

B16F10 세포에서 Flavonoid인 Myricetin과 Vitamine C, Vitamine E의 병용 투여가 항산화 효소계에 미치는 영향

유지선 · 김안근*
숙명여자대학교 약학대학

Effect of Myricetin Combined with Vitamin C or Vitamin E on Antioxidant Enzyme System in 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-radical scavenging abilities. To determined flavonoid, myricetin in the presence of other antioxidants - vitamin C and vitamin E - can exert antioxidative properties not only directly by modulating the AOE system but also scavenging free radical, we investigated cell viability, antioxidant enzyme activities and ROS level in B16F10 murine melanoma cell. B16F10 cells were exposed to medium containing myricetin in the presence or absence of vitamin C or vitamine E for a period of 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. In co-treating myricetin with other antioxidants, CAT activities were increased, compared with control, but SOD and GPx activities were decreased, compared with each antioxidant treated groups. In the group of myricetin or myricetin present with other antioxidants, ROS levels were decreased dose-dependently. Especially, myricetin present of other antioxidants were decreased compared with myricetin.

Key words – antioxidant enzyme, myricetin, vitamin C, vitamin E, ROS

호기성 생명체는 산소를 이용하는 정상적인 대사과정의 부산물로 hydroxyl radicals($\cdot\text{OH}$), superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide(H_2O_2)와 nitric oxide(NO)를 포함하는 반응성이 매우 큰 reactive oxygen species(ROS)을 생산한다. ROS는 방사선, 염증, 공기 오염물질(O_3 , NO_2), 담배연기, reperfusion injury, ischemia 등과 같은 비정상적인 조건에서 과도하게 생산되면^{1,2)} 이로인해 세포막의 지질, 조직의 protein 또는 효소, 탄수화물, DNA에 산화를 유발시켜 세포막의 손상, 단백질의 변형, DNA를 손상시킨다.³⁾ 호기성 유기체들은 vitamin E와 같은 화학적 항산화 물질, 그리고 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx)와 같은 항산화 효소를 통하여 ROS로 인한 손상을 감소시키는 것으로 알려져 있다.^{4,6)}

그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래된 단어인 flavonoid는 방향족 아미노산(phenylalanine, tryptophan)과 식물

에서 malonate로부터 형성되는 phenolic 화합물이다. 일반적으로 식물에서 glycoside로 된 형태의 과생물이며 잎, 꽃, 과일에서 빨간색, 오렌지색, 파란색 등을 띠게 하는데 관여하고 식물의 성장·발생·면역에 중요한 역할을 한다.⁷⁾ 잎이 무성한 야채, 과일 외에도 와인, 차, 맥주와 같은 음료와 씨앗, 땅콩, 곡류, 향신료, 약용 식물 등에 널리 분포한다. 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.⁸⁻¹¹⁾ Flavonoids의 항산화 특성은 lipid peroxidation의 개시에 영향을 주는 높은 반응성을 나타내는 $\cdot\text{OH}$ ¹²⁾와 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^{13,14)}에 직접적으로 영향을 준다.

본 실험에서는 항산화효소 활성화에 대한 연구의 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포에서 flavonoid의 한 종류인 myricetin을 단독 또는 항산화제로 알려져 있는 vitamin C, vitamin E 등을 병용 투여하여 그 효과를

*교신저자(E-mail) : akkim@sdic.sookmyung.ac.kr
(FAX) : 02-710-9561

알아보았다. 이를 위해 세포 생존률을 알아보기 위한 MTT assay, reactive oxygen species(ROS) level의 변화, 항산화 효소의 활성 변화등을 측정하였다.

실험 방법

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

시료의 조제 - myricetin과 β-carotene은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에, taurine는 phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 0.2 µm pore size syringe filter로 여과하여 stock solution을 만들었다. 실험에 이용하기 직전에 DMSO와 ethanol의 최종농도가 0.1%가 되도록 RPMI 1640 세포배양 배지로 희석하여 사용하였다.

세포 생존률 측정 - MTT assay - B16F10 cell suspension을 1 × 10⁵ cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 µl씩 가하여 배양기에서 24시간동안 안정화 시킨다. myricetin을 농도별로 단독 투여하거나 혹은 다른 항산화제들과 함께 병용 투여한 후 24시간동안 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 formazon을 완전히 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁵⁾

항산화 효소의 활성 측정 - 시료의 처리는 2.5 × 10⁶ cells/ml의 B16F10 cell suspension을 150 π tissue culture dish에 가한다. 배양기에서 24시간동안 안정화시킨후 myricetin 혹은 myricetin과 다른 항산화제를 농도별로 처리하여 24시간 배양한다. Culture dish에서 배지를 제거하고 PBS로 세척하여 농도별 sample을 얻고 상층액을 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 protein assay을 하였다.¹⁶⁾

Superoxide dismutase (SOD)의 활성 측정은 hematoxylin을 이용한 Martin의 방법을 사용하였다.¹⁷⁾ 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 측정하였다.

Glutathione peroxidase(GPX)의 활성측정은 Paglia와 Valetine의 방법에 의해 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.¹⁸⁾ 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 H₂O₂ 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 측정하였다.

Catalase(CAT)의 활성측정은 hydrogen peroxide의 분해를 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 generation의 측정 - B16F10 cell suspension을 96 well plate에 각 well당 1 × 10⁵ cells로 가한후 24시간 동안 배양하였다. 시료를 농도별로 처리한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해준다. 상온에서 50 µM DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate; Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)를 처리 한 후 Cytofluor 2350 plate reader(Millipore, Bedford, MA, USA)를 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 측정하였다.¹⁹⁾

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 생존률 측정 - B16F10 세포에 myricetin을 vitamin

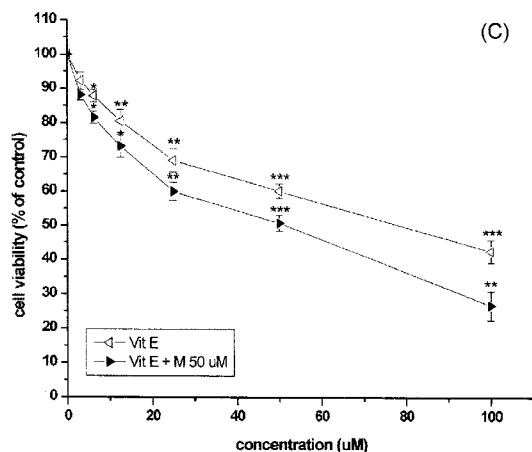
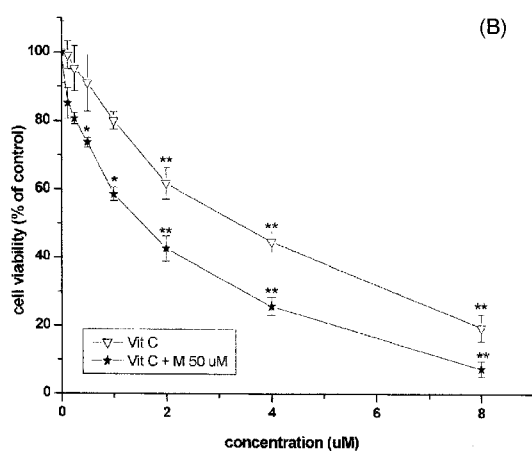
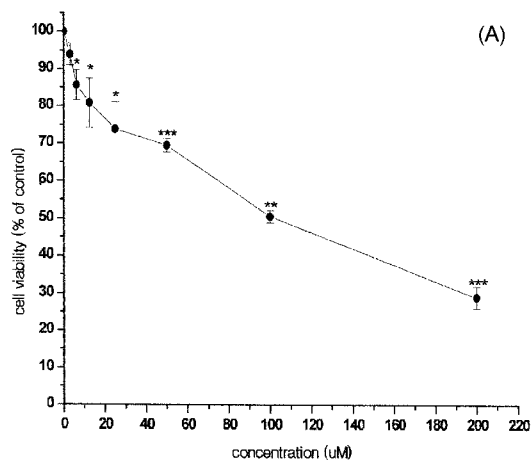


Fig. 1. Cell viability of B16 melanoma cells after treatment with (A) myricetin and (B) vitamin C or (C) vitamin E in the presence of 50 μ M myricetin. The cells were exposed to various concentrations of (A) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μ M myricetin for 24 hr. Percentage of cell viability was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Values are means \pm S.E. and were obtained from three different experiments; * P <0.05, ** P <0.01 *** P <0.001 vs. control. M 50 μ M : myricetin 50 μ M.

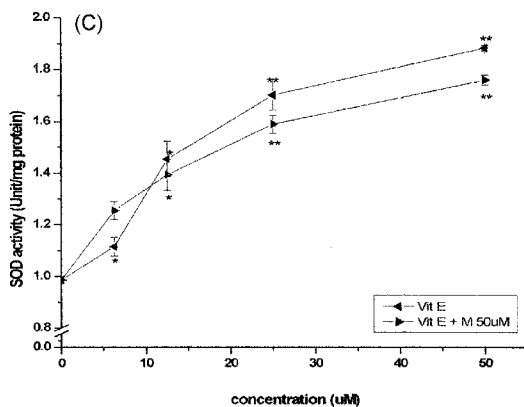
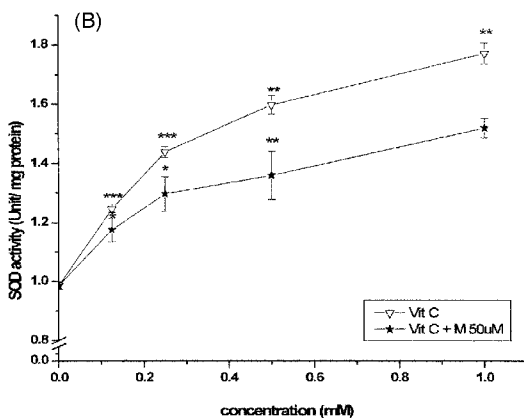
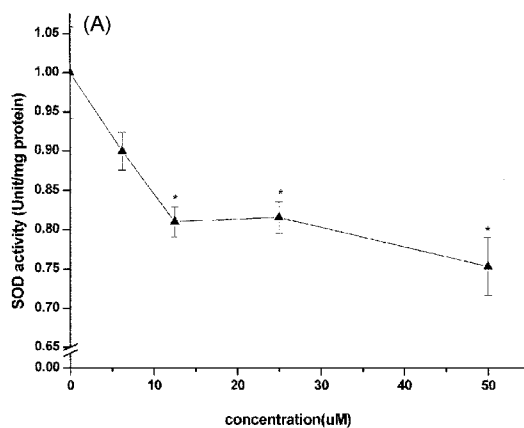


Fig. 2. Effect of (A) myricetin and (B) vitamin C or (C) vitamin E in the presence of 50 μ M myricetin on superoxide dismutase (SOD) activities in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to various concentrations of (A) myricetin (B) vitamin C or (C) vitamin E in the presence of 50 μ M myricetin-treated 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 \pm S.E. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with control. M 50 μ M : myricetin 50 μ M.

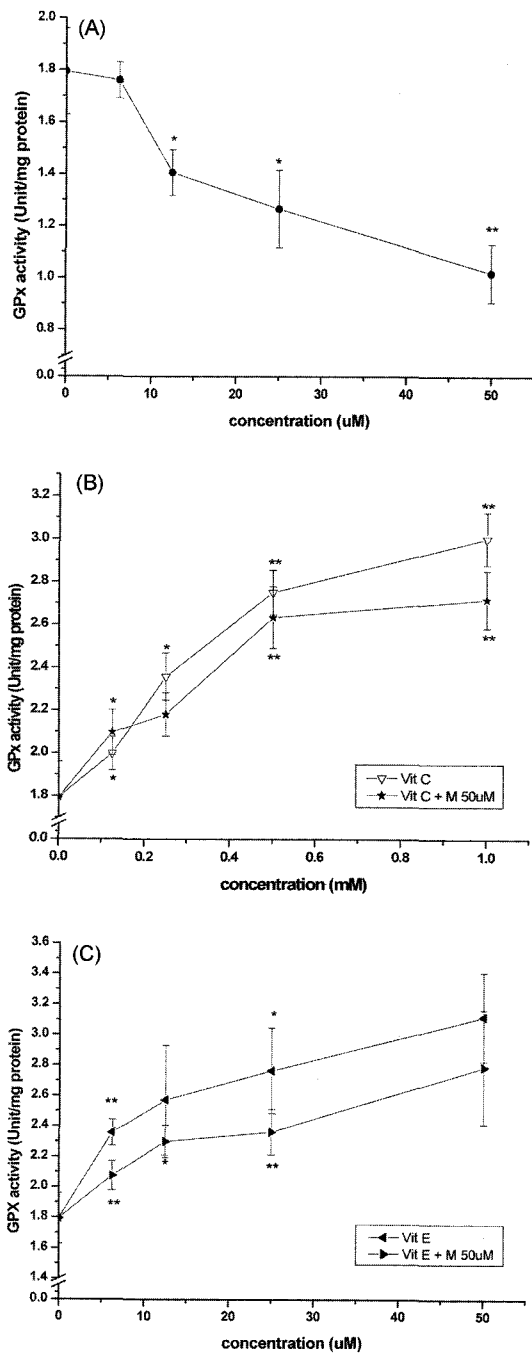


Fig. 3. Effect of (A) myricetin and (B) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin on glutathione peroxidase (GPx) in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to various concentrations of (A) myricetin and (B) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin for 24 hr. The (A) myricetin-treated (B) vitamin C or (C) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin-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, *** P <0.001 compared with control. M 50 μM : myricetin 50 μM .

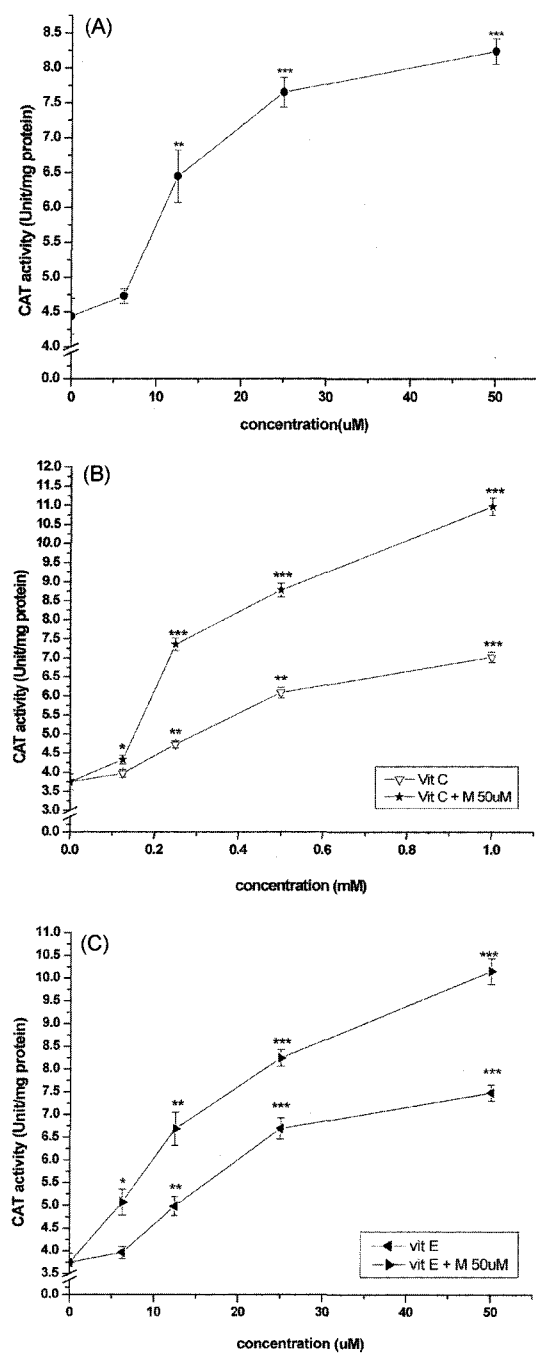


Fig. 4. Effect of (A) myricetin and (B) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin on catalase (CAT) in B16F10 murine melanoma cells. The cells were exposed to various concentrations of (A) myricetin and (B) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin for 24 hr. The (A) myricetin-treated and (B) vitamin C or (B) vitamin E in the presence of 50 μM myricetin-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 <0.05, ** P <0.01, *** P <0.01 compared with control. M 50 μM : myricetin 50 μM .

C나 vitamin E와 병용 투여하여 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 관찰하였다. 병용 처리하는 myricetin의 농도는 세포독성을 나타내지 않는 최고 농도인 50 μM 로 동일하게 처리하였으며 vitamin C는 0.125-8 mM, vitamin E는 6.25 - 100 μM 의 농도 범위에서 실험을 시행하였다. Myricetin 50 μM 과 병용 처리한 결과 세포 생존율이, vitamin C는 1 mM에서 62%, vitamin E는 50 μM 에서 52.5%에서 59.9%로 세포 독성을 나타내지 않았으므로 이 농도를 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다(Fig. 1).

항산화 효소 활성에 미치는 영향 - Myricetin을 단독 처리하였을 때 SOD, GPx의 활성은 감소하였으나 CAT의 활성은 증가한 것으로 나타났다. 이에 따라 독성을 나타내지 않는 농도에서 myricetin과 다른 항산화제를 병용 처리하였을 때 항산화 효소계의 변화를 통해 항산화제로서의 역할을 증가시키는가의 여부를 알아보기 위해 실험을 시행하였다. Vitamin C와 vitamin E는 세포 생존율 실험에서 독성을 나타내지 않았던 농도를 최고 농도로 하여 4가지 농도를 선택하여 단독 처리 혹은 myricetin 50 μM 과 병용 처리하였다. 24시간 후에 이들 sample에서 protein을 얻어 실험하였다.

Superoxide dismutase 활성에 미치는 영향은 vitamin C, vitamin E는 농도가 증가할수록 활성이 증가하였으나 myricetin 경우에는 감소하였다. Control에 비해 vitamin C가 1 mM일 때 1.78배, vitamin E가 50 μM 일 때는 1.9배 증가하였다. Myricetin 50 μM 과 병용 처리한 경우는 vitamin C나 vitamin E 각각의 실험군보다 활성이 감소하였으나 myricetin 50 μM 을 단독 처리한 경우보다는 증가하였다(Fig. 2).

Glutathione peroxidase 활성에 미치는 영향은 항산화제를 단독 처리한 경우, vitamin C와 vitamin E에서는 농도가 증가할수록 활성이 증가함을 알 수 있었으나 myricetin인 경우는 감소하여 SOD와 같은 양상을 나타내었다. Control에 비해 vitamin C가 1 mM일 때 1.67배, vitamin E가 50 μM 일 때는 1.74배 증가하였다. Myricetin 50 μM 과 병용 처리한 경우는 vitamin C나 vitamin E를 각각 처리한 실험군보다 활성이 감소하였다. 각 항산화제를 단독 처리 한 실험군에 비해 vitamin C가 1 mM일 때 9.5%, vitamin E 50 μM 일 때 10.6% 감소하였다. 그러나 이들은 myricetin 50 μM 을 단독 처리한 경우보다는 증가하였다(Fig. 3).

Catalase 활성에 미치는 영향은 항산화제를 단독 처리한 경우와 myricetin 50 μM 과 병용 처리한 경우 모두 다 농도가 증가할수록 활성이 증가하였다. 또한 항산화제를 단독 처리한 경우보다 myricetin 50 μM 과 병용 처리한 실험군의 활성이 더 높았다. Vitamin C의 경우 1 mM일 때 단독 처리와 병용 처리한 실험군이 control에 비해 각각 1.87배, 2.93배 증가하였으며, vitamin E 50 μM 일 때 단독 처리와 병용 처리한 실험군이 control에 비해 각각 2배, 2.71배 증가하였

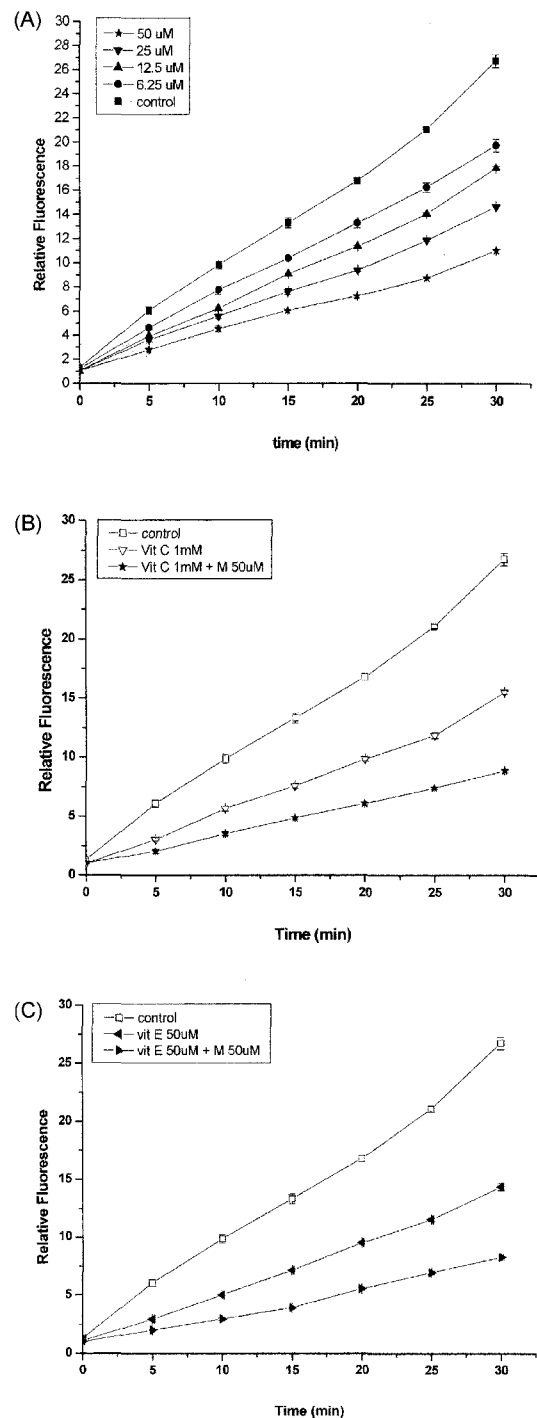


Fig. 5. Measurement of reactive oxygen species (ROS) level. (A) myricetin (B) vitamin C or (C) vitamin E treatment in the presence of myricetin 50 μM . The melanoma cells (2×10^4 /well) were incubated with (A) myricetin at various concentration and (B) 1 mM vitamin C or (B) 50 μM in the presence of myricetin 50 μM and then 200 μl DCFH-DA (50 μM) 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.

다(Fig. 4).

Vitamin C와 vitamin E 단독 투여 시의 SOD나 GPx의 활성보다 myricetin을 병용 투여했을 때에 활성이 더 낮아지는 것은 myricetin 단독 투여시 농도가 증가할수록 SOD나 GPx의 활성이 낮게 나타나는 결과를 볼 때 그러한 원인 때문인 것으로 생각된다.

Myricetin 병용 투여 시 Vitamin C와 vitamin E 단독 투여시보다 Catalase의 활성이 증가하는 것은 myricetin 단독 투여 시에 활성이 크게 나타나는 것과 관련이 있는 것으로 볼 수 있다.

Reactive oxygen species(ROS) level에 미치는 영향
- Myricetin과 다른 항산화제의 병용 처리가 CAT의 활성을 더욱 증가시키므로 이 효소의 활성이 직접 활성산소에 제거에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 각각의 항산화제를 단독 처리 또는 myricetin 50 μ M과 병용 처리하여 ROS level을 측정하였다. 실험에 사용된 vitamin C, vitamin E는 각각 myricetin과 병용 처리시 항산화 효소 활성을 가장 높이는 농도인 1 mM, 50 μ M을 사용하였다. Vitamin C의 경우 단독 처리와 병용 처리한 실험군이 control에 비해 각각 42%(P=0.006), 66.9%(P=0.007) 감소하였다. Vitamin E의 경우 단독 처리와 병용 처리한 실험군이 control에 비해 각각 46.3%(P=0.007), 69%(P=0.007) 감소하였다(Fig. 5).

위의 실험결과 Myricetin을 단독으로 투여한 경우 농도가 증가할수록 SOD나 GPx의 활성은 감소시키나 CAT의 활성은 증가시키는 것으로 보아 myricetin의 항산화작용은 SOD나 GPx 보다는 CAT의 활성을 증가시키므로서 항산화 작용을 나타내며 vitamin C나 vitamin E를 병용 투여함으로써 ROS level을 더 감소시키는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 myricetin과 vitamin C나 vitamin E를 병용 처리하여 항산화 효소의 활성, ROS level을 측정하여 항산화 효과에 대해 알아보았다. Myricetin을 단독으로 투여한 경우 농도가 증가할수록 SOD나 GPx의 활성은 감소하였으나 CAT의 활성은 높게 나타났다.

Myricetin과 vitamin C 또는 vitamin E를 병용 투여한 경우 SOD나 GPx의 활성은 vitamin C 또는 vitamin E를 단독 투여한 경우 보다 낮았다.

Myricetin 단독 처리보다는 myricetin과 vitamin C 또는 vitamin E를 병용 처리한 경우 ROS level을 더욱 효과적으로 억제시켰다.

이상의 실험 결과 myricetin 단독으로 투여하는 것 보다 항산화제의 병용 처리가 세포 독성에는 영향을 미치지 않으면서 ROS level을 감소시키는 것으로 나타났다.

사 사

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

인용문헌

1. Borish E. T., Prior W. A., Venuugopal S., et al. (1987) DNA synthesis is blocked by cigarette tar-induced DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis*. **8**: 1517-1520.
2. Machlin L. J. and Bendich A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*. **1**: 441-445.
3. Matés J. M., Perez-Gomez C., Núñez de Castro I. (1999) Antioxidant enzymes and human disease. *Clin. Biochem*. **32**: 595-603.
4. McCord J. M. (1979) Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. In: Hodgson E. Bend J. R. Philpot R. M., eds. *Reviews in Biochemical Toxicology*. **1**: 109-124.
5. Aebi Hugo (1984) Catalase *in vitro*. *Method in Enzymology*. **105**: 93-127.
6. Paglia D. E. and Valentine W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*. **70**: 158-169.
7. Middleton E. (1996) Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int J Pharmacognosy*. **34**: 344-348.
8. Formica J. V. and Regelson V. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol*. **33**: 1061-1080.
9. Inal M. E. and Kahraman A. (2000) The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology*. **154**: 21-29.
10. Inal M. E., Kahraman A. and Koken T. (2001) Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet. *A. Clin. Exp. Dermatol*. **26**(6): 536-539.
11. Robak J. and Gryglewski R. J. (1996) Bioactivity of flavonoid. *Pol. J. Pharmacol. Pharm*. **48**: 558-564.
12. Husain S. R., Cillard J. and Cillard P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. **26**: 2489-2491
13. Bors W., Heller W., Michel C. and Saran M. (1990) Flavonoid as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. **186**: 143-155.
14. Robak J. and Gryglewski R. J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol*. **37**: 837-841.
15. Vistica D. T., Skehan P., Scudiero D., Monks A., Pittman A. and Boyd M. R. (1991) Tetrasodium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. **51**: 2515-20.
16. 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. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.
17. Martin J. P., Dailey M. and Sugarman E. (1987) Negative and Positive ass superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **255**(2): 329-336.
18. Flohe Leopold and Wolfgang A Gunzler (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology.* **105**: 93.
19. Sattler M., Winkler T., Verma S., Byrne C. H., Shrikhande G., Salgia R. and Griffin J. D. (1999) Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood.* **93**: 2928-2935.

(2004년 11월 25일 접수)