

Poncirin의 니켈에 대한 세포독성억제효과

한두석^{**}, 양승진, 곽동근

원광대학교 치과대학 구강해부학교실

The Inhibitory Effects of Poncirin against Nickel Induced Cytotoxicity

Du-Suk Han^{**}, Seung-Jin Yang, Dong-Keun Kwak

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : Nickel is a major metal used in the nickel-chromium alloys of most orthodontic appliances, partial denture and implants. This study was carried out for the examination of the cytotoxicity on nickel sulfide in cultured NIH3T3 fibroblasts, and poncirin effect on nickel-induced cytotoxicity.

Methods : Cell viability for the MTT assay and cell adhesion activity for the XTT assay.

Results : The IC₅₀ of nickel sulfide by the MTT assay was 93.7 μ M . Poncirin was significantly increased the cell viability and cell adhesion activity.

Conclusion : Nickel was highly toxic and poncirin has the inhibitory effects against nickel induced cytotoxicity.

Key words : Nickel, Cytotoxicity, Poncirin

서론

Nickel (Nickel, Ni)은 치과에서 교정장치, 보철물 및 임플란트 제품을 만드는 재료로 쓰이며 대부분 합금형태로 개발되어 있다¹⁻⁴⁾. 합금이 구강내에서 타액과 접촉하게 되면 중금속 이온을 유리하게 되는데 니켈이 유리되어 인체 조직에 접촉되면 접촉성 피부염, 알레르기성 과민반응, 천식 및 상피세포암종 발생의 원인이 되는 것으로 보고되고 있어⁵⁻¹¹⁾ 니켈의 유리에 대한 관심이 증가되고 있다. 니켈은 DNA와 RNA구조와 기능에 필수적인 요소이며 세포막의 신진대사와 기능에 생물학적 역할을 담당하지만 과도한 양을 섭취하면 인체에 유해하다. 최근에는 니켈에 의한 산화적 스트레스 (oxidative stress)에 관한 연구가 관심을 유발하고 있는데 Costa¹²⁾ 등은 입자형 니켈이 수용성 니켈보다 산화적 스트레스를 강하게 나타내고 Chen¹³⁾ 등은 실험관내 시험에서 염화니켈 (nickel chloride)은 인체 혈액의 혈장내에 농도 또는 시간의존적으로 지방과산화 (LPO, lipid peroxidation)와 수산화기 (OH, hydroxyl radical)를 생산하며 glutathione (GSH), catechin (CTCH) 및 mannitol은 지방과산화와 수산화기형성을 감소시킨다고 보고하였으며 Wozniak과 Blasiak¹⁴⁾은 comet분석에 의하여 염화니켈 250~1000 μM 농도는 인체 임프구에서 DNA손상 (strand breaks 및 DNA-protein cross-links)을 유발한다고 보고하였다. Poncirin은 citrus속 열매에서 분리된 flavonoid의 주요성분이고 flavonoid는 flavanone류와 glycoside류로 분류되는데 poncirin은 flavanone류에 속하며¹⁵⁾ 페놀성 수산화기 (phenolic hydroxy group)와 함께 glucosides로 존재한다. 근래에 citrus속 주요성분의 생리활성효과와 약재로 활용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. Mouly 등¹⁶⁾은 liquid chromatographic method에 의하여 citrus속 열매로부터 flavanone glycosides (FGs)와 polymethoxylated flavones (PMFs) 두 속을 분리하였는데 FGs에는 narinutin, naringin, hesperidin, neohesperidin, didymin 및 poncirin이 PMFs에는 sinensetin, hexamethoxyflavone, nobiletin, scutellarein, heptamethoxyflavone 및 tangeretin이 분리되었다고 보고하였고 백 등¹⁵⁾은 citrus속 열매의 껍질인 청피로부터 nobiletin을 분리하여 기관지 평활근의 이완효과를 보고하였다. Citrus속 flavonoid의 생리활성효과는 이외에도 다양하게 연구되었는데 Calomme 등¹⁷⁾은 항돌연변이효과를 보고하였고, Chaumontet 등¹⁸⁾은 간의 상피세포에 대한 발암억제 효과를 보고하였으며, Harats 등¹⁹⁾은 lipoprotein의 산화가 감소되는 것을 고찰하였고, Neszmelgi 등²⁰⁾은 중남

미 인디언의 항알러지 약제인 o-galloylquinic acid가 기관지 수축을 이완시키는 것을 보고하였다. Poncirin의 구조식에는 수산화기, 산소, 수소등이 결합되어 니켈에 의한 산화적 스트레스를 감소시킴으로서 니켈의 세포독성을 감소시킬 가능성이 있다.

이에 저자는 정상세포인 NIH3T3섬유모세포에 니켈을 적용한 후 니켈의 세포독성과 또한 poncirin이 니켈에 미치는 영향을 세포생존률과 세포부착능으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약

세포배양에 사용한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)과 fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제이였으며, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) 정량과 XTT(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (XTT) 정량에 사용한 시약과 니켈은 Sigma사에서 구입하였으며 poncirin은 citrus속인 탱자나무열매에서 분리하였다.

2) 지각으로부터 생리활성물질의 분리

(1) 실험재료

실험에 사용한 탱자나무의 미숙과실의 껍질인 지각은 2001년 8월 전남 순천시 인근지역에서 채취하여, 씨를 제거하고 세절한 후 음건하여 사용하였다. 시료는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

(2) 추출 및 분획

탱자나무의 미숙과실(Citrus속 열매)인 지각 (2.0 kg)을 상온에서 메탄올 (10.0 l)로 5일간 3회 반복하여 추출한 다음 진공증류기로 35°C에서 용매를 증류하여 메탄올 추출물 423.0 g (21.15 %)을 얻었다. 이 메탄올 추출물 (418.0 g)을 10% 수용성메탄올 (500 ml)로 현탁시킨 후에 노르말 핵산으로 3회 추출하였다. 이 핵산 추출물 57.0 g (13.64 %)을 얻었다. 이와같은 방법으로 크로로포름, 에틸 아세테이트, 노르말 부탄올, 물 순으로 추출하여 크로로포름 추출물 109.0 g (26.08 %), 에틸 아세테이트추출물 20.0 g (4.78 %), 노르말 부탄올추출물 72.0 g (17.22 %), 물 추출물 118.0 g (28.23 %)을 얻었다.

(3) Poncirin의 분리

에틸 아세테이트가용부에서 이동상의 조건인 크로마토그래피법으로 분리한 후, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 자료로 비교분석하여 구조동정을 한 결과 Poncirin으로 문헌치와 일치하였다²¹⁾.

3) 실험기기

세포의 배양은 CO_2 incubator (Shellab. Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기 (Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 정량, XTT 정량에는 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

4) 세포배양

니켈의 세포독성과 poncirin의 세포독성 경감효과를 측정하기 위하여 NIH3T3 섬유모세포는 DMEM 배지에, 10% fetal bovine serum, penicillin (25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C , 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

2. 실험방법

1) MTT 정량분석법

Mosmann의 방법²²⁾에 의하여, NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기에 4×10^4 세포수를 넣고 24 시간 배양 후 니켈의 세포독성과 poncirin 자체의 세포독성을 측정하기 위하여 농도별 (1, 25, 50 및 100 μM)로 첨가하고, poncirin의 세포독성 경감효과를 측정하기 위하여 각 니켈의 IC_{50} 량과 poncirin을 농도별 (1, 25, 50 및 100 μM)로 첨가하여 48시간 배양한 후 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 $\mu\text{M/ml}$ 가 포함된 배양액을 배양용기당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

2) XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서 필요시에 laminin의 농도 (20 mg/ml)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하고 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200 μl 씩 분주하여 하룻밤동안 건조시킨 뒤 PBS로 두 번 세척하여 3% BSA를 각 well에 200 μl 씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음 제거하고 PBS로 두 번 정도 세척하였다. 배양된 NIH3T3 섬유모세포를 4×10^4 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후 MTT 정량분석법과 같은 방법으로 니켈과 poncirin을 넣고 다시 48시간 배양한 후 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 두 번 세척하였다(세척시 micropipett으로 조심스럽게 빨아낸다). 여기에 X-42512,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl-2H-tetrazolin-5-carboxilic], Sigma (XTT)와 혼합하여 (MEN의 최종농도를 25 μM 로 한다) 각 well에 200 μl 씩 주입하고 4~6 시간동안 배양한 뒤 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

3) IC_{50} 결정

니켈의 IC_{50} 결정은 배양중인 NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기당 4×10^4 cells/ml씩 넣고 24시간 배양 후 1, 25, 50, 100 μM 의 니켈을 첨가하여 48시간 배양한 후 MTT 정량과 XTT 정량을 하여 니켈이 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC_{50} 을 회귀직선식²³⁾에 의해 구하였다.

4) 통계처리

실험결과와 통계처리는 Students' t-test에 준하였고 유의성 검정은 one way ANOVA t-test와 비교하였으며 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 니켈의 세포독성

Nickel sulfide의 세포독성을 세포생존율로 확인 할 수 있는 MTT분석에 의하여 측정된 결과 50 μM nickel sulfide와 같이 통계적으로 유의한($P < 0.001$) 세포독성을 나타냈고 0 μM nickel sulfide와 같이 통계적으로 유의한($P < 0.05$) 세포독성을 나타냈다. Nickel sulfide의 IC_{50} 농도는 93.7 μM 로 세포독성이 강하게 나타났다(Table 1).

Table 1. Cytotoxicity of Nickel sulfide by MTT on NIH3T3 Fibroblast.

Division of Concentration of poncirin(μ M)	MTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
control	4.16 \pm 0.00	100
IC ₅₀	4.13 \pm 0.07	99.2
1	4.10 \pm 0.13	98.4
50	3.47 \pm 0.22	83.3**
100	1.68 \pm 0.07	40.5***

The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments.

Significantly different from the control value: **P<0.01, ***P<0.001(Students' t-test).

2. Poncirin의 니켈에 대한 세포생존율

Poncirin의 nickel sulfide에 대한 세포독성 경감효과를 세포생존율의 측면에서 알아보기 위하여 nickel sulfide IC₅₀농도와 poncirin을 농도별 (1, 25, 50 및 100 μ M)로 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후 48시간 째에 MTT흡광도를 측정하여 결과 nickel sulfide IC₅₀ 농도만을 처리하면 MTT흡광도는 55.4%로 50.0%로 감소하였다. Nickel sulfide IC₅₀농도와 poncirin을 농도별로 처리하면 1 μ M poncirin 농도에서부터 MTT 흡광도를 64.2%로 증가시켜 통계적으로 유의하게 (p<0.05) 세포독성은 감소하였고 50 μ M poncirin 농도까지 농도의존적으로 MTT흡광도를 74.6%로 증가시켰으나 100 μ M농도에서는 50 μ M농도보다 MTT흡광도를 70.4%로 감소시켰다(Table 2).

Table 2. Antitoxic Effects of Poncirin against Nickel sulfide Cytotoxicity.

Division of Concentration of poncirin(μ M)	MTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
control	4.14 \pm 0.05	100
IC ₅₀	2.30 \pm 0.19	55.4
1	2.66 \pm 0.14	64.2*
25	2.85 \pm 0.09	68.8*
50	3.09 \pm 0.17	74.6**
100	2.91 \pm 0.23	70.4*

The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments.

Significantly different from the control value: *P<0.05, **P<0.01 (Students' t-test).

3. Poncirin의 니켈에 대한 세포부착능

Poncirin의 nickel sulfide에 대한 세포독성 경감효과를 세포부착능의 측면에서 알아보기 위하여 nickel sulfide IC₅₀농도와 poncirin을 농도별 (1, 25, 50 및 100 μ M)로 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후 48시간 째에 MTT흡광도를 측정하여 결과 nickel sulfide IC₅₀ 농도만을 처리하면 XTT흡광도는 50.0%로 나타나 50.0%로 감소하였다. Nickel sulfide IC₅₀농도와 poncirin을 농도별로 처리하면 1 μ M poncirin 농도에서부터 XTT흡광도를 69.6%로 증가시켜 통계적으로 유의하게 (p<0.05) 세포독성은 감소하였고 50 μ M poncirin 농도까지 농도의존적으로 XTT흡광도를 78.4%로 증가시켰으나 100 μ M농도에서는 50 μ M농도보다 XTT흡광도를 74.0%로 감소시켰다(Table 3).

Table 3. Antitoxic Effects of Poncirin against Nickel sulfide Cytotoxicity.

Division of Concentration of poncirin(μ M)	MTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
control	4.16 \pm 0.01	100
IC ₅₀	2.07 \pm 0.02	50.0
1	2.90 \pm 0.08	69.6*
25	2.98 \pm 0.13	71.6**
50	3.26 \pm 0.35	78.4**
100	3.08 \pm 0.07	74.0**

The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments.

Significantly different from the control value: *P<0.05, **P<0.01 (Students' t-test).

고찰

치과에서 사용되는 재료들은 니켈과 크롬을 함유한 합금들이 많으며 인체 조직이 니켈과 크롬에 노출되면 접촉성 피부염, 알레르기성 과민반응, 천식 및 상피세포 암종 발생의 원인이 된다는 보고가 있어 니켈과 크롬의 유리에 대한 관심이 증가되고 있다⁵⁻¹¹⁾.

니켈과 크롬 합금은 타액에 접촉되면 니켈과 크롬 뿐만 아니라 여러 종류의 중금속 이온이 유리된다

사람의 경우 니켈의 음식물을 통한 1일 섭취량은 300~600 μ g이고, 뇨 중에 배출되는량은 1일 25~28 μ g이며 타액 1L 당 0.8~4.5 μ g을 함유하고 있다고 보고하였다²⁶⁾. 치과재료로 사용되고 있는 니켈크롬합금

이나 음식물로부터 섭취되는 니켈이 인체에 미치는 독성에 대한 연구는 많지 않으나 M'Bemba와 Chakrabarti²⁷⁾는 여러종류의 니켈에 대한 신장독성을 조사한 결과 독성이 강하게 나타난다고 보고하였는데 본 연구에서도 nickel sulfide의 MTT₅₀은 93.7 μ M로 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성이 강하게 나타났다. 그러나 Kasprzak 등²⁸⁾이 TRL 1215 세포주에 nickel oxide를 적용한 후 24시간째에 MTT분석 결과 LC₅₀은 232 \pm 16 μ M로 본 연구와 거의 일치하였다. Borenfreund 등²⁹⁾은 MTT 및 NR의 흡광도를 대조군과 비교하여 세포가 독성을 받기 시작하는 농도를 NR₉₀, MTT₉₀으로 하고, 심한 독성을 받은 농도를 NR₅₀, MTT₅₀으로 결정한 후, NR₅₀, MTT₅₀이 100 μ M 미만일 때를 고독성, 100-1,000 μ M 사이일 때를 저독성, 2,000 μ M 이상일 때를 무독성으로 독성판정기준을 제시하였다. Borenfreund 등²⁹⁾의 세포독성평가 기준에 의하여 nickel sulfide의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 고독성으로 판정할 수 있었다.

Poncirin은 citrus속 열매에서 분리되는 flavonoid의 주성분이지만 flavonoids 화합물은 저분자량으로 과일이나 야채 및 음료수 등에 폭넓게 존재하며 수많은 유도체가 알려져 있다. 이들 화합물은 항균작용, 항염증, 항암작용 및 항산화작용 등 다양한 생물활성들이 보고되고 있으며, 작용기전 또한 활발히 연구되고 있다³⁰⁾. 본 연구에 사용된 poncirin은 citrus속인 탕자나무의 껍질에서 분리한 성분으로 그 구조식에 수산기, 산소, 수소등이 결합되어 있다. Flavonoids 화합물과 페놀산(phenolic acid)은 정상세포에 세포독성 또는 유전독성이 없는 것으로 보고한 문헌들이 많으며^{31,32)} flavonoid 화합물인 poncirin의 세포독성도 이들 연구결과와 일치하였다. Poncirin이 니켈의 세포독성을 얼마나 감소시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 니켈 IC₅₀농도와 poncirin을 동시에 NIH3T3섬유모세포에 처리하고 48시간 후에 MTT분석과 XTT분석을 실시하였다. 중금속의 세포독성 또는 생체내 독성을 감소시킬 수 있는 물질을 찾아내기 위한 연구는 일부 이루어졌으나 poncirin에 의한 중금속의 세포독성 경감효과는 보고된 바 없어 타 보고와 비교할 수는 없으나 본 연구에서 poncirin은 nickel sulfide IC₅₀농도에 대한 세포독성을 MTT분석과 XTT분석에서 각각 70.4%와 74.0%로 감소시킬 수 있었다. 그러나 이들 세포독성은 50 μ M poncirin에서 나타난 결과이며 100 μ M poncirin에서는 오히려 세포독성 경감효과가 50 μ M농도에서보다 떨어지는 경향이 있었다. 이와 같이 일정농도 이상에서 세포독성 경감효과가 떨어지

는 이유에 대하여 한 등³³⁾은 카드뮴과 페놀산인 caffeic acid의 연구에서 카드뮴 IC₅₀농도인 61 μ M농도와 61 μ M caffeic acid를 1:1로 하여 백색 배양 신경아교세포에 적용한 후 UV/Vis spectrophotometer (Pyeunicam Co, USA)를 사용하여 흡수 스펙트럼 240-440 nm 범위를 선택하여 몰비법으로 착물의 최대 흡수 파장에서 흡광도를 계속 측정하여 흡광도의 변화와 몰비를 도출하여 몰비를 구한 결과 caffeic acid와 카드뮴을 동시에 첨가하면 카드뮴의 1:1 착물형성에 의하여 배양 백색 신경아교세포로부터 카드뮴이 제거된다고 보고하였다.

Fig. 1에서 poncirin의 A고리 hydroxyl기와 C 고리계의 전자적 성질에 따라 카드뮴 이온에 대한 좋은 ligand가 될 수 있어 flavanone의 hydroxyl치환기의 위치와 고리계(C-ring)의 전자적 성질에 따라 전이금속에 대한 좋은 ligand가 될 수 있어 전이금속의 Cu, Zn, Fe 이온등에 강한 친화력을 갖고 있다고 보고하고 있다³⁵⁾. 이는 poncirin은 flavone 화합물로서 A고리의 C₅ 위치에 있는 hydroxyl기와 C 고리의 C₄ 위치에 있는 ketone 그룹이 conjugate system으로 음전하량을 증가시켜 니켈과의 안정한 착물형성의 기여도를 증가시키기 때문으로 음전하의 ligand로서 카드뮴과 결합할 때 두 자리 리간드로 작용하여 카드뮴과 flavone과 1:1 착물을 형성할 것이라고 생각된다. 또한 NIH3T3 섬유모세포에 대한 배지의 PH조건(ph=8.0-8.2)이 flavone의 A고리의 C₅의 hydroxyl기와 C고리의 C₄의 Ketone 그룹의 음전하량을 증가시키는 염기요인으로써 작용하리라 추측된다(Fig. 9). 이와 같이 A고리와 C고리의 conjugate system에 의한 니켈에 대한 binding site로 작용하기 때문에 NIH3T3 섬유모세포의 니켈독성을 경감시킬 수 있다고 생각된다. 앞으로 니켈과 poncirin과 같은 물질에 의하여 일어나는 세포사 과정은 물리적, 화학적 및 생리학적 과정을 세포에 적용하면서 더 많은 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

결론

니켈의 세포독성과 이를 감소시킬 수 있는 물질을 찾아내기 위하여 정상세포인 NIH3T3섬유모세포에 대한 nickel sulfide와 세포독성과 니켈의 독성효과에 대한 poncirin의 영향을 MTT 정량분석에 의한 세포생존율과 XTT 정량분석에 의한 세포부착능을 하였다. 그 결과 MTT분석에서 nickel sulfide의 IC₅₀농도는 93.7 μ M이었다. 또한, poncirin은 nickel sulfide 세포

독성에 대하여 세포생존율과 세포부착능을 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 이상의 결론에서 니켈은 NIH3T3 섬유모세포에 강한 독성을 나타냈으며 또한, poncirin은 니켈의 세포독성을 억제시킬 수 있는 물질임을 알 수 있었다

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Brokhurst PJ, Pham HL. Orthodontic silver brazing alloys. *Aust Orthod J.* 1989. 11(2): 96-99.
2. Berge M, Gherdet NR and Erichsen ES : Corrosion of silver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 1982. 40(2): 75-79.
3. Shih CC, Shih CM, Chen YL, Su, YY, Shih JS, Kowk CF and Lin SJ : Growth inhibition of cultured smooth muscle cells by corrosion products of 316 L stainless steel wire. *J Biomed Mater Res.* 2001. 57(2): 200-207
4. Wataha JC, Nelson SK and Lockwood PE : Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein. *Dent Mater.* 2001. 17(5): 409-414
5. Park HY and Shearer TR : In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. *Am J Orthod.* 1983. 84(2): 156-159
6. Rickles NH : Allergy in surface lesions of the oral mucosa. *Oral Surg,* 1972. 33: 744-754.
7. Rickles NH : *Oral Pathology,* New York, McGraw-Hill Book Company, Inc. 1965. 501-534.
8. Jones TK, Hansen CA, Singer MT and Kessler HP : Dental implications of nickel hypersensitivity. *J Prosther Dent.* 1986. 56: 507-509
9. Stern RM : *Chromium compounds.* Amsterdam, Elsevier Biomedical Press. 1982. p. 5.
10. Mitchell CL : *Nervous system toxicology.* New York, Raven Press. 1985. pp 278.
11. Moffa JP : Biological effects of Nickel-containing dental alloys. *Council on Dental Materials, Instruments and Equipment. J Amer Dent Assoc.* 1982. 104: 501-505
12. Costa M, Salnikow K, Sutherland JE, Broday L, Peng W, Zhang Q and Kluz T : The role of oxidative stress in nickel and chromate genotoxicity. *Mol Cell Biochem.* 2002. 234-235(1-2):265-75.
13. Chen CY, Su YJ, Wu PF and Shyu MM : Nickel-induced plasma lipid peroxidation and effect of antioxidants in human blood: involvement hydroxyl radical formation and depletion of alpha-tocopherol. *J Toxicol Environ Health A.* 2002. 65(12):843-52.
14. Wozniak K and Blasiak J : Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride. *Mutat Res,* 2002. 514(1-2):233-43.
15. 백순옥, 한종현, 천현자, 한두석, 한성수, 김일광 : 한국산 청피에서 분리한 Nobiletin의 기관지 평활근 이완효과. *대한화학회지.* 2002. 46(3):205-212.
16. Mouly P, Gaydou EM and Auffray A : Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1998. 800(2):171-9.
17. Calomme M, Pieters L, Vlietinck A and Vanden Berghe D : Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med.* 1996. 62(3):222-6.
18. Chaumontet C, Droumaguet C, Bex V, Heberden C, Gaillard-Sanchez I and Martel P : Flavonoids(apigenin, tangeretin) counteract tumor promoter- induced inhibition of intercellular communication of rat liver epithelial cells. *Cancer Lett,* 1997. 114(1-2):207-10.
19. Harats D, Chevion S, Nahir M, Norman Y, Sagee O and Berry EM : Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998. 67(2):240-5.
20. Neszmelyi A, Kreher B, Muller A, Dorsch W and Wagner H : Tetragalloy- lquinic acid, the

- major antiasthmatic principle of *Galphimia glauca*. *Planta Med.* 1993. 59(2):164-7.
21. Kim DH, Bae EA and Han MJ : Anti-*Helicobacter pylori* activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull.* 1999. 22(4):422-4.
 22. Mosmann T : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983. 65: 55-63.
 23. 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 : 기초생물통계학 제 9장 직선회귀. 학문사. 1991. 179-198.
 24. Mizrahi A : Biologicals from animal cells in culture. *Bio. Technology* 4. 1986. 123-128.
 25. Freshney RI : Culture of animal cells-A manual of basic Technique. PP. 1987. 175-180, Alan R, Liss Inc., New York,
 26. Schroeder HA, Balassa JJ and Tipton IH : Abnormal trace metals in man-nickel. *J Chron Dis.* 1961. 15:51-65.
 27. M'Bemba Meka P and Chakrabarti SK : Effects of different nickel compounds on the transport of para-aminohippurate ion by rat renal cortical slices. *Toxicol Lett* 6. 2001. 122(3):235-244,
 28. Kasprzak KS, Kadiiska M, Liu J, Chen H, Maciag A, Mason RP, Waalkes MP and Qu W : Mechanisms of arsenic-induced cross-tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in rat liver epithelial cells. *Toxicol Sci*, 2001. 63(2):189-195.
 29. Borenfreund E and Puerner JA : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *J Tissue Culture Meth.* 1984. 9: 7.
 30. Lee JJ, Son MW, Yoo MH, Jang MS, Kim WB, and Lee KC : Analysis of DA-6034, a new flavonoid derivative in biological fluids by HPLC. *Yakhak Hoeji.* 1998. 42(2):149-152,
 31. 강병철, 권은아, 이나래, 안병욱, 김원배, 이상구, 이국현, 정진호, 성명훈, 서울대학교병원 임상의학연구소, 동아제약(주) 연구소 : 새로운 플라보노이드 유도체인 DA-6034에 대한 유전독성에 관한 연구. *한국독성학회.* 2002. 18(4):349-354.
 32. 박명오, 이명호, 이희재, 한두석 : NIH3T3섬유모세포에 대한 니켈의 세포독성과 ferulic acid의 독성경감효과. *대한구강해부학회지.* 2002. 26(2): 105-14.
 33. 한두석, 백승화, 이홍, 배현옥, 김영옥, 광정숙, 유현경 : 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발(제5보) 배양 백서 신경아교세포에서 caffeic acid와 카드뮴의 결합에 의한 해독효과. *한국독성학회지.* 1995. 11(2):241-246.