

B16F10 세포에서 Quercetin 과 Vitamin E, L-Ascorbic acid, 환원형 글루타치온과의 병용 투여에 의한 활성산소종 발생과 항산화 효소의 활성 변화

허정심 · 김안근[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received November 12, 2003; Revised December 8, 2003)

Change of ROS Generation and Antioxidant Enzyme Activity of Flavonol Quercetin in the Presence of Vitamin E, L-Ascorbic acid, Reduced Glutathione on the B16F10 Murine Melanoma Cells

Jeong Sim Hue and An Keun Kim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Abstract — It has been known that quercetin, a bioflavonoid widely distributed in fruits and vegetables as dietary-derived flavonoid and exert significant multiple biological effects such as antioxidant and anti-inflammatory, anti-tumor effects. In addition, it has been shown to have a chemoprotective role in cancer, though complex effects on signal transduction involved in cell proliferation and angiogenesis. The present study investigated whether quercetin can enhance antioxidant enzyme activity (glutathione peroxidase: GPx, superoxide dismutase: SOD, catalase: CAT) and regulate the reactive oxygen species (ROS) generation in the presence of vitamin E, L-ascorbic acid, reduced glutathione (GSH) on B16F10 murine melanoma cells. After 48h treatment of cells with quercetin in the presence of vitamin E, L-Ascorbic acid, GSH, we measured the cytotoxicities by MTT assay. The cells exhibited a dose-dependent inhibition in their proliferation in the presence of vitamin E, L-ascorbic acid, GSH respectively. We also investigated the effects of antioxidant enzyme activity and ROS generation. The antioxidant enzyme activity of quercetin in the presence of vitamin E was stronger than GSH, L-ascorbic acid, the same treatments decreased ROS generation in B16F10 murine melanoma cells. Taken together, these result demonstrate that the antioxidant effect of quercetin can enhanced in the presence of vitamin E and it might plays an important role in anti-oxidative effects.

Keywords □ antioxidant enzyme activity, quercetin, vitamin E, L-ascorbic acid, GSH, ROS

생명 공학의 진보적인 발전 속에서도 가장 큰 난제 중의 하나로 남아 있는 암에 관한 연구는 근래에 발암 기전에 관한 분자 수준에서의 연구, 새로운 치료제의 개발 등 각 분야에 걸쳐 심도 있는 연구가 이루어져 왔으나 국내의 사망 원인 중 암으로 인한 것이 1위를 차지하고 있으며 고령화 사회로 인하여 암 환자의 수는 계속해서 증가 추세에 있다. 현재의 암 치료제 개발은 주로 암 세포 증식에 관련하는 생리, 화학적 메커니즘을 조절하는 측면으로 많은 연구가 진행되어 신약 개발 및 기존의 방사선, 외과적 시술등과 병행하여 사용하고 있으나 몇몇의 암 치료에 한정되어 그 효과를 나타내고 있으며 암의 발생기전 및 전이에 관한

연구는 아직도 강조되고 있다. 최근 이러한 암을 유발하고 전이하는 것에 직접적으로 관여되고 있는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)과 그 유도체는 생체 내에서 많은 분자를 공격하여 세포의 노화와 변형을 초래함으로써 암을 유발시키게 되고 이러한 활성산소종과 그 유도체의 과도한 축적을 막기 위한 인체의 방어 시스템으로 작용하는 항산화효소인 glutathion peroxidase(GPx), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성 변화를 통하여 암세포에 존재하는 항산화 효소 계의 변화 기전이 연구 되어지고 있다. Quercetin은 유리형 또는 배당체 형태로 야채, 과일, 올리브오일, 적포도주, 차, 콩과 식물에서 발견되어지는 플라보노 배당체로서 항바이러스,¹⁾ 항혈액응고,²⁾ 항염증,³⁾ 모세혈관의 히스타민 억제, 혈압강화, 케양을 억제하고 항산화제로서 종양억제 작용⁴⁾ 등 다양한 생리적 효과가 보고되어 왔다. 뿐만 아니라 tyrosine kinase activity를 효과적으로 억제함

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9566
(E-mail) akkim@sdic.sookmyung.ac.kr

으로 혈관신생작용을 억제함⁵⁾과 동시에 미토콘드리아에서 succinoxidase 활성과 유리기 형성의 억제작용⁶⁾ 및 glutathione 고갈에 의한 지질과 산화반응의 억제작용,⁷⁾ 인체의 호중구에서 NADPH-oxidase의 억제효과⁸⁾ 및 과산화 생성 억제 효과⁹⁾에 대해 보고 되었다.

본 연구는 암세포에서의 항산화 효소활성에 대한 연구의 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포에 quercetin 을 단독 투여시 나타나는 항산화 효소 활성변화와 ROS 발생의 변화, 또한 항산화제로 알려져 있는 vitamin E, L-ascorbic acid, reduced glutathione 등의 항산화제를 병용 투여하여 항산화 효소와 ROS 발생과의 변화를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험방법

검액조제

Quercetin, vitamin E, L-ascorbic acid, GSH(Sigma Chemical Co., USA)를 각각 에탄올과 PBS에 녹여 0.22 μ pore 여과지로 여과 멸균한 후 stock solution을 만들었으며, 실험에 이용하기 직전 RPMI 1640 세포배양 배지에 희석하여 농도를 조정한다 사용하였다.

세포배양

B16F10 murine melanoma 세포배양은 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin(Sigma Chemical Co., USA)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco. Co.)이 포함된 RPMI 1640 배지를 약 24시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann¹⁰⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. B16F10 세포를 2.5 \times 10⁴ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 quercetin 또는 다른 항산화제를 세포에 투여하여 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 48시간 동안 안정화 시킨 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 μ g/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣은 뒤 3시간 동안 배양하였다. 이후 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μ l씩 넣고 15분간 실온에서 방치하여 ELISA reader 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정

SOD 활성 측정은 pyrogallol autoxidation의 저해를 관찰하는 Marklund의 방법을 사용하였다.^{11,12)} 50 mM tris-cacodylic acid

buffer(pH 8.2, 1 mM EDTA) 1 ml에 pyrogallol stock solution (0.2 mM/10 mM HCl)을 약 500 μ l를 가하여 1분당 0.015 정도의 흡광도 증가를 나타내도록 조절하여 standard absorbance로 사용하였다. 이 substrate 용액 1 ml에 각 sample 100 μ l를 가하고 UV/visible spectrophotometer를 사용해 420 nm에서 tris-cacodylic acid buffer를 blank로 하고 1분마다 10분까지 absorbance를 측정하고 lag phase에서 직선이 성립하는 5분에서 10분까지 1분당 흡광도 변화를 평균 내어 효소활성을 계산하였다.

Glutathione peroxidase(GPx)의 활성측정

GPx의 활성은 Flohe와Gunzler의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.^{13,14)} GPx의 반응 동안 glutathione(GSSG)은 GSH의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase(GR)에 의해 환원되며 이때 reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)의 산화를 관찰하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0, 1 mM EDTA) 500 μ l에 각 sample, GR, 10 mM GSH, 1 mM sodium azide를 각각 100 μ l씩 넣은 후 37°C에서 10분간 예배양 시킨다. 여기에 1.5 mM NADPH 100 μ l를 가한 다음 3분 동안 H₂O₂가 없는 상태에서의 NADPH 소비를 관찰하였다. 1.5 mM H₂O₂를 넣고 감소한 NADPH의 흡광도가 직선이 나타나도록 340 nm에서 5분간 흡광도를 측정한다.

Catalase(CAT)의 활성측정

CAT의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해를 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi¹⁵⁾의 방법을 이용하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml당 30% H₂O₂를 넣어 10 mM substrate solution(A240=0.5)을 만든다. 이 substrate solution 3 ml에 각 sample 100 μ l를 가한 후 43.6 M-1cm-1의 extinction coefficient¹⁶⁾를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 1분마다 2분 동안 흡광도를 측정하였다.

Reactive oxygen species generation의 측정

B16F10 cell을 96 well에 각 well당 1 \times 10⁵로 배양하였다. 배양 후 상온에서 50 μ M 2, 7-dichlorofluorescein diacetate(Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)를 처리한 후 Cytofluor 2350 plate reader(Millipore, Bedford, MA, USA)로 분석하였다.

(excitation wavelength: 485, emission wavelength: 530)

Data presentation

본 연구의 실험결과는 평균표준편차로 표시하였으며, 모두 triplicate set로 세 차례 이상 수행하였다. 각 sample의 통계적 유의성 여부는 Students t-test를 시행하여 *; p<0.05, **;

$p < 0.01$ 로 표시하였다.

결과 및 고찰

세포 생존율 측정

Quercetin을 B16F10 세포에 vitamin E, L-ascorbic acid, GSH와 병용투여하고 MTT 측정 방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. 배양기간은 3일로 고정하였으며 병용 투여하는 quercetin의 농도는 12.5, 25, 50, 100 μM 로 48시간 처리하였을 때 세포 독성을 나타내지 않는 50 μM 로 동일하게 처리하였고 병용 처리하는 각 sample 농도는 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 vitamin E는 50, 25, 12.5, 6.25 μM 로 처리하였으며 L-ascorbic acid는 5, 2.5, 1.25, 0.625 mM로 GSH는 1, 0.5, 0.25, 0.125 mM로 처리하였다. Fig. 1에서와 같이 quercetin과 병용 처리한 vitamin E에 의한 세포의 증식은 12.5 μM 까지는 유의할 만한 변화를 보이지 않았으나 25 μM 농도부터 서서히 증식이 억제됨을 볼 수 있다. L-ascorbic acid의 병용 투여시 5 mM에서 30% 이상 성장 억제 효과가 나타났으며, GSH와의 병용 투여는 0.5 mM까지는 대조군과 비교하여 변화가 없으나 1 mM에서 20% 이상 증식이 억제 되었다. 또한 quercetin, vitamin E, L-ascorbic acid, GSH를 각각 단독 처리한 것보다 quercetin에 vitamin E, L-ascorbic acid, GSH의 병용 처리한 것이 암세포의 증식을 억제 시킴을 알 수 있다. 특히 quercetin에 vitamin E를 병용 처리한 경우는 가장 우수한 암세포 증식 억제효과를 나타내었다 이 결과로 보아 quercetin과 다른 항산화제를 병용 처리함은 세포 독성을 나타내지 않으면서도 우수한 암세포 증식 억제 효과를 나타냄을 알 수 있다.

Quercetin의 병용 처리에 대한 항산화효소의 변화

항산화 효소 시스템은 산화적인 스트레스로부터 생체를 보호하는 중요한 역할을 수행한다. GPx, CAT, SOD 등은 분자 산소에서 유래한 유해 활성산소를 제거하는 대표적인 항산화 효소로서 활성변화를 통해서 활성산소의 대사 변화를 의미하는 것으로 간주 할 수 있다. Quercetin을 hepatoma cells에 처리하였을 때 GPx, SOD가 오히려 감소되고 세포 독성을 나타내는 100 M로 처리한 것에만 CAT 활성이 증가되었다고 보고 되었다.¹⁷⁾ 이러한 감소에도 불구하고 quercetin이 산화적 스트레스로부터 생체를 보호하는 것은 항산화 효소의 활성을 통해서가 아니라 직접적인 radical scavenging을 통해서라고 생각 되어진다. 따라서 독성을 나타내지 않는 농도에서 quercetin과 다른 항산화제를 병용 투여했을 때 항산화 효소계의 변화를 통해 quercetin이 간접적으로 항산화제로서의 역할을 증가 시킬 수 있을 것인가에 대한 실험을 실시하였다. Vitamin E, L-ascorbic acid, GSH는 생존율 시험에 사용되었던 4가지 농도로 단독처리 혹은 quercetin과 48

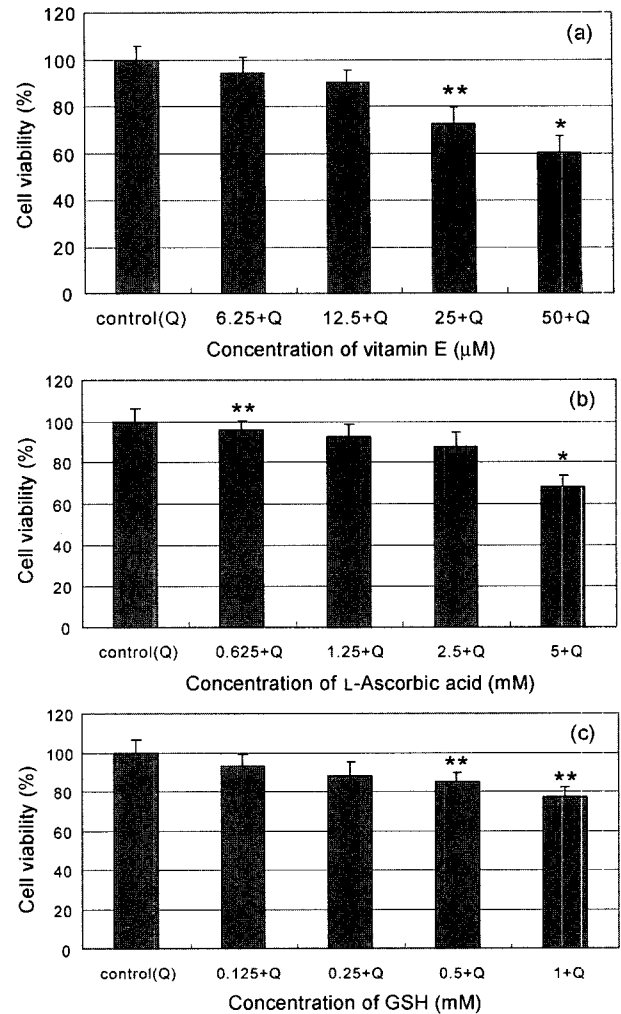


Fig. 1 – (a) Effect of quercetin in the presence of vitamin E on the viability of B16F10 murine melanoma cells. The cells were cultured in the presence of quercetin (50 μM) and various concentration of vitamin E for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean SD of at least five different experiments. Control (Q) : quercetin (50 μM) treat, others: quercetin (50 μM)+6.25, 12.5, 25, 50 μM vitamin E respectively. (b) Effect of quercetin in the presence of L-ascorbic acid on the viability of B16F10 murine melanoma cells. The cells were cultured in the presence of quercetin (50 μM) and various concentration of L-ascorbic acid for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean SD of at least five different experiments. Control (Q): quercetin (50 μM) treat, others: quercetin (50 μM)+0.625, 1.25, 2.5, 5 mM L-ascorbic acid respectively. (c) Effect of quercetin in the presence of reduced glutathione (GSH) on the viability of B16F10 murine melanoma cells. The cells were cultured in the presence of quercetin (50 μM) and various concentration of GSH for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean SD of at least five different experiments. Control (Q): quercetin (50 μM) treat, others: quercetin (50 μM)+0.125, 0.25, 0.5, 1 mM GSH respectively.

Table I – Changes of antioxidant enzyme activities of quercetin (50 µM) in the presence of various concentrations of vitamin E in the B16F10 murine melanoma cells

Antioxidant enzyme activities (Unit/mg protein)			
Sample	GPx	SOD	CAT
Quercetin (50 µM)	0.231±0.020	2.87±0.45	4.92±0.49
Q+vit. E 6.25 µM	0.223±0.03	2.91±0.45	4.69±0.30
Q+vit. E 12.5 µM	0.278±0.05	3.40±0.54	5.14±0.47
Q+vit. E 25 µM	0.387±0.020**	5.38±0.12*	8.29±0.36**
Q+vit. E 50 µM	0.299±0.014*	3.72±0.35**	5.92±0.38**
Vit. E 25 µM	0.349±0.01*	4.86±0.28*	6.89±0.27*

The cells cultured with quercetin (50 µM) in the presence of various concentration of vitamin E for 48 h. The result were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

시간 동안 병용 처리 하였다. 각 sample의 protein양은 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 사용하여 BCA protein assay에 의해 정량 하였다. Vitamin E를 세포에 단독 처리 했을 때 25 µM에서 가장 높은 활성을 보였으며 L-ascorbic acid에서는 5 mM에서 활성이 제일 높고 GSH와 병용 처리에서는 1 mM에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이 결과를 토대로 quercetin(50 M)과 vitamin E(25 µM), L-ascorbic acid(5 mM), GSH(1 mM)를 각각 다시 병용 처리하여 항산화 효소 활성을 측정하였다. Table I에서 나타나는 것과 같이 quercetin에 vitamin E를 병용 처리한 것이 quercetin 단독 혹은 vitamin E 단독 처리한 것 보다 GPx, SOD, CAT 모두에서 활성증가를 나타내었다. 이 결과로 보아 quercetin과 vitamin E를 병용 처리함은 세포독성을 나타내지 않고서도 quercetin의 항산화력을 증가 시킴으로 항산화제로서 역할을 강화 시킬 수 있음을 나타낸다.

Reactive oxygen species(ROS) 발생에 미치는 영향

연령이 증가함에 따라 체내 유전자나 단백질 합성 과정에서 야기 되는 체내 장기의 구조와 기능의 감소로 내분비계와 면역계의 변화로 말미암아 노화에 이르게 된다. 노화에 의한 내분비 및 면역계의 변화는 신진 대사의 조절 작용과 병원체로부터의 방어 기능을 약화시키고 노화촉진과 질병을 야기한다. 현재 알려

Table III – Changes of antioxidant enzyme activities of quercetin (50 µM) in the presence of various concentrations of reduced glutathione (GSH) in the B16F10 murine melanoma cells

Antioxidant enzyme activities (Unit/mg protein)			
Sample	GPx	SOD	CAT
Quercetin (50 µM)	0.231±0.020	2.87±0.45	4.92±0.49
Q+GSH 0.125 mM	0.263±0.011	3.63±0.52	4.99±0.12
Q+GSH 0.25 mM	0.292±0.022	3.54±0.35	4.96±0.46
Q+GSH 0.5 mM	0.312±0.023*	4.12±0.25*	5.77±0.34*
Q+GSH 1 mM	0.356±0.015*	4.59±0.56**	6.80±0.46**
GSH 1 mM	0.307±0.013**	3.87±0.32**	6.44±0.41**

The cells cultured with quercetin (50 µM) in the presence of various concentration of GSH for 48 h. The result were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

진 노화 가설에는 시계생존설, 유전자설, 유리기설, 내분비 및 면역설등이 있으며 이중 최근 주목을 받는 유리기설은 활성산소(oxygen free radical)와 항산화 효소의 균형이 깨어지면서 체내 산화적 스트레스(oxidative stress) 증가로 인해 노화가 촉진된다는 것이다.^{18,19)} Quercetin은 최근 위암, 유방암, 난소암 등의 성장 억제 효과가 보고된 바 있고 활성산소 제거력을 가지고 있음으로써 xanthine oxidase와 지질 과산화를 억제하는 강력한 항산화제로 알려져 있으며 산화적 스트레스에 의해 유발되는 H₂O₂와 nitric oxide synthase(NOS) 활성을 억제한다고 보고 되어 있다.²⁰⁾ 활성산소종(ROS)은 O₂가 전자 전달계에 의해 H₂O까지 환원 되어 가는 중에 전자(e⁻) 한 개씩에 의해 순차적으로 환원되면서 생성되는 O₂⁻, H₂O₂, OH 등의 파생유도체이며 세포의 기능 조절에 중요한 역할을 수행하면서도, 세포를 구성하는 단백질, 지방, DNA 등을 산화 시킴으로써 세포의 퇴화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 세포의 반복적인 활성산소에 의한 노출은 DNA의 돌연변이를 유발해 다양한 종류의 암을 비롯한 난치질환의 근원이 되는 것으로 생각되고 있다.¹⁸⁾ 이에 따라 이런 유해한 활성산소에 대해 항산화 효소계가 분자수준에서의 항산화 장치로 작용함으로써 quercetin과 항산화제와의 병용 처리가 항산화 효소의 활성을 증가시킴이 확인되어 이런 효소들의 활

Table II – Changes of antioxidant enzyme activities of quercetin (50 µM) in the presence of various concentrations of L-ascorbic acid in the B16F10 murine melanoma cells

Antioxidant enzyme activities (Unit/mg protein)			
Sample	GPx	SOD	CAT
Quercetin (50 µM)	0.231±0.020	2.87±0.45	4.92±0.49
Q+L-ascorbic acid 0.625 µmM	0.182±0.04	3.02±0.54	5.79±0.08
Q+L-ascorbic acid 1.25 mM	0.235±0.025*	3.70±0.23*	5.83±0.14*
Q+L-ascorbic acid 2.5 mM	0.290±0.023	3.53±0.28*	6.32±0.15
Q+L-ascorbic acid 5 mM	0.323±0.015**	4.03±0.33**	6.88±0.34**
L-ascorbic acid 5 mM	0.301±0.029*	3.92±0.23	5.74±0.21*

The cells cultured with quercetin (50 µM) in the presence of various concentration of L-ascorbic acid for 48 h. The result were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

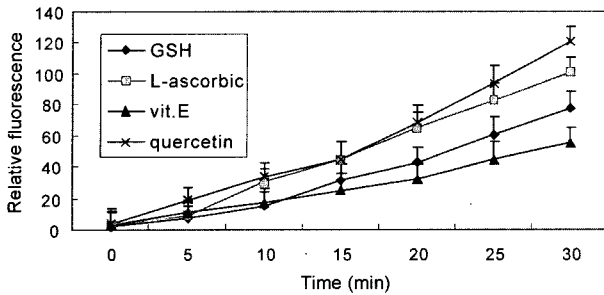


Fig. 2 – Measurement of reactive oxygen species (ROS) generation-B16F10 cells (1×10^5) were incubated with or without quercetin ($50 \mu\text{M}$) in the presence of vitamin E ($25 \mu\text{M}$), L-ascorbic acid (5mM), GSH (1mM) and then $200 \mu\text{l}$ (2, 7-dichlorofluorescein diacetate : $50 \mu\text{M}$) was added as a substrate for ROS. After incubation for 15 min. ROS generation was measured by spectrofluorometer (excitation wavelength: 485, emission wavelength: 530). Q: quercetin ($50 \mu\text{M}$).

성이 직접 활성산소를 제거 할 수 있는지를 ROS 발생을 통하여 실험하였다. 이 실험에 사용된 vitamin E L-ascorbic acid, GSH 는 quercetin과 병용 처리시 항산화 효소 활성을 가장 높이는 최적농도인 $25 \mu\text{M}$, 5mM , 1mM 를 각각 사용하였다. Fig. 2에서와 같이 병용 처리시 quercetin과 vitamin E $25 \mu\text{M}$ 가 활성산소를 제거함으로 ROS 발생을 낮추는 것으로 확인되었다. 이 결과로부터 암세포내의 생성되는 O_2^- 이온으로 야기되는 활성산소의 독성을 무독화 시키기 위해 H_2O_2 의 분해효소인 CAT, GPx 등이 SOD와 함께 활성이 증가되며 이 증가된 활성으로 말미암아 ROS의 발생이 억제될 가능성을 시사하고 있다.

결 론

본 연구에서는 quercetin과 vitamin E, L-ascorbic acid, GSH를 다른 항산화제를 병용 처리 하여 항산화효소 활성과 ROS 발생을 측정하여 항산화 효과에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다. Quercetin, vitamin E, L-ascorbic acid, GSH를 단독 처리한 것과 비교할 때 vitamin E, L-ascorbic acid, GSH 등의 병용 처리는 세포독성을 나타내지 않으면서 항산화효소 활성을 증가시키고 ROS 발생을 억제시키는 결과를 나타내었다. 특히 quercetin과 vitamin E와의 병용 처리는 quercetin 또는 vitamin E의 단독 처리 보다 항산화효소 활성을 증가시키고 ROS 발생으로 인한 질병 예방 및 의약품 개발에 기여할 것으로 사료된다.

문 헌

1) Weixiong, L. and Helene, Z. H. : Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem.*

- Phytophysiol.* **65**, 480 (1997).
- 2) Kaufman, R. J. : Vectors used for expression in mammalian cells. *Method Enzymol.* **205**, 87 (1991).
- 3) Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S. and Nishiyama, S. : Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 126 (1993).
- 4) McClure, J. W. : Physiology and function of flavonoids. In "Harbone, J. B., The flavonoids". *Chapman and Hall, London* **970** (1975).
- 5) Levy, J., Teuerstein, I., Marbach, M., Radian, S. and Sharoni, Y. : Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: inhibition by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 1227 (1984).
- 6) 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).
- 7) Younes, M. and Siegers, C. P. : Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Medica.* **43**, 240 (1981).
- 8) Tauber, A. L., Fay, J. R. and Marletta, M. A. : Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1367 (1984).
- 9) Warren, D. B., Louis, W. H. and Robert, W. W. : The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production and phosphorylation of specific neutrophil protein. *Eiochem. Biophysic Res.* **144**, 1229 (1987).
- 10) Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**, 55 (1983).
- 11) Stefan, M. and Gudrun, M. : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469 (1974).
- 12) Eugene, F. R. and Harriet, S. G. : The pyrogallol assay for superoxide dismutase : absence in glutathione artifact. *Anal Biochem.* **137**, 50 (1983)
- 13) Flohe Leopold and Wolfgang Gnzler : Assays of glutathione peroxidase. *Method in Enzymology.* **105**, 93 (1984).
- 14) Donald EPaglia and William N Valentine : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. & Clin. Med.* **70**, 158 (1967).
- 15) Hugo Abei : Catalase *in vitro.* *Method in Enzymology.* **105**, 93 (1984).
- 16) Yasuko Shindo and Takashi Hashimoto : Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UV irradiation. *J. Dermatol. Sci.* **14**, 225 (1997).

- 17) Sichel G, Corsaro C, Scalia M, Di Bilio A. J. and Bonomo R. P. : *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O_2^- . *Free Radic Biol. Med.* **11**, 1 (1991).
- 18) Rice, E. C. and Burdon, R. : Free radical lipid interactions and their pathological consequence. *Prog. Lipid. Res.* **32**, 71 (1993).
- 19) Jenkins, R. R. and Goldfarb, A. : Introduction: Oxidant stress, aging, & exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **25**(2), 210 (1993).
- 20) Fiorani, M., De Sanctis, R., Menghinello, P., Cucchiari, L., Cellini, B. and Dacha, M. : Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. *Free Rad. Res.* **34**, 639 (2001).