

## 비타민 C와 글루타치온이 수은유도 ROS 생성에 미치는 영향

권 경 진, 신 윤 용\*

이화여자대학교 약학대학

## Effect of Vitamin C and GSH on the Hg Induced ROS

Kyoung Jin Kwon and Yhun Yhong Sheen\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

### ABSTRACT

The genotoxicity of mercury compounds have been investigated with a variety of genetic endpoints in prokaryotic and eukaryotic cells. The mercury ions are positively charged and easily form complexes with DNA by binding with negatively charged centers to cause mutagenesis. Further, the mercury ions can react with sulfhydryl (-SH) groups of proteins associated with DNA replication and alter genetic information. Another mechanism by which mercury damages DNA molecule is via its probable involvement of reactive oxygen species (ROS) and induces DNA strand breaks.

In order to investigate whether the ROS production was induced by mercury, we performed ROS assay. As the result, the ROS production was significantly increased when it grows dose-dependently and time-dependently. We compared mercury alone-treated group and mercury co-treated with Vitamin C or glutathione group. As the result, the ROS production induced by mercury was decreased by Vitamin C and glutathione. Co-treated with Vitamin C and glutathione group was the most effective to lowering ROS production induced by mercury.

**Key words** : mercury, Vitamin C, GSH, reactive oxygen species

### 서 론

산화적 스트레스는 활성산소종(ROS)과 활성질소종(RNS)의 증가 및 이들의 무독화 기전의 감소로 인해 발생된다. 활성산소종(ROS)의 레벨이 높으면 DNA나 단백질과 지질 등 biomolecules에 독성효과를 일으킬 수 있고 따라서 여러 세포 내부

위에 산화적 손상의 축적을 일으킬 수 있고 산화환원 반응성 대사 및 신호전달계와 병리학적 상태의 조절을 방해한다.

산화적 스트레스를 유발하는 물질의 예로는 중금속, 이온화, UV irradiation, 열충격, 염증반응을 일으키는 환경 산화물질이나 독성물질 등이 있다 (Ermak and Davies, 2002).

수은은 그 형태에 따라 크게 무기 수은과 유기 수은으로 나뉘며 무기 수은(수은염)은 화장품, 하제, teething powder, 이뇨제, 방부제에서 발견되며 수은 원소 증기나 메틸수은의 대사로 무기 수은의

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-3277-3028, Fax: +82-2-3277-2851  
E-mail: yysheen@ewha.ac.kr

형태로 되기도 한다(Ozuah, 2000; Clarkson, 2002). 비록 무기 수은이 태반이나 blood-brain barrier를 보통 통과하지 못하더라도 blood-brain barrier가 완전히 발달하지 못한 신생아의 뇌에서는 발견되기도 한다(National Research Council, 2000). 무기 수은은 간에서 글루타치온과 결합체를 형성하여 시스테인-수은이나 글루타치온-수은 형태로써 담즙으로 배출된다. 무기 수은염에 의한 만성 노출은 renal cortex에 영향을 끼쳐 신부전을 유발하거나 위장관계 문제를 일으키기도 한다(Kojima *et al.*, 1989). 유기 수은은 가장 독성이 크고 가장 빈번하게 노출되는 형태로 생선이나 어분, 살충제, 진균제, 치메로살 함유 백신을 먹인 육류 등에서 발견된다(Patrick, 2002). 수은은 다양한 기전을 거쳐 조직이나 유전자에 세포 내 칼슘 항상성 파괴, 세포막 전위 파괴, 단백질 합성 변화, 중추신경계 흥분성 아미노산 합성 방해 등 생화학적인 손상을 유발할 수 있다(Yee and Choi, 1996). 또한, 메틸 수은은 미토콘드리아 손상, 지질 과산화, 미소관 파괴와 세로토닌, 아스파르트, 글루타메이트 축적으로 인한 신경독성 등도 일으킨다(Yee and Choi, 1996; National Research Council, 2000). 수은은 다양한 진핵세포와 원핵세포 모두에서 다양한 유전독성 실험 결과 유전독성이 있다고 알려져 있다(WHO, 1991).

무기 수은은 유비퀴틴 cytochrome b5 단계에서 산화적 인산화와 전자전달 효과를 약화시킴으로써 과산화수소( $H_2O_2$ ) 생성을 증가시킨다(Chavez and Holguin, 1988; Lund *et al.*, 1991; Nath *et al.*, 1996). 활성산소의 생성은 글루타치온(GSH)을 감소시키거나 글루타치온(GSH)합성을 억제하여 세포 내 메르캡탄(thiol)을 낮추기도 한다(Shenker *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1999). 게다가 수은은 DNA와 결합해 DNA 염기쌍을 변형시키거나 DNA 가닥 사이를 교차연결시켜 변이를 유발하기도 한다(Guille *et al.*, 1981). 글루타치온(GSH)은 mammalian 세포에서 가장 흔한 낮은 분자량의 설프히드릴기 함유 화합물로서 대부분의 세포에서 밀리몰 양으로 존재한다. 환원된 글루타치온은 모든 형태의 수은에 glial 세포, human erythrocyte, mammalian renal tissue 등 특정한 세포에 노출이 될 때 양이 감소한다(Queiroz *et al.*, 1998; Zalups, 2000; Lee *et al.*, 2001). 글루타치온(GSH)은 수은의 운반자이자 동시에 항산화제로서 생체 내에서 수은에 의한 독성으로부터 보호

하는 세 가지 기전이 있다(Patrick, 2002). 첫째, 글루타치온(GSH)은 수은과 결합하여 수은이 세포 단백질과 결합하는 것을 막아 효소나 조직에 손상을 주는 것을 방지해준다(Kromidas *et al.*, 1990). 둘째, 수은과 글루타치온(GSH) 결합체는 간, 신장, 뇌에서 발견되며 이는 수은이 체 내에서 운반되고 제거되는 형태이다. 즉, 글루타치온(GSH)은 수은을 몸 밖으로 배출하는 데 도움을 준다(Zalups, 2000). 셋째, 글루타치온(GSH)은 항산화 효능을 가지기 때문에 수은에 의해 생성되는 과산화수소, 지질 과산화물 등으로부터 세포를 보호하는 작용을 한다(Kromidas *et al.*, 1990). 그 외에 항산화제로 알려진 Vitamin C는 항발암성, 항염색체파괴성, 항돌연변이적인 효과가 있으며 이러한 사실은 생체 외와 생체 내에서 방사선이나 살충제에 의해 노출되었을 때 다양한 연구를 통해 알려졌다(Hoda and Sinha, 1993; Sweetman *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 2000). Vitamin C는 산화적 손상으로부터 DNA를 보호하며 방사선으로 인해 발생된 DNA 손상도 감소시킨다(Green *et al.*, 1994; Eylar *et al.*, 1996; Antunes and Takahashi, 1999). 또한 중금속과 방사선으로부터 노출된 경우 설치류의 골수 polychromatic erythrocytes에서 소핵 형성을 감소시킨다(Chorvatovicova *et al.*, 1991; Konopacka *et al.*, 1998). 본 연구에서는 수은에 의한 ROS 생성 및 Vit C와 GSH에 의한 영향을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

Mercuric chloride ( $HgCl_2$ ), dimethyl sulfoxide (DMSO), disodium ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH), sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), fluorescamine, Vitamin C, glutathione (GSH), Gibco RPMI medium 1640, penicillin, streptomycin, horse-serum

### 2. 실험 방법

#### 1) 세포 배양 및 약물 처치

L5178Y 세포는 10% horse serum이 포함된 RPMI

1640 배지에서 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 배양기에서 배양한다. HgCl<sub>2</sub>, Vitamin C는 물에 녹이고 glutathione (GSH)은 PBS에 녹여서 각 농도별로 제조한 후 원하는 농도로 세포에 처치 후 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

2) 세포독성 시험

먼저 HgCl<sub>2</sub>의 용량설정을 위한 예비세포독성 시험으로 L5178Y 세포를 12 well plate에 1 × 10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 파종하여 시험물질을 처리한 다음, trypan blue로 세포를 염색하여 세포 생존률을 측정하는 trypan blue exclusion assay를 실시하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매인 물을 처리한 것으로 하였고 시험 물질 처리 후 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양 후 음성 대조군의 relative survival을 100%로 보고, 80%에 해당하는 relative survival을 보이는 농도를 회귀식을 이용하여 산출하여 이 농도를 최고 농도로 하여 공비 2로 3단계의 농도를 설정하여 본 실험을 하였다.

3) ROS 측정

96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 파종하여 HgCl<sub>2</sub> 1.25, 2.5, 5 μM, Vitamin C 1.25, 2.5, 5 μM, glutathione (GSH) 30, 300 μM을 처치하고 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 10 μM을 처치하고 시간별로 485/530 nm에서 형광을 측정하였다. 단백질 보정은 PBS로 2번 세척 후 well 당 80 mM Sodium phosphate buffer 112 μL, fluorescamine 48 μL 처치 후 15분 후 360/460 nm에서 형광을 측정하였다.

결 과

1. 세포독성 시험

L5178Y 세포를 12 well plate에 1 × 10<sup>6</sup> cells/well이 되도록 파종하여 HgCl<sub>2</sub>를 처리한 다음, 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양 후 trypan blue로 세포를 염색하여 음성 대조군의 relative survival을 100%로 보고, 80%에 해당하는 relative survival을 보이는 농도를 회귀식을 이용하여 산출하여 이 농도를 최고 농도로 하여 공비 2로 3단계의 농도를 설정하여 본 실험을 하였다. 그 결과 HgCl<sub>2</sub> 5 μM에서 약 80%의 relative survival을 나타내어 이를 가

장 고농도로 하여 ROS assay를 수행하였다.

2. ROS (Reactive Oxygen Species) Analysis

1) HgCl<sub>2</sub>의 투여 농도가 ROS 생성에 미치는 영향  
L5178Y 세포를 96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 파종하여 HgCl<sub>2</sub>를 1.25, 2.5, 5 μM의 농도별로 24시간 처치한 후 ROS 생성을 측정하였다. ROS 생성은 oxidative-sensitive fluorescent dye인 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA)를 이용해 분석하였다. H<sub>2</sub>DCF-DA는 비극성의 세포투과가 가능한 화합물로 세포 내에서 H<sub>2</sub>DCF로 변하고 ROS 존재시 H<sub>2</sub>DCF는 빠르게 높은 형광물질인 DCF로 산화된다. 실험결과, H<sub>2</sub>O 대조군의 ROS 생성률을 100%로 봤을 때 HgCl<sub>2</sub>의 농도가 증가할수록 130, 156, 167%로 점점 증가함을 알 수 있었다.

2) HgCl<sub>2</sub>의 투여 시간이 ROS 생성에 미치는 영향  
L5178Y 세포를 96 well plate에 1 × 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 파종하여 5 μM의 HgCl<sub>2</sub>를 처치한 후 2, 4, 8, 12, 24시간별로 ROS 생성을 측정하였다. ROS 생성은 H<sub>2</sub>DCF-DA를 이용해 분석하였다. 실험결과, H<sub>2</sub>O 대조군의 ROS 생성률을 100%로 봤을 때 HgCl<sub>2</sub>가 시간이 지날수록 125, 135, 162, 159, 167%

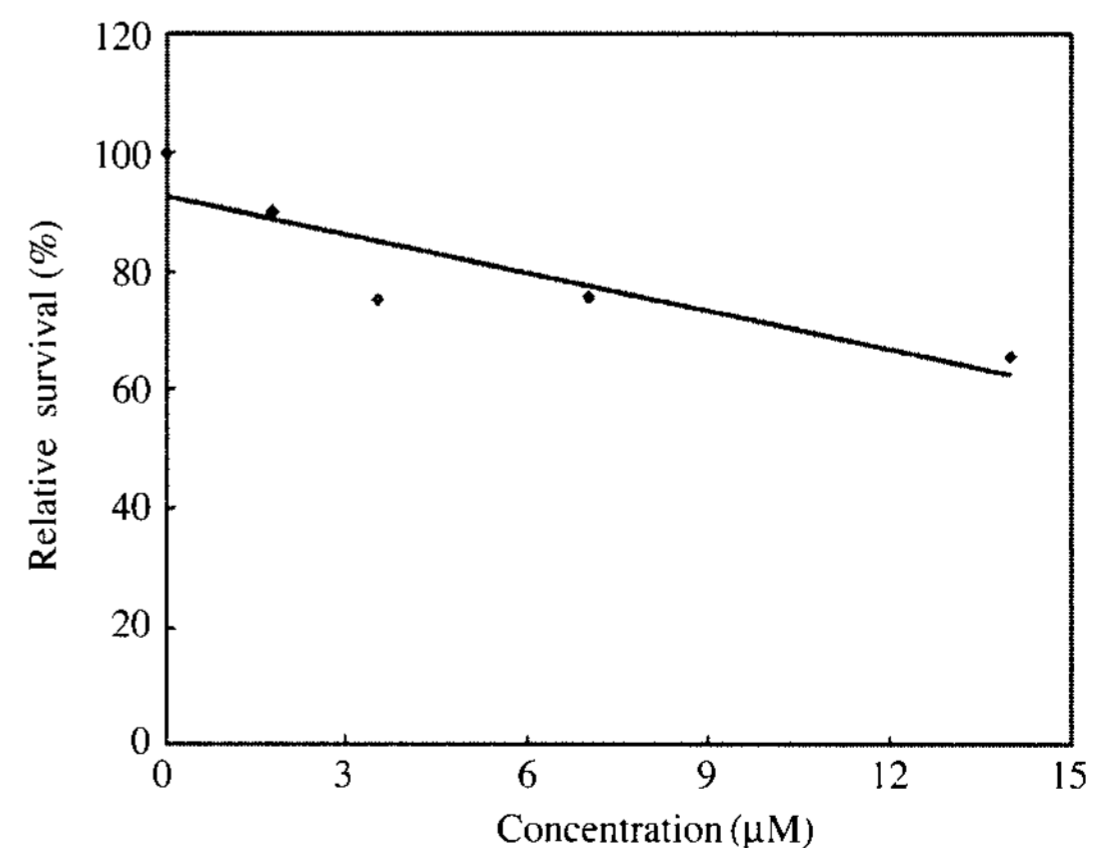


Fig. 1. Cytotoxicity test of HgCl<sub>2</sub> in L5178Y cells for the comet assay. L5178Y cells were plated in a 12-well plate at 1 × 10<sup>6</sup> cells per well and were treated with the indicated concentrations (1.75 ~ 14 μM) of HgCl<sub>2</sub> for 2 hours. Relative survival was determined by Trypan blue exclusion assay and expressed as percent compared to the control group.

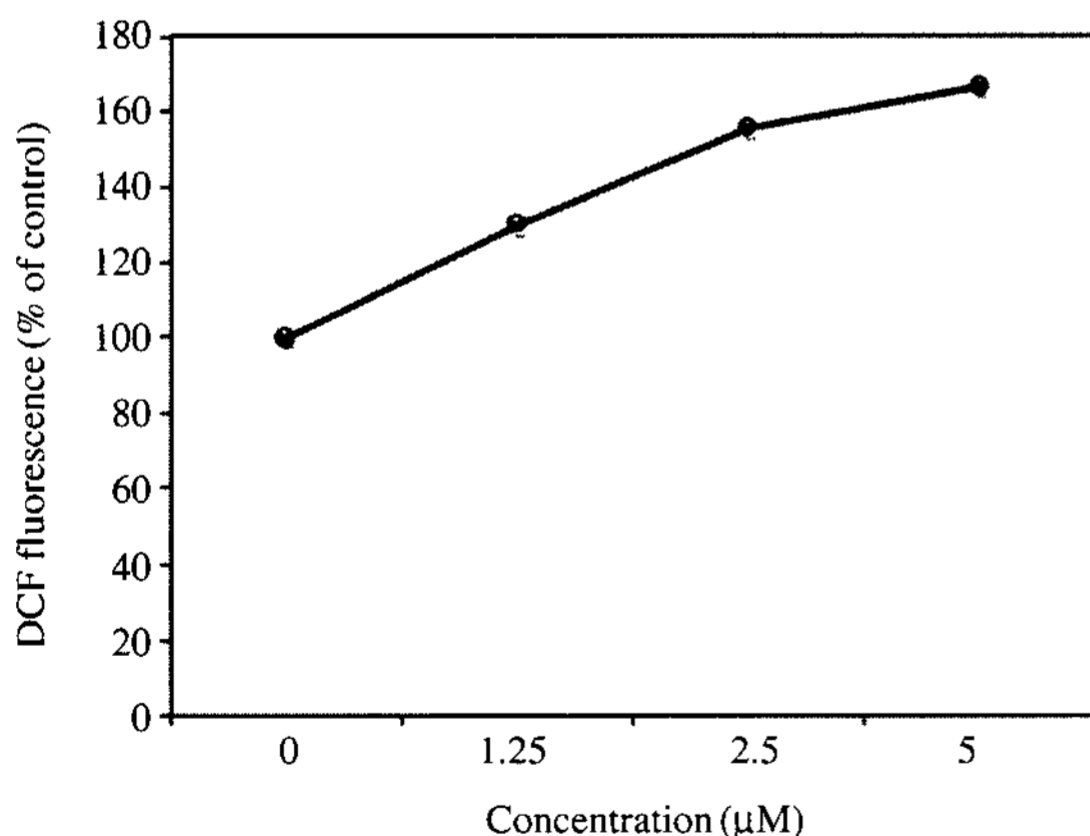
로 점점 증가함을 알 수 있었다.

### 3) HgCl<sub>2</sub>에 의해 유도되는 ROS 생성에 미치는 Vitamin C의 농도별 영향

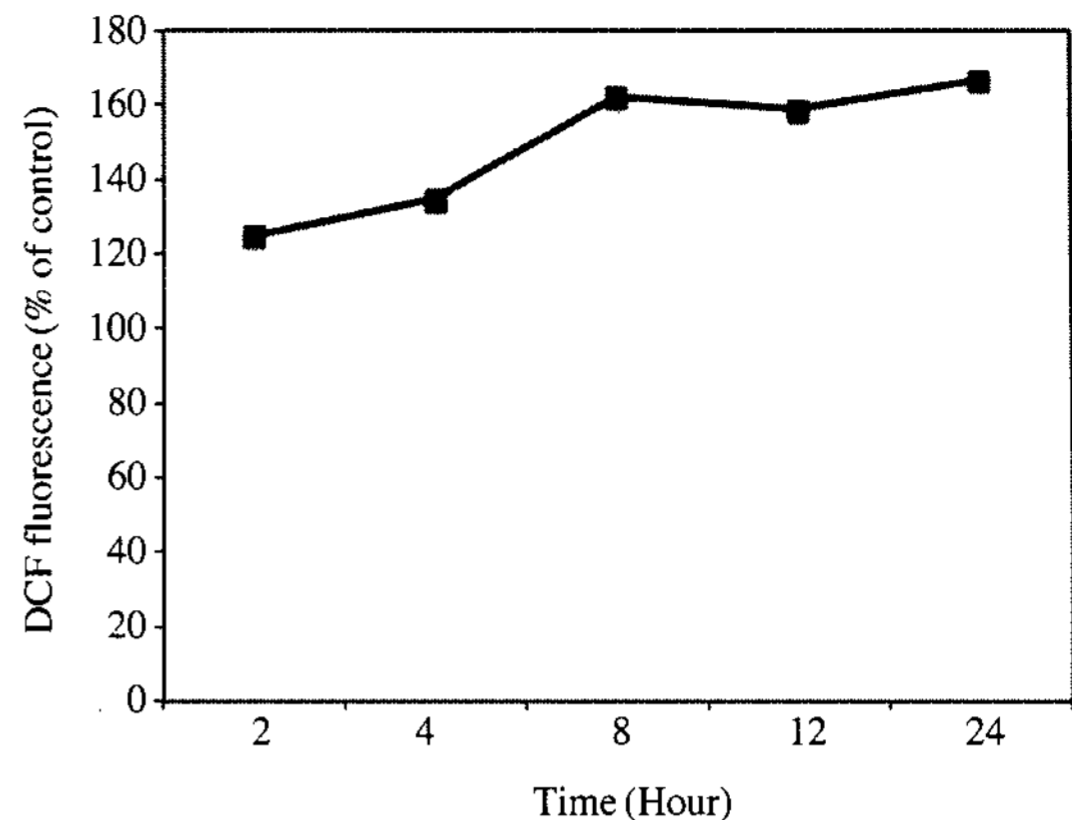
L5178Y 세포에서 Vitamin C에 의해 HgCl<sub>2</sub>로 인한 ROS 생성이 감소되는지 알아보기 위해 5 μM의 HgCl<sub>2</sub>에 1.25, 2.5, 5 μM의 Vitamin C를 병용 처치 하였다. 2시간 후 H<sub>2</sub>DCF-DA를 이용해 ROS 생성을 측정한 결과 H<sub>2</sub>O 대조군의 ROS 생성을 100%로 봤을 때 HgCl<sub>2</sub> 단독 처치시 116%인데 비해 Vitamin C를 병용 처치한 결과 처치 농도에 따라 70, 49, 33%로 감소됨을 알 수 있었다.

### 4) HgCl<sub>2</sub>에 의해 유도되는 ROS 생성에 있어 Vitamin C의 투여 시간에 따른 영향

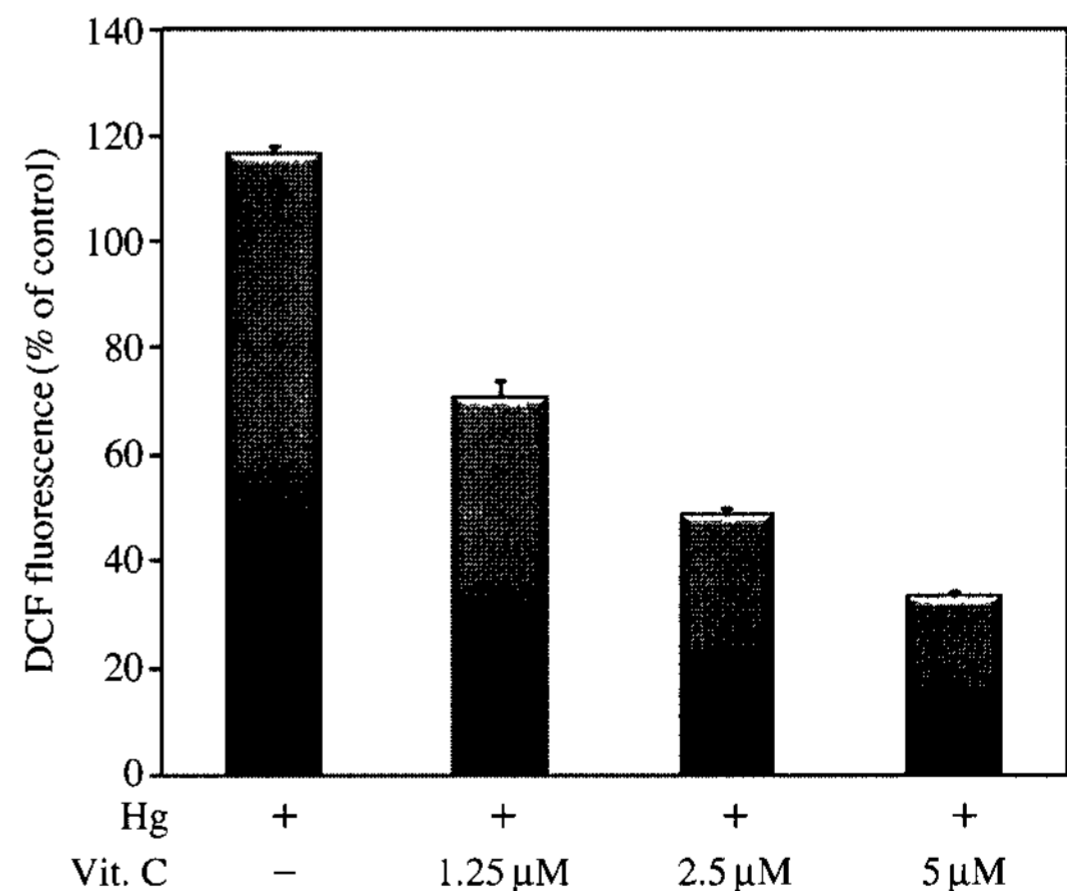
위의 실험 결과 L5178Y 세포에서 Vitamin C에 의해 HgCl<sub>2</sub>로 인한 ROS 생성이 감소됨을 알 수 있었는데 Vitamin C의 투여 시간에 따라 영향이 달라지는지 알아보기 위해 5 μM의 HgCl<sub>2</sub>에 5 μM의 Vitamin C를 처치한 후 0.5, 1, 2, 3, 4시간별로 H<sub>2</sub>DCF-DA를 이용해 ROS 생성을 측정하였다. 그 결과 H<sub>2</sub>O 대조군의 ROS 생성을 100%로 봤을 때 HgCl<sub>2</sub> 단독 처치시 114, 117, 116, 109, 105%인데



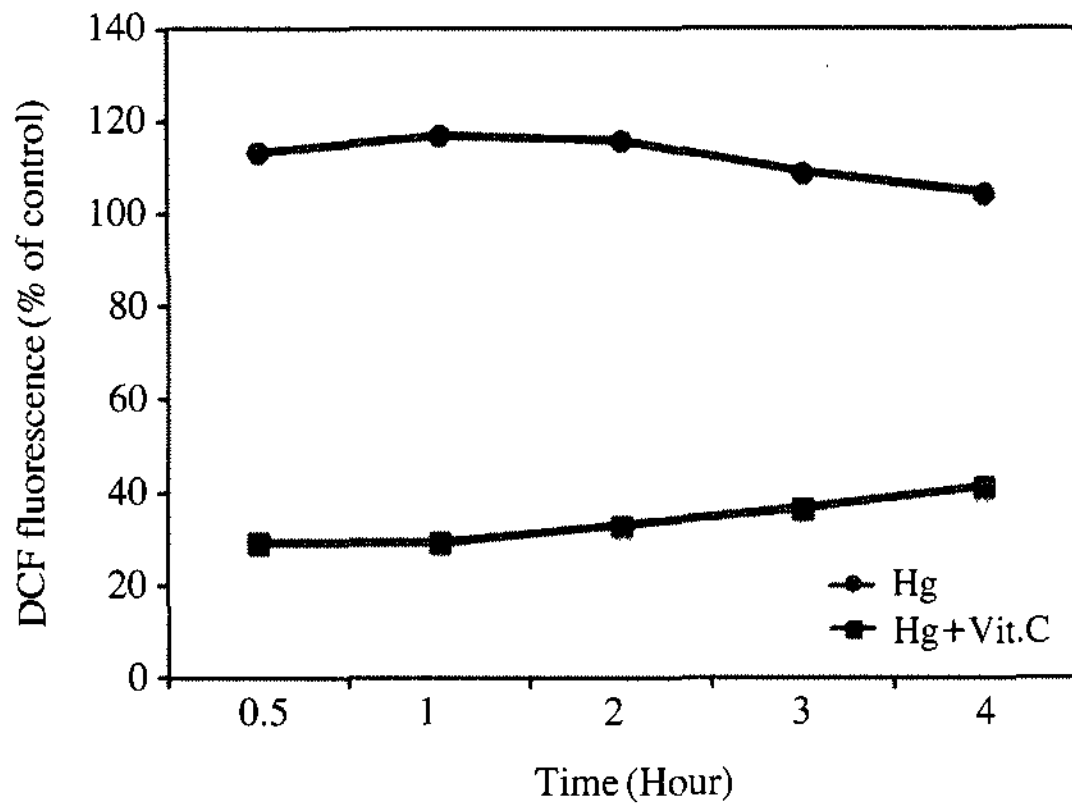
**Fig. 2.** The dose effect of HgCl<sub>2</sub> on ROS production in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with the indicated concentrations (1.25~5 μM) of HgCl<sub>2</sub> for 24 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.



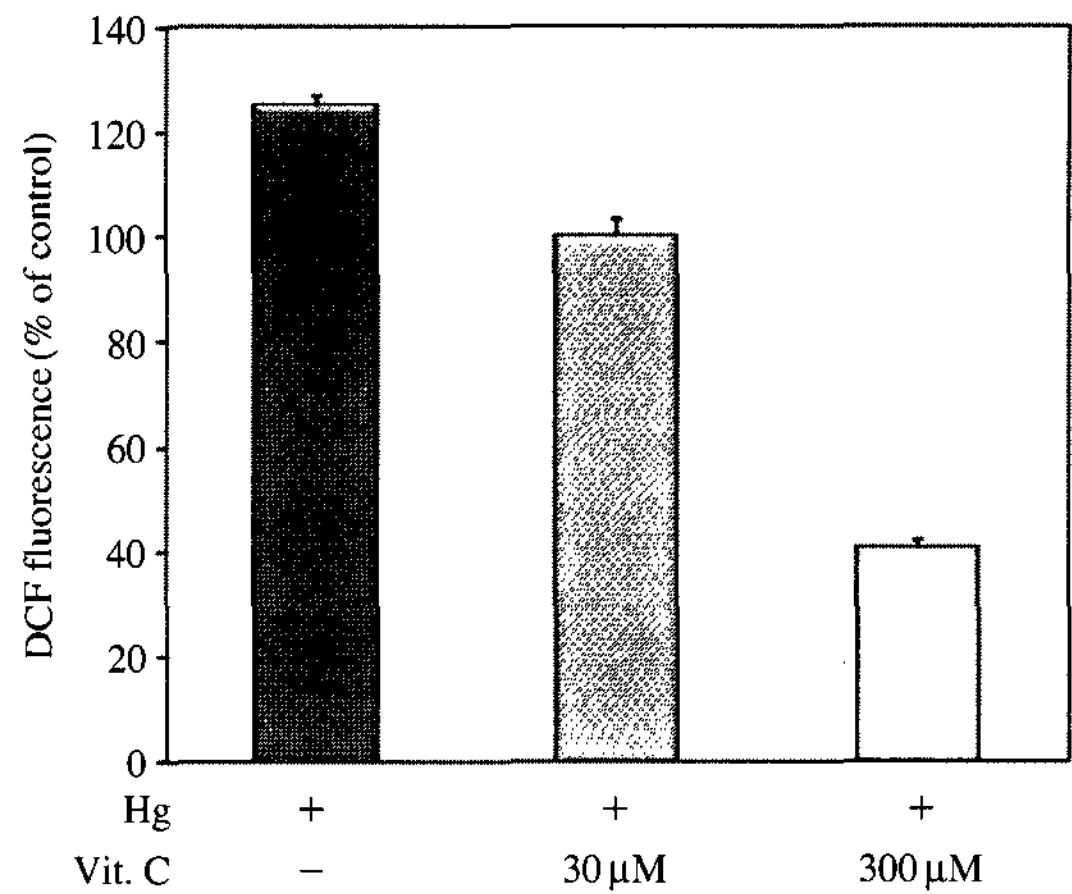
**Fig. 3.** The time course effect of HgCl<sub>2</sub> on ROS production in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with 5 μM HgCl<sub>2</sub> and incubated for 2, 4, 8, 12, 24 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.



**Fig. 4.** The dose effect of Vitamin C on ROS production induced by HgCl<sub>2</sub> in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with 5 μM HgCl<sub>2</sub> and the indicated concentrations (1.25~5 μM) of Vitamin C and incubated for 2 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.



**Fig. 5.** The time course effect of Vitamin C on ROS production induced by HgCl<sub>2</sub> in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with 5 μM HgCl<sub>2</sub> and 5 μM Vitamin C and incubated for 0.5, 1, 2, 3, 4 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.



**Fig. 6.** The dose effect of glutathione on ROS production induced by HgCl<sub>2</sub> in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with 5 μM HgCl<sub>2</sub> and the indicated concentrations (30, 300 μM) of glutathione and incubated for 2 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.

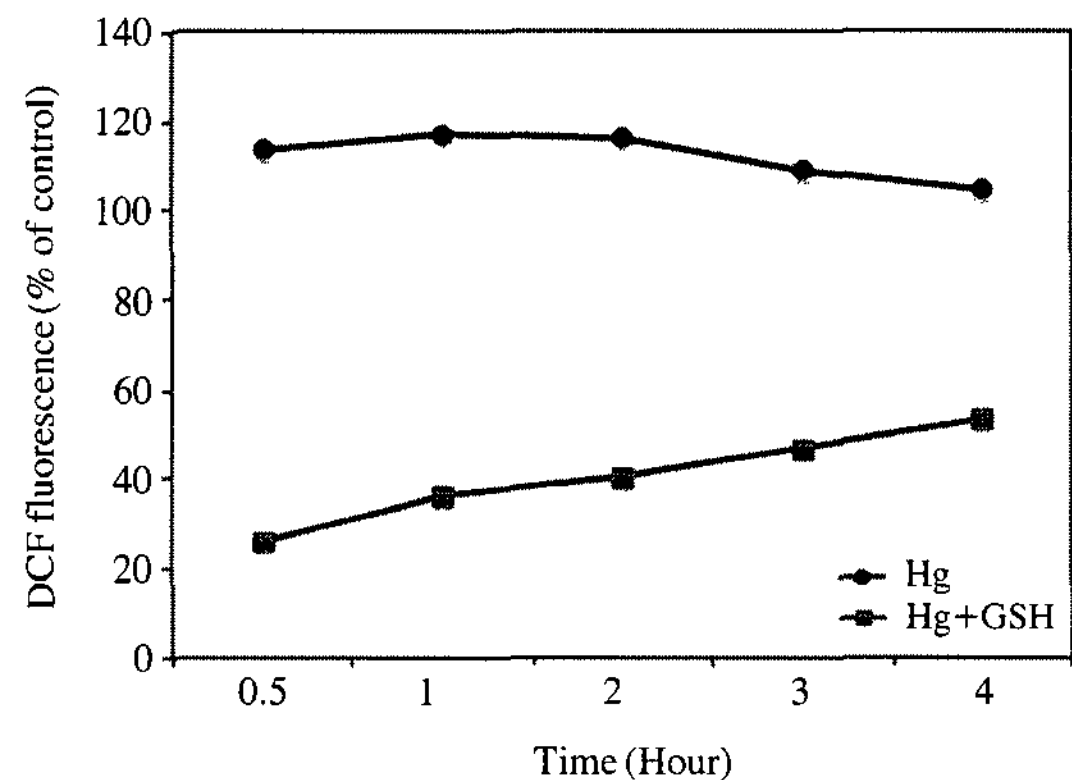
비해 Vitamin C를 병용 처치한 결과 처치 시간에 따라 30, 30, 33, 37, 41% 정도로 감소하는 경향을 보였으며 처치 시간이 짧은 0.5, 1시간에 30%로 가장 많은 감소를 보였다.

5) HgCl<sub>2</sub>에 의해 유도되는 ROS 생성에 미치는 glutathione의 농도별 영향

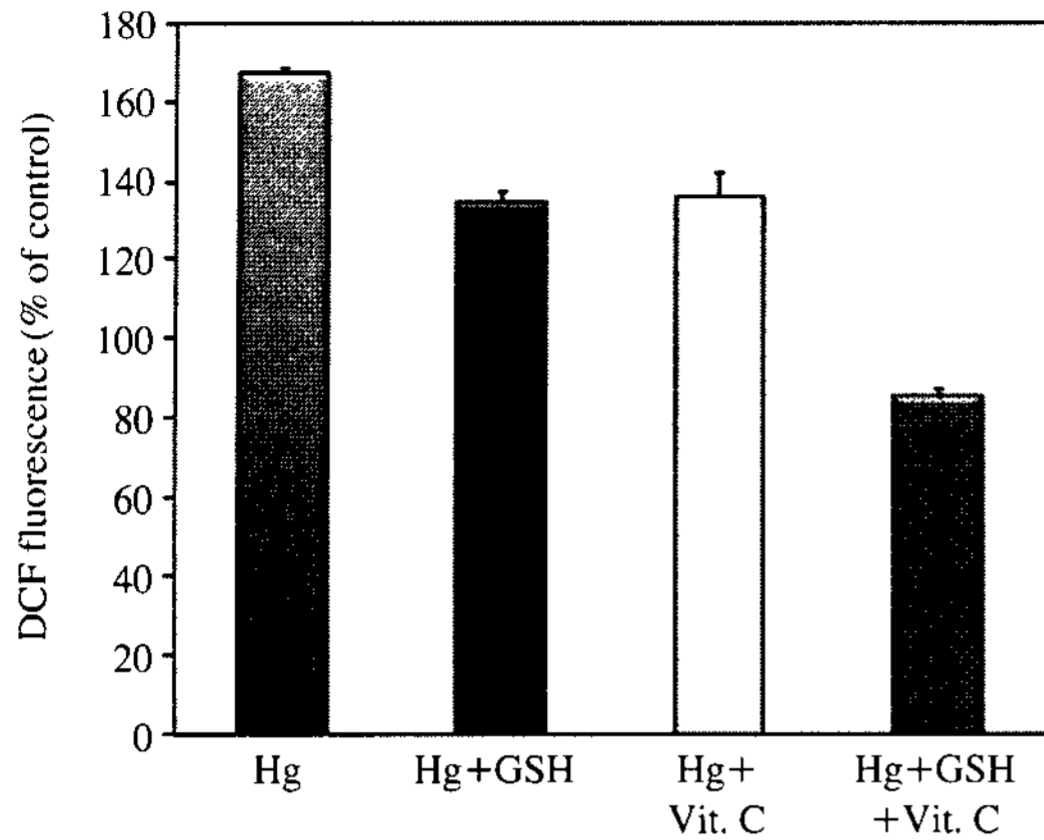
위의 실험 결과 L5178Y 세포에서 glutathione에 의해 HgCl<sub>2</sub>로 인한 ROS 생성이 감소됨을 알 수 있었는데 위의 실험에서 사용한 농도보다 낮은 농도의 glutathione도 ROS 생성을 감소시킬 수 있는지 알아보기 위해 5 μM의 HgCl<sub>2</sub>에 30, 300 μM의 glutathione을 병용 처치하였다. 2시간 후 H<sub>2</sub>DCF-DA를 이용해 ROS 생성을 측정된 결과 H<sub>2</sub>O 대조군의 ROS 생성을 100%로 봤을 때 HgCl<sub>2</sub> 단독 처치시 125%인데 비해 glutathione을 병용 처치한 결과 처치 농도에 따라 100, 41%로 감소됨을 알 수 있었다.

6) HgCl<sub>2</sub>에 의해 유도되는 ROS 생성에 있어 glutathione의 투여 시간에 따른 영향

위의 실험 결과 L5178Y 세포에서 glutathione에



**Fig. 7.** The time course effect of glutathione on ROS production induced by HgCl<sub>2</sub> in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with 5 μM HgCl<sub>2</sub> and 300 μM glutathione and incubated for 0.5, 1, 2, 3, 4 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D.



**Fig. 8.** The effect of Vitamin C and glutathione on ROS production induced by  $\text{HgCl}_2$  in L5178Y cells. L5178Y cells were treated with  $5 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  and  $100 \mu\text{M}$  Vitamin C and  $100 \mu\text{M}$  glutathione and incubated for 24 hours. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 485-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.

의해  $\text{HgCl}_2$ 로 인한 ROS 생성이 감소됨을 알 수 있었는데 glutathione의 투여 시간에 따라 영향이 달라지는지 알아보기 위해  $5 \mu\text{M}$ 의  $\text{HgCl}_2$ 에  $300 \mu\text{M}$ 의 glutathione을 처치한 후 0.5, 1, 2, 3, 4시간별로  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 를 이용해 ROS 생성을 측정하였다. 그 결과  $\text{H}_2\text{O}$  대조군의 ROS 생성을 100%로 봤을 때  $\text{HgCl}_2$  단독 처치시 114, 117, 116, 109, 105%인데 비해 glutathione을 병용 처치한 결과 처치 시간에 따라 26, 37, 41, 47, 54% 정도의 감소 경향을 보였고 처치 시간이 짧은 0.5시간에 26%로 가장 많은 감소를 보였다.

#### 7) $\text{HgCl}_2$ 에 의해 유도되는 ROS 생성에 glutathione과 Vitamin C가 미치는 영향

$\text{HgCl}_2$ 에 의해 유도된 ROS 생성에 있어 ROS 생성저해제인 glutathione과 Vitamin C가 서로 영향을 미치는지 알아보기 위해 L5178Y 세포에  $5 \mu\text{M}$ 의  $\text{HgCl}_2$ 를 처치하고  $100 \mu\text{M}$ 의 glutathione,  $100 \mu\text{M}$  Vitamin C를 각각 혹은 병용 처치하여 24시간 후  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 를 이용해 ROS 생성을 측정하였다. 그 결과  $\text{H}_2\text{O}$  대조군의 ROS 생성을 100%로 봤을 때

$\text{HgCl}_2$  처치시 167%로 증가하였으며 Vitamin C 처치시 135%, glutathione 처치시 134%로 감소하였고 병용 처치에 의해서는 85%로 단독 투여에 비해 크게 감소하였다.

## 고 찰

이 연구에서는 수은이 실제로 활성산소(ROS)생성과 관련이 있는지 또 여기에 항산화제로 알려진 Vitamin C와 글루타치온(GSH)이 어떤 효과가 있는지 알아보기 위해 oxidative-sensitive fluorescent dye인 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ )를 이용해 활성산소 생성 여부를 측정하였다. 실험 결과 수은 농도 의존적으로 활성산소(ROS)가 증가하였으며 투여 시간에 따라서도 점차 증가하는 경향을 보였다. Vitamin C를 병용 처치하자 활성산소(ROS) 수준이 수은만 처치했을 때에 비해 1/3 가량으로 줄었으며 이는 Vitamin C 농도 의존적이었고 투여 시간은 시간이 짧을수록 감소하는 효과가 더 컸다. 이러한 효과는 수은에 의해 생성된 활성산소(ROS)를 Vitamin C가 제거 또는 최소화함으로써 무독화한다는 기존 연구결과와 일치하는 것이다(Gebhart, 1984; Herbaczynska-Cedro *et al.*, 1995). 글루타치온(GSH)을 병용 처치하자 Vitamin C와 마찬가지로 감소하였으며 이는 농도 의존적이었고 투여 시간은 짧을수록 그 효과가 더 컸다. 이는 글루타치온(GSH)이 수은에 의한 과산화물을 제거한다는 기존 보고와 일치하는 결과이다(Kromidas *et al.*, 1990). 글루타치온(GSH)과 Vitamin C가 활성산소(ROS) 제거에 있어 서로 관련성이 있는지 알아보기 위해 수은에 글루타치온(GSH)과 Vitamin C를 각각 또는 병용 처치한 결과, 두 가지 모두를 병용 처치했을 때 활성산소(ROS)가 더 감소하였다. 이로 보아 수은은 활성산소를 증가시키며 Vitamin C와 글루타치온이 상호작용하여 활성산소 생성 감소에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

Antunes LM and Takahashi CS. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lympho-



- cyte cultures, *Teratog Carcinog Mutagen* 1999; 19(1): 53-59.
- Castillo J, Benavente-Garcia O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuno A and Del Rio JA. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds, *J Agric Food Chem* 2000; 48(5): 1738-1745.
- Chang WK, Yang KD and Shaio MF. Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction, *Clin Exp Immunol* 1999; 117(3): 482-488.
- Chavez E and Holguin JA. Mitochondrial calcium release as induced by  $Hg^{2+}$ , *J Biol Chem* 1988; 263(8): 3582-3587.
- Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A and Zloch Z. Effect of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat and guinea pig, *Mutat Res* 1991; 262(1): 41-46.
- Clarkson TW. The three modern faces of mercury, *Environ Health Perspect* 110 Suppl 2002; 1: 11-23.
- Ermak G and Davies KJ. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death, *Mol Immunol* 2002; 38(10): 713-721.
- Eylar E, Baez I, Navas J and Mercado C. Sustained levels of ascorbic acid are toxic and immunosuppressive for human T cells, *P R Health Sci J* 1996; 15(1): 21-26.
- Gebhart E and Rossman TG. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity. In: Merian E (Ed.), *Metals and their Compounds in the Environment*. VCH, New York 1991.
- Green MH, Lowe JE, Waugh AP, Aldridge KE, Cole J and Arlett CF. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells, *Mutat Res* 1994; 316(2): 91-102.
- Guille E, Grisvard J and Sissoeff I. Structure and function of metallo-DNA in the living cells. Systemic aspects of Biocompatibility. In: Williams DF (Ed.), 1. CRC press, FL. 1981.
- Herbaczynska-Cedro K, BK o-W, Cedro K, Wasek W, Pan-czenko-Kresowska B and Wartanowicz M. Supplementation with vitamins C and E suppresses leukocyte oxygen free radical production in patients with myocardial infarction, *Eur Heart J* 1995; 16(8): 1044-1049.
- Hoda Q and Sinha SP. Vitamin C-mediated minimisation of Rogor-induced genotoxicity, *Mutat Res* 1993; 299(1): 29-36.
- Kojima S, Shimada H and Kiyozumi M. Comparative effects of chelating agents on distribution, excretion, and renal toxicity of inorganic mercury in rats, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1989; 64(3): 471-484.
- Konopacka M, Widel M and Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells, *Mutat Res* 1998; 417(2-3): 85-94.
- Kromidas L, Trombetta LD and Jamall IS. The protective effects of glutathione against methylmercury cytotoxicity, *Toxicol Lett* 1990; 51(1): 67-80.
- Lee YW, Ha MS and Kim YK. Role of reactive oxygen species and glutathione in inorganic mercury-induced injury in human glioma cells, *Neurochem Res* 2001; 26(11): 1187-1193.
- Lund BO, Miller DM and Woods JS. Mercury-induced  $H_2O_2$  production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria, *Biochem Pharmacol* 1991; 42 Suppl: S181-S187.
- National Research Council. Toxicological effects of Methylmercury. National Academy Press, Washington, DC. 2000.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW and Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury, *Kidney Int* 1996; 50(3): 1032-1043.
- Ozuah PO. Mercury poisoning, *Curr Probl Pediatr* 2000; 30(3): 91-99.
- Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity, *Altern Med Rev* 2002; 7(6): 456-471.
- Queiroz ML, Pena SC, Salles TS, de Capitani EM and Saad ST. Abnormal antioxidant system in erythrocytes of mercury-exposed workers, *Hum Exp Toxicol* 1998; 17(4): 225-230.
- Shenker BJ, Mayro JS, Rooney C, Vitale L and Shapiro IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. IV. Alterations in cellular glutathione content, *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1993; 15(2-3): 273-290.
- Sweetman SF, Strain JJ and McKelvey-Martin VJ. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells, *Nutr Cancer* 1997; 27(2): 122-130.
- WHO. Environmental Health Criteria, 118: Inorganic Mercury Environmental Aspects, 1991.
- Yee S and Choi BH. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning, *Neurotoxicology* 1996; 17(1): 17-26.
- Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney, *Pharmacol* 2000; Rev 52(1): 113-143.