

## Antioxidant Effect of Poncirin and Cytotoxicity on Cultured Human Skin Fibroblast Damaged by Methyl Mercury

In-Ju Jung<sup>1</sup>, Jong-Cheon Back<sup>2</sup> and Yu-Sun Choi<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural Science, Dongshin University, Naju 520-714, Korea.

<sup>2</sup>Department of Public Health, Wonkwang University, Graduate School, Iksan 570-749, Korea.

<sup>3</sup>Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gunpo 435-040, Korea

In order to evaluate on the cytotoxicity of methyl mercury (MM) and antioxidant effect of phenolic compound, poncirin against MM-induced cytotoxicity, XTT assay was performed to determine the cell viability after human skin fibroblasts (Detroit 51) were grown in the media containing various concentrations of methylmercuric chloride (MMC). And also, the antioxidant effect of poncirin on the cytotoxicity induced by MMC was examined by cell viability and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in these cultures. MMC decreased cell viability in dose-dependent manner in these cultures and the midcytotoxicity value was determined at concentration of 30  $\mu$ M MMC after human skin fibroblasts were treated with 10~50  $\mu$ M MMC for 72 hours, respectively. MMC was highly toxic on cultured human skin fibroblasts by toxic criteria. MMC-mediated cytotoxicity was related with oxidative stress by the diminution of toxic effect according to the treatment of vitamin E. In the antioxidant effect of poncirin, it showed vitamin E-like DPPH radical scavenging activity at 90  $\mu$ g/ml poncirin and also, remarkably increased cell viability compared with MMC-treated group. From these results, it is suggested that MMC-mediated cytotoxicity was highly toxic and was related with oxidative stress in cultured human skin fibroblasts, and also phenolic compound such as poncirin showed the protection on MMC-induced cytotoxicity by antioxidant effect in these cultures.

**Key Words:** Methylmercuric chloride, Cytotoxicity, Poncirin, Antioxidant effect

### 서 론

수은의 독성은 매우 강하기 때문에 인체에 노출될 경우 대뇌마비와 정신발육지연을 비롯하여 뇌조직의 손상으로 인한 정신기능의 소실등이 알려져 있다 (Kasuya, 1975; Greener and Kochen, 1983). 또한, 피부접촉과 호흡으로 인해 피부를 비롯한 호흡계통과 같은 여러 장기에도 질환을 유발할 뿐만 아니라 병변의 회복 후에도 각종 후유증으로 심한 부작용을 낳고 있다 (Synder, 1971; Kasuya, 1975). 그럼에도 불구하고 수은은 온도계제조나 제련, 도금, 수은전지 및 의약품 등과 같은 생활필수품의 생산공정에 널리 사용되고 있다 (Kasuya, 1975; Park et al., 1996).

그러나 아직까지 수은독성에 대한 효과적인 치료방법은 물론이고 독성기전에 대하여도 자세히 밝혀져 있지 않다 (Ganther, 1980). 특히, 수은중 메틸수은이나 알킬수은과 같은 유기수은은 반감기가 길기 때문에 무기수은과는 달리 독성이 더욱 강하다 (Kasuya, 1975; Park et al., 1996). 최근 메틸수은의 분해시 메틸라디칼이 생성된다는 것이 제시되면서 수은의 독성효과를 산화적 손상 측면에서 밝히려는 연구가 시도되고 있다 (Ganther, 1980; Park et al., 1996).

메틸라디칼은 산소자유기의 일종으로서 세포의 손상이나 고사를 초래함은 물론 (Peterson et al., 1981), 세포막을 구성하고 있는 지질성분을 산화시켜 지질과산화반응 (lipid peroxidation)을 일으킴으로서 세포막의 손상내지는 변형을 유도한다 (Hayase et al., 1989; Harats et al., 1998). 이 같은 막손상은 막주위를 싸고 있는 물질의 세포내 유입과 세포막 물질출입에 많은 변화와 장애를 초래하기 때문에 결국 세포를 죽게 만든다 (Rosen et al., 1993; Mattson et al., 1993). 더욱이 산화적 손상은 세포내 항산화효소

\*논문 접수: 2007년 11월 28일

수정재접수: 2007년 12월 12일

†교신저자: 최유선, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142,

원광대학교 의과대학 산본병원

Tel: 031-390-2845, Fax: 031-390-2399

e-mail: dbtjschoi@hanmail.net

의 손상을 비롯하여 세포내 사립체의 전자전달계의 이상, 칼슘이온과 관련된 막수용체의 과활성을 유발한다 (Przyklenx와 Kloner, 1986; Pellegrini-Giampietro et al., 1990). 특히, 칼슘이온과 관련된 glutamate 수용체의 과활성은 흥분성 아미노산을 분비케 하며 이는 세포내 다량의 칼슘 유입을 초래하게 된다 (Mattson et al., 1993). 따라서 메틸수은의 독성을 산화적 손상과 연관시켜 이의 치료적 접근의 한 방법으로 허브나 약용식물과 같은 천연물에서 항산화효과가 뛰어난 약리활성물질을 추출하려는 연구가 시도되고 있다 (Goldberg et al., 1999; Hirota et al., 2000).

한편, 천연추출물중 항산화효과나 항암효과가 뛰어나다고 알려진 페놀화합물은 천마나 수수꽃다리 및 citrus 속의 속하는 약용식물에 다량 들어 있는 성분으로서 (Krizkova et al., 2000; Lavid et al., 2001) 특히, citrus속에 포함되는 약용식물들에는 flavonoid를 비롯하여 터펜, 벤젠류와 같은 방향족 화합물이 줄기나 열매 등에 많이 들어 있다 (Calomme et al., 1996; Harats et al., 1998; Sun et al., 2002). 이중 poncirin은 citrus속의 열매에서 추출되는 페놀 화합물성분의 일종으로 질경이과에 속하는 차전초 (Plantaginis Herba)나 차전자 (Plantaginis Semen)와 같은 약용식물이나 또는 귤과 (Rutaceae)에 속하는 광귤나무 (Citrus aurantium L.) 등과 같은 다년생 초본식물에 다량 함유되어 있는데 이 성분의 약리작용으로는 항산화작용과 해독 작용과 같은 효능이 있다고 알려져 있으나 (Krizkova et al., 2000; Sun et al., 2002; Han et al., 2006), 이에 대한 연구는 매우 드물다 (De Heredia et al., 2001; Han et al., 2006). 특히, 페놀성분이 중금속에 대한 독성억제효과가 있다고 보고되면서 poncirin과 같은 폴리페놀화합물의 독성경감 효과의 기전규명에 대한 연구가 시도되고 있다 (Heilmann et al., 2000; Park et al., 2002). 따라서 본 연구에서는 배양 인체피부섬유모세포를 재료로 하여 메틸수은의 세포독성을 비롯하여 메틸수은의 독성과 산화적 손상과의 상호관련 및 메틸수은의 세포독성에 대한 페놀화합물의 일종인 poncirin의 영향을 항산화 측면에서 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

배양용기에 가득 자란 인체피부섬유모세포 (Detroit 51) 를 Michikawa 등 (1994)의 방법에 따라 분리 배양하였다. 즉, 0.5% trypsin (Sigma)을 이용하여 분리한 세포를 Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco)에 10% fetal bovine

serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 96 배양용기 (well plate)에 분주하였다. 분주가 완료된 후 72시간 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였다.

### 2. 약제 제조

본 실험에 사용한 methylmercuric chloride (MMC, Sigma)는 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM (minimum essential medium, Sigma) 배양액으로 최종 농도가 10  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 필요시 일정농도로 희석 사용하였다. XTT[2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt]는 Sigma회사에서 구입하였으며 실험 전날 200  $\mu$ g/ml의 저장액을 만들어 냉장보관한 후 필요에 따라 배양액에 첨가나 희석하여 사용하였다. 그 밖에 DPPH와 vitamin E는 Sigma Chemical Co. (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 3. 약제 추출

탱자나무의 미숙과실인 지실을 상온에서 메탄올로 5일간 3회 반복하여 추출한 다음 진공증류기로 35°C에서 용매를 증류 후 메탄올추출물을 얻었다. 이를 10% 수용성 메탄올로 현탁 후 노르말핵산으로 3회 추출하여 42.3 g을 얻었다. 이를 다시 실리카 겔 크로마토그래피를 이용하여 poncirin을 분리동정하였다.

### 4. MMC 처리

96 배양용기에 분주한 후 48시간 동안 배양이 완료된 세포에 10  $\mu$ M 부터 50  $\mu$ M 까지의 MMC가 농도별로 각각 포함된 배양액에서 72시간 동안 배양한 후 MMC가 인체피부섬유모세포에 미치는 영향을 분석하였다.

### 5. 항산화제 처리

Vitamin E가 100~120  $\mu$ g/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양세포를 MMC에 처리하기 전에 2시간 동안 배양한 후 이의 영향을 분석하였다.

### 6. Poncirin의 처리

Poncirin이 MMC에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 인체피부섬유모세포에 125~150  $\mu$ g/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 배양한 후 이의 영향을 XTT assay에 의하여 정량분석하였다.

**Table 1.** The dose-dependent absorbance of MMC on human skin fibroblasts (Detroit 51) by XTT assay

Exposure Concentration of MMC ( $\mu\text{M}$ )	XTT assay	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Control	7.74 $\pm$ 0.52	100
10	4.11 $\pm$ 0.37	53.1*
30	4.02 $\pm$ 0.41	51.9*
50	3.36 $\pm$ 0.29	43.4*

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $P$ <0.05

### 7. XTT 정량분석

XTT의 정량분석을 위하여 poncirin을 처리하지 않은 배양 인체피부섬유모세포를  $5 \times 10^5$  세포수를 laminin 도포용기에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 약재를 72시간 동안 처리한 다음 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 세척이 끝난 후 실험날 전에 제조한 XTT를 well당 0.2 ml씩 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 4시간 동안 배양 후 DMSO로 처리하여 분광광도계로 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

### 8. DPPH 자유기제거능 분석

Blios (1956)의 방법에 따라 메탄올에 녹인 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 vortex mixer로 10초간 반응시킨 후 실온에서 30분간 방치하였다. 반응 완료 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유기제거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소 시키는데 필요한 농도인 RC<sub>50</sub> (reduction concentration)으로 나타냈으며 대조군의 흡광도와 실험군의 흡광도 차이에 의한 감소율에 의한 백분율로 표시하였으며 vitamin E를 양성대조군으로 하였다.

### 9. 통계 처리

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student *t*-test를 사용하였으며  $P$ 가 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. MMC의 독성효과

#### 1) 농도에 의한 세포생존율 분석

배양중인 인체피부섬유모세포를 PBS로 서너번 수세한 후 10~50  $\mu\text{M}$  MMC의 각각 농도에서 72시간 배양한

**Table 2.** Time-dependent absorbance of MMC on cultured human skin fibroblasts (Detroit 51)

Exposure Treated tim of MMC (hour)	XTT assay	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Control	9.59 $\pm$ 0.72	100
72	5.22 $\pm$ 0.36	54.4*
88	2.46 $\pm$ 0.31	25.7**
96	2.42 $\pm$ 0.17	25.2**

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

다음 XTT값에 의한 세포생존율을 대조군과 비교 조사한 결과 10  $\mu\text{M}$  처리에서는 대조군인 100% (7.74 $\pm$ 0.52)에 비하여 53.1% (4.11 $\pm$ 0.37)로 나타났으며, 30  $\mu\text{M}$ 의 경우 51.9% (4.02 $\pm$ 0.41)로 나타났다. 또한 50  $\mu\text{M}$ 에서는 43.4% (3.36 $\pm$ 0.29)로 나타나 10~50  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 모두 유의하게 감소하였다 ( $P$ <0.05). 이 때 XTT<sub>50</sub> 값은 30  $\mu\text{M}$ 에서 나타났다 (Table 1).

#### 2) 시간에 의한 세포생존율 분석

MMC를 인체피부섬유모세포에 처리시간별에 의한 세포생존율을 조사하기 위하여 XTT<sub>50</sub> 농도인 30  $\mu\text{M}$  MMC의 농도에서 72~96시간 동안 각각 처리한 결과 72시간 배양에서 세포생존율은 대조군인 100% (9.59 $\pm$ 0.72)에 비하여 54.4% (5.22 $\pm$ 0.36)로 나타났다 ( $P$ <0.05). 또한, 88시간과 96시간의 배양에서는 각각 25.7% (2.46 $\pm$ 0.31)와 25.2% (2.42 $\pm$ 0.17)로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 ( $P$ <0.01) (Table 2).

### 2. MMC에 대한 vitamin E의 영향

MMC의 XTT<sub>50</sub> 값인 30  $\mu\text{M}$  농도에서 인체피부섬유모세포를 처리하기 2시간 전에 100~120  $\mu\text{g/ml}$ 의 vitamin E가 각각 포함된 배양액에서 세포를 전처리 후 세포생존율을 조사하였다. MMC 처리군의 세포생존율은 대조군인 100% (4.89 $\pm$ 0.37)에 비하여 56.0% (2.74 $\pm$ 0.92)로 나타났다. 반면 100  $\mu\text{g/ml}$  vitamin E의 처리에서는 세포생존율은 85.1% (4.16 $\pm$ 0.37)로 나타났으며 ( $P$ <0.05), 또한 120  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리에서는 92.6% (4.53 $\pm$ 0.25)로 나타나 ( $P$ <0.01), 이는 MMC만을 처리한 군에 비하여 모두 유의하게 증가하였다 (Table 3).

### 3. Poncirin의 DPPH 자유기소거능

Poncirin이 10~90  $\mu\text{g/ml}$ 로 각각 포함된 메탄올 시료에 대한 자유기소거능은 10  $\mu\text{g/ml}$  poncirin 처리에서는 4.7%로 나타났으며 30  $\mu\text{g/ml}$  처리에서는 28.1%로 나타났다.

**Table 3.** The effect of vitamin E on MMC-induced cytotoxicity on cultured human skin fibroblasts (Detroit 51)

Exposure	XTT assay	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Concentration of vitamin E ( $\mu$ M)		
Control	4.89 $\pm$ 0.37	100
30 MMC	2.74 $\pm$ 0.92	56.0
100	4.16 $\pm$ 0.37	85.1*
120	4.53 $\pm$ 0.25	92.6**

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the MMC-treated group. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

**Table 4.** The DPPH radical scavenging activity of poncirin was determined at a wavelength of 517 nm

Concentration of poncirin ( $\mu$ g/ml)	DPPH radical scavenging activity	
	% of control	
10	4.7 $\pm$ 0.25	
30	28.1 $\pm$ 1.36	
90	62.5 $\pm$ 4.89**	

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \*\* $P$ <0.01

또한 90  $\mu$ g/ml의 처리에서는 62.5%로 나타났다. 특히, 90  $\mu$ g/ml poncirin 처리에서는 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ( $P$ <0.01) (Table 4). 이 때 poncirin에 대한 양성대조군으로 사용한 vitamin E의 자유기소거능 (Table 5)과의 비교에서는 90  $\mu$ g/ml poncirin과 40  $\mu$ g/ml vitamin E의 농도에서는 각각 자유기소거능이 62.5%와 63.3%로 나타남으로서 poncirin의 자유기소거능이 vitamin E와 거의 비슷하게 나타났다 (Table 4).

#### 4. MMC에 대한 poncirin의 영향

또한 MMC를 인체피부섬유모세포에 처리한 시간에 따른 세포의 생존율을 조사하기 위하여 XTT<sub>50</sub> 농도인 30  $\mu$ M MMC의 농도에서 처리하기 2시간 전에 125~150  $\mu$ g/ml poncirin을 처리한 결과 MMC만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (2.52 $\pm$ 0.35)에 비하여 64.3% (1.62 $\pm$ 0.17)로 나타났는데 비하여 125  $\mu$ g/ml과 150  $\mu$ g/ml poncirin의 처리에서 세포생존율이 대조군에 비하여 각각 82.5% (2.08 $\pm$ 0.14)와 83.3% (2.10 $\pm$ 0.19)로 나타났으며 이는 MMC만을 처리한 경우에 비하여 모두 세포생존율이 유의하게 증가하였다 ( $P$ <0.05) (Table 6).

## 고 찰

MMC와 같은 유기수은의 독성은 기도를 통한 체내 흡

**Table 5.** The DPPH radicle scavenging activity of vitamin E was determined at a wavelength of 517 nm

Concentration of vitamin E ( $\mu$ g/ml)	DPPH radical scavenging activity	
	% of control	
20	57.6 $\pm$ 4.72*	
40	63.3 $\pm$ 5.14**	
80	84.1 $\pm$ 6.83**	

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

**Table 6.** The effect of poncirin on MMC-induced cytotoxicity on cultured human skin fibroblasts (Detroit 51)

Exposure	XTT assay	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Concentration of poncirin ( $\mu$ g/ml)		
Control	2.52 $\pm$ 0.35	100
30 $\mu$ M MMC	1.62 $\pm$ 0.17	64.3
125	2.08 $\pm$ 0.14	82.5*
150	2.10 $\pm$ 0.19	83.3*

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the MMC-treated group. \* $P$ <0.05

수와 (Ganther, 1980), 또한 피부를 통해 직접 피하로 침투한 경우에 매우 위협적이다 (Kasuya, 1975). 본 연구에서는 MMC의 독성효과와 이에 대한 폐쇄화합물의 일종인 poncirin의 영향을 산화적 손상 측면에서 조사하기 위하여 인체피부섬유모세포를 배양하여 먼저 MMC의 세포독성을 조사하였다. 본 실험에서 인체피부섬유모세포에 10~50  $\mu$ M의 MMC가 각각 포함된 배양액에서 72시간 동안 배양한 결과 농도 비례적으로 세포생존율이 감소하였다. 특히, 30  $\mu$ M 이상 MMC 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율은 유의한 감소한 보였다 ( $P$ <0.05). 본 실험에서 MMC는 Borenfreund와 Puener (1984)의 독성판정기준에 의하여 고독성의 세포독성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이같은 세포독성은 MMC가 세포내 단백질합성을 억제하여 세포생존율을 감소시켰거나 (Greener and Kochen, 1983), 또는 세포내 핵산물질의 손상으로 세포생존율을 감소시켰을 가능성을 고려할 수가 있다 (Nishio and Uyeki, 1985). 또 하나의 가능성은 MMC가 조면내형 질세망이나 리보솜, 또는 에너지생산과 전자전달계에 관련이 깊은 사립체 (mitochondria)와 같은 세포소기관들에 손상을 초래함으로써 세포생존율을 감소시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Borenfreund and Puerner, 1984). 본 실험에서 XTT 분석이 세포소기관의 효소활성과 관련이 깊기 때문에 후자의 원인이 더 클 것으로 생각된다. 한편, MMC의 독성과 산화적 손상간의 상호관련성을 알아보기

위하여 항산화제인 vitamin E를 100~120 µg/ml 농도로 배양세포에 전처리한 결과 농도의존적으로 세포생존율의 증가를 보였으며 특히, 100 µM 이상 처리에서는 MMC의 처리군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ( $P<0.01$ ). 이 결과는 vitamin E가 항산화제인 것을 고려해 볼 때 MMC의 독성이 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다는 것을 증명하고 있다 (Kasuya, 1975; Przyklenk and Kloner, 1986). 한편, poncirin의 항산화능을 알아보기 위하여 DPPH 자유기소거능분석을 시행하였다. 그 결과 poncirin의 처리농도에 비례하여 자유기소거능이 증가하였으며 90 µg/ml, poncirin의 처리에서는 62.5%로, 이는 양성 대조군으로 사용한 vitamin E의 40 µg/ml 농도처리에서 나타난 자유기소거능 63.3%와 큰 차이가 나타나지 않음으로서 vitamin E와 같은 유효한 항산화효과를 가지고 있는 것으로 나타났다 (Kasuya, 1975; Han et al., 2006). 한편, MMC의 독성에 대한 poncirin의 영향을 항산화 측면에서 조사하기 위하여 125~150 µg/ml 농도의 poncirin이 각각 포함된 배양액에서 인체피부섬유모세포를 전처리한 다음 MMC에 대한 세포생존율을 분석하였다. 그 결과 MMC 처리군에 비하여 처리한 poncirin의 농도에 비례하여 세포생존율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ( $P<0.05$ ). 이러한 결과는 poncirin이 MMC의 산화적 손상으로 부터 세포를 방어한 것으로서, 이는 아마도 poncirin이 MMC에 의한 세포내 catalase를 비롯하여 glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소의 손상을 방어하였거나, 또는 MMC에 의해서 형성된 자유라디칼을 제거함으로써 세포생존율을 증가시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Przyklenk and Kloner, 1986; Han et al., 2006). 또한, 본 실험의 결과는 Harats 등 (1998)이 poncirin이나 ferulic acid와 같은 citrus속의 약리활성 성분들이 지질단백질의 산화적 손상을 억제하였다는 보고나, Park 등 (2002)이 ferulic acid가 니켈의 산화적 손상을 방어함으로써 독성경감효과를 나타냈다는 보고와 일치한 것으로서 나타났다. 위의 타 연구결과들은 모두 poncirin과 같은 페놀성분들이 항산화효과를 가지고 있다는 것을 증명하고 있으며 (Heilmann et al., 2000), 본 실험에서도 DPPH 자유기소거능분석에 의해 poncirin의 항산화능이 확인되었다. 그러나 수은독성에 대한 더욱 자세한 기전 규명을 위해서는 MMC가 항산화효소에 미치는 직접적인 영향을 비롯하여 단백질합성 및 이와 관련이 깊은 세포소기관들에 대한 작용현상 등이 추후 연구되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 연구됨.

## REFERENCES

- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 1958. 26: 1199-1200.
- 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.
- Calomme M, Pieters L, Vlietinck A, Vanden Berghe D. Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med.* 1996. 62: 222-2226.
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere* 2001. 45: 85-90.
- Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci.* 1980. 355: 212-225.
- Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* 1999. 47: 3978-3985.
- Greener Y, Kochen JA. Methylmercuric toxicity in the chick embryo. *Teratology* 1983. 28: 23-28.
- Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, Song HJ. The Effect of Poncirin on Hexavalent Chromium in NIH3T3 Fibroblasts in Vitro. *Kor J Herbol.* 2006. 21: 101-107.
- Harats D, Chevion S, Nahir M, Norman Y, Sagee O, Berry EM. Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamin C and E in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998. 67: 240-245.
- Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem.* 1989. 53: 3383-3389.
- Heilmann L, Calis I, Kirmizibekmez H, Schuhly W, Harput S, Sticher O. Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships. *Planta Med.* 2000. 66: 746-748.
- Hirota A, Taki S, Kawaii S, Yano M, Abe N. 1,1-Diphenyl-2-picrlylhydrazyl radical-scavenging compounds from soybean miso and antiproliferative activity of isoflavones from soybean

- miso toward the cancer cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000. 64: 1038-1040.
- Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975. 32: 354-374.
- Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res.* 2000. 469: 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.
- 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: 1-13.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res.* 1994. 37: 62-70.
- Nishio A, Uyeki EM. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J Toxicol Environ Health.* 1985. 15: 237-244.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 1996. 17: 37-46.
- Park MH, Lee MH, Lee HJ, Han DS. Cytotoxicities of Nickel and Effects of Ferrous Acid in Cultured NIH3T3 Fibroblasts. *Kor J Oral Anat.* 2002. 26: 105-114.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F. Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 1990. 10: 1035-1041.
- Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. *Toxicol Lett.* 1981. 9: 101-108.
- Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of stunned myocardium". *Cir Res.* 1986. 58: 149-157.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A, et al. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993. 362: 59-62.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of Common Fruits. *J Agric Food Chem.* 2002. 45:7449-7454.
- Synder RD. Congenital mercury poisoning. *New Eng J Med.* 1971. 284-1014.