

HepG2 cell에서 quercetin의 HO-1 발현을 통한 mitochondria의 생합성 유도 효과에 관한 연구

강재구¹, 장상철¹, 이기승², 김진희¹, 정명수²

¹원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, ²원광대학교 한의과대학 예방의학교실

Quercetin Induces Mitochondrial Biogenesis via HO-1 Expression in HepG2 Cell

Jaekoo Kang¹, Sang Chul Jang¹, Ki Seung Lee², Jin Hee Kim¹,
Myong Soo Chong²

Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, 2Dept. of
Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University

ABSTRACTS

Flavonoids show diverse bioactivities, such as anti-oxidant, anti-cancer, anti-allergic, anti-inflammatory, and anti-viral. Quercetin is one of the flavonoids present in a wide range of plants, especially onions and consumed all over the world. Recently, it is known that quercetin induces mitochondrial biogenesis in vivo and in vitro. However, detail mechanism of these actions remains unknown. We investigated quercetin's effects on mitochondrial biogenesis in HepG2 cells, and determined the mechanisms involved. We found that quercetin treatment induced the expression of mitochondrial biogenesis activators, PGC-1 α , NRF-1, TFAM, and mitochondrial proteins, cytochrome c and complex IV (COXIV). Moreover, amount of mitochondrial DNA was also increased by quercetin. Quercetin has been known to induce heme oxygenase (HO)-1 in several types of cells. Here, we found quercetin induces HO-1, and inhibition of HO-1 or CO, which is product of HO-1, decreased quercetin-induced mitochondrial biogenesis such as induction of PGC-1 α , NRF-1, TFAM, cytochrome c, COXIV, and mitochondrial DNA. These findings imply that quercetin can increase mitochondrial biogenesis via HO-1/CO system. High glucose results in dysfunction of mitochondria biogenesis. In the present study, 25 mM glucose decreased mitochondrial biogenesis and this damage was restored by quercetin. Conversely, inhibition of HO-1 or CO inhibited quercetin-induced mitochondrial biogenesis rescue. These results suggest that quercetin enhances mitochondrial biogenesis via HO-1/CO system and hence, can rescue mitochondria from damage by high glucose.

Key words : mitochondrial biogenesis, Heme oxygenase-1, quercetin.

I. 서론

Quercetin은 양파, 레드와인, 녹차, 여러 종류의 과일에 흔히 존재하는 flavonoids로¹⁾, 항염증반응, 항산화작용, 항암작용, 항바이러스 뿐 만 아니라 mitochondria 합성과 같은 수많은 생물학적 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 생체실험에서 quercetin은 mitochondria의 생합성을 증가시키고, SIRT 1 단백질 활성화를 유도하여 뇌와 근육의 운동내성증가⁴⁾, 신장근세관에서 mitochondria 합성 유도⁵⁾ 등의 보고가 있으며, 또한 quercetin은 HO-1유도를 통하여 쥐 신경교종 세포의 세포사멸 억제⁶⁾, 흡연에 노출된 조골세포의 기능 보호⁷⁾, Nrf2-HO-1신호전달 경로 활성화 유도를 통한 항알레르기 작용⁸⁾, 호흡기 질병에서 섬유아세포의 콜라겐 합성 억제⁹⁾ 등의 보고가 있다.

이러한 작용 외에도 quercetin은 mitochondria 합성에 중요한 역할을 하고 있다. Mitochondria는 세포 호흡에 관여함으로써 많은 세포들에 에너지를 제공하고 세포의 대사 작용¹⁰⁾을 조절한다고 알려졌다. Mitochondria의 기능은 다양한 인체의 병리적 측면과 연계된다. 이러한 병리적 반응은 대사 작용에 관여하는 뇌, 심장, 간, 근육과 같은 많은 장기에서 나타난다^{11,12)}. 그러므로 mitochondria의 기능과 양을 보호하는 것은 다양한 만성 질환의 예방과 치료에도 적용할 수 있을 것이다^{4,12-14)}.

이에 저자는 간암세포에서 quercetin의 HO-1 발현을 통한 mitochondria의 생합성 유도 효과에 관한 연구로 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Quercetin과 Hemoglobin은 Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO)를 구입하여 사용하였고, Tin protoporphyrin-IX는 Porphyrin Products Inc. (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 항 NRF-1, cytochrome c, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품이고, 항 cyclooxygenase (COX) IV, PGC-1 α 항체는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA) 제품을 사용하였다. 항 HO-1 항체는 Stressgen (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입했고 그 외 다른 화합물은 Sigma-Aldrich 제품이다.

2. 연구방법

Mitochondria 생체내 합성은 mitochondria DNA의 long and short reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, 역전사 중합효소연쇄반응)에 의해 실험되었다. Heme Oxygenase-1 (HO-1) 유전자의 유도는 단백질과 mRNA를 western blotting과 reverse transcription polymerase chain reaction을 통해 발현하는 방법으로 분석하였다.

1) 세포배양

인간의 간암 세포주인 HepG2 세포는 5.6 mM에서 배양되었고, 다른 HepG2 세포는 25 mM glucose가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양되었다.

HepG2를 10% fetal bovine serum (FBS) 과 100 U/ml penicillin 과 100 mg/ml streptomycin (Gibco, NY)이 첨가된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다.

2) 역전사 (Reverse transcription polymerase chain reaction); RT-PCR

HepG2의 RNA는 Trizol reagent

(Invitrogen, CA)로 분리되었다. 전체 2 µg의 RNA가 oligo-dT primers (QIAGEN, CA)와 M-MLV reverse transcriptase (Promega, WI)를 이용하여 RT-PCR에 사용되었다. PCR은 다음의 primer HO-1(정방향, 5'-GGAACCTTTCAGAAGGGCCAG-3'; 역방향, 5'-GTCCTTGGTG TCATGGGTCA-3'), N R F - 1 (정 방 향 , 5'-CCAGTGGCCACACAGAACTC-3'; 역방향, 5'-CTTCCTTTCCTTCCACTGC-3'), PGC-1α (정방향, 5'-GGAAGTGCAGGCCTAACTCC-3'; 역방향, 5'-CACTGTCCCTCAGTTCACCG-3'), T-fam (정방향, 5'-ATGCTTATAGGGCGGAGTGG-3'; reverse, 5'-TGGTTTTCCTGTGCCTATCCA-3'), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (정방향 5'-CCACCCATGCAAATTCATGGCA-3'; 역방향, 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'). PCR 생성물은 1.5% agarose gel electrophoresis 되고, ethidium bromide로 가시화되었다. GAPDH cDNA가 내부 대조군으로 이용되었다.

3) 단백질 gel blot 분석

세포는 Halt™ Protease and Phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific, IL)을 포함한 용해용액 (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1% Triton X-100)에 모아 사용하였다. 같은 양의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동되었고, Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA) 에 이동되었다. Membrane은 5% 저지방 우유로 보호되었다, 실험에 사용된 해당 항체인 anti-HO-1(Enzo Life Sciences, NY), anti-COX IV (cell signaling, DE), anti-cytochrome c (BDBiosciences), anti-actin (Santa Cruz Biotechnology, CA)항체들로 배

양하였다. 이 신호들은 ECL detection system (GE health care Bio-Sciences Corp, NJ)으로 측정되었다.

4) 미토콘드리아 DNA 동정 및 정량적 실시간 PCR 분석

전체 DNA (mitochondria, 핵 DNA 포함)는 혈액과 세포배양 DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)으로 분리하였다. mitochondria DNA는 SYBR green quantitative PCR (qPCR)로 측정되었다. DNA primer는 Complex II (succinate - ubiquinone oxidoreductase) (Human Complex II: 5'-CAAACCTACGCCAAAATCCA-3' and 5'-GAAATGAATGAGCCTACAGA-3')를 측정하기 위해 사용하였고, 측정은 step one plus system을 이용하였다.

5) 통계분석

다중 평균수치가 Graph Pad Prism 편차를 이용해 분석되었다. 수치는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, T-test로 비교하였다. P<0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 시간과 농도에 따른 mitochondria 발현 증가

Mitochondria는 이중 지질의 막과 그 속의 바탕질(matrix) 등으로 구성되어 있으며 고유의 유전체를 갖고 있다. Mitochondria는 세포의 종류에 따라 작은 공(sphere) 모양이나 짧은 막대(rod) 모양에서부터 긴 관(tubule) 모양까지 그 형태는 매우 다양하다¹⁰⁾. Mitochondria는 microtubules과 microfilaments를 따라 끊임없이 움직이며, 융합과 분열을 통해 자신의 수와 형태를 조절한다.

Mitochondria의 형태(morphology)는 세포 내 에너지 생산 외에도 증식, 분화, 사멸, 노화, 발생, 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 대사 등의 다양한 세포기능과 밀접한 관계가 있다는 사실이 차츰 밝혀지고 있다(15,16). ROS는 mitochondria에 의하여 생성되며, 생성된 활성산소는 mitochondria를 손상 시킴으로써 세포의 산화적 손상을 일으킨다(17).

Mitochondria 합성의 연구는 PGC1, NRF1, TFAM과 같은 mitochondria 합성에 관련된 유전자와 cytochrome c (Cyt C) 와 complex IV (COX IV), 즉 mitochondria의 단백질 양을 측정으로 함으로써 그 결과를 얻을 수 있다.

PGC-1 α 는 mitochondria 생성을 조절하는 전자 네트워크를 활성화 시키는데 조절자 역할을 한다. PGC-1 α 는 mitochondria DNA중복과 산화, 인산화에 관련된 유전자들의 발현을 활성화시키는데 중요하다(18,19). 전자 조절자인 NRF-1와 NRF-2는 PGC-1 α 에 의해 활성화 되고, mitochondria의 전자 중복 혹은 mitochondria 호흡 반응에 중요한 단백질을 코딩하고 있다. PGC-1 α 와 NRFs는 mitochondria DNA 복제수의 유지와 조절에 관련한 mitochondria 단백질인 TFAM를 코딩하는 다양한 핵 유전자들의 발현을 동시 활성화한다.

이에 간암세포(HepG2)에서 quercetin의 HO-1 발현을 통한 mitochondria의 생합성 유도 효과에 관하여 실험하였다. 우선 quercetin이 HepG2 세포의 기본 요소를 통하여 mitochondria 생성을 유도하는지 확인했다. Quercetin은 mitochondria 생성 활성 요소인 PGC-1 α , NRF-1, TFAM의 전사(20)와 mitochondria 유전자 복제수를 증가시키는 mitochondria 단백질인 cytochrome C, COX IV의 발현을 증가시킴을 보였다(Fig. 1-2). Quercetin(10 μ M)을 HepG2에 처리하면 3시간 후부터 PGC-1 α , NRF-1, TFAM의 mRNA 발

현이 증가하여 12-24시간 동안 유의하게 증가하였으며(Fig. 1A), Quercetin을 HepG2에 농도별로 3시간동안 처리하면 농도 증가에 비례함을 확인했다(Fig. 1B).

또한 mitochondria 호흡 체인 요소인 cytochrome C와 COX IV의 단백질 발현을 실험하였다. Mitochondria 호흡 체인은 complex I, II, III, and IV라고 부르는 네 개의 막-결합 복합체를 포함한다. ATP를 합성하기 위해서는 전자가 NADH 혹은 FADH₂에 결합하여 네 복합체와 cytochrome C에 전이된다. Cytochrome C는 COX IV와 관련되어 있어서 HepG2의 세포에 quercetin을 처리하면 cytochrome C와 COX IV의 양이 농도, 시간에 비례하여 증가되었다 (Fig. 2A and B).

그리고 quercetin과 mtDNA 양의 증가여부를 확인하였다. Quercetin 10 μ M을 시간에 따라 처리했을 때 3시간에서 mtDNA가 증가했으며(Figure 3A), 농도별로 quercetin을 3시간 처리하였을 때 mtDNA 복제수는 5 μ M에서 증가하기 시작하였고, 15 μ M에서 가장 많이 증가하였다(Figure 3B).

2. Quercetin 처리 시간 및 농도에 따른 HO-1 mRNA, HO-1 단백질 발현 증가

Heme oxygenase (HO) -1은 cytokines, mitogens, nitric oxide (NO)와 같은 다양한 유도물질에 반응하여 합성이 유도되는 효소로 heme을 분해한다(21-23). HO-1은 heme을 분해하여 일산화탄소, 철 그리고 biliverdin을 생성한다(21). 이렇게 생성된 물질들은 항산화작용, 항염증반응, 그리고 항세포 사멸작용과 같은 중요한 생리적 기능들이 있다(23,24). 특히 일산화탄소(CO)는 신호 전달물질로서 mitochondria 합성을 유도하는 기능을 가진다(24). CO는 cytochrome c oxidase (COX)에 결합하여 mitochondria합성을 유도하고, mitochondria가 발생한 ROS를 억제시켜 결과적으로 mitochondria 합성에 관련된

전사 유전자들을 활성화시킨다(24-27). HO-1/CO가 mitochondria 합성을 자극한다는 여러 보고가 있는데, 그 중 HO-1/CO의 증가가 mitochondria 합성을 유지시킴으로써 치명적인 *S. aureus* sepsis로부터 쥐를 살려낸 보고가 있으며(28), 또한 HO-1/CO가 mitochondria 합성을 유도함으로써 심장근세포의 세포사멸을 막고(25), 세포 생존을 증가시킨다(29).

Quercetin 처리시간에 따른 HO-1 mRNA 단백질 발현량 증가를 살펴본 결과 항염증 인자로 알려진 HO-1 mRNA는 10 μ M, 3시간에서 발현이 증가하였으며(Figure 4A), HO-1 단백질 또한 quercetin 10 μ M, 3시간에서 가장 많은 단백질 발현 증가가 있었다(Figure 4B)

Quercetin 처리농도에 따른 HO-1 mRNA와 단백질의 발현 변화를 살펴보기 위하여 10 μ M의 quercetin을 3시간 처리하였고, 세포는 준 정량 RT-PCR을 위해 거둬들인 결과 GAPDH 대조군에서 5 μ M에 따른 발현 증가하였다(Figure 5A and 5B). Fig. 4에서 보여지듯이, HO-1의 발현 증가가 HepG2세포에서 RNA, 단백질양이 증가가 10 μ M quercetin을 3시간 처리 후에 관찰되고, 13시간 이후에 다시 되돌아 왔다. HepG2에 quercetin을 다양한 농도로 3시간동안 처리하면, HO-1의 발현은 5, 10 μ M 에서 감지되었다 (Fig. 5A). 따라서 quercetin은 HO-1 발현을 증가시킨다고 할 수 있다.

3. Mitochondria 활성화 발현의 quercetin 유도 전사 발현의 HO-1/CO 시스템 저해 효과

HO-1에 의한 CO생성은 mitochondria의 생성을 촉진시키고 에탄올에 손상된 간암세포(HepG2)를 quercetin이 활성화 시킨다는 연구 결과가 있다(30,31). 그래서 quercetin에 의해 발현된 HO-1/CO가 mitochondria 생성에 관련했는지 조사하기 위하여, 억제제(SnPP)

와 CO를 비활성화하기 위해 헤모글로빈(Hb)을 quercetin 처리 전에 도입했고 PGC-1 α , NRF-1, TFAM mRNA를 측정하였다 (Fig. 6). 실험결과 SnPP와 Hb에 의해 PGC-1 α , NRF-1, TFAM mRNA가 낮아졌다. 발현양이 낮아진 PGC-1 α , NRF-1, TFAM mRNA들을 다시 15 μ M의 quercetin에 처리하여 실험한 결과 발현양이 증가하였다 (Fig. 6A and B). 또한 cytochrome C와 COX IV의 단백질 양도 SnPP와 Hb처리한 후 측정된 결과 유의한 감소를 보였다(Fig. 7).

Mitochondria DNA 복제수의 quercetin 유도 단백질 발현의 HO-1/CO 시스템 저해 효과를 살펴보기 위하여 Hb (20 μ g)를 처리 후 실시간 - PCR 분석 이전에 quercetin (15 μ M)을 3시간 처리했다. 실험결과 Hb (20 μ g)처리 후에 mtDNA가 감소하였다. 그러므로 mtDNA 수도 quercetin에 의해 발생된 CO에 의해 증가된다는 것을 알 수 있었다 (Figure 8). 이 실험의 결과로 HO-1/CO가 quercetin 유도 mitochondria 생성에 관여한다고 볼 수 있다.

4. 고농도 glucose에 의해 손상된 mitochondria를 quercetin에 의해 유도 복구되는 HO-1/CO의 연관성

Quercetin은 높은 glucose에 의한 손상으로 부터 mitochondria 형태를 복원한다(32,33). 이는 과혈당이 mitochondria 생성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(34,35). mitochondria생성은 HO-1/CO를 통하여 발현되는데, quercetin이 과혈당의 영향으로 HO-1/CO에 손상을 주는지 확인하였다. HepG2에 고농도의 당 25 mM을 처리한 후 관찰해 보면 PGC-1 α , NRF-1, TFAM mRNA과 cytochrome C, COX IV 단백질이 유의하게 감소하였다 (Fig. 9 A, B). 손상된 mitochondria에 다시 quercetin을 처리하면 고농도의 당에 의하여 감소된 PGC1, NRF1, TFAM의 양이 quercetin에 의하여 회복되었

다.

Quercetin 처리 후 SnPP 처리는 PGC-1 α , NRF-1, TFAM, COX IV 발현이 저해되었고 cytochrome C는 변화가 없었다. 또한 Hb를 quercetin 처리 후 처리하게 되면, quercetin에 의해 증가하는 모든 요소들이 발현 저해되었다(Fig. 9A, B). 이 결과 quercetin은 높은 glucose에 의해 감소된 PGC-1 α , NRF-1, TFAM, COX IV들의 양을 발현 증가시켰다.

이러한 결과들을 종합해 보면, quercetin은 HO-1/CO의 양을 증가시켜 mitochondria의 합성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었으며 quercetin은 양과 시간 의존적으로 HO-1의 발현을 증가시켰다. 더 나아가 농도 의존적으로 quercetin은 mitochondria 생체내 합성을 증가함을 알 수 있었다. 이는 quercetin이 대사성 질환의 예방과 치료에 유용할 것이라 생각된다.

IV. 결론

Quercetin이 mitochondria 합성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 Hepatocarcinoma cell-lines (HepG2)를 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Quercetin은 HepG2에서 PGC-1 α , NRF1, TFAM의 발현을 증가시켰고, cytochrome C와 COX IV의 발현 양을 증가시켰다.

2. Quercetin은 Heme Oxygenase-1 (HO-1)의 발현 양을 증가시켰다.

3. mtDNA 복제 속도 시간과 농도에 따라 증가하였으며 일정한 농도에서 시간에 따른 HO-1 mRNA, HO-1 단백질 발현도 증가하였다.

4. HO-1 억제제와 CO scavenger는 quercetin에 의한 mitochondria의 합성을 억제

시켰다. 그리고 cytochrome C와 COX IV의 발현 양과 mtDNA 복제수도 억제되었다.

5. HepG2에 고농도의 당 (25 mM)을 처리하면 mitochondria가 손상을 입는다. 손상을 입은 mitochondria에 quercetin을 처리하면 고농도의 당에 의하여 감소된 PGC-1 α , NRF1, TFAM의 양이 quercetin에 의하여 회복되었다.

이러한 결과들을 종합해 보면, quercetin은 HO-1/CO의 양을 증가시켜 mitochondria의 합성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었으며 quercetin은 양과 시간 의존적으로 HO-1의 발현을 증가시켰다. 더 나아가 농도 의존적으로 quercetin은 mitochondria 생체내 합성을 증가함을 알 수 있었다. 이는 quercetin이 대사성 질환의 예방과 치료에 유용할 것이라고 제안하는 바이다.

V. 참고문헌

1. Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V : Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med* 32(11): 1220-1228. 2002.

2. Nieman DC, Henson DA, Maxwell KR, Williams AS, McAulty SR, Jin F, Shanely RA, Lines TC : Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. *Med Sci Sports Exerc* 41: 1467-75, 2009.

3. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD : Effects of dietary flavonoid quercetin upon performance and health. *Curr Sports Med Rep* 8: 206-13, 2009.

4. Davis JM, Murphy EA : Carmichael MD, Davis B: Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

Physiol 296: 1071-7, 2009.

5. Rasbach KA, Schnellmann RG : Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 536-43, 2008.

6. Chen TJ, Jeng JH, Lin CW, Wu CY, Chen YC : Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 223: 113-26, 2006.

7. Braun KF, Ehnert S, Freude T, Eqana JT, Schenck TL, Buchholz A, Schmitt A, Siebenlist S, Schyschka L, Neumaier M, Stockle U, Nussler AK : Quercetin protects primary human osteoclasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. *Scientific World Journal* 11: 2348-57, 2011.

8. Matsushima M, Tkagi K, Ogawa M, Hirose E, Ota Y, Abe F, Baba K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Kawabe T : Heme oxygenase-1 mediates the anti-allergic actions of quercetin in rodent mast cells. *Inflamm Res* 58: 705-15, 2009.

9. Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T : Attenuation of transforming growth factor- β -stimulated collagen production in fibroblasts by quercetin-induced heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 614-20, 2011.

10. Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R : The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1928-39, 2009.

11. Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Cohen BH : Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians. *Pediatrics* 120: 1326-33, 2007.

12. Rasbach KA, Schnellmann RG :

Isoflavones Promote Mitochondrial Biogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 352: 536-43, 2008.

13. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J : Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-22, 2006.

14. Trumbeckaite S, Bernatoniene J, Majiene D, Jakstas V, Savickas A, Toleikis A : The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed Pharmacother* 60: 245-8, 2006.

15. Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferre M, Guillet V, Gueguen N, Loiseau D, de Crescenzo MA, Verny C, Procaccio V, Lenaers G, Reynier P : OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1855-1865, 2009.

16. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC : Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 19: 50-56, 2009.

17. Liu J, Shen W, Zhao B, Wang Y, Wertz K, Weber P, Zhang P : Targeting mitochondrial biogenesis for preventing and treating insulin resistance in diabetes and obesity: Hope from natural mitochondrial nutrients. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 1343-52, 2009.

18. Chow JM, Shen SC, Huan SK, Lin HY, Chen YC : Quercetin, but not rutin and quercitrin, prevention of H₂O₂-induced apoptosis via anti-oxidant activity and heme oxygenase-1 gene expression in macrophages. *Biochem Pharmacol* 69: 1839 - 1851, 2005.

19. Park HK, Kim SJ, Kwon DY, Park JH, Kim YC : Protective effect of quercetin

against paraquat-induced lung injury in rats. *Life Sci* 87: 181-6, 2010.

20. Laquoue M, Arqmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puiqserver P, Auwerx J : Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127: 1109-22, 2006.

21. Liu XM, Pevton KJ, Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W : Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: 84-93, 2011.

22. Choi BM, Pae HO, Kim YM, Chung HT : Nitric oxide-mediated cytoprotection of hepatocytes from glucose deprivation-induced cytotoxicity: involvement of heme oxygenase-1. *Hepatology* 37: 810-23, 2003.

23. Shoskes D, Lapierre C, Cruz-Correa M, Muruve N, Rosario R, Fromkin B, Braun M, Copley J : Beneficial effects of the bioflavonoids curcumin and quercetin on early function in cadaveric renal transplantation: a randomized placebo controlled trial. *Transplantation* 80: 1556-9, 2005.

24. Fisslthaler B, Fleming I : Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* 105: 114-27, 2009.

25. Suliman HB, Carraway MS, Ali AS, Reynolds CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA : The CO/HO system reverse inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest* 117: 3730-41, 2007.

26. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB : Heme oxygenase-1

regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res* 103: 1232-40, 2008.

27. Rhodes MA, Carraway MS, Piantadosi CA, Reynolds CM, Cherry AD, Wester TE, Natoli MJ, Massey EW, Moon RE, Suliman HB : Carbon monoxide, skeletal muscle oxidative stress, and mitochondrial biogenesis in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: 392-9, 2009.

28. Macqarvey NC, Suliman HB, Bartz RR, Fu P, Withers CM, Welty-Wolf KE, Piantadosi CA : Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated Nrf2 induction rescues mice from lethal *S.aureus* sepsis. *Am Respir Crit Care Med* 185(8): 851-61, 2012.

29. Zheng M, Kim SK, Joe Y, Back SH, Cho HR, Kim HP, Iqnarro LJ, Chung HT : Sensing endoplasmic reticulum stress by protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase promotes adaptive mitochondrial DNA biogenesis and cell survival via heme oxygenase-1/carbon monoxide activity. *FASEB J* 26(6): 2558-68, 2012.

30. Nussler AK, Hao L, Knobloch D, Yao P, Nussler NC, Wang Z, Liu L, Ehnert S : Protective Role of HO-1 for Alcohol-Dependent Liver Damage. *Dig Dis* 28: 792-8, 2010.

31. Liu S, Hou W, Yao P, Li N, Zhang B, Hao L, Nussler AK, Liu L : Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. *Toxicol In Vitro* 26: 74-80, 2010.

32. Gomes AP, Duarte FV, Nunes P, Hubbard BP, Teodoro JS, Varela AT, Jones

JG, Sinclair DA, Palmeira CM, Rolo AP :
Berberine protects against high fat
diet-induced dysfunction in muscle
mitochondria by inducing SIRT1-dependent
mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys
Acta* 1822: 185-95, 2012.

33. Dey A, Swaminathan K :
Hyperglycemia-induced mitochondrial
alterations in liver. *Life Sci* 87: 197-214, 2010.

34. Harborne JB : Flavonoides in the
environment: Structure-activity relationships.
In progress in *Clinical and Biological
Research*. Vol.213. Edited by V. Cody,
E.Middleton, Jr and J.B. Harborne. 17-27.
Alan R. Liss, New York, 1986

35. Pierpoint WS : Flavonoids in the
human diet. In progress in *Clinical and
Biological Research*. Vol.213 Edited by V.
Cody, E. Middleton, Jr and J.B. Harborne.
125-140. Alan R. Liss, New York, 1986.