

## Effect of Kaempferol on the Cytotoxicity Induced Oxygen Free Radicals in Skin Fibroblast Derived from Human *In Vitro*

Jai-Kyoo Lee and Dae-Ho Ha<sup>†</sup>

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

In order to evaluate on the effect of kaempferol on the cytotoxicity of oxygen free radicals, XTT assay was performed to determine the cell viability after skin fibroblasts derived from human (Detroit 51) that were treated with various concentrations of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). And also, the effect of kaempferol on the cytotoxicity induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that was examined by cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) activity and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in these cultures. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased cell viability in dose-dependent manner in these cultures and the XTT<sub>90</sub> and XTT<sub>50</sub> values were determined at concentration of 35  $\mu$ M and 90  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after skin fibroblasts derived from human were treated with 15~90  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 6 hours, respectively. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was highly toxic on cultured skin fibroblasts derived from human by toxic criteria of Brenfreund and Puerner (1984). In the protective effect of kaempferol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity, kaempferol increased DPPH radical scavenging activity and significantly decreased LDH activity. From these results, it is suggested that oxygen free radical, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was highly toxic on cultured skin fibroblasts derived from human, and also kaempferol of flavonoid showed the protection on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity.

**Key Words:** Oxygen radicals, Kaempferol, DPPH radical scavenging activity, LDH activity

### 서 론

산소자유기는 허혈 (ischemia)을 비롯하여 무산소증 (anoxia)과 같은 상태에서는 과량이 생성되어 뇌조직을 비롯한 여러 인체조직이나 세포에 산화적 손상을 유발함으로써 각종 질환의 병인으로 작용하고 있다 (Pelligrini-Giampietro et al., 1990; Reiter, 1995; Kim et al., 2002). 특히, 근위축성측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 질환은 superoxide dismutase (SOD)-1 유전인자의 돌연변이로 인하여 뇌속에 산소자유기의 축적에 의한 현상으로 알려져 있다 (Rosen et al., 1993). 지금까지 밝혀진 산소자유기에 의한 산화적 손상을 살펴보면, 세포내 DNA의 손상을 비롯하여 (Nishio and Uyeki, 1985; Loft et al., 1994), 세포막의 지질과산화반응 (lipid peroxidation) 및 흥분성 아미노산 (excitatory amino acids, EAAs)의 분비축진을 유발시킨다고 한다 (Yamamoto et al., 1983; Pelligrini-Giampietro et al., 1990). 특히, 산소자유기는 흥분성 아미

노산의 분비축진을 유발하여 세포에 위치하고 있는 칼슘채널과 연관성이 깊은 N-methyl-D-aspartate (NMDA)의 수용체를 과활성 시킴으로서 세포내로 다량의 칼슘유입을 촉진시킨다 (Pedder et al., 1990; Kim et al., 2002). 세포내 다량의 칼슘유입은 세포의 정상적인 대사기능을 파괴할 뿐만 아니라 더욱 진행되면 세포의 팽창을 초래하여 (Mattson et al., 1993), 결국 세포사멸을 초래함으로써 심각한 병변을 야기하게 된다 (Rosen et al., 1993; Michikawa et al., 1994). 따라서 산소자유기에 의하여 중재된 각종 질환의 치료를 위하여 산소자유기를 제거할 수 있는 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 항산화제를 비롯하여 vitamin C나 E와 같은 비효소계통의 산소제거제 또는 flunarizine과 같은 칼슘억제제 및 NMDA 수용체 길항제 등과 같은 약제를 투여하여 치료적 접근을 꾀하고 있다 (Jacobson et al., 1990; Leung et al., 2007). 최근에는 각종 식물이나 허브 및 한약제 등에서 항산화 작용이나 항암 및 항균효과가 뛰어난 물질들을 순수분리하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Chuyen et al., 1990; Hirota et al., 2000; Sun et al., 2002). 이러한 연구에 힘입어 페놀화합물을 비롯하여 (De Heredia et al., 2001; Lavid et al., 2001), 터펜이나 flavonoids와 같은 계통의 다양한 성분들이 추출분리 되었다 (Jung et al., 2006; Wang et al., 2006). 특히,

\*논문 접수: 2008년 5월 30일

수정재접수: 2008년 8월 8일

<sup>†</sup>교신저자: 하대호, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원

Tel: 031-390-2224, e-mail: hdh@wonkwang.ac.kr

식물이나 한약제 또는 허브에서 추출된 천연성분들은 강력한 약리효능을 가지고 있으면서 세포독성이 거의 없다는 장점이 있다 (Goldberg et al., 1999; Krizkova et al., 2000; Li et al., 2007). 특히, flavonoid 계통의 추출물중에는 항산화 작용이나 항염작용에 탁월한 약리활성을 나타내는 성분들이 다량 함유되어 있다고 알려지면서 이들 성분에 대한 연구가 활발히 진행중이다 (Harats et al., 1998; Han et al., 2006; Gates et al., 2007). Flavonoid에 대한 다수의 연구에서 flavonoid는 과일이나 채소 등에 많이 포함되어 있으며 그 밖에도 연수 (*Nelumbo nucifera*)의 추출물이나 산복사나무 (*Prunus davidiana*) 등에도 다량 들어 있다고 알려져 있다 (Jung 등, 2003; Gates et al., 2007). Flavonoid 계통의 하나인 kaempferol은 3개의 환모양의 분자구조에 각각 수산기 (OH)를 가지고 있어 이들의 상호작용에 의하여 강력한 항암작용이나 항산화 작용을 나타낸다고 보고된 바 있다 (Leung et al., 2007). 그러나 아직까지 kaempferol의 항산화 작용에 대한 기전에 대해서는 자세히 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라 더욱이 세포를 대상으로 한 연구는 그리 많지 않다 (Gates et al., 2007; Li et al., 2007). 본 연구에서는 배양된 인체유래피부섬유모세포를 대상으로 kaempferol이 산소자유기에 대한 영향을 colorimetric assay에 의한 세포생존율을 비롯하여 LDH 활성 및 DPPH 자유기소거능을 조사하여 kaempferol의 항산화에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

배양용기내에서 배양이 완료된 인체유래피부섬유모세포 (Detroit 51)를 Kim 등 (2002)의 방법에 따라 분리 배양하였다. 즉, 0.5% trypsin (Sigma)의 희석용액을 처리하여 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 산정한 후 96 배양용기 (well plate)에 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 72 시간 동안 배양한 후 본 실험에 사용하였다.

### 2. 약제 제조

본 실험에 사용한 kaempferol (Sigma)은 메탄올이나 또는 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-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt]는 실험 전날 200  $\mu$ g/ml의 저장액을 만들어 냉장보관한 후 필요에 따라 배양액에 첨가하거나 희석하여 사용하였다. 그 밖에  $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)과 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 모두 Sigma Chemical Co. (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 3. 산소자유기 처리

배양용기에서 48 시간 동안 배양이 완료된 인체유래섬유모세포에 15  $\mu$ M 부터 90  $\mu$ M 까지의 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )가 농도별로 각각 포함된 배양액에서 6 시간 동안 배양한 후 인체유래피부섬유모세포에 미치는  $H_2O_2$ 의 영향을 분석하였다.

### 4. Kaempferol의 처리

$H_2O_2$ 에 대한 kaempferol의 영향을 조사하기 위하여 100~150  $\mu$ M의 kaempferol이 각각의 농도로 포함된 배양액에서  $H_2O_2$ 에 처리하기 2 시간 전에 인체유래섬유모세포에 전처리한 후 이의 영향을 분석하였다.

### 5. XTT 정량분석

XTT의 정량분석을 위하여 kaempferol을 처리하지 않은 배양 인체유래피부섬유모세포를  $5 \times 10^5$  세포수를 산정하여 배양용기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 약제를 72 시간 동안 처리한 다음 세포를 PBS로 3 회 세척하였다. 세척완료 후 실험날 전날에 미리 제조한 XTT를 well당 200  $\mu$ l씩 넣어 37°C, 5%  $CO_2$ 로 조절된 정온기에서 4 시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 DMSO로 처리한 다음 ELISA를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 6. DPPH 자유기소거능 분석

Blios (1956)의 방법에 의하여 DPPH 자유기소거능을 분석하였다. 즉, 메탄올시료에 0.3 mM DPPH 메탄올 용액 100  $\mu$ l를 가하여 잘 섞어 실온에서 30 분간 방치하였으며 반응이 완료된 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자유기소거능은 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 농도인  $RC_{50}$  (reduction concentration)으로 나타냈으며 대조군의 흡광도와 실험군의 흡광도 차이에 의한 감소율에 의한 백분율로 표시하였다.

**Table 1.** The dose-dependent absorbance of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on skin fibroblasts derived from human (Detroit 51) by XTT assay

Treatment	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Concentration of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)		
Control	0.108±0.016	100
15	0.106±0.015	98.1
25	0.103±0.008	95.4
35	0.095±0.004	88.0

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the control

### 7. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성분석

LDH 활성에 대한 정량분석은 CytoTox detection kit (Takara)에 의하여 행하였다. 이는 반응액에 의한 NAD의 산화결과 형성된 formazan을 450 nm에서 ELISA를 이용하여 흡광도를 측정하여 다음 대조군과 비교 조사하였다.

### 8. 통계 처리

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

## 결 과

### 1. 산소자유기의 독성효과

#### 1) XTT<sub>90</sub>값의 정량

배양중인 인체유래피부섬유모세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3 회 세척한 후 15~35 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 각각 농도에서 6 시간 동안 배양한 다음 흡광도에 의한 세포 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 15 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 대조군인 100% (0.108±0.016)에 비하여 98.1% (0.106±0.015)로 나타났으며, 25 μM의 경우 95.4% (0.103±0.008)로 나타났다. 또한 35 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 처리에서는 세포 생존율이 88.0% (0.095±0.004)로 나타났으며, XTT<sub>90</sub>값은 35 μM에서 나타났다 (Table 1).

#### 2) XTT<sub>50</sub>값의 정량

배양이 완료된 인체유래피부섬유모세포에 50~90 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 각각 농도에서 6 시간 동안 처리한 다음 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 의한 세포 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우 대조군인 100% (0.117±0.041)에 비하여 82.9% (0.097±0.032)로 나타났으며, 70 μM의 경우 70.9% (0.083±0.038)로 나타났다. 또한 90 μM

**Table 2.** Dose-dependent absorbance of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on skin fibroblasts derived from human (Detroit 51) by XTT assay

Treatment	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Treated time of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)		
Control	0.117±0.041	100
50	0.097±0.032	82.9
70	0.083±0.038	70.9
90	0.059±0.009	50.4*

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

**Table 3.** The effect of kaempferol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity on cultured skin fibroblasts derived from human (Detroit 51)

Exposure	XTT assay	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Concentration of kaempferol (μM)		
Control	0.084±0.007	100
90 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.040±0.005	47.6
100	0.063±0.006	75.0*
150	0.070±0.005	83.3*

The data indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. \*P<0.05

을 처리한 경우 세포생존율은 50.4% (0.059±0.009)로 나타났으며, 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05). 이 때 XTT<sub>50</sub>값은 90 μM에서 나타났다 (Table 2).

### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 kaempferol의 영향

인체유래피부섬유모세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 XTT<sub>50</sub>값인 90 μM 농도를 처리하기 2 시간 전에 100~150 μM의 kaempferol 이 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 후 세포 생존율을 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (0.084±0.007)에 비하여 47.6% (0.040±0.005)로 나타났다. 이에 비하여 100 μM의 kaempferol 처리에서는 75.0% (0.063±0.006)로 나타났으며 150 μg/ml의 처리에서는 83.3% (0.070±0.005)로 나타나 kaempferol을 처리한 경우에는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리한 군에 비하여 모두 유의하게 증가하였다 (Table 3).

### 3. Kaempferol의 DPPH 자유기소거능

Kaempferol이 30~120 μM까지로 각각 포함된 메탄올 시료에 대하여 DPPH 자유기소거능을 분석한 결과 30 μM을 처리한 경우에는 1.8%로 나타났으며 60 μM의

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

Concentration of kaempferol ( $\mu\text{M}$ )	DPPH radical scavenging activity	
	% of control	
30	1.8 $\pm$ 0.07	
60	30.0 $\pm$ 2.15*	
120	9.8 $\pm$ 3.14*	

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

처리에서는 30.0%로 나타났다. 또한 120  $\mu\text{M}$ 의 처리에서는 39.8%로 나타났다. 특히, 60  $\mu\text{M}$ 과 120  $\mu\text{M}$ 의 kaempferol 처리에서는 유의하게 증가한 것으로 나타났다 ( $P$ <0.05) (Table 4).

#### 4. $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 대한 kaempferol의 LDH 활성분석

$\text{H}_2\text{O}_2$ 에 대한 kaempferol의 LDH 활성을 조사하기 위하여 인체유래피부섬유모세포를  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의  $\text{XTT}_{50}$  농도인 90  $\mu\text{M}$  농도에서 처리하기 2 시간 전에 160~200  $\mu\text{M}$  농도의 kaempferol을 각각 처리한 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만을 처리한 경우 LDH 활성은 대조군에 비하여 164.7%로 나타났는데 비하여 160  $\mu\text{M}$ 의 kaempferol 처리에서는 117.6% ( $P$ <0.05)로 나타났으며 200  $\mu\text{M}$ 의 kaempferol 처리에서는 100% ( $P$ <0.01)로 나타났다 (Table 5).

## 고 찰

산소자유기는 hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ) superoxide ( $\text{O}_2^\cdot$ ) 및 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 등이 있으며 이들은 산화적 손상으로서 세포독성을 나타낸다 (Reiter et al., 1995; Wang et al., 2006). 특히, 산화적 손상은 항산화계의 손상이나 막독성을 나타내어 세포고사를 초래한다 (Kim et al., 2002; Leung et al., 2007). 따라서 항산화효소나 또는 식물이나 허브 또는 한약제로 부터 추출한 천연물중 항산화효과가 뛰어난 추출성분을 이용하여 산소자유기의 산화적 손상을 예방 내지는 치료적 접근을 시도하고 있다 (Li et al., 2007; Gates et al., 2007). 본 연구에서는 산소자유기에 대한 kaempferol의 영향을 조사하기 위하여 먼저 산소자유기의 일종인  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 배양된 인체유래섬유모세포에 처리하여  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 세포독성을 세포생존율 측면에서 조사하였다. 그 결과 15~90  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$  농도를 각각 6 시간 동안 처리한 결과 농도 의존적으로 세포생존율의 감소를 보였다. 특히, 90  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$  처리에서는 세포생존율이 대

**Table 5.** The lactate dehydrogenase (LDH) activity of kaempferol on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cytotoxicity in cultured skin fibroblasts derived from human (Detroit 51)

Concentration of kaempferol ( $\mu\text{M}$ )	LDH activity	
	% of control	
Control	100 $\pm$ 9.8	
90 $\text{H}_2\text{O}_2$	164.7 $\pm$ 13.2	
160	117.6 $\pm$ 10.6*	
200	100 $\pm$ 8.4**	

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated group. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01

조군에 비하여 유의하게 감소하였으며 동시에  $\text{XTT}_{50}$ 값을 나타냈다 ( $P$ <0.05). 본 연구결과는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 세포독성을 가지고 있음을 말해주며 Borenfreund와 Puerner (1984)의 독성판정기준에 의하여 고독성인 것으로 나타났다. 즉, Borenfreund와 Puerner는  $\text{XTT}_{50}$ 값이 100  $\mu\text{M}$  이하이면 고독성으로 판정하였으며 100~1,000  $\mu\text{M}$ 이면 중간독성, 1,000~2,000  $\mu\text{M}$ 이면 저독성, 2,000  $\mu\text{M}$  이상이면 무독성으로 각각 판정하였다. 본 실험에 있어서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 세포독성을 나타낸 원인으로는 세포내 핵산물질인 DNA를 손상시켰거나 (Loft et al., 1994), 또는 세포내 항산화효소의 기능저하나 (Jacobson et al., 1990; Sun et al., 2002), 세포내 칼슘유입 (Mattson et al., 1993) 등을 초래하였을 가능성을 배제할 수는 없으나 본 실험에서 측정된 colorimetric assay가 세포내 사립체활성과 깊은 관련이 있음을 고려할 때 아마도  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 세포내소기관을 손상시킴으로서 세포생존율의 감소를 초래하였을 것으로 생각된다 (Mosmann, 1983; Michikawa et al., 1994). 한편,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 산화적 손상에 대한 kaempferol의 영향을 조사하기 위하여 인체유래피부섬유에 100~150  $\mu\text{M}$ 의 kaempferol을 전처리한 후 이에 대한 세포생존율을 조사한 결과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 만을 처리한 실험군에 비하여 모두 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 kaempferol이  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 부터 세포손상을 방어하였음을 보여주었으며 이는 kaempferol이 항산화능이 있다는 것을 말해주고 있다 (Gates et al., 2007; Leung et al., 2007). 따라서 본 실험에서는 kaempferol의 항산화능을 조사하기 위하여 kaempferol이 30~120  $\mu\text{M}$ 의 농도로 각각 포함된 메탄올시료에 대하여 DPPH 자유기소거능을 조사한 결과 농도가 증가할수록 DPPH 자유기소거능도 증가하였으며 특히, 60  $\mu\text{M}$ 과 120  $\mu\text{M}$ 의 kaempferol의 농도에서는 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 본 실험결과는 Jung 등 (2003)에 의한 kaempferol의 항산화능의 보고

와 일치하였으며 또한, 본 실험에 있어서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대하여 kaempferol이 세포생존율을 증가시킴으로서 항산화 작용을 나타낸 것에도 일치하였다. 한편, 산소자유기의 산화적 손상은 막의 지질과산화반응을 유발시킴으로서 세포독성을 나타내게 되며 동시에 LDH 활성분석은 막의 손상 정도를 판정하는 최적의 분석방법으로 알려져 있다 (Yamamoto et al., 1983; Harats et al., 1998). 따라서 본 연구에서는 kaempferol이 LDH 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 인체유래피부섬유모세포에 처리하기 전에 kaempferol이 160~200 µM로 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에서는 LDH 활성이 대조군에 비하여 164.7%로 높게 나타난 반면 kaempferol의 처리에서는 100~120%로 나타나 유의하게 감소하였다. 이러한 실험결과는 kaempferol이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 야기되는 막의 지질과산화반응을 방어함으로써 항산화효과를 보여주었음을 알 수 있었다. 그러나 kaempferol의 항산화능의 약리활성에 대한 기전을 더욱 자세히 규명하기 위하여서는 산화적 손상과 관련이 깊은 세포내 신호전달계나 항산화계의 측면에서 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

이 논문은 2006년도 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.
- Chuyen NV, Utsunomiya N, Hodaka A, Kato H. Antioxidative effect of Maillard reaction products in vivo. in the "The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology". ed. PA Pinot Birkhauser Verlag Basel, 1990. 285-290.
- De Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by Fenton's reagent. *Chemosphere* 2001. 45: 85-90.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007. 121: 2225-2232.
- 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.
- 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 Herbology* 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.
- 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-picrylhydrazyl 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.
- Jacobson JM, Michael JR, Jafri MH, Gurtner GH. Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *J Appl Physiol*. 68: 1252-1259, 1990.
- Jung HA, Jung MJ, Kim YJ, Chung HY, Choi JS. Inhibitory activity of flavonoids from *Prunus davidiana* and other flavonoids on total ROS and hydroxyl radical generation. *Arch Pharm Res*. 2003. 26: 809-815.
- 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. *Kor J Oriental Physiol Pathol* 16: 1016-1019, 2002.
- Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracilis*. *Mut 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.
- 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.
- Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.* 1994. 8: 534-537.
- 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 Methods* 1983. 65: 55-63.
- Nishio A, Uyeki EM. Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J Toxicol Environ Health* 1985. 15: 237-244.
- Pedder SC, Wilcox RI, Johnson DD. Attenuation of febrile seizures in epileptic chicks by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990. 68: 84-88.
- 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.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J.* 1995. 9: 526-533.
- 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. 4; 50: 7449-7454.
- Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2006. 54: 9798-9804.
- Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 1983. 14: 977-982.