

사물탕이 산화적 스트레스에 의하여 유발되는 신경교세포의 세포 사멸에 미치는 보호효과

김형우 · 김경윤¹ · 김계엽¹ · 김재현² · 정종길² · 최찬현² · 황귀성² · 이상영² · 정현우^{2*}

부산대학교 한의전문대학원, 1: 동신대학교 보건복지대학, 2: 동신대학교 한의과대학

Protective Effects of Samul-tang on Cell Death Induced by Oxidative Stress in C6 Glial Cell

Hyung Woo Kim, Kyung Yoon Kim¹, Gye Yep Kim¹, Chae Hyun Kim², Jong Gil Jeong², Chan Hun Choi², Gui Seong Hwang², Sang Yeong Lee², Hyun Woo Jeong^{2*}

School of Oriental Medicine, Pusan National University, 1: College of Health and Welfare, Dongshin University, 2: College of Oriental Medicine, Dongshin University

Samul-tang (SMT), which was firstly described in (Hwajegukbang) Song dynasty, is well known remedy for blood diseases in Oriental medicine. SMT is traditional herbal-remedy composed of *Rehmanniae Radix Preparat*, *Angelicae Gigantis Radix*, *Cnidii Rhizoma* and *Paeoniae Radix*. Recently, SMT has known to have anti-oxidative action. However, the reports on anti-oxidant action in neuroglial cells are rare. In addition, the exact mechanisms are unclear. For these reasons, we investigated the protective effects of SMT on cell death induced by oxidative stress using C6 glioma cells. In our results, SMT accelerated proliferation rates of C6 cells *in vitro*. In addition, levels of LDH release induced by oxidative stress were lowered by treatment with SMT. Finally, protective effects on cell death induced by chemicals such as paraquat and rotenone were observed. In conclusion, these results suggest the possibility to protect brain cell or neuronal cell from damage induced by oxidative stress.

Key words : Samul-tang(SMT), herbal medicine, neuroglial cell, oxidative stress

서 론

四物湯은宋代에 편찬된 太平惠民和劑局方에 처음으로 소개된 처방으로 熟地黃, 當歸, 川芎, 白芍藥의 4가지 약물로 구성되어 있다¹⁾. 和劑局方의 婦人諸疾門에 四物湯에 대하여 “調益榮衛 滋養氣血”한다고 하여 血病의 대표방으로 현재에 이르기까지 부인과 질환에 광범위하게 응용되고 있다^{1,2)}.

四物湯은 그 활용도가 무척 광범위하기 때문에 현대의 연구자들도 다양한 방면에서 四物湯의 활성을 연구하고 있다. 四物湯에 대한 최근 연구로는 항암제 부작용 방지에 대한 연구³⁾, 골다공증 방지에 대한 연구⁴⁾, 면역기능 증진에 대한 연구^{5,6)}, 말초신경조직 재생에 대한 연구⁷⁾, 항산화 효과^{8,9)} 등이 있다.

고등생물체는 자신이 살아갈 에너지를 얻기 위하여 필연적

으로 산소 호흡을 필요로 하고, 이때 사용되는 산소량의 2 ~ 3%는 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)로 전환되게 된다^{10,11)}. 생체 내에서 발생하는 대표적인 활성 산소로는 Singlet oxygen, Superoxide, hydroxyl radical 등과 과산화수소 (hydrogen peroxide)등이 있으며, 이들은 쉽게 화학반응을 일으켜 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발한다¹²⁾.

산화적인 스트레스는 세포나 조직 손상을 일으키기 때문에 신속히 제거되어야 하며, 이를 위하여 생체는 효율적인 항산화 체계를 가지고 있다¹³⁾. 세포가 가진 항산화 체계로 감당할 수 없을 만큼의 산화적 스트레스가 발생하면 세포는 apoptosis 등의 방법을 통하여 사멸하게 되며, 이러한 기전을 통하여 노화가 유발될 뿐만 아니라, 생체 내의 거의 모든 질병의 발생과 악화에 관여한다^{14,15)}.

상기한 바와 같이 사물탕에 대한 현대적 연구가 여러 방면으로 진행되고 있으며, 항산화 효과^{8,9)}를 관찰하여 보고한 연구도 있었으나, 신경교세포 (Neuroglial cell)에 발생하는 산화적 스트

* 교신저자 : 정현우, 나주시 대호동 252 동신대학교 한의과대학 병리학교실

· E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3524

· 접수 : 2009/08/07 · 수정 : 2009/08/23 · 채택 : 2009/09/23

레스로부터 四物湯의 보호 효과를 연구한 바는 아직까지 접할 수가 없었다. 이에 본 저자들은 신경교세포주인 C6 glioma cell에 각종 산화적인 스트레스를 유발하고, 四物湯이 주어진 스트레스에 의하여 유발되는 신경교세포주의 사멸을 효과적으로 보호할 수 있는지를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 四物湯 (Samul-tang, SMT)의 구성은 熟地黄, 當歸, 川芎, 白芍藥으로, 동신대학교 광주한방병원을 통하여 구입 정선하여 사용하였으며, 처방 내용은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of Samul-tang (SMT)

| 韓藥名 | 生藥名 | 用量(g) |
|-----|----------------------------------|-------|
| 熟地黄 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 8 g |
| 當歸 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 8 g |
| 川芎 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 8 g |
| 白芍藥 | <i>Paeoniae Radix</i> | 8 g |
| 生薑 | <i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i> | 4 g |
| 大棗 | <i>Jujubae Fructus</i> | 4 g |
| 總計 | | 40 g |

2) 세포주

원취의 뇌세포에서 유래한 신경교세포주인 C6 glioma cell은 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 동결 상태로 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

SMT 3첩 분량 (120 g)을 증류수 1,500 ml과 함께 전기약탕기 (대웅, 한국)으로 3시간 동안 전탕하여 580 ml 추출액을 얻었다. 얻어진 추출액을 거즈로 거른 다음, 원심분리기(eppendorf, Germany)를 이용하여 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 감압 농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음, 동결건조하여 최종적으로 29.4 g의 시료를 얻었다.

2) 세포 배양

신경교세포주인 C6 glioma cell은 RPMI 배지에 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)과 항생제(Antibiotic antimycotic)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포는 T-75 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 세포의 탈착을 위하여 인산완충액 (Phosphate buffered saline, PBS)으로 가볍게 세척한 다음, Trypsin-EDTA (Sigma, USA)을 처리한 후, 37°C에서 5분간 방치하였다가 세포를 채집하였다. 계대 배양은 2~3일에 1회씩 시행하였다.

3) 세포 증식율에 미치는 영향 측정

SMT가 세포 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay¹⁶⁾를 통해 확인하였다. C6 glioma cell을 96 well plate에 5×10³

cell/well의 농도로 분주하여 배양기에서 37°C, % CO₂를 유지하며 24시간동안 pre-incubation시킨 후 0 ~ 1000 µg/ml의 농도로 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 처리하여 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) LDH 유출 농도 측정

SMT가 C6 glioma cell의 세포 사멸을 효율적으로 방지할 수 있는지 살펴보기 위하여, 12 well 플라스크에 4×10⁴ cell/well 농도로 C6 Glioma cell을 부착, 안정화 시켰다. 세포의 부착과 안정화 후, SMT와 함께 24시간 배양한 다음, 1.25 mM의 rotenone을 투여하고 다시 4시간을 배양하였다. 배양이 끝난 다음, 모든 세포를 따로 모아 원심분리하여 pellet을 얻었다. 얻어진 pellet에 0.2% Triton X-100을 첨가한 다음, 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파괴하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) 유출량은 LDH assay kit (Sigma, USA)을 이용하여 측정하였다.

5) 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호 효과 측정

산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 보호효과는 MTT법¹⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 먼저 C6 세포주를 96-well plate에 well 당 1×10⁴개씩 분주한 후, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 4시간동안 방치하여 부착을 시행하였다. 세포의 부착이 끝난 후, SMT를 처리하고 동일한 환경에서 24시간 동안 방치하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 800 mM의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂), 1.25 mM의 rotenone, 500 mM의 paraquat, 40 mM의 sodium nitroprusside (SNP)를 처리하고 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에 4시간 동안 방치하였다. 4시간동안의 배양이 끝난 후, 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

3. 통계 처리

제시된 모든 결과에 대한 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하였으며, Student-Newman-Keuls multiple range test를 이용하여 P값이 0.05 미만 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. 세포 증식율에 미치는 영향

SMT가 신경교세포주의 증식율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C6 glioma cell에 농도별로 SMT를 투여하고 24시간 후, 세포 증식율을 측정한 결과 250 µg/ml에서 101.9±1.0%, 500 µg/ml에서 102.5±1.6%, 1000 µg/ml에서 103.2±1.8%로 경미하지만 유의한 수준의 세포생존율 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

2. LDH 유출량에 미치는 영향

C6세포에 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SMT를 전처리하고, rotenone으로 산화적 스트레스를 유발한 다음 LDH 유출량을 측정된 결과 Normal군에서 100.0 \pm 32.2%, Control군에서 527.8 \pm 7.3%을 보여 유의한 수준으로 LDH 유출량이 증가함이 관찰되었고, SMT군은 477.8 \pm 28.4%로 나타나 Control군과 비교하여 유의한 수준으로 LDH 유출량이 감소함이 관찰되었다(Fig. 2).

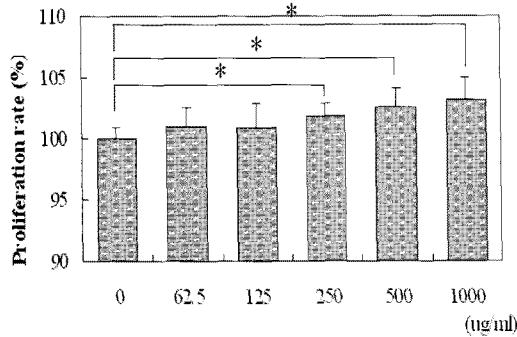


Fig. 1. Effects of SMT on cell viability of C6 glioma cells *in vitro*. C6 Cells were attached 96-well plate, and added SMT as indicated concentrations respectively. After 24 hr incubation, cell viabilities were measured using MTT methods. Result are presented as mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05, versus Normal (non-treated).

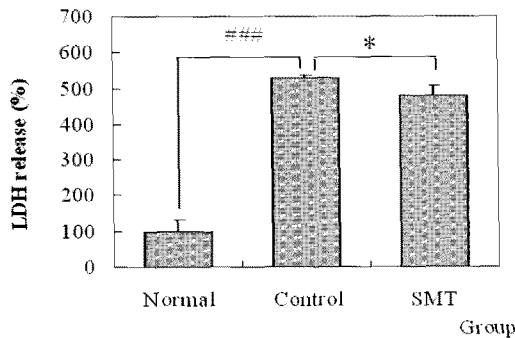


Fig. 2. Effects of SMT on LDH release in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 12-well plate, and added 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SMT for 24 hr. After 24 hr incubation, LDH release was measured using LDH assay kit. Normal : non-treated, Control : only rotenone treated, SMT : SMT pre-treated then rotenone treated. Result are presented as mean \pm SD of three independent experiments. *P < 0.05 versus Control, ###P < 0.001 versus Normal.

3. 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 방지효과

C6세포에 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 SMT를 전처리하고, paraquat, SNP, hydrogen peroxide, rotenone으로 산화적 스트레스를 유발한 다음 SMT의 세포 사멸 방지 효과를 측정하였다. SMT를 전처리하고, paraquat를 처치한 결과 paraquat군에서 76.5 \pm 3.3%, SMT+paraquat군에서 95.6 \pm 5.3%의 세포 생존율을 보여 유의한 수준으로 세포 사멸을 방지함이 관찰되었다(Fig. 3A). SMT를 전처리하고, SNP와 hydrogen peroxide를 각각 처치한 결과는 SNP와 hydrogen peroxide만을 처리한 군과 특별한 세포 생존율의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 3B, 3C). SMT를 전처리하고, rotenone을 처치한 결과 rotenone군에서 63.7 \pm 3.3%, SMT+rotenone군에서 92.9 \pm 4.0%의 세포 생존율을 보여 유의한 수준으로 세포 사멸을 방지함이 관찰되었다(Fig. 3D).

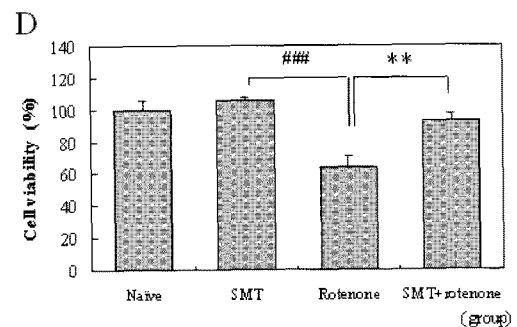
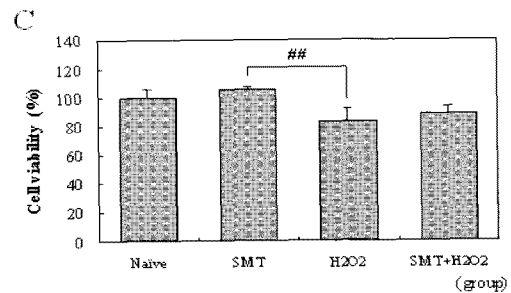
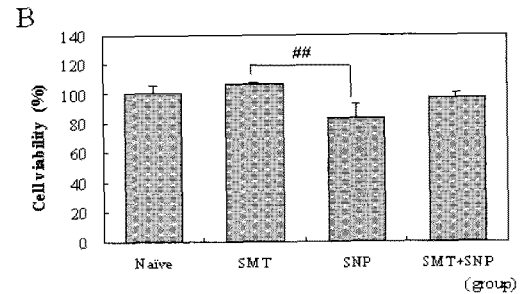
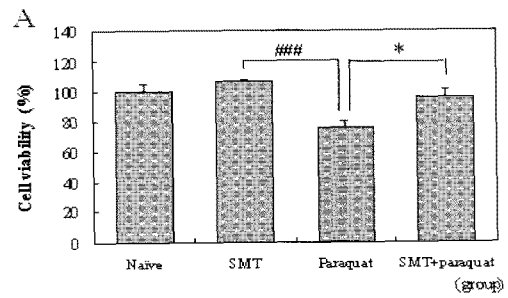


Fig. 3. Protective effects of SMT on Oxidative stress induced by various chemicals in C6 glioma cells. C6 Cells were attached 96-well plate, and added 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SMT for 24 hr. After 24 hr incubation, indicated concentration of paraquat, SNP, hydrogen peroxide and rotenone were treated for 4 hr. Naive : non-treated, SMT : only SMT treated, (A) Paraquat : only paraquat treated, SMT+paraquat : SMT pre-treated then paraquat treated, (B) SNP : only SNP treated, SMT+SNP : SMT pre-treated then SNP treated, (C) H₂O₂ : only hydrogen peroxide treated, SMT+H₂O₂ : SMT pre-treated then hydrogen peroxide treated, (D) Rotenone : only rotenone treated, SMT+rotenone : SMT pre-treated then rotenone treated. Result are presented as mean \pm SD of three independent experiments. ##P < 0.01, ###P < 0.001 versus Normal, *P < 0.05, **P < 0.01 versus Control.

고찰

四物湯은 通治血病의 대표적인 처방으로 和劑局方 婦人門에 소개 되었으며, “調益榮衛 滋養氣血의 효능으로 衝任虛損, 月水不調, 崩漏, 胎動不安, 血下不止, 臍腹疼痛, 癥瘕, 妊娠宿冷 產後

乘虛 風寒內博 惡露不下 少腹堅痛 時作實熱 등을 치료한다고 하였다¹⁾. 四物湯은 현삼과에 속한 다년생 초본인 지황 *Rehmannia glutinosa Liboschitz var. purpurea Makino*의 根莖을 가공하여 조제된 熟地黃, 산형과에 속한 다년생 초본인 당귀 *Angelica sinensis(OLIV.) DIELS*의 뿌리를 건조시킨 當歸, 미나리아재비과에 속한 多年生 草本인 천궁 *Ligusticum chuanxiong Hort*의 根莖을 건조한 川芎과 미나리아재비과에 속한 다년생 초본인 작약 *Paeonia latiflora PALL.*의 뿌리를 건조한 白芍藥으로 구성된 처방이다¹⁷⁾.

四物湯을 구성하는 4가지 약물 각각에 대하여 연구된 결과 중에서 항산화 효과에 관련된 연구로는 熟地黃에 대하여 노령 흰쥐에서 보이는 항산화 효과¹⁸⁾, 신장 조직 손상에서 보이는 항산화 효과¹⁹⁾, 남성 생식 세포에서 보이는 항산화 효과²⁰⁾, 등이 있고, 當歸와 白芍藥에 대하여서는 藥針液의 항산화 효과^{21,22)}가 보고되어 있다.

최근에 성인병 질환과 노화의 원인이 활성 산소임이 밝혀짐에 따라 산소로부터 활성 산소의 생성을 억제하거나, 대사에 의하여 생산되는 활성 산소를 효율적으로 제거 할 수 있는 약물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{23,24)}.

본 저자는 이러한 추세에 발맞추어 뇌 및 신경 조직에서 항산화 효과를 발휘하여 노화 및 각종 뇌혈관 질환을 예방할 수 있는 약물에 대한 연구를 진행하고자 하였다.

본 연구의 결과에서 SMT는 C6 세포주에 대하여 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 유의한 수준의 증식을 증가를 나타냈으며, 모든 농도에서 특별한 세포 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과로부터 SMT가 신경 손상 환자의 뇌 또는 신경 조직을 재생 시킬 수 있다는 가능성을 발견하였다. 이에 부가하여, SMT의 최소 유효 농도는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 결정되었으며, 이후 실험에서는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도를 사용하였다.

신경교세포주의 증식을 유의하게 증가시킨 SMT에 대하여 신경세포 사멸 시 증가되는 LDH의 유출을 억제시킬 수 있는지를 살펴보고자 rotenone으로 뇌세포 사멸을 유도한 후 SMT를 투여한 결과, 유의한 수준으로 LDH 유출량을 감소시켰다(Fig. 2). 이는 SMT가 뇌신경세포가 괴사되는 과정에서 신경세포의 손상을 억제할 수 있는 가능성으로 해석할 수 있다.

신경교세포주에 대하여 증식을 증가 소견과 세포 손상 방지 소견을 보인 SMT에 대하여 산화적 스트레스를 유발한다고 알려져 있는 4가지 chemical을 전처치하고 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. 4가지 chemical로는 그라복손 (Gramoxone)이라는 이름으로 잘 알려져 있는 제초제로 실험실에서는 주로 각종 중독 작용, 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 일으키는 자극원으로 사용되는 paraquat^{25,26)}, 생체 내에서 nitric oxide (NO)를 발생시켜 산화적 스트레스를 유발하는 sodium nitro-prusside (SNP)²⁷⁾, 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 그리고 농약, 살충제 용도로 사용되며, 생체 내의 각종 세포에 산화적 손상을 일으켜 결국 apoptosis에 이르게하는 작용이 알려져 있는 rotenone^{28,29)}를 사용하였다.

본 연구의 결과에서 상기한 4가지 chemical은 모두 C6 세포의 생존율을 유의한 수준으로 감소시켰다. 이러한 생존율 감소에

대하여 SMT의 보호효과를 관찰한 결과 paraquat와 rotenone에 의한 산화적 스트레스에 대하여 보호 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 비록, 과산화수소나, SNP에 의한 세포사멸을 효과적으로 억제하지는 못하였지만, 이러한 결과는 SMT가 뇌교세포 내의 어떤 기전을 통하여 항산화 효과를 발휘할 수 있음을 암시한다. 추후 명확한 기전을 밝히기 위한 후속 연구가 필요하리라고 생각한다.

결론

四物湯이 뇌교세포에서 항산화 효과를 발휘하는지 살펴보기 위하여 C6 glioma cell에 四物湯 추출물을 투여하고 세포 증식에 미치는 영향과 LDH 유출에 미치는 영향, 그리고 산화적 스트레스를 유발하는 paraquat, SNP, hydrogen peroxide 그리고 rotenone에 의하여 유발되는 세포 사멸에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 四物湯 추출물은 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상에서 유의한 수준으로 세포 증식을 증가시켰고, 특별한 세포 독성을 관찰할 수 없었다. 또한, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 四物湯 추출물은 산화적 스트레스에 의하여 세포가 사멸되면서 발생하는 LDH 유출 농도를 유의한 수준으로 감소시켰다. 마지막으로 4가지 산화적 스트레스 유발 물질에 의한 세포 사멸 방지 효과를 살펴본 결과 paraquat와 rotenone의 자극에 의한 세포 사멸을 유의한 수준으로 방지함을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 본 저자는 四物湯이 항산화 효과를 통하여 뇌 및 신경 세포의 손상을 방지해 줄 수 있는 가능성을 발견하였다. 추후 노화나 건망증 동물 모델을 활용한 후속 연구와 기전을 밝혀 내기 위한 면역학적 연구가 필요하리라고 생각한다.

참고문헌

1. 윤용갑. 東醫處方과 方劑解說. 서울, 의성당, pp 163-169, 1998.
2. 陣偉, 路一平. 方劑學. 上海, 上海中醫學院出版社, pp 205-208, 1993.
3. 안희덕. 四物湯의 항암제 부작용 억제에 관한 실험적 연구. 동의병리학회지 19(2):341-359, 1995.
4. 이상곤, 권영규, 김광중, 김완희. 사물탕과 육미지황탕이 난소 적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 제한동의학술원논문집, 1(1):31-48, 1995.
5. 은재순, 유동화, 권진, 오찬호. 사물탕이 L1210 세포 이식 및 항암제를 투여한 마우스의 면역세포에 미치는 영향. 생약학회지 29(2):110-119, 1998.
6. 전훈, 은재순, 송정모. 사물탕이 복강 Macrophage 의 탐식능에 미치는 영향. 대한본초학회지 14(2):75-80, 1999.
7. 이기태, 유병찬, 김윤식, 설인찬. 사물탕(四物湯)이 손상된 말초신경섬유 재생에 미치는 효과에 대한 사전 연구. 한의학논문집, 14(2):107-112, 2005.
8. 조기용, 유동열. 사군자탕 및 사물탕이 인체과동과 활성산소

- 에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 한의학논문집, 9(1):305-317, 2000.
9. 최미애, 김미림, 박찬성. 사물탕 재료 추출물의 항균 및 항산화능. 한국식품조리과학회지 24(1):52-58, 2008.
 10. Lee, S.O., Kim, M.J., Kim, D.K., Choi, H.J. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. Korean J. Food Sci. Nutr. 34: 139-147, 2005.
 11. 조숙현, 최용조, 노치웅, 최철웅, 김덕송, 조성환. 대나무수액의 활성산소 소거활성과 세포독성. 한국식품저장유통학회지 15(1):105-110, 2008.
 12. PaPa, S., Skulachev, V.P. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol. Cell. Biochem. 174: 305-319, 1997.
 13. Slavić, M., Appiah, I., Nikolić-Kokić, A., Radojčić, R., Jones, D.R., Spasić, M.B., Milovanović, S., Blagojević, D. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. Acta Physiol Hung. 93(4):335-339, 2006.
 14. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. Alcohol-related cirrosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. Arch. Immunol. Ther. Exp. 49: 19-22, 2001.
 15. Srnely Mainzen Princem, P. and Menon, V.P. Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. Phytother. Res. 15, 213-217, 2001.
 16. Mari, M., Seiji, K., Kenji, F., Airo, T. and Toshimasa, N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 209(5):413-421, 2006.
 17. 전국한의과대학교수 공저. 본초학. 서울, 영림사, pp 450, 632-637, 2004.
 18. 안상원, 이철완. 숙지황(熟地黃)과 육미지황탕(六味地黃湯)이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 한의학 논문집, 8(1):593-623, 1999.
 19. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 숙지황의 항산화 효과. 대한본초학회지 18(4):119-126, 2003.
 20. 장문석, 양응모, 유태원, 김도립, 박은화, 고은빛, 최문정, 김휴영, 오지훈, 심경준, 윤지원, 박성. 숙지황(熟地黃)이 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. 대한본초학회지 22(4):81-86, 2007.
 21. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀(當歸) 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 13(2):254-262, 1996.
 22. 임창수, 김갑성. 작약 약침액의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지 14(2):191-198, 1997.
 23. Corl, M.M. Antioxidant activity of tocopherol and ascorbylpalmitate and their mode of action. JAOCS. 51: 321-325, 1974.
 24. Coleman, M.D., Fernandes, S. and Khanderia, L.A. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. Environ. Toxicol. Pharmacol. 14: 69-75, 2003.
 25. Wills, B.K., Aks, S., Maloney, G.E., Rhee, J., Brand, R., Sekosan, M. The effect of amifostine, a cytoprotective agent, on paraquat toxicity in mice. J Med Toxicol. 3(1):1-6, 2007.
 26. Krasowska, A., Sigler, K. Cell-protective and antioxidant activity of two groups of synthetic amphiphilic compounds-phenolics and amine N-oxides. Folia Microbiol (Praha). 52(6):585-592, 2007.
 27. Mullens, W., Abrahams, Z., Francis, G.S., Skouri, H.N., Starling, R.C., Young, J.B., Taylor, D.O., Tang, W.H. Sodium nitroprusside for advanced low-output heart failure. J Am Coll Cardiol. 52(3):200-207, 2008.
 28. Molina-Jiménez, M.F., Sánchez-Reus, M.I., Andres, D., Cascales, M., Benedi, J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Brain Res. 29, 1009(1-2):9-16, 2004.
 29. Zhang, J.G., Nicholls-Grzemeski, F.A., Tirmenstein, M.A., Fariss, M.W. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and III by alkylating agents. Chem Biol Interact. 138(3):267-284, 2001.