

Quinolinedione 유도체, OQ1 과 OQ21 에 의한 혈관 이완 억제에 Oxidative stress의 중요성

김세련 · 이주영 · 김화정* · 유충규* · 정진호#

서울대학교 약학대학, *이화여자대학교 약학대학

(Received July 23, 1999)

The Importance of Oxidative Stress in the Inhibition of Vasorelaxation Induced by Quinolinedione Derivatives, OQ1 and OQ21

Se-Ryun Kim, Joo-Young Lee, Hwa-Jung Kim*,
Chung-Kyu Ryu* and Jin-Ho Chung#

College of Pharmacy, Seoul National University

*College of Pharmacy, Ewha Womans University

Abstract — To reveal the inhibitory mechanism of NO-dependent vasorelaxation by quinone derivatives (OQ1 and OQ21), we have compared the generation of free radicals by oxidative stress and the formation of cellular adducts by arylation. First, we measured oxygen consumption by quinone derivatives as a marker of oxidative stress in order to investigate whether these quinone compounds could generate reactive oxygen species. Both OQ1 and OQ21 generated free radicals and OQ21 was more potent. These results suggested that free radicals be involved in the inhibition of vasorelaxation by quinones. Next, we measured the binding capacity of quinone derivatives with intracellular GSH and protein thiols (-SH) in order to investigate whether these quinones have arylation capacity. Compared to positive control groups (menadione), both OQ1 and OQ21 depleted intracellular GSH and protein thiols very slightly. These compounds have low toxicities in mammalian tissues. From these results, we concluded that the inhibition of vasorelaxation by quinone derivatives (OQ1, OQ21) may be caused by generation of free radicals.

Keywords □ OQ1, OQ21, oxidative stress, arylation, inhibition of vasorelaxation.

Quinone은 자연계에 널리 존재하는 물질로써 세포 내에서의 다양한 생리학적 역할이 보고되어 있다.^{1,2)} 혈소판에서의 항응집 작용, 항암 작용, 항염증 작용 등이 알려져 있다.^{3,4)} 이런 다양한 생리활성 때문에 quinone 류에 대한 작용 기전 연구가 활발히 되어져 왔다.

Quinone류의 작용기전으로는 크게 두가지가 제시되고 있는데 첫째는, oxidative stress(redox cycling) 활성화이다. Oxidative stress은 microsome, mito-

chondria, whole cell preparation 등의 biological system에서 NAD(P)H oxidation과 oxygen utilization 을 유발하는 능력을 일컫는다.⁵⁾ Quinone 류의 경우, 세포 내에 존재하는 여러 flavo효소들에 의해 one electron이 환원되어 semiquinone을 형성하며, 이 semiquinone이 주변의 산소와 반응하여 superoxide 등의 활성산소를 생성시키는데, 이러한 oxidative stress가 quinone 류의 작용기전으로 제시되고 있다.^{1,2)} 둘째는 arylation 능력이다. Quinone은 분자구조 내에 electrophilic한 위치를 가지고 있어 nucleophile 특히 thiol과 특이적으로 반응한다.^{6,7)} 즉 세포 내에 존재하는 glutathione(GSH) 등의 soluble thiol, protein

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7856 (팩스) 02-885-4157

thiol과 반응하여 quinone-glutathione conjugate와 quinone-thiol adduct를 형성한다. 이로 인해 세포 내의 thiol redox 상태를 변화시키고 thiol group이 그 activity에 중요한 효소의 기능을 변화시킴으로써 세포의 정상적인 기능을 억제한다. 예로써 Ca^{2+} -ATPase, nitric oxide synthase(NOS) 등이 있는데, NOS의 중요한 thiol기가 quinone에 의해 conjugation되면 지나친 혈관 이완이 억제된다.⁸⁾

Quinone류는 각 화합물에 따라 세포 작용기전이 다른데, benzoquinone과 같이 arylation 능력만 존재하는 경우,⁹⁾ 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone처럼 redox cycling(oxidative stress)만 존재하는 경우,¹⁰⁾ 그리고 menadione과 1,4-naphthoquinone처럼 arylation 능력과 redox cycling 능력을 모두 지닌 경우^{9,11)}로 분류할 수 있다.

최근 본 연구실에서는 합성된 quinone 계열인 quinolinedione 유도체가 LPS 처리에 의하여 유발된 혈관 이완에 대하여 억제 작용이 현저한 것을 관찰하였다. 따라서 합성된 유도체 중에서 가장 강력한 억제 작용을 갖은 OQ1과 OQ21을 대상으로 그 억제 작용 기전이 redox cycling(oxidative stress) 또는 arylation에 의한 것인지를 규명하고자 하였다.

실험 방법

시약 - Menadione, glutathione reduced form(GSH), glutathione reductase, glutathione oxidized form(GSSG), thrombin, trisodium citrate, pyruvic acid, dimethyl sulfoxide(DMSO), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), N-ethylmaleimide(NEM), triton X-100, NADPH, NADH와 buffer solution 조제시 사용한 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 60% perchloric acid(PCA)는 Junsei Chemical Co.(Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. OQ1과 OQ21은 5-amino-8-hydroxyquinoline sulfate로부터 Pratt 법¹²⁾에 의하여 합성하였다. 그 밖의 모든 시약은 모두 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 Platelet Rich Plasma(PRP)의 분리 - Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 서울대학교 동물 사육장으로부터 공급받아 4주 이상 물과 사료(삼양사, Korea)의 제한 없이 사육하여, 체중 220 ± 20 g 정도 되

는 것을 실험에 사용했다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12시간이 되도록 하였다.

흰쥐를 diethyl ether로 마취 후 개복하여 복대 동맥으로부터 채혈하였다. 이 때 3.8% trisodium citrate를 항응고제로 하여 혈액과 1:9의 비율이 되게 하였으며 18 guage 주사 바늘을 이용, 채혈시 용혈에 의한 활성화를 억제시켰다. 실험 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며, 혈소판 분리의 전 과정을 상온에서 수행하였다. 채혈액을 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻었으며 잔사를 계속하여 1,500 g에서 20분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. 이와 같이 얻은 PRP 중의 혈소판 수는 광학 현미경에서 hemacytometer를 사용하여 측정하였으며, PPP로 희석하여 3×10^8 혹은 1×10^9 cells/ml이 되도록 한 후 실험에 사용하였다.

산소 소모율의 측정 - Cell suspension의 산소 소모율을 O_2 -electrode가 연결된 biological oxygen monitor (YSI 5300, USA)를 이용하여 측정하였다. Cell suspension 1 ml을 sample chamber에 넣고 37°C에서 3분 동안 교반시킨 후 electrode를 꽂고 산소 소모량을 측정하였다. 기준선을 1분 동안 설정한 후 시험 시료를 가하고 산소 소모율 증가를 측정하였다. Superoxide dismutase와 catalase는 시험 시료를 가하기 전에 5분간 미리 incubation하였다.

Soluble thiol(GSH)의 측정 - Soluble thiol은 glutathione reductase를 이용한 enzymatic recycling assay방법으로 측정하였다.¹³⁾ Cell suspension과 quinones 혹은 DMSO를 incubation한 후에 cell suspension 1 ml를 취해서 10,000 g에서 20초간 원심분리하였다. Cell pellets과 상층액을 분리한 후 cell pellets에는 0.4 mM EDTA가 들어 있는 0.125 mM perchloric acid 0.6 ml를 가하여 단백질을 침전시켰다. 이것을 10,000 g에서 2분간 원심분리하여 상층용액을 취하였다. 이 용액에 0.3 M MOPS가 들어 있는 2 M KOH 용액으로 광량의 perchloric acid를 제거하고 pH를 7.0 부근으로 맞춘 후에 soluble thiol 측정시료로 사용하였다. Semimicro cuvette에 NADPH/buffer 용액 0.7 ml, DTNB 용액 0.1 ml, 시료 0.2 ml을 넣고 잘 혼합하고 30°C에서 4분간 안정화시켰다. 다음으로 50 units/ml의 glutathione reductase 용액 0.03 ml을 가하고 혼합한 후 즉시 412 nm에서 흡광도 변화를

측정하였다. Soluble thiol(GSH)의 양은 glutathione 표준액으로 산출하였다.

Protein thiol의 측정 - Protein thiol의 측정은 Di Monte의 방법을 변형하여 실험하였다.¹⁴⁾ Cell suspension을 quinones 혹은 DMSO와 incubation한 후에 cell suspension 1 ml를 취하여 10,000 g에서 20 초간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 cell pellets에 5% perchloric acid 500 μ l를 가한 후에 homogenation시켰다. 다시 5,000 g에서 1분간 원심분리하고 상층액은 버렸다. 5 mM EDTA와 1% sodium dodecyl sulfate가 포함된 0.5 M tris-HCl(pH 7.6) buffer 용액을 pellets에 가해서 현탁시킨 후에 측정 시료로 하였다. 시료를 900 μ l씩 나누어 한쪽에는 25 mM N-ethylmaleimide(NEM)를 가해 10분간 방치 하여 blank로 하였다. 양쪽 모두 최종 농도가 250 μ M이 되도록 dithiodinitrobenzoic acid(DTNB)를 가하고 20분간 방치 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. Thiol의 양은 glutathione(GSH) 표준액으로 산출하였다.

Platelet Aggregation 측정 - 혈소판의 cell aggregation 정도를 Lumi-aggregometer(Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화로써 측정하였다. Platelet rich plasma(PRP)의 light transmission을 0%, platelet poor plasma(PPP)의 light transmission을 100%로 맞춘 후 혈소판의 aggregation 정도에 따른 light transmission을 측정하였다. 이 때 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용했으며 1,100 rpm에서 지속적으로 교반시켰고, 1분간 preincubation하여 37°C가 되도록 한 후 시험 시료를 가하여 일정 시간 incubation한 후 응집 유발 시료를 가했다. Quinone 물질들의 vehicle로는 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 최종 농도 0.5%이하로 사용하여 혈소판의 light transmission에는 영향을 미치지 않도록 하였다.

Lactate Dehydrogenase(LDH) 유출 실험 - 혈소판으로부터의 lactate dehydrogenase(LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 이용하였다. Tris-EDTA-NADH buffer(56 mM Trizma base, 5.6 mM EDTA, pH 7.4)에 녹인 0.17 mM NADH 1.0 ml에 25 μ l의 quinones 또는 DMSO를 처리한 platelet rich plasma(PRP)의 원심분리한 상층액을 가한 후 37°C에서 10분 동안 incubation하였다. 여기에 37°C에서 미

리 incubation시켜 놓은 100 μ l의 14 mM pyruvate를 가하고 339 nm의 파장에서 흡광도 감소를 측정하였다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화 속도를 의미하며 이는 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도를 나타낸다. LDH의 총 활성도는 0.3% triton X-100으로 혈소판의 lysis를 유발하여 측정하였으며 이를 100% 활성도로 하여 계산하였다.

통계 - Soluble thiol(GSH) 양, LDH leakage 및 protein thiol 양 등의 꺾은 선 graph로 나타난 data는 각각의 점에 대하여 3회 이상 실험한 후, 그 값을 means \pm SEM으로 표시하였다. 산소 소모율과 platelet aggregation에 관한 data는 3회 이상 실험하여 동일한 경향이 나오는 것을 확인하고 그 중 대표적인 그림을 data로 하였다.

결 과

OQ1과 OQ21에 의한 Oxidative stress - 먼저 quinone계 물질의 기전 중 oxidative stress(redox cycling)을 연구하기 위하여 OQ1 및 OQ21 화합물에 의한 혈소판 세포내에서 oxygen consumption을 측정함으로써 활성산소 생성능의 지표로 간주하였다(Fig. 1). OQ1 및 OQ21은 활성산소(free radicals) 생성이 현저히 증가함을 발견하였으며 OQ21이 2배 정도 높은 것은 혈관이란 억제 활성과 유사하였다. 활성산소(free radical) 생성을 확인하고자 이를 제거하는

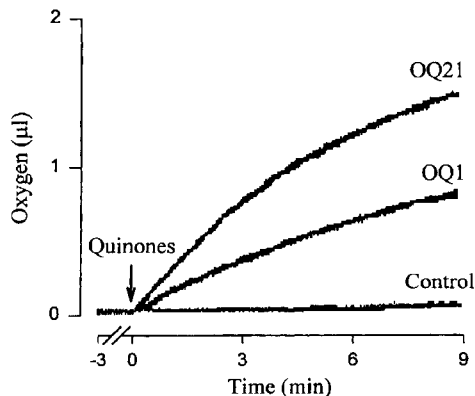


Fig. 1 - The effects of OQ1 and OQ21 on oxygen consumption rates. OQ1 and OQ21 (250 μ M) were incubated with cells at 37°C and oxygen consumption was measured polarographically using a water-jacked cell fitted with a Clarke oxygen electrode. This is one typical tracing of three individual experiments.

Table I – The effects of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on OQ1 and OQ21-induced oxygen consumption rates

Group	Oxygen Consumption (O ₂ μl/min)
OQ1	0.112 ± 0.007
OQ1+SOD+CAT	0.068 ± 0.005
OQ21	0.257 ± 0.019
OQ21+SOD+CAT	0.167 ± 0.021

Platelets were pretreated with 1000 units of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) 3 min prior to addition of 250 μM OQ1 and OQ21, respectively. Oxygen consumption was measured by a Clarke oxygen electrode. Data represent means ± SEM from three experiments.

enzymes인 superoxide dismutase(SOD) 및 catalase (CAT)를 가해 주었다. SOD와 CAT 각각 1000 units 씩 동시에 가하면 oxygen consumption이 유의적으로 억제되었고 이것으로 보아 quinone에 의해 free radical이 생성됨을 알 수 있었다(Table I).

OQ1과 OQ21에 의한 Arylation capacity – Quinone 화합물은 구조내의 electrophilic한 구조에 의해 세포내 glutathione 또는 protein thiol 등의 nucleophiles과 arylation된다. OQ1과 OQ21의 arylation 정도를 파악하기 위하여 세포내 GSH 및 protein thiol(-SH)과 결합력을 측정하였다(Fig. 2 & 3). OQ1 및 OQ21에 의한 총 GSH 감소는 30분간 OQ1은

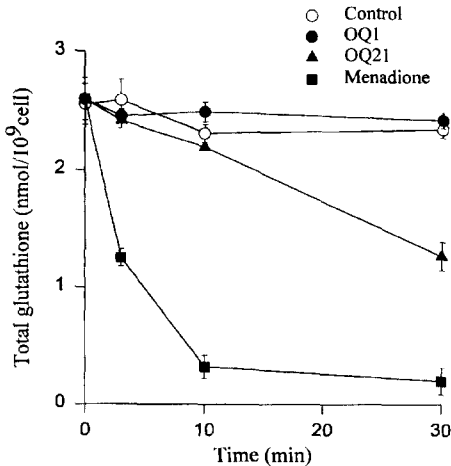


Fig. 2 – Effects of OQ1 and OQ21 on total glutathione (GSH) levels. Each cell suspension was incubated with 100 μM concentrations of OQ1, OQ21, and menadione. Total GSH levels were determined by the enzymatic recycling method. Data represent means ± SEM from three experiments.

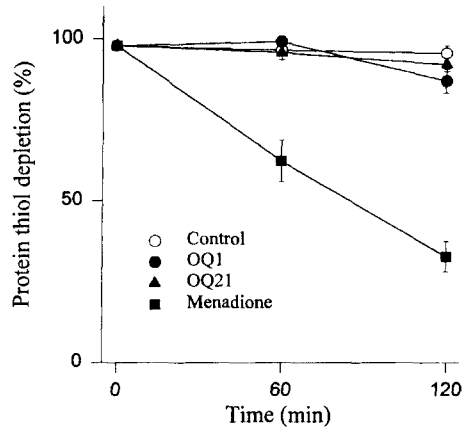


Fig. 3 – Effects of OQ1 and OQ21 on protein thiol levels. Each cell suspension was incubated with 250 μM concentrations of OQ1, OQ21, and menadione. Protein thiol concentrations were measured by a modified assay based on the colorimetric method. Data represent means ± SEM from three experiments.

control(DMSO)과 마찬가지로 전혀 고갈되지 않았으며, OQ21 경우에는 약 50%정도 감소하였으나, 이는 양성 대조군인 menadione(quinone)보다 현저히 적은 수준이었다. Protein thiols의 경우에는 OQ1 및 OQ21 모두 전혀 감소시키지 못하였다. 따라서 양성 대조군(menadione)과 비교하여 GSH 및 protein thiol(-SH) 고갈이 현저히 적음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 OQ1 및 OQ21에 의한 NO 의존성 혈관 이완 억제기전은 quinone 유도체에 의한 free radical 생성능과 상관성이 있음을 제시하고 있다.

OQ1과 OQ21의 세포기능에 미치는 영향 – OQ1 및 OQ21의 안전성 평가를 위한 예비실험으로써 *in vitro* 세포독성 시험을 수행하였다. 세포독성은 platelet-rich-plasma(PRP)에서 lactate dehydrogenase(LDH) 효소 유리로 연구하였다. OQ1 및 OQ21은 250 μM에서도 세포손상이 일어나지 않았으나 양성 대조 quinone인 menadione의 경우에는 세포독성이 현저함을 보였다 (Fig. 4). 또한 quinone(menadione)의 혈소판에서의 독성기전은 protein thiol의 감소라는 보고¹⁵⁾에 근거하여, 세포독성이 유발되는 시간까지 protein thiol 감소를 관찰한 결과(Fig. 3), OQ1과 OQ21 모두 대조군 수준이었다. 한편 quinone 물질이 혈소판에 세포독성을 유발함으로써 세포기능(혈소판 응집)을 억제함이 알려져 있으므로, OQ1과 OQ21의 혈소판 기능(혈소판 응집)에 대한 영향을 알아보았다(Fig. 5). 양성 대조군

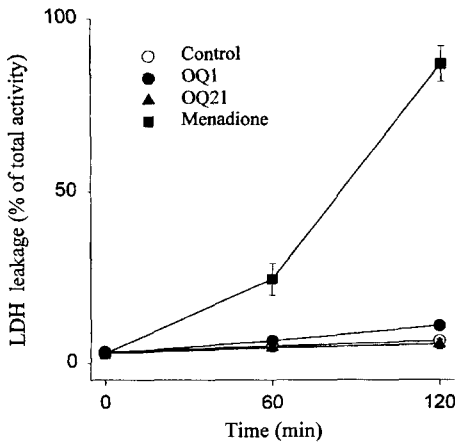


Fig. 4—Effects of OQ1 and OQ21 on lactate dehydrogenase (LDH) release. Each cell suspension was incubated with 250 μ M concentrations of OQ1, OQ21, and menadione and then release of LDH was determined. Data represent means \pm SEM from three experiments.

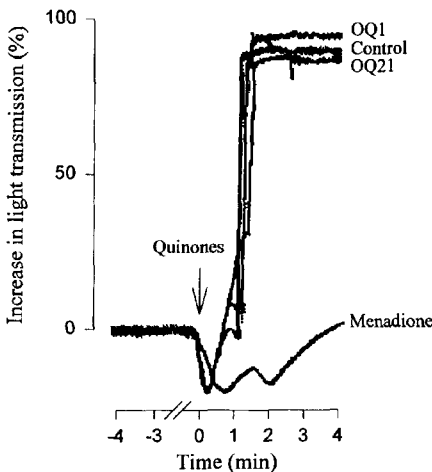


Fig. 5—Effects of OQ1 and OQ21 on platelet aggregation. Platelet rich plasma (PRP) was prepared and incubated with 250 μ M concentrations of OQ1, OQ21, and menadione in a platelet aggregometer. The X-axis represents the time of incubation and the Y-axis represents the percentage change in turbidity. This is one typical tracing of three individual experiments.

인 menadione이 혈소판 응집을 완전히 억제하는데 반해, 같은 농도에서 OQ1과 OQ21은 아무런 영향이 없었다.

이상의 결과로부터 OQ1 및 OQ21은 free radical

생성에 의하여 NO의존성 혈관이완을 현저히 억제시킬 가능성을 제시하고 있으며 세포독성은 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 quinone계 유도체인 OQ1과 OQ21의 혈관이완 억제 기전을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 내렸다. 첫째, OQ1과 OQ21의 작용기전은 free radical 생성에 따른 oxidative stress에 의한 것이며 둘째, glutathione(GSH)이나 protein thiol 감소에는 영향을 미치지 않았으므로 arylation과는 관련이 없다. 셋째, 혈소판에의 기능 및 독성을 살펴 본 결과, 혈소판 고유 기능인 응집 반응과 독성에도 아무런 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, OQ1과 OQ21에 의한 혈관 생리의 변화는 oxidative stress에 의하여 유발되며 이는 화학물질 독성과는 관계가 없을 수 있다.

Quinone계 화합물의 기전 연구는 분리 간세포에서 광범위하게 수행되었으며 그 작용 기전으로서 세포내 nucleophile에의 arylation과 redox cycling을 경유한 oxidative stress가 주된 기전으로 제시되어 왔다. 일반적으로 quinone계 화합물들은 arylation 능력만을 가진 benzoquinone류, oxidative stress 능력만을 가진 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone류, arylation 능력과 oxidative stress 능력을 모두 지닌 menadione과 1,4-naphthoquinone류로 분류된다.⁹⁻¹¹⁾ 따라서 OQ1과 OQ21이 어떠한 기전을 경유하는지 알아보기 위해 oxidative stress 지표인 산소 소모량을 측정하였고 (Fig. 1), 세포내의 glutathione(GSH)와 protein thiol (PSH) 등이 quinone 류와 conjugation됨으로써 감소되는 것을 arylation 지표로 삼아 측정하였다(Fig. 2 & 3). 결과적으로 OQ1과 OQ21은 arylation과는 관계가 없이 오직 redox cycling(oxidative stress) 능력만을 가짐을 확인하였다. 혈관 기능에 있어서의 free radicals(superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등)의 역할은 많이 보고되어 있다.

특히 superoxide anion의 경우 endothelium-derived contracting factor(EDCF)라는 보고¹⁶⁾와 그 혈관 수축 기전이 endothelium-derived releasing factor(EDRF)인 nitric oxide(NO)를 scavenging하기 때문이라는 보고¹⁷⁾ 등이 있다. Hydroxyl radical의 경우에는

guanylate cyclase를 불활성화시킴으로써 혈관이완을 억제한다는 보고¹⁸⁾가 있다. Table I에서 superoxide dismutase와 catalase를 가했을 때, 산소 소모량이 감소되는 것으로 보아 OQ1과 OQ21의 혈관이완을 억제하는 기전에 free radicals 생성과 관계가 있음을 확인하였다.

한편 quinone계 화합물의 독성에 대한 연구 또한 많이 되어 있다. Oxidative stress가 과도하게 일어나거나, 세포 방어제인 PSH나 GSH이 quinones에 의한 arylation으로 심하게 감소될 경우에 세포독성이 유발된다.^{2,14)} 이에, OQ1과 OQ21의 세포독성 및 세포 기능 손상을 알아보기 위하여 mammalian 세포인 plasma-rich-platelet(PRP)에서 lactate dehydrogenase(LDH) 유리(Fig. 4)와 혈소판 응집(Fig. 5)을 측정하였다. 양성 대조군인 menadione이 60분부터 LDH를 유리시킴에 반해 OQ1과 OQ21은 control과 마찬가지로 LDH가 전혀 유리되지 않았다. 또한 혈소판의 고유기능인 응집 반응에서도 menadione이 혈소판 응집을 완전히 억제한 것과는 다르게 OQ1과 OQ21은 정상적인 응집을 유도하였다.

본 연구는 quinone계 화합물인 OQ1과 OQ21의 혈관이완 억제 기전이 free radical 생성에 의한 가능성을 제시하고 있으며, 세포독성이 거의 없음을 확인하였다. 따라서 OQ1과 OQ21은 LPS 처리에 의한 과도한 혈관 이완을 억제시킴으로써 새로운 패혈증 치료제로서의 개발가능성을 제시하고 있다.

결 론

Quinone 유도체(OQ1 및 OQ21)의 NO 의존성 혈관이완 억제기전을 규명하기 위하여 quinone의 작용기전인 활성산소(free radical) 생성능 및 생체 효소와 같은 고분자와 arylation 형성능을 비교 연구 하였다. Quinone 화합물에 의한 활성산소 생성능을 연구하기 위하여 quinone 화합물에 의한 oxygen consumption을 측정함으로써 free radical의 지표로 삼고자 하였다. OQ1 및 OQ21은 free radical 생성이 현저히 증가함을 발견하였으며 OQ21이 2배 정도 높은 것은 혈관이완 억제 활성과 관련이 있음을 암시하고 있다. 이때 SOD 및 catalase을 가하면 oxygen consumption이 현저히 억제되는 것으로 보아 quinone에 의한 free radical 생성을 알 수 있었다. 다음으로 quinone 화합

물에 의한 arylation 정도를 파악하기 위하여 세포내 GSH 및 protein thiol(-SH)과 결합력을 측정 하였다. 양성 대조군(menadione)과 비교하여 GSH 및 protein thiol(-SH) 고갈이 현저히 적음을 확인하였다. 반면에 세포독성을 보면 250 μM에서도 세포 손상이 일어나지 않았다. 이상의 결과로부터 OQ1 및 OQ21에 의한 NO 의존성 혈관이완 억제기전은 quinone 유도체에 의한 free radical 생성능과 상관성~) 있음을 제시하고 있으며 세포독성이 관찰되지 않았으므로 LPS 처리에 의한 과도한 혈관 이완 작용을 감소시키는 패혈증 치료제로 개발 가능성을 보여주고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 1998년도 보건 의료기술연구개발사업 연구비에 의하여 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

문 헌

- 1) Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S. A. and Orrenius, S.: The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12419 (1982).
- 2) Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. and Graham, D. G.: Contemporary issues in toxicology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **112**, 2 (1992).
- 3) Ko, F. N., Sheu, S. J., Liu, Y. M., Huang, T. F. and Teng, C. M.: Inhibition of rabbit platelet aggregation by 1,4-naphthoquinone. *Thromb. Res.* **57**, 453 (1990).
- 4) Mandel, H. G. and Cohn, V. H.: *Vitamin K, in Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.* ed. A.G. Gilman Goodman, L. S. and Gilman, A., Macmillian Publishing Co., Inc., New York, p. 1592 (1980).
- 5) Orrenius, S.: Oxidative stress studied in intact mammalian cells. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B* **311**, 673 (1985).
- 6) Wilson, I., Wardman, P., Lin, T. S. and Sartorelli, A. C.: Reactivity of thiols towards derivatives of 2- and 6-methyl-1,4-naphthoquinone bioreductive alkylating agent. *Chem. Biol. Interact.*, **61**, 229 (1987).
- 7) Ross, D., Thor, H., Orrenius, S. and Moldeus, P.:

- Interaction of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione. *Chem. Biol. Interact.* **55**, 177 (1985).
- 8) Nicotera, P., Rundgren, M., Porubek, D. J., Cotgreave, I., Moldeus, P., Orrenius, S. and Nelson, S. D.: On the role of Ca^{2+} in the toxicity of alkylating and oxidizing quinone imines in isolated hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 46 (1989).
 - 9) Gant, T. W., Ramakrishna Rao, D. N., Mason, R. P. and Cohen, G. M.: Redox cycling and sulphhydryl arylation: Their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **65**, 157 (1988).
 - 10) Miller, M.G., Rodgers, A. and Cohen, G. M.: Mechanisms of toxicity of naphthoquinones to isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1177 (1986).
 - 11) Seung, S. A., Lee, J. Y., Lee, M. Y., Park, J. S. and Chung, J. H.: The relative importance of oxidative stress versus arylation in the mechanism of quinone-induced cytotoxicity to platelets. *Chem. Biol. Interact.* **113**, 133 (1998).
 - 12) Pratt, Y. T. and Drake, N. L.: Synthesis of 6,7-dichloro-quinoline-5,8-quinone. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1155 (1960).
 - 13) Griffith, O. W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
 - 14) Di Monte, D., Ross, D., Bellomo, G., Eklow, L. and Orrenius, S.: Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **235**, 334 (1984).
 - 15) Cho, Y. S., Kim, M. J., Lee, J. Y. and Chung, J. H.: The role of thiols in protecting against simultaneous toxicity of menadione to platelet plasma and intracellular membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 1335 (1997).
 - 16) Katusic, Z. S. and Vanhoutte, P. M.: Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am. J. Physiol.* **257**, H33 (1989).
 - 17) Ruanyi, G. M. and Vanhoutte, P. M.: Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* **250**, H822 (1986).
 - 18) Kontos, H. A. and Wei, E. P.: Hydroxyl radical dependent inactivation of guanylate cyclase in cerebral arterioles by methylene blue and by LY83583. *Stroke* **24**, 427 (1993).