약학회지 제35권 제3호 165~173(1991)
Yakhak Hoeji Vol. 35, No. 3

Flavonoids의 약리작용(IV)

— 백혈구유주, superoxide anion 및 과산화지질 생성 억제작용 —

김창종 · 정현삼 · 정진모
중앙대학교 약학대학

(Received March 9, 1991)

Pharmacological Activities of Flavonoids(IV)

— Inhibitory Actions of Leukocyte Migration, Superoxide Anion Production and Lipid Peroxidation —

Chang-Johng Kim, Hyun Sam Jung and Jin Mo Chung
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—Effects of eight flavonoids and their related compounds on leukocytes migration, superoxide anion production and lipid peroxidation in the phagocytosis of latex beads or *E. coli* by guinea pig peritoneal exudate cells were studied *in vitro*. It shows that most of flavonoids generally inhibited the leukocytes migration and production of superoxide anion and malonedialdehydes. Their inhibitory activities in the phagocytosis of latex beads had more active than that of *E. coli*. Quercetin has the most inhibitory activity in leukocytes migration and production of superoxide anion and lipid peroxides at the concentration of 1, 2 and 10 μM. Catechin and rutin at the concentration of 2 and 10 μM inhibited significantly the production of superoxide anion and lipid peroxides. Flavone, catechin, naringin and rutin at the concentration of 2 and 10 μM inhibited significantly the leukocytes migration.

Keywords □ Flavonoids, superoxide anion, lipid peroxidation, leukocytes migration, guinea pig peritoneal exudate cells, phagocytosis of latex beads or *E. coli*.

Rakieten 등[1]과 Srivastava 등[2]은 streptozotocin이 유리기(free radicals)를 형성하여 β-cell 막에서 과산화지질화가 일어나므로 당뇨병이 유발된다고 보고하였고, 또 여러 가지 화학물질들[3-5]에 의하여 유리기가 형성되어 질병이 유발된다는 소위 화학적 세포상해기전을 보고하였다. 또한 Rugh 등[6]은 방사선이나 자외선조사에 의하여 세포 구성성분이 유리기를 형성하므로 세포상해가 일어난다고 보고하였다. 이러한 유리기유발 세포상해는 여러 가지 병리기전[7-9]에도 관여된다고 보고되고 있고, 특히 노화현상[10]은 산화환원반응에서 생성되는 유리기에 의하여 세포막 인지질의 과산화 때문이라고 알려져 있지만, 인체에서는 superoxide dismutase(SOD),[11-15] catalase,[15] glutathione peroxidase[16] 등과 같은 효소와 ceruloplasmin 및 transferrin 같은 혈청단백,[16] SH기 함유아미노산[16] 등이 유리기 제거작용을 한다고 보고하였다. 또한 Umeo 등[17,18]은 식물의 엽록소에서 quercetin이 광과산화반응(photoperoxidation)을 억제한다고 보고하였다.

한편 Johnston 등[19]과 Babior 등[20]은 백혈구가 세균의 탐식과정에서 superoxide anion(O_2)이 생성되어 hydrogen peroxide(H_2O_2)로 전환되어 H_2O_2-myeloperoxidase-hilide system[20]이나 myeloperoxidase-independent killing system[21]을 통하여 살균작용을 갖는다고 보고하였으며, Busse 등[22]과 Pagonis 등[23]은 quercetin, morin, chalcone 등이 호중구의 supero-

xide anion 생성을 억제한다고 보고하였다. 또한 Hodnick 등[24]은 quercetin이 미토콘드리아에서 succinoxidase 활성과 유리기형성을 억제한다고 보고하였고, Fraga 등[25]은 eriodyctiol과 (+)catechin이 사염화탄소 유리기(CCl_3·)에 의한 지질과산화반응을 억제한다고 보고하였으며, Younes 등[26]은 quercetin이 glutathione 고갈에 의한 지질과산화반응을 억제한다고 보고하였다. 또 Lambev 등[27]은 naringin과 rutin이 항산화작용 및 histamine 유리억제작용이 있다고 보고하였다. 이와 같이 몇 가지 flavonoids가 유리기생성을 억제할 뿐만 아니라 Sandler 등[28]은 dimethylurea가 streptozotocin 유발당뇨를 억제하므로 유리기 제거작용(free radical scavenger action)을 한다고 보고하였으며, 또한 penicillamine,[16] flavins,[29] quinones,[29] Cu(II)-(3,5-diisopropyl salicylate)$_2$,[30] α-tocopherol,[31] acrolein,[32] croton aldehyde,[32] 항암제 및 인삼배당체[34] 등[33]도 유리기 제거작용이 있다고 보고되었다.

저자 등은 전보들[35-37]에서 여러 가지 flavonoids가 과민반응과 면역반응을 억제하며, 항염작용과 백혈구의 탐식작용을 촉진하지만 상처치유를 억제하므로 glucocorticoidal activity[38]가 있다고 보고하였다.

본보에서는 flavonoids의 항염작용기전을 규명하기 위하여 flavonoids 및 관련화합물들이 guinea pig 복강삼출 백혈구에 의한 대장균 및 latex beads 탐식 때 백혈구유주, superoxide 및 과산화지질 형성에 미치는 영향에 관하여 실험한 결과 flavonoids가 백혈구유주, 지질과산화 및 유리기생성을 억제한다는 지견을 얻었기에 이에 보고한다.

실험재료 및 방법

재료 및 시약—Prednisolone acetate는 Roussel Uclaf Co.에서 구입하여 사용하였으며, bovine, superoxide dismutase, flavonoids, cytochrome C, latex beads, 1,1,3,3-tetraethoxypropane 등은 Sigma Co.에서 구입하였고, 대장균(*E. coli* NIHJ)은 국제약품에서 구입하여 사용하였다.

실험동물—일정한 조건하에서 2주일간 사육한 체중 350±50g의 건강한 숫 Hartley quinea pig을 실험 전 24시간 동안 절식시킨 다음 사용하였다.

시료의 조제—Flavonoids는 dimethyl sulfoxide에 녹여 20 mM 용액을 조제하였고, superoxide dismutase와 prednisolone acetate는 증류수에 녹여 50 μM 및 20 mM 농도로 각각 조제하여 사용하였다.

복강삼출세포액 제조—일정한 조건에서 사육한 Hartley guinea pig을 급사시킨 다음 탈이온수로 조제한 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH 7.3) 30 m*l*을 복강주사하고 복부를 5분간 완만하게 맛사지한 다음 복강액을 채취하여 2,700 rpm으로 10분간 원심분리하여 침전된 복강세포를 HBSS로 2회 세척하였다. 이 액 소량을 스라이드그라스에 도말하여 May-Gründwald Giemsa 염색[38]한 결과 과립구, 단핵구, 임파구 및 거핵구가 각각 27, 3, 18 및 52%를 차지하였으며, trypan blue exclusion test[39]에서 95% 이상의 생존율을 보였다. 이 세척액을 과립구로서 1.2×10^6 cells/m*l*가 되게 HBSS로 희석하여 사용하였다.[41]

Latex beads 현탁액 조제—Latex beads(평균직경 1.1 μm) 일정량을 증류수에 현탁하여 hemocytometer를 이용하여 latex leads 입자수가 1.5×10^9개/m*l*이 되도록 희석하여 사용하였다.

대장균액 조제—대장균을 정상 Buion 배지 5 m*l*에 1백금이를 이식하여 37℃에서 2일간 배양한 후 2,700 rpm으로 원심분리하고 침전된 대장균을 HBSS로 2회 세척한 다음 혈구계산판에서 균수가 1.5×10^9 organisms/m*l*가 되게끔 HBSS로 희석하여 사용하였다.

백혈구유주 측정—Ketchel법[42]에 따라 다음과 같이 시험하였다. hematocrit 측정용 모세관에 혈액을 넣고 한쪽을 점토로 막고 1,600×G로 1분간 원심분리하여 상층으로부터 혈장, 백혈구 및 적혈구 3층으로 분리시킨 다음 혈장층 위에 약물과 대장균(1.2×10^9 organisms/m*l*)을 혼화한 혼액 10 μ*l*를 넣고 100배 현미경을 사용하여 백혈구층의 길이를 측정한 다음 37℃에서 4시간 동안 배양한 후 다시 백혈구층의 길이를 측정하고 그 차를 백혈구유주거리로 하였다.

백혈구의 탐식측정—미리 냉각시킨 시험관에 복강삼출세포액(1.2×10^6 cells/m*l*) 3 m*l*을 넣고 대장균액(10 organisms/m*l*) 25 μ*l* 또는 latex beads 현탁액(10 particles/m*l*) 25 μ*l*를 넣고, 또 여기에 cytochrome C (45 nm/m*l*) 25 μ*l*를 넣고 약물을 1, 2 및 10 μM 농도가 되도록 첨가한 후 희석하고 이중 1.5 m*l*는 0℃로 보관하고, 나머지 혼합액은 37℃에서 15분간 배양한 후 급히 빙냉시켜 반응을 종결시킨 다음 각각 4℃에서

Table I—Effect of flavonoids on the leukocytes chemotaxis against *E. coli.*

Drugs	Chemical name	Concentration (μM)	No. of experiments	Chemotaxis ($\times 10^{-2}$ mm/4 hrs.)[1]
Control		—	6	6.93± 0.72
Aglycones				
Flavones				
Flavone	2-Phenylchromone	1	6	5.83± 1.50
		2	6	4.22± 0.21*
		10	6	3.53± 1.13**
Apigenin	5,7,4′-Trihydroxyflavone	1	6	4.39± 0.83
		2	6	4.82± 0.35
		10	6	5.44± 0.23
Flavonols				
Quercetin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxyflavone	1	6	4.35± 0.24*
		2	6	4.03± 0.23*
		10	6	3.72± 0.23*
Flavanones				
Hesperetin	5,7,3′-Trihydroxy-4′-methoxyflavanone	1	6	5.65± 0.62
		2	6	5.04± 0.23
		10	6	4.53± 0.52*
Flavans				
Catechin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxyflavan	1	6	5.38± 0.62
		2	6	3.85± 0.62*
		10	6	3.63± 0.42*
Glycosides				
Flavonol glycosides				
Rutin	5,7,3′,4′-Tetrahydroxyflavone	1	6	5.83± 1.51
	-3-O-rhamnosylglycoside	2	6	4.33± 0.12*
		10	6	4.12± 0.31*
Flavanone glycosides				
Hesperidin	5,3′-Dihydroxy-4′-methoxyflavanone	1	6	4.63± 0.31
	-7-O-rhamnosylglycoside	2	6	4.85± 0.22
		10	6	4.63± 0.33
Naringin	5,4′-Dihydroxyflavanone	1	6	5.43± 0.25
	-7-O-rhamnosylglycoside	2	6	3.85± 0.72*
		10	6	3.52± 1.12*
Prednisolone acetate		1	6	3.53± 0.32**
		2	6	3.44± 0.31**
		10	6	2.83± 0.55**
Superoxide dismutase		33	6	4.73± 0.31

[1]The migration distance of leukocytes against *E. coli.* (1.2×10^9 organism/m*l*) by Ketchel method.[42] Significantly different from control (*$p<0.05$ and **$p<0.01$)

20분간 600×G로 원심분리하고 상등액을 취하여 superoxides 생성량을 측정하는데 사용하였다.[43,44] 대조약물로는 prednisolone acetate 1, 2 및 10 μM 농도와 SOD 33 μM 농도로 첨가하였다.

Superoxide anion 정량—Margoliash법[45]에 따라 다음과 같이 정량하였다. 백혈구와 latex beads 또는 대장균의 배양액중 상등액을 각각 취하여 증류수를 대조로 하여 파장 550 nm에서 Spectronic 20으로 흡광도를 측정하고 흡광도차(ferrocytochrome C-ferricytochrome C)를 구하여 표준곡선($\Delta E_m M=15.5$)[45]에

Table II—Effect of flavonoids on superoxide anion and lipid peroxide production in the phagocytosis of latex beads by guinea pig peritoneal exudate cells.

Drugs	Chemical name	Concentration[1] (μM)	No. of experiments	Superoxide anion: Cytochrome C reduction (nM/1.2×10⁶ cells/15 mins)	Lipid peroxide: Malonedialdehyde (nM/1.2×10⁶ cells/15 mins)
Control			6	2.46± 0.11[2]	14.92± 0.27
Aglycones					
Flavones					
Flavone	2-Phenylchromone	1	6	2.39± 0.06	14.82± 0.55
		2	6	2.33± 0.03	14.05± 0.63
		10	6	2.37± 0.01	18.02± 1.86
Apigenin	5,7,4′-Trihydroxyflavone	1	6	2.28± 0.11	18.36± 0.99
		2	6	2.28± 0.04	16.79± 0.96
		10	6	2.27± 0.04	16.23± 1.23
Flavonols					
Quercetin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxy-flavone	1	6	2.12± 0.16*	12.84± 0.16*
		2	6	2.03± 0.11*	12.65± 0.34*
		10	6	1.65± 0.02**	12.02± 0.65*
Flavanones					
Hesperetin	5,7,3′-Trihydroxy-4′-methoxyflavanone	1	6	2.41± 0.05	15.12± 0.63
		2	6	2.43± 0.11	14.68± 1.46
		10	6	2.37± 0.64	14.75± 1.23
Flavans					
Catechin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxyflavan	1	6	2.48± 0.11	13.47± 0.64
		2	6	2.43± 0.67	13.57± 0.35
		10	6	2.17± 0.02*	12.74± 0.62*
Glycosides					
Flavonol glycosides					
Rutin	5,7,3′,4′-Tetrahydroxy-flavone-3-O-rhamnosyl-glycoside	1	6	2.37± 0.13	13.71± 0.29
		2	6	2.25± 0.07	13.78± 0.26
		10	6	2.19± 0.04*	13.57± 0.21
Flavanone glycosides					
Hesperidin	5,3′-Dihydroxy-4′-methoxyflavanone-7-O-rhamnosylglycoside	1	6	2.34± 0.04	14.15± 1.01
		2	6	2.31± 0.09	14.34± 2.10
		10	6	2.45± 0.09	14.61± 0.37
Naringin	5,4′-Dihydroxyflavanone-7-O-rhamnosylglycoside	1	6	2.27± 0.04	15.07± 0.64
		2	6	2.21± 0.09	15.01± 3.97
		10	6	2.37± 0.13	15.48± 0.36
Prednisolone acetate		1	6	2.35± 0.07	13.59± 0.51
		2	6	2.33± 0.16	13.08± 0.66
		10	6	2.28± 0.27	13.13± 1.18
Superoxide dismutase		33	6	1.45± 0.03**	14.68± 0.67

[1]A reaction mixture containing 3 m*l* of peritoneal exudate cell suspension (1.2×10⁶ cell/m*l*), 25 μ*l* latex beads suspension (10 particles/cell) and 25 μ*l* cytochrome C (45 nM/m*l*) was incubated at 37℃ for 15 mins.
[2]Each value represents the mean± S.E. Significantly different from control (*$p<0.05$ and **$p<0.01$).

따라 환원된 cytochrome C 양을 구하여 이를 superoxide anion 생성량으로 하였다.

과산화지질 정량—Masugi법[46]에 따라 다음과 같이 정량하였다. 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 시료에 대한 malonedialdehyde(MDA) 양을 과산화지질의 생성량으로 하였다.

결과 및 고찰

백혈구유주 억제작용—Flavonoids는 일반적으로

Table III—Effect of flavonoids on superoxide anion and lipid peroxide production in the phagocytosis of *E. coli* by guinea pig peritoneal exudate cells.

Drugs	Chemical name	Concentration[1] (μM)	No. of experiments	Superoxide anion: Cytochrome C reduction (nM/1.2×10⁶ cells/15 mins)	Lipid peroxide: Malonedialdehyde (nM/1.2×10⁶ cells/15 mins)
Control			6	1.45± 0.36[2]	13.23± 0.45
Aglycones					
Flavones					
Flavone	2-Phenylchromone	1	6	1.52± 0.11	15.36± 0.68
		2	6	1.41± 0.07	14.54± 0.17
		10	6	1.40± 0.16	13.66± 0.25
Apigenin	5,7,4′-Trihydroxyflavone	1	6	1.43± 0.17	14.20± 0.26
		2	6	1.42± 0.09	13.81± 0.22
		10	6	1.26± 0.11	13.45± 0.37
Flavonols					
Quercetin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxy-flavone	1	6	1.13± 0.14*	11.14± 0.67*
		2	6	1.03± 0.13*	10.55± 0.22*
		10	6	0.87± 0.14**	8.80± 0.14**
Flavanones					
Hesperetin	5,7,3′-Trihydroxy-4′-methoxyflavanone	1	6	1.33± 0.29	13.81± 0.16
		2	6	1.32± 0.52	13.75± 0.07
		10	6	1.33± 0.29	11.92± 1.02
Flavans					
Catechin	3,5,7,3′,4′-Pentahydroxyflavan	1	6	1.77± 0.18	12.21± 0.17
		2	6	1.41± 0.25	11.15± 0.67*
		10	6	1.28± 0.17*	10.57± 0.21*
Glycosides					
Flavonol glycosides					
Rutin	5,7,3′,4′-Tetrahydroxy-flavone-3-O-rhamnosyl-glycoside	1	6	1.36± 0.20	11.87± 0.38
		2	6	1.34± 0.29	11.63± 0.30*
		10	6	1.24± 0.07*	10.85± 0.56*
Flavanone glycosides					
Hesperidin	5,3′-Dihydroxy-4′-methoxyflavanone-7-O-rhamnosylglycoside	1	6	1.41± 0.11	12.79± 0.30
		2	6	1.34± 0.07	12.81± 0.44
		10	6	1.32± 0.05	12.30± 0.53
Naringin	5,4′-Dihydroxyflavanone-7-O-rhamnosylglycoside	1	6	1.50± 0.13	14.58± 0.27
		2	6	1.44± 0.20	14.55± 1.03
		10	6	1.29± 0.02	14.03± 0.53
Prednisolone acetate		1	6	1.59± 0.15	13.28± 0.21
		2	6	1.44± 0.21	12.64± 0.30
		10	6	1.39± 0.05	12.32± 0.62
Superoxide dismutase		33	6	0.91± 0.02**	12.02± 0.77

[1]A reaction mixture containing 3 m*l* of peritoneal exudate cell suspension (1.2×10⁶ cell/m*l*), 25 μ*l* *E. coli* suspension (10 organisms/cell) and 25 μ*l* cytochrome C (45 nM/m*l*) was incubated at 37℃ for 15 mins.
[2]Each value represents the mean± S.E. Significantly different from control (*$p<0.05$ and **$p<0.01$).

대장균에 대한 백혈구유주를 억제하였다(Table I). quercetin 1, 2 및 10 μM에서 백혈구유주거리가 각각 4.35, 4.03 및 3.72×10^{-1} mm/4 hrs로서 대조군의 6.93 $\times10^{-1}$ mm/4 hrs에 비해 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다. 또한 flavone, catechin, naringin 및 rutin 2 및 10 μM에서도 대조군에 비하여 농도의존적으로 유의성있게 백혈구유주 억제작용이 있었다. 그러나 이들 flavonoids의 백혈구유주 억제력은 prednisolone acetate 1, 2 및 10 μM에서 백혈구유주거리가 각각 3.53, 3.44 및 2.83×10^{-1} mm/4 hrs보다 미약하였다.

Latex beads 탐식 때 superoxide anion 및 과산화지질 생성억제작용—Flavonoids가 latex beads 탐식 때 일반적으로 superoxide anion과 malonedialdehyde 생성을 억제시켰다(Table II). 특히 quercetin 1, 2 및 10 μM 농도에서 superoxide 생성량이 각각 2.12, 2.03 및 1.65×10^6 nM/1.2×10^6 cells/15 mins로서 대조군의 2.46 nM/1.2×10^6 cells/15 mins에 비해 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다. 또한 catechin과 rutin 10 μM 농도에서도 superoxide 생성량이 유의성있게 억제되었다. 그러나 prednisolone acetate에서 유의성있는 유리기 생성억제가 없었는데 이러한 결과는 Drath 등[47]이 주장한 것과 같이 면역억제가 superoxide anion 생성량과는 상관성이 없는 것으로 사려된다.

또한 과산화지질 생성에 있어서도 superoxide 생성억제와 같은 양상으로 flavonoids가 일반적으로 과산화지질 생성을 억제하였으며, quercetin은 농도의존적으로 유의성있는 억제작용이 있었다.

대장균 탐식 때 superoxide anion 및 과산화지질 생성억제작용—Flavonoids가 일반적으로 백혈구와 대장균 탐식 때도 superoxide anion 및 과산화지질 생성을 억제하였다(Table III). 특히 quercetin 1, 2 및 10 μM에서 superoxide anion 생성량이 각각 1.13, 1.03 및 0.87 nM/1.2×10^6 cells/15 mins로서 대조군의 1.45 nM/1.2×10^6 cells/15 mins에 비해 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다. 또한 catechin 및 rutin 10 μM에서도 superoxide anion 생성량이 각각 유의성있게 억제되었다.

한편 과산화지질 생성에 있어서도 quercetin 1, 2 및 10 μM에서 각각 11.14, 10.55 및 8.80 nM/1.2×10^6 cells/15 mins로서 대조군의 13.23 nM/1.2×10^6 cells/15 mins에 비해 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다. 또 catechin과 rutin 2 및 10 μM에서도 농도의존적인 억제작용이 있었다.

이상과 같은 결과에서 보듯이 대조군에서 superoxide anion 생성량이 latex beads 탐식 때는 2.46 nM/1.2×10^6 cells/15 mins이었으나 대장균 탐식 때는 1.45 nM/1.2×10^6 cells/15 mins로서 약 54% 정도 적게 생성되었다. 이러한 실험결과는 Hassan 등[48]이 주장한 것과 같이 대장균이 superoxide anion dismutase 생성을 조절하여 제거해주기 때문이라고 생각된다. 더우기 거의 모든 flavonoids에서도 latex beads 탐식 때보다 대장균 탐식 때 superoxide anion 및 과산화지질 생성이 더 억제되었다. 또 특히 quercetin이 superoxide 및 과산화지질 생성을 억제하는 것은 Afanasev 등[49]이 보고한 것처럼 quercetin과 rutin이 유리기와 chelate를 형성하여 유리기 제거작용이 있기 때문이라 사려된다.

한편 flavonoids 구조와 생리활성과의 상관성을 보면 C-ring의 3위탄소의 OH기에 당이 결합된 배당체인 rutin이 그의 비배당체인 quercetin에 비하여 생리활성이 감소하였는데 이러한 결과는 Kim 등[35] 및 Varma 등[50]의 보고와 일치하였다. 또한 B-ring의 OH기가 meta 위치에 존재하는 quercetin과 rutin, catechin 등에서 OH기가 존재하지 않는 flavone 및 apigenin 보다 생리활성이 강하였지만, 이 OH기에 methyl기가 결합된 hesperetin과 hesperidin은 생리활성이 미약하였다.

결 론

Flavonoids가 백혈구의 latex beads 또는 대장균 탐식 때 superoxide anion 및 과산화지질 생성과 백혈구유주에 미치는 영향을 *in vitro*에서 실험한 결과는 다음과 같다.

백혈구가 latex beads보다 대장균 탐식 때 superoxide anion 및 과산화지질이 더 적게 생성되었다. flavonoids는 일반적으로 백혈구유주, superoxide anion 및 과산화지질 생성을 억제하였는데, 특히 quercetin 1, 2 및 10 μM에서 농도의존적으로 유의성있게 억제되었으며, 또 catechin 및 rutin 2 및 10 μM에서 유리기 생성을 각각 억제하였으며, flavone, catechin, naringin 및 rutin 2 및 10 μM에서 각각 백혈구유주를 억제하였다.

문 헌

1) Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nakani, M.V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Reports* **29**, 91(1963).
2) Srivastava, L.M., Bora, P.S. and Bhatt, S.D.: Diabetogenic action of streptozotocin. *Trends Pharmacol.* **3**, 376(1982).
3) Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Biology of disease; Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**,

412(1982).

4) Plaa, G.L. and Witschi, H.: Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Am. Rev. Toxicol. Pharmacol.* **16**, 125(1976).

5) Recknagel, R.O. and Glende, E.A.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity; An example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263(1973).

6) Rugh, R.: Damage to cells by ionizing radiation. *Atompraxis* **14**, 13(1968).

7) Fantone, J.C. and Ward, P.A.: Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* **107**, 397(1982).

8) Badwey, J.A., Curnutte, J.T. and Karnovsky, M.L.: *cis*-Polyunsaturated fatty acids induced high levels of superoxide production by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **256**, 12640(1981).

9) Lewis, K.O. and Paton, C.: Could superoxide cause cirrhosis. *Lancet* **24**, 188(1982).

10) Toubald, R.D.: Studies on the chemical nature of lipofuscin(age pigment) isolated from normal human brain. *Lipids* **10**, 383(1975).

11) McCord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprine). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049(1969).

12) Baret, A., Jadot, G. and Michelson, A.M.: Pharmacokinetic and antiinflammatory properties in the rat of superoxide dismutase(CU SOD and Mn SOD) from various species. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2755(1984).

13) Nishida, T. and Nakagawa, S.: Supeoroxide dismutase activity in the diabetic rat retina. *Jpn. J. Ophthalmol.* **28**, 377(1984).

14) Marklund, S.L., Westman, N.G., Lundgren, E. and Roos, G.: Copper and Zinc-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Research* **42**, 1955 (1982).

15) Grankvist, K., Marklund, S., Shelin, J. and Taljedal, I.: Superoxide dismutase, catalase and scavenger of hydroxyl radical protector against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells *in vitro*. *Biochem. J.* **182**, 17(1979).

16) Cortran, R.S., Kumar, V. and Robbins, S.L.: Robbins pathologic basis of disease, 4th ed., W.B. Saunders Co., p12(1989).

17) Umeo, T.: Suppression of lipid peroxidation by quercetin and its glycosides in spinach chloroplasts. *Phytochem. Photobiol.* **38**, 363(1983).

18) Umeo, T.: Hydrogen peroxide-dependent oxidation of flavonols by infact spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **74**, 852(1984).

19) Johnston, R.B., Keele, B.B., Misra, H.P., Lehmeyer, J.E., Webb, L.S., Baehner, R.L. and Rajagopalan, K.V.: The role of superoxide anion generation in phagocytic biological activity; Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J. Clin. Invest.* **55**, 1357(1975).

20) Babior, B.M., Kipnes, R.S. and Curnutte, J.T.: Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741(1973).

21) Babior, B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* **298**, 659(1978).

22) Busse, W.W., Kopp, D.E. and Middleton, E.: Flavonoid modulation of human neutrophil function. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**, 801(1984).

23) Pagonis, C., Tauber, A.I., Pavlosky, N. and Simons, E.: Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 237(1986).

24) Hodnick, W.F., Kung, F.S., Roettger, W.L., Bohmont, C.W. and Pardini, R.S.: Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2345(1986).

25) Fraga, C.G., Martino, V., Ferraro, G.E., Coussio, J.D. and Boveris, A.: Flavonoids as antioxidants evaluated by *in vitro* and *in situ* liver chemiluminescence. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 717(1987).

26) Younes, M. and Siegers, C. P.: Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica* **43**, 240(1981).

27) Lambev, I., Belcheva, A. and Zhelyazkov, D.: Flavonoids with anti-oxidant action(naringin and rutin) and the release of mastocytic and nonmastocytic histamine. *Acta Physiol. et Pharmacol. Bulga-*

rica **6**, 70(1980).

28) Sandler, S. and Andersson, A.: The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethylurea on streptozotocin-induced diabetes in the mouse *in vivo* and *in vitro*. *Diabetologia* **22**, 374 (1982).

29) Misra, H.P. and Fridovich, I.: The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *J. Biol. Chem.* **247**, 188(1972).

30) Leuthauser, S.W.C., Oberley, L.W., Oberley, T.D., Sorensen, J.R.J. and Ramakrishna, K.: Antitumor effect of a copper cordination compound with superoxide dismutase-like activity. JNCI. **66**, 1077 (1981).

31) Shvedova, A.A., Sidorov, A.S., Novkov, K.N., Galushchenko, I.V. and Kagan, V.E.: Lipid peroxidation and electric activity of the retina. *Vision Research* **19**, 49(1979).

32) Witz, G. Lawrie, N.J., Amoruso, M.A. and Goldstein, B.D.: Inhibition by reactive aldehyde of superoxide anion radical production from stimulated polymorphonuclear leukocytes and pulmonary alveolar macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 721 (1987).

33) Georgleff, K.K.: Free radical inhibitory effect of some anti-cancer compounds. *Science* **173**, 537 (1971).

34) Kim, C.J. and Yu, J.S.: Effect of ginsenosides on the WBC chemotaxis, and the superoxide anion and lipid peroxide production in the phagocytosis by guinea pig peritoneal exudate cells or reticuloendothelial system. *Chung-Ang J. Pharm.* **2**, 58 (1988).

35) Kim, C.J. and Chung, J.M.: Pharmacological activities of flavonoids(I). Relationships of chemical structure of flavonoids and their inhibitory activity of hypersensitivities. *Yakhak Hoeji* **34**, 348(1990).

36) Kim, C.J. and Cho, S.G.: Pharmacological activities of flavonoids (III). Structure-activity relationships of flavonoids in immunosuppressions. *Achiv. Pharm. Res.* **14**, 250(1991).

37) Kim, C.J., Su, S.K., Joo, J.H. and Cho, S.K.: Pharmacological activities of flavonoids(II). Relationships of anti-inflammatory and anti-granulamatous actions. *Yakhak Hoeji* **34**, 407(1990).

38) Kim, C.J.: Relationships of chemical structure of flavonoids and glucocorticoidal activities: Inhibitory activity of hypersensitivities, inflammation and wound healing. Korean-Japan-China symposium on drug development from natural products. Korean Pharmacog. Symposium p.41-47(1991).

39) Cook, H.C.: *Manual of histological demonstration technigues.* Butterworth and Co. Ltd., p.185(1974).

40) Ramellini, G. and Meldolesi, J.: Liver protection by silymarin: *In vitro* effect of dissociated rat hepatocytes. *Arzneim. Forsch.* **26**, 69(1976).

41) Allen, R.C., Stjernholm, R.L. and Steele, R.H.: Evidence for the generation of an electronic excitation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **47**, 679(1972).

42) Ketchel, M.M. and Favour, C.B.: *J. Experimental Med.,* **101**, 647(1955); Ishikawa, H.: On the independence of increased vascular permeability and leukocyte migration in the exudate inflammation. *Yakugaku Zasshi* **90**, 1201(1970).

43) Oyanagui, Y.: Inhibition of superoxide anion production in non-stimulated guinea pig peritoneal exudate cells by anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 777(1978).

44) Curnutte, J.T. and Babior, B.M.: Biological defense mechanism. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes. *J. Clin. Invest.* **53**, 1662(1974).

45) Margoliash, E. and Frohwirt, N.: Spectrum of horse-heart cytochrome C. *Biochem. J.* **71**, 570(1959).

46) Masugi, F. and Nakamura, T.: Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecylsulfate and variation of the value affected by the vitamin E and drugs. *Vitamins* **51**, 21(1977).

47) Drath, D.B. and Kahan, B.D.: Phagocytic cell function in response to immunosuppressive therapy. *Arch. Surg.* **119**, 156(1984).

48) Hassan, H.M. and Fridovich, I.: Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*; glucose effect. *J. Bacteriol.* **132**, 505(1977).

49) Afanasev, I. B. and Dorozhko, A.I.: Chelating and

free radial scavengering mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1763(1989).

50) Varma, S.D.; Inhibition of aldose ruductase by flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.* **213**, 343(1986).