

Myricetin과 Taurine의 병용 투여가 B16F10 세포의 항산화 효소계에 미치는 영향

유지선 · 김안근[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received February 6, 2006; Revised February 17, 2006)

Effect of Myricetin Combined with Taurine on Antioxidant Enzyme System in B16F10 Cell

Ji Sun Yu and An Keun Kim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Abstract — The antioxidant enzyme (AOE) system plays an important role in the defense against oxidative stress damage. To determine whether myricetin or myricetin/taurine can exert antioxidative effects not only by modulating the AOE system directly but also by scavenging free radical, we investigated the influence of the myricetin and taurine on cell viability, ROS level, activities of different antioxidant enzyme, and the expression of different antioxidant enzyme. As results, the cell viability showed inhibition of the proliferation with treatment of 'myricetin' or 'myricetin with taurine', respectively, with dose-dependent manner. Compared to control, the treatment of 'myricetin' decreased activities and gene expressions of superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx). However, combined treatment of 'myricetin with taurine' increased activities and gene expressions of the SOD, GPx, and catalase (CAT). In addition, the combined treatment of 'myricetin with taurine' somewhat decreased ROS levels, compared to the treatment of 'myricetin'. In conclusion, our study provides that the combined treatment of different antioxidants can enhance antioxidant effects.

Keywords □ antioxidant enzyme, myricetin, taurine, ROS

호기성 생물은 풍부한 산소를 전자 수용체로 하는 호흡을 통해 에너지를 획득하며 대사과정의 부산물로 hydroxyl radicals (OH), superoxide anion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 nitric oxide(NO)를 포함하는 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)를 생산한다. 방사선, 염증, 공기 오염물질, 담배연기, ischemia 등과 같은 비정상적인 조건에서 ROS가 과도하게 생산되면^{1,2)} 이로 인해 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA를 손상시킨다.³⁾ 이러한 활성산소종과 그 유도체는 암을 유발하고 전이하는 것에도 관여하고 있다. 호기성 유기체들은 이러한 활성산소종과 그 유도체의 과도한 축적을 막기 위하여 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase(CAT)와 같은 항산화효소 또는 항산화제의 작용을 통하여 ROS로 인한 손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾

Flavonoid는 항박테리아, 항바이러스, 항혈전증, 항염증, 항알레르기, 항암 효과, 항산화활성 등의 다양한 생물학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 free radical 생성과 관련된 전이 원소를 chelation하거나 효소의 저해에 의해 ROS의 생성을 억제하며 ROS를 scavenging하는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹⁰⁾

본 연구에서는 암세포에서 flavonoid의 항산화 효소활성에 대한 연구의 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포에서 flavonoid의 일종인 myricetin과 항산화제로도 알려져 있는 taurine을 병용 처리하여 myricetin을 단독 처리한 결과와 비교하여 항산화 효과를 알아보았다. 이를 위해 항산화 효소의 활성 변화, ROS level의 변화 등을 측정하였다. 또한 유전자의 발현 정도를 알아보기 위한 RT-PCR을 실행하여 이를 보고하고자 하였다.

실험 방법

세포배양

Mouse melanoma cell로부터 유래된 B16F10 cell은 한국 세

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

포주 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% CO₂ incubator에서 배양하였다. 25 cm³ tissue culture flask나 75 cm³ tissue culture flask에서 계대 배양하고 confluent되었을 때 cell dissociation solution을 처리하여 실험에 이용하였다.

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), CO₂ incubator(Forma science), table top centrifuge(Hanil science industrial Co. Ltd.), centrifuge(supra21K, Hanil science industrial Co. Ltd.), inverted microscope(Olympus CK2), UV/visible spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech).

시료의 조제

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

세포생존률 측정

B16F10 cell suspension을 1×10⁵ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 µl씩 가하여 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨다. Taurine을 농도별로 단독 처리하거나 myricetin과 병용 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.¹¹⁾

항산화 효소의 활성 측정

시료의 처리와 단백질 정량은 3×10⁶ cells/ml의 B16F10 cell suspension을 150π tissue culture dish에 가한다. 배양기에서 24시간 동안 안정화 시킨 후 일정농도의 myricetin에 taurine을 농도별로 처리하여 24시간 배양한다. Culture dish에서 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 농도별 sample을 얻고 상층액을 제거한 pellet에 lysis buffer 1 ml를 가한다. Lysis buffer를 가한 각각의 sample을 14,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 enzyme assay sample로 사용하였다. Sample protein의 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 standard로 사용하여 BCA(bicinchoninic acid) protein assay를 하였다.¹²⁾

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정은 hematoxylin을 이용한 Martin의 방법을 사용하였다.¹³⁾ 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 µl를 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.¹⁴⁾ GPx의 반응 동안 glutathione(GSSG)은 GSH의 일정 농도에 대해서 제공되는 과잉의 glutathione reductase(GR)에 의해 환원되며 이 때 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 H₂O₂ 0.1 ml, 6 mM NADPH 0.1 ml를 각각 가한 후 5분간 preincubation시킨다. 여기에 각각의 sample을 가하여 UV/visible spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후 다시 흡광도를 측정한다.

Catalase(CAT)의 활성측정 CAT의 활성 측정은 hydrogen peroxide의 분해에 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi 방법을 이용하였다.⁵⁾ 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 30% H₂O₂를 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⁻¹cm⁻¹의 extinction 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 2×10⁴ cells로 가한 후 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 H₂O₂나 superoxide에 의해 산화될 때 형광을 나타낸다. 산화된 DCF의 형광성은 485 nm의 excitation wavelength와 530 nm의 emission wavelength에서 측정한다.¹⁵⁾

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

3 × 10⁶ cells/ml의 B16F10 cell suspension을 150π tissue culture dish에 가한다. 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후 myricetin을 단독 혹은 taurine을 병용처리하여 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 상층부와 동량의 isopropanol을 가한 후 4°C, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 pellet만 남기고 상등액을 제거한다. 70% Et-OH로 RNA pellet을 세척하여 4°C, 12,000 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 RNA는 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. Cycling 조건과 primer의 sequence는 Table I와 같다. 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)
<i>β-actin</i>			
Forward	CATCCATCATGAAGTGTGACG	52.5	220
Reverse	CATACTCCTGCTTGCTGATGG		
<i>Cu/Zn SOD</i>			
Forward	TTAACTGAAGGCCAGCATGGG	60	335
Reverse	ATCACTCCACAGGCCAAGCGG		
<i>Mn SOD</i>			
Forward	TGCACCACAGCAAGCACCATG	55	413
Reverse	CTCCCACACGCAATCCCCAG		
<i>GPx</i>			
Forward	CTCGGTTTCCCGTGCAATCAG	65	431
Reverse	GTGCAGCCAGTAATCACCAAG		
<i>CAT</i>			
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 세포에 myricetin과 taurine을 병용 투여하여 MTT assay를 통해 배양기간은 2일로 고정하여 세포의 생존율을 관찰하였다. Myricetin의 농도는 강한 세포독성을 나타내지 않는 최고 농도인 50 μM로 동일하게 처리하였으며 Myricetin(50 μM)과 taurine을 병용 처리시 세포 생존율은 taurine 5 mM에서 강한 세포 독성을 나타내지 않았으므로 taurine은 이 농도를 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다.

항산화 효소 활성에 미치는 영향

항산화 효소계는 산화적인 스트레스로부터 생체를 보호하는 중요한 역할을 하며 SOD, GPx, CAT 등은 유해한 활성산소를 제거하는 대표적인 항산화 효소이다. 이들 항산화 효소들이 강한 독성을 나타내지 않는 농도에서 myricetin과 taurine을 병용 처리하였을 때 항산화 효소계의 변화를 통해 항산화제로서의 역

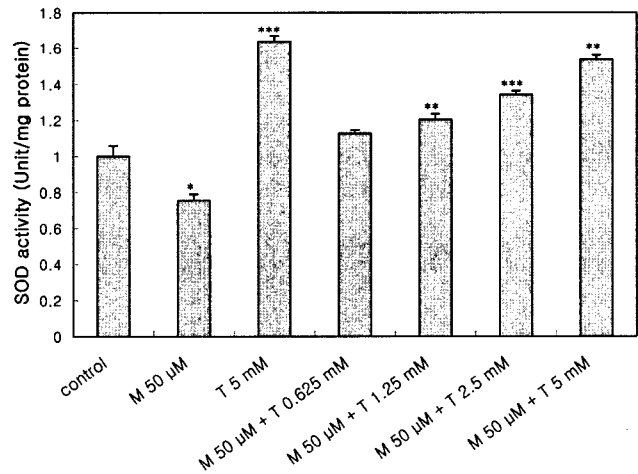


Fig. 1 - Effect of myricetin, taurine and various concentration taurine in the presence of myricetin on superoxide dismutase (SOD) activities in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to of myricetin 50 μM, taurine 5 mM, various concentrations of taurine in the presence of 50 μM myricetin for 24 hr. The treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 568 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with ±S.E. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 compared with control. M 50 μM : myricetin 50 μM, T : taurine.

활을 증가시키는가의 여부를 알아보기 위해 실험을 시행하였다. Taurine은 4가지 농도를 선택하여 단독 처리 혹은 myricetin 50

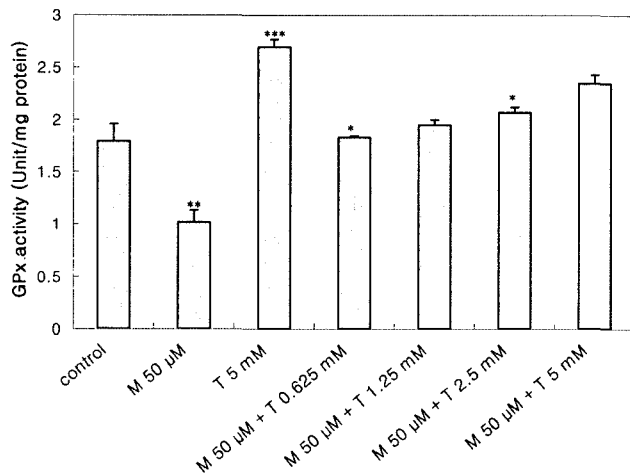


Fig. 2 – Effect of myricetin, taurine and taurine in the presence of myricetin on glutathione peroxidase (GPx) activities in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to of myricetin 50 μ M, taurine 5 mM, various concentrations of taurine in the presence of 50 μ M myricetin for 24 hr. The treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 340 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm S.E. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 compared with control. M 50 μ M : myricetin 50 μ M, T : taurine.

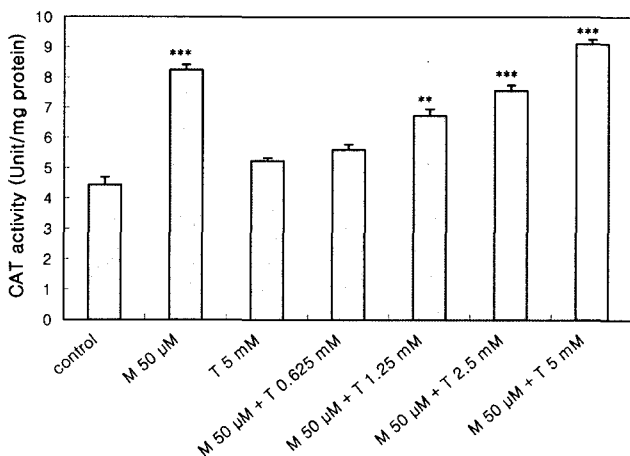


Fig. 3 – Effect of myricetin, taurine and taurine in the presence of myricetin on catalase (CAT) activities in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to of myricetin 50 μ M, taurine 5 mM, various concentrations of taurine in the presence of 50 μ M myricetin for 24 hr. The treated cells and control cells were harvested and protein was isolated from the cells. Absorbance of each enzyme sample was read at 240 nm. Results are expressed as average of triplicate samples with \pm S.E. ** P <0.01 and *** P <0.001 compared with control. M 50 μ M : myricetin 50 μ M, T : taurine.

μ M과 병용 처리하였다. 24시간 후에 이들 sample에서 protein 을 얻어 실험하였다.

SOD와 GPx의 활성 측정실험에서 myricetin을 단독 처리한 경우, 최고 농도인 50 μ M에서 활성이 control에 비해 각각 24%, 43% 감소하였으나, taurine과 병용 처리하였을 때는 농도가 증가할수록 SOD, GPx 활성이 증가하여 taurine 5 mM 농도에서 SOD 활성은 control에 비해 1.53배, GPx 활성은 1.31배 증가하였다(Fig. 1, 2).

CAT의 활성은 myricetin(50 μ M) 을 단독 처리시에도 높은 활성을 나타내어 control에 비해 1.85배 증가하였으며, taurine과 병용 처리시 농도가 증가할수록 활성이 증가하여 taurine의 최고 농도인 5 mM 농도에서 CAT의 활성은 control에 비해 2.05배 증가하였다. 또한 myricetin과 taurine을 병용 처리한 실험군은 myricetin(50 μ M) 단독 처리시 보다 활성이 1.1배 더 높았다(Fig. 3).

Reactive oxygen species(ROS) level에 미치는 영향

Myricetin과 taurine의 병용 처리가 항산화 효소의 활성을 증가시키기가 확인되어 이런 효소들의 활성이 직접 활성산소의 제거에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 taurine을 myricetin 50 μ M과 병용 처리하여 ROS level을 측정하였다. 실험에 사용된 taurine은 myricetin과 병용 처리시 항산화 효소 활성을 가장 높이는 농도인 5 mM을 사용하였다. Myricetin을 단독 처리 혹은 taurine과 병용 처리시 ROS level이 control에 비해 각각 약

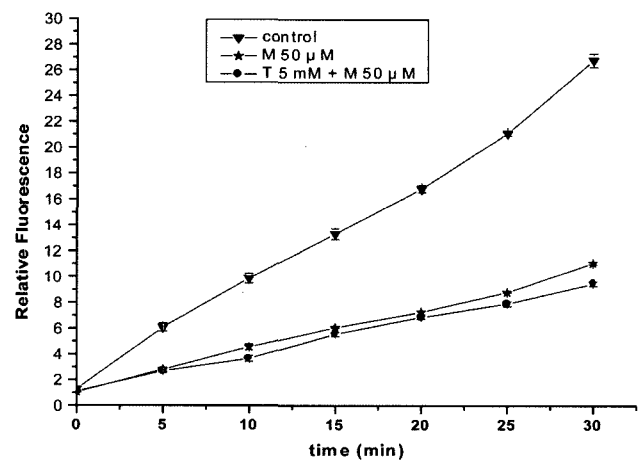


Fig. 4 – Measurement of reactive oxygen species (ROS) level after myricetin and taurine treatment in the presence of myricetin. The melanoma cells (2×10^4 /well) were incubated with myricetin 50 μ M 5 mM taurine in the presence of myricetin 50 μ M. And then 200 μ l DCFH-DA (50 μ M) was added as a substrate for ROS. After incubation for 30 min. ROS level were measured by spectrofluorometer (excitation : 485 nm, emission : 530 nm). Results are representative of three experiments and each performed in triplicates (M : myricetin, T : taurine).

58.7%($P < 0.001$), 61.8%($P = 0.009$) 감소하였다(Fig. 4).

유전자 발현에 미치는 영향

B16F10 cells에 taurine과 myricetin 50 μ M을 병용 처리 혹은 단독 처리 모두에서 항산화 효소들의 활성 변화를 확인할 수 있었다. 이에 따라 SOD, GPx, CAT의 활성 변화가 유전자 발현에 의한 것인지를 알아보기 위해 RT-PCR을 실행하였다.

Myricetin을 단독 처리시 CuZn SOD의 발현에는 영향을 미치지 못하였으나, Mn SOD와 GPx는 발현이 감소됨을 확인할 수 있었다. taurine을 단독 처리 혹은 Myricetin과 taurine을 병용

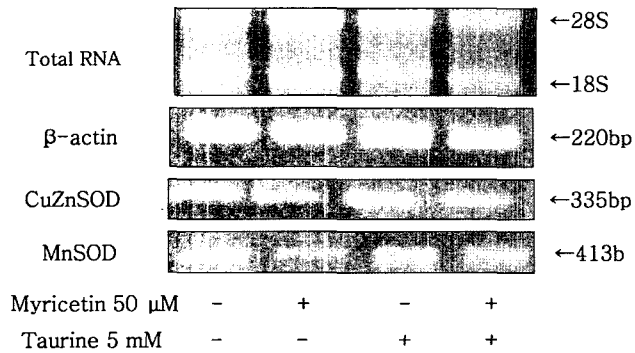


Fig. 5 - Copper zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) and manganese superoxide dismutase (Mn SOD) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin presence in the taurine exposure. Melanoma cells were exposed to myricetin 50 μ M or myricetin 50 μ M presence in the taurine 5 mM and then incubated for 24 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 each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Results are representative of three experiments.

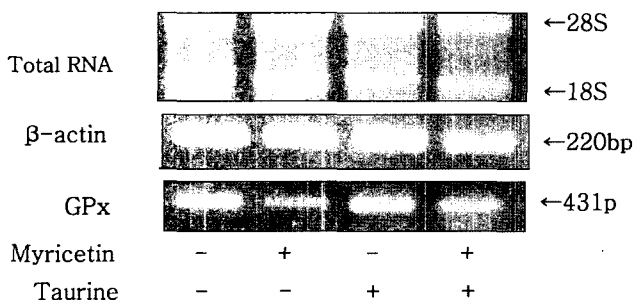


Fig. 6 - Glutathione peroxidase (GPx) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin presence in the taurine exposure. Melanoma cells were exposed to myricetin 50 μ M or myricetin 50 μ M presence in the taurine 5 mM and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Results are representative of three experiments.

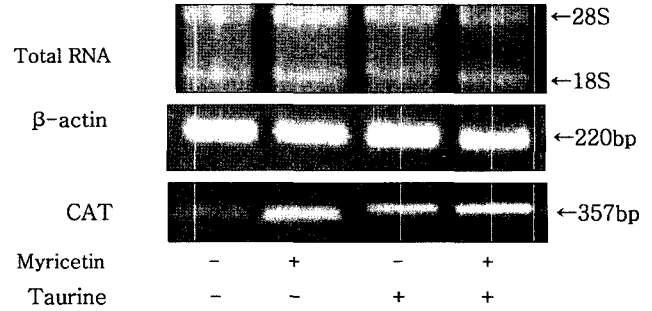


Fig. 7 - Catalase (CAT) mRNA expression in B16F10 cells after myricetin presence in the taurine exposure. Melanoma cells were exposed to myricetin 50 μ M or myricetin 50 μ M presence in the taurine 5 mM and then incubated for 24 hr. After culture, the cells were harvested and total RNA was examined by electrophoresis. RT-PCR was carried out with the same amount of cDNA under each conditions. PCR products were analyzed by 1.5% gel electrophoresis. Results are representative of three experiments.

처리한 실험군에서는 Mn SOD, GPx 발현이 control에 비해서 모두 증가하였으나 이 경우에도 CuZn SOD 발현에는 영향을 미치지 못했다. SOD나 GPx와는 다르게 CAT의 경우 taurine과 myricetin의 단독 투여시에 control 보다 효소 활성이 증가되며 특히 myricetin인 경우 CAT 효소 활성이 매우 증가되었다. Myricetin과 taurine을 병용 투여시 taurine 농도가 낮은 경우에는 오히려 CAT 효소 활성이 myricetin 단독 투여 때보다도 감소되었으나 농도가 증가할수록 점점 높아지는 것으로 나타났으며 유전자 발현도 같은 양상을 나타내었다(Fig. 5, 6, 7).

이상의 실험결과를 볼 때 myricetin에 taurine을 병용 투여함으로써 myricetin만을 투여한 경우 control 보다도 낮았던 SOD와 GPx의 효소활성이 증가하는 것을 알 수 있었으며 효소활성이 변화되는 것은 해당효소의 유전자 발현에도 영향을 미치는 것으로 나타났다.

결론

B16F10 cell에서 flavonoid인 myricetin과 항산화제로 알려진 taurine을 병용 처리하여 이들이 세포내 항산화 효소 활성 및 유전자 발현 변화를 살펴본 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

Myricetin에 taurine을 병용 투여하여 줌으로써 myricetin만을 투여했을 때 control 보다도 낮았던 SOD나 GPx의 활성을 증가시키는 역할을 했으며 이때 이 효소들에 해당하는 유전자 발현도 증가되었다. CAT의 경우 taurine이나 myricetin을 각각 단독으로 투여한 경우 SOD나 GPx와는 다르게 control 보다 효소 활성이 증가되며 특히 myricetin의 경우 CAT 효소 활성이 매우 증가되었다. Myricetin과 taurine을 병용 투여시 taurine 농도가 낮

은 경우에는 오히려 myricetin 단독 투여 때보다도 활성이 감소되었으나 농도가 증가할수록 CAT 효소 활성이 점점 높아지는 것으로 나타났으며 유전자 발현도 같은 양상을 나타내었다.

이 연구 결과는 항산화제를 병용시킴으로써 단독처리보다 항산화효소 활성을 증가시키고 ROS 발생으로 인한 질병예방 및 의약품 개발에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2004년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Borish, E. T., Prior, W. A. and Venuugopal, 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., Pérez-Gómez, C. and Núñez de Castro, I. : Antioxidant enzymes and human disease. *Clin. Biochem.* **32**, 595 (1999).
- 4) McCord, J. M. : Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. In: Hodgson, E., Bend, J. R. and Philpot, R. M., eds. *Reviews in Biochemical Toxicology* **1**, 109 (1979).
- 5) Aebi Hugo : Catalase *in vitro*. *Method in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- 6) 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).
- 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. : Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet. *A. Clin. Exp. Dermatol.* **26**(6), 536 (2001).
- 10) Robak, J. and Gryglewski, R. J. : Bioactivity of flavonoid. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **48**, 558 (1996).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**(2), 329 (1987).
- 14) Flohè Leopold and Wolfgang A Günzler : Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**, 93 (1984).
- 15) 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).