

## 어성초의 카드뮴에 대한 독성억제효과 (II)

이정호 · 유일수\* · 김종수\* · 이기남\*\* · 정우영\*\*\* · 한두석\*\*\* · 백승화#

원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실, \*\*산업한의학교실,

\*\*\*치과대학 구강해부학교실, \*익산대학 화학공학과

(Received June 1, 2000)

## The Inhibitory Effects of *Houttuynia cordata* $T_{HUNB}$ against Cadmium induced Cytotoxicity (II)

Jeong Ho Lee, Il Soo You\*, Jong Soo Kim\*, Ki Nam Lee\*\*, Woo Young Chung\*\*\*,  
Du Seok Han\*\*\* and Seung Hwa Baek#

Department of Natural Products and

\*\*Department of Industrial Oriental Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,

\*\*\*Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

\*Department of Chemical Engineering, Iksan College, Iksan 570-110, Korea

**Abstract** — This study was conducted to investigate the antitoxic component in aqueous extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$ . The results were as follows: Generally, detoxification effects by *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract increased in proportion to the extract concentrations in rats. When 40 mg/kg dosage of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract was administrated, *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract showed the highest antitoxic effects in metallothionein induction. After the extract treatment, body weights increased in proportion to the extract concentrations. However, after 3 weeks, the body weight decreased insignificantly. From the above results, *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract increased metallothionein concentration and decreased the toxicity of cadmium in rats. *In vitro* the antitoxic activity of aqueous extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  on NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) and SRB (sulforhodamine B protein) assays. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of the treated cells. These results were obtained as follows; The concentration of  $10^{-2}$  mg/ml of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract was shown significant antitoxic activity. The number of NIH 3T3 fibroblasts were increased and tend to regenerate. These results suggest that *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  extract retains a potential antitoxic activity.

**Keywords** □ *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$ , Antitoxic agent, Metallothionein, MTT assay, SRB assay.

어성초(*Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$ )는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로써, 우리나라와 일본에서는 치료와 예방효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 효능은 이뇨, 해독, 강심, 해열, 배농작용, 항균작용, 항암작용과 축농증, 폐렴, 관절염, 습진, 매독, 협심증, 담석증, 신장병, 통풍, 치질, 당뇨병, 고혈압,<sup>1-3)</sup>

제질병의 치료와 피부미용을 위하여 복용한다.<sup>1-4)</sup> 1985년 일본 히로시마의 원폭피해자들중 어성초를 지속적으로 마신 사람들은 목숨을 구했다고 하였다.<sup>5)</sup> 현재 많은 연구자들이 천연물을 이용하여 중금속 해독 물질을 연구하고 있으며,<sup>6-9)</sup> 최근에는 엑기스, 환, 건조분말 등 여러 가지 형태로 제품화되어 많은 사람들이 건강보조식품으로 이용되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이렇게 이용되고 있는 어성초를 물로 추출하여 카드뮴에 중독된 흰쥐에게 경구 투여한 후, 조직

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893

내 카드뮴의 농도와 metallothionein의 농도 및 체중 변화를 측정하고, 카드뮴 세포독성효과를 1차 검색방법인 비색법중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과를 평가하고자 하였다.

**실험재료 및 방법**

**실험재료** - 어성초는 1998년 8월 전북 익산시 팔봉동에서 채취하여 음건한 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

**실험동물** - 실험에 사용된 동물은 원광대학교 의과대학 실험동물 사육장에서 사육한 생후 6~8주 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷으로 체중은 150±20 g을 사용하였으며, 실험시작 1주전부터 안정화 시켰고, 사육은 온도 22°C±2°C, 습도는 50%±10%의 동물사육실에서 흰쥐용 깔집을 깔고 1군당 5마리씩으로 하였으며, 2개군은 대조군과 카드뮴 대조군, 3개군은 실험군으로 총 25마리를 사육하였다. 고령 pellet사료(삼양유지)와 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였으며, 사육기간 (투여기간)은 4주로 하였다.

**검액의 조제** - 본 연구에 사용된 생약제인 어성초는 전북 익산시 팔봉동에서 채취하여, 어성초의 잎을 잘게 썰어 음건한 후, 건조된 어성초의 잎을 분쇄하여 500 g을 5000 ml 등근 플라스크에 물 2500 ml를 넣고, 75°C에서 4시간 동안 환류 추출하였다. 이와같이 세 번 반복하여 얻은 추출물을 0.4 µm 필터로 여과한 후, 증류기로 45~50°C에서 감압 농축시켰다. 건조된 양은 물 추출물 121.36 g(24.27%) 얻었다.

**시약 및 기기** - 어성초 추출물에 사용된, 용매로는 3차 증류수를 사용하였으며, 흰쥐 신장과 간장내의 카드뮴 함량 분석에 사용된 시약은 GR급을 사용하였고, Cd표준용액(CdCl<sub>2</sub>)은 Sigma제를 사용하였다. 전처리에 사용된 초자기구는 질산으로 세척하여 중금속을 완전히 제거한 후 사용하였으며, 분석용 기기는 원자흡광광도계(Hitachi Z-5700)를 사용하였다.

세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator(Shellab

**Table I** - Dosage content of cadmium and water extract of *Houttuynia cordata* T<sub>HUNB</sub> in rats

Group	Cd dosage (mg/kg)	<i>Houttuynia cordata</i> T <sub>HUNB</sub> (mg/kg)
Control	0	0
Cd control	4	0
Group	4	10
Group	4	20
Group	4	40

Experiment animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata* T<sub>HUNB</sub> by oral administration.

Co., U.S.A)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT 정량 및 SRB정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A)를 사용하였다.

**카드뮴 및 어성초 추출액 투여** - 실험에 사용한 중금속은 cadmium chloride(CdCl<sub>2</sub>; Japan Wako Chemical 사 GR급)이며, 어성초 물 추출물을 흰쥐 구강내 투여 용량은 Table I과 같이 5개군으로 구분하였으며, 1군당 5마리씩으로 실험하였다.<sup>10)</sup>

**흰쥐 장기내의 카드뮴의 농도 측정** - 실험 24시간 전부터 절식시킨 흰쥐를 에테르로 마취시키고, 신장과 간장을 적출하여 3차 증류수로 3회 세척하여, 진공건조기(110°C)내에서 24시간 건조시킨 후, 200°C hot plate상에서 각각 질산, 황산, 및 과염소산을 이용한 습식탄화방법에 의하여 유기물을 분해시키고, 25%의 ammonium citrate용액 10 ml와 0.1% bromothymol blue(BTB) indicator 용액을 2~3방울 넣고, 용액의 색이 황색에서 녹색으로 변할때까지 ammonium hydroxide용액으로 중화시켰다. 여기에 10 ml의 40% ammonium sulfate 용액과 10 ml의 sodium diethyl dithiocarbamate(DDTC) 용액을 넣고 세차게 흔든 후 수분간 방치한 다음, 20 ml의 MIBK(methyl isobutyl ketone)층을 가하고 흔든 후 방치한 다음, MIBK층을 취하여 120°C hot plate상에서 휘산시켜 0.1N HCl로 용해한 후, wave length 228.8 nm, slit path 1.3 nm, lamp current 9 nm의 분석조건하에서 원자흡광광도계(Hitachi Z-5700)를 이용하여 장기내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

**흰쥐 장기내의 metallothionein의 농도 측정** - Onosaka등<sup>11)</sup>의 방법에 따라 조직중의 MT(metallo-

thionein)은 간과 신장조직을 0.5 g 취하여 생리적 식염수로 세척한 다음, 0.25 M 설탕용액을 가하면서 teflon glass homogenizer를 이용하여 조직이 균질화 되도록 하였으며, 4°C에서 20분간 원심분리하여 세포질액(cytosol)을 얻었다. 세포질액 0.2 ml를 0.03 M tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 첨가한 후, 10 ppm의 CdCl<sub>2</sub>(standard solution) 1 ml로 포화시키고, 실온에서 5분간 배양하였다. 여기에 rat RBC hemolysate 0.2 ml를 가하여 과량의 카드뮴과 MT이외의 모든 bioligand를 제거하고, 100°C 수욕탕에 1분간 정치시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이와같이 rat RBC hemolysate첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여, MT 분획층을 분리하여 측정하였다. 최종적인 MT농도 계산은 원자흡광도계에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로, MT분자량 6,050 g 당 카드뮴 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 µg 당 mgMT 농도를 표시하였다.

**체중측정** - 모든 동물에 대해서 시험개시일로부터 시험종료일까지 매주 2회 측정하였다.

**시료의 처리** - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도를 실험에 사용하였다.

**세포배양** - 어성초 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/ml), streptomycin(0.25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Shellab, U.S.A)를 사용하였다. 실험을 위하여 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

**MTT정량분석법** - Mosmann의 방법<sup>12)</sup>에 따라 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유세포에 대한 카드뮴의 MTT<sub>50</sub>(midpoint inhibition value) 농도를 결정하였다. 수복효과 실험은 6개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT<sub>50</sub>량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT<sub>50</sub>군, MTT<sub>50</sub>량과 각각의 어성초 물추출물의 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup>

mg/ml 농도를 배양액에 넣어 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후 분석당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 함유된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치후, MTT formazan을 용해한 후 분광광도계 ELISA reader(Spectra MAX 250, U.S.A, 520 nm)로 흡광도를 측정하여 MTT<sub>50</sub>군과 비교하였다.

**SRB정량 분석법** - Skehan 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라, 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 SRB<sub>50</sub> 농도를 결정하였다. MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB<sub>50</sub>군 및 실험군으로 하여 어성초 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 nM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(Spectra MAX 250, U.S.A, 520 nm)로 측정하여 SRB<sub>50</sub>군과 비교하였다.

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

**통계학적 해석** - 실험결과에 대한 통계학적처리는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 실험결과 및 고찰

흰쥐에게 카드뮴 농도를 4 mg/kg와 어성초의 물추출물을 단독 또는 병용하여 경구투여 시킨 후, 각 실험군의 신장내의 카드뮴의 농도는 Table II와 같다. 카드뮴과 어성초 물추출물을 투여하지 않은 군에서 카드뮴의 농도는 5.58±0.09 mg/kg으로 낮게 나타났으나, 이 함량은 실험결과에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 카드뮴 대조군에서의 농도는 63.20 mg/kg±0.01으로 나타났고, 일반적으로 어성초의 물추출물의 경구 투여 농도가 증가할수록 흰쥐 신장내 카드뮴의 농도가 저하된 것을 알 수 있다. 어성초의 물추출물의 경구 투여 농도가 40 mg/kg에서 카드뮴

**Table II** – Contents of cadmium in kidney of rats treated with water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$

Dosage of <i>Houttuynia cordata</i> $T_{HUNB}$ extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	Cd contents <sup>a</sup> (mg/kg)	Antitoxicity of Cd (% decrease)
Control	5.58 ± 0.09	-
Cd control (4)	63.20 ± 0.01	100.00
HC (10)+Cd (4)	61.85 ± 0.00	97.59
HC (20)+Cd (4)	57.25 ± 0.00*	90.59
HC (40)+Cd (4)	51.23 ± 0.01*	81.06

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  by oral administration. Significantly different from the control values; \*p<0.05 (Student's t-test).

독성에 대한 해독경감효과는 51.23±0.01 mg/kg (81.06%)로 가장 우수한 결과를 보였다.<sup>6)</sup> 하지만 간장내 카드뮴 독성에 대한 해독경감효과와 비교해보면, 신장내 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과는 낮게 나타나는 결과를 볼 수 있다. 어성초의 물 추출물의 투여농도가 20 mg/kg, 40 mg/kg에서 통계적으로 유의성을 보였다(p<0.05).

흰쥐에게 카드뮴 농도를 4 mg/kg와 어성초의 물 추출물을 단독 또는 병용하여 경구 투여한 후, 각 실험군에서의 간장내 카드뮴 농도는 Table III과 같다. 카드뮴과 어성초 물 추출물을 투여하지 않은 군에서 카드뮴의 농도는 6.55±1.04 mg/kg으로 나타났으나, 이 함량은 실험결과에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 간장에서도 신장과 같이 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 증가할 수록 흰쥐 간장내 카드뮴의

**Table III** – Contents of cadmium in liver of rats treated with water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$

Dosage of <i>Houttuynia cordata</i> $T_{HUNB}$ extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	Cd contents <sup>a</sup> (mg/kg)	Antitoxicity of Cd (% decrease)
Control	6.55 ± 1.04	-
Cd control (4)	72.78 ± 1.38	100.00
HC (10)+Cd (4)	62.78 ± 2.16*	86.26
HC (20)+Cd (4)	58.63 ± 1.79*	80.56
HC (40)+Cd (4)	57.32 ± 0.01*	78.76

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  by oral administration. Significantly different from the control values; \*p<0.05 (Student's t-test).

**Table IV** – Contents of metallothionein in kidney of rats treated with water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$

Dosage of <i>Houttuynia cordata</i> $T_{HUNB}$ extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	MT contents <sup>a</sup> (mg/kg)	MT (% increase)
Control	0.88 ± 0.09	-
Cd control (4)	0.45 ± 0.07	0.00
HC (10)+Cd (4)	0.61 ± 0.06*	35.55
HC (20)+Cd (4)	0.62 ± 0.00**	37.78
HC (40)+Cd (4)	0.63 ± 0.01**	40.00

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  by oral administration. Significantly different from the control values; \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Student's t-test).

농도가 줄어드는 경향을 볼 수 있다. 신장내 카드뮴 독성에 대한 해독경감효과보다 간장내 카드뮴 독성에 대한 해독경감효과가 높게 나타났다. 어성초의 물 추출물 투여농도가 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg에서 통계적으로(p<0.05) 유의성을 보였다. 이 결과를 볼 때, 어성초의 물 추출물이 카드뮴 작용의 배설로 인한 간장내 카드뮴 독성에 대한 해독경감효과가 나타났으며, 뇨와 변으로 배설된 것으로 판단된다.<sup>7-9,13)</sup>

신장내 metallothionein의 농도는 Table IV와 같다. 카드뮴과 어성초 물 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는 0.88±0.09 mg/kg으로 나타났다. Table IV에서 보는바와 같이 MT양을 카드뮴 대조군과 비교해 보면, 대조군에서는 0.45±0.07 mg/kg으로 나타났으며, 40 mg/kg은 MT양이 0.63±0.01 mg/kg(40.00%)으로 나타나는 것을 볼 수 있다. 이 결과를 볼 때 흰쥐 신장내 MT의 축진은 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 증가할 수록 신장내 MT형성도 증가하는 경향을 보였다. 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 10 mg/kg에서 통계적으로(p<0.05) 유의성을 보였으며, 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 20 mg/kg, 40 mg/kg에서 p<0.01의 유의성을 보였다.<sup>6)</sup> 간장내 MT 축진과 비교해보면(Table V), 어성초 물 추출물의 경구투여시 신장에서 MT 축진이 좋은 것으로 나타났다.

간장내 metallothionein의 농도는 Table V와 같다. 카드뮴과 어성초 물 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는 0.40±0.07 mg/kg으로 나타났다. 카드뮴 대조군은 0.53±0.07 mg/kg으로 나타났으며, 어성초 물 추출물 경구 투여용량이 10 mg/kg에서는 0.54

**Table V** – Contents of metallothionein in liver of rats treated with water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$ 

Dosage of <i>Houttuynia cordata</i> $T_{HUNB}$ extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	MT contents <sup>a</sup> (mg/kg)	MT (increase)
Control	0.40 ± 0.07	-
Cd control (4)	0.53 ± 0.07	0.00
HC (10)+Cd (4)	0.54 ± 0.01	1.89
HC (20)+Cd (4)	0.58 ± 0.00*	9.43
HC (40)+Cd (4)	0.60 ± 0.00*	13.21

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  by oral administration. Significantly different from the control values; \* $p < 0.05$  (Student's t-test).

±0.01 mg/kg(1.89%)으로 MT의 축진이 낮게 나타났으나, 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 40 mg/kg 이 되면 간장내 MT 축진은 10 mg/kg에 비해 약 7 배가 되는 것으로 나타났다. 통계적인 유의성은 어성초의 물 추출물의 투여농도가 20 mg/kg과 40 mg/kg 에서  $p < 0.05$ 로 나타났다.<sup>11)</sup> 체내에 중금속이 흡수될 경우 자체 해독기전으로 간장 및 신장조직에서 MT를 형성하여 조직내에서 독성이 강한 유리금속과 결합하여 수용성으로 전환시켜 배설함으로써 해독작용에 관여한다.<sup>14)</sup>

어성초의 물 추출물의 농도의 증가에 대한 흰쥐의 무게변화는 Table VI과 같다. 어성초 물 추출물과 카드뮴을 투여하지 않은 군에서는 흰쥐 무게가 시간이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나, 카드뮴만 경구 투여한 대조군의 경우, 체중이 1주일과 2주일후에

서는 약간 증가한 후, 3주일후부터는 흰쥐의 체중변화가 심하게 감소하였다. 어성초 물 추출물의 경구 투여 농도가 증가함에 따라서 체중변화의 기폭은 심하였으나 체중이 감소하지는 않았다. 어성초 물 추출물의 경구 투여농도가 40 mg/kg에서 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과가 가장 우수하게 나타났고, 어성초 물 추출물의 투여 기간이 2주까지가 카드뮴 독성에 대한 해독경감효과가 뚜렷하였으며, 2주 이후에는 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과는 조금씩 감소하였다. 일반적으로 어성초의 물 추출물의 농도가 증가함에 따라, 주별 흰쥐의 체중의 증가도 나타났으며, 이 체중변화증에 일주일후의 체중증가가 가장 현저히 증가하는 경향을 알 수 있었다. 이는 흰쥐의 카드뮴 축적에 대한 독성을 완화시킬 뿐만 아니라, 카드뮴 착물을 형성하여 배출을 촉진시키리라 사료된다.<sup>7-9)</sup>

3T3 섬유모세포를 여러농도의 카드뮴으로 처리한 후, MTT 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 마이크로몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, MTT 및 SRB의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며, IC<sub>50</sub>인 MTT<sub>50</sub>은 33.04 μM 및 SRB<sub>50</sub>은 54.72 μM이었다.<sup>15)</sup> MTT 정량분석법을 이용하여 MTT 농도를 측정한 결과, 어성초 물 추출물의 10<sup>-2</sup> mg/ml~10<sup>-3</sup> mg/ml농도에서는 100%~98.9% 범위의 통계적으로 유의성 ( $p < 0.001$ ) 있는 카드뮴 해독경감효과를 나타냈으나, 다른 분석농도에서도 통계적으로 유의성이 없었다(Table VII).

핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여, SRB농도

**Table VI** – Body weights in rats treated with water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$ 

Dosage <sup>b</sup> (mg/kg)	Weeks after treatment <sup>a</sup> (%)				
	Control	1	2	3	4
Control	153.60 ± 8.72	171.26 ± 9.43 (11.50)	180.43 ± 11.43 (17.46)	189.75 ± 11.42 (23.53)	199.42 ± 3.15 (29.83)
Cd control (4)	160.50 ± 0.70	172.33 ± 15.95** (7.37)	165.50 ± 4.96 (3.12)	156.00 ± 5.00 (-2.80)	143.00 ± 4.24 (-10.90)
HC (10)+CD (4)	157.33 ± 2.31	176.00 ± 0.01 (11.87)	176.67 ± 2.52* (12.29)	168.50 ± 1.12* (7.10)	160.00 ± 0.01 (1.70)
HC (20)+CD (4)	125.00 ± 12.12*	147.33 ± 0.58 (17.86)	147.00 ± 0.00* (17.60)	138.00 ± 3.46* (10.40)	140.00 ± 0.02 (12.00)
HC (40)+CD (4)	123.50 ± 3.54*	148.00 ± 15.95 (19.84)	146.00 ± 0.01 (18.22)	142.00 ± 0.00 (14.98)	143.00 ± 0.02 (15.79)

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and water extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  by oral administration. Significantly different from the control values; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (Student's t-test).

**Table VII** – The MTT absorbance on aqueous extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  on 3T3 fibroblasts treated with cadmium ( $MTT_{50}$ )

Concentration (mg/ml)	$A_{540}$	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	(% of control)
Control	4.154 $\pm$ 0.000	(100.0)
$Cd_{50}$	3.742 $\pm$ 0.015	(90.1)
$10^{-2}$	4.154 $\pm$ 0.000	(100.0)***
$10^{-3}$	4.110 $\pm$ 0.014	(98.9)***
$10^{-4}$	3.998 $\pm$ 0.169	(96.2)
$10^{-5}$	3.822 $\pm$ 0.062	(92.0)

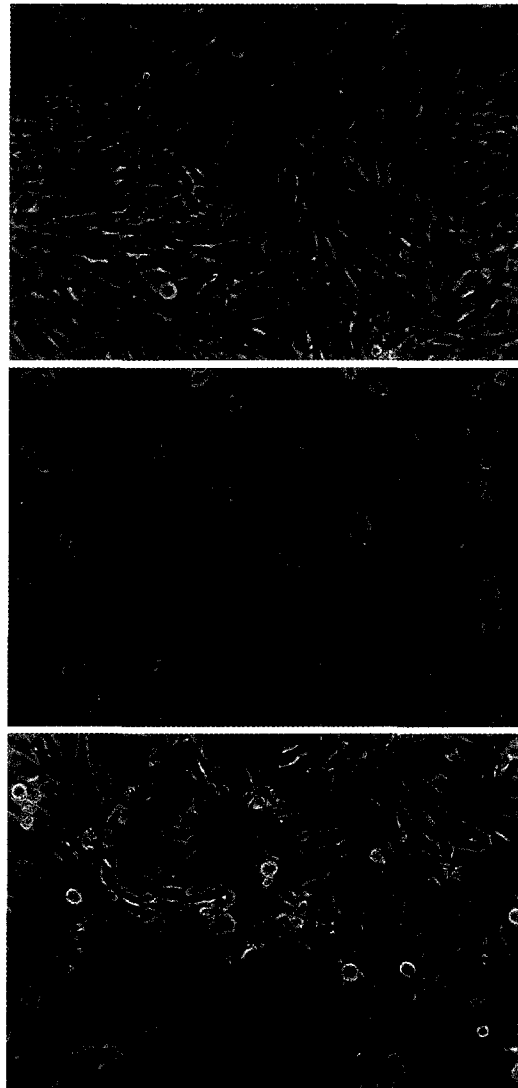
Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. <sup>a</sup>The values represent the mean standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value; \*\*\* $p < 0.001$  (Student's t-test)

**Table VIII** – The SRB absorbance on aqueous extract of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  on 3T3 fibroblasts treated with cadmium ( $SRB_{50}$ )

Concentration (mg/ml)	$A_{550}$	
	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>	(% of control)
Control	2.953 $\pm$ 0.004	(100.0)
$Cd_{50}$	1.106 $\pm$ 0.028	(37.5)
$10^{-2}$	1.423 $\pm$ 0.033	(48.2)***
$10^{-3}$	1.416 $\pm$ 0.004	(48.0)**
$10^{-4}$	1.379 $\pm$ 0.037	(46.7)**
$10^{-5}$	1.170 $\pm$ 0.035	(39.6)

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. <sup>a</sup>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)

를 측정한 결과 MTT 농도에서와 같이, 어성초 물추출물의  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서 통계적으로 48.2%로 유의성( $p < 0.001$ ) 있는 해독억제효과를 나타냈으나,  $10^{-3}$  mg/ml~ $10^{-4}$  mg/ml 농도에서 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ )이 있었지만, 해독억제효과를  $10^{-5}$  mg/ml 농도에서는 통계적으로 유의성이 없었다(Table VIII). 비색분석법에 의한 어성초 물추출물의 카드뮴 해독억제효과는 추출물의 농도증가에 따라 흡광도가 증가하며, 흡광도의 변화는 MTT정량분석법보다 SRB정량분석법이 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다.<sup>15)</sup> 어성초 물추출물의  $SRB_{50}(Cd_{50} 1.106 \pm 0.028, 37.5\%)$  농도가  $MTT_{50}(Cd_{50} 3.742 \pm 0.015, 90.1\%)$  농도보다 카드뮴



**Fig. 1** –Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with SRB for additional 3 hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days  $\times$  200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (A). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the  $Cd_{50}$  concentration for 2 days  $\times$  200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased (B). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing  $Cd_{50}$  concentration plus  $10^{-2}$  mg/ml concentration of *Houttuynia cordata*  $T_{HUNB}$  for 2 days  $\times$  200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased (C).

에 대한 해독경감효과의 민감성을 나타내었으며, 추출물의  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서  $Cd_{50}$ 에 대한 SRB 분석법으로 10.7%의 차이로 MTT 분석법의 차이보다 높게 나타남을 관찰 할 수 있었다(Table VIII).

세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있다(Fig. A).  $IC_{50}$  ( $MTT_{50}$  및  $SRB_{50}$ )의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. B).  $IC_{50}$ 농도의 카드뮴과 어성초 물추출물을 처리한 군에서는  $IC_{50}$ 군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다(Fig. C). 어성초 물추출물을 이용하여, 카드뮴 해독경감효과를 측정된 보고가 없어 직접적인 비교는 할 수 없으나, 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 어성초 물추출물이 억제하는 해독경감효과가 있는 것으로 인정된다. 이에 어성초의 물추출물의 카드뮴에 대한 해독물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 분광화학적 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

## 결 론

흰쥐에게 카드뮴 경구투여시, 어성초 물 추출물의 경구 투여한 후 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과와 카드뮴이 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, 카드뮴  $IC_{50}$ ( $MTT_{50}$  및  $SRB_{50}$ )에 의하여 손상된 3T3 섬유모세포의 재생효과에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흰쥐에게 어성초 물 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과는 증가하였으며, 신장에서보다 간장에서 해독경감효과가 좋았다.

2. 흰쥐 신장 및 간장의 MT의 농도는 간장에서 보다 신장에서 우수한 결과를 보였으며, 신장에서는 어성초 물 추출물의 경구 투여 농도가 10 mg/kg 이상이 되면 MT 형성은 어성초 물 추출물의 투여농도가 증가하여도 크게 증가하지는 않았다.

3. 흰쥐의 체중변화는 어성초 물 추출물의 경구 투여용량이 증가할 수록, 흰쥐의 체중변화도 증가하는 경향을 보였으나, 3주 이후에는 체중의 증가가 적게 나타났다.

4. MTT 및 SRB분석은 배양액만으로 배양한 군을 대조군, 세포독성실험에 의하여 결정된  $IC_{50}$ 농도의 카드뮴과 어성초 물추출물을 배양액에 넣어 배양한 군을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 군은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT 흡광도 및 SRB 농도를 측정하고, 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 어성초 물추출물이 MTT 농도 및 SRB 농도에서 정량적으로 유의성 있는 해독경감효과를 나타냈으나, 농도에 따른 흡광도의 변화는 SRB 정량분석법이 MTT 정량분석법보다 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 광학현미경적 조건에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.

이상과 같이 어성초 물 추출물의 경구 투여시켰을 경우 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과와 카드뮴에 의하여 손상된 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 두뇌 한국21 사업과 2000년도 원광대학교 교비일부에 의해서 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) 이인영 : 어성초가 가토의 적출 장관운동에 미치는 영향. 한양대학교 석사학위논문 (1986).
- 2) 조규형 : 어성초 건강법. 서진각 (1996).
- 3) 신민교, 임상본초학, 영림사, p.336-337 (1994)
- 4) 노병규 : 어성초 추출물의 항알레르기의 효과에 관한 연구. 원광대학교 박사학위논문 (1998).
- 5) 임용규, 박석근, 노길형, 임달성, 유증자 : 어성초. 도서출판서일 (1996).
- 6) 김영옥, 이종섭, 박경옥, 한두석, 유일수,곽정숙, 백승화 : 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제8보) 금은화 메탄올 분획이 흰쥐 장기내 카드뮴 축적과 metallothionein 생성에 미치는 영향. 한국독성학회지, **12**, 41 (1996).
- 7) 백승화, 유일수, 이종섭, 한두석 : 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제2보). 흰쥐간장내의 카드뮴 축적에 미치는 금은화 추출물의 영향. 한국독성학회지, **11**, 223 (1995).
- 8) 백승화, 유일수, 이종섭, 한두석 : 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제4보). 흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 인삼 추출물의 영향. 한국독성학회지, **11**, 235 (1995).

- 9) 이종섭, 김남송, 유일수, 김종수, 이기남, 한두석, 강길웅, 이정호, 백승화: 천화분 메탄올 추출물이 흰쥐장기 내 카드뮴 축적에 미치는 영향(I). *한국노화학회지*, **9**, 28 (1999).
- 10) Lee, J. S., Park, K. O. and Lee, J. M. : A Study on the effects of Radix Menispermis extracts against cadmium chloride sub-chronic toxicity in rats. *Korean J. Toxicol.* **12**, 59 (1996).
- 11) Onosaka, S., Tanaka, K., Doi M. and Okahara, K. : A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues, *Eisei Kagaku*, **24**, 128 (1978).
- 12) Mosmann, T. (1978) : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55 (1978).
- 13) Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. : New colorimetric cytotoxicity Assay for Anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 14) Kwon, O. R. and Kim, M. K. : The effect of dietary protein and calcium levels on the cadmium detoxication in rats. *J. Kor. Home Econom. Asso.*, **30**, 99 (1992).
- 15) Han, D. S., Lee, K. N., Lee, J. S. and Baek, S.H.: The inhibitory effects of Taraxaci Herba against cadmium induced cytotoxicity, *J. Pharm. Soc. Korea*, **42**, 307 (1998).