

Caffeic Acid의 ONOO⁻ 제거활성

¹부산대학교 유전공학 연구소, ²부산대학교 약학대학,
³부산여자대학 피부미용과, ⁴부경대학교 식품생명과학과

이지영¹ · 성도유² · 노재경² · 김유정³ · 제정환²
김민선² · 최재수⁴ · 정해영^{1,2} · 이경희²

Peroxynitrite (ONOO⁻) Scavenging Activity of Caffeic Acid

Ji-Young Lee¹, Do-Yu Soung², Jae-Kyung No², You-Jung Kim³, Jeong-Hwan Je²,
Min-Sun Kim², Jae-Sue Choi⁴, Hae-Young Chung^{1,2} and Kyung-Hee Lee²

¹Genetic Engineering Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Pharmacy, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Department of Cosmetology, Pusan Women's College, Busan, Korea

⁴Department of Food Biotechnology, Pukyong National University, Busan, Korea

Peroxynitrite (ONOO⁻) is produced by the reaction of superoxide (O₂⁻) with nitric oxide (NO). ONOO⁻ is a powerful oxidant that can cause damages of proteins, lipids, and DNA through more subtle action mechanism, which is called the process of nitration and oxidation. Nitrotyrosine has served as a fingerprint for ONOO⁻ mediated damage of cellular proteins in a variety of pathological conditions. Because the body lacks endogenous defense components against ONOO⁻ induced protein modifications, ONOO⁻ scavengers should be supplemented. In the present study, caffeic acid showed evidence of scavenger for ONOO⁻. A dihydroxyl group and a double bond seem to be essential structure requirements. The data from the experiments confirmed a protective effect of caffeic acid on bovine serum albumin (BSA) and low-density lipoprotein (LDL) against ONOO⁻. Further, caffeic acid was found to protect *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)-mediated ROS generation in vascular endothelial cells. The present study demonstrated that caffeic acid with hydroxyl groups and double bonds exerts an anti-nitration effect by scavenging ONOO⁻ through electron donation.

Key Words: Caffeic acid, Peroxynitrite (ONOO⁻), Scavenger, Nitration

서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)란 일반적으로 superoxide ($\cdot O_2^-$), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등의 산소종을 말한다. 넓은 뜻으로는 지질과산화물이나 할로젠화산소, 내피유래 이완인자로서 동정된 nitric oxide (일산화질소, NO)도 포함된다. 특히, 최근 많은 연구가 수행되고 있는 peroxynitrite ($ONOO^-$)는 NO, NO_2 , HNO_2 등의 질소화합물들과 함께 활성질소(reactive nitrogen species, RNS)라고 한다.

$ONOO^-$ 는 두 개의 비교적 안정적인 free radical 인 NO와 $\cdot O_2^-$ 의 반응에 의해서 *in vitro* 및 *in vivo*의 염증반응에서 특히 많이 생성된다. $ONOO^-$ 는 NO와 $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다.^{1,2)} 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 $ONOO^-$ 의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다.³⁻⁵⁾

혈관벽에서 NO는 보통 NO synthase (NOS)에서 생산되어 내피유래 이완작용, 혈소판 응집억제, 혈관평활근 세포증식 및 형질변환의 조절에 중요한 역할을 맡고 있다. $\cdot O_2^-$ 는 산소가 1전자 환원되는 것에서 생기고 혈관벽에 존재하는 NO와 재빨리 반응하여 $ONOO^-$ 로 변환된다. $ONOO^-$ 는 지질의 과산화 및 단백질의 니트로소화 등을 일으키는 것에서 동맥경화의 진전에 깊이 관여하고 있다. NO가 다량으로 존재하지 않는 조건 하에서는 $\cdot O_2^-$ 는 superoxide dismutase (SOD)와 반응하여 H_2O_2 를 생산한다. H_2O_2 는 비교적 세포 내에 안정하게 존재할 수 있지만, catalase나 GSH peroxidase 등에 의해서 최종적으로는 물로 대사된다. 이들 ROS는 내피의

존성 이완작용의 장애, 세포증식, 혈관염증작용 및 리모델링 형성을 일으키고 고혈압, 동맥경화, 심부전 등 순환기계 질환의 발증에 깊이 관여한다.^{6,7)}

이들 ROS 및 RNS의 독성으로부터 세포를 보호하기 위한 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 또한 이들의 제거제 개발의 중요성이 인식되고 있다. $ONOO^-$ 의 독성이 매우 강하여 결국에는 여러 가지 질병과 관련되어 있다는 것을 알 수 있다. 인체 내에서 특이하게 $ONOO^-$ 를 제거하는 효소가 존재하지 않으므로 내인성 물질과 천연 및 합성 화학물질을 이용하여 $ONOO^-$ 에 대한 독성을 방지하는 것이 중요하다. 이러한 작용을 하는 물질로는 uric acid, serotonin 등과 같은 내인성 $ONOO^-$ 방지제, flavonoids, hydroxycinnamates와 같은 천연물 유래성분 및 salicylate 등과 같은 합성물이 존재한다.⁸⁻¹⁰⁾

페놀화합물은 식용식물에 널리 존재하는 생리활성 물질이므로 인간은 이를 복용하기 때문에, 인간의 혈장(plasma)에서 흔히 존재하는데, 이러한 화합물 중 caffeic acid는 가장 풍부한 hydroxycinnamic acid를 가지고 있다. 또한, caffeic acid는 low-density lipoprotein (LDL)의 산화를 막고,¹¹⁾ U957 세포에서 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 저해작용이 있다고 보고되어 있다.¹²⁾ 따라서 본 연구에서는 항산화작용이 있는 것으로 알려진 caffeic acid와 그 유도체들의 $ONOO^-$ 제거활성과 tyrosine 잔기의 nitration에 대한 보호 작용에 대해 연구하였고, $ONOO^-$ 제거활성과 관련이 있는 caffeic acid의 구조에 대해 caffeic acid 유도체사이의 구조상관관계를 비교분석하였다.

재료 및 방법

1) 시약

Caffeic acid, DL-penicillamine는 시그마 화학 주식회사(ST. Louis, MO, USA)에서 dihydrorhodamine 123 (DHR123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 $ONOO^-$ 은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) ONOO⁻ 측정

Crow 등의 방법에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다.¹³⁾ 96-well microplate에 caffeic acid를 농도별로 취하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액(pH 7.4)을 가한다. 그리고 10 μ M ONOO⁻ 첨가한 후, 형광광도를 이용하여 excitation (500 nm)과 emission (536 nm)을 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 시판되는 ONOO⁻ (Cayman Chemical Co.)를 직접 사용하여 caffeic acid의 제거 활성능을 검토하였다.

3) Protein Nitration 측정

Bovine serum albumin (BSA, 0.5 mg/ μ l)과 low density lipoprotein (LDL 1 mg protein/ml) 95 μ l에 농도별 시료나 혹은 용매 2.5 μ l를 첨가하여 상온에서 10 분간 shaking incubation한 후, ONOO⁻ (4 mM in 0.3 N NaOH) 2.5 μ l를 첨가하고 20분간 상온에서 incubation하였다. Nitration 반응이 끝난 후 acrylamide gel에 전기영동하여 anti-nitrotyrosine antibody를 이용하여 단백질이 nitration된 정도를 검사하였다.¹⁴⁾

4) Protein Oxidation 측정

OxyBlot Kit¹⁵⁾를 사용하여 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH)로 단백질 side-chains에 있는 carbonyl 기를 분석하여 immunoblot assay를 실시하였다. 10% SDS 3 μ l와 DNPH 5 μ l를 준비된 시료 2 μ l 가한 후 상온에서 15 분간 배양한 후 3.75 μ l의 neutralization 용액을 첨가하였다. Oxidation 반응이 끝난 후, Acrylamide gel에 전기영동하여 anti-nitrophenyl antibody를 이용하여 단백질의 산화 정도를 분석하였다.

5) 혈관 내피세포에서 caffeic acid의 ONOO⁻ 소거능 분석

YPEN 혈관 내피세포를 10% fetal bovine serum (FBS)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM: Nissui, Tokyo, Japan) 배지에 glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25 μ g/ml), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 37°C,

5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 세포는 지수기 (exponential phase)에 있는 것을 실험에 사용하였다. 세포를 6-well plates에 2 \times 10⁴/ml로 심은 후 하루 동안 배양한 다음 1, 2, 4 μ M의 caffeic acid와 t-BHP 10 μ M을 처리하여 3시간 배양하였다. 배양된 세포는 cover glass에서 10 μ M의 DHR 123을 가하여 세포 내 생성된 ONOO⁻에 대한 caffeic acid의 소거능을 형광현미경(Zeiss Co., Germany)을 통해 분석하였다.

결 과

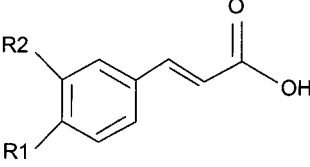
1) Caffeic acid 유도체들의 ONOO⁻ 제거 활성 비교

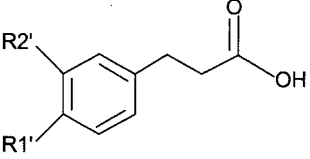
비교적 강한 ONOO⁻ 제거 활성을 가지고 있는 caffeic acid와 5 종류의 그 유도체들의 ONOO⁻ 제거 활성을 조사한 결과, 가장 효과적인 phenolic compound는 1.34 μ M의 IC₅₀을 나타낸 caffeic acid였다. 이것은 R1과 R2의 위치에 각각 두개의 OH기를 가진 caffeic acid였으며, 다음으로 R1'와 R2'의 치환기 위치에 각각 두개의 OH기를 가진 3,4-dihydroxylhydrocinnamic acid (IC₅₀=2.39 μ M)였다. 다음은 각각 R1과 R2 위치에 한 개씩 OH기의 치환기를 가진 *p*-coumaric acid (IC₅₀=3.95 μ M)와 *p*-hydroxyhydrocinnamic acid (IC₅₀=48.20 μ M)였으며, OH기의 치환기를 가지지 못한 cinnamic acid (IC₅₀ > 50 μ M)와 hydrocinnamic acid (IC₅₀ > 50 μ M)는 ONOO⁻에 대한 제거활성이 극히 낮았다(Table 1). 따라서 OH기와 그 치환위치가 caffeic acid의 ONOO⁻ 제거활성에 밀접하게 관련되어 있는 것으로 사료된다.

2) ONOO⁻에 의해 유도된 BSA와 LDL의 nitration에 대한 caffeic acid의 억제효과

Caffeic acid의 nitration에 대한 효과를 검토하기 위해 ONOO⁻로 BSA와 LDL의 nitration을 유도하여 nitration된 tyrosine 잔기를 anti-nitrotyrosine antibody로 western blot 하였다. Fig. 1의 A에서 보는 바와 같이 500 g/ml BSA에 100 μ M의 ONOO⁻를 단독으로 처리하였을 때 BSA의 nitration이 control에 비해 강하게 나타났으며, caffeic acid 각각 2, 20 μ M을 함께 처리함으로써, 농도의존적으로 tyrosine 잔기의 nitration이 현저히 감소하였다. 또한, ONOO⁻에

Table 1. Comparison of ONOO⁻ scavenging activity of caffeic acid and its derivatives





Substitute

Compound	R1	R2	R1'	R2'	IC50 (M)
Caffeic acid	OH	OH			1.34 ± 0.11*
3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid			OH	OH	2.39 ± 0.42
<i>p</i> -Coumaric acid	OH				3.95 ± 0.53
<i>p</i> -Hydroxyhydrocinnamic acid			OH		48.2 ± 2.35
Cinnamic acid					> 50
Hydrocinnamic acid					> 50

*Each value is mean ± S.D.

의해 유도된 LDL의 nitrotyrosine에 대해서도 caffeic acid 각각 2, 20 μM을 처리함으로써, LDL에 형성된 nitrotyrosine이 농도 의존적으로 현저히 감소되었다 (Fig. 1B).

3) ONOO⁻에 의해 유도된 BSA와 LDL의 oxidation에 대한 caffeic acid의 억제효과

BSA와 LDL의 산화에 대한 caffeic acid의 억제효과를 검토하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 ONOO⁻에 의한 BSA와 LDL의 protein carbonyl 형성이 caffeic acid를 전 처리 한 결과 BSA뿐만 아니라 LDL에서도 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, 20 μM caffeic acid 처리에 의해서 protein carbonyl 형성이 현저하게 감소하였다. 따라서 caffeic acid는 ONOO⁻에 의해 발생하는 단백질과 지질의 산화에 대한 억제효과가 있는 것으로 나타났다.

4) 혈관내피세포에서 t-BHP에 의한 세포 내 ONOO⁻ 생성에 대한 rosmarinic acid의 억제효과

세포 내 생성되는 ONOO⁻에 대한 억제효과를 검토하기 위해 acid 1, 2, 4 μM을 각각 세포에 전 처리 한 후 산화적 스트레스를 유도하는 t-BHP를 처리하여 유도된 ONOO⁻의 생성을 억제하는지를 검

토하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 caffeic acid 처리에 의해 세포 내 생성된 ONOO⁻ level이 농도 의존적으로 감소되었다. 본 실험결과 caffeic acid는 세포 내 ONOO⁻ 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

고 찰

생체 내 대사과정 뿐만 아니라 외부 자극에 의해 발생하는 ROS/RNS 등에 의해 초래되는 산화적 스트레스에 의한 생체 내 redox statue의 불균형은 노화와 깊은 관련이 있을 뿐만 아니라, 세포사 (apoptosis), 암, 동맥경화, 본태성 고혈압, 당뇨병, Parkinson씨병, amyloid증, 치매 등 여러 가지 질병과 관련되어 있다고 보고되어지고 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이들 ROS/RNS는 세포 내 과립(mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성되며, 세포막, 핵산, 단백질 등에 결합하여 이러한 분자의 기능을 손상시킨다.¹⁷⁾ 특히, ·O₂⁻는 NO와 결합하여 강력한 세포독성을 나타내는 ONOO⁻를 생성할 수 있고, ONOO⁻는 peroxynitrous acid로 전환되는데 이는 다시 nitrogen dioxide 및 OH로 분해되어 hydroxyl radical (·OH)을 형성한다.

생체 내의 주요한 ROS 생성계로는 mitochondria의 전자전달계와 cytochrome P450 등의 효소계 등

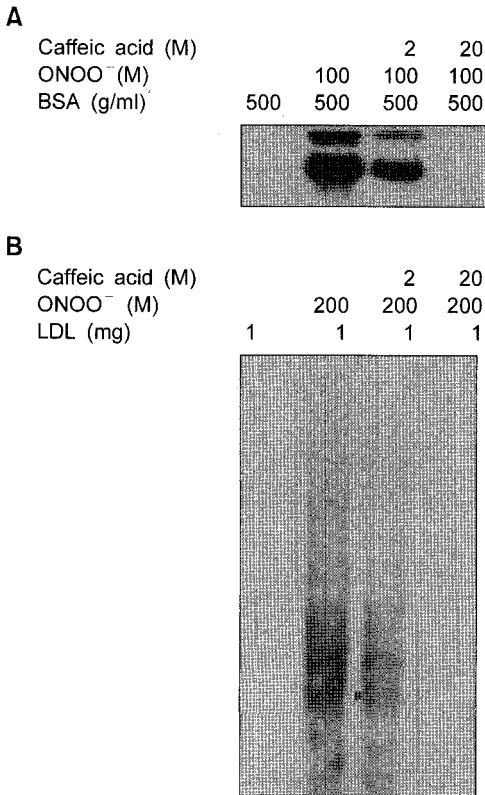


Fig. 1. Effect of caffeic acid on nitration of BSA and LDL by ONOO⁻. Caffeic acid was added to BSA (A) or LDL (B). The reaction samples were incubated with shaking at 25°C for 1hr. After ONOO⁻ was added, all samples were further incubated with shaking at 25°C for 30 min.

이 있다. 생체는 이들에 대해 항산화계를 가동함으로써 세포 항상성(homeostasis)을 유지하고 있으나, 생체는 지속적인 내인성 자극(endogenous stimuli) 뿐만 아니라 다양한 종류의 외인성 자극(exogenous stimuli)에 노출되어 있기 때문에 이들 자극에 대한 보호작용이 중요하다. ONOO⁻는 poly ADP ribosyl transferase의 활성화를 통해 세포의 에너지 고갈과 세포사를 유도할 뿐만 아니라, 미토콘드리아의 전자전달과 호흡을 저해한다.¹⁸⁾ 즉, ONOO⁻는 미토콘드리아의 칼슘을 유출시켜 결국 이로 인해 세포사가 일어난다.¹⁹⁾ Salgo 등²⁰⁾은 쥐의 흉선에서 ONOO⁻가 tyrosine 잔기의 니트로화와 전자 인자의 산화를 야기시켜 결국 세포사를 유도한다고 보고하였다. 또한, ROS/RNS에 의해 유도된 산화적 스트레스에 의한 세포사에서 SOD나 catalase 등과 같은

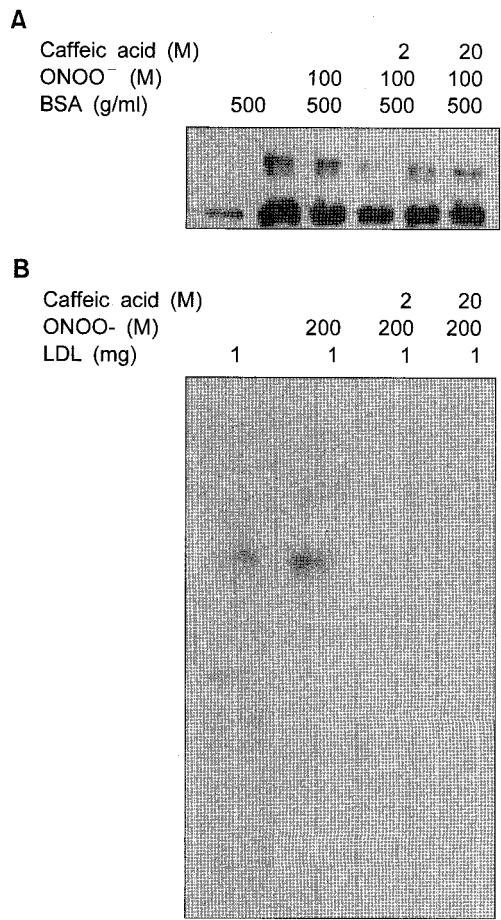


Fig. 2. Effect of caffeic acid on oxidation of BSA and LDL by ONOO⁻. Caffeic acid was added to BSA (A) or LDL (B). The reaction samples were incubated with shaking at 25°C for 1hr. After ONOO⁻ was added, all samples were further incubated with shaking at 25°C for 30 min.

항산화 효소의 gene을 발현시키므로서, apoptosis를 억제 할 수 있다고 보고한 바가 있다.²¹⁾

생체는 자연적으로 발생하는 ROS/RNS에 대하여 여러 가지 항산화 효소와 항산화 물질의 방어 체계를 가지고 있어 이러한 방어계를 통해 redox state 균형을 조절함으로써 생체 내 항상성을 유지한다. Caffeic acid는 이러한 생체 내 항산화계를 강화하는 작용을 통해 여러 가지 외인성 자극에 의해 발생한 산화적 스트레스를 저하시키는 것으로 사료된다. 또한 ROS를 소거함으로써 과도하게 생성된 ROS가 세포내 항산화 방어계의 기능저하를 막

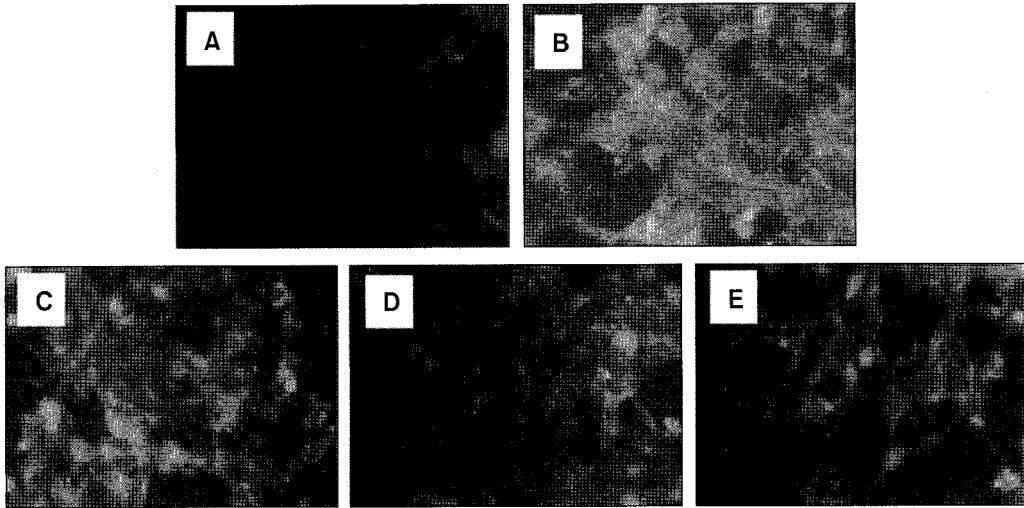


Fig. 3. Protective effect of caffeic acid on *t*-BHP-induced ONOO⁻ generation. The cells were incubated with 10 μM *t*-BHP for 3 hr after pre-treated for 30 min with caffeic acid. Intracellular ONOO⁻ levels were analyzed with confocal laser microscopy. A; control, B; 10 μM *t*-BHP, C; 10 μM *t*-BHP + 1 μM caffeic acid, D; 10 μM *t*-BHP + 2 μM caffeic acid, E; 10 μM *t*-BHP + 4 μM caffeic acid.

는 것 같다.

본 연구에서 caffeic acid가 LDL의 산화를 억제하였으며 albumin의 tyrosine nitration 또한 농도 의존적으로 현저히 억제하였다. 이러한 caffeic acid의 효과는 caffeic acid의 직접적인 nitration에 의해서가 아니라 electron donation에 의해 효과적으로 ONOO⁻를 제거함으로써 albumin의 nitration을 저해한 것으로 사료된다. 또한 이러한 활성은 OH group의 수에 따라 그 활성산소 제거능이 달라지며, 전이금속을 chelating하여 Fenton 반응에 의한 활성산소 형성을 지연할 수 있다.^{22,23)} 따라서, 본 연구에서 강한 활성을 나타낸 caffeic acid는 특히 OH group을 함유하고 있어 활성산소 및 활성질소를 효율적으로 소거할 것으로 사료된다.

노화나 노화관련 질병에서와 같이 ROS 과다 생성 환경에 놓이게 되면 ROS는 세포막을 구성하고 있는 지질을 과산화하여 *t*-BHP와 같은 지질과산화 산물을 생성한다. 따라서 *t*-BHP는 노화에 따라 증가하는 물질로 알려져 있다.²⁴⁾ 이러한 지질과산화 산물들은 세포 내 단백질의 cysteine, histidine, lysine 등에 결합하여²⁵⁾ 단백질 기능 손상을 가져오거나 세포내의 칼슘 농도의 변화,²⁶⁾ 신호전달 체계를 변화함으로써 결국 세포사를 일으키는 것으로

보고되어 있다.²⁷⁾ 따라서 지질과산화 산물인 *t*-BHP에 의한 ONOO⁻의 생성을 caffeic acid가 효과적으로 억제함으로써 이로 인한 심각한 세포손상과 이어지는 세포사를 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 사료되어진다.

이러한 결과를 종합하면, 노화 및 노인성 질환과 같이 염증반응과 산화스트레스 반응이 관련된 여러 가지 생체반응에는 caffeic acid가 매우 효과적으로 방어 작용을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 학술연구비에 의해 수행되었다.

참 고 문 헌

- 1) Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; 272: 7617-2625.
- 2) Espey MG, Miranda KM, Feelisch M, Fukuto J, Grisham MB, Vitek MP, Wink DA. Mechanisms of

- cell death governed by the balance between nitros active and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 209-221.
- 3) Corfran RS, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. W.B. Saunders, Philadelphia. 1989; pp 1-31.
 - 4) Oyanagui Y. SOD and active oxygen modulators. *Nihon Igakukan, Tokyo* 1989; pp 17-31.
 - 5) Vasquez-Vivar J. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9220-9225.
 - 6) Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 241-248.
 - 7) Maxwell SR. Coronary artery disease-free radical damage, antioxidant protection and the role of homocysteine. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 165-171.
 - 8) Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 242-259.
 - 9) Blanchard B, Servy C, Ducrocq C. Chemical evaluation of compounds as nitric oxide or peroxynitrite donors using the reactions with serotonin. *Free Radic Res* 2001; 34: 189-191.
 - 10) Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 591-603.
 - 11) Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scacci C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 541-552.
 - 12) Nardini M, Pisu P, Gentili V, Natella F, Di Felice M, Piccolella E, Scaccini C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 1098-1105.
 - 13) Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydro-rhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1997; 1: 145-157.
 - 14) Khan J, Brennand DM, Bradley N, Gao B, Bruckdorfer R, Jacobs M, Brennan DM. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method. *Biochem J* 1998; 330: 795-801.
 - 15) OxyBlotTM, Gaithersburg, MD, USA.
 - 16) Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydro-rhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 149-156.
 - 14) Brune B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 2003; 84: S22-S24.
 - 15) Jakus V. The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratisl Lek Listy* 2000; 101: 541-551.
 - 16) Tabner BJ, Turnbull S, El-Agnaf O, Allsop D. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr Top Med Che* 2001; 1: 507-517.
 - 17) Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 2001; 61: 3894-3901.
 - 18) Wang J, Green PS, Simpkins JW. Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2001; 77: 804-811.
 - 19) Lemasters JJ, Qian T, Trost LC, Herman B, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Nieminen AL. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic and apoptotic cell death. *Biochem Soc Symp* 1999; 66: 205-222.
 - 20) Salgo MG, Squadrito GL, Pryor WA. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res* 1995; 215: 1111-1118.
 - 21) Borg J, London J. Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro. *J Neurosci Res* 2002; 70: 180-189.
 - 22) Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS and No JK, Baek BS. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4484-4486.
 - 23) Pannala AS, Razaq R, Halliwell B, Singh S, Rice-Evans CA. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 594-606.
 - 24) Martin C, Martinez R, Navarro R, Ruiz-Sanz JI, Lacort M, Ruiz-Larrea MB. Tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 705-712.
 - 25) Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med* 1991; 11: 81-128.
 - 26) Kim JA, Kang YS, Kim YO, Lee SH, Lee YS. Role of Ca²⁺ influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced

- apoptosis of HepG₂ human hepatoblastoma cells. *Exp Mol Med* 1998; 30: 137-144.
- 27) Haidara K, Morel I, Abalea V, Gascon Barre M, Denizeau F. Mechanism of *tert*-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1542: 173-185.
-