

Protective Effect of Omega-3 of Polyunsaturated Fatty Acid Docosahexaenoic Acid on the Organic Mercury-Induced Cytotoxicity in Cultured NIH3T3 Fibroblasts

Dae-Ho Ha and Jai-Kyoo Lee[†]

Sanbon Medical Center, Wonkwang University, Gunpo 435-040, Korea

To clarify the protective effect of omega-3 of polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on the cytotoxicity induced by organic mercury in cultured NIH3T3 fibroblasts. The measurement of cell viability on organic mercury was done by XTT assay after NIH3T3 fibroblasts were cultured with various concentrations of methyl mercuric chloride (MMC). And also, the effect of DHA on the MMC-mediated cytotoxicity was examined by cell viability, and antioxidant effect of DHA was also assessed by superoxide dismutase (SOD)-like activity and the lipid peroxidation activity in cultured NIH3T3 fibroblasts. In this study, MMC decreased cell viability and XTT₅₀ value was determined at 50 μM of MMC in these culture. In the effect of DHA against the cytotoxicity induced by MMC, DHA significantly increased the cell viability damaged by MMC in cultured NIH3T3 fibroblasts. And also, DHA showed the antioxidant effect by showing the increase of SOD-like activity and the decrease of lipid peroxidation activity. From these results, it is suggested that organic mercury such as MMC has highly toxic effect on cultured NIH3T3 fibroblasts, and also, omega-3 of polyunsaturated fatty acid, DHA showed the protection on MMC-induced cytotoxicity and antioxidant effect.

Key Words: Docosahexaenoic acid, Methyl mercuric chloride, SOD-like activity

서 론

수은이나 납을 비롯한 대부분의 중금속류는 강한 독성을 가지고 있어 이들이 체내에 과량 축적될 경우 중독 현상을 유발함으로써 인간의 건강을 크게 위협하고 있다 (Ganther, 1980; Liu et al., 2000). 이들 중금속들은 각각 독특한 작용으로 세포를 손상하거나 나아가서 세포고사 (apoptosis)를 유발한다. 즉, 카드뮴은 세포내 DNA와 같은 핵산물질을 저해함으로써 세포성장이나 분열을 억제하며, 황산구리 (CuSO₄)는 발생기산소를 방출하여 산화적 손상에 의한 세포독성을 나타낸다고 알려져 있다 (Narahashi et al., 1994). 이와 같이 중금속들은 각각 특유한 세포손상기전을 통하여 세포독성을 나타냄으로서 각종 질환을 유발한다 (Olson & Massaro, 1977; Chen et al., 2002). 이중 메틸수은과 같은 유기수은은 대뇌신경세포의 위축이나 정신발육지연과 같은 임상적 증후를 유발할뿐만

아니라 태아에 노출될 경우 선천성기형을 유발함으로써 기형원질 (teratogen)로도 잘 알려져 있다 (Chen et al., 1979). 더욱이 유기수은은 무기수은으로 분해될 경우 메틸라디칼을 발생함으로써 산화적 손상을 유발한다고 제시된 바 있다. 따라서 수은중독시 이의 치료를 위한 하나의 방법으로 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 항산화제나 vitamin C나 E와 같은 산소자유기제거제를 투여함으로써 치료적 접근을 시도하고 있다 (Ganther, 1980; Narahashi et al., 1994).

최근에는 한약제나 약초 등에서 추출한 천연물성분에서 수은중독과 같은 중금속중독에 대한 해독을 비롯한 항암이나 항산화와 같은 약리활성을 가지고 있는 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kim et al., 2002; Li et al., 2007; Leung et al., 2007). 한편, 이와 병행하여 생체에서 합성되어지는 지방산 역시 생리활성물질로 주목받고 있다 (Larsson et al., 2004). 지방산중 오메가-3 불포화지방산은 들깨류와 같은 작물에 다량 포함되어 있으며 (Ruxton et al., 2004), 이들은 대부분 탄소사슬이 16~26개로 다수의 이중결합의 구조적 특징을 하고 있으며 이 같은 구조는 항암을 비롯한 항염, 항산화, 항독성 및 항혈전생성과 같은 기능을 나타낸다 (Roynette et al., 2004;

*논문 접수: 2008년 7월 8일
수정재접수: 2008년 9월 16일

[†]교신저자: 이재규, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원
Tel: 031-390-2270, e-mail: drkyoo@wonkwang.ac.kr

Larsson, et al., 2004). 이러한 오메가-3 불포화지방산의 기능은 분자구조중 이중결합을 형성하는 숫적 차이에 기인한다는 것이 밝혀지고 있다 (Lima et al., 2002). 특히, docosahexaenoic acid (DHA)는 오메가-3 불포화지방산의 일종으로 탄소사슬이 22개로 6개의 이중결합을 가지고 있으며 포유동물의 뇌조직이나 심근의 세포막에 인지질을 구성하고 있으며 해조류에도 다량 포함되어 있다 (Sijtsma & Swaaf, 2004). DHA의 여러 작용중 항산화작용을 비롯한 항독소에 관한 자세한 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않을 뿐만 아니라 또한 이에 대한 연구도 많이 되어 있지 않으며 (Ding 등, 2004), 특히 세포를 대상으로 한 연구는 그리 많지 않다 (Gates et al., 2007; Li et al., 2007).

근래에 배양세포를 이용한 특정 병변의 모델을 만든 후 이의 예방과 치료를 위한 다양한 실험은 물론 또한 각종 화학약제나 천연추출성분에 대한 효능검정을 위한 최적의 실험도구로 응용되고 있다 (Mattson et al., 1993; Michikawa, et al., 1994). 배양세포를 이용한 실험은 첫째로 균등한 실험재료를 다량 얻을 수 있으며 둘째로 생체에서처럼 세포나 조직의 화학적 특성을 그대로 가지고 있기 때문에 재현성이 뛰어나다는 장점이 있다 (Mosmann, 1983). 본 연구에서는 배양된 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 유기수은에 대한 오메가-3 불포화지방산의 일종인 DHA의 영향을 시험관내 분석을 통하여 세포생존율을 비롯한 SOD 유사활성 및 지질과산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

배양이 완료된 NIH3T3 섬유모세포는 Kim et al. (2002)의 방법에 따라 분리 배양하였다. 배양이 완료된 세포를 0.5% trypsin (Sigma) 용액에 희석 처리한 후 해리한 세포를 Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시켰다. 부유된 세포는 1×10^5 cells/well의 밀도로 세포를 배분하여 96 배양용기 (well plate)에 분주하였으며 분주 후 48 시간 배양한 다음 본 실험에 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 docosahexaenoic acid (DHA, Sigma)는 에탄올이나 또는 혈청이 포함되어 있지 않은 MEM (minimum essential medium, Sigma) 배양액으로 최종농도가

100 μ M, 500 μ M 및 1 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 필요시 일정농도로 희석 사용하였다. XTT [2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt]는 실험 전날 50 μ g/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 필요농도에 따라 배양액에 첨가 또는 희석하여 사용하였다. 또한 methyl mercuric chloride (MMC) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 모두 Sigma Chem Co. (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

3. 유기수은 처리

48 시간 동안 배양이 완료된 NIH3T3 섬유모세포에 15 μ M 부터 90 μ M 까지의 MMC가 농도별로 각각 포함된 배양액에서 72 시간 동안 배양한 후 NIH3T3 섬유모세포에 미치는 MMC의 영향을 분석하였다.

4. 오메가-3 불포화지방산의 처리

MMC에 대한 docosahexaenoic acid (DHA)의 영향을 조사하기 위하여 100~150 μ M의 DHA가 각각 포함된 배양액에서 MMC를 처리하기 2 시간 전에 NIH3T3 섬유모세포에 전처리한 후 이의 영향을 분석하였다.

5. XTT 정량분석

XTT의 정량분석을 위하여 docosahexaenoic acid (DHA)를 처리하지 않은 배양 NIH3T3 섬유모세포를 1×10^5 의 세포수로 하여 배양용기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 약제를 36 시간 동안 처리한 다음 세포를 PBS로 서너 번 수세하였다. 수세 후 실험날 전날에 미리 제조한 XTT를 well당 100 μ l씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 DMSO로 처리한 다음 ELISA를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD의 유사활성 측정은 Marklund & Marklund (1956)의 방법에 의하여 시행하였다. 즉, 농도별 DHA 에탄올시료에 Tris-HCl buffer와 7.2 mM pyrogallol을 넣어 25°C에서 10분 동안 잘 반응시켰다. 반응완료 후 반응정지액으로 처리한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성 측정은 시료첨가군의 흡광도와 시료무첨가군의 흡광도 차이에 의한 백분율로 표시하였으며 vitamin E를

Table 1. The absorbance of methyl mercuric chloride (MMC) on NIH3T3 fibroblasts in dose-dependent manner by XTT assay

Concentration of MMC (μM)	XTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Control	0.177 \pm 0.045	100
5	0.159 \pm 0.008	89.8
10	0.154 \pm 0.011	87.0*
15	0.151 \pm 0.011	85.3**

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

비교군으로 하였다.

7. 지질과산화 활성 (Ferric thiocyanate) 활성 측정

지질과산화 활성에 대한 분석은 Kikuzaki와 Nakatani (1993)의 방법에 의하여 행하였다. 즉, 각 농도별 DHA 에탄올시료에 linolic acid를 첨가하여 40°C에서 반응시켰다. 반응완료 후 반응액에 30% ammonium thiocyanate를 가하여 실온에서 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 활성은 대조군에 대한 실험군의 백분율로 표시하였다.

8. 통계 분석

대조군과 실험군간의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test를 사용하였으며 P 가 0.05 이하인 값만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. MMC의 농도에 의한 세포생존을 측정

1) XTT₉₀값 측정

배양이 완료된 NIH3T3 섬유모세포를 phosphate buffered saline (PBS)을 이용하여 서너번 수세한 다음 MMC가 각각 5~15 μM 농도로 포함된 배양액에서 36 시간 동안 배양한 다음 흡광도에 의한 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 5 μM MMC를 처리한 경우 흡광도는 대조군인 100% (0.177 \pm 0.045)에 비하여 89.8% (0.159 \pm 0.008)로 나타났다. 또한, 10 μM 을 처리한 경우 87.0% (0.154 \pm 0.011)로 나타났으며 15 μM MMC의 처리에서는 흡광도가 85.3% (0.151 \pm 0.013)로 나타나 모두 대조군보다 유의하게 감소하였다. 이 과정에서 XTT₉₀값은 5 μM 에서 나타났다 (Table 1).

Table 2. The absorbance of methyl mercuric chloride (MMC) on NIH3T3 fibroblasts in dose-dependent manner by XTT assay

Treated time of MMC (μM)	XTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Control	0.526 \pm 0.057	100
20	0.402 \pm 0.043	76.4***
30	0.307 \pm 0.034	58.4***
40	0.236 \pm 0.044	44.9***

The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. *** $P < 0.001$

2) XTT₅₀값 측정

48 시간 동안 배양이 완료된 NIH3T3 섬유모세포에 20~40 μM 의 농도로 각각 MMC가 포함된 배양액에서 36 시간 동안 처리한 다음 MMC의 농도에 따른 흡광도를 대조군과 비교 조사한 결과 20 μM MMC를 처리한 경우 대조군인 100% (0.526 \pm 0.057)에 비하여 76.4% (0.402 \pm 0.043)로 나타났다. 또한, 30 μM 의 처리에서는 58.4% (0.307 \pm 0.034)로 나타났으며 40 μM 을 처리한 경우 흡광도는 44.9% (0.236 \pm 0.044)로 나타났으며, 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P < 0.001$). 이 때 XTT₅₀값은 40 μM 에서 나타났다 (Table 2).

2. MMC에 대한 docosahexaenoic acid (DHA)의 영향

DHA가 MMC에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MMC의 midcytotoxicity value (MCV)인 40 μM 농도를 NIH3T3 섬유모세포에 처리하기 2 시간 전에 60~100 μM 의 DHA가 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 세포생존율을 조사하였다. MMC만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (0.196 \pm 0.084)에 비하여 45.4% (0.089 \pm 0.023)로 나타났다. 그러나 60 μM 의 DHA를 처리한 경우 세포생존율은 79.1% (0.155 \pm 0.045)로 나타났으며 100 μM 의 처리에서는 87.8% (0.172 \pm 0.050)로 나타나 DHA를 처리한 경우에는 MMC만을 처리한 군에 비하여 모두 유의하게 증가하였다 ($P < 0.001$) (Table 3).

3. Docosahexaenoic acid (DHA)의 SOD 유사활성 분석

DHA의 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 각각 80~160 μM 까지 포함된 DHA 에탄올시료에 대하여 SOD 유사활성을 조사한 결과 80 μM 을 처리한 경우 SOD 유사활성은 대조군에 비하여 10.2% 증가하였으며 120 μM 의 처리에서는 33.5%로 증가하였다. 또한, 160 μM 의 처리에서는 SOD 유사활성이 대조군에 비하여 38.2%로 증가함

Table 3. The effect of docosahexaenoic acid (DHA) on methyl mercuric chloride (MMC) on cultured NIH3T3 fibroblasts

Pretreatment Concentration of DHA (μM)	XTT assay	
	Mean \pm S.D.	(% of control)
Control	0.196 \pm 0.084	100
40 MMC	0.089 \pm 0.023	45.4
60	0.155 \pm 0.045	79.1***
100	0.172 \pm 0.050	87.8***

The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the MMC-treated group. *** P <0.001

Table 4. The superoxide dismutase (SOD)-like activity of docosahexaenoic acid (DHA) determined at a wavelength of 420 nm

Concentration of DHA (μM)	SOD-like activity
	% of control
20 VitE	33.9 \pm 2.56**
80	10.2 \pm 0.73
120	33.5 \pm 1.53**
160	38.2 \pm 2.79**

The data indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control value. Vitamin E (VitE) was assessed as compared group with DHA. ** P <0.01

으로서 120과 160 μM 에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다 (P <0.01). 이 때 비교군으로 사용한 20 μM 의 vitamin E의 SOD 유사활성이 33.9%로 나타남으로서 DHA 120 μM 의 에탄올시료의 활성과 비슷하게 나타났다 (Table 4).

4. MMC에 대한 docosahexaenoic acid (DHA)의 지질 과산화 활성분석

MMC에 대한 DHA의 지질과산화 활성을 조사하기 위하여 NIH3T3 섬유모세포를 50~130 μM 의 DHA 에탄올 시료 각각에 처리하였다. 그 결과 50 μM 을 처리한 경우 지질과산화 활성은 대조군에 비하여 98.9%로 나타났는데 비하여 90 μM 과 130 μM 의 DHA 처리에서는 각각 73.3%와 62.1%로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소하였다 (P <0.001) (Table 5).

고 찰

메틸수은 (MMC)은 페닐수은이나 에틸수은과 같은 유기수은의 일종으로서 카드뮴이나 납처럼 환경오염원인 동시에 기형유발원으로 잘 알려져 있다 (Chen et al., 1979; Liu et al., 2000). 이의 중독시 신장이나 뇌조직에 영향을 주어 각종 질환의 유발과 심각한 부작용을 초래한다

Table 5. Lipid peroxidation (LP) activity of docosahexaenoic acid (DHA) on MMC in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentration of DHA (μM)	LP activity
	% of control
Control	100 \pm 8.54
50	98.9 \pm 7.43
90	73.3 \pm 5.67***
130	62.1 \pm 4.69***

The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * P <0.001

(Kunimoto, 1994). 특히, MMC가 붕괴될 때 메틸라디칼을 생성함으로써 세포에 산화적 손상을 유발한다고 제시되면서 MMC와 활성산소와의 상호관계에 대하여 꾸준히 연구가 이루어져 왔다 (Ganther, 1980; Narahashi et al., 1994). 본 연구에서는 배양 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 MMC의 세포독성과 이에 대한 오메가-3 불포화지방산의 일종인 docosahexaenoic acid (DHA)의 영향을 조사하였으며 동시에 DHA의 항산화능도 조사하였다. 먼저 MMC의 세포독성을 조사하기 위하여 5~40 μM 의 MMC가 각각 포함된 배양액에서 NIH3T3 섬유모세포를 36 시간 동안 배양한 결과 MMC의 처리농도에 따라 세포생존율의 감소를 보여주었으며 5 μM 과 40 μM 의 MMC 농도에서 각각 XTT₉₀값과 XTT₅₀값이 나타났다. 특히, XTT₅₀값은 각종 화학약제나 중금속류와 같이 독성물질의 독성 정도를 판정하는데 기준이 된다 (Borenfreund & Puerner, 1984). 즉, Borenfreund & Puerner (1984)는 XTT₅₀값이 100 μM 이하이면 고독성을 나타내며 1,000 μM 이하이면 중간독성, 2,000 μM 이하이면 저독성, 2,000 μM 이상이면 무독성으로 판정하였다. 따라서 본 연구에서 MMC는 위의 판정 기준에 의하여 고독성인 것으로 나타났다. 본 실험에서 MMC가 세포독성을 나타낸 것은 Michikawa et al. (1994)이 MMC가 신경세포에 세포독성을 나타냈다는 보고와 일치하였다. 본 실험에서 MMC가 NIH3T3 섬유모세포의 생존율을 감소시킨 것은 MMC가 세포내 단백질합성억제를 비롯하여 (Olson & Massaro, 1977), 세포내 사립체 (mitochondria)와 같은 세포소기관의 효소활성을 억제함으로써 세포손상을 유발하였을 가능성도 클 것으로 생각된다 (Mosmann, 1983). 그러나 이 보다는 MMC가 활성산소를 생성함으로써 세포에 산화적 손상을 유발하였을 가능성을 배제할 수는 없다. 이 같은 이유는 몇몇 타 연구에서 MMC의 산화적 손상이 보고된 바 있다 (Kasuya, 1975; Ganther, 1980). 따라서 본 연구에서는 항산화능이 제시된 오메가-3 불포화지방산의 일종인 docosahexaenoic

acid (DHA)가 (Ruxton et al., 2004), MMC의 세포독성에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 DHA가 60~100 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 NIHT3T3 섬유모세포를 2 시간 동안 전처리한 후 DHA가 MMC에 미치는 영향을 세포생존율 측면에서 조사하였다. 그 결과 DHA는 MMC만을 처리한 경우 세포생존율이 45.4%인 것에 비하여 약 70~80% 이상의 높은 생존율을 보였다. 이는 아마도 DHA가 MMC로부터 생성된 메틸라디칼을 소거함으로써 세포를 산화적 손상으로 부터 보호하였을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Ganther, 1980; Ruxton et al., 2004). 따라서 본 실험에서는 DHA의 항산화능을 조사하기 위하여 superoxide dismutase (SOD) 유사활성과 지질과산화물 정량분석하였다. 먼저, MMC에 대한 DHA의 SOD 유사활성분석을 위하여 DHA가 각각 80, 120 및 160 μM 이 포함된 에탄올시료에서 SOD 유사활성은 대조군에 비하여 각각 10.2%, 33.5% 및 38.2%로 나타나 특히 120 μM 과 160 μM 에서 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이 때 비교군으로 사용한 20 μM vitamin E 처리에서 SOD 유사활성이 33.9%로 나타남으로서 DHA 120 μM 에탄올시료에서의 유사활성과 비슷한 것으로 나타났다. 한편, DHA가 50~130 μM 농도로 각각 포함된 에탄올시료에서 지질과산화물 분석한 결과 DHA의 처리군이 대조군에 비하여 모두 감소하였으며 특히 90 μM 과 130 μM 의 DHA 농도에서는 대조군에 비하여 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 이 같은 실험 결과는 DHA가 항산화능을 가지고 있음을 증명하고 있으며 이는 본 실험에 있어서 MMC에 의하여 감소된 세포생존율이 DHA에 의하여 증가된 것도 DHA의 항산화능과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 그러나 DHA와 같은 오메가-3 불포화지방산의 항독소나 항산화에 대한 더욱 자세한 기전 규명을 위하여서는 항산화효소나 산화적 손상과 관련이 깊은 세포내 신호전달체계와 같은 측면에서 상호 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 연구됨.

REFERENCES

- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth.* 1984. 9: 7-9.
- Chen WJ, Body RL, Motilet NK. Some effects of continuous low dose congenital exposure to methylmercury of organ in the rat fetus. *Teratology* 1979. 20: 31-36.
- Chen YJ, Yang IG, Hsieh WC, Huang BM, Liu MY. Enhancement of TNF- α expression does not trigger apoptosis upon exposure of glial cells to lead and lipopolysaccharide. *Toxicology* 2002. 178: 183-191.
- Ding WQ, Vaught JL, Yamauchi H, Lind SE. Differential sensitivity of cancer cells to docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity: the potential importance of down-regulation of superoxide dismutase 1 expression. *Mol Cancer Ther.* 2004. 3: 1109-1117.
- Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci.* 1980. 355: 212-225.
- Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975. 32: 374-354.
- Kim HS, Lee YS, Oh SK, Lee KC, Lee GM, Lee J, Lee SB, Kim JH, Yu JK, Kang YS, Kim SS, Song HJ, Park ST. Effect of *Ramulus et Uncus Uncariae* on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons. *Korean J Oriental Physiol Pathol.* 16: 1016-1019, 2002.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci.* 1993. 58: 1470-1410.
- Kunimoto M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994. 204: 310-317.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanism. *Am J Clin Nutr.* 2004. 79: 935-945.
- Leung HW, Lin CJ, Hour MJ, Yang WH, Wang MY, Lee HZ. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol.* 2007. 45: 2005-2013.
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, Liu TW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china L.* rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2007. 113: 115-124.
- Lima TM, Kanunfre CC, Pompeia C, Verlengia R, Curi R. Ranking the toxicity of fatty acids on jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Toxicol In Vitro.* 2002. 16: 741-747.
- Liu MY, Hsieh WC, Yang BC. In vitro aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG

- cells. *Toxicology*. 2000. 147: 59-64.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974. 47: 468-474.
- 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.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Meth*. 1983. 65: 55-63.
- Narahashi T, Ma J, Arakawa O, Reuveny E, Nakahiro M. GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol*. 1994. 14: 599-621.
- Olson FC, Massaro EJ. Effects of methylmercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and palate closure. *Teratology* 1977. 16: 187-194.
- Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr*. 2004. 23: 139-151.
- Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet*. 2004. 17: 449-459.
- Sijtsma L, de Swaaf ME. Biotechnological production and applications of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Appl Microbial Biotechnol*. 2004. 64: 146-153.
-