

## MTT formazan의 발색에 미치는 zinc protoporphyrin의 영향

박경아 · 최현아 · 김미리 · 최유미 · 김현정 · 홍정일\*  
 서울여자대학교 자연과학대학 식품공학과

### Changes in Color Response of MTT formazan by Zinc Protoporphyrin

Kyung A Park, Hyun A Choi, Mi-Ri Kim, Yoo Mi Choi, Hyun Jung Kim, and Jungil Hong\*  
 Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University

**Abstract** Zinc protoporphyrin (ZnPP) is produced endogenously during heme metabolism and treated in cells as a heme oxygenase inhibitor. In the present study, the effects of ZnPP on the color response of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, a commonly-used method for analyzing cell viability, were investigated. ZnPP induced rapid decolorization of MTT formazan under light; the degradation rates were 10- and 20- folds faster in the presence of 5 and 10  $\mu$ M ZnPP, respectively. Methylene blue (MB), another type of photosensitizer, also accelerated degradation of formazan under light. Butylated hydroxytoluene did not inhibit ZnPP- or MB-induced formazan degradation. The color degradation of formazan dye was significantly delayed in the presence of *N*-acetylcysteine or  $\beta$ -carotene. The present results suggest that certain photosensitizing compounds may affect the color and stability of MTT formazan, which should be carefully considered when conducting the MTT assay.

**Keywords:** MTT tetrazolium, formazan, zinc protoporphyrin, photosensitizer, cell viability

## 서 론

다양한 식품생리활성 물질에 대한 세포활성, 즉 세포의 성장 및 사멸도 변화를 평가하기 위해 가장 널리 이용되는 방법이 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 시약을 이용한 환원법이다. MTT 시약을 이용하는 tetrazolium assay는 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 세포에 처리할 때, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소에 의해 tetrazolium의 ring 구조가 끊어진 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원되는 원리를 이용한다(1,2). MTT formazan은 일반적으로 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 같은 유기용매에 녹여 흡광도를 측정하는데, 이때 formazan dye의 최대 흡광도는 540 nm 부근이며, 측정된 흡광도 값에 따라 살아있는 세포를 정량적으로 평가할 수 있다(1,2). Tetrazolium assay는 생성된 비수용성 formazan을 용해하기 위해 유기용매를 사용해야 하고, 세포의 생리적 상태나 세포의 종류에 따라 미토콘드리아 탈수소효소 활성의 차이가 나타날 수 있으며, suspension cell에 적용하기 어려운 단점도 있다. 하지만, 비교적 간편하면서도 정확하게 세포 성장 및 사멸도의 변화를 평가할 수 있을 뿐만 아니라, multi-well plate를 사용하여 대량의 시료를 동시에 측정할 수 있기 때문에 *in vitro*상에서의 세포활성을 평가하는데 널리 사용되고 있다(3-5).

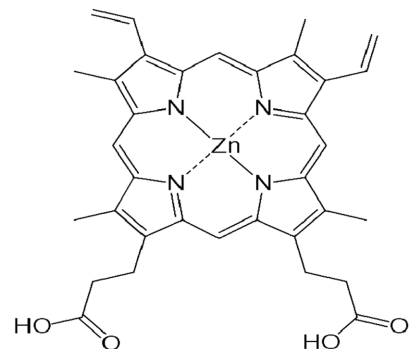


Fig. 1. Structure of zinc protoporphyrin.

Zinc protoporphyrin(ZnPP)는 porphyrin의 대표적인 대사물인 protoporphyrin에 zinc가 삽입된 구조를 가지고 있으며(Fig. 1), heme 생합성 과정 중 ferrous ion이 부족할 경우 생성되는 대사산물이다(6). ZnPP는 만성빈혈, 철 결핍, 납중독 등의 경우 생체 내 생성 농도가 증가한다고 알려져 있어 관련 증상의 지표로도 이용된다(7,8). 또한 ZnPP는 heme oxygenase-1(HO-1)의 inhibitor로서 작용하여 heme의 산화과정을 조절한다고 널리 보고되었다(9). HO-1은 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)와 분자상 산소를 이용하여 heme을 산화적으로 분해하고 carbon monoxide, Fe, biliverdin 등의 산화물을 생성하는 반응을 촉매한다(10). HO-1은 항산화 · 항염증 · 항암 효과 및 세포손상방지 효과 등의 생리활성 작용을 나타낸다고 보고되었으며(10-13), ZnPP는 이러한 HO-1의 활성을 직접적으로 억제하여 세포의 산화스트레스, 염증반응을 촉진한다고 알려졌다(9). 따라서 세포 배양계에 ZnPP를 처리하여 다양한 세포 스트레스, 염증 반응은 물론, HO-1와 관련된 기작 구명 등에 대한 연구도 광범위하게 진행되고 있다(14,15).

\*Corresponding author: Jungil Hong, Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea  
 Tel: 82-2-970-5639  
 Fax: 82-2-970-5977  
 E-mail: hjil@swu.ac.kr  
 Received August 31, 2011; revised October 28, 2011;  
 accepted October 31, 2011

Tetrazolium assay는 세포 내 효소에 의해 생성된 MTT formazan을 용해하여 발색에 따른 흡광도를 측정함으로써 이루어지기 때문에, MTT formazan의 생성과 발색도에 영향을 주는 다양한 요인들이 실험 결과에 지대한 영향을 미칠 수 있다. Tetrazolium assay가 다양한 식이성분의 생리활성을 포함한 세포활성 평가에 광범위하게 이용되고 있으나, 그럼에도 불구하고 MTT formazan의 환원과 발색도에 영향을 미치는 요인으로 세포의 부유상태, 불용성 formazan의 용해에 사용되는 유기용매, 세포 내 처리 물질, 사용배지 등에 대한 일부의 보고가 있을 뿐(2,16,17), 관련 연구는 활발하게 진행되지 않는 실정이다. 본 연구에서는 세포에 의해 자연적으로 생성되거나 또는 다양한 세포실험에 이용되는 ZnPP를 처리한 세포에서 MTT formazan의 발색도에 급격한 변화가 발생하는 것을 파악하고, formazan의 생성과 formazan dye의 안정성에 미치는 ZnPP의 영향 및 관련 기작을 분석하여 MTT assay에 미치는 영향요인에 대한 기본정보를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

실험에 사용된 ZnPP와 methylene blue(MB)는 Sigma-Aldrich chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서, MTT는 Amresco Inc.(Solon, OH, USA)에서 각각 구입하였다. DMSO, zinc sulfate heptahydrate 및 NaOH는 각각 Daejung Chemical & Metals Co.(Gyeonggi, Korea), Showa Chemical Co.(Tokyo, Japan) 및 Dusan Pure Chemical Co.(Gyeonggi, Korea)에서 구입하였다. Buthylated hydroxytoluene(BHT), N-acetylcysteine(NAC),  $\beta$ -carotene, 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl(DPPH) 및 그 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 MEM 배지는 Welgene(Daegu, Korea)에서 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)과 100 unit/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin은 각각 Sigma-Aldrich와 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입하였다.

### 세포배양 및 MTT formazan의 추출

인간 형질전환 정상장관계 세포주 INT 407은 고려대학교 김태성 교수 실험실(Korea Univ., Seoul, Korea)에서, 쥐 대식세포인 RAW264.7은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 각각 분양 받았다. INT 407과 RAW264.7세포는 10% FBS와 100 unit/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin이 포함된 MEM 및 RPMI 배지에서 각각 배양하였고, MEM 배지에는 추가로 1% non-essential amino acid를 첨가하였다. 세포주는 약 80% confluency에 도달하였을 때 계대배양하였고, 온도 37°C, 습도 95% 및 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다.

### ZnPP에 의한 세포독성 평가와 발색도 변화 측정

ZnPP에 의한 세포독성 평가는 MTT colorimetric method를 통해 측정하였다. 상기 조건에서 배양된 INT 407세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 단일 세포 현탁액으로 만든 후, 96 well plate에 well당 1.5×10<sup>4</sup>씩 접종하여 24시간 배양하였다. 이후 배양배지를 제거하고 각 처리 농도로 serum free 배지에 희석한 ZnPP를 well 당 200  $\mu$ L씩 처리하여 24시간 더 배양하였다. 이후 처리 물질을 포함한 serum free 배지는 제거하고, MTT의 최종농도가 0.5 mg/mL이 되도록 serum free 배지에 녹여, 각 well당 100  $\mu$ L씩 첨가하였다. 세포배양기 내에서 약 90분간 반응시킨 후, 배지는 완전히 제거하고 생성된 MTT formazan을 DMSO에 용해시킨 즉시 microplate reader(Triad LT; Dynex Technologies Inc, Chan-

tilly, VA, USA)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 plate를 자연광 하의 실온에 방치하면서 시간별로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 시간에 따른 MTT formazan의 발색도 변화를 측정하였다.

### MTT formazan의 추출

INT 407 또는 RAW264.7세포를 10 cm dish에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 약 80-90% confluency에 도달할 때까지 배양한 후, 0.5 mg/mL MTT 용액을 처리하여 37°C에서 약 2 시간 동안 세포에 의한 MTT formazan 생성을 유도하였다. 이후 세포 외 MTT 용액을 완전히 제거하고 세포 내에 생성된 보라색 MTT formazan을 4 mL의 DMSO에 용해시켜 추출하였다. 이 MTT formazan 원액은 실제 실험상에서의 흡광도가 0.8-1.0 정도가 되도록 DMSO에 희석하여 사용하였다. 한편, DMSO 추출물에 함유된 기타 세포성분의 영향을 가능한 배제하기 위하여, MTT formazan 함유세포에 증류수를 가한 후 3차례 동결과 해동을 거쳐 cell lysates를 만들고 이에 ethyl acetate를 가하여 유기용매 층에 이행된 MTT formazan을 모아 실험을 진행하였다. 두 종류의 세포에서 두 가지 용매 추출방법을 통해 제조된 MTT formazan이 빛과 ZnPP 등에 대해 각각 유사한 정도의 탈색반응이 진행됨을 확인하였고, 이후에 진행된 실험에서는 INT 407세포 유래의 formazan dye를 DMSO로 추출하여 사용하였다.

### MTT formazan의 발색도에 미치는 각종 영향요인 분석

MTT formazan의 발색도에 미치는 ZnPP의 단계별 영향평가를 위하여, ZnPP를 24시간 처리한 INT 407세포에 MTT 시약을 처리한 경우, INT 407세포를 24시간 배양한 뒤 ZnPP를 MTT 발색 단계에 함께 처리한 경우 및 생성된 formazan을 DMSO로 용해하는 과정에 ZnPP를 함께 첨가하는 경우와 같이 ZnPP의 처리시점을 달리한 3종류의 세포에 의해 생성된 formazan dye의 흡광도 변화를 측정하였다. MTT formazan의 안정성에 미치는 ZnPP의 영향을 평가하기 위해 96 well plate에 well당 control DMSO나 ZnPP 또는 MB DMSO solution을 40  $\mu$ L 가하고, 실험에 따라 항산화제를 DMSO에 녹여 40  $\mu$ L 첨가하였다. 이어서 초기 흡광도가 0.8-1.0 사이에 들도록 formazan DMSO 추출물의 농도를 조절하여 80  $\mu$ L를 가한 후 550 nm에서 시간별 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 동일한 조건에서 2개의 plate에 시료를 제조하여 각 plate를 상온의 명소와 암소에 보관하여 빛의 영향을 비교하였다. 한편 24시간 암소에 보관한 plate를 다시 빛에 노출시킨 후, 이후에 진행되는 발색도의 변화를 시간별로 측정하였다.

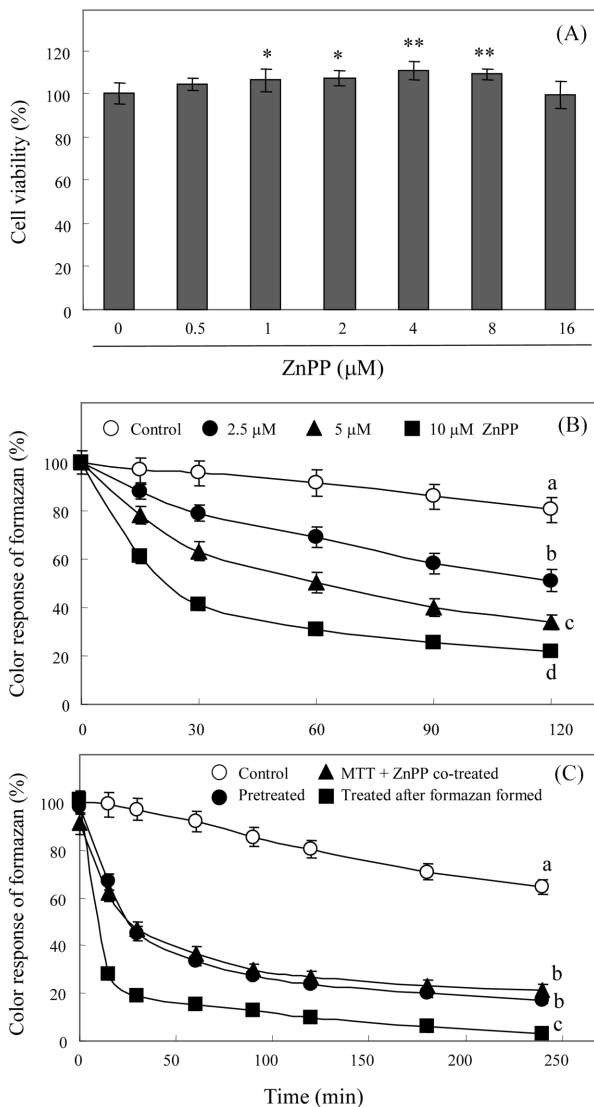
### 결과 분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's *t*-test 또는 one-way ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하여 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다. MTT formazan의 반감기 값은 각 처리조건에서의 550 nm 흡광도 감소 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50%가 감소되는 시간을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### ZnPP에 의한 MTT formazan 발색도의 변화

ZnPP는 생체 내에서 heme 대사와 관련하여 자연적으로 생성될 수 있는 물질로서 빈혈 등의 지표로서 이용될 뿐 아니라(6,7), 특히 널리 알려진 HO-1 등의 저해제로서 관련 세포실험에 빈번



**Fig. 2. Effect of ZnPP on cell viability and changes in color responses of MTT formazan by ZnPP.** Concentration-dependent effects of ZnPP on viability of INT 407 cells were analyzed after 24 h incubation using MTT assay (A). Time-dependent changes in color response of MTT formazan in ZnPP-treated cells (B), and in cells with ZnPP by different treatment schemes (C) were also analyzed. INT 407 cells were treated without (○) or with 10 μM ZnPP for 24 h before MTT assay (●), with ZnPP and MTT tetrazolium simultaneously (▲), or with ZnPP after MTT formazan formed (■) (C). At each time point indicated, color response of MTT formazan was analyzed by measuring absorbance at 550 nm using a microplate reader. Each value represents the mean±S.D. (n=8). Significantly different from control according to Student's *t*-test (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ) (in A). Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (B and C).

하게 투여되는 물질이다(9). 우선 세포의 생존율에 미치는 ZnPP의 영향을 인간 장관계 INT 407 세포에 0-16 μM 농도 범위 24시간 투여하여 조사하였다. 그 결과 최대 농도범위까지 유의적인 세포독성은 나타나지 않았으며 1-8 μM 범위에서 10% 이내로 세포활성을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 흥미롭게도 DMSO에 용해 후 즉시 측정된 세포와 달리, 10분 또는 일정시간 균질화 시킨 후 측정된 ZnPP 처리세포에서는 formazan dye의 발

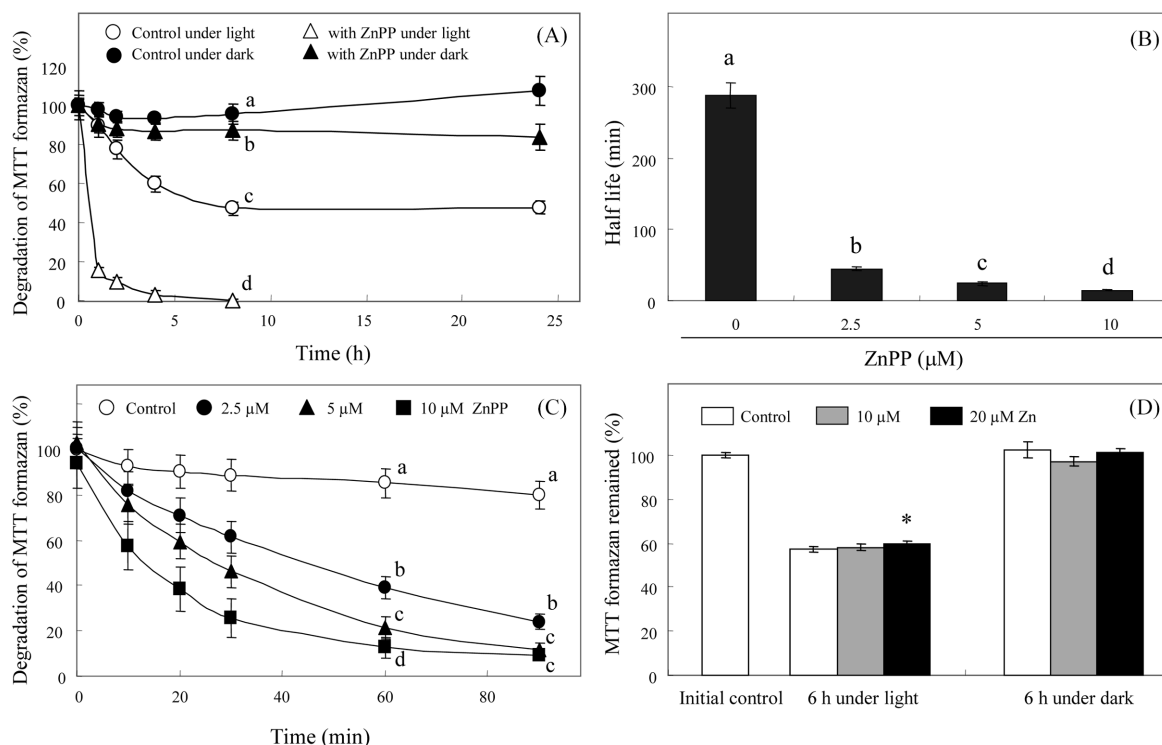
색이 유의적으로 약화되어 세포의 사멸이 진행된 것과 같은 현상이 관찰되었다. 이로부터 ZnPP 처리세포에서 세포생존율의 지표인 청자색 MTT formazan의 신속한 탈색이 진행됨을 발견하였고, 시간별 탈색도를 측정된 결과 10 μM ZnPP를 처리한 세포에서 30분 이내에 50% 이상 흡광도가 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2B). 이러한 현상은 ZnPP를 처리한 세포에 농도의존적으로 나타났으며, ZnPP 미처리 세포에서 2시간 동안 20% 이내의 탈색이 진행된 것에 반해, 2.5, 5와 10 μM 처리세포에서는 2시간 후 각각 51, 34 및 22%의 잔류 발색도를 나타내었다(Fig. 2B).

ZnPP 처리세포에 나타나는 MTT formazan의 급속한 탈색 반응이 ZnPP 물질 자체에 의한 것인지, ZnPP 처리에 의한 세포성분의 변화 또는 ZnPP의 세포 내 대사물 등에 의한 간접적인 원인인지를 파악하기 위해 MTT assay를 위한 세포배양실험 각 단계별로 ZnPP를 처리하여 조사하였다. 그 결과 10 μM ZnPP를 24시간 전처리한 경우와 MTT를 첨가하여 세포에 의해 환원반응이 진행되는 90분간 ZnPP를 같이 처리해 준 두 경우에서 시간경과에 따라 유사한 정도로 탈색이 진행되었다(Fig. 2C). 하지만 모든 발색과정 이후 DMSO로 세포 내 MTT formazan을 용해하는 과정에 ZnPP를 첨가한 시료에서 현저히 빠른 탈색현상이 나타났는데, 이상의 결과로 보아 MTT formazan의 탈색은 ZnPP의 대사물이나 ZnPP 처리에 의해 변화된 세포환경에 의한 것이 아니라, 이미 생성된 MTT formazan의 탈색에 ZnPP가 직접적으로 관여하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2C). 따라서 이후에 진행된 실험은 세포에 의해 환원된 MTT formazan에 대하여 직접적인 ZnPP의 영향 및 관련 영향요인들을 조사하였다.

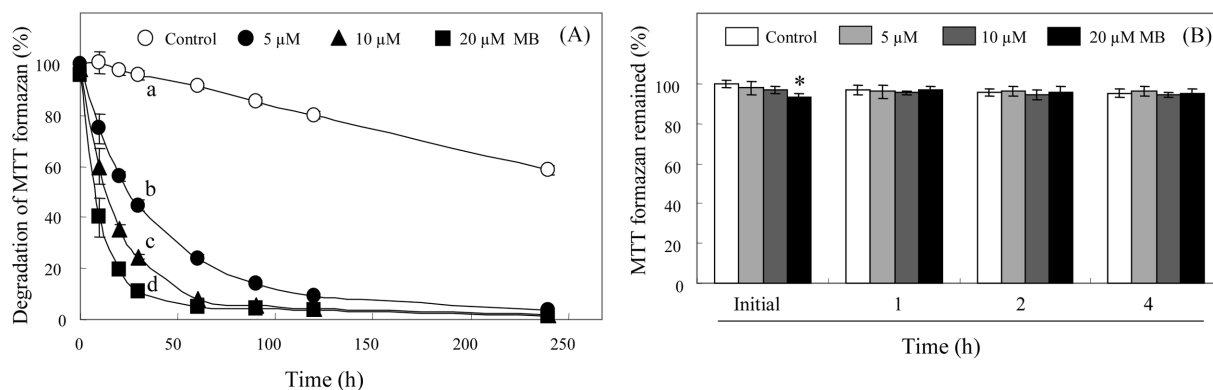
#### ZnPP에 의한 MTT formazan 탈색에 미치는 영향요인

일반적으로 MTT는 빛에 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있고(5,18), 본 연구에서도 ZnPP 미처리 세포에서 생성된 MTT formazan이 자연광에 노출되었을 때 서서히 탈색이 진행되는 것으로 나타났다. 따라서 ZnPP 존재 하에 가속화되는 MTT formazan의 분해에 있어서 빛의 유무에 따른 영향을 조사하였다. MTT formazan은 빛에 노출되었을 때, 8시간까지 서서히 분해되어 50% 이상이 탈색되었으며 그 이후에는 24시간까지 거의 탈색반응이 진행되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3A). 하지만 10 μM ZnPP가 첨가된 formazan은 자연광 하에서 신속하게 분해되어 1시간 이내에 80%이상의 탈색현상을 나타내었다. 암소에 저장 시 formazan dye는 대단히 안정하여 24시간 후에도 탈색현상이 전혀 관찰되지 않았으며, ZnPP 첨가 시에도 24시간 동안 15%정도의 색도 감소 현상만이 나타났다(Fig. 3A). 빛에 노출 시 formazan dye의 분해는 ZnPP 농도 의존적으로 나타났으며, ZnPP 미첨가 시 dye의 반감기가 288.3분인 반면, ZnPP 2.5, 5와 10 μM 첨가 시 반감기는 각각 45.0, 24.2 및 14.7분으로 단축되었다(Fig. 3B). 한편, 24시간 암소에 저장한 MTT formazan을 빛에 노출시켰을 때, 즉시 노출시킨 경우와 유사한 속도로 dye의 분해가 진행되어 흡광도가 감소하였으며 여전히 ZnPP 농도의존적인 양상을 나타내었다(Fig. 3C). 이상의 결과는 ZnPP에 의한 formazan dye의 파괴는 빛의 유무에 절대적으로 좌우되며, 빛에 노출 시 신속하게 dye의 분해가 일어나는 것을 나타낸다. 한편, MTT formazan이 암소에서 대단히 안정한 것으로 보아 관련 실험에 있어서 빛의 통제가 중요한 요소로서 고려되어야 할 것으로 보인다.

ZnPP는 기본적인 porphyrin 구조의 대사물인 protoporphyrin의 중앙에 Zn가 삽입된 구조를 가지고 있으며, Fe, Sn 또는 Co 등과 같은 중심 metal ion의 종류에 따라 heme-, Sn- 또는 Coprotoporphyrin의 형태를 가질 수 있다(6,19). 본 연구에서 관찰된



**Fig. 3. Effects of ZnPP and Zn on stability of MTT formazan under light or dark conditions.** MTT formazan was incubated without or with 10  $\mu$ M ZnPP under light or dark conditions at room temperature (A), and half life for color degradation of MTT formazan dye in the presence of different concentrations of ZnPP was calculated (B). Degradation of MTT formazan after 24 h-storage with different concentrations of ZnPP under dark condition was analyzed under light condition (C). Effects of Zn on stability of MTT formazan under light or dark conditions were also analyzed (D). Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p<0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A-C). \* Significantly different from the corresponding control according to the Student's  $t$ -test ( $p<0.05$ ) (in D).

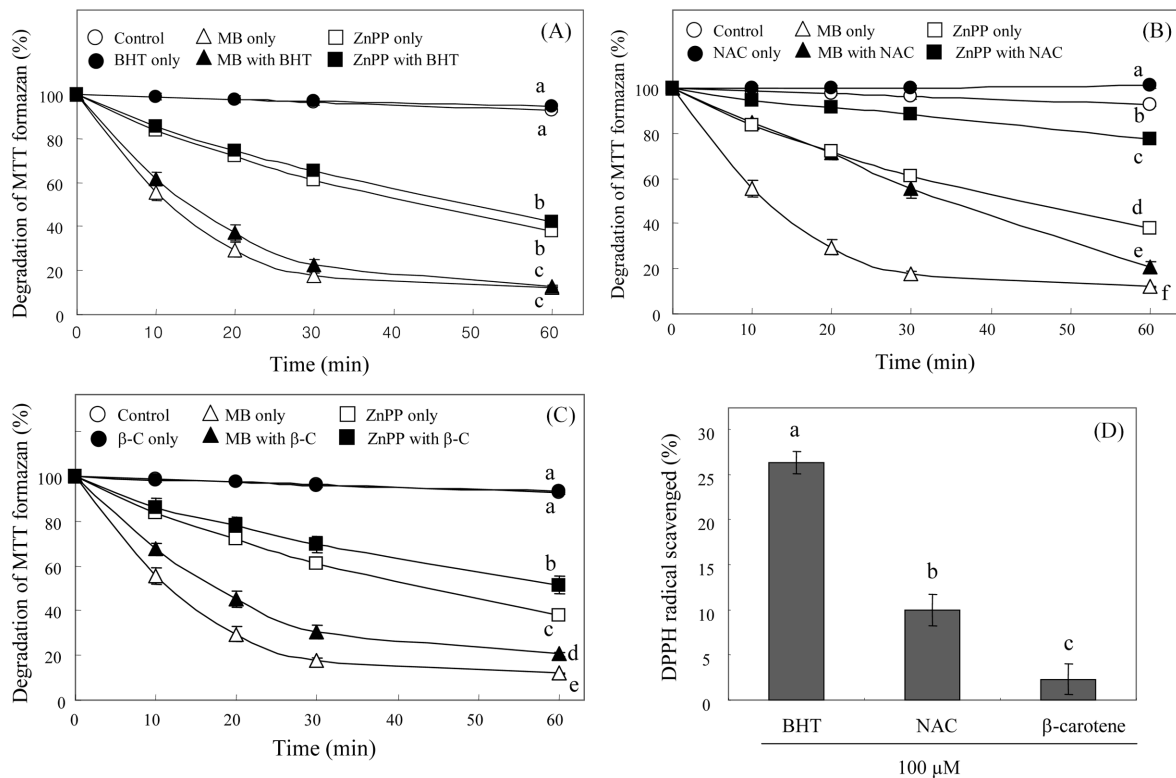


**Fig. 4. Effects of methylene blue on stability of MTT formazan under light or dark conditions.** MTT formazan was incubated in the presence of different concentrations of MB under light (A) or dark conditions (B) at room temperature. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p<0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A). \* Significantly different from the corresponding control according to the Student's  $t$ -test ( $p<0.05$ ) (in B).

ZnPP에 의한 formazan dye의 탈색현상에 있어서 Zn metal의 영향을 알아보기 위하여 10과 20  $\mu$ M의 Zn를 MTT formazan에 첨가한 후 빛에 노출시키거나 암소에서 저장하여 dye 색도의 변화 양상을 측정하였다. 그 결과 암소 저장 시료는 물론 빛에 노출시켰을 때에도 Zn에 의한 영향은 미비하였으며, 따라서 ZnPP에 의한 formazan dye의 탈색은 Zn와 같은 metal ion의 영향이 아닌 protoporphyrin 구조에 의한 것으로 추정되었다(Fig. 3D).

Porphyrin 형태 화합물의 일반적인 특징으로 이들이 감광제(photosensitizer)로 작용하는 것이 알려져 있다(20,21). 따라서 또

다른 감광제 물질인 MB를 첨가하여(22) formazan dye의 탈색여부를 조사하였다. 그 결과, ZnPP와 마찬가지로 MB의 첨가 시에도 신속하게 formazan dye의 탈색이 관찰되었으며 그 효과 역시 처리한 MB 농도에 의존적이었다(Fig. 4A). 하지만 암소에 보관 시에는 MB 처리 유무에 관계없이 formazan dye의 탈색현상은 관찰되지 않았다(Fig. 4B). 본 연구결과는 MTT formazan dye의 파괴가 porphyrin류나 MB와 같은 감광제 존재 시에 매우 신속하게 일어날 수 있음을 나타내며, 해당 물질들에 대한 영향 및 관련 기작이 향후 면밀히 조사되어야 할 것으로 사료된다.



**Fig. 5. Effects of different antioxidants on ZnPP- or MB-induced MTT formazan degradation.** MTT formazan was incubated with different types of antioxidant (each 200  $\mu$ M), BHT (A), NAC (B), or  $\beta$ -carotene (C) in the absence or presence of 5  $\mu$ M ZnPP or 10  $\mu$ M MB. DPPH radical scavenging effects of the antioxidants (100  $\mu$ M) used in the present study were also analyzed (D). Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

#### ZnPP에 의한 formazan dye의 탈색에 미치는 항산화제의 영향

세포에 의한 MTT formazan의 형성은 세포 내 미토콘드리아의 탈수소효소에 의해 MTT tetrazolium이 환원되는 반응이다(1,2). 따라서 ZnPP나 MB에 의한 formazan dye의 탈색에 감광체에 의한 산화촉진 반응이 관여할 것으로 예상하고, formazan dye의 변화에 미치는 각종 항산화제의 영향을 조사하였다. 항산화제의 기작 중 가장 보편적인 것이 유리라디칼 소거 작용으로서 주로 BHT와 같은 페놀성 화합물들의 주 항산화 기작으로 보고된 바 있다(23,24). 하지만 BHT의 첨가는 ZnPP나 MB에 의해 촉진되는 MTT formazan dye의 탈색에 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 한편, NAC 또는  $\beta$ -carotene의 첨가는 ZnPP와 MB에 의한 formazan dye의 탈색을 유의적으로 지연시켰는데(Fig. 5B and C), 특히 NAC에 의한 억제효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 동일한 조건에서 이들 항산화제 시료에 대한 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였을 때, BHT가 가장 높은 활성을 나타내었으며  $\beta$ -carotene의 경우는 거의 라디칼 소거활성을 나타내지 않았다(Fig. 5D). NAC는 ZnPP 등의 감광체에 의한 탈색뿐만 아니라 대조구의 자연광에 의한 탈색반응도 유의적으로 지연시키는 것으로 보아(Fig. 5B), NAC가 지니는 환원성질을 비롯한 특정성질 자체가 formazan dye의 안정화에 기여하는 것으로 보인다. 한편,  $\beta$ -carotene은 유리라디칼에 대한 효과보다는 일중항산소에 대한 quenching 작용을 하는 것으로 알려졌는데(25,26), 감광체에 의한 산화반응 중 중요한 역할을 하는 일중항산소의 제거가 formazan dye의 탈색억제에 중요한 기작으로 작용하는 것으로 사료된다. 향후 탈색된 dye의 화학적 본체, 탈색반응의 가역적 또는 비가역적인 성질 여부, 상세한 산화반응 기작 등을 밝히기 위한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 보인다.

이상의 결과는 다양한 생리활성 성분에 의한 세포활성변화 측정에 널리 응용되는 MTT assay 실험에 있어서 생체 내에 존재하는 물질 및 세포실험 시 첨가되는 물질들이 생성된 MTT formazan dye의 발색과 안정성에 크게 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주며, 특히 porphyrin 등의 감광체류 물질들이 존재할 경우 formazan dye가 빛에 의한 신속한 탈색반응이 일어남에 각별히 유의해야 함을 시사한다.

#### 요약

본 연구는 세포의 사멸 및 성장변화 등의 평가에 널리 이용되는 MTT assay에서 생성된 formazan dye에 미치는 ZnPP의 영향을 조사하였다. ZnPP는 생체 내에 자연적으로 생성되거나 다양한 관련 실험에 인위적으로 첨가해주는 물질로서, MTT formazan dye의 빛에 의한 탈색을 가속화시키는 것으로 밝혀졌다. Formazan dye의 분해는 5와 10  $\mu$ M ZnPP 존재 시 반감기를 기준하여 각각 10 및 20배 가량 가속화되었으며, 빛이 차단된 조건에서는 영향을 미치지 않았다. ZnPP 구조 중 Zn는 formazan dye의 탈색에 영향을 미치지 않았으나, porphyrin 구조와 공통적인 감광체 성질을 나타내는 MB에 의해서 ZnPP 존재 시와 유사하게 dye의 탈색을 가속화 시켰다. 이러한 ZnPP와 MB에 의한 formazan dye의 탈색반응은 NAC와  $\beta$ -carotene에 의해 지연되었으나, BHT에 의한 저해효과는 나타나지 않았다. 본 결과는 세포 중에 존재하는 ZnPP 등의 감광체류가 MTT tetrazolium으로부터 환원된 formazan dye의 빛에 의한 신속한 분해를 유도하며, 관련 실험에서 빛의 차단 등의 조치와 함께 각별히 유의해야함을 시사한다.

## 감사의 글

본 연구는 2011년 서울여자대학교 교내 학술특별연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
- Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Brit. J. Cancer* 56: 279-285 (1987)
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94: 57-63 (1986)
- Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70: 257-268 (1984)
- Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *J. Tissue Cult. Meth.* 11: 15-17 (1988)
- Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin. Chem.* 45: 2060-2072 (1999)
- Hastka J, Lasserre J, Schwarzbeck A, Strauch M, Hehlmann R. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. *Blood* 81: 1200-1204 (1993)
- Lamola AA, Joselow M, Yamane T. Zinc protoporphyrin (ZPP): A simple, sensitive, fluorometric screening test for lead poisoning. *Clin. Chem.* 21: 93-97 (1975)
- Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K, Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int. J. Cancer* 109: 1-8 (2004)
- Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AMK, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 192: 1015-1026 (2000)
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 103: 129-130 (1999)
- Deshane J, Wright M, Agarwal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim. Pol.* 52: 273-284 (2005)
- Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 9: 27-35 (2004)
- Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H. Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Brit. J. Cancer* 88: 902-909 (2003)
- Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat. Med.* 8: 240-246 (2002)
- Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.* 68: 445-448 (2002)
- Talorete TP, Bouaziz M, Sayadi S, Isoda H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology* 52: 189-198 (2006)
- Plumb JA. Cell sensitivity assays: The MTT assay. pp. 165-169. In: *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Langdon SP (ed). Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA (2004)
- Maines MD. Zinc protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. *BBA-Gen Subjects* 673: 339-350 (1981)
- Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin: IX: Basic principles and present clinical experience. *J. Photoch. Photobio. B* 6: 143-148 (1990)
- Moan J. Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem. Photobiol.* 43: 681-690 (1986)
- Tardivo JP, Del Giglio A, Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, Turchiello RF, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn. Photodyn.* 2: 175-191 (2005)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* 48: 3597-3604 (2000)
- Hirayama O, Nakamura K, Hamada S, Kobayasi Y. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* 29: 149-150 (1994)
- Foot CS, Denny RW. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* 90: 6233-6235 (1968)