고삼으로부터 분리된 Leachianone A의 카드뮴에 대한 독성억제 효과

양희태 · 최화정[1] · 백승화[2]*

대전보건대학 식품영양과, 1 : 생명공학연구원 천연의학연구부, 2 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Inhibitory Effects of Leachianone A from *Sophora flavescens* Ait. against Cadmium Induced Cytotoxicity

Hee Tae Young, Hwa Jung Choi[1], Seung Hwa Baek[2]*

Department of Food Nutrition, Daejeon Health Sciences College,
1 : Natural Medicine Research Centre, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology,
2 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

In this study, cytotoxicity of cadmium on NIH 3T fibroblasts was utilized in order to discover antitoxic compound in methanol extract of *Sophora flavascens* Ait. There were treatment groups; control (medium only), MTT_{50} group and five experimental groups. MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*- tetrazoliumbromide} assay was performed to evaluate the cytotoxicity of cell organelles and IC_{50} was also measured. Accordingly we have examined the detoxification effects of methanol extract of *S. flavescens* Ait. and leachianone A (LA) on cadmium-treated NIH 3T3 fibroblasts (IC_{50}= 12.5 μM) to observe morphological changes by the light microscopy. Both *S. flavescens* Ait. methanol extract and LA showed inhibitory effects on cadmium-induced cytotoxicity. Furthermore, LA showed dose-dependency in detoxication. From these results, it is conceivable to suggest that LA from *S. flavescens* Ait. methanol extract is a potential antitoxic agent.

Key words : Cytotoxicity, cadmium, NIH 3T3 fibroblasts, *Sophora flavescens* Ait.

서 론

산업의 발달과 인구증가 등 여러 요인으로 유해 중금속 같은 물질에 의해 인류의 의 · 식 · 주에 이용되는 재료를 공급하는 토양이 오염되며 오염된 토양에서 생산된 농산물을 섭취함으로서 인간의 건강에 여러 종류의 질병을 유발하고 있다. 그 중에서도 중금속은 인간의 몸에 축적되어 아미노산의 곁가지 (side chain)에 높은 친화력이 있어 결합함으로서 효소의 작용을 억제하고, 보조인자 (cofactors), 비타민 및 기질 (substrates)과 결합한 중금속은 간접적으로 세포구성 물질의 이용도를 변화시키며, 필수금속과 유사한 중금속이 필수금속과 대체되어 생체 내 복잡한 과정을 변화시키며, 생체 내 금속 물질의 불균형을 초래하여 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[1,2]. 카드뮴과 같은 일부 유독성 중금속은 비교적 낮은 농도에서도 체조직과 반응하여 체내에 서서히 독작용을 나타내고 그 생물학적 반감기가 길어 일단 중독이 되면 완치가 불가능하기 때문에 특별히 문제가 되고 있는데, 이 중 카드뮴은 체내에서 10-30년의 긴 생물학적 반감기를 가지고 있으므로 먹이 연쇄에 의하여 계속 축적되고, 이에 따라 그 독성도 누적된다. 그러므로 일반적인 사람은 출생시에는 인체 내에 카드뮴이 존재하지 않지만 연령이 증가함에 따라 점차적으로 체내에 축적되어 60년 정도를 사는 동안 약 20-30 ㎎의 카드뮴이 인체내에 축적된다. 이 축적량의 50-80%가 간장과 신장에 존재하며 혈액에 존재하는 카드뮴은 70% 이상이 적혈구에 존재한다[3-7]. 카드뮴의 체내 유입되는 과정은 음식물 섭취와 호흡 및 저부위 흡수 등의 경로를 거치나 특히 음식물은 1~50 μg/day로 나타나 있다[5,7,8]. 또한 흡수된 카드뮴은 생체 내에 축적됨으로서 중추신경마비, 근육의 무력화 및 돌연변이성 기형의 유발, 피부암 및 혈액암 등을 유발하는 등 생리기능계의 장애와 함께 생화학적 변화를 일으켜 여러 가지 질병을 일으키며 자손에게까지 악

* 교신저자 : 백승화, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : shbaek@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6225
· 접수 : 2008/05/13 · 수정 : 2008/09/10 · 채택 : 2008/09/25

영향을 미치는 것으로 보고되고 있다[9,10]. 카드뮴은 용융점 321℃, 끓는점 765℃인 부드럽고, 은백색이며, 연성이 있는 금속으로 용해도는 카드뮴 화합물에 따라서 상당한 변이가 있다[11,12].

특히, 녹차를 비롯한 다류 (茶類)의 잎 중에 존재하는 폴리페놀성 화합물인 catechin은 중금속류 제거작용[13], 항균작용[14], 혈압저하 및 혈소판 응집감소 및 혈중콜레스테롤 저하[15], 항암작용[16], 충치억제작용[17], 중추신경활성화[18], 항산화[19]에 대한 효과가 보고되고 있다. Catechin은 녹차 이외에도 홍차와 우롱차 등에 포함되어 있으나, 녹차가 홍차와 우롱차에 비해 중금속 제거효과가 탁월한 것으로 보고되고 있다. 이는 catechin이 발효과정을 거치는 동안 theaflavin 및 기타 다른 물질로 변하게 되므로, 발효차인 홍차와 반 발효차인 우롱차가 비 발효차인 녹차에 비해, catechin 함량이 적어지게 되어 나타나는 결과이다. 따라서 녹차에 다량 포함되어 있는 폴리페놀 성분 중의 하나인 catechin이 착물형성 혹은 화학흡착에 의해 침전을 일으킬 수 있으며, catechin 경구투여시 장내에서 중금속과 불용성 금속염을 형성함으로써, 체내에 흡수되지 않고 그대로 카드뮴을 배출시킴으로써, 체내 중금속을 제거할 수 있음이 제시되고 있다[20]. 최근 고삼이 다양한 종류의 flavonoids를 함유함이 보고됨에 따라, 고삼에 다량 포함된 flavonoid가 중금속에 대한 착염제로 작용할 수 있을지에 대한 많은 연구가 추구되고 있다. 고삼(苦蔘, 학명; *Sophora flavescens* Ait. (*S. flavescens* Ait.) Pharmaceutical name : *Radix Sophora flavescemtis*)는 콩과 (Leguminosae)에 속하는 뿌리는 약용 (건위제)로 쓰인다[21]. 고삼추출물이 중금속으로 인한 세포독성을 줄여줄 수 있는지 등에 대해서는 전혀 연구되고 있지 않은 실정으로서, 고삼에 함유된 flavonoids가 중금속에 대하여 효과적인 배위자로 작용할 수 있을지를 고찰함으로서, 고삼추출물이 중금속 해독제로 개발될 수 있을지에 대한 기초연구로서 시도하고자 하였다. 이에 본 연구는 고삼을 메탄올로 추출하여 flavanone을 분리한 후, IR 및 NMR 등의 분광학적인 방법으로 분자구조를 동정하여, leachianone A (LA)로 규명하였으며[22], LA이 카드뮴에 대한 세포독성을 효과적으로 억제할 수 있는지를 검색하고자, NIH 3T3 섬유모세포에 고삼의 메탄올 추출물 LA를 처리하여, MTT assay 및 광학 현미경적인 분석을 통해 세포생존율을 검색하여, 카드뮴에 대한 독성억제 효과를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 고삼 뿌리는 원광대학교 한의과 대학 한방병원에서 구입에서 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다.

2. 시약 및 기기

고삼 추출에 사용된 용매는 3차 증류수, *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol은 증류하여 사용하였다. 그리고 glass column (47 mm × 800 nm)을 사용하였고, Thin layer chromatography (TLC)는 silica gel plate (0.25 mm, polygram sil N-HR/ UV254, E. Merck), silica gel (kieselgel 60, 230-400 mesh), sand (Aldrich)를 사용하였다. Recycling prep-HPLC는 SUNIL JAI (JALGEL - GS310)의 methacrylic acid polymer가 충진된 column (40 × 500 mm)을 사용하였으며, HPLC용 grade를 사용하였다. Recycling prep-HPLC (Model 908), Column : JAIGEL-GS (310) × 2ea, Detector : UV (model-310) 사용하였으며, IR-Spectro- photometer는 Bomem사의 Model MB 10^4 FT/IR을 사용하였다. NMR Spectro-photometer (KBSI)는 JEOL-ECP 600을 사용하였으며, dimethyl sulfoxide-d6을 용매로 사용하였고, 내부 표준물질로 tetramethylsilane (TMS)를 기준으로 δ (ppm)으로 나타내었다.

세포배양에 사용한 MEM (minimum essential medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide]정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은 CO_2 incubator (Shellab Co., USA), Deep freezer (Ilshin), Nitrogen freezer (MVE, XC 34/14), Micropipette (Gilson), 96 well (Falcon), Conical tube (Falcon), FBS (Fetal bovine serum), RPMI medium 1640, antibiotic antimyzolic, hepes, L-glutamine, D-PBS (Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS (Hank's balanced salt solution) 등을 사용하였으며, Dimethylsulfoxide, 0.4% trypan blue solution, SDS (sodium dodecyl sulfate) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT 정량분석 및 SRB 정량분석은 ELISA reader (Spectra Max 250, USA)를 사용하였다.

3. MTT assay

고삼의 메탄올 추출물 및 LA의 카드뮴에 대한 해독경감을 보기 위하여, Mosmann[23]에 의한 MTT 방법으로 세포의 증식 또는 생존의 정도를 측정하였다. 즉, flat bottom의 96 well microplate (Falcon)에 NIH 3T3 세포를 1 × 10^3 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 배양하고, 시료들을 DMSO에 녹여 각 well에 처리한 후 48시간 배양하였다. 배양 후에 2 mg/mL 농도의 MTT용액을 0.05 mL씩 각 well에 넣어 CO_2 배양기에서 3시간 동안 배양하고, 상청액을 30 μL만을 남도록 multiple channel aspirator를 사용하여 흡입한 후, 각 well에 100% DMSO 0.15 mL을 첨가하였다. 이를 plate shaker에서 5 - 15분간 진탕시킨 다음 ELISA reader (Biorad, Richmond, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 결정하였다.

고삼의 메탄올 추출물 및 LA의 카드뮴에 대한 해독경감효과를 보기 위하여, 사용한 카드뮴 농도는 NIH 3T3 세포의 생장을 50% 억제하는 MTT_{50} (midpoint inhibition value)농도를 결정하였으며, 해독효과 실험은 7개군으로 구분하여 실험하였다. 즉, 배양액만으로 배양한 대조군, MTT_{50}량의 카드뮴처리군, MTT_{50}

량의 카드뮴과 0.5 μg/mL의 고삼 또는 LA 추출물 처리군, MTT_{50}량의 카드뮴과 1 μg/mL의 고삼 또는 LA 처리군, MTT_{50}량의 카드뮴과 5 μg/mL의 고삼 또는 LA 처리군, MTT_{50}량의 카드뮴과 10 μg/mL의 고삼 또는 LA 처리군, MTT_{50}량의 카드뮴과 50 μg/mL의 고삼 또는 LA 처리군으로 나누어 실험하였다. Survival absorbance (%)는 MTT_{50}량의 카드뮴 처리군을 100%로 하여 산출하였다.

4. 세포의 광학현미경 관찰

카드뮴에 대한 고삼의 메탄올 추출물 및 LA의 해독 경감효과를 보기 위하여, 카드뮴 및 고삼의 메탄올 추출물과 LA를 NIH 3T3 섬유모세포에 가하고, 일정시간 배양한 후 광학현미경으로 세포를 관찰하고, inverted microscope 하에서 관찰하여 사진을 촬영하였다.

5. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판명하였다.

결과 및 고찰

1. MTT 방법에 의한 세포 생존률 (viability) 측정

최근에 중금속 해독물질로 사용되고 있는 폴리페놀계 화합물인 탄닌성분이 금속이온과 착염 (chelation)에 의하여 세포독성을 경감시키며, 감귤 과피로부터 flavonoids인 hesperidin을 섭취하였을 때, 카드뮴 독성을 완화시킨다는 보고와 일치되는 결과로서[24], LA의 카드뮴 독성에 대한 억제는 5-hydroxyflavanone형태로 A고리의 5번위치의 히드록실기와 C고리의 카르보닐기에 의하여 카드뮴 착물이 형성되어, 카드뮴독성을 경감시키는 것으로 사료된다. 그렇지만 LA의 5-hydroxyflavanone유형으로 분자구조로 5-hydroxy-carbonyl의 bidentate의 chelating site로 이루어져, 카드뮴착물의 낮은 형성상수가 예상되는 배위자로서 카드뮴의 독성에 대한 완화효과를 기대한다[25]. 그 동안 BAL, EDTA 등과 같은 중금속 킬레이터들이 2차적인 독성을 유발하여, 중금속 해독제로 개발되어 사용되지 못하는 등, 카드뮴의 세포독성을 경감시키는 물질에 대한 연구가 이루어지고 있으나, 아직까지 뚜렷한 성적을 보이는 해독제가 개발되지 못하고 있는 실정이므로, 고삼에 포함된 flavonoids 화합물인 LA (5,7,4′-trihydroxy-8-lavandulyl-2′-methoxyflavanone)의 A고리의 5번위치 hydroxyl기와 C고리의 카보닐기에 bidendate로써 카드뮴에 대한 배위공유결합이 가능하다고 사료되어, 고삼의 메탄올 추출물로부터 LA를 분리하여, 세포의 생존률을 측정한 후, NIH 3T3 세포의 생장을 50% 억제하는 IC_{50} 농도를 결정하였다. 즉, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 각각의 처리군에 대한 흡광도를 측정한 결과, 1.56 μM 카드뮴처리시 세포의 생존률이 97.2%로 감소하였으며, 6.25 μM 카드뮴 처리시 생존률이 68.5%까지 급격히 감소되었고, 12.5 μM 처리시에는 세포생존률이 45.2%로 감소되어 대조군에 비하여, 생존률이 반으로 감소됨을 확인하였다. 25 μM 농도이하부터는 세포의 생존률이 10%이하로 감소되어, 카드뮴 농도에 의존적으로 세포의 생존률이 감소됨을 확인할 수 있었으며, IC_{50} 농도는 12.5 μM임을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. The cytotoxicity of cadmium in NIH 3T3 fibroblasts

Concentration of cadmium (μM)	Absorbance	Viability (%)
0.00 μM	1.563 ± 0.069	100
1.56 μM	1.520 ± 0.052	97.2
3.13 μM	1.491 ± 0.052	95.4
6.25 μM	1.071 ± 0.096	68.5
12.50 μM	0.707 ± 0.011	45.2
25.00 μM	0.304 ± 0.025	19.4
50.00 μM	0.166 ± 0.005	10.6
75.00 μM	0.086 ± 0.005	5.5
100.00 μM	0.080 ± 0.003	5.1

이에 고삼의 메탄올 추출물과 LA가 카드뮴에 대한 세포독성을 방어할 수 있는지를 평가하기 위하여, 다음과 같이 7개의 실험군으로 나누어 실험하였다. 즉, NIH 3T3 섬유모세포 대조군 (control 군), 카드뮴 단독처리군 (IC_{50}군), 카드뮴 IC_{50} 농도와 고삼의 메탄올 추출물 처리군 (IC_{50} + 고삼의 메탄올 추출물), LA 처리군 (IC_{50} + LA처리군)으로 나누어 각 약물을 처리한 후 48시간 배양한 다음, MTT assay로 세포 생존률을 비교하였다. 카드뮴 IC_{50} 농도의 세포 생존률을 100%로 하여 고삼 메탄올 추출물 혹은 LA 처리군의 세포 생존률을 비교하여 산출하였다. 그 결과 IC_{50}군의 세포 생존률은 100% (A= 0.372 ± 0.013)이며, 이에 비해 대조군의 세포 생존률은 273.1%, IC_{50} + 1 μg/mL 메탄올 추출물 처리시에는 세포 생존률이 116.7% (A= 0.434 ± 0.008)로 증가하였으며, 이런 결과는 IC_{50} + 0.5 μg/mL 메탄올 추출물의 처리시에 증가한 112.6% (A= 0.491 ± 0.013)와 비슷한 세포 생존율이 관찰되었다. IC_{50} + 10 μg/mL 메탄올 추출물 처리시에는 132.8% (A= 0.554 ± 0.012)로 더욱 세포 생존율이 증가되었으며, IC_{50} + 50 μg/mL 메탄올 추출물 처리시에는 161.8% (A= 0.602 ± 0.009)가 증가되어, 10 μg/mL 메탄올 추출물농도 이상에서는 약 50% 이상 세포 생존율이 증가되는 결과를 얻게 되었으며, 이러한 연구결과는 고삼의 메탄올 추출물이 농도에 의존적으로 세포 생존율을 증가시킨다는 사실임을 증명하고 있다. LA가 카드뮴 독성에 대한 경감효과를 확인하기 위하여 실험한 결과, IC_{50} + LA처리군에서의 세포 생존율은 IC_{50}처리군보다 LA의 농도 의존적으로 세포 생존률이 증가되었다. IC50처리군의 세포 생존률 (100%)에 비해, IC_{50} + 1.0 μg/mL LA처리군의 세포 생존률이 124.4%로 증가되었으며, IC_{50} + 10 μg/mL LA처리군 (174.7%)의 생존율은 IC_{50} + 1.0 μg/mL LA처리군보다 약 1.4배 (124.4%) 정도로 증가하였으나, IC_{50} + 50 μg/mL LA처리군의 세포 생존율 (205%)은 IC50 + 10 μg/mL LA처리군보다 약 1.2배 정도로 세포독성을 경감하는 것으로 관찰되었다. IC_{50} + 5.0 μg/mL LA처리군이상에서부터 카드뮴독성에 대한 50%이상의 경감효과를 예측되었다. 이와 같은 연구결과로, 고삼에 포함된 LA가 카드뮴에 의한 세포독성을 효과적으로 방어할 수 있음을 알 수 있었으며, 고삼의 메탄올 추출물에서 분리된 LA가 카드뮴에 대한 세포의 독성을 경감시킬수 있는 5-hydroxy-carbonyl의 bidentate로서 카드뮴-LA 착

물을 형성할 수 있으리라 생각된다[25]. 이러한 연구결과를 근거로 하여 flavonoid의 분자구조에 따른 중금속의 독성경감효과에 대한 금속착물의 조성과 안정도상수, 구조분석등을 연구함으로서, 환경오염으로 인한 질병예방과 중독치료제의 개발에 기여하리라 생각된다(Table 1, Fig. 1, 2).

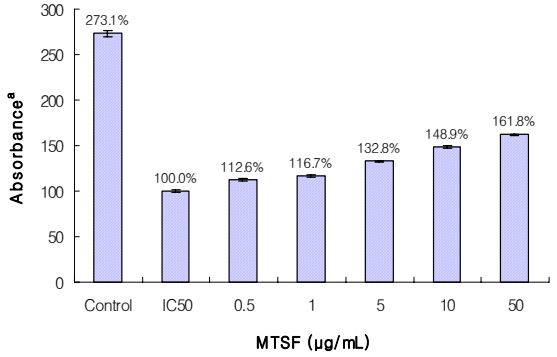

Fig. 1. The MTT absorbance of MTSF on NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (IC_{50}). The cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. aThe values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments significanthy different from the control value ; *p<0.05, **p<0.01 (Student's test). MTSF: Methanol extract of *S. flavescens* Ait. 0.5; IC_{50} + 0.5 μg/mL MTSF, 1; IC_{50} + 1.0 μg/mL MTSF, 5: IC_{50} + 0.5 μg/mL MTSF, 10: IC_{50} + 10 μg/mL MTSF, 50: IC_{50} + 50 μg/mL MTSF.

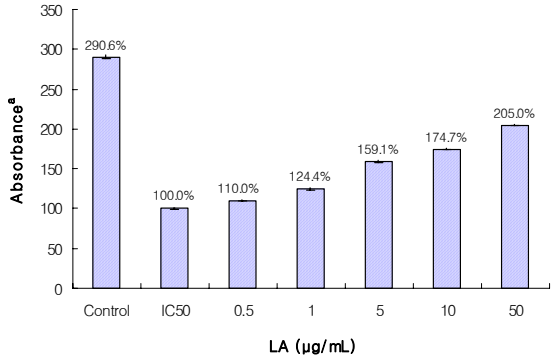

Fig. 2. The MTT absorbance of LA on NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (IC_{50}). The cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. aThe values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments significanthy different from the control value ; **p<0.01 (Student's test). LA; leachianone A. 0.5; IC_{50} + 0.5 μg/mL LA, 1; IC_{50} + 1.0 μg/mL LA, 5; IC_{50} + 5.0 μg/mL LA, 10; IC_{50} + 10 μg/mL LA, 50; IC_{50} + 1.0 μg/mL LA.

2. 세포의 광학현미경적 관찰

LA의 카드뮴에 의한 세포독성 방어효과를 평가하기 위해, 광학현미경적인 관찰을 통해 세포의 성상을 고찰하였다. 즉, NIH 3T3 세포를 24 시간 배양한 후 실험군을 대조군 (control), 카드뮴 단독처리군 (IC_{50}군), 카드뮴과 고삼의 메탄올 추출물 처리군 (IC_{50} + 고삼의 메탄올 추출물 처리군), 카드뮴과 LA 처리군 (IC_{50} + LA 처리군)으로 나누어, 세포의 변화양상을 관찰하였다. NIH 3T3 세포는 24 시간이상 배양하면, 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로서 well 바닥에 부착되면서 단층을 이루어 자랐으며, 이에 비해 IC_{50}의 카드뮴을 처리한 군에서는 12시간 후부터 세포수가 감소되었으며, 세포의 형태는 방추형에서 원형으로 변형되는 양상을 볼 수 있었다. IC_{50} 농도의 카드뮴과 고삼의 메탄올 추출물, LA를 처리한 군에서는 IC_{50} 군에 비하여 세포수가 증가하고, 세포의 형태가 변하지 않는 등의 카드뮴 독성에 대하여 방어효과가 뚜렷하였다. 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 고삼으로부터 분리한 LA가 억제효과가 있는 것으로 인정된다(Table 2).

Table 2. The MTT absorbance of leachianone A on NIH 3T3 fibroblasts treated with different concentrations of cadmium.

Concentration (μg/mL)	Absorbance (% of control) Mean ± S.D. NIH 3T3 fibroblasts	
	MTSF	LA
Control	1.016 ± 0.035 (273.1%)	0.988 ± 0.016 (290.6%)
MTT50	0.372 ± 0.013 (100%)*	0.340 ± 0.011 (100%)
0.5	0.419 ± 0.013 (112.6%)	0.374 ± 0.007 (110.0%)
1	0.434 ± 0.008 (116.7%)	0.423 ± 0.011 (124.4%)
5	0.494 ± 0.010 (132.8%)	0.541 ± 0.011 (159.1%)
10	0.554 ± 0.012 (148.9%)	0.594 ± 0.007 (174.7%)
50	0.602 ± 0.009 (161.8%)**	0.697 ± 0.010 (205.0%)**

Cells were incubated for 48 hrs. The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the MTT_{50} group (**p<0.01, *p<0.05). LA; Leachianone A, MTSF; Methanol extract of *S. flavescens* Ait.

Leachianone A는 flavanone 화합물로써 A고리의 C5 위치에 있는 hydroxy기와 C고리의 C4 위치에 있는 ketone 그룹이 conjugate system으로 음전하량을 증가시켜, Cd (Ⅱ)과의 안정한 착물형성의 기여도를 증가시키기 때문으로, 음전하의 ligand로써 카드뮴과 결합할 때 두자리 리간드로 작용하여, 카드뮴과 LA가 1 : 1 착물을 형성할 것이라고 생각된다[26]. 또한 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 배지의 pH 조건 (pH= 8.0~8.2) 이 LA의 A고리의 C5 의 hydroxy기와 C고리의 C4의 ketone 그룹의 음전하량을 증가시키는 염기요인으로써 작용하리라 추측된다[27]. 이와 같이 A고리와 C고리의 conjugate system에 의한 Cd (Ⅱ)에 대한 binding site로 작용하기 때문에, NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성을 경감시킬 수 있다고 생각된다. 또한 세포의 회복으로 생존률이 증가되며, 광학현미경적 소견에서도 세포재생이 뚜렷하게 관찰됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

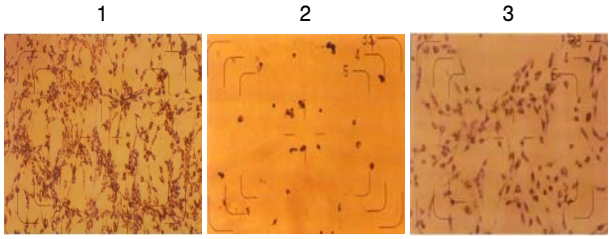

Fig. 3. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3 hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days × 200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (1). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the IC_{50} concentrations for 2 days × 200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased (2). An inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the MTT_{50} cadmium concentration and 50 μM LA containing medium. Cells were showed regenerative and number of cells were increased (3).

결 론

카드뮴에 대한 세포독성을 방어할 수 있는지를 평가하기 위하여, NIH 3T3 섬유모세포를 대조군 (control), 카드뮴 단독 처리군 (IC_{50}), 카드뮴 + 고삼의 메탄올 추출물 처리군 (IC_{50} + 고삼의 메탄올 추출물 처리군), 카드뮴 + LA 처리군 (IC_{50} + LA처리군)의 6개 실험군으로 나누어 약물처리하고, MTT 정량분석법 및 광학 현미경으로 세포 생존률을 검색한 결과, 현미경상에서도 세포의 회복양상은 LA처리군에서 현저히 증가되는 양상을 보였다.

이상의 연구결과에 의하면, 고삼의 메탄올 추출물에서 분리한 LA가 카드뮴 독성에 의하여, 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Beattie, J.H., Marion, M., Schmit, J.P., Denizeau, F. The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primary hepatocyte cultures. Toxicology 62: 161-173, 1990.
2. Williams, P.L., Burson, J.L. Industrial Toxicology.(eds) Van Nostrand Reinhold. pp 197-210, 1985.
3. Foulkes E.C. (eds) Biological Roles of Metallothionein, Elsevier, New York, pp 215-222, 1982.
4. Vallee, B.L., Ulmer, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem. 4: 91-128, 1972.
5. 국립보건원. 식품중의 미량금속에 관한 조사연구. 29: 365-377, 1992.
6. 김운성, 이철호, 김성조, 이주돈, 문광현, 백승화. 알로에 첨가식이 흰쥐의 카드뮴 독성에 미치는 영향. 한국식품과학회지 27: 555-563, 1995.
7. 최성인, 이정희, 이서래. 동물실험에 의한 녹차음료의 카드뮴 및 납 제거효과. 한국식품과학회지 26: 745-749, 1994.
8. Eiinder, C.G. Cadmium: Uses, Occurrence and Intake. Cadmium and Health. L. Friberg, et al, Eds. CRC Press, Bca Raton, FL. 1985.
9. WHO. Cadmium in Recommended Health-Based Limits in Occupational Health to Heavy Metals. WHO Techanical Report Series, pp 647-655, 1980.
10. WHO. Health hazard of the Human Environmental. Geneva, WHO, pp 35-37, 1977.
11. Friberg, L., Kjellstrom, T., Nordberg, G. Cadmium. Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, New York, pp 130-184, 1986.
12. Elinder, C.G. Cadmium : Wses, Occurrence and Intake. Cadmium and Health. L. Friberg, et al, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL. 1985.
13. Kim, M.J., Rhee, S.J. Effects of Korean green tea, colong tea and black tea beverage on the removal of cadmium in rat. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 784-791, 1994.
14. Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against Streptococcus mutans. a Cariognic bacterium. Argic. Biol. Chem. 53: 2307-2311, 1989.
15. Muramatsu, K., Fukuyo, M,, Jara, Y. Efect of green tea catechins on plasma cholestero level in cholesterol fed rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 32: 613-612, 1986.
16. Cheng, S.J. The preliminary study of inhibitory effects of green tea antioxidant on mutation. Acta Exp. Biol. 9: 328-334, 1986.
17. Sakanaka, S., Shimura, N., Aizawa, M., Kim, M., Yamamoto, T. Preventive effect of green tea polyphenols against dental caries in conventional rats. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 592-594, 1992.
18. Hayashi, E., Hayashi, M., Yamazoe, H. Pharmacological action of tea extract on the central nervous system in mice. Oyo Yalari 40: 351-356, 1990.
19. Matsuzaki, T., Hata, Y. Antioxidative activity of tea leaf catechins. Nippon Nogeikagaku Kaish 59: 129-134, 1985.
20. Choi, J.H., Rhee, S.J. Effects of green tea catechin on cadmium accumulation in chronic cadmium poisoned rats. Korean J. Nutr. 34: 384-392, 2001.
21. 신민교. 임상본초학, 남산당, 서울. pp 314-315, 1996.
22. Yang, H.T., Choi, H.J., Baek, S.H. Antimicrobial effect of flavanones from Sophora flavescens Ait. J. Pharm. Soc. Korea Accepted, 2008.
23. Mosmann, T.J. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survial; application of proloferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65: 55-63, 1983.
24. Kim, H.J., Bea, K.H., Lee, H.J., Eun, J.B., Kim, M.K. Effect of hesperidin extracted from tangerine peel on Cd and lipid metabolism, and antioxidative capacity in rats. Korean J. Nutr. 32: 137-149, 1999.
25. Cornard, J.P., Dangleterre, L., Lapouge, C. Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb (II)-quercetin complex. J. Phys. Chem. 109: 10044-10051, 2005.
26. 이정호. 어성초로부터 활성성분의 분리와 약리효과. 원광대학교 한의전문대학원 박사학위 논문. 2002.
27. Baek, S.H., Lee, H., Pae, H.O., Kim, Y.O., Kwak, J.S., Yoo, Y.H., Han, D.S. Delvelopment of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. antitoxic effects of binding of caffeic acid and cadmium on cultured rat neuroglial cells. Kor. J. Toxicol. 11: 241-246, 1995.