 투여기간으로 인하여 효과를 나타내지 못한 것으로 사료된다. 추후 연구에서는 세포 내 항산화 방어체계를 강화시키는 분자세포생물학적 작용 기전 연구와 동물 모델을 이용한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 서울시 재원으로 보조금 지원을 받아 수행된 2016년 “파인엑솔의 처리에 따른 뇌세포와 뇌졸중 모델에서의 보호효과 검증”의 연구비로 연구되었으며, 이에 감사 드립니다.

References

- Alexandrova ML, Bochev PG. 2005. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic Biol Med* 39:297-316
- Alfadda AA, Sallam RM. 2012. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* Article ID 936486 14 page
- Anna P, Paulina D, Magdalena B, Krystyna P. 2011. Evaluation of the antioxidant properties of fruit and flavoured black teas. *Eur J Nutr* 50:681-688
- Branen AL. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxy anisole and butylated hydroxy toluene. *J Am Oil Chem Soc* 52:59-63
- Choi JH, Choi MK, Han OT, Han SJ, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. 2007. Evaluation of skin absorption of catechin from topical formulations containing Korea pine bark extract (PineXol[®]). *J Korean Pharm Sci* 37:359-364
- Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52:794-804
- Duran EH, Morshed M, Taylor S, Oehninger S. 2002. Differences in generation of reactive oxygen species (ROS) in highly motile fractions of spermatozoa as a discriminating tool for semen samples from infertility patients. *Fertil Steril Sep* 78:S263-264
- Hasegawa N. 2002. Inhibition of lipogenesis by pycnogenol. *Phytother Res* 14:472-473
- Ito N, Fukushima S, Hasegawa A, Shibata M, Ogiso T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J Cancer Inst* 70:343-347
- Jeon YH, Choi SW and Kim MR. 2009. Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *rubus coreanum*. *Korean J Food Cookery* 2:379-386
- Kalt W. 2006. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidant. *J Food Sci* 70:11-19
- Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-Sayed ME. 2014. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *J Biochem Mol Toxicol* 28:312-319
- Kim DY, Kim MK, Kim BW. 2015. The antioxidant and skin whitening effect of *Withania somnifera* (winter cherry). *J Food Hyg Saf* 30:258-264
- Kim HY, Koh SH, Kim SH. Rat models for ischemic stroke. 2011. *Korean J Stroke* 13:107-113
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. 1986. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 8:1-8
- Lee YH, Shin MH, Kweon SS, Choi JS, Park MS, Cho KH, Lim YS. 2012. Awareness of stroke warning signs and risk factors: Result Of a 2010 Community Survey in Gwangju Metropolitan City. *J Korean Neurol Assoc* 30:26-32
- Lee YJ, Han OT, Choi HS, Lee BY, Chung HJ, Lee OH. 2013. Antioxidant and anti-adipogenic effects of PineXol[®]. *Korean J Food Sci Technol* 45:97-103
- Lenaz G, Cavazzoni M, Genova ML, D'Aurelio M, Merlo Pich M, Pallotti F, Formiggini G, Marchetti M, Parenti Castelli G, Bovina C. 1998. Oxidative stress, antioxidant defences

- and aging. *Biofactors* 8:195-204
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91
- Min HK, Kim HJ, and Chang HC. 2008. Growth-inhibitory effect of the extract of porphyran *Chungkookjang* on cancer cell. *Korea J Korean Soc Food Sci Nut* 37:826-833
- Ni Z, Mu Y, Gulati O. 2002. Treatment of melasma with Pycnogenol®. *Phytother Res* 16:567-571
- Nishioka K, Hidaka T, Nakamura S. 2007. Pycnogenol®, French maritime pine bark extract, augments endothelium-dependent vasodilation in humans. *Hypertens Res* 30:775-780
- Park JH, Kweon GR. 2013. Clinical applications of antioxidants Hanyang. *Med Rev* 33:130-136
- Rohdewald PA. 2002. Review of the French maritime pine bark extract (pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharm Th* 40:158-168
- Ryu SE. 2013. Do reactive oxygen species cause aging?. *Hanyang Med Rev* 33:75-76
- Saliou C, Rimbach G, Moini H, McLaughlin L, Hosseini S, Lee J, Watson RR, Packer L. Solar. 2002. Ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-β-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pinebark extract. *Free Radical Bio Med* 30:154-160
- Sarmadi BH, Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins. *Peptides* 31:1949-1956
- Suh Jh, Paek OJ, Kang YW, Ahn JE, Yun J, Oh KS, An YS, Park SH, and Lee SJ. 2013. Study on the antioxidant activity in the various vegetables. *J Fd Hyg Safety* 28: 337-341
- Sung SJ, Jung DG, Lee WK, Kim YJ, Lee HS. 2009. Life style and eating behavior of stroke patients in Daegu and Gyeongbuk province. *Korea J Korean Soc Food Sci Nut* 38:319-332
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84
- Yong L, Hendrik J, Vreman RJW, Tjoston T, Toshihiro Y, and Linda J N-H. 2007. Heme oxygenase-1 stabilizes the blood-spinal cord barrier and limits oxidative stress and white matter damage in the acutely injured murine spinal cord. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1010-1021
- Zhang S, Chen J, Wang S. 1998. Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Res* 801:101-106

Received 31 October, 2016

Revised 03 November, 2016

Accepted 06 December, 2016