

Paraquat에 의한 사람 임파구 DNA 손상에 대한 환원전리수의 보호효과

박은주² · 류근걸 · 이윤배 · 이종권 · 이미영^{1,*}

¹순천향대학교 생명과학부, ²경남대학교 식품영양학과, 순천향대학교 신소재화학공학부

Protective Effect of Electrolyzed Reduced Water on the Paraquat-induced Oxidative Damage of Human Lymphocyte DNA

Eun-Ju Park², Kun-Kul Ryoo, Yoon-Bae Lee, Jong-Kwon Lee and Mi-Young Lee^{1,*}

¹Division of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

²Department of Food and Nutritional Sciences, Kyungnam University, Masan, 631-701, Korea

Division of Material & Chemical Engineering, Soonchunhyang University, Asan, 336-745, Korea

Received May 2, 2005; Accepted June 10, 2005

Electrolyzed reduced water (ERW), showing extremely negative oxidation-reduction potential, was used to investigate the effects of paraquat-induced damages on DNA from human lymphocyte. The effect of ERW on paraquat-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes was evaluated by Comet assay (single-cell gel electrophoresis) quantified as percentage fluorescence in tail. Comet assay has been used widely to assess the level of the DNA damage in individual cells. Lymphocytes were oxidatively challenged with various concentrations of paraquat for 30 min at 37°C, and were then treated with electrolyzed reduced water for 30 min. The oxidative DNA damage by paraquat, as indicated by the fluorescent tail in DNA, increased in a dose-dependent manner. However, oxidative damage of the DNA was almost completely prevented upon treatment with electrolyzed reduced water.

Key words: electrolyzed reduced water, paraquat, human lymphocyte DNA

서 론

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridium dichloride)는 전세계적으로 광범위하게 사용되는 비선택적 접촉성 제초제로, 식물 광합성 반응에서 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 생성하여 세포벽과 원형질을 파괴함으로써 제초효과를 나타낸다.¹⁾ Paraquat은 최근 10년 동안 국내에서 사용되어 온 비선택성 제초제의 절반을 차지하고 있으며 유효성분으로 약 1,500톤에 이르는 많은 양이 사용되었다. Paraquat 음독시 인체 내의 여러 장기, 특히 폐, 신장, 간 등에 손상을 입히게 되며, 다량을 음독하였을 때에는 광범위한 조직손상으로 인해 다발성 장기부전을 일으키게 되는데 이후 폐 섬유화로 진행하여 대부분 사망에 이르게 된다. 그러나 아직까지 효과적인 치료방법이 개발되어 있지 않으며, 초기의 적극적인 치료에도 불구하고 60-90%의 사망률을 보이고 있다.¹⁾ Paraquat가 인체에 흡수되게 되면 체내에서

ROS가 극단적으로 급격히 증가하여 독성작용의 주요 원인으로 작용한다. ROS는 단백질 효소의 불활성화, 지질과산화물 및 DNA 분절화를 통해 세포 손상을 일으키게 된다고 잘 알려져 있다.²⁾ Paraquat은 포유동물 세포 내에서 NADPH와 효소작용에 의하여 paraquat radical(PQ⁺·)로 환원된다.³⁾ 이렇게 형성된 paraquat radical은 산소분자와 반응하여 superoxide radical(O₂⁻·)을 형성하며 이 superoxide radical은 superoxide dismutase에 의하여 촉매되거나 paraquat와의 반응을 통해 과산화수소로 환원된다.³⁾ 과산화수소는 계속해서 Fenton 반응에 의해 강력한 산소유리기인 하이드록시 라디칼(OH·)이 된다. 강력한 산화력을 가지고 있는 이러한 산화기들은 산소유리기에 의한 조직의 지질과산화의 최종 단계를 매개하는 중요한 산화제이다. 또한 제초제 중독이외에도 화상이나 폐혈증 등에서도 정상적인 체내 방어 기전으로는 역제가 불가능할 정도로 ROS가 과량 생성되어 단시간에 치명적인 세포손상과 기능상실을 유발한다.⁴⁾

일반적으로 ROS로 인한 병변의 산화적 손상으로부터 단백질이나 지질, 혈관내피세포를 포함한 각종 세포들을 보호하기 위하여 다양한 항산화제가 사용되고 있다. 항산화제로는 항산화효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase

*Corresponding author

Phone: +82-41-530-1355; Fax: +82-41-530-1355

E-mail: miyoung@sch.ac.kr

등의 효소계와 vitamin A, vitamin C, vitamin E, glutathione, bilirubin, urate, melatonin, dexamethasone, butylated hydroxytoluene, amino acids(sulfhydryl group), N-acetyl cysteine 등의 비효소계로 분류할 수 있다.⁵⁾ Paraquat 중독으로 인해 급격하게 과량 생성된 ROS를 제거하기 위해서 다양한 항산화제가 투여되어 왔으며 강력한 항산화제를 얼마나 짧은 시간 내에 효과적으로 투입시켜주느냐가 치료의 핵심부분이라고 보고되어 있다.⁶⁾ 세포 수준에서의 실험에서는 vitamin C나 환원형 glutathione 및 N-acetyl-L-cysteine 등의 항산화제가 ROS 제거에 효과가 있다고 보고되어 있다.⁶⁾ 그러나 실제로 paraquat 중독환자 치료에 항산화제를 적용하기에는 무리가 있으며 vitamin C의 경우에도 손상된 조직에서 발생하는 금속이온에 의해서 오히려 ROS에 의한 조직손상이 심화되기도 했다.⁷⁾

전리수(electrolyzed water)는 전기분해에 의해서 pH나 산화·환원전위(oxidation-reduction potential, ORP)를 조절할 수 용액이며, 물에 직류전압을 가하면 이온의 이동에 의해 pH를 변화시킬 수 있는 이온수를 만들 수 있다. 양극에서 생성되는 물은 H⁺ 이온의 증가로 pH가 감소되며 ORP가 증가하게 되어 강한 산화성의 상태가 되고, 음극에서는 OH⁻ 이온의 증가로 pH가 상승하여 환원성의 상태가 된다.⁸⁾ 전리수의 ORP는 다른 수용액보다 매우 강한 pH의존성을 나타내고 있다. 일반적으로 산성전리수의 ORP는 +1200 mV의 높은 산화전위를 나타내고 있는 반면 산성수용액의 경우 +600 mV 정도의 ORP를 나타낸다. 환원전리수의 ORP는 -850 mV의 환원전위를 가지고 있으나, 알칼리성 수용액의 경우 +20 mV를 나타내고 있다. 환원전리수가 가지고 있는 매우 낮은 음의 환원전위로 인해 환원전리수는 항산화활성을 가지게 된다. 흥미롭게도 환원전리수는 당뇨와 화상 등의 질환치료에 매우 효과적이며 항암, 항노화 등의 효능이 있다고 보고되고 있는데^{9,10)} 이러한 효과는 환원전리수가 가지고 있는 활성산소소거능에 기인할 것으로 추측되고 있다.¹¹⁾ 뿐만 아니라 환원전리수가 항산화활성을 가지고 있어서 활성산소 생성으로 인한 DNA 분해를 억제한다고 보고되었다.¹¹⁾ 본 연구에서는 환원전리수의 항산화 활성을 근거로 하여 paraquat에 의해 생성되는 활성산소종으로 인한 사람 임파구 DNA의 손상에 미치는 환원전리수의 보호효과를 Comet assay(single cell gel electrophoresis)^{12,13)}를 통하여 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

환원전리수의 제조. 실험에 사용된 환원전리수를 제조하기 위하여 마이크로 벵크사의 Redox-water 생성기를 사용하였다. 전리수 제조장치에 사용된 물은 증류, 역삼투압(Reverse Osmosis)을 거쳐 최종 3차수에 이르는 초순수(Deionized water)물이었다. 본 실험에서 사용한 환원전리수는 pH가 8.5~9.5, ORP는 -850 ~ -800 mV가 유지되게 하였다.

인체 임파구 세포 분리. 준비된 사람 혈액을 채취하여 전혈 100 μ l를 1 ml RPMI-1640(10% fetal bovine serum: FBS) 배지와 섞은 후, histopaque 1077 200 μ l를 underlay하여 원심분리(1,300 rpm, 6 min)한 뒤 상층의 PBS(phosphate-buffered saline)와 histopaque 사이의 band 부분인 약 100 μ l를 1 ml

RPMI-1640(10% FBS)에 섞어 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 lymphocyte storage 용액(40% RPMI-1640, 50% FBS, 10% dimethyl sulfoxide: DMSO)에 넣고 -70°C 냉동고에 보관하였다. 실험 시에는 저장된 lymphocyte를 실온에서 신속하게 녹이고 원심분리하여 상층액을 제거된 세포에 950 μ l PBS와 50 μ l RPMI-1640(10% FBS)을 섞어 냉장고에 10분 정도 안정화시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거한 후 사용하였다.

산화 스트레스의 유도. 임파구 DNA에 paraquat에 의한 산화적 손상을 가하기 위해 paraquat의 최종 농도가 각각 0, 2.5, 5, 10과 20 μ M가 되도록 한 후 37°C에서 30 분간 반응시켰으며, 대조군으로는 PBS만을 처리하였다. 또한 환원전리수가 paraquat에 의한 임파구 DNA 손상에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 10 μ M paraquat으로 30분 동안 처리된 임파구에 환원전리수를 각각 0, 200, 500과 800 μ l씩 30 분간 처리하였다.

Comet assay을 이용한 임파구 DNA의 산화적 손상 측정. Paraquat에 의한 DNA의 산화적 손상과 환원전리수 처리에 의한 DNA 손상의 억제정도를 확인하기 위해 Singh¹⁴⁾ 등의 방법을 변형하여 Comet assay를 실시하였다. 준비된 임파구를 0.5% low melting agarose gel(LMA) 75 μ l와 혼합 후, 0.5% normal melting agarose 150 μ l가 precoating된 fully frosted slide 위로 임파구와 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover slip으로 덮어 4°C 냉장고에 약 10분간 보관하였다. Gel이 굳으면 cover slip을 덮고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ l를 slide 위에 첨가한 후 다시 cover slip을 덮어 gel이 굳을 때까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인한 뒤 cover slip을 제거한 후 slide를 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, 1% laurosylsarcosinate, pH 10)에 담그고, 4°C의 암실에서 1 시간 동안 두면서 세포 단백질을 제거하였다. Lysis가 끝난 slide를 alkaline 용액(300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH > 13)이 포함된 전기영동 탱크에 넣고 40분 동안 4°C에서 unwinding 시킨 후 25 V/300 \pm 3 mA에서 20 분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 slide를 0.4 M Tris(pH 7.4) 용액으로 5분씩 두 번 세척하여 중성화시켰으며 ethanol 3 ml로 3분 동안 고정시켰다.

Image analysis. Comet image 분석을 위해 20 μ l(10 μ g/ml) 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover slip으로 덮은 뒤 형광현미경(Leica MZ16 FA, Germany) 상에서 관찰하였다. 그 후 CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 얻어진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)로 분석하였다. Comet assay에 의한 임파구 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리인 tail내에 함유된 DNA %인 tail % DNA 값을 측정하여 나타내었다. 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

통계처리. 모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 처리군별로 100 개의 세포에서 측정된 DNA 손상도(tail % DNA)의 평균값과 표준 오차를 구하였다. 각 농도에서 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 농도별로 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하였으며, 각 농도간의 차이

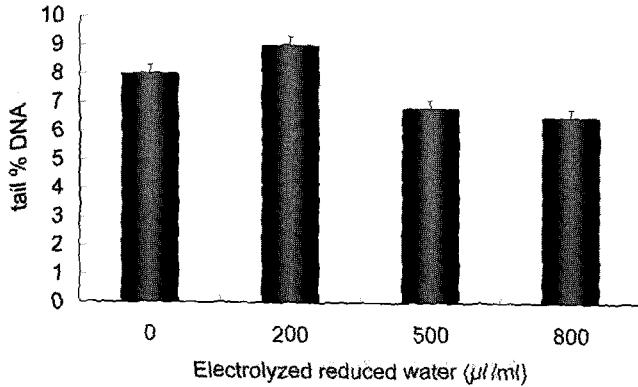


Fig. 1. The effect of supplementation *in vitro* with different concentration of electrolyzed reduced water in human lymphocytes. Values are mean with standard error of duplicate experiments with lymphocytes from each of two different donors. Bars with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's test.

는 Duncan test로 사후 검증하였고, 모든 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 Comet assay¹³⁾를 사용하여 대표적인 비선택적 맹독성 제초제인 paraquat에 의한 사람 임파구 DNA의 산화적 손상을 살펴보았으며 환원전리수 처리에 의한 임파구 DNA의 손상 회복효과를 분석하였다. 세포내 DNA 손상정도를 측정하는 방법으로는 chromosomal aberration, sister chromatid exchange, micronuclei, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine 등의 방법이 널리 사용되어 왔으나, 최근 Comet assay가 소개되면서 *in vitro*, *in vivo* 연구 뿐만 아니라 DNA 손상 측정을 위한 사람 모니터링 방법으로 광범위하게 사용되고 있다.¹⁴⁾ Comet assay는 유전 독성물질에 의한 DNA 손상을 세포수준에서 민감하고 간편하게 감지할 수 있는 유용한 연구 방법으로 알려져 있다.¹⁴⁾ Comet assay는 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 처음 개발되었으며, Singh¹⁵⁾ 등에 의하여 보다 민감하게 DNA 손상을 감지할 수 있는 방법으로 발전되어 암유발원이나 독성물질에 대한 유전독성 실험에 다양하게 적용되어 왔다.

환원전리수가 사람 임파구 DNA에 미치는 효과를 tail % DNA를 통하여 살펴보았다(Fig. 1). 그 결과 임파구 DNA에 환원전리수를 800 µl까지 증가시키면서 처리하여도 대조군과 유사하게 DNA 손상을 발견할 수 없었다. 사람 임파구 DNA에 다양한 농도의 paraquat을 처리한 후 paraquat에 의한 임파구 DNA의 손상정도를 tail % DNA를 측정하여 살펴보았다(Fig. 2). 이 결과에서 알 수 있듯이 paraquat 농도 증가에 따라 DNA 손상정도가 의존적으로 증가하였다(Fig. 1, 2). Paraquat 농도를 2.5와 5 µM 농도로 처리하였을 때는 대조군과 마찬가지로 거의 DNA가 손상되지 않았다. 그러나 paraquat 농도를 10과 20 µM로 증가시켰을 때 임파구 DNA가 많이 손상되어 대조군에 비해 각각 약 3.5배와 4.2배 씩 tail % DNA가 증가하여 심각한 DNA 손상을 보여주었다. 이번에는 환원전리수 처리가 paraquat에 의해 손상된 임파구 DNA에 미치는 보호효과

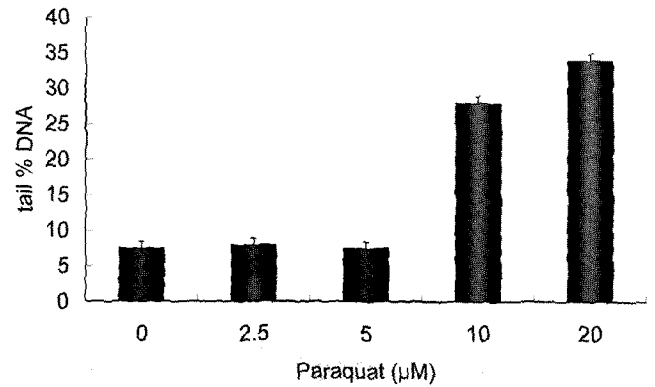


Fig. 2. The effect of paraquat treatment for 30 min at 37°C in human lymphocytes. Values are mean with standard error of duplicate experiments with lymphocytes from each of two different donors. Bars with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's test.

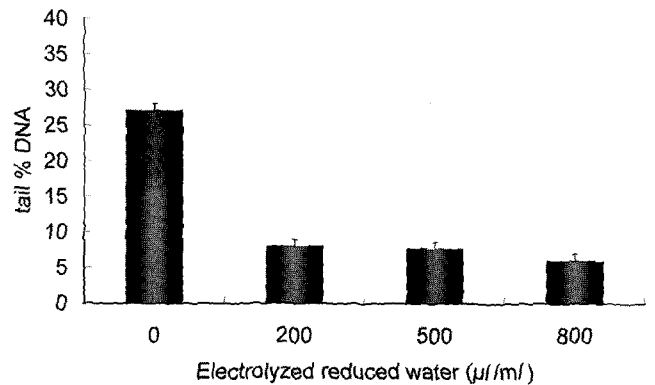


Fig. 3. The protective effect of supplementation *in vitro* with different concentration of electrolyzed reduced water on 10 µM paraquat-induced human lymphocytes DNA damage. Values are mean with standard error of duplicate experiments with lymphocytes from each of two different donors. Bars with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's test.

를 살펴보기 위하여 먼저 10 µM paraquat을 30분간 임파구에 처리한 후 환원전리수를 각각 200, 500과 800 µl씩 처리하였다(Fig. 3). 그 결과 환원수를 처리하지 않은 경우 paraquat에 의해서 DNA가 심각하게 손상되어서 tail % DNA가 약 27%로 측정되었다(Fig. 3). 그러나 환원전리수를 200 µl에서 800 µl까지 처리 후 모든 DNA의 산화적 손상이 복구 및 억제되어 Fig. 1에서 측정된 대조군의 tail % DNA 수치와 거의 유사하였다. 이러한 결과는 환원전리수 처리가 paraquat으로 인한 DNA 손상을 억제시킬 수 있음을 보여준다. 10 µM paraquat을 처리한 후 손상된 임파구의 컴퓨터 이미지와 환원전리수 처리 후 대조군 임파구의 DNA 손상이 복구된 이미지를 살펴보았다(Fig. 4). PBS 완충용액만을 처리한 대조군의 임파구 DNA는 손상되지 않았으나(Fig. 4-A), 10 µM paraquat으로 처리된 임파구의 경우 DNA 손상이 일어나 손상된 DNA 파편이 마치 해성 꼬리처럼 퍼져있음을 볼 수 있다(Fig. 4-B). DNA 손상을 입은 세포를 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 손상으로 인해 분자량이 작아진 DNA일수록 핵으로부터 멀리 이동하게 되기 때문이다. 그러나 환원전리수를 paraquat으로 산화적 손상을 유도시킨 임

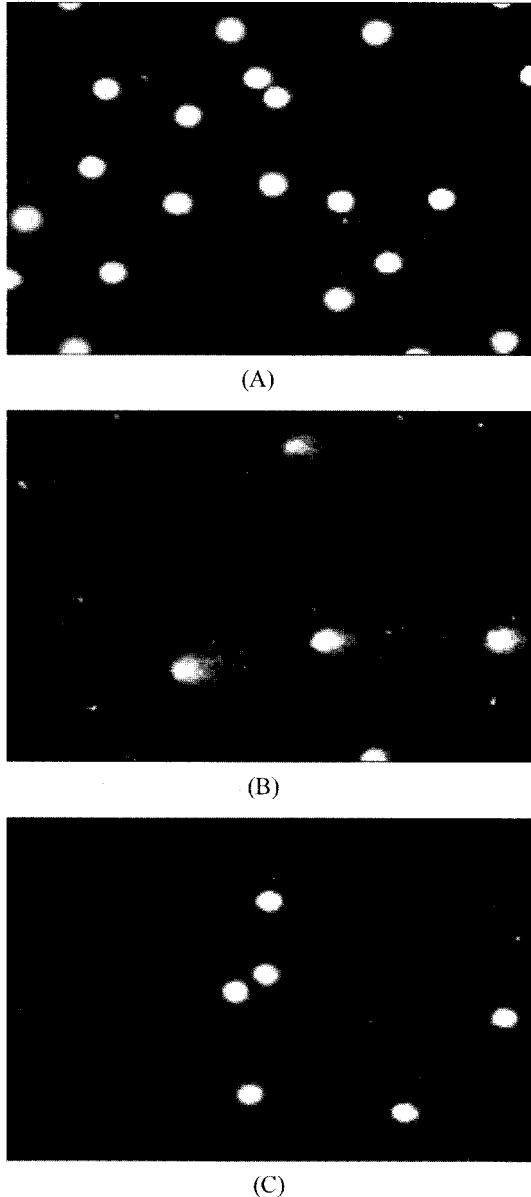


Fig. 4. Protective effect of electrolyzed reduced water on the paraquat-induced oxidative damage of human lymphocyte DNA. A, Untreated lymphocyte; B, 10 μ M paraquat-treated lymphocyte; C, 800 μ l electrolyzed reduced water-treated lymphocyte following 10 μ M paraquat treatment.

파구에 처리하였을 때 흥미롭게도 임파구의 DNA 손상이 복구되어서 PBS 완충용액만 처리된 대조군처럼 DNA의 손상된 꼬리가 없는 구형의 이미지를 보여주었다(Fig. 4). 이러한 결과는 Fig. 3의 결과와 마찬가지로 paraquat에 의해 생성된 활성산소로 인한 산화적 DNA 손상이 환원전리수 처리에 의해 거의 완벽하게 복구된다는 것을 보여준다.

최근 산화적 DNA 손상이 항산화제 처리에 의해서 복구된다는 사실이 다수 보고되고 있는데, 산화적 손상이 일어난 DNA가 복구되는 주요 이유로서 DNA repair 효소의 활성화를 들고 있다.¹⁵⁾ 발암물질인 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine에 의한 DNA의 산화적 손상은 curcumin, resveratrol, indole-3-carbinol 및 ellagic acid 등에 의해서 예방되었을 뿐만 아니라, 손상된

DNA도 DNA repair의 활성화로 인하여 완전히 복구되었다고 보고되었다.¹⁶⁾ Quinoxaline 1,4-di-N-oxide 유도체에 의한 저산소로 인한 DNA의 손상도 산소공급에 의하여 24시간 후 완전히 복구됨이 Comet assay로 확인되었다.¹⁷⁾ Nitrosamine에 노출된 암환자의 임파구의 DNA repair 능력 뿐만 아니라,¹⁸⁾ cisplatin과 etoposide에 의한 DNA repair의 조절이 phosphatidylinositol 3'-kinase의 억제와 연관되어 있음도 보고되었다.¹⁵⁾ 본 연구결과에서 나타난 환원전리수에 의한 DNA의 산화적 손상의 복구는 환원전리수에 포함된 활성수소로 인한 항산화력과 연관되어 있을 것으로 추측된다.¹¹⁾ 최근 전리수(electrolyzed water)가 환경친화적인 신개념의 기능수로 주목을 받고 있는데,⁹⁾ 전기분해로 음극에서 생성되는 환원전리수는 superoxide를 소거할 수 있는 강력한 항산화효능을 가지고 있어서 DNA의 분해를 방지하였다.¹²⁾ 뿐만 아니라 일반 물의 입자보다 작은 클러스터를 가지고 있어서 일반 물보다 운동성이 높고 대상물에 대한 흡수력과 용해력이 높다는 사실이 밝혀졌다.¹⁹⁾

Paraquat에 의해 극단적으로 과도하게 생성되는 활성산소종을 소거하기 위하여 항산화제를 사용한 연구가 많이 진행되고 있으나 아직 효과적인 해독법이 개발되어 있지 않다. Paraquat의 독성에 대하여 인삼의 사포닌 성분의 항산화효능 뿐만 아니라,²⁰⁾ protopanaxatriol의 지질과산화물 생성 억제효과가 보고되어 있다.²¹⁾ 또한 홍삼 사포닌의 항산화효능은 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 직접적인 작용과 함께, 홍삼의 특정 성분들이 생체 내에서 내인성 항산화 물질의 합성능력을 강화시킴으로써 산화적 손상에 대한 회복작용을 향상시킨다는 보고도 있다.²²⁾ Paraquat의 실제적인 치료제로 그 효능이 인정된 것은 아직 없다고 볼 수 있으나 몇 가지 약물에 대한 연구는 지속적으로 진행되고 있다. Polyamine과 D-propranolol 등은 폐에서의 paraquat 축적방지를 위하여 사용되고 있으며, corticosteroid나 fibrinolytic agent 등은 폐 섬유화 억제 목적으로 사용되고 있다.^{23,24)} 또한 21-aminosteroid의 일종인 U-74389G는 철을 킬레이트 시키고 철의존성 지질과산화물의 제거와 산소유리기 제거 등에 사용된다고 알려져 있는데 실제로 paraquat에 중독된 실험쥐의 지질과산화를 억제하는 효과를 보인다고 보고되었다.²⁵⁾ Fujimoto²⁶⁾ 등은 vitamin C가 paraquat의 신장내 축적을 방해하여 신장조직내 paraquat의 양을 감소시킨다고 보고하였다. Paraquat유도체에 대한 강력한 결합체로 최근 bis(m-phenylene)-32-crown-10-based cryptand 뿐만 아니라,²⁷⁾ 대칭형의 cylindrical bis(crown ether)가 알려져 있다.²⁸⁾ Paraquat의 독성기전을 NIH3T3 세포를 사용하여 살펴본 결과, paraquat에 의한 세포사멸이 pyrrolidone dithiocarbamate와 desferrioxamine에 의하여 감소하였으나 N-acetyl-L-cysteine에 의해서는 영향을 받지 않았다. 또한 paraquat이 철 조절 단백질(IRP1)과 철 반응성 DNA 요소(IRE)와의 결합력을 증가시키는 것으로 보아 paraquat에 의한 세포독성에 철 대사과정이 관여할 것으로 추측하고 있다.²⁹⁾ 환원전리수가 paraquat에 의한 임파구 DNA 손상을 복구시키는 기전을 밝히기 위해서는 환원전리수의 항산화력의 본질에 대한 이해와 함께, 환원전리수의 항산화력과 DNA repair효소의 활성조절의 관련성에 대한 체계적인 연구가 필요할 것이다.

초 록

본 연구에서는 매우 낮은 음의 산화환원전위를 나타내는 환원전리수가 paraquat에 의한 사람 임파구 DNA의 손상에 미치는 영향을 Comet assay를 사용하여 조사하였다. 환원전리수 처리에 의해서 paraquat에 의해 산화적으로 손상된 DNA가 회복되는 정도를 손상된 DNA로 인한 꼬리부분의 형광광도의 %비율로 나타내었다. Comet assay는 개별 세포의 DNA의 산화적 손상을 측정하는데 널리 사용되고 있다. 사람 임파구에 다양한 농도의 paraquat을 37°C에서 30분간 처리한 후, 환원전리수를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그 결과 paraquat에 의한 임파구 DNA의 손상은 paraquat 농도증가에 의존적으로 증가하였다. 그러나 환원전리수를 처리한 결과 DNA의 산화적 손상이 paraquat 미처리 대조군 수준으로 거의 다 복구되었다.

Key words: 환원전리수, 파라쿼트, 사람 임파구 DNA

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국가지정연구실사업(N10302000029-04J000001400) 지원에 의해 수행되었습니다

참고문헌

- Lheureus, P., Leduc, D., Vanbinst, R. B. and Askenasi, R. (1995) Survival in a case of massive paraquat ingestion. *Chest* **107**, 285-289.
- Lin, J. L., Leu, M. L., Liu, Y. C. and Chen, G. H. (1999) A prospective clinical trial of pulse therapy with glucocorticoid and cyclophosphamide in moderate to severe paraquat-poisoned patients. *Am. J. Resp. Crit. Care* **159**, 357-360.
- Bus, J. S., Aust, S. D. and Gibson, J. E. (1974) Superoxide and singlet oxygen catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 749-755.
- Babior, B. M. and Peters, W. A. (1981) The O_2^- producing enzyme of human neutrophils: further properties. *J. Biol. Chem.* **256**, 2321-2323.
- Stocker, R. and Frei, B. (1991) In Oxidative stress: endogenous antioxidant defences in human blood plasma. Helmut, S. (ed.), San Diego, Academic Press INC, pp. 218-238.
- Hong, S. Y., Yang, D. H. and Kim, Y. T. (1996) Successful management of severe paraquat poisoning with free radical scavenger. *Korean J. Med.* **51**, 99-107.
- Kang, S. A., Jang, Y. J. and Park, H. (1998) In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radical Res.* **28**, 93-107.
- Ryoo, K. K., Kang, B. and Sumida, S. (2002) Electrolyzed water as an alternative for environmentally-benign semiconductor cleaning. *Mater. Res. Soc.* **17**, 1298-1304.
- Huang, K. C., Yang, C. C., Lee, K. T. and Chien, C. T. (2003) Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int.* **64**, 704-714.
- Xin, H., Zheng, Y. J., Hajime, N. and Han, Z. G. (2003) Effect of electrolyzed water and hydrocolloid occlusive dressings on excised burn-wounds in rats. *Chin. J. Traumatol.* **6**, 234-237.
- Sanetaka, S., Shigeru, K., Mariko, N., Takumi, M., Kenichi, K., Miho, G., Hidemitsu, H., Kazumichi, O., Shinkatsu, M. and Yoshinori, K. (1997) Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 269-274.
- Park, E. J. and Kang, M. H. (2002) Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J. Nutr.* **35**, 213-222.
- Singh, P. N., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **175**, 184-191.
- Cotelle, S. and Ferard, J. F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* **34**, 246-255.
- Friedmann, B., Caplin, M., Hartley, J. A. and Hochhauser, D. (2004) Modulation of DNA repair *in vitro* after treatment with chemotherapeutic agents by the epidermal growth factor receptor inhibitor Gefitinib (ZD1839). *Clin. Cancer Res.* **10**, 6476-6486.
- Chakraborty, S., Roy, M. and Bhattacharya, R. K. (2004) Prevention and repair of DNA damage by selected phytochemicals as measured by single cell gel electrophoresis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **23**, 215-226.
- Azqueta, A., Pachon, G., Cascante, M., Creppy, E. E. and de Cerain, A. L. (2005) DNA damage induced by quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative (hypoxic selective agent) in Caco-2-cells evaluated by the comet assay. *Mutagenesis in press.*
- Kleinsasser, N. H., Wallner, B. C., Wagner, C., Kastenbauer, E. R. and Harreus, U. A. (2004) DNA repair capacity in lymphocyte of nasopharyngeal cancer patients. *Eur. Arch Otorhinol.* in press
- Ryoo, K. K., Lee, Y. B., Lee, J. K. and Lee, M. Y. (2005) Permeability and dissolvability of cathodic electrolyzed water for electrophoretic gel and green tea components. *J. Korean Acad. Indus. Soc.* **6**, 87-93.
- Lee, H. J., Kim, D. Y. and Chang, C. C. (1999) Antioxidant effects of Korean Red Ginseng components on the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the liver of mouse treated with paraquat. *J. Ginseng Res.* **23**, 182-189.
- Choi, J. H. and Oh, S. K. (1984) Studies on the anti-aging action of Korean Ginseng (II): The inhibitory effects of diol and triol saponins on lipoperoxide formation. *Korean Biochem. J.* **17**, 445-455.
- Frei, B., England, L. and Ames, B. N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6377-6381.
- Bateman, D. N. (1987) Pharmacological treatments of paraquat poisoning. *Hum. Toxicol.* **6**, 57-62.
- Sittoum, C. (2005) Paraquat poisoning. *Resp. Care* **50**, 383-385.
- Oho, J. H., Chung, S. P., Lim, H., Noh, S. H., Kim, H. Y., Kim, S. H., Lee, H. S. and Min, J. S. (2000) Effect of antioxidant, U-74389G, on paraquat-intoxicated rats. *J. Korean Soc. Emerg. Med.* **11**, 431-436.

26. Fujimoto, Y., Nakatani, E., Horinouchi, M., Okamoto, K., Sakuma, S. and Fujita, T. (1989) Inhibition of paraquat accumulation in rabbit kidney cortex slices by ascorbic acid. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **65**, 245-248.
27. Hung, F., Switek, K. A., Zakharov, L. N., Fronczek, F. R., Slebodnick, C., Lam, M., Golen, J. A., Bryant, W. S., Mason, P. E., Rheingold, A. L., Ashorassani, M. and Gibson, H. W. (2005) Bis (m-phenylene)-32-crown-10-based cryptands, powerful hosts for paraquat derivatives. *J. Org. Chem.* **70**, 3231-3241.
28. Huang, F., Zakharov, L. N., Rheingold, A. L., Ashraf-Khorassani, M. and Gibson, H. W. (2005) Synthesis of a symmetric cylindrical bis (crown ether) host and its complexation with paraquat. *J. Org. Chem.* **70**, 809-813.
29. Ayaki, H., Lee, M. J., Sumino, K. and Nishio, H. (2005) Different cytoprotective effect of antioxidants and change in the iron regulatory system in rodent cells exposed to paraquat or formaldehyde. *Toxicology* **208**, 73-79.