약학회지 제42권 제3호 307~311(1998)
Yakhak Hoeji Vol. 42, No. 3

포공령의 카드뮴에 대한 세포독성 억제효과

한두석 · 이기남* · 이종섭** · 백승화***#
원광대학교 치과대학 구강해부학교실, *한의과대학 예방의학교실,
**의과대학 예방의학교실, ***자연과학대학 화학과
(Received February 6, 1998)

The Inhibitory Effects of *Taraxaci Herba* against Cadmium induced Cytotoxicity

Du Seok Han, Ki Nam Lee* Jong Sub Lee** and Seung Hwa Baek***#
Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
**Department of Preventive Medicine, School of Oriental Medicine,*
***Department of Preventive Medicine, School of Medicine,*
****Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea*

Abstract—This study was carried out to evaluate antitoxic effects *Taraxaci Herba* extract against Cadium by colorimetric methods. The antitoxic activity of *Taraxaci Herba* extract in NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazoliumbromide), NR (Neutral red) and SRB (Sulforhodamine B protein) assay. The light microscopic study was carried out to observe morphologcal changes of the treated cells. These results were obtained as follows: The concentration of 10^{-2} mg/m*l* of *Taraxacci Herba* extract was shown significant antitoxic activity. The number of NIH 3T3 fibroblasts were antitoxic and tend to regenerate. These results suggest that *Taraxaci Herba* extract retains a potential antitoxic activity.

Keywords □ *Taraxaci Herba* extract, MTT assay, NR assay, SRB assay, colorimetric method, antitoxic activity.

포공령은 우리나라 전지역에 자생하고 있으며, 최근에 김등[1]은 포공령 물추출물이 진통과 항염작용에 비교적 양호하게 나타났으며, 이등[2]은 포공령의 메탄올 추출물을 헥산, 클로르포름, 부탄올을 계통분획 후 각 분획의 항위염작용을 염산-에탄올 위손상 모델을 이용하여 검토한 결과 물분획이 강한 위손상 억제작용을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이[3]는 포공령으로 부터 물추출물을 조제하여 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후 일차검색에 이용되는 비색법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 항암활성을 측정하였고, 세포증식의 지표가 되는 Ag-NOR 염색방법을 이용하여 Ag-NOR 수를 산정하여 항암활성을 보고한 바 있다. 오등[4]은 포공령으로 부터 물추출물을 조제하여 인체 피부흑색종세포에 적용한 후 1차 검색방법인 비색정량분석법을 이용하여 세포의 항암활성을 측정하여 유의한 결과를 보고한 바있다.

중금속 해독물질은 자체 독성이 적고 중금속과의 결합이 용이하거나 중금속과의 결합을 쉽게 할 수 있는 물질을 생체에서 분비하도록 하는 물질이어야 하며,[5] 소엽에는 게의 중독을 해독하는 물질이 함유되어 있을 뿐 아니라 약리작용이 다양하고 중금속 물질의 해독성분인 페놀산이[6] 함유되어 있을 것으로 생각되어 한 등[7]은 소엽의 세포독성을 관찰하여 독성이 가장 적은 추출액으로 밝혀진 메탄올 추출액에서 5종류의 분획을 조제하여 카드뮴 IC_{50}량과 10^{-4} mg/m*l* 정도의 분획을 동시에 처리하여

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0653-850-6225 (팩스) 0653-841-4893

각 분획의 MTT정량(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide), NR정량 (Neutral red) 및 SRB정량 (Sulforhodamine B protein)을 분광광도계를 이용하여 정량분석하고 형태학적 관찰을 실시하여 해독효과를 측정하였다.

본 연구는 비색정량분석법에 의한 포공령 물추출물의 카드뮴 세포독성효과를 1차 검색방법인 비색법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법, NR 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 포공령 물추출물의 해독효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

검액재료 - 포공령 600 g을 2개의 3000 m*l* 둥근플라스크에 1차 증류수 1500 m*l*과 포공령 300 g씩 넣고, 100°C에서 물 중탕하여 환류추출하였다. 이와같이 3번 반복하여 얻은 추출액을 0.45 μm필터로 여과한 후 여과액을 50°C에서 감압농축 시킨후 동결건조하였다. 건조된 양은 약 50 g정도 얻을 수 있었다. 추출액은 실험직전에 생리식염수로 용해시켜 사용하였다.

시약 - 세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량, NR정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

실험기기 - 세포의 배양은 CO_2 incubator(Shellab Co., U.S.A)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량, NR정량 및 SRB정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A)를 사용하였다.

시료의 처리 - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 10^{-2}~10^{-5} mg/m*l*농도를 실험에 사용하였다.

세포배양 - 포공령 추출물에 대한 해독작용을 측정하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포를 사용하였다. 배양액으로는 MEM(Gibco, U.S.A)에 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A)과 penicillin G(25 unit/m*l*), streptomycin(0.25 μg/m*l*)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO_2 incubator, Shellab, U.S.A)를 사용하였다. 실험을 위하여 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10^4 cells/m*l*가 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT정량 분석법 - Mosmann의 방법[8]에 따라 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 1 m*l* 씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3섬유모세포에 대한 카드뮴의 MTT_{50}(midpoint inhibition value)농도를 결정하였다. 수복효과 실험은 6개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT_{50}량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT_{50}군, MTT_{50}량과 각각의 포공령 물추출물의 10^{-2}~10^{-5} mg/m*l*농도를 배양액에 넣어 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후 분석당일 조제한 MTT(Sigma) 50 μg/m*l*가 함유된 배양액을 well당 1 m*l*씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 m*l*/well씩 넣어 5분간 실온 방치 후 MTT formazan을 용해한 후 분광광도계 ELISA reader(Spectra MAX 250, U.S.A, 520 nm)로 흡광도를 측정하여 MTT_{50}군과 비교하였다.

NR정량 분석법 - Borenfreund와 Puerner의 방법[9]에 따라 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 1 m*l* 씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3섬유모세포에 대한 카드뮴의 NR_{50} 농도를 결정하였다. MTT정량의 방법과 동일하게 대조군, NR_{50}군 및 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후, 50 μg/m*l*의 neutral red(Sigma)를 함유한 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight시킨 후, well당 1 m*l* 씩 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고, phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척하고, well당 0.5 m*l*의 1% formaldehyde-1% $CaCl_2$을 넣어 세포를 고정한 후, 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 m*l* 씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR에 관한 흡광도는 분광광도계 ELISA reader (Spectra MAX 250, U.S.A, 520 nm)로 측정하여 NR_{50}군과 비교하였다.

SRB정량 분석법 - Skehan등의 방법[10]에 따라, 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 1 m*l* 씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3섬유모세포에 대한 카드뮴의 SRB_{50} 농도를 결정하였다.

MTT정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB_{50}군 및 실험군으로 하여 포공령 물추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B를 200 μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1.0% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(Spectra MAX 250, U.S.A, 520 nm)로 측정하여 SRB_{50}군과 비교하였다.

세포의 광학현미경적 관찰 - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포는 MTT정량, NR정량 및 SRB정량을 하기 전에 도립현미경 (Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

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

결과 및 고찰

본 실험에서는 포공령으로부터 물추출물을 조제하여 카드뮴에 대한 해독효과를 측정하기위하여, 1차 검색방법인 비색분석방법 중 가장 민감하고 안정한 방법인 MTT정량 NR정량 및 SRB정량 분석법을 이용하여 실험한 결과는 Table I~VI과 같다.

3T3 섬유모세포를 여러농도의 카드뮴으로 처리한 후, MTT, NR 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 마이크로몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, MTT, NR 및 SRB의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며, IC(inhibitory concentration)$_{50}$인 MTT_{50}은 33.04 μM, NR_{50}은 30.45 μM, 및 SRB_{50}은 54.72 μM이었다(Table I, II, III). 3T3 섬유모세포에 MTT_{50}농도는 33.04 μM 카드뮴과 4종류의 포공령 물추출물농도를 동시에 처리한 후, MTT흡광도를 측정하여 MTT_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 모든 분석농도에서 통계적으로 유의성있는 해독효과를 나타내었다. 그렇지만 포공령 물추출물의 10^{-2} mg/ml농도에서 가장 높은 유의성($p<0.001$)이 관찰되었다(Table IV). 3T3 섬유모세포를 NR_{50}농도인 30.45 μM 카드뮴과 4종류의 포공령 물추출물농도를 동시에 처리한 후, NR흡광도를 측정하여 NR_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 물추출물의 10^{-2}~10^{-3} mg/ml농도에서만 70%와 67%로 유의성($p<0.05$)있는 해독효과를 나타냈으며, 다른 분석농도에

Table I — The effects of cadmium on the production of MTT formazan crystal in 3T3 fibroblasts

Concentration of cadmium (μM)	MTT quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	3.26±0.18	(100.0)
1	2.91±0.32*	(89.3)
5	1.71±0.13**	(52.5)
25	0.76±0.14***	(23.2)
50	0.63±0.13***	(19.3)
100	0.29±0.03***	(8.8)
MTT_{50}	33.04 μM	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ (Student's t-test).

Table II — The effects of cadmium on the neutral red uptake in cultured 3T3 fibroblasts

Concentration of cadmium (μM)	NR quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	3.73±0.01	(100.0)
1	3.72±0.02	(99.6)
5	2.19±0.03**	(58.6)
25	0.40±0.10***	(10.8)
50	0.36±0.10***	(9.6)
100	0.30±0.03***	(8.1)
NR_{50}	30.45 μM	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: **$p<0.01$, ***$p<0.001$ (Student's t-test).

Table III — Dose-response effects of cadmium-treated 3T3 fibroblast cells assessed by the SRB assay

Concentration of cadmium (μM)	SRB quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
Control	1.92±0.02	(100.0)
1	1.92±0.03	(99.5)
5	1.16±0.02**	(60.3)
25	0.78±0.11**	(40.4)
50	0.67±0.05**	(34.9)
100	0.72±0.11**	(37.2)
SRB_{50}	54.72 μM	

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: **$p<0.01$ (Student's t-test).

Table IV—The MTT absorbance on aqueous extract of *Taraxaci Herba* in 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT_{50})

Groups Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
control	3.34±0.35	(100.0)
Cd_{50}	1.93±0.18	(57.7)
10^{-2}	2.61±0.04***	(78.1)
10^{-3}	2.50±0.19**	(74.9)
10^{-4}	2.41±0.28*	(72.0)
10^{-5}	2.41±0.27*	(72.1)

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student's t-test).

Table V—The NR Uptake ability on aqueous extract of *Taraxaci Herba* in 3T3 fibroblasts treated with cadmium (NR_{50})

Groups Concentration (mg/ml)	NR quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
control	3.56±0.10	(100.0)
Cd_{50}	1.96±0.24	(54.9)
10^{-2}	2.49±0.16*	(70.0)
10^{-3}	2.39±0.22*	(67.2)
10^{-4}	2.25±0.18	(63.2)
10^{-5}	2.00±0.16	(56.1)

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05 (Student's t-test).

서 통계적으로 유의성있는 해독효과를 관찰할 수 없었다(Table V). 핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여 SRB량을 측정한 결과, 3T3 섬유모세포에 농도인 54.72 μM 카드뮴과 4종류의 포공령 물추출물농도를 동시에 처리하였다. 추출물농도를 처리한 후, SRB흡광도를 측정하여 SRB_{50}군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과, 포공령 물추출물의 10^{-2} mg/ml농도에서 통계적으로 67%로 유의성($p<0.05$)있는 해독효과를 나타냈으나, 다른 분석농도에서 통계적으로 유의성있는 해독효과를 관찰 할 수 없었다(Table VI). 포공령 물추출물 10^{-2} mg/ml농도를 건강세포인 NIH 3T3 섬유모세포에 적용하여 MTT정량분석방법으로 검색한 결과 대조군에 비하여 98.53%로 나타났으므로 자체독성을 거의 없는 것으로 생각된다. 비색분석법에 의한 포공령 물추출물의 카드뮴

Table VI—The SRB absorbance on aqueous extract of *Taraxaci Herba* in 3T3 fibroblast treated with cadmium (SRB_{50})

Groups Concentration (mg/ml)	SRB quantity	
	Mean±S.D.[a]	% of control
control	2.81±0.03	(100.0)
Cd_{50}	1.57±0.13	(55.8)
10^{-2}	1.88±0.28*	(67.0)
10^{-3}	1.60±0.33	(57.1)
10^{-4}	1.57±0.14	(55.8)
10^{-5}	1.33±0.28	(47.2)

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with Trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05 (Student's t-test).

해독효과는 일반적으로 추출물의 농도증가에 따라 흡광도가 증가하며, 모든 비색정량분석법 중에서 농도에 따른 흡광도의 변화는 MTT 정량분석법과 NR 정량분석법이 SRB 정량분석법보다 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 3T3섬유모세포들이 부착되어 있다(그림 A). IC_{50}(MTT_{50}, NR_{50}, 및 SRB_{50})의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로 부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다(그림 B). IC_{50} 농도의 카드뮴과 포공령 물추출물을 처리한 군에서는 IC_{50}군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상 뚜렷하였다(그림 C). 포공령 물추출물을 이용하여 카드뮴 해독효과를 측정한 보고가 없어 직접적인 비교는 할 수 없으나, 본 실험의 결과에 의하면 카드뮴에 대한 세포독성을 포공령 물추출물이 억제하는 해독효과가 있는 것으로 인정된다. 이에 포공령의 물추출물의 카드뮴에 대한 해독물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 분광화학적인 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

결 론

카드뮴이 3T3섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, 카드뮴 IC_{50}(MTT_{50}, NR_{50}, 및 SRB_{50})에 의하여 손상된 3T3섬유모세포를 해독시킬 수 있는 물질을 창출할 목적으로 본 연구를 수행하였다. 실험은 배양액만으로 배양한 군을 대조군, 세포독성실험에 의하여 결정된

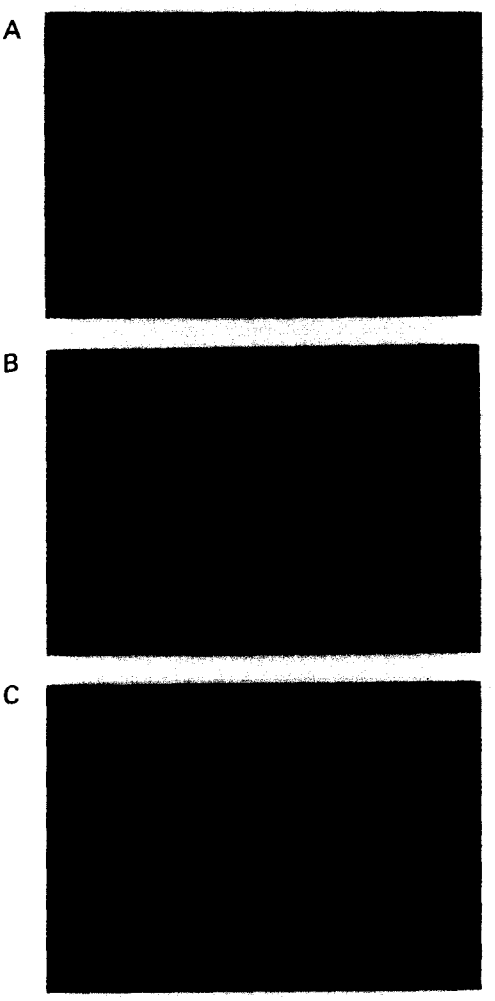

Fig. 1 — Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in unmodified medium (control) for 2 days ×200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (A). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing 10^{-2}mg/m*l* concentration of *Taraxaci Herba* for 2 days ×200. Most cells were shrinked and number of cells were decreased (B). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing 10^{-2} mg/m*l* concentration of *Taraxaci Herba* for 2 days ×200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased (C).

IC_{50} 농도의 카드뮴과 4종류의 포공령 물추출물을 각각 배양액에 넣어 배양한 군을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 군은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT흡광도, NR Uptake능력 및 SRB량을 측정하고, 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 포공령 물추출물이 MTT정량, NR정량 및 SRB정량에서 통계적으로 유의성있는 해독효과를 나타냈으나, 농도에 따른 흡광도의 변화는 MTT 정량분석법과 NR 정량분석법이 SRB 정량분석법보다 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 광학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.

감사의 말씀

본 연구는 교육부 기초의학연구비지원에 의해서 연구되었으며, 이에 감사한다.

문 헌

1) 김석근, 송호준 : 포공령 수추출물이 진통, 항염작용에 미치는 영향, 대한한의학회지, **13**, 152 (1992).
2) 이은방, 김정근, 김옥경 : 포공령의 항위염 작용, 한국생약회지, **24**, 313 (1993).
3) 이명호 : 원광대학교 석사학위논문, (1998).
4) 오인교, 유은하, 한두석, 백승화 : 한국산 생약으로 부터 항암물질의 개발 (제 8보). 비색분석법 에 의한 포공령 물추출물의 항암평가. 대한화학회 투고중
5) Waalkes, M. P. Hjelle, J. J. and Klaassen, C. D. : Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **74**, 314 (1984).
6) Conn, H. J. : Biological stains, The Willinms and Wilkins Co., Baltimore, p. 458 (1977).
7) 한두석, 정병호, 유현경, 김영옥, 백승화 : 소엽의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구. 한국생약 학회지 **25**, 249 (1994).
8) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. **65**, 55 (1983).
9) Borenfreund, E. and Puerner, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *Tissue Culture Meth*. **9**, 7 (1984).
10) Skehan, P. : Storeng, S.; Studiero, D.; Monke, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bodesh, H., Kenny, S.; Boyd, M. R.: New colorimetric cytotoxicity Assay for Anticancer-drug screening. National cancer institude, *J. Natl. Cancer Inst*. **82**, 1107 (1990).