약학회지 제 49 권 제 1 호 86~91 (2005)
*Yakhak Hoeji* Vol. 49, No. 1

藥學會誌

# B16F10 Murine Melanoma Cell에서 Myricetin이 항산화효소의 m-RNA 발현에 미치는 영향

유지선 · 김안근#
숙명여자대학교 약학대학

(Received January 7, 2005; Revised February 15, 2005)

# Effect of Myricetin on mRNA Expression of Different Antioxidant Enzymes in B16F10 Murine Melanoma Cells

Ji Sun Yu and An Keun Kim#
*College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea*

**Abstract** — Flavonoids are class of polyphenolic compounds widely distributed in the plant kingdom, which display a variety of biological activities, including antiviral, antithrombotic, antiinflammatory, antihistaminic, antioxidant and free-radica l scavenging abilities. The antioxidant enzyme (AOE) system plays an important role in the defense against oxidative stress insults. To determine whether flavonoid, myricetin can exert antioxidative effects not only directly by modulating the AOE system but also scavenging free radical, we investigated the influence of the flavonoid myricetin on cell viability, different antioxidant enzyme activities, ROS level and the expression of different antioxidant emzyme in B16F10 murine melanoma cells. Myricetin in a concentration range from 6.25 to 50 μM decreased superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities, but catalase (CAT) activity was increased. In the myricetin-treated group, ROS levels were decreased dose-dependently. Antioxidant enzyme expression was measured by RT-PCR. Myricetin treatment of B16F10 cells increased catalase expression. Expression levels of copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) were not affected by exposure of myricetin. Manganese superoxide dismutase (Mn SOD) and GPx expression levels decreased slightly after myricetin treatment. In conclusion, the antioxidant capacity of myricetin was due to CAT and free-radical scavenging.

**Keywords** □ antioxidant enzyme, myricetin, ROS

Hydroxyl radicals(·OH), superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide($H_2O_2$)와 nitric oxide (NO)를 포함하는 반응성이 매우 큰 reactive oxygen species(ROS)는 호기성 대사과정의 정상적인 생산물이다. 이들 ROS는 방사선, 염증, 공기 오염물질($O_3$, $NO_2$), 담배연기, repurfusion injury, ischemia 등과 같은 비정상적인 조건에서 과도하게 생산되고[1,2] 이로인해 세포막의 지질, 조직의 protein 또는 효소, 탄수화물, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA 손상을 유발한다.[3] 이들 산화적 손상은 암, 노화, 관상동맥 심장 질환, 퇴행성 신경질환(파킨슨 병, 알츠하이머병) 등과 같은 다양한 질병을 유발한다.[4-6]

Flavonoid는 항박테리아, 항바이러스, 항혈전증, 항염증, 항알레르기, 항암 효과, 항산화, antimutagenic 활성 등의 다양한 생물학적 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 또한 free radical 생성과 관련된 전이 원소를 chelation하거나 효소의 저해에 의해 ROS의 생성을 억제하며 ROS를 scavenging하는 것으로 알려져 있다.[7-10] Flavonoids의 항산화 특성은 lipid peroxidation의 개시에 영향을 주는 높은 반응성을 나타내는 ·OH[11]와 $O_2^{\cdot-}$[12,13]에 직접적으로 영향을 주는 것이다.

이번 연구는 암세포에서의 flavonoid의 항산화 효소활성에 대한 연구의 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포에서 flavonoid의 한 종류인 myricetin 처리하여 SOD, GPx, CAT의 발현에 미치는 영향을 검토함으로써 항산화효소를 통한 항산화 작용을 규명하고자 하였다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9561 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr

## 시약 및 방법

### 시약 및 기기

RPMI 1640 powder medium, antibiotics(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 μg/ml streptomycin sulfate), trypan blue는 Gibco BRL life Technologies Inc. 제품을 사용하였고, FBS는 BioWhittaker™을 사용하였다. Cell dissociation solution, myricetin, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide), β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(β-NADPH), glutathione reduced form, tris[hydroxyl-methyl]aminomethane(Tris), protein kit는 Acros organics Co. Ltd 제품을 사용하였다. 이들 시약들은 모두 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

기기로는 ELISA reader(Bio-Tek instrument Inc), cytofluor 2350 plate reader(Millipore, Bedford, MA, USA), $CO_2$ incubator(Forma science), table top centrifuge(Hanil science industrial Co. Ltd.), centrifuge(supra 21K, Hanil science industrial Co. Ltd.), inverted microscope(Olympus CK2), UV/visible spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech).

### 세포배양

Mouse melanoma cell로부터 유래된 B16F10 cell은 한국 세포주 은행(Korean Cell Lines Bank)으로부터 분양받았다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 μg/ml streptomycin sulfate), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 RPMI 1640 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% $CO_2$ incubator에서 배양하였다. 25 $cm^3$ tissue culture flask나 75 $cm^3$ tissue culture flask에서 confluent되었을 때 cell dissociation solution을 처리하여 계대배양하고 실험에 이용하였다.

### 시료의 조제

Myricetin은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 0.2 μm pore size syringe filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 실험에 이용하기 직전에 DMSO의 최종농도가 0.1%가 되도록 RPMI 1640 세포배양 배지로 희석하여 사용하였다.

### 세포생존률 측정

B16F10 cell suspension을 $1\times10^5$ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 μl씩 가하여 배양기에서 24시간동안 안정화시킨다. Myricetin을 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양한다. 2.5 mg/ml MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 well당 50 μl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한다. 이후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100 μl씩 가하여 1분간 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.[14]

### 항산화 효소의 활성 측정

시료의 처리와 단백질 정량은 $2.5\times10^6$ cells/ml의 B16F10 cell suspension을 150π tissue culture dish에 가한다. 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후 myricetin을 처리하여 24시간 배양한다. Culture dish에서 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 농도별 sample을 얻고 상등액을 제거한 pellet에 lysis buffer 1 ml을 가한다. Lysis buffer를 가한 각각의 sample을 14,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액만을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample protein의 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 사용하여 BCA(Bicinchoninic acid) protein assay을 하였다.[15]

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정은 hematoxylin을 이용한 Martin의 방법을 사용하였다.[19] Hematoxylin은 자연상태에서 붉은색인 hematin으로 자가 산화한다. 이러한 과정에 SOD가 관여하면 자동산화를 억제하게 된다. 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1 ml에 각각의 sample을 50 μl씩 가하고 5분 동안 preincubation시킨다. 여기에 5 mM hematoxylin을 30 μl을 가한 후 phosphate buffer를 blank로 하여 UV/visible spectrophotometer를 사용해 568 nm에서 흡광도를 측정하고 4분 후 다시 흡광도의 변화를 측정한다.

Glutathione peroxidase(GPx)의 활성측정은 Paglia와 Valetine의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.[17] 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. 0.4 M Tris·HCl(pH 7.2) buffer 2.625 ml에 0.04 M GSH 75 μl, 0.075 mM $H_2O_2$ 0.1 ml, 6 mM NADPH 0.1 ml을 각각 은 후 5분간 preincubation시킨다. 여기에 각각의 sample을 가하여 UV/visible spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후 다시 흡광도를 측정한다.

Catalase(CAT)의 활성측정은 hydrogen peroxide의 분해를 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi 방법을 이용하였다.[18] 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 30% $H_2O_2$를 넣어 10.5 mM substrate solution(A240=0.5)을 만든다. 이 substrate solution 1 ml에 각 sample 50 μl를 가한 후 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$의 exitinction coefficient를 사용하여 UV/visible spectrophotometer로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 30초마다 1분 동안 흡광도를 측정하였다.

### Reactive oxygen species level 측정

B16F10 cell suspension을 96 well plate에 각 well당 $2\times10^4$

cells로 가한후 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해준다. 상온에서 50 μM DCF-DA를 처리 한 후 Cytofluor 2350 plate reader를 이용하여 5분 간격으로 측정하였다. DCF-DA는 세포 투과성 염료로 ROS의 세포내 변화를 볼 때 일반적으로 사용된다. 이 화합물은 $H_2O_2$나 superoxide에 의해 산화될 때 형광을 나타낸다. 산화된 DCF의 형광성은 485 nm의 excitation wavelength와 530 nm의 emission wavelength에서 측정한다.[19]

**Total RNA isolation와 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)**

$2.5\times10^6$ cells/ml의 B16F10 cell suspension을 150π tissue culture dish에 가한다. 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후 myricetin을 단독 혹은 다른 항산화제와 병용 처리하여 24시간 배양한다. Culture dish에서 배지를 제거하고 차가운 PBS로 2번 세척한 후 easy blue를 1 ml 가한 후 scraper를 이용해 cell을 모아 1.5 ml tube에 넣는다. 여기에 200 μl의 chloroform을 가하여 4°C, 12000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층부만 취한다. 취한 상층부에 동량의 isopropanol을 가한후 4°C, 12000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 pellet만 남기고 상등액을 제거한다. 70% ethanol로 RNA pellet을 세척하여 4°C, 12000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후 상등액을 제거하고 pellet을 말린다. 여기에 DEPC water을 30 μl를 가한다. 이렇게 만들어진 total RNA는 agarose gel 전기영동을 통하여 확인한다.

Total RNA은 cDNA power synthesis kit을 사용하여 complementary DNA(cDNA)로 역전사시켰다. PCR법에 의해 DNA를 증폭시키기 위해 역전사 된 cDNA는 각각 다른 antioxidant enzyme primer와 함께 PCR 증폭을 하였다. Primer의 sequence와 annealing 온도는 Table I에 나타낸 바와 같다. Cycling 조건은 95°C에서 30초, annealing 온도에서 30초, 72°C에서 30초 실행하였으며 β-actin은 25회, 그 외 항산화 효소들은 35회 실행하였다. 증폭된 RT-PCR 산물은 1.5% agarose gel로 전기영동을 한 후, ethidium bromide 염색으로 검출하였다.

**Table I** – Sequences of primers and RT-PCR conditions

| Gene | Primer sequence | Annealing (°C) | Product size (bp) |
|---|---|---|---|
| *β-actin* | | | |
| Forward | CATCCATCATGAAGTGTGACG | 52.5 | 220 |
| Reverse | CATACTCCTGCTTGCTGATGG | | |
| *Cu/Zn SOD* | | | |
| Forward | TTAACTGAAGGCCAGCATGGG | 60 | 335 |
| Reverse | ATCACTCCACAGGCCAAGCGG | | |
| *Mn SOD* | | | |
| Forward | TGCACCACAGCAAGCACCATG | 55 | 413 |
| Reverse | CTCCCACACGCAATCCCCAG | | |
| *GPx* | | | |
| Forward | CTCGGTTTCCCGTGCAATCAG | 65 | 431 |
| Reverse | GTGCAGCCAGTAATCACCAAG | | |
| *CAT* | | | |
| Forward | TCTGCAGATACCTGTGAACTG | 55 | 357 |
| Reverse | TAGTCAGGGTGGACGTCAGTG | | |

**통계처리**

본 연구의 그래프와 표의 모든 수치는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준오차로 표시하였으며, 모두 triplicate set로 세 차례 이상 수행하였다. 각 sample의 통계적 유의성에 대한 검증은 *t*-Student test를 시행하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

**세포 생존율**

B16F10 cell에서 myricetin의 농도별 세포 생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 실행하였다. 배양 기간은 2일로 고정하였으며 myricetin의 농도는 6.25~200 μM 범위에서 실험을 시행하였다. 낮은 농도(6.25 μM)에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 못하였으나(93.8%) myricetin의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하여 myricetin의 농도가 200 μM에서는 세포 생존율이 29%로 나타났다. Myricetin의 농도가 50 μM일 때 세포 생존율이 69.5%로 강한 독성을 나타내지 않았으므로 50 μM을 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다.

**항산화 효소 활성에 미치는 영향**

호기성 유기체의 생명 유지에 필수성분 중의 하나인 산소는 전자 전달계의 전자 수용체로 호흡을 통해 에너지를 획득하게 되고 그 과정의 부산물로 활성 산소종(ROS)이 발생한다. ROS로 인한 손상을 막기 위해 호기성 유기체들은 생체내에 효소적 항산화 체계가 있는데 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT)와 같은 항산화 효소가 중요한 역할을 하고 있다. 진핵세포에서는 Cu/Zn SOD(SOD-1), Mn SOD(SOD-2)와 extracellutar SOD(EC-SOD)의 세 가지 형태의 SOD가 존재하며 각각은 세포의 cytosol, mitochondria, extracellular space에 존재한다.[20] SOD는 free radical superoxide을 hydrogen peroxide로 전환시킨다. 생성된 hydrogen peroxide는 Fenton reaction을 통해 더욱 반응성이 큰 hydroxyl radical로 전환될 수 있다. 이렇게 생성된 hydrogen peroxide는 주로 peroxisomes에 존재하며 간세포와 적혈구에 풍부한 CAT에 의해 $O_2$와 $H_2O$로 전환된다.[18] 또한 cytoplasm과 mitochondria에 존재하는 GPx에 의해서 $H_2O$로 되어 무독화된다.[17] 이들 항산화 효소들이 myricetin의 농도에 따라 효소 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 myricetin을 다양한 농도로 처리하여 SOD, GPx, CAT의 활성 변화를 측정하였다. SOD와 GPx

**Table II** – Effect of myricetin on the activities of the antioxidant enzyme activities, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) in B16F10 murine melanoma cells

| Concentration | SOD (Units/mg protein) | | GPx (Units/mg protein) | | CAT (Units/mg protein) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE |
| 0 | 0.11 | 0.06 | 1.80 | 0.17 | 4.44 | 0.26 |
| 6.25 μM | 0.90 | 0.02 | 1.73 | 0.07 | 4.73 | 0.11 |
| 12.5 μM | 0.83 | 0.02* | 1.42 | 0.09* | 6.45 | 0.38** |
| 25 μM | 0.82 | 0.02* | 1.28 | 0.03* | 7.65 | 0.21** |
| 50 μM | 0.77 | 0.04* | 1.11 | 0.02** | 8.23 | 0.18*** |

The cells were exposed to various concentrations of myricetin for 24 hr. The myricetin-treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. SOD, GPx and CAT of absorbance of each enzyme sample was read at 568 nm, 340 nm and 240 nm, respectively. Results are expressed as average of triplicate samples with ±S.E. *P<0.05,**P<0.01 compared with control.

의 경우, myricetin의 농도가 증가할수록 효소 활성이 감소하여, myricetin의 농도가 50 μM일 때 control에 비해 각각 24%, 43% 감소하였다. 이에 반해 CAT은 myricetin의 농도가 증가할수록 활성이 증가하여 myricetin의 농도가 50 μM일 때 control에 비해 1.85배 정도 증가하였다(Table II).

### Reactive oxygen species(ROS) level에 미치는 영향

활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 $O_2$가 전자 전달계에 의해 $H_2O$까지 환원되어 가는 중에 전자($e^-$) 한 개씩에 의해 순차적으로 환원되면서 생성되는 $^{\cdot}OH$, $O_2^{\cdot-}$, $H_2O_2$ 등의 파생물로 과잉 생성될 경우 세포의 퇴화를 촉진시키며, DNA의 돌연변이를 유발해 다양한 종류의 암을 비롯한 난치질환의 근원이 된다. 이에 따라 myricetin이 B16F10 cell에서 직접 활성산소를 제거 할 수 있는지를 알아보기 위해 ROS level을 측정하였다. 그 결과, CAT의 활성 증가가 myricetin이 직접 활성 산소를 제거할 수 있는지를 ROS 발생을 통하여 실험해 본 결과 myricetin의 농도가 증가함에 따라 ROS level의 감소폭이 증가함을 알 수 있었다. 특히, 최고 농도인 50 μM에서는 control에 비해 약 58.7%가 감소하였다($P<0.001$)(Fig. 1).

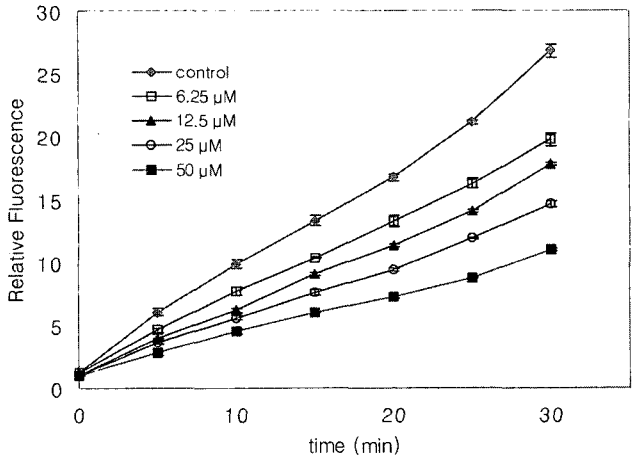


**Fig. 1** – Measurement of reactive oxygen species (ROS) level after myricetin treatment. The melanoma cells ($2\times10^4$/well) were incubated with myricetin at various concentration and then 200 μl DCFH-DA (50 μM) was added as a substrate for ROS. After incubation for 30 min. ROS levels were measured by spectrofluoremeter (excitation : 485 nm, emission : 530 nm). Results are representative of three experiments and each performed in triplicates.

### 유전자 발현에 미치는 영향

진핵 세포에 존재하는 항산화 체계는 ROS level의 감소가 CAT의 활성과 관련이 있는 지를 알아보기 위해서 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과 항산화 효소의 활성과 발현이 비슷한 양상을 보이는 것을 알 수 있었다. Myricetin은 CuZnSOD의 발현에는 영향을 미치지 못하였으나, MnSOD는 농도가 증가함에 따라 발현이 약간 감소됨을 확인 할 수 있었고 GPx 또한 myricetin의 농도가 증가할수록 발현이 감소됨을 알 수 있었다. CAT의 경우에

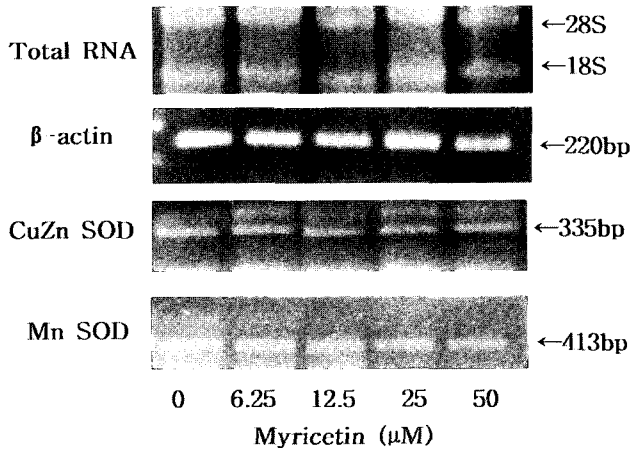


**Fig. 2** – Copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) and manganese superoxide dismutase (Mn SOD) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin exposure. Melanoma cells were exposed to various concentrations of myricetin and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA. PCR products were analyzed by 1.5% gel electorphoresis. Results are representative of three experiments.

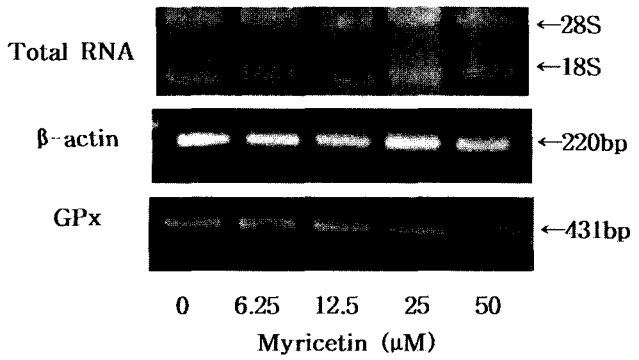


**Fig. 3** – Glutathione peroxidase (GPx) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin exposure. Melanoma cells were exposed to various concentrations of myricetin and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under the same condition. PCR products were analyzed by 1.5% gel electorphoresis. Results are representative of three experiments.

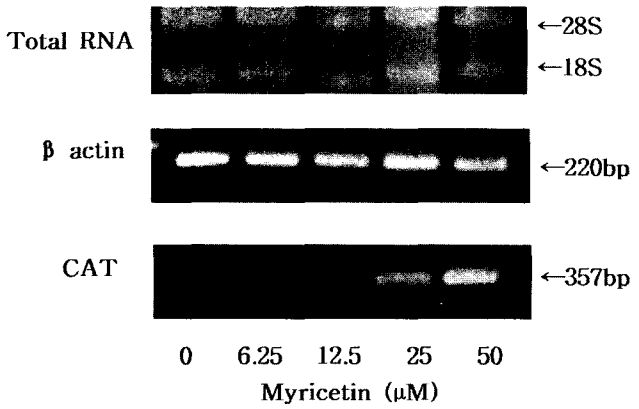


**Fig. 4** – Catalase (CAT) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin exposure. Melanoma cells were exposed to various concentrations of myricetin and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under the same condition. PCR products were analyzed by 1.5% gel electorphoresis. Results are representative of three experiments.

는 SOD나 GPx와는 다르게 myricetin의 농도가 증가할수록 발현이 증가하였다(Fig. 2~4). 이것은 항산화 효소인 CAT의 활성 증가가 유전자 발현에 의한 것임을 나타내는 결과라 생각할 수 있다. 암세포 내에 생성되는 $O_2^-$으로 야기되는 활성산소의 독성을 무독화 시키기 위해 CAT, GPx 등이 SOD와 함께 활성이 증가되며 이 증가된 활성으로 말미암아 ROS의 발생이 억제시키는 역할을 하게 된다. 실험결과에서 나타난 바와 같이 myricetin 처리 시 SOD와 GPx의 활성이 감소하는 이유는 SOD와 GPx의 유전자 발현이 감소하여 일어난 현상이며 CAT의 경우에는 유전자 발현이 증가되어 효소의 활성이 증가되게 된다. Rohrdanz 등은 hepatoma cells에서 flavonoids는 항산화 효소인 catalase의 mRNA의 발현을 증가시켰다고 보고하였으며,[21] 또한 human melanoma cells에서도 flavonoid가 tumor cell의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다.[22]

이상의 결과들을 보면 myricetin의 항산화 효소계를 통한 항산화 작용은 $H_2O_2$의 분해효소인 CAT의 mRNA의 발현을 통하여 CAT의 활성을 증가시키며 ROS의 발생을 효과적으로 억제함으로써 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 결 론

B16F10 세포에 myricetin 처리시 농도가 증가함에 따라 항산화효소 중 SOD나 GPx는 감소시켰으나 CAT의 활성은 증가시켰다.

B16F10 세포에 myricetin 처리시 농도가 증가함에 따라 ROS 발생에 대한 억제율이 커짐을 알 수 있었다.

Myricetin 처리시 항산화효소의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 검토해본 결과 항산화효소 중 SOD나 GPx의 발현에는 영향이 없었으나 CAT의 발현은 증가시켰다.

## 감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2003년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1) Borish, E. T., Prior, W. A. and Venugopal, S. : DNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis* **8**, 1517 (1987).
2) Machlin, L. J. and Bendich, A. : Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* **1**, 441 (1987).
3) Matés, J. M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. : Antioxidant enzymes and human disease. *Clin. Biochem.* **32**, 595 (1999).
4) Mossman, B. T. and Marsh, J. P. : Evidence supporting a role for active oxygen species asbestos-induced toxicity and lung disease. *Environ. Health Perspect.* **81**, 91 (1989).
5) Tniguchi, N. : Clinical significances of superoxide dismutases: Change in aging, diabetes, ischemia, and cancer. *Adv. Clin. Chem.* **29**, 51 (1992).
6) Cross, E. E., Halliwell, B., Borish, E., Pryor, W. A., Ames, B. B., Saul, R. L. and Mccord, J. M. : Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* **107**, 526 (1987).

7) Formica, J. V. and Regelson, V. : Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061 (1995).
8) Inal, M. E. and Kahraman, A. : The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* **154**, 21 (2000).
9) Inal, M. E., Kahraman, A. and Koken, T. : Bebeficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet. *A. Clin. Exp. Dermatol.* **26**, 536 (2001).
10) Robak, J. and Gryglewski, R. J. : Bioactivity of flavonoid. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **48**, 558 (1996).
11) Husain, S. R., Cillard, J. and Cillard, P. : Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* **26**, 2489 (1987).
12) Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. : Flavonoid as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 143 (1990).
13) Robak, J. and Gryglewski, R. J. : Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 837 (1988).
14) Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R. : Tetrasodium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515 (1991).
15) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
16) Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and Positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 329 (1987).
17) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158 (1967).
18) Aebi, H. : Catalase *in vitro. Method in Enzymology* **105**, 93 (1984).
19) Sattler, M., Winkler, T., Verma, S., Byrne, C. H., Shrikhande, G., Salgia, R. and Griffin, J. D. : Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* **93**, 2928 (1999).
20) McCord, J. M. : Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. In: Hodgson, E., Bend, J. R., Philpot, R. M., eds. *Reviews in Biochemical Toxicology* **1**, 109 (1979).
21) Rohrdanz, E., Bitter, A. and Tran-Thi, Q. : The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzyme in hepatoma cells. *Arch. Toxicol.* **77**, 506 (2003).
22) Rohrdanz, E., Ohler, S., Tran-Thi, Q. and Kahl, R. : The phytoestrogen daidzein effects the antioxidant enzyme system of rat hepatoma H4IIE cells. *J. Nutr.* **132**, 370 (2002).