

## 빛, 용매와 zinc protoporphyrin에 의한 MTT 포마잔의 화학적 동태 변화

김주현 · 홍정일\*

서울여자대학교 자연과학대학 식품응용시스템학부

### Effects of various lights, solvents, and zinc protoporphyrin on the chemical behavior of MTT formazan

Joo Hyoun Kim and Jungil Hong\*

Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University

**Abstract** The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is commonly used for analyzing the cell viability. In this study, effects of various solvents, different lights, and zinc protoporphyrin (ZnPP) on the chemical behavior of MTT formazan were investigated. The color response of MTT formazan in NaOH was highly pronounced; the absorbance of MTT formazan in 0.1 N NaOH at 550 nm was >2-fold higher than that in water, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, and ethanol. MTT formazan in DMSO and NaOH (>0.1 N) was relatively stable under fluorescent and UV light at 365 nm; its rapid degradation was induced under UV light at 254 nm in all solvents. ZnPP degraded MTT formazan under light in a time- and concentration-dependent manner; MTT formazan in 0.1 N NaOH was the most sensitive to ZnPP, followed by DMSO. These results suggest that NaOH and DMSO might be suitable media for MTT formazan for monitoring photosensitizing properties.

**Key words:** MTT formazan, zinc protoporphyrin, light, sodium hydroxide, photosensitizing property

## 서 론

MTT 테트라졸륨(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)염은 세포의 증식과 성장 및 사멸도 등의 세포활성을 측정하는 방법인 MTT 분석에 사용되며, 본 방법은 식품 기능성 성분을 비롯한 다양한 생리활성물질이 세포에 미치는 영향을 평가하기 위한 연구에 널리 응용되고 있다(1,2). MTT 분석은 살아있는 세포의 탈수소효소 활성에 근거하며, 이 효소에 의해 황색의 수용성 MTT 테트라졸륨이 청자색의 불용성 MTT 포마잔으로 환원되는 원리를 이용한다(3). 생성된 포마잔의 양과 이로부터 기인한 청자색의 강도는 세포의 생존율과 비례하며, 생성된 포마잔의 흡광도를 측정하여 비교적 정확하게 세포의 성장 및 사멸도를 평가할 수 있다. 뿐만 아니라, 다중 흡 플레이트의 사용으로 대량의 시료를 동시에 측정할 수 있기 때문에 식품 및 제약관련 연구에서 다양한 활성물질의 탐색에 광범위하게 이용되는 방법이다(4,5).

MTT 포마잔은 불용성 물질로 세포 내에 축적되는 데, 다이메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 유기용매를 사용하여 세포막을 파괴하고 이를 용해시킨 후 흡광도를 측정하게 된다(3). 따라서 포마잔의 생성과 발색 또는 용해도에 영향을 미치는 요인들이 실

험의 간섭요인으로 작용할 수 있으며, 실제로 세포의 종류, 포마잔을 용해하는 용매, 세포 처리물질, 세포 대사 물질 등과 같은 다양한 요인들이 MTT를 비롯한 포마잔을 이용하는 분석에 영향을 준다고 보고되었다(6-8). 한편 세포 처리 물질 중에서 포르피린류와 같은 감광체 화합물이 MTT 포마잔의 탈색을 가속화시키며(9), 플라보노이드나 비타민 C 등과 같은 환원성 물질은 테트라졸륨의 환원에 직접적으로 관여하여 발색도를 증가시킨다는 연구결과도 발표되었다(10,11).

포르피린은 4개의 피롤고리(pyrrole ring)가 연결된 porphyrin을 기본구조로 가지고 있으며, 식품 및 천연물에 널리 분포되어 있다(12,13). Porphyrin의 중앙에 결합된 금속이온의 종류에 따라 헴(heme) 구조, 클로로필 구조, 비타민 B<sub>12</sub> 구조 등이 존재하며, 비금속 결합체로는 생체 내에서 헴의 생합성 중 전구체로 나타나는 protoporphyrin구조가 있다(12,13). Zinc protoporphyrin (ZnPP)은 porphyrin구조에 zinc가 삽입된 구조로서 생체 내에 철이 부족할 경우 헴 대신 생성되는 물질이며(14), 식품 중에는 염지하지 않은 육류나 파르마헴 등에 존재한다(15). ZnPP를 포함한 포르피린 유도체들은 heme oxygenase-1 (HO-1)의 저해제로서 세포실험에 널리 이용되고 있으며(16,17), 대부분 감광성을 가지고 있어 이를 이용한 광역학 치료(photodynamic therapy)도 개발되었다(18). 이처럼 포르피린류 화합물들은 각종 식품이나 생체 내에 다양한 형태로 존재하며 세포실험 등에 빈번하게 이용되는 처리 물질로서 MTT 분석을 비롯한 관련 실험에 필연적으로 접하게 되는 물질이다.

ZnPP를 비롯한 포르피린류 화합물이 빛의 존재 하에 MTT 포마잔의 탈색을 유도하여 관련실험에서의 오류가 발생할 수 있다는 사실이 보고된 바(9), 본 연구에서는 다양한 종류의 빛과 용매 조건에서의 MTT 포마잔의 안정성을 평가하였고, 이러한 조

\*Corresponding author: Jungil Hong, Division of Applied Food System, College of Natural Science, Seoul Women's University, Hwarang-ro 621, Nowon gu, Seoul 01797, Korea  
Tel: +82-2-970-5639  
Fax: +82-2-970-5977  
E-mail: hjil@swu.ac.kr  
Received July 12, 2017; revised September 8, 2017;  
accepted September 13, 2017

건에서 ZnPP에 의해 MTT 포마잔의 탈색에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

MTT 테트라졸륨염과 MTT 포마잔은 각각 Amresco Inc. (Solon, OH, USA)와 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carbox-anilide, inner salt]는 MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA)에서, ZnPP는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 메탄올과 에탄올은 Merck (Darmstadt, Germany)에서, NaOH는 Duksan Pure Chemical Co. (Ansan, Korea)에서 구입하였고 그 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. ZnPP와 MTT 포마잔은 DMSO에 녹여 각각 10과 20 mM 농도용액을 만들고 사용시까지 80°C에 보관하였다.

### 다양한 용매와 광원 하에서 MTT 포마잔의 발색도 및 안정성 변화

적정 농도로 DMSO에 희석한 MTT 포마잔 20  $\mu$ L를 140  $\mu$ L의 증류수, DMSO, 에탄올, 메탄올 또는 서로 다른 농도의 수산화소듐(NaOH) 등의 용매에 섞어 최종농도가 50  $\mu$ M (NaOH) 또는 100  $\mu$ M (기타 용매)가 되도록 하고 96 well plate에 분주하였다. 이 혼합액을 상온의 평소 또는 암소에 보관하거나, 다양한 광원

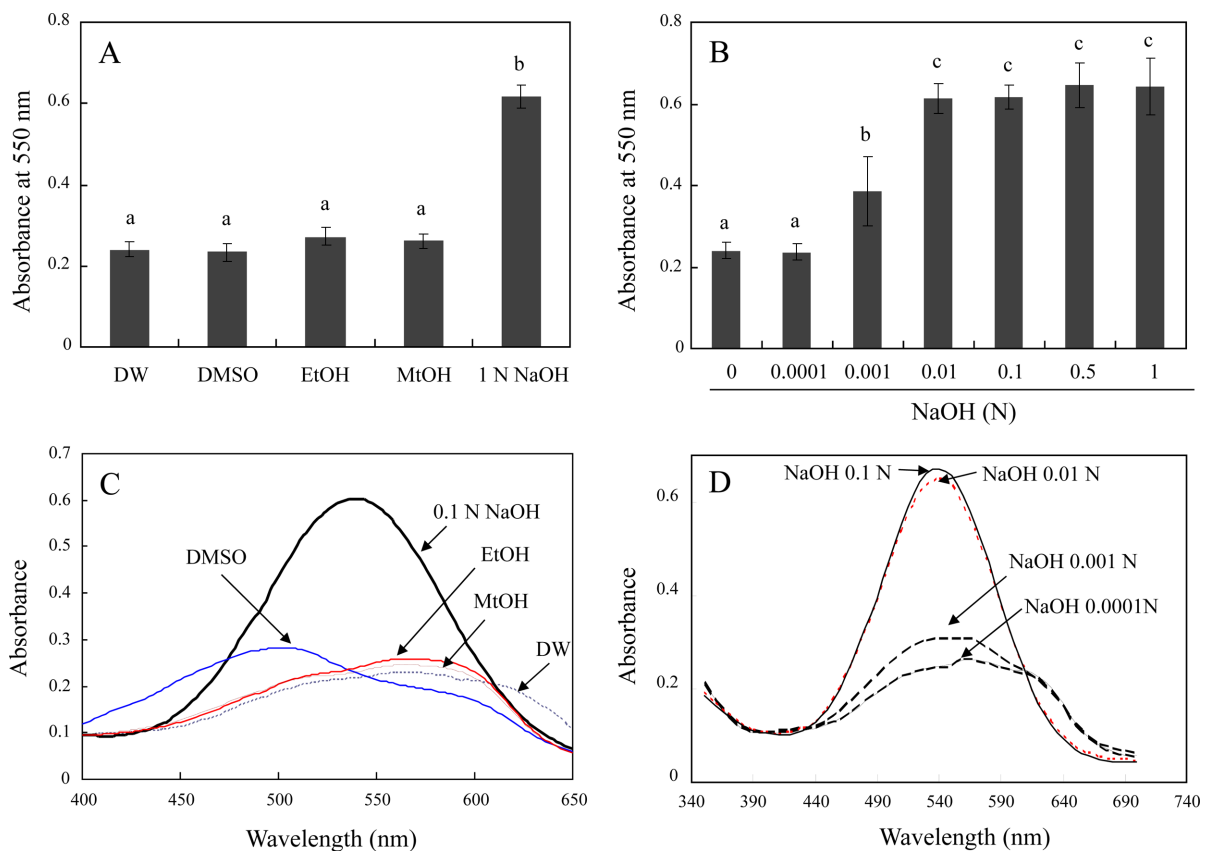
에 노출시키면서 시간별 흡광도 변화를 분광광도계(SpectraMax M3; Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다. 다양한 광원에 의한 MTT 포마잔의 안정성 변화를 평가하기 위해, UV 조사기(4W, 230V) (VL-4LC; Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France)를 이용하여 UVA (365 nm), UVB (254 nm)를 시료를 주입한 플레이트와 10 cm 거리에서 조사하거나, 형광등(TL-D Super 80 fluorescent light 32W, Philips, Seoul, Korea)은 30 cm 거리에 노출시키면서 조사하였다. 한편, 시료의 가시광선 영역에서 스펙트럼 변화를 마이크로플레이트 분석기(SpectraMax M3)로 측정하였다.

### 다양한 용매 상에서 ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 발색도 변화 측정

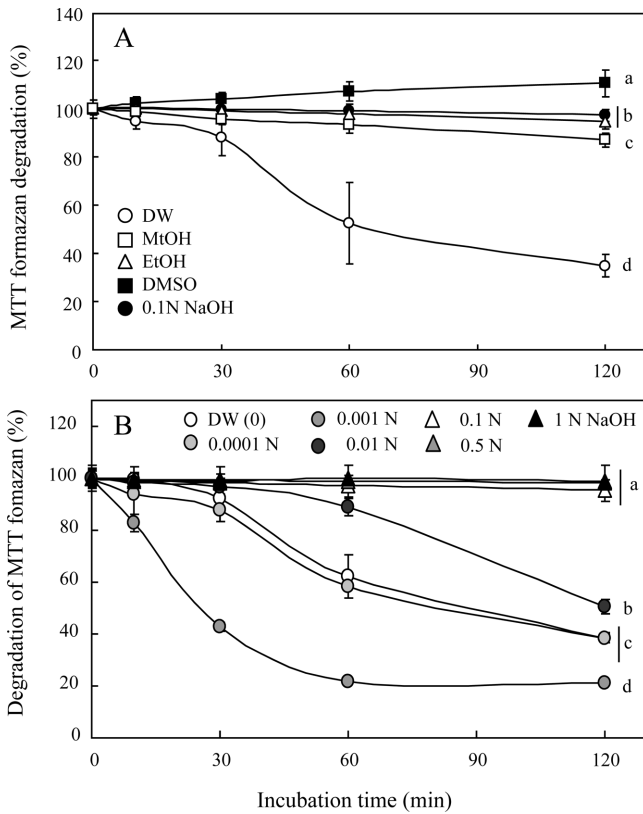
다양한 용매 상에서 ZnPP가 MTT 포마잔의 발색도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 서로 다른 농도의 ZnPP를 첨가한 MTT 포마잔(각 용매 87.5%, DMSO 12.5%) 혼합액을 96 well plate에 well당 160  $\mu$ L씩 주입하였다. 동일한 조건에서 제조한 시료를 각각 실온의 암소 또는 상기 조건으로 형광등에 노출시키면서 시간에 따른 흡광도 변화를 마이크로플레이트 분석기(SpectraMax M3)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다.

### XTT 포마잔의 생성과 ZnPP에 의한 영향

XTT 테트라졸륨은 살아있는 INT 407 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 이용하여 수용성 XTT



**Fig. 1. Initial color intensity and absorbance spectrum of MTT formazan in different solvents.** Initial absorbance of MTT formazan dissolved in different solvents was measured at 550 nm (A and B). The absorbance spectrum of MTT formazan (50  $\mu$ M) in different solvents was scanned (C and D). Each value represents the mean $\pm$ SD ( $n=6-8$  in A and B,  $n=3$  in C and D). Different letters indicate a significant difference among samples ( $p<0.05$ ) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A and B).



**Fig. 2. Changes in color response of MTT formazan in different solvents under dark conditions.** The MTT formazan dissolved in different solvents (100 μM in A and 50 μM in B) was incubated under dark condition at room temperature for 2 h. At each time point indicated, the color response of MTT formazan was measured at 550 nm. Each value represents the mean±SD (n=5-6). Different letters indicate a significant difference among different solvents (p<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

포마잔으로 환원시켰다. 즉 96 well plate에 1.5×10<sup>4</sup>씩 접종하여 24시간 배양한 INT 407세포에 XTT 테트라졸륨(0.1 mg/mL)과 전자전달체인 menadione (32 μM)을 함께 무혈청 MEM 배지로 희석하여 37°C 암소에서 3시간 동안 처리하였다. XTT 포마잔이 생성된 배양액을 회수하여 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 (Force1418, Labnet Co., Edison, NJ, USA), 상등액을 취하고 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 본 수용성 XTT 포마잔 함유 배양액 100 μL와 동일한 무혈청 배지에 희석한 ZnPP 100 μL를 혼합하여 상온의 암소 또는 상온에서 형광등을 조사하면서 시간에 따른 흡광도 변화를 490 nm에서 측정하였다(SpectraMax M3).

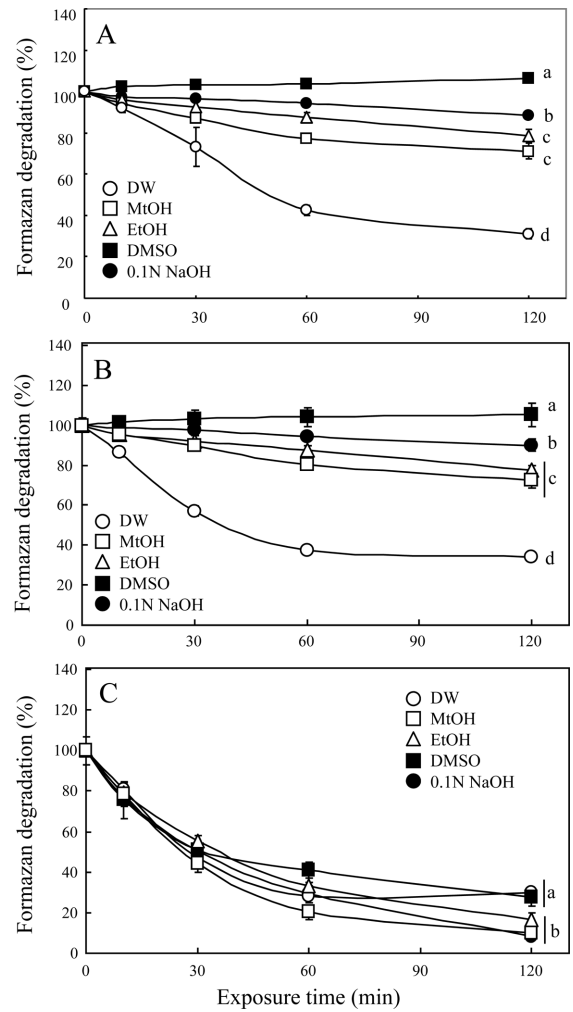
**결과 분석 및 통계처리**

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's t-test 또는 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey's HSD test를 실시하여 95와 99%의 유의수준에서 검정하였다.

**결과 및 고찰**

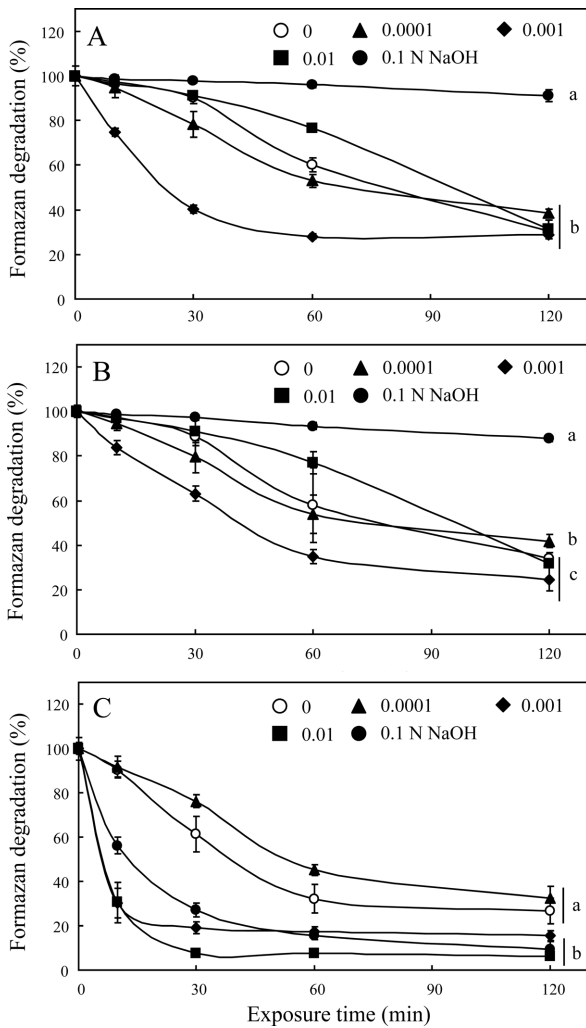
**다양한 용매에서의 MTT 포마잔 발색도 및 안정성 변화**

MTT 포마잔은 청자색의 불용성 색소로서, MTT 분석에서는 세포 내에 생성된 포마잔을 용해시키기 위해 DMSO나 NaOH, 또



**Fig. 3. Changes in stability of MTT formazan in different solvents under various light sources.** The MTT formazan dissolved in different solvents (100 μM) was exposed under fluorescent light (A), UVA at 365 nm (B), or UVB at 254 nm (C) for 2 h at room temperature. At each time point indicated, the color response of MTT formazan was measured at 550 nm. Each value represents the mean±SD (n=5-6). Different letters indicate a significant difference among different solvents (p<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

는 sodium dodecyl sulfate, Triton X-100 등의 계면활성제를 포함한 혼합액을 사용하기도 한다(19,20). 본 실험에서는 MTT 분석에 적용될 수 있는 다양한 용매상에서 순수한 MTT 포마잔 색소를 이용하여 발색도 변화 및 화학적 동태를 살펴보았다. 증류수를 비롯한 다양한 유기용매 상에서 발색도를 조사한 결과, 증류수, DMSO, 에탄올과 메탄올에서는 발색도의 차이가 나타나지 않았으나 NaOH 용액에서 현저하게 발색도가 증가하는 결과가 나타났다(Fig. 1A). MTT 포마잔의 발색도는 NaOH의 농도에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 0.01 N 이상의 농도에서는 거의 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1B). 각 용매 상에서 MTT 포마잔의 스펙트럼을 조사한 결과, 에탄올, 메탄올과 수용액 상에서는 550 nm보다 장파장 쪽에서 최대흡광도를 보였고, DMSO에서는 500 nm 근처의 단파장 쪽으로 최대흡광파장이 이동한 것으로 나타났다(Fig. 1C). NaOH 용액에서 MTT 포마잔은 550 nm 근처에서 최대흡광도를 나타내었고 NaOH 농도가 증가함에 따라 단파



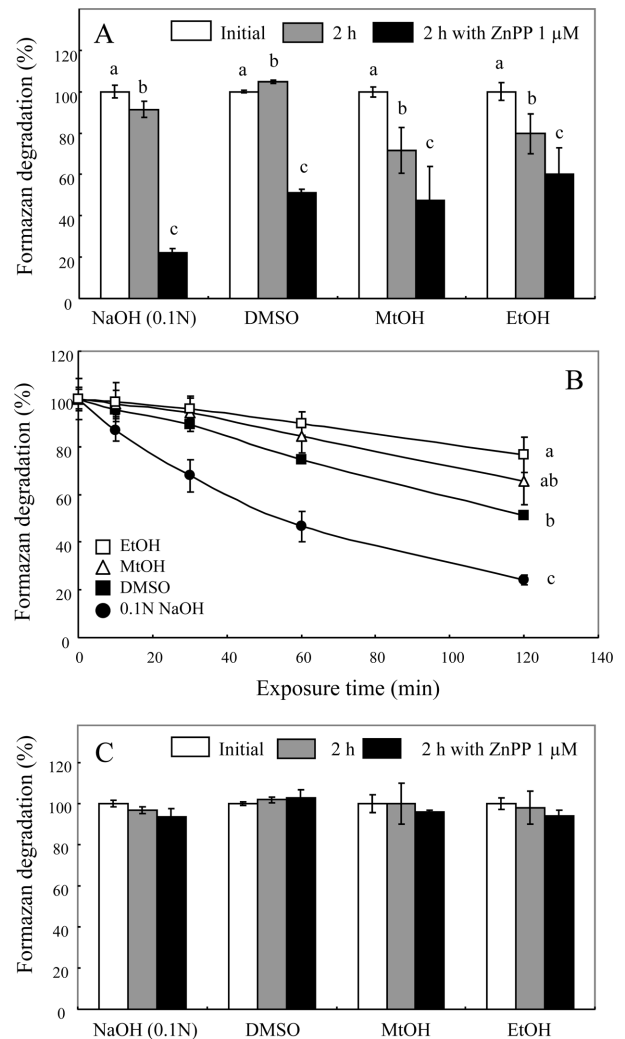
**Fig. 4. Changes in stability of MTT formazan in NaOH under various light sources.** The MTT formazan (50  $\mu$ M) dissolved in different concentrations of NaOH was exposed under fluorescent light (A), UVA at 365 nm (B), or UVB at 254 nm (C) for 2 h at room temperature. At each time point indicated, the color response of MTT formazan were measured at 550 nm. Each value represents the mean $\pm$ SD ( $n=4$ ). Different letters indicate a significant difference among different solvents ( $p<0.05$ ) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

장 쪽으로 최대흡광과장이 이동하는 경향을 나타내었다(Fig. 1D).

서로 다른 용매상에서 MTT 포마잔의 발색 안정성을 조사한 결과, 다소 차이는 있으나 유기용매상에서는 2시간 이내에 비교적 안정한 색도를 유지하였으나, 수용액 상에서는 매우 불안정하여 1시간 이내에 50% 이상 색도가 감소하였다(Fig. 2A). 한편 0.1 N NaOH 농도 이상에서 MTT 포마잔을 안정화 하였으며, 0.01 N 이하에서는 초기발색도의 현저한 증가에도 불구하고 시간에 따라 신속한 색도의 감소를 초래하였다(Fig. 2B).

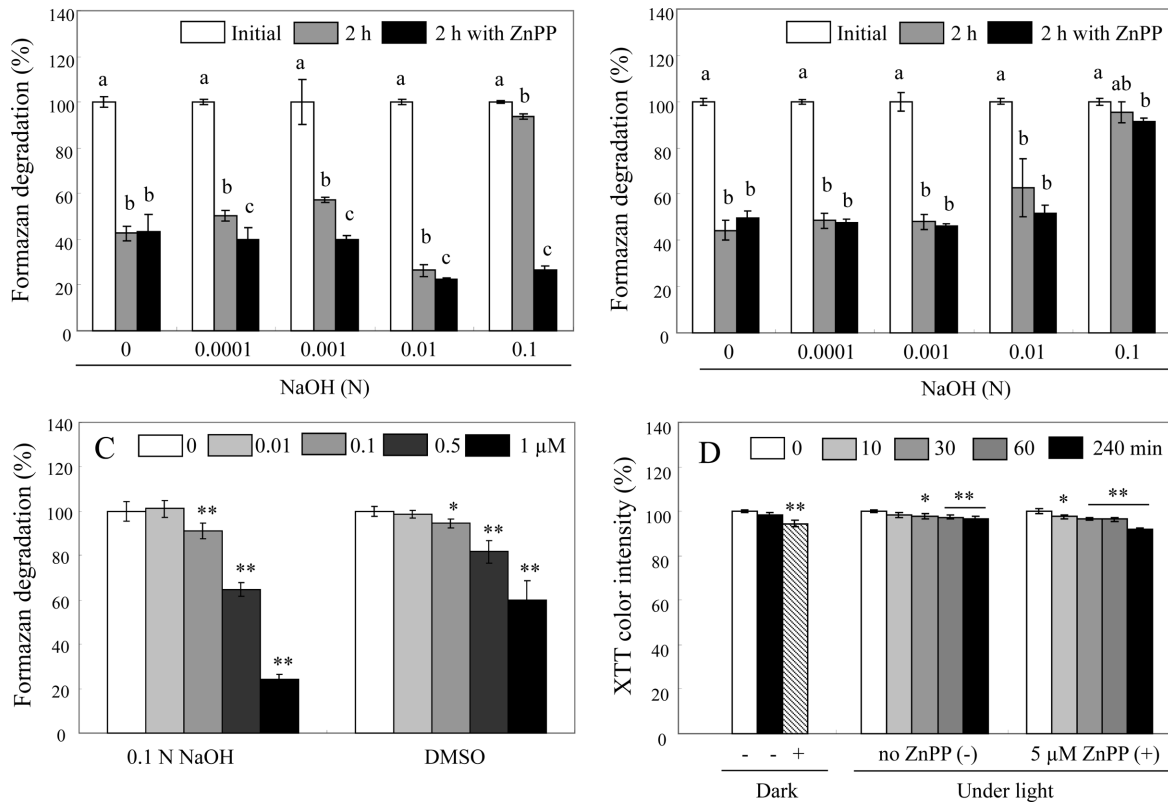
#### 다양한 광원에 의한 MTT 포마잔의 발색도 변화

MTT와 각종 포마잔의 안정성이 빛에 의해 영향 받는다고 보고되어(21,22) 서로 다른 용매상에 용해된 MTT 포마잔에 대해 형광등, UVA (365 nm) 또는 UVB (254 nm)의 빛을 조사하면서 시간에 따른 안정성의 변화를 측정하였다. 형광등 조사 시 DMSO에 용해된 포마잔은 안정하여 색도의 변화가 거의 나타나지 않



**Fig. 5. Effects of different solvents on ZnPP-induced degradation of MTT formazan.** Degradation of MTT formazan (50  $\mu$ M in NaOH and 100  $\mu$ M in other solvents) dissolved in various solvents were incubated with ZnPP (1  $\mu$ M) under fluorescent light for 2 h at room temperature (A and B). After 2 h (A) or at each time point indicated (B), the color response of MTT formazan were measured at 550 nm. Changes in color intensity of the MTT formazan in different solvent during 2 h under dark condition were also analyzed (C). Each value represents the mean $\pm$ SD ( $n=5-6$ ). Different letters indicate a significant difference among groups ( $p<0.05$ ) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test.

았으며 0.1 N NaOH를 사용한 경우에도 2시간 동안 12% 정도의 발색도 감소가 나타났다. 에탄올, 메탄올 등의 유기용매에서는 점진적인 탈색이 일어나 2시간 후 각각 21%와 29%의 흡광도 저하가 나타났으며, 수용액 상의 포마잔은 대단히 불안정하여 1시간 내에 58% 탈색이 일어났다(Fig. 3A). UVA (365 nm) 조사 시에도 형광등 조사 시와 유사한 발색도 변화현상이 나타났으나 (Fig. 3B), UVB (254 nm) 조사 시에는 용매와 상관없이 모든 포마잔에서 빠른 속도로 탈색이 일어나는 것이 관찰되었다(Fig. 3C). 특히 0.1 N NaOH를 용매 상에서의 MTT 포마잔은 형광등과 UVA 조사 시에 2시간 동안 10% 정도의 발색도 저하가 일어난 반면, UVB 조사 시에는 오히려 수용액 상에서 보다 더 신속하게 탈색 반응이 진행되었다(Fig. 4). 이상의 결과는 형광등이나 UVA를 조사할 경우 빛 에너지 보다는 용매 상에서 안정화가 포마잔의 발



**Fig. 6. ZnPP-induced degradation pattern of MTT formazan in different solvents and effect of ZnPP on XTT formazan.** MTT formazan (50 μM) in different concentrations of NaOH was incubated under fluorescent light (A) or dark condition (B) in the presence or absence of ZnPP (1 μM) for 2 h at room temperature. MTT formazan in 0.1 N NaOH and DMSO were incubated with different concentration of ZnPP under fluorescent light for 2 h (C). Effect of ZnPP on color intensity of XTT formazan was also analyzed (D). Each value represents the mean±SD (*n*=6-8). Different letters indicate a significant difference among different concentrations of NaOH (*p*<0.05) based on one way ANOVA and the Tukey's HSD test (in A and B). Significant differences from control were determined by Student's t-test (\**p*<0.05; \*\**p*<0.01) (in C and D).

색 안정성에 더 크게 영향을 미치나, 에너지가 큰 254 nm 단파장 UVB의 경우 포마잔에 직접적으로 빛 에너지가 작용하여 신속한 분해를 유발하기 때문으로 보인다. 포마잔을 NaOH 용매를 사용하여 용해한 경우에도, 형광등이나 UVA를 조사 시에 포마잔의 불안정성을 유도하는 0.01 N 이하 농도 용매에서 신속하게 분해가 일어났으나, 포마잔이 비교적 안정한 0.1 N NaOH 농도에서는 빛에 의한 탈색이 진행되지 않았다(Fig. 4A, 4B) 하지만 UVB의 조사 시에는 역시 0.1 N NaOH에 용해된 포마잔에서 수용액 상에서 보다 빠른 탈색이 진행되었는데, 이는 포마잔의 파괴를 유도하는 빛 에너지의 전달이 포마잔을 안정화 시키는 용매 상에서 보다 효과적으로 일어났기 때문으로 판단된다.

**ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 탈색에 미치는 용매의 영향**

선행연구에 의하면 세포에 의해 MTT 테트라졸륨으로부터 환원된 포마잔이 ZnPP에 의해 신속하게 탈색이 진행되며 이는 빛 존재 하에 가속화된다고 보고하였다(9). ZnPP 외에도 다양한 종류의 포르피린류를 적용하여 조사한 결과, MTT 포마잔의 탈색은 감광성 물질과 빛의 상호작용 하에 일어나는 것으로 판단되며(23), 이에 MTT 포마잔의 탈색정도를 분석하여 각종 감광제의 감광활성에 대한 정량도 가능할 것으로 보인다. 따라서 이어지는 실험에서는 다양한 용매를 적용하여, ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 탈색반응을 진행시키기 위한 적절한 용매조건을 탐색하였다. MTT 포마잔은 ZnPP에 매우 민감하게 반응하여 1 μM의 ZnPP에 의해서도 신속하게 탈색이 진행되었다(Fig. 5A, 5B). ZnPP에 의

한 MTT 포마잔의 탈색은 NaOH용액에서 가장 현저하였으며, 1 μM ZnPP 존재 하에 2 시간 동안 약 80% MTT 포마잔의 탈색이 진행되었다(Fig. 5A, 5B). 이어서 DMSO, 메탄올, 에탄올순으로 탈색의 정도가 크게 나타났으며, 각 용매 상에서 ZnPP 존재 하에 2시간 형광등 조사 후 잔류한 포마잔의 양은 각각 51.4, 65.4와 76.6%였다(Fig. 5A). 한편 빛 조사 시 ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 감소는 시간에 따라 비례적으로 나타났으나(Fig. 5B), 빛을 차단하였을 경우에는 ZnPP 존재 하에서도 포마잔의 탈색은 거의 일어나지 않았다(Fig. 5C).

ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 탈색이 NaOH상에서 가장 민감하게 나타난 결과에 근거하여, NaOH 농도를 달리한 포마잔 용액 상에서 ZnPP에 의한 탈색도 변화를 검토하였다. 증류수 상에서는 ZnPP의 유무에 관계없이 포마잔이 불안정하여 2시간 형광등 조사 후 42%의 잔류량을 나타내었으며, 0.001-0.01 N NaOH 용액 상에도 ZnPP에 의해 MTT 포마잔의 탈색정도가 유의적으로 증가하였으나 ZnPP가 존재하지 않더라도 MTT 포마잔의 안정성이 현저하게 감소하였다(Fig. 6A). 이러한 현상은 암소에서도 나타났으며(Fig. 6B), 따라서 0.01 N NaOH 농도 이하에서는 ZnPP의 감광성 발현과 관계없이 MTT 포마잔의 안정성 감소에 의한 탈색현상이 더 크게 일어나는 것으로 판단된다.

이상의 결과에서 0.1 N NaOH 또는 DMSO를 용매로 사용할 경우, MTT 포마잔 자체의 발색안정성에 크게 영향을 미치지 않으면서 빛 조사 시 ZnPP의 감광성 발현에 의한 MTT 포마잔의 탈색이 민감하게 일어날 수 있다는 것을 알 수 있다. 이에 따라

본 용매조건을 적용하여 1  $\mu\text{M}$  이하 저농도의 ZnPP에 대한 MTT 포마잔의 탈색 민감성을 평가하였다. 그 결과 2시간 반응시간 동안 두 용매 상에서 모두 0.1  $\mu\text{M}$  ZnPP 농도까지 유의적인 MTT 포마잔의 탈색현상이 관찰되었으며, 0.1 N NaOH에서 훨씬 우수한 탈색반응에 대한 민감성을 나타내었다(Fig. 6C).

한편 수용성 조건에서 빛과 관계없이 MTT 포마잔 자체의 안정도가 감소하기는 하였으나, ZnPP에 의한 MTT 포마잔 탈색에 미치는 영향도 감소하는 것이 관찰되어, 수용성 포마잔에 대한 ZnPP의 영향을 검토하였다. XTT 테트라졸륨은 살아있는 세포에 의해 XTT 포마잔으로 환원되거나 세포 외 배양액에서 생성되는 수용성 포마잔이다(24). INT 407 세포에 의해 XTT 포마잔을 생성시키고 이를 회수하여 5  $\mu\text{M}$  농도의 ZnPP를 처리하여 명소와 암소에서 발색도의 변화를 분석한 결과, 빛의 조사나 ZnPP 유무에 관계없이 240분간 XTT 포마잔의 탈색은 거의 발생하지 않았다(Fig. 6D). 이 결과는 ZnPP를 비롯한 감광성을 지닌 물질들의 세포활성을 평가할 때, MTT 분석보다 수용성 포마잔을 형성하는 XTT를 사용하는 것이 실험상의 오류를 줄일 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 탈색이 빛 조사에 의해 시간 별, 농도 별로 신속하게 진행되며 특히 0.1 N NaOH와 DMSO 용매 상에서 민감하게 감소현상이 나타나는 것을 밝혔으며, 이에 근거하여 ZnPP를 비롯한 여러 식이 감광제의 감광활성 측정을 위해 MTT 포마잔이 가능한 지표시약으로 사용될 수 있는 것과 이를 위한 적절한 반응환경을 제시하였다. 향후 MTT 포마잔에 대해 다양한 종류의 감광제를 적용하여 감광활성 및 반응특성의 비교, 본 활성측정에 대한 보편성, 타당성 등의 검증이 지속적으로 연구되어야 할 것으로 보인다.

## 요 약

본 연구에서는 식품성분이나 천연물의 세포활성 측정에 널리 사용되는 MTT 분석 상의 최종산물인 MTT 포마잔 색소에 대한 여러 용매 상에서의 안정성과 다양한 빛과 ZnPP가 미치는 영향을 조사하였다. MTT 포마잔의 발색도는 0.01 N 이상의 NaOH 농도에서 가장 높게 나타났으며, 증류수, DMSO, 에탄올, 메탄올 등의 용매에 비해 2배 이상의 발색강도를 보였다. 증류수나 0.01 N 이하의 NaOH 농도에서 MTT 포마잔은 불안정하여 빛의 조사와 관계없이 신속하게 분해되었으며 0.1 N NaOH, DMSO에서는 안정하였다. DMSO나 0.1 N NaOH 상에서 MTT 포마잔은 형광등과 UVA (365 nm)의 조사에 의해 2시간 내에 발색도의 현저한 변화가 관찰되지 않았으나, UVB (254 nm)에 노출되었을 경우 용매와 관계없이 신속하게 탈색되었다. MTT 포마잔은 에탄올, 메탄올, DMSO와 NaOH 용매상에서 ZnPP에 의해 시간과 농도에 의존적으로 분해되었으며, 0.1 N NaOH 상에서 가장 민감하고 신속한 탈색 양상을 나타내었다. DMSO와 0.1 N NaOH 상에서 MTT 포마잔은 0.1  $\mu\text{M}$ 의 ZnPP에 의해서도 유의적인 탈색현상을 나타내었다. 하지만 ZnPP에 의한 MTT 포마잔의 탈색현상은 암소에서는 일어나지 않았으며, 빛과 관계없이 명소와 암소에서 모두 수용성 XTT 포마잔에는 미미한 효과를 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단 이공분야기초연구사업 중견연구자 지원사업 연구비 지원(과제번호: 2016R1A2B1007540)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## References

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94: 57-63 (1986)
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
- 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)
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 127-152 (2005)
- Plumb JA, Milroy R and Kaye S. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49: 4435-4440 (1989)
- 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)
- Talorette 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)
- Park KA, Choi HA, Kim MR, Choi YM, Kim HJ, Hong J. Changes in color responses of MTT formazan by zinc protoporphyrin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 754-759 (2011)
- Chakrabarti R, Kundu S, Kumar S, Chakrabarti R. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *J. Cell. Biochem.* 80: 133-138 (2000)
- Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloid. Surface. B.* 45: 108-111 (2005)
- Bonkovsky HL, Guo JT, Hou W, Li T, Narang T, Thapar M. Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. *Compr. Physiol.* 3: 365-401 (2013)
- Biesaga M, Pyrzyńska K, Trojanowicz M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. *Talanta* 51: 209-224 (2000)
- Labbe RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin. Chem.* 45: 2060-2072 (1999)
- Benedini R, Raja V, Parolari G. Zinc-protoporphyrin IX promoting activity in pork muscle. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 1160-1166 (2008)
- Lee T, Chau L. Heme Oxygenase-1 Mediates the Anti-Inflammatory Effect of Interleukin-10 in Mice. *Nat. Med.* 8: 240-246 (2002)
- Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Brit. J. Cancer* 88: 902-909 (2003)
- Kennedy JC, Pottier RH. New trends in photobiology: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photoch. Photobio. B* 14: 275-292 (1992)
- Hansen MB, Nielsen, SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell killing. *J. Immunol. Methods* 119: 203-211 (1989)
- Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci. Res.* 38:325-329 (2000)
- 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)
- 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)
23. Choi BH. Modulation of color response in the tetrazolium-based assay by porphyrins and polyphenols, MS thesis, Seoul Women's University, Seoul, Korea (2015)
  24. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142: 257-265 (1991)