

항산화제 Quercetin이 파라쿼트에 유도되는 세포 손상에 미치는 효과

충북대학교 의과대학 응급의학교실

김 훈 · 이석우

The Effects of Quercetin on Paraquat-induced cell Damage

Hoon Kim, M.D., Suk-Woo Lee, M.D.

Purpose: Paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride, PQ) is a very effective and widely used herbicide which was introduced commercially in 1962. However, its toxic effects are often fatal to humans and animals through accidental or suicidal poisoning. Quercetin belongs to an extensive class of polyphenolic flavonoid compounds almost ubiquitous in plants and plant food sources. Quercetin is known as a strong free radical scavenger and an inhibitor of reactive oxygen species production. However, the effects of quercetin on paraquat-induced oxidative cell damage have not been investigated.

Methods: This experiment was conducted in vitro using the HeLa Human cervical carcinoma cell line. The free radical scavenging activity of quercetin was assayed in cell free systems using a stable free radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Cytotoxicity was studied using the MTT method. Optical density was measured at 540 nm using an ELISA reader. We examined morphological changes in cells after drug treatment using an inverted microscope, and quercetin-induced apoptosis was investigated using an apoptotic DNA fragmentation assay and a caspase-3 activity assay.

Results: Results of anti-DPPH radical assay indicated that

quercetin inhibited the production of DPPH radicals in vitro and that its radical scavenging activity was superior to the activities of both ascorbic acid and N-acetylcysteine. Incubation of HeLa cells with quercetin protected HeLa cells from paraquat-induced cytotoxicity according to the MTT assay. In the DNA fragmentation and caspase-3 activity assays, DNA ladders and caspase-3 concentrations characteristic of apoptosis appeared in quercetin-treated HeLa cells.

Conclusion: The results of this study suggest that quercetin at less than a concentration of 100uM exhibits an inhibitory effect on paraquat-induced cell death, but that at concentrations of over 100 uM, the protective effects against paraquat-induced cell damage were reduced due to its apoptotic effects.

Key Words: Paraquat, Quercetin, Antioxidants

Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongjoo, Korea

서 론

파라쿼트(1,1-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride)는 1958년 최초로 개발된 이후 전 세계적으로 가장 흔히 사용되는 유기염소계 비선택성 제초제로서 국내에서는 그람 옥산, 속사포, 파라코 등의 이름으로 시판되고 있다. 강한 독성으로 소량에서도 인체에 흡수되면 치명적이어서 약물 중독에 의한 사망 원인으로는 최고를 차지하며 우리나라에서는 연간 500명 이상의 사망자가 발생한다고 알려져 있다¹⁾. 파라쿼트의 독성 작용은 세포내에서 cytochrome P 450 reductase, glutathione reductase 등의 효소에 의한 파라쿼트 이온의 순환적 환원으로 활성산소종인 superoxide radicals의 과다 생성으로 세포막 지방 과산화(lipid peroxidation), apoptosis 유도 등이 발생하여 산화적 세포독성이 발생하게 된다²⁾. 이러한 이유로 다양한 항산화제가 파라쿼트의 중요한 치료 방법으로 인식되고 있다. 현재 급성 파라쿼트 중독의 치료를 위한 다양한 시도가 이루어지

책임저자: 김 훈
충청북도 청주시 흥덕구 개신동
충북대학교병원 응급의학교실
Tel: 043) 269-6080, Fax: 043) 269-6954
E-mail: nickeh2000@chungbuk.ac.kr

접수일: 2006년 9월 21일, 1차 교정일: 2006년 10월 9일
게재승인일: 2006년 10월 11일

*이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

고 있으며, 위세척, 이노제 사용 혹은 혈액 관류 등의 고식적인 방법과 함께 유해 활성산소종 제거를 위한 항산화제들로 tocopherol, ascorbic acid 등의 비타민계 항산화제, metatonin, glutathione, metallothionein, N-acetylcysteine, liposomal antioxidants 등이 있고 chelating agents로 desferoxamine hydroxypyridin-4-one, 그리고 superoxide radicals 제거와 관련된 효소인 Superoxide dismutase 흡인 치료 등이 현재 임상적으로 사용 또는 연구되고 있다.

하지만 ascorbic acid, tocopherol 등의 비타민성 항산화제를 제외하고 천연물에서 추출되는 항산화 물질들에 대하여는 파라쿼트에 유도된 과도한 활성산소종에 의한 산화적 세포 독성에 미치는 효과에 대해서 많은 연구가 되고 있지 않다. 현재까지 보고 된 대표적인 천연물 성분의 항산화 물질들로는 caffeic acid, ferulic acid 등의 페놀산류, catechine 같은 탄닌류, kampferol, quercetin 등의 플라보노이드류 그리고 카로티노이드류 등의 화합물들이다. 이 중 quercetin은 토마토, 사과, 양파 등에 풍부한 플라보노이드류 계통의 화합물 중 하나로서 강력한 항산화효과가 있는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 이러한 플라보노이드류 계통의 화합물은 활성산소종으로부터 얻어지는 자유전자(free electrons)를 안정화할 수 있는데 이는 quercetin 분자 구조에 있는 자유 수산화기(hydroxyl group)가 peroxy-nitrite 같은 활성산소종을 제거하는 역할과 Fenton 반응에 의해 발생하는 활성산소종 생성에 기여하는 금속이온을 흡착하는 특별한 구조를 가졌기 때문이다⁵⁻⁶⁾. 또한 Hanasaki 등⁷⁾은 xanthine oxidase 에 의한 superoxide radicals 발생을 억제함으로써 항산화 효과가 있다고 설명하고 있다.

하지만 quercetin이 파라쿼트에 의해 유발된 유해 활성산소종 발생과 관련된 세포 손상에 대하여 어떠한 작용을 하는지에 대하여 아직까지 연구된 바가 없다. 이에 우리는 항산화 기능을 가진 것으로 알려진 천연물 성분 중 대표적인 quercetin이 in vitro 상에서 파라쿼트로 유도된 세포 손상에 대한 효과를 분석하고, 임상적으로 파라쿼트의 치료제로 사용 중인 ascorbic acid, N-acetylcysteine 등과 항산화능과 파라쿼트 유도성 세포 손상에 미치는 영향을 조사하기 위해 본 실험을 시행하게 되었다.

대상과 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 paraquat, quercetin, bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide, tetrazolium bromide, DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 Sigma (St. Louis, MO)사에서, Dulbecco's modified

Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL사에서 구입하였고, ECL protein detection kit, nitrocellulose membrane은 Amersham (Arlington Heights, IL)사에서 구입하였다. 그 외의 다른 시약들은 특급의 것을 사용하였다.

2. 세포의 배양

본 실험에는 HeLa cells를 사용하였으며, penicillin-streptomycin (100ug/ml), 10% heat-inactivated FBS를 첨가한 DMEM을 배양액으로 5% CO₂, 37°C 에서 배양하였으며, 배양접시의 바닥 면이 70~80%에 도달하면 계대배양을 시행하였으며 모든 실험에는 계대배양 10 번 이내의 세포를 사용하였다.

3. 세포 증식능 검사(MTT assay)

96-well microtiter tissue culture plate (Falcon)에 HeLa 세포를 103 cells/well로 분주하고 다양한 농도의 paraquat 또는 quercetin을 처리하여 5% CO₂, 37°C 에서 일정 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 0.5 mg/ml MTT용액 1 ml을 넣고 5% CO₂, 37°C 에서 2시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후 DMSO 200 ul를 넣고 30분후 ELISA Microreader 550 (Biorad, USA) 장비를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상대적 흡광도(Relative absorbance)는 약물 농도별 흡광도를 대조군(약물 미처리군)의 흡광도로 나눈 값으로 계산하였다.

4. 항산화활성 측정

항산화 활성은 DPPH를 이용하여 시료의 free radical 소거능을 측정하였다⁸⁾. 즉 에탄올에 용해시킨 100 uM DPPH용액을 100 uL 씩 96 well plate에 분주하고 여기에 약물을 농도별로 제조한 후 100 uL씩 첨가하여 최종 반응용액이 200 ul로 한 후 30분간 반응을 시켰다. 그리고 ELISA Microreader 550을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고 DPPH의 환원에 의한 흡광도 감소를 통해 각 약물의 항산화활성을 측정하였다.

5. 세포 형태 변화 관찰

100 mm dish에 HeLa 세포를 6×10⁵ 개씩 담고 24시간 동안 배양한 후 대조군(약물 미처리군), 파라쿼트만 처리한 군, 파라쿼트와 quercetin을 처리한 군으로 분리하여 5% CO₂, 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한 후,

inverted microscopy를 이용하여 세포 수와 형태 변화 양상을 관찰하였다.

6. Apoptotic DNA Fragmentation assay

Quercetin에 의해 apoptotic DNA fragmentation이 일어나는지 검색하기 위해 DNA fragmentation assay를 수행하였다. 즉 100 mm dish에 HeLa 세포를 5×10^5 개씩 담고 24시간 동안 배양한 후 0 uM(대조군)과 50 uM(저농도), 200 uM(고농도) quercetin을 처리하고 5% CO₂, 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 세포를 수확한 다음 차가운 PBS를 넣고 원심 분리하여 배지를 제거한 후 침전된 세포를 25 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1 ug/ml proteinase K가 첨가된 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 이용하여 resuspension 한 후 60°C에서 12시간 동안 반응시켰다. Phenol/chloroform(1:1)과 chloroform/isoamyl alcohol(1:24)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 이에 95% ethanol을 첨가하고 원심 분리하여 DNA를 침전시키고 상층액을 제거한 후 1시간 동안 반응시켜 RNA를 완전히 가수분해 시키고 1.6% agarose gel에 5 ug의 DNA를 전기 영동하여 DNA ladder를 확인하였다.

7. Caspase-3 activity assay

Quercetin에 의한 HeLa 세포의 caspase-3 활성 변화를 관찰하기 위해 caspase-3 activity assay를 시행하였다. 즉 6 well plate에 HeLa 세포를 1×10^5 cells로 plating하여 24시간 동안 배양한 후 0 uM(대조군)과 50 uM(저농도), 200 uM(고농도) quercetin을 처리하고 .5%CO₂, 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고 세포를 수확한 다음 원심분리 후 세포를 모아 TTE buffer

(10 mM Tris-HCl, 0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, pH 8.0)로 lysis 시킨 후 30 분간 얼음에서 방치한 후 효소반응 buffer (100 mM HEPES, 10 mM DTT, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 0.1% BSA)에 cell lysate를 첨가한 후 100uM Ac-DEVD-AFC (caspase-3에 대한 substrate)을 첨가하여 37°C 에 4시간 동안 반응 시켰다. 그 다음 효소반응 후 방출되는 fluorescent는 spectrofluorimeter (Perkin Elmer LS-50B)를 이용하여 400~505 nm에서 측정하였다.

8. 통계처리

오차 범위를 줄이기 위해 동일동시 조건에서 세포 증식능 검사, 항산화활성 측정, Caspase-3 activity assay를 6회 시행한 후 평균값과 표준편차를 분석하였고 평균값에 대한 t-검정으로 유의성을 각각 확인하였다.

결 과

1. HeLa 세포에서의 파라쿼트에 의한 세포 독성

파라쿼트 농도별로 HeLa 세포에 미치는 독성 정도를 평가하기 위해 파라쿼트를 농도별로 처리한 후 24, 48, 72 시간에서의 세포 독성을 측정한 결과, 100 uM 농도에서는 24시간 내 95% 이상의 세포 손상이 관찰되었고, 1 uM 농도에서는 약물 처리 후 48시간부터 50% 정도의 세포독성이 발생하기 시작하였으며 10 uM 농도에서는 48시간에서 95% 이상의 세포 손상이 확인되었다(Fig. 1).

2. 항산화활성 측정

Quercetin이 항산화능을 가진 파라쿼트의 치료제 N-

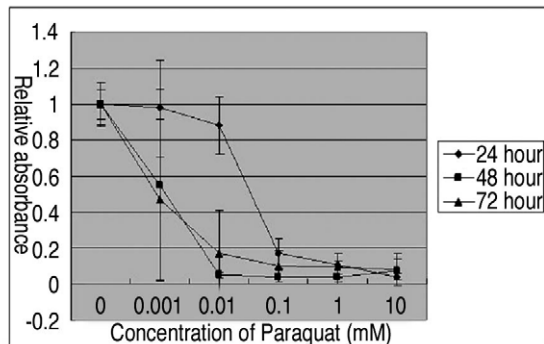


Fig. 1. Cytotoxic activity of paraquat in HeLa cells. HeLa cells were treated with various concentrations of paraquat for the indicated times. Cytotoxicity was determined by MTT assay, and relative absorbance comparing with control group without paraquat treatment was calculated according to doses of paraquat.

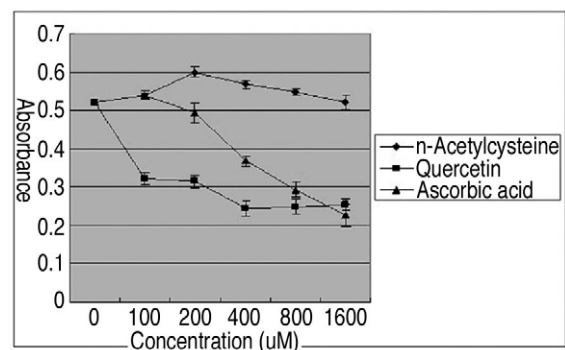


Fig. 2. DPPH Assay. Radical scavenging effect of quercetin, ascorbic acid, and n-Acetylcysteine on DPPH radical production were investigated according to concentrations of each drugs.

acetylcysteine과 ascorbic acid와의 항산화활성 비교를 위해 DPPH radical 소거효과를 검토한 결과 quercetin 이 N-acetylcysteine과 ascorbic acid 보다 높은 항산화 활성을 보였다. Quercetin은 100 uM 이상의 농도에서 비슷한 정도의 항산화활성을 보였으며, ascorbic acid는 농도가 증가하면서 비례적으로 항산화활성이 증가하는 양상이 관찰되었다(Fig. 2).

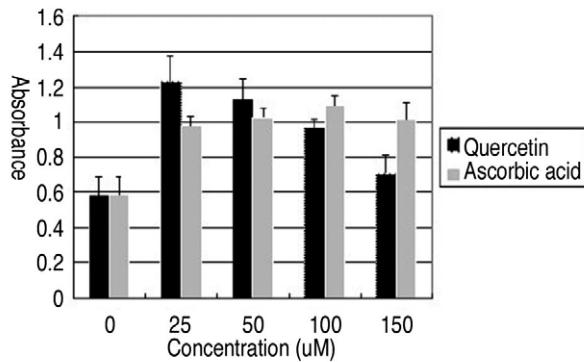


Fig. 3. Effects of quercetin and ascorbic acid on paraquat-induced cytotoxicity
HeLa cells were treated with 10 uM paraquat and after 4 hour, various doses of quercetin and ascorbic acid were treated. cytotoxicity was determined by MTT assay.

3. 파라쿼트에 유발된 세포독성에 대한 항산화제 quercetin과 ascorbic acid의 영향

DPPH에서 높은 항산화활성을 보인 quercetin과 ascorbic acid가 파라쿼트에 유도된 세포 손상에 미치는 효과를 관찰하기 위해 10 uM의 파라쿼트 처리 후 4시간 후에 동일 농도별로 quercetin과 ascorbic acid를 처리 후 36시간 후에 분석한 결과, 25 uM, 50 uM에서는 quercetin이 ascorbic acid보다 높은 세포보호 효과가 관찰된 반면, 150 uM에서는 quercetin보다 ascorbic acid가 통계학적으로 유의한 세포보호효과가 관찰되었다(Fig. 3).

4. 파라쿼트와 quercetin 에 의한 HeLa 세포의 형태학적 변화

10 uM 파라쿼트를 처리한 4시간 후에 HeLa 세포와 quercetin 50 uM를 처리한 후 36시간 배양 후 위상차현미경으로 관찰한 결과 quercetin 50 uM을 함께 처리한 군에서 파라쿼트만 처리한 군과 비교하여 생존 세포수가 의미 있게 많았다(Fig. 4).

5. Apoptotic DNA Fragmentation assay

Quercetin이 고농도에서 세포보호효과 감소 원인이 apoptosis 유도과 관련이 있는지를 조사하기 위하여 대조

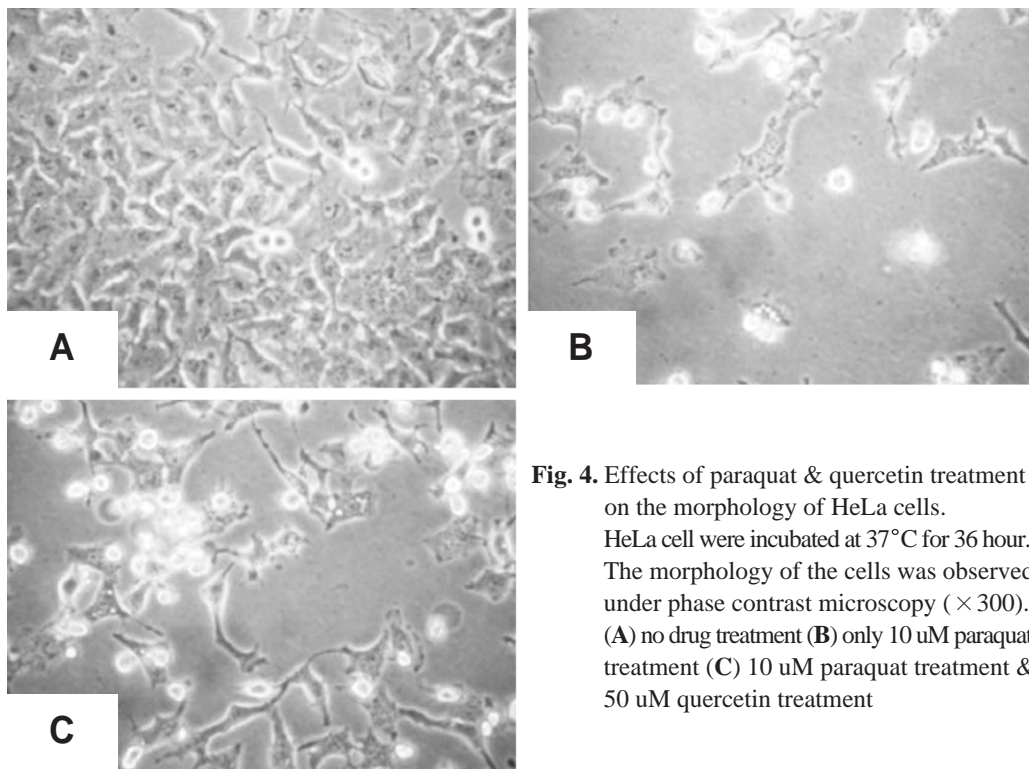


Fig. 4. Effects of paraquat & quercetin treatment on the morphology of HeLa cells.
HeLa cell were incubated at 37°C for 36 hour. The morphology of the cells was observed under phase contrast microscopy (×300). (A) no drug treatment (B) only 10 uM paraquat treatment (C) 10 uM paraquat treatment & 50 uM quercetin treatment

군(약물 미처리군), 50 uM(저농도), 200 uM(고농도) quercetin 처리군 간의 DNA Fragmentation assay 시행 결과, 대조군과 50 uM(저농도) quercetin 군에서는 DNA ladder가 관찰되지 않았으나, 200 uM(고농도) quercetin 군에서는 DNA ladder가 관찰되었다(Fig. 5).

6. Caspase-3 activity assay

Quercetin이 고농도에서 세포보호효과 감소 원인이 caspase-3 활성 관련 apoptosis 유도과 관련이 있는지를 조사하기 위하여 HeLa 세포에 대조군(약물 미처리군), 50 uM(저농도), 200 uM(고농도) quercetin 처리군간 caspase-3 활성을 분석한 결과, 200 uM(고농도) quercetin 처리군이 대조군(약물 미처리군)과 50 uM(저농도) 보다 의미 있는 caspase-3 활성도 증가를 보였다(Fig. 6).

고 찰

과도한 활성산소를 중화하기위하여 다양한 항산화제가 파라쿼트의 중요한 치료로 사용되고 있고 더 효과적인 항산화

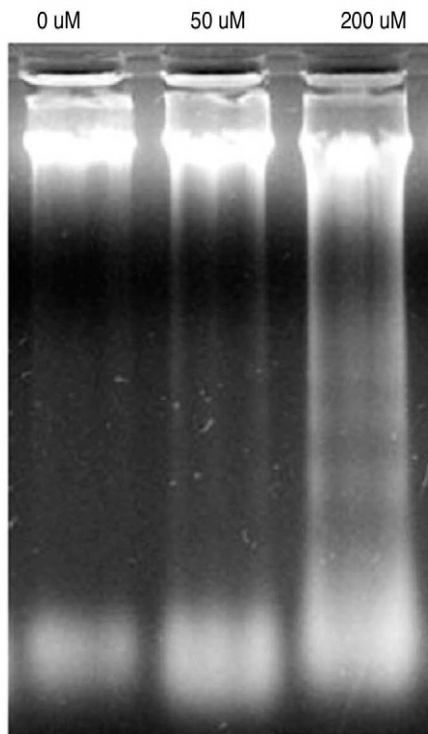


Fig. 5. Effects of quercetin on DNA fragmentation in HeLa cells

HeLa cell were incubated at 37°C for 24h in the absence (0 uM) and presence (50 uM & 200 uM) of quercetin. Total genomic DNA was extracted and electrophoresed on 1.6% agarose gel.

제의 개발은 파라쿼트의 치료의 임상적 적용에 중요한 역할을 할 것이다. 이러한 관점에서 천연물에 존재하는 다양한 항산화능을 가진 화학물을 활용한 새로운 접근이 필요하여 본 실험을 시행하게 되었다.

이 번 실험에서는 HeLa 세포를 이용하여 세포독성을 조사하였으며, 파라쿼트를 농도별로 세포에 처리한 결과, 1 uM 처리 후 48시간 후부터 세포 독성이 확인되어 대략 50%의 세포 생존률 감소가 확인되었고 10 uM 처리 시에는 24시간에서도 세포독성이 발생하기 시작하였으며 48시간에는 90% 이상의 세포생존 감소가 확인되어 농도와 시간에 의존적인 세포독성을 보였다. 또한 현미경의 세포 형태 변화에서도 파라쿼트 처리 후 36시간에 정상의 50% 이상의 세포 손상을 확인할 수 있었다. 이는 많은 연구들에서 다양한 세포주에서 파라쿼트의 농도와 시간 의존성 세포독성과 유사한 소견이다⁹⁻¹².

Quercetin은 과일, 채소, 다양한 식물 등에 풍부하게 함유된 polyphenolic flavonoid 에 속하는 다양한 생물학적 효과를 가진 화합물이다. 현재 quercetin의 작용기전에 관한 in vitro 상 연구는 주로 항암작용에 초점을 맞추어 많은 연구가 이루어지고 있으며, 유방암, 대장암, 위암, 두경부암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 난소암 세포주 등 다양한 세포주에서 다양한 농도에서 암세포의 성장을 억제한다고 보고 되고 있다¹³⁻¹⁷. 이러한 암세포 성장의 분자기전으로 변이형 P53의 발현을 억제하여 세포 분열 단계에서 G2-M 단계에서 세포를 정지시키거나, tyrosine kinase, Ras 단백질 억제를 통한 세포분열을 억제, 그리고 heat shock protein 들을 억제하여 암세포 생존을 억제하게 하는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁸. 이번 실험에서 HeLa 세포에서도 200 uM의 농도처리 시에 apoptotic DNA fragmentation assay에서 DNA ladder 가 관찰되고 caspase-3 activity assay 상 caspase-3 활성이 대조군보다 3배 이상 증가하

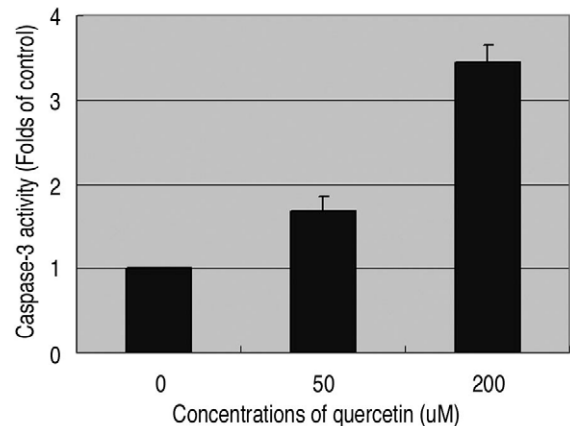


Fig. 6. Caspase-3 activity assay

200 uM quercetin induced activation of casapase-3 more than those of control (No treatment of quercetin) & 50 uM quercetin in HeLa cells.

는 것을 보면 고농도의 quercetin에서는 HeLa 세포에서 apoptosis 유도성 세포독성을 보이는 것을 알 수 있었다. 이로 인해 저농도 quercetin에서 보인 활성산소종 증화에 의한 세포 보호효과가 감소하는 결과를 보였던 것으로 사료된다.

Jeong 등¹⁹⁾은 quercetin이 cell-free system 과 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)에서 Cu²⁺에 의해 산화된 LDL에 유도된 apoptosis를 억제하고 강력한 항산화제로서 세포의 생존율을 증가시킨다고 보고하고 있으며, Chen 등²⁰⁾은 rat glioma C6 cells에서 quercetin이 H₂O₂ 활성산소종에 의한 apoptosis와 chemical anoxia에 의한 apoptosis 모두를 억제한다고 발표한 바 있다. 이번 실험에서 quercetin의 항산화활성을 평가하기 위한 DPPH assay에서 항산화제로 현재 파라퀴트의 중심 치료약물로 사용하고 있는 ascorbic acid 또는 N-acetylcysteine 보다 낮은 농도에서도 높은 항산화활성을 보였다. 이러한 낮은 농도의 quercetin이 가진 높은 항산화활성이 파라퀴트에 의한 활성산소종 유도성 세포손상을 막고 세포생존을 높인 것으로 사료된다. 흥미로운 점은 ascorbic acid는 농도가 증가함에 따라 항산화능이 비례적으로 서서히 증가하는 양상이었으며, 800 uM 농도에서의 효과가 quercetin 100 uM에서 보인 항산화활성과 비슷한 정도를 나타내었다. 이는 quercetin의 경우 낮은 농도에서도 활성산소종을 제거하는 능력이 ascorbic acid, N-acetylcysteine 보다 높은 강력한 항산화제임을 시사한다고 평가할 수 있다.

이에 우리는 높은 항산화활성을 보인 quercetin과 ascorbic acid가 파라퀴트에 의한 세포 독성에 작용하는 효과를 알아보려고 HeLa세포에 10 uM를 처리한 다음 4시간 후에 quercetin 농도별로 처리하고 36시간 후에 paraquat 만 처리한 대조군과 비교하여 세포생존 정도를 평가하였을 때, quercetin은 25 uM에서 파라퀴트만 처리한 대조군에 비해 가장 높은 세포생존을 보였고 농도가 증가함에 따라 세포 생존률이 비례적으로 감소하는 양상을 보였다. 하지만 quercetin 농도가 25 uM에서 100 uM 사이에서는 대조군에 비교하여 의미 있는 생존 증가가 관찰되었다. 반면 ascorbic acid를 처리한 경우에는 대조군과 비교해 의미 있는 세포 생존을 보였지만, 25 uM과 50 uM에서는 quercetin보다 낮은 세포 생존을 보였다. 하지만 100 uM과 150 uM에서는 오히려 quercetin 처리시보다 높은 세포 생존률을 나타냈다.

이에 quercetin의 높은 농도에서 apoptosis에 의한 세포 독성이 원인인지를 파악하기 위해 apoptotic DNA fragmentation assay를 실시한 결과 50 uM quercetin 처리 시 관찰되지 않던 DNA Ladder가 200 uM quercetin 처리 시에서 관찰되었고, caspase-3 activity assay에서 HeLa 세포에 50 uM quercetin 처리한 것보다 200 uM

quercetin 처리 시 의미 있는 caspase -3 활성도 증가를 보였다. caspase-3는 proenzyme 형태인 procaspase-3로 세포내에 존재하다가 apoptotic signal을 받아 활성화 된 caspase-8, 또는 caspase-9에 의해 활성화 형태로 변화하므로 caspase-3의 활성 증가는 apoptosis 발생을 시사한다. 그러므로 HeLa 세포에서 파라퀴트에 대한 quercetin의 세포보호 작용이 고농도에서 적은 이유는 quercetin에 의한 apoptosis 유도로 인한 것으로 판단된다. Chen 등²⁰⁾이 glioma C6 세포주에서 quercetin을 농도별로 처리한 후 세포독성정도를 평가하였을 때 200 uM에서 의미 있는 세포 생존률 감소가 관찰되었고 H₂O₂ 처리와 chemical anoxia 상태에서 quercetin을 처리하였을 때 25 uM과 50 uM에서 quercetin을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 의미 있는 세포생존을 보고 하였다. 또한 apoptotic DNA fragmentation assay상에서 H₂O₂ 처리와 chemical anoxia에 의한 DNA ladder 발생을 25 uM과 50 uM에서 apoptosis를 억제한다고 보고한 바 있다.

아직까지 quercetin의 세포 효과는 강력한 항산화제로서의 역할과 apoptosis를 유발하는 항암작용으로서의 효과로 상반된 주장이 많다. 본 실험에서는 다양한 농도의 파라퀴트 처리 후 각 농도별 다른 quercetin 농도에서 apoptosis assay, MTT assay 등이 시행되지 못했고, 단지 HeLa 세포에서 이루어진 제한점이 있어 향후 다양한 세포주를 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되며 더 나아가 in vivo에서의 효과에 대한 조사가 필요할 것이다.

결 론

이번 연구는 HeLa 세포에서 paraquat의 세포독성과 관련된 quercetin의 효과를 분석한 것이다. 먼저 HeLa 세포에서 paraquat의 세포독성은 농도와 시간에 비례적으로 증가하는 양상을 보였다. 항산화활성 능력은 quercetin이 전반적으로 ascorbic acid, N-acetylcysteine 보다 더 높았으며 HeLa 세포에서 quercetin은 낮은 농도에서는 ascorbic acid 보다 우수한 세포보호효과가 확인되었고 높은 농도에서는 apoptosis에 의한 세포 독성을 보여서 농도에 따른 다른 효과가 나타나는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Lee EY, Kim YT, Yang JO, Hong SY. Long-term prognosis of paraquat-induced lung injury. J Korean Soc Emerg Med 2003;65:308-14.
2. Suntres ZE. Role of antioxidants in paraquat toxicity. Toxicology 2002;180:65-77.

3. Ishikawa Y, Kitamura M. Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:629-34.
4. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994;16: 845-50.
5. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63: 1035-42.
6. Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 2001;5:3-6.
7. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygen's scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 1994;16:845-50.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology*. 1995;28:25-30.
9. Bonne-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cell cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;134:52-6.
10. Helga T, Christina E. The use of flow cytometric methods in acute and long-term in vitro testing. *Toxicology* 2005;19:845-52.
11. Choi YI, Noh EW, Han MS, Yi YS. Estimation of cellular damage caused by paraquat and lead using a cell culture system. *J Plant Biotechnology* 2001;3:83-8.
12. Park JK, Kim GT, Song HS, Park SM. Apoptosis in respiratory epithelial cells: Triggering by paraquat and modulation by L-ascorbic acid. *J Korean Soc Emerg Med* 2004;15:606-11.
13. Richter M, Ebermann R, Marian B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: possible role of EGF receptor signaling. *Nutr Cancer* 1999;34:88-99.
14. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer* 1999;35:1517-25.
15. Russo M, Palumbo R, Tedesco I, Mazzarella G, Russo P, Iacomino G, et al. Quercetin and anti-CD95 (Fas/Apo1) enhance apoptosis in HPB-ALL cell line. *FEBS Lett*. 1999;462:322-8.
16. Choi JA, Kim, JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ, Yoo YD, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int J Oncol* 2001;19:837-44.
17. Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1813-20.
18. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 1994;54:4952-57.
19. Jeong YJ, Choi YJ, Kwon HM, Kang SW, Park HS, Lee M, et al. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr* 2005;93:581-91.
20. Chen TJ, Jeng JY, Lin CW, Wu CY, Chen YC. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 2006;223:113-26.