

한국산 생약으로부터 해독물질의 개발(제5보)
배양 백서 신경아교세포에서 Caffeic acid와 카드뮴의 결합에 의한 해독효과

백승화 · 이 홍 · 배현옥 · 김영옥 · 광정숙 · 유현경* · 한두석*
원광대학교 자연과학대학 화학과, 치과대학 구강해부학교실*

Development of Antitoxic Agents from Korean
Medicinal Plants. Part 5.
Antitoxic Effects of Binding of Caffeic acid and
Cadmium on Cultured Rat Neuroglial Cells

Seung-Hwa Baek, Hong Lee, Hyun-Ock Pae, Young-Ok Kim, Jung-Suk Kwak,
Hyeon Gyeong Yoo* and Du-Seok Han*

Dept. of Chemistry, College of Natural Science and
*Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, WonKwang University

(Received November 20, 1995)

(Accepted December 2, 1995)

ABSTRACT : This study was carried out to develop the antitoxic compound about cytotoxicity of cadmium on cultured rat neuroglial cells. These cells divided into 3 groups; control group (medium only) or MTT_{50} group (neuroglial cell, $61 \mu\text{M}$ cadmium) and experimental group ($61 \mu\text{M}$ caffeic acid). Neutral red (NR) and tetrazolium MTT of the colorimetric assay were performed to evaluate the cytotoxicity of cell organelles. The light microscopic study was carried out to morphological changes of cultured rat neuroglial cells. The results indicated that caffeic acid showed detoxification effect on cytotoxicity of cadmium in $61 \mu\text{M}$ concentration. According to the spectroscopic study of 1 : 1 complex of cadmium and caffeic acid, it showed that this formation of complex eliminated cadmium from cultured rat neuroglial cells.

Key Words : Cytotoxicity, Neuroglial cell, Neutral red (NR), Tetrazolium MTT, Detoxification effect

I. 서 론

카드뮴 등의 중금속에 생체가 노출되었을 때 일어나는 반응은 첫째, 대부분의 중금속은 amino acid의 side chain에 높은 친화력이 있어 결합하므로 효소의 작용을 억제하고, 둘째, cofactors, vitamins 및 substrates와 결합한 중금속은 간접적으로 세포구성 물질의 이용도를 변화시키며, 셋째, 필수금속과 유사한 중금속이 필수금속과 대체되어 생체내 복잡한 과정을 변화시키며, 넷째, 생체내 금속 물질의 불균형을 초래하여 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Williams와 Burson, 1985). 또한 중금속에 대한 생체내 방어작용으로 핵반응 및 세포질 반응으로 대별할 수 있는데, 핵반응은 acid non-histone 단백질과 결합하여 핵포입체(nuclear inclusion bodies)를 형성하는 것이고, 세포질 반응은 중

금속과의 결합반응, 용해소체의 변화 및 MT합성이 있다고 보고하였다(Cherian와 Nordberg, 1983).

카드뮴은 생체내에 축적되므로 중추신경마비, 근의 무력화 및 돌연변이성 기형을 유발하여 후세까지 영향을 주며(Gale와 Bunch, 1979; Greener와 Kochen, 1983), 최근에는 인체에 피부암(Nomiyama, 1980; Lin 등, 1992), 또는 혈액암(Waalkes 등, 1992)을 일으키는 것으로 밝혀져 관심이 집중되고 있는 중금속이다. 카드뮴의 독성을 조사하기 위해서는 생체에 카드뮴을 투여하면서, 중독증상이나 기형유발을 관찰하는 방법인 생체내 실험(*in vivo*)과 각종 세포에 카드뮴을 농도별로 투입하면서 세포독성을 조사한 후, 관찰하는 방법인 실험관내 실험(*in vitro*)방법이 있는데, 근래에는 생체내 실험보다는 실험관내 실험이 많이 이용되고 있다.

최근에 중금속 해독물질로 사용되고 있는 BAL이나

EDTA 등은 신장에 손상을 주는 등 2차적인 독성을 유발하는 물질로 문제가 되고 있어(WHO, 1977), 카드뮴의 세포독성을 경감시키는 물질인 아연(Zn)(Coogan 등, 1992; Kaji 등, 1992; Liu 등, 1990), MT(metallothionein)(Beattie 등, 1990; Robson 등, 1992), 구리(Cu)(Kaji 등, 1992), GSH(cellular glutathione)(Li 등, 1993; Kelland 등, 1992; Kang과 Enger, 1990), sodium butyrate(Thomas 등, 1991) 등에 대하여 각각 많은 연구가 이루어지고 있고, 또한 이들 물질들의 상호관계에 대하여도 연구되고 있으나, 아직 카드뮴 해독제로 사용하지 못하고 있는 실정이다.

이에 저자는 카드뮴의 해독경감효과가 있는 소엽과 금은화의 구성 성분인 페놀화합물로서 caffeic acid는 항암작용이 있는 것으로 보고되었고(Huang 등, 1988), 또한 항염증작용 및 정균작용이 있으며(Chinthalapally 등, 1992), 생선중독이나 버섯중독시 효과가 있는 것으로 보고되었다(송주택, 1983). Caffeic acid 분자구조식이 중금속과 결합이 용이하게 되어 있어 그동안 세포독성 실험에 이용한 카드뮴(정연태 등, 1992; 이용주 등, 1993)과 리간드로 결합이 용이할 것으로 추측되어 카드뮴의 해독물질을 개발할 목적으로 본 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

전보(Han 등, 1994)에 보고된 바와 같이 실험재료, 세포배양, 카드뮴처리, caffeic acid처리, NR(Neutral red)정량, MTT(Tetrazolium MTT)정량, 세포의 형태학적 관찰 및 통계처리는 동일한 실험방법으로 이루어졌다.

기구 및 시약: Caffeic acid(RCOOH, Sigma사 제품)의 pH=8.0 저장용액은 NaOH(1.0×10^{-3} M) 소량에 의해서 완전히 중화시켜서 RCOO⁻로 해리시켜 1.0×10^{-4} M로 조제하여, 목적한 량(50 μ M)을 분취하여 사용하였고, pH=4.0의 caffeic acid 저장용액은 물에 대한 용해도가 적은 관계로 5.0×10^{-5} M을 조제하여 pH=4.0으로 유지하여 사용하였다. CdCl₂(Sigma사 제품)의 저장용액은 1.0×10^{-3} M을 3차 증류수에 용해시켜 조제하였으며, 여기서 필요한 량을 분취하여 사용하였다. 모든 스펙트라 측정은 실험용액의 액성을 pH=4.0과 pH=8.0로 유지시켰으며, 온도는 17°C~20°C에서 실시하였다. 사용한 UV/VIS spectrophotometer는 Pye-Unicam사의 model SP-400을 사용하였으며, 흡수 스펙트라의 측정범위는 240~440 nm 범위를 선택하였다. 흡수분광학적 방법에 의한 복합체의 결합비 결정(Skoog 등, 1992)은 몰비법을 사용하였으며, 몰비법은 한가지 성분의 농도

를 고정하고 나머지 성분의 농도를 바꾸어 금속과 리간드의 농도비 즉([M]/[L])를 바꾸면서 착물의 최대흡수 파장에서 흡광도를 계속 측정하여 흡광도 변화와 몰비를 도출하여 몰비를 구하는 방법을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에서는 caffeic acid와 cadmium의 착물형성에 관한 것으로 먼저 caffeic acid의 액성에 따른 spectra의 변화를 살펴보았다.

Fig. 1은 pH=4.0과 8.0에서의 caffeic acid의 흡수 spectrum을 나타낸 것으로 pH=4.0의 caffeic acid는 $\lambda_1=315$ nm와 $\lambda_2=294$ nm에 두개의 흡수대가 나타난다. Caffeic acid를 수산화 나트륨으로 완전히 중화하여 알카리 상태의 pH=8.0에서의 caffeic acid의 흡수 spectrum은 $\lambda_1=340$ nm, $\lambda_2=294$ nm와 260 nm에서 흡수대가 나타나는 현상은 산-염기 반응에 의한 것으로 생각된다. 용액의 액성에 따라서 spectra의 특성적 변화가 나타남으로 액성을 산성과 알카리로 구분하여 caffeic acid 용액에 cadmium을 농도별로 첨가하여 분광학적 현상을 연구하였다. 산성조건인 pH=4.0의 caffeic acid에 Cd(II)의 농도별 첨가에 따른 spectra의 변화 양상은 Fig. 2와 같다. Cd(II)의 농도증가에 따라 315 nm의 흡광도가 감소하고, 280 nm에 새로운 흡수대가 나타나는 것을 볼 수 있으며, 290 nm에 등흡광점이 관찰된다. 280 nm에 나타난 새로운 흡수대는 산성조건 하에서 caffeic acid와

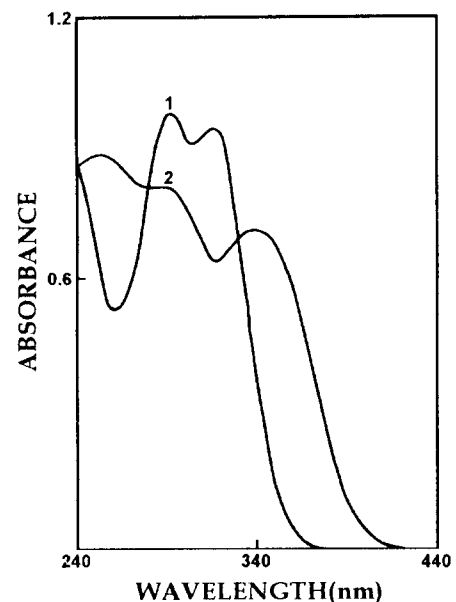


Fig. 1. Absorption spectra of caffeic acid (50 μ M) at pH=4.0(1) and pH=8.0(2).

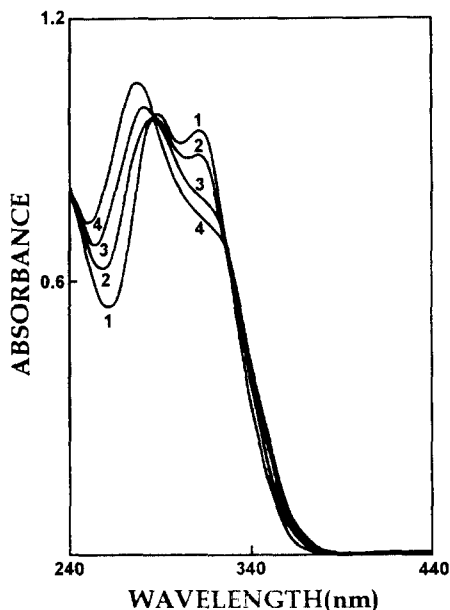


Fig. 2. Absorption spectra of caffeic acid ($50 \mu\text{M}$) at $\text{pH}=4.0$ in the presence of various concentrations of cadmium. $R=[\text{Cadmium}]/[\text{Caffeic acid}]$; $R=0(1), 0.6(2), 0.8(3),$ and $1.0(4)$.

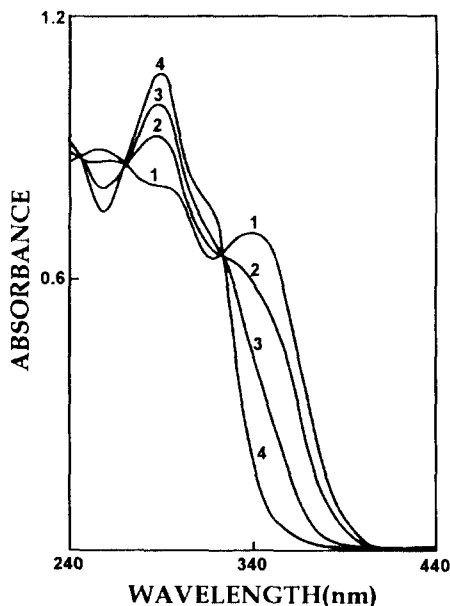


Fig. 3. Absorption spectra of caffeic acid ($50 \mu\text{M}$) at $\text{pH}=8.0$ in the presence of various concentration of cadmium. $R=[\text{Cadmium}]/[\text{Caffeic acid}]$; $R=0(1), 0.6(2), 0.8(3),$ and $1.0(4)$.

cadmium이 착물형성에 의한 것으로 생각된다.

Fig. 3은 알카리 상태의 $\text{pH}=8.0$ 인 caffeic acid에 Cd(II)을 농도별로 첨가했을 때 나타나는 스펙트라의 변화를 나타낸 것으로 배양 배서 신경아교세포에 대한 배지의 pH 조건($\text{pH}=8.0\sim 8.2$)과 비슷한 조건에서 카드뮴착물을 조사한 스펙트라의 변화를 연구한 것이다.

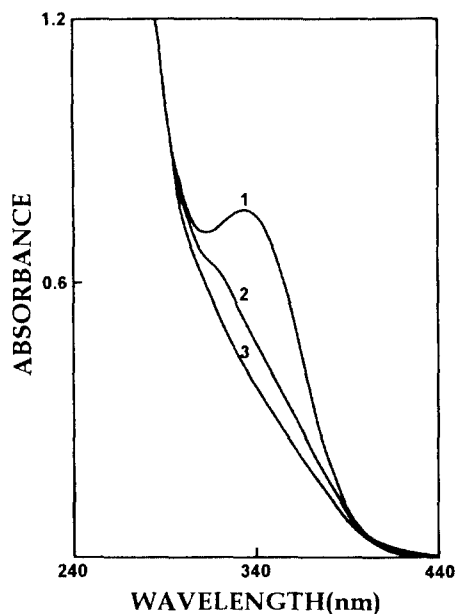


Fig. 4. Absorption spectra of caffeic acid ($61 \mu\text{M}$) at $\text{pH}=8.0$ (1) caffeic acid ($61 \mu\text{M}$), (2) caffeic acid ($61 \mu\text{M}$), and cadmium ($61 \mu\text{M}$), (3) medium only.

Cd(II)의 농도증가에 따라서 260, 294와 340 nm의 흡광도가 감소하고, 294 nm의 흡광도를 지나서 290 nm에 새로운 흡수대가 나타나는 것을 볼 수 있으며, 270과 325 nm에 등흡광점이 관찰된다. 290 nm에 나타난 새로운 흡수대는 알카리 조건하에서 나타나는 caffeic acid와 cadmium의 착물형성에 의한 것으로 본다. Fig. 2와 3의 흡수스펙트라로부터 $R=[\text{cadmium}]/[\text{caffeic acid}]$ 의 값이 $R=1.0$ 인 경우 caffeic acid와 cadmium의 착물에 대한 흡광도를 비교하면 Fig. 3에서 $\text{pH}=8.0$ 인 착물의 흡광도가 산성조건($\text{pH}=4.0$)에서 관찰된 흡광도보다 높은 값을 얻었으며, 이와 같은 흡광도의 관찰값은 $\text{pH}=8.0$ 인 염기성 용액에서 안정한 caffeic acid와 cadmium의 착물이 형성 되었으리라 생각된다.

Fig. 5는 Fig. 2와 3의 caffeic acid 용액에 따른 spectra의 변화를 mole-ratio method에 대하여 도식한 것으로 caffeic acid와 Cd(II)의 mole-ratio가 1.0이 되면 흡광도의 변화가 최대가 되고 이보다 높은 mole-ratio에서는 흡광도의 변화가 없거나($\text{pH}=4.0$), 염기성 용액에서 흡광도의 감소가 나타나는 것을 보아 $R=1.0$ 에서 가장 안정된 분자구조의 착물을 형성하였으리라 생각된다. Fig. 2와 3의 실험결과로부터($\text{pH}=8.0$) caffeic acid에 cadmium을 농도별로 첨가하면 spectra의 변화가 있음을 발견하였고, 이러한 spectra의 변화는 cadmium과 caffeic acid간의 안정한 착물 형성에 기인하며, Fig. 5로부터 caffeic acid와 cadmium 착물의 농도비가 1:1

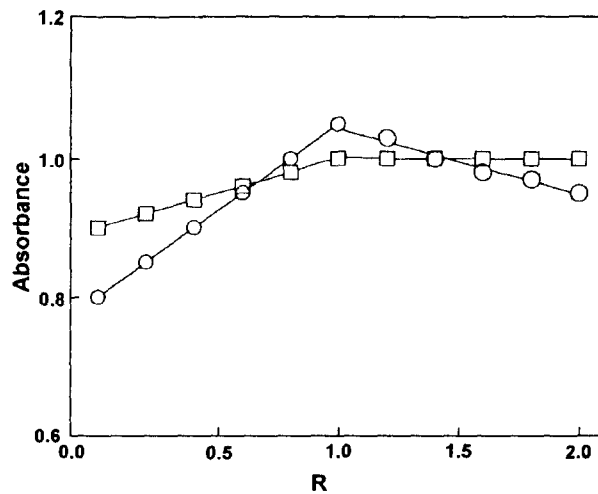


Fig. 5. Mole-ratio plots at 280 nm (□: pH=4.0) and 290 nm (○: pH=8.0) for 1:1 complex of cadmium and caffeic acid.

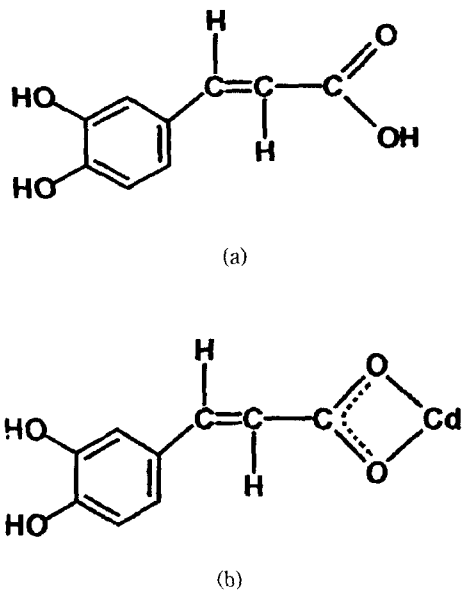
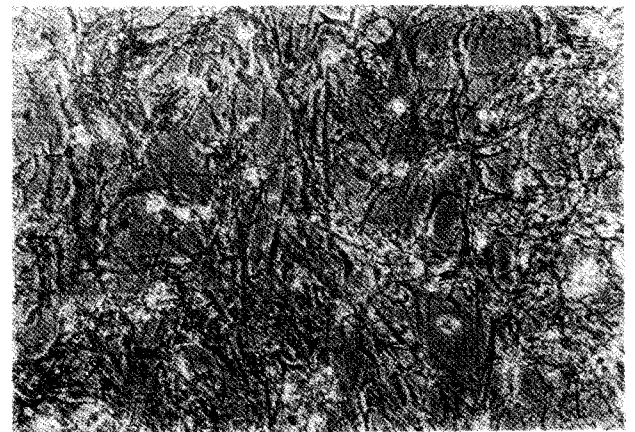
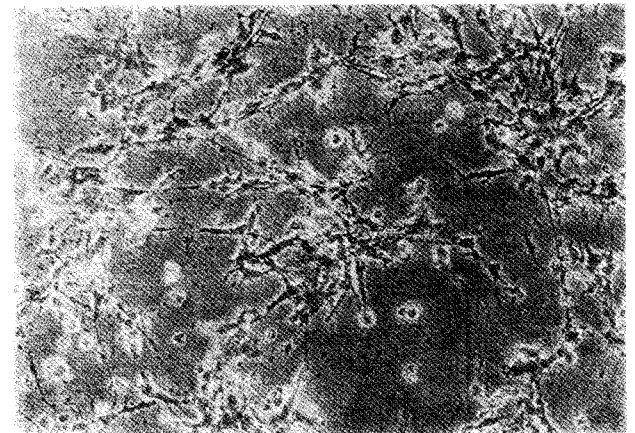


Fig. 6. The structures of caffeic acid (a) and 1:1 complex of cadmium and caffeic acid (b).

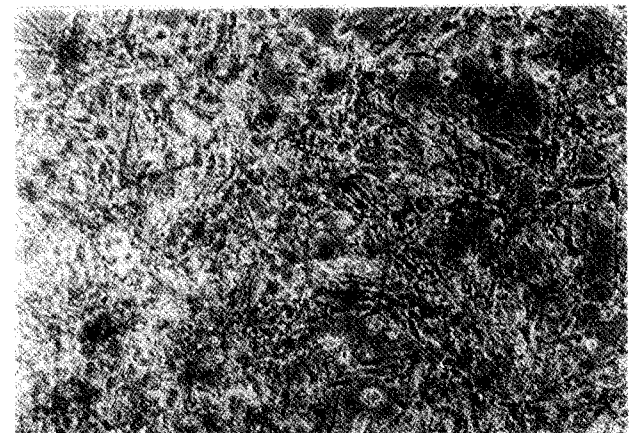
임을 알 수 있었다. 한편, 배양 백서 신경아교세포를 cadmium과 caffeic acid를 농도별로 동시에 첨가함으로써 세포의 해독효과와 분광학적인 실험의 결과를 비교 검토할 목적으로 배양 백서 신경아교세포에 caffeic acid(61 μM)를 첨가하여 나타나는 spectrum을 Fig. 4의 1에 나타나 있다. Caffeic acid(61 μM)와 Cd(II) (61 μM) 농도를 1:1로 유지한 spectrum이 Fig. 4의 2에 나타나 있다. 340 nm의 최대 흡수대가 현저히 감소된 것을 볼 수 있으나, 320 nm 이하의 영역은 배지의 특성 흡수대에 의해서 관측할 수 없지만 Fig. 3과 5로부터 얻은 실



(a)



(b)



(c)

Fig. 7. An inverted photomicrograph of cultured rat neuroglial cells in control medium (A) and MTT₅₀ (61 μM/ml) cadmium containing medium (negative control) (B)×100. An inverted photomicrograph of cultured rat neuroglial cells in MTT₅₀ cadmium and 61 μM/ml caffeic acid containing medium (C)×100.

험적 사실로부터 1:1 착물이 형성된 것으로 추측할 수 있다. Caffeic acid는 수용액내에서 keto형태로 한자리 리간드로 작용하는 반면 벤젠고리의 diol형태는 두

Table 1. The effects of caffeic acid on the MTT absorbance in cultured rat neuroglial cell treated with different cadmium

Concentration of caffeic acid (μM)	Absorbance (% of control) Mean \pm S.D.	
	Neuroglial cell	
Control	0.799 \pm 0.40 (100)	
MTT ₅₀	0.253 \pm 0.08 (31.7)	
1	0.424 \pm 0.13 (53.1)**	
25	0.540 \pm 0.08 (67.6)**	
61	0.644 \pm 0.28 (80.6)**	
100	0.603 \pm 0.14 (75.5)**	

Significantly different from the MTT₅₀ group (**; $p < 0.01$).

자리 리간드로 작용하여 킬레이트 화합물을 형성하는 것으로 예측되었으나, 벤젠고리의 공액효과에 의하여 카르복실기의 음전하량을 증가시켜 Cd(II)과의 안정한 착물형성의 기여도를 증가시키기 때문으로 RCO₂⁻ 이온은 카드뮴과 결합시 두자리 리간드로 작용하여 착물을 형성하리라 생각된다(Fig. 6)(Kim 등, 1992). 따라서 세포의 해독효과는 배양 백서 신경아교세포에 caffeic acid와 Cd를 동시에 첨가할때 1:1 착물의 안정한 분자구조 형성에 의해서 배양 백서 신경아교세포로부터 cadmium이 제거됨을 알 수 있었다(Table 1).

전보(Han 등, 1994)에서 신경아교세포를 형태학적으로 관찰한 결과 대조군에서는 많은 신경아교세포가 배양용기의 바닥에 부착되어 있었고 세포체에서 뻗어나간 많은 돌기들이 서로 연결되어 있었으며 일부 세포에서는 분열되는 소견을 보였으며(Fig. 7-A), MTT₅₀량 및 NR₅₀량의 카드뮴 처리군에서는 뚜렷한 세포괴사가 관찰되었었고 세포돌기 역시 거의 관찰되지 않았으며, 세포형태의 변화가 심하였다(Fig. 7-B).

MTT₅₀량 및 NR₅₀량의 카드뮴과 caffeic acid(61 μM) 농도를 동시에 처리한 군에서는 배양용기의 바닥에 다수의 세포가 부착되어 있었고 세포돌기가 대조군과 유사한 상태로 회복되었으며, 원형세포의 수도 현저히 감소한 결과가 일치하였다(Fig. 7-C).

IV. 결 론

카드뮴에 의한 배양 백서 신경아교세포 손상에 수복시킬 수 있는 해독물질을 창출할 목적으로 NR₅₀량 및 MTT₅₀량의 카드뮴과 caffeic acid(61 μM)를 신경아교세포에 처리한 후 NR uptake 능력 MTT 흡광도 및 광학현미경적 관찰을 실시한 결과 caffeic acid는 61 μM 농도에서 카드뮴의 세포독성에 대한 해독효과가 있음을 알 수 있었다.

분광학적인 실험결과에 의한 스펙트럼(Fig. 4의 2)으

로부터 caffeic acid와 카드뮴을 동시에 첨가한 카드뮴의 1:1 착물 형성에 의해서 배양 백서 신경아교세포로부터 카드뮴이 제거됨을 증명할 수 있었다.

참고문헌

- Beattie, J.H., Marion, M., Schmit, J.P. and Denizeau, F. (1990): The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicology*. **62**(2), 161-173.
- Cherian, M.G., Nordberg M. (1983): Cellular adaption in metal toxicology and metallothionein. *Toxicology*. **28**, 1-15.
- Chinthalapally, V.R., Dhimant, D., Bipin, K., Shantu, A. and Bandara, S.R. (1992): Effect of caffeic acid ester on carcinogen induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chem. Biol. Int.* **84**, 277-290.
- Coogan, T.P., Bare, R.M. and Waalkes, M.P. (1992): Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicology and Applied pharmacology*. **113**(2), 227-233.
- Gale, T.F. and Bunch, J.D. (1979): The Effect of the time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters. *Teratology*, **19**, 81-86.
- Greener, Y. and Kochen, J.A. (1983): Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology*. **28**, 23-28.
- Huang, M.T., Smart, R.C., Wang, C.Q. and Conney, A.H. (1988): Inhibitory effect of carcummin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Cancer Res.* **48**, 5941-5946.
- Kang, Y.J. and Enger, M.D. (1990): cadmium cytotoxicity correlates with the changes in glutathione content that occur during the logarithmic growth phase of A549-T27 cells. *Toxicology Letters*. **51**(1), 23-28.
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Koyanagi, E., Yamamoto, C., Mishima, A., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992): Protective effect of copper against cadmium cytotoxicity on cultured vascular endothelial cells. *Toxicology Letters*. **63**(1), 13-20.
- Kaji, T., Ohkaward, S., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992): Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology*, **76**(3), 257-270.
- Kelland, L.R., Mistry, P., Avel G., Freidlos, F., Loh, S.

- Y., Roberts, J.J. and Harrap, K.R. (1992): Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line. *Cancer Res.* **52**(7), 1710-1716.
- Kim, Y.I., Park, H.J., Choi, S.N. and Yun, S.S. (1992): Thermodynamic infrared and magnetic studies on the complexation of Ge (III) by benzonate anion. *J. Kor. Chem. Soc.* **36**, 212-217.
- Li, W., Zhao, Y. and Chou, I.N. (1993): Alterations in cytoskeletal oributeub sulfhydryl and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology.* **77**(1-2), 65-79.
- Lin, R.H., Lee, C.H., and Lin-Shiau, S.P. (1992): Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in chinese hamster ovary cells. *Environmental and Molecular Mutageneses.* **23**(2), 143-147.
- Liu, J., Kershaw, W.C. and Klaassen, C.D. (1990): Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. *In vitro cellular and Developmental Biology-Animal.* **26**(1), 75-79.
- Nomiyama, K. (1980): Recent progress and perspectives in cadmium health effects studies. *Sci. Total Environ.* **14**, 199-232.
- Robson, T., Hall, A. and Lohrer, H. (1992): Increased sensitivity of a chinese hamster ovary cell line to alkylating agents after overexpression of the human metallothionein 11-A gene. *Mut. Res.* **274**(3), 177-185.
- Skoog, D.A., West, D.M., and Holler, F.J. (1992): Fundamentals of Analytical Chemistry, 6th ed., Saunders College Publishing, Vol. 22.
- Thomas, D.J., Angle, C.R., Swanson, S.A. and Cafrey, T.C. (1991): Effect of sodium butyrate on metallothionein induction and cadmium cytotoxicity in ROS 17/2.8 cells. *Toxicology.* **66**(1), 35-46.
- Waalkes, M.P., Reham, S., Sass, B. and Ward, J.M. (1992): Cadmium in the hematopoietic system by cadmium in rats. *Iarc Scientific Publications Lyon.* **188**, 401-401.
- Williams, P.L., Burson, J.L. (1985): Industrial Toxicology. (eds) Van Nostrand Reinhold. p.197-210.
- World Health Organization (1977): Lead environmental health criteria 3, Geneva, WHO, 160.
- 송주택 (1983): 한국자원식물, 미도문화사, 서울, p.982.
- 이용주, 유현경, 한두석 (1993): 카드뮴이 백서 배양 섬유모세포와 신경아교세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. 대한구강해부학회지. **17**(1), 63-73.
- 정연태, 박승택, 최민규, 김정중, 김재민, 최봉규, 우원홍, 위인섭 (1992): 몇가지 중금속(Cr, Hg 및 Cd)이 배양섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구, 한국독성학회지, **8**, 119-129.
- 한두석, 김영옥, 백승화 (1994): 카드뮴으로 처리한 백서 섬유모세포와 신경아교세포에서 caffeic acid의 수복효과. 대한구강해부학회지, **18**(1), 29-38.