

## 삼백초 추출물의 카드뮴독성에 대한 방어효과(II)

이정호<sup>1</sup> · 유일수<sup>2</sup> · 이기남<sup>3</sup> · 지정목<sup>3</sup> · 한두석<sup>4</sup> · 신민교<sup>5</sup> · 정승일<sup>1</sup> · 오현주<sup>1</sup> · 백승화<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, <sup>3</sup>산업한의학교실, <sup>4</sup>치과대학 구강해부학교실,  
<sup>5</sup>한의학대학 본초학교실, <sup>2</sup>익산대학 공업화학과

## The Protective Effects of the Extract of *Saururus chinensis* Against Cadmium Induced Cytotoxicity (II)

Jeong Ho Lee<sup>1</sup>, Il Soo You<sup>2</sup>, Ki Nam Lee<sup>3</sup>, Jeong Ok Ji, Du Seok Han<sup>4</sup>, Min Kyo Shin<sup>5</sup>,  
Seung Il Jeong<sup>1</sup>, Hyun Ju Oh<sup>1</sup> and Seung Hwa Baek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Herbal Resources and <sup>3</sup>Department of Industrial Oriental Medicine,  
Professional Graduate School of Oriental Medicine,

<sup>4</sup>Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,

<sup>5</sup>Department of Herbage, School of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
Iksan 570-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Industrial Chemistry, Iksan College, Iksan 570-110, Korea

(Received December 2, 2000)

(Accepted August 25, 2001)

**ABSTRACT** : This study was conducted to investigate the antitoxic component in ethanol extract of *Saururus chinensis* (*S. chinensis*). The results were as follows: Generally, detoxication effects by *S. chinensis* extract increased in proportion to the extract concentrations. When 8 µg/g dosage of *S. chinensis* extract was administered, it showed the highest antitoxic effects in metallothionein induction. After the extract treatment, body weights generally increased in proportion to the extract concentrations. From the above results, *S. chinensis* extract increased metallothionein concentrations and decreased the toxicity of cadmium in rats. In vitro the antitoxic activity of ethanol extract of *S. chinensis* on NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and SRB (sulforhodamine B protein) assays. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of the treated cells. 10<sup>-2</sup> mg/ml Concentrations of *S. chinensis* extract was shown significant antitoxic activity. The number of NIH 3T3 fibroblasts were increased and tend to regenerate. These results suggest that *S. chinensis* extract retains a potential antitoxic activity.

**Key Words** : Antitoxic agent, Metallothionein, MTT assay, SRB assay, *Saururus chinensis*

### I. 서 론

삼백초(三白草, *Saururus chinensis* Baill)는 삼백초과에 속하는 다년생초본(多年生草本) 식물로서, 우리나라에서는 남쪽지방에 자생하거나 재배하며(문관심, 1999), 해열, 이뇨, 거담, 수종, 각기, 임질, 위장병, 간염, 황달, 해독, 응중 등에 효과가 있다(신민교, 1994). 조 등(2000)은 감잎으로부터 분리한 polyphenol 화합물이 카드뮴 제거에 효과가 있다고 하였고, 이 등(1999)은 인진쑥 열수 추출물이 흰쥐

생체내 지질과산화 물질의 생성을 억제해 카드뮴으로부터 간보호작용을 한다고 보고되어 있다. 중금속은 주로 호흡과 식품 등에 의하여 체내에 유입되어 신장, 간장 등의 장기에 축적 여러 질병을 일으키게 된다(이 등, 1999; WHO, 1977). 이에 본 연구는 삼백초 추출물의 카드뮴에 대한 방어효과를 규명하기 위하여 삼백초를 물과 에탄올로 추출하여 얻은 추출물을 카드뮴에 중독된 흰쥐에게 경구 투여한 후, 조직내 카드뮴과 MT의 농도, 체중변화를 측정하고, 카드뮴의 세포독성을 1차 검색방법인 비색법중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 카드뮴에 대한 방어효과를 평가하고자 하였다.

\*To whom correspondence should be addressed

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용한 삼백초는 1999년 7월 충남 공주시 반포면에서 채집하여 음건한 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관되어 있다. 삼백초 추출에 사용한 용매로는 물과 EtOH를 사용하였으며, 흰쥐 신장과 간장내의 카드뮴 함량 분석에 사용된 시약은 GR급을 사용하였고, Cd 표준용액은 Sigma제를 사용하였다. 전처리에 사용된 초자기구는 질산으로 세척하여 중금속을 완전히 제거한 후 사용하였으며, 세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT 정량 및 SRB 정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은 CO<sub>2</sub> incubator(Shellab 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.

### 2. 실험동물

실험에 사용된 동물은 원광대학교 의과대학 실험동물 사육장에서 사육한 생후 6~8주 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐 숫컷으로 체중은 150 ± 20 g을 사용하였으며, 1주일의 순화사육기간 동안에 일반증상관찰을 시행하여 정상적인 동물만 실험에 사용하였으며, 사육은 온도 22±2°C, 습도는 50±10%의 동물사육실에서 흰쥐용 깔집을 깔고 1군당 5마리씩으로 하였다. 사료는 고령 pellet 사료(삼양유지)와 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였으며, 사육기간(투여기간)은 4주로 하였다.

### 3. 검액의 조제

본 연구에 사용된 생약제인 삼백초는 충남 공주시 반포면에서 채취하여, 삼백초를 잘게 썰어 음건한 후 건조된 삼백초 50 g을 1,000 ml 둥근플라스크에 넣고 에탄올을 250 ml를 가한 후, 상온에서 24시간 동안 stirring한 후 추출하였다. 물 추출은 삼백초 50 g에 250 ml를 넣어 75°C에서 4시간 동안 환류 추출하였다. 이와 같이 세 번 반복하여 얻은 추출물을 0.4 µm 필터(Advantec, No 5B)로 감압여과한 후, 여과액을 진공증류기로 감압농축시켰다. 삼백초 에탄올 추출물 1.240 g(8.27%)을 얻었으며, 물 추출물 10.774 g(21.55%)을 얻었다. 이 추출물을 필요에 따라 물에 희석하여 사용하였다.

**Table 1.** Dosage of cadmium and extracts of *S. chinensis* in rats

Group	Cd dosage (µg/g)	<i>Saururus chinensis</i> Baill (µg/g)
Control	0	0
Cd control	4	0
Water extract	4	2
	4	4
	4	8
Ethanol extract	4	2
	4	4
	4	8

Experiment animals were treated with cadmium and extracts of *S. chinensis* by oral administration.

### 4. 카드뮴 및 삼백초 추출액 투여

실험에 사용한 중금속은 cadmium chloride(CdCl<sub>2</sub>; Sigma GR급)이며, 삼백초의 물과 에탄올 추출물의 rat의 1일 경구 투여용량은 Table 1과 같으며, 경구투여는 1일 1회 투여하였고, 1군당 5마리씩으로 4주간 실험하였다(Eaton 등 1982).

### 5. 흰쥐 장기내의 카드뮴의 농도측정

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 습식 탄화방법에 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 hydroxide 용액으로 중화시켰다. 여기에 10 ml의 40% ammonium sulfate 용액과 10 ml의 sodium diethyl dithiocarbamate(DDTC) 용액을 넣고 세차게 흔든 후 수분간 방치한 다음, 20 ml의 methyl isobutyl ketone(MIBK)층을 가하고 흔든 후 방치한 다음, MIBK층을 취하여 120°C hot plate상에서 휘산시켜 0.1 N 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.

### 6. 흰쥐 장기내의 metallothionein의 농도측정

Onosaka 등(1978)의 방법에 따라 조직 중의 metallothionein (MT)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 세포질액을 얻었다. 세포액

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 MT 이외의 모든 bioligand를 제거하고, 100°C 수욕탕에 1분간 정지시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이와같이 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복한 후, µg MT 분획층을 분리하여 측정하였다. 최종적인 MT 농도 계산은 원자흡광광도계에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로, MT 분자량 6,050 g 당 카드뮴 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 g 당 µgMT 농도를 표시하였다.

### 7. 체중측정

실험동물에 대해서 시험개시일로 부터 시험종료일 까지 매주 2회 측정하였다.

### 8. 세포배양

조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직 전에 에탄올로 동량희석하였다. 각각 1:1(mg/ml)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution하여 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도를 실험에 사용하였다. 삼백초 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.

### 9. MTT 정량분석법

Mosmann(1978)의 방법에 따라 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well 이 되도록 조절하여, 1 ml씩 24 well plate에 분주하고, 24 시간 배양하였다. NIH 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 삼백초 추출물의 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도를 배양액에 넣어, 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 함유된 배양액을 well당 1 ml씩

넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 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.

### 10. SRB 정량 분석법

Skehan 등(1990)의 방법에 따라, 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well 이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고, 24 시간 배양하였다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 SRB<sub>50</sub> 농도를 결정하였다. MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB<sub>50</sub>군 및 실험군으로 하여 삼백초 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(520 nm)로 측정하여 SRB<sub>50</sub>군과 비교하였다.

### 11. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, NIH 3T3 섬유모세포는 MTT 정량 및 SRB 정량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

### 12. 통계학적 해석

실험결과의 통계학적처리는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 흰쥐 신장내 cadmium 농도

흰쥐에게 카드뮴 농도를 4 µg/g와 삼백초 추출물을 단독 또는 병용하여 경구투여 시킨 후, 각 실험군의 신장내의 카드뮴의 농도는 Fig. 1과 같다. 카드뮴과 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 투여하지않은 군에서 카드뮴의 농도는 2.04±0.28 µg/g으로 나타났으며, 카드뮴 대조군에서의 농도는 18.24±1.93 µg/g으로 나타났다(백승화 등, 1995). 삼백초의 물과 에탄올 추출물 경구 투여용량이 증가할수록 흰쥐 신장내 카드뮴 농도의 저하로 카드뮴에 대한 방어효과가 관찰되었다. 삼백초의 물 추출물의 경구 투여용량이 4 µg/g에서 16.88±0.81 µg/g(92.54%) (p < 0.05)와 8 µg/g

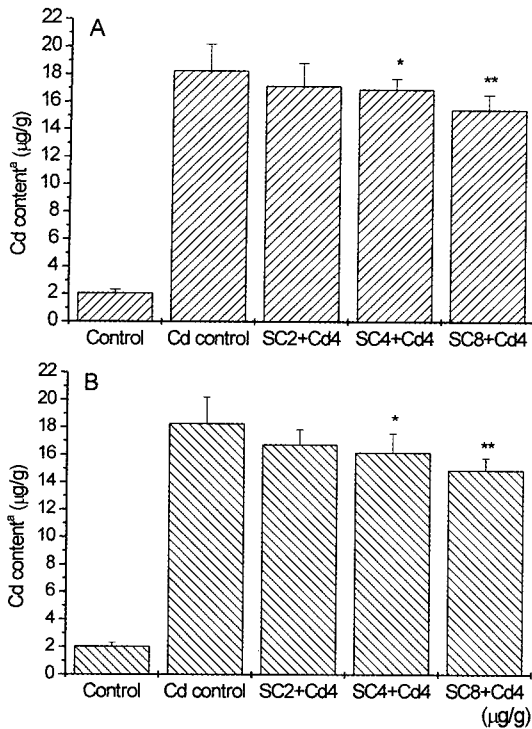


Fig. 1. Concentrations of cadmium in kidney of rats treated with water extract (A) and ethanol extract (B) of *S. chinensis* (SC). \*The values represent the mean±standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and extracts of *S. chinensis* by oral administration. Significantly different from the control values (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

에서  $15.43 \pm 1.08 \mu\text{g/g}$  (84.59%) ( $p < 0.01$ )으로 통계적으로 유의성이 나타났다. 삼백초의 에탄올 추출물의 경구 투여 용량이  $4 \mu\text{g/g}$ 에서  $16.15 \pm 1.41 \mu\text{g/g}$  (88.54%) ( $p < 0.05$ )으로 통계적으로 유의성이 나타났으며,  $8 \mu\text{g/g}$ 에서 카드뮴 농도의 감소효과는  $14.86 \pm 0.91 \mu\text{g/g}$  (81.47%) ( $p < 0.01$ )로 가장 우수한 결과를 보였다. 삼백초의 에탄올 추출물이 흰쥐의 신장에서 카드뮴의 농도가 물 추출물 보다 약간 감소하였다.

### 2. 흰쥐 간장내 cadmium 농도

흰쥐에게 카드뮴 농도를  $4 \mu\text{g/g}$ 와 삼백초의 물과 에탄올 추출물을 단독 또는 병용하여 경구투여한 후, 각 실험군에서의 간장내 카드뮴 농도는 Fig. 2와 같다. 카드뮴과 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서 카드뮴의 농도는  $3.04 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$ 으로 낮게 나타났다(백승화 등, 1995). 삼백초의 물 추출물의 경구 투여용량이  $4 \mu\text{g/g}$ 에서는  $15.38 \pm 0.41 \mu\text{g/g}$  (85.73%)과  $8 \mu\text{g/g}$ 에서는  $15.13 \pm 0.90 \mu\text{g/g}$  (84.34 %)에서 통계적( $p < 0.05$ )으로 유의하였으며, 에탄올 추출물의 투여용량이  $4 \mu\text{g/g}$ 에서는  $15.20 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$  (84.73%) ( $p < 0.05$ )와  $8 \mu\text{g/g}$ 에서는  $14.91 \pm 1.12 \mu\text{g/g}$

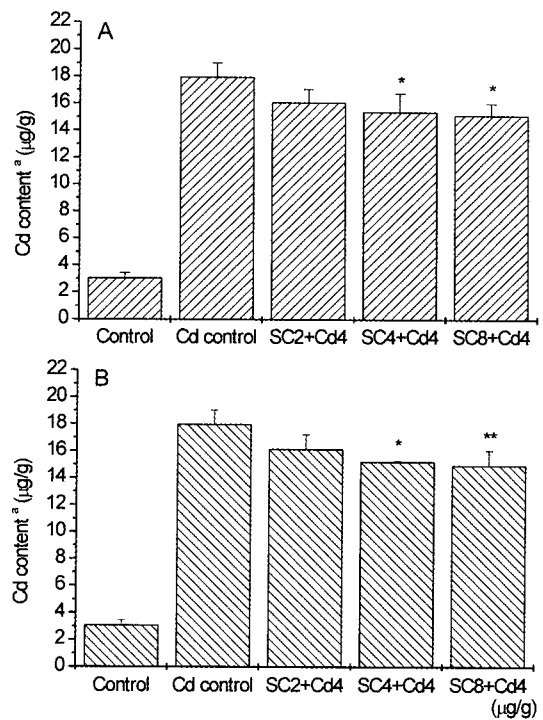
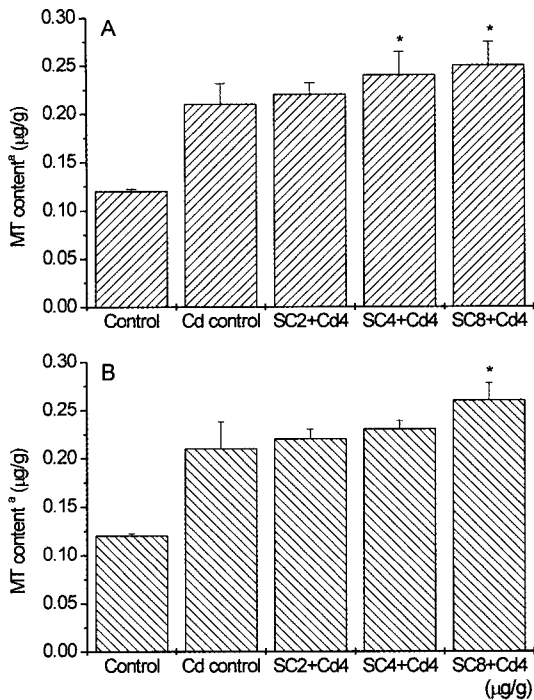


Fig. 2. Concentrations of cadmium in liver of rats treated with water extract (A) and ethanol extract (B) of *S. chinensis* (SC). \*The values represent the mean±standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and extracts of *S. chinensis* by oral administration. Significantly different from the control values (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

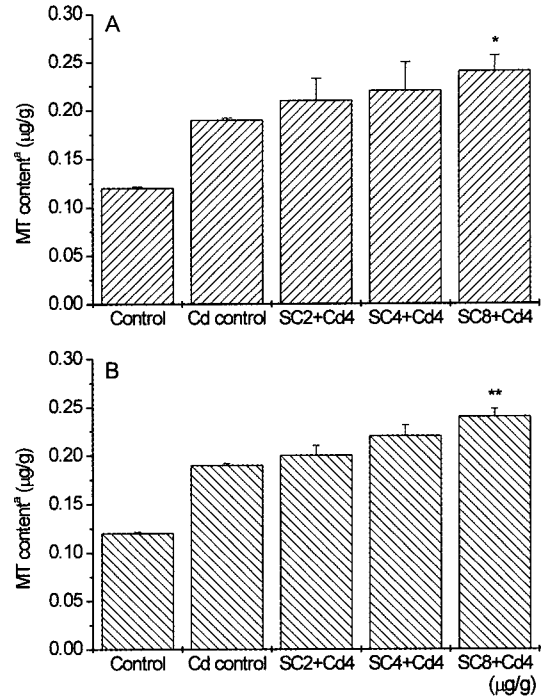
(83.11%)으로 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ )을 보였다. 삼백초 물 및 에탄올 추출물의 경구 투여용량이  $4 \mu\text{g/g}$  이상이 되면, 카드뮴에 대한 농도가 크게 증가하지 않는 경향을 보였다.

### 3. 흰쥐 신장내 metallothionein의 농도

신장내 metallothionein의 농도는 Fig. 3과 같다. 카드뮴과 삼백초 물과 에탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는  $0.12 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 카드뮴 대조군의 MT양은  $0.21 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ 으로 나타났으며, 삼백초의 물과 에탄올 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록 신장내 MT양이 증가하였다. 삼백초 물 추출물의 경구 투여 용량이  $4 \mu\text{g/g}$ 에서  $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$  (14.28%),  $8 \mu\text{g/g}$ 에서  $0.25 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$  (19.04%)에서 통계적으로 유의성이 나타났으며 ( $p < 0.05$ ), 에탄올 추출물의 투여용량이  $8 \mu\text{g/g}$ 에서  $0.26 \pm 0.18 \mu\text{g/g}$  (23.81%)에서 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ )이 나타났다. 삼백초 물 추출물의 투여용량이  $4 \mu\text{g/g}$  이후에서 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높게 나타났으나, 투여용량이  $2 \mu\text{g/g}$ 에서는 물과 에탄올 추출물에 관계없이 높은 방어효과가 나타났다.



**Fig. 3.** Concentrations of metallothionein in kidney of rats treated water extract (A) and ethanol extract (B) of *S. chinensis* (SC). \*The values represent the mean±standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and extracts of *S. chinensis* by oral administration. Significantly different from the control values (\*p < 0.05).



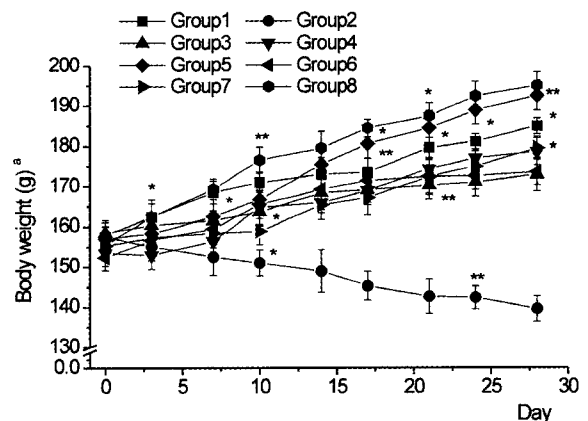
**Fig. 4.** Concentrations of metallothionein in liver of rats treated water extract (A) and ethanol extract (B) of *S. chinensis* (SC). \*The values represent the mean±standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and extracts of *S. chinensis* by oral administration. Significantly different from the control values (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

**4. 흰쥐 간장내 metallothionein의 농도**

간장내 metallothionein의 농도는 Fig. 4와 같다. 카드뮴과 삼백초 물과 에탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는 0.12±0.01 µg/g으로 나타났으며, 카드뮴 대조군은 0.19±0.01 µg/g으로 나타났다. 삼백초 물과 에탄올 추출물을 경구 투여할 경우, 신장보다는 간장에서 MT 형성이 많이 되는 결과를 보였으며, MT 형성으로 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 나타나는 것으로 판단된다. 삼백초 물 추출물의 경구 투여용량이 2 µg/g에서는 0.21±0.02 µg/g으로 에탄올 추출물의 경우에는 0.20±0.01 µg/g으로 나타나, 삼백초 물 추출물에서 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높게 나타났다. 물과 에탄올 추출물 모두 투여용량이 4 µg/g 이상에서는 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 두 추출물 모두 같은 경향을 보였다. 삼백초 물 추출물의 경구 투여농도가 8 µg/g에서 0.24±0.02 µg/g(26.31%)으로 통계적으로 유의성이 나타났으며(p < 0.05), 삼백초 에탄올 추출물의 경구 투여용량이 8 µg/g에서 0.24±0.01 µg/g(26.32%)으로 통계적으로 유의성(p < 0.01)이 높게 나타났다.

**5. 체중 변화**

삼백초의 물과 에탄올 추출물을 경구투여한 흰쥐의 무



**Fig. 5.** Body weights in rats treated with extract of *S. chinensis*. \*The values represent the mean±standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and *S. chinensis* extract by oral administration. Significantly different from the control values (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

계변화는 Fig. 5와 같다. 카드뮴과 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 투여하지않은 군에서는 흰쥐의 체중이 꾸준히 증가하는 경향을 보였으며, 카드뮴만 투여한 흰쥐 군의 경우에는 체중이 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 카드뮴에 대한 중독으로 인하여 체중이 감소하는 결과를 알 수 있다. 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 경구 투여한 후 1주 까지는 체중이 증가하는 경향이 적었지만, 2주 이후부터는 체중이 증가하는 경향은 높았다. 이 결과는 흰쥐의 2주 이후부터 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높아지는 것으로 판단된다. 삼백초 에탄올 추출물이 물 추출물보다 체중이 증가하는 경향이 높게 나타났으며, 투여기간 동안 에탄올 추출물의 투여용량이 8 µg/g에서는 물 추출물의 체중증가보다 높게 나타났다. 이는 흰쥐의 카드뮴 축적에 대한 독성을 완화시킬 뿐만 아니라, 카드뮴 차물을 형성하여 배출을 촉진시켰기 때문이라 생각된다.

6. MTT 정량분석법

NIH 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(Han *et al.*, 1998). MTT 정량분석법을 이용하여 MTT 농도를 측정한 결과, 삼백초 에탄올 추출물의 10<sup>-2</sup> mg/ml(87.03%) 통계적으로 유의성(p < 0.01)과 10<sup>-3</sup> mg/ml~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도에서 통계적 유의성(p < 0.05) 있는 카드뮴 독성에 대한 방어효과를 나타냈

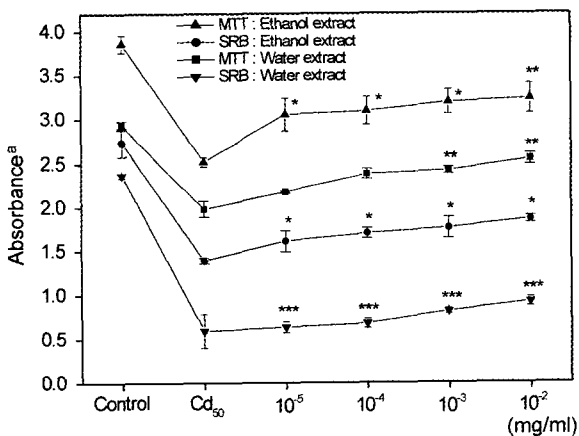


Fig. 6. The MTT and SRB absorbance of extract of *S. chinensis* on 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT<sub>50</sub>, SRB<sub>50</sub>). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. \*The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 \*\*\*p < 0.001 (Student's t-test).

다. 삼백초 물 추출물의 경우 10<sup>-2</sup> mg/ml~10<sup>-3</sup> mg/ml 농도에서 82.59%~74.06% 범위의 통계적으로 유의성(p < 0.01) 있는 카드뮴 독성에 대한 방어효과를 나타냈으며, 일반적으로 삼백초 추출물의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 증가하였으며, 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 증가하였다. 삼백초 물 추출물이 에탄올 추출물보다 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 약간 증가하여, 물 추출물의 10<sup>-2</sup> mg/ml 농

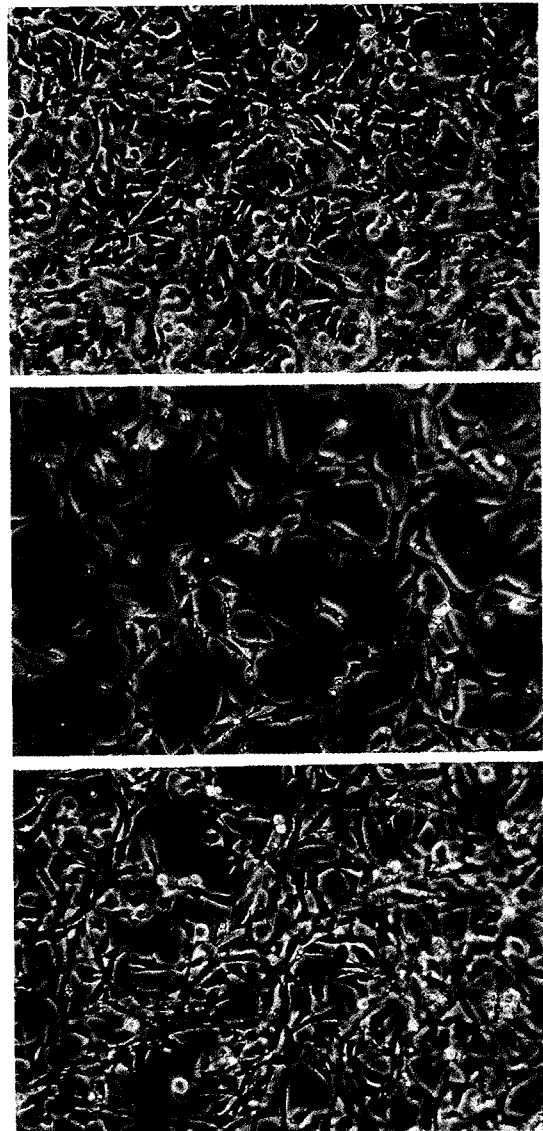


Fig. 7. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3 hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days ×200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (1). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the Cd<sub>50</sub> concentrations for 2 days ×200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased (2). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing Cd<sub>50</sub> concentrations plus 10<sup>-2</sup> mg/ml concentrations of *S. chinensis* for 2 days ×200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased (3).

도에서 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높게 나타났다.

## 7. SRB 정량분석법

핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여, SRB 농도를 측정 한 결과 MTT 농도에서와 같이, 삼백초 에탄올 추출물의  $10^2$  mg/ml~ $10^5$  mg/ml 농도에서 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 카드뮴 독성에 대한 방어효과를 나타냈다. 삼백초 물 추출물의 경우에는  $10^2$  mg/ml~ $10^5$  mg/ml 농도에서 유의성( $p < 0.001$ )이 나타났으며, 모든 농도에서 에탄올 추출물이 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높게 나타났다(Fig. 6). 비색분석법에 의한 삼백초 에탄올 추출물과 물 추출물의 카드뮴 독성에 대한 방어효과는 추출물의 농도증가에 따라, 흡광도의 증가와 함께 방어효과도 증가하였으며, 흡광도의 변화는 SRB 정량분석법 보다 MTT 정량분석법이 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다(Han *et al.*, 1998).

## 8. 세포의 광학현미경적 관찰

세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양 하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, NIH 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있다(Fig. 7-1).  $IC_{50}$ (MTT<sub>50</sub> 및 SRB<sub>50</sub>)의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포 수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 7-2).  $IC_{50}$  농도의 카드뮴과 삼백초 에탄올 추출물을 처리한 군에서는  $IC_{50}$ 군에 비하여 세포 수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다(Fig. 7-3). 에탄올 추출물을 이용하여, 카드뮴 방어효과를 측정한 보고가 있어 직접적인 비교는 할 수 없으나, 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 삼백초 에탄올 추출물이 억제 하는 방어효과가 있는 것으로 인정된다. 이에 삼백초 에탄올 추출물의 카드뮴에 대한 해독물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 분광화학적 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

## IV. 결 론

흰쥐에게 카드뮴 경구 투여시, 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 경구 투여한 후 카드뮴 독성에 대한 방어효과와 카드뮴이 NIH 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, 카드뮴  $IC_{50}$ (MTT<sub>50</sub> 및 SRB<sub>50</sub>)에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 방어효과에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흰쥐에게 삼백초 물 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 증가하였으며, 삼

백초 물 추출물이 에탄올 추출물 보다 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 약간 높게 나타났다. 간장보다는 신장에서 카드뮴 독성에 대한 방어효과가 높게 나타났다.

2. 삼백초 물 및 에탄올 추출물을 경구투여한 후, 흰쥐 신장과 간장에서 MT의 농도는 신장에서 보다 간장에서 높은 결과를 보였으며, 두 추출물의 투여 용량이  $4 \mu\text{g/g}$  이상에서 MT의 형성이 증가하는 경향을 보였다.

3. 흰쥐의 체중변화를 보면 삼백초 물 및 에탄올 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록, 흰쥐의 체중변화도 증가하는 경향을 보였으나, 2주 이후에는 체중의 증가가 높게 나타났다.

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

이상과 같이 실험관내와 흰쥐에서 삼백초 물 및 에탄올 추출물의 실험결과를 종합해 보면, 삼백초 물 및 에탄올 추출물의 경구 투여농도가 증가할수록 카드뮴 독성에 대한 방어효과를 보였으며, 물 추출물보다 에탄올 추출물이 방어효과가 약간 우수하였으며, 카드뮴 독성에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 원광대학교 교비와 BK 21 사업지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사한다.

## 참고문헌

- Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982): Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **66**, 134-139.
- Han, D.S., Lee, K.N., Lee, J.S. and Baek, S.H. (1998): The inhibitory effects of *Taraxaci Herba* against cadmium induced cytotoxicity. *J. Pharm. Soc. Korea*, **42**, 307-311.
- Mosmann, T. (1978): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and

- cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55-63.
- Onosaka, S., Tanak, K., Doi, M. and Okahara, K. (1978): A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues, *Eisei Kagaku*, **24**, 128-133.
- Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112.
- WHO (1977): Health hazard of the Human Environmental. Geneva, WHO, pp. 35-37.
- 문관심 (1999): 약초의 성분과 이용, 일월서각. 서울, pp 344-345.
- 백승화, 유일수, 이종섭, 한두석 (1995): 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발(제2보) 흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 금은화 추출물의 영향. *한국독성학회지*, **11**, 223-227.
- 신민교 (1994): 임상분초학, 영림사, 서울, pp. 336-337.
- 이치호, 한규호, 최일신, 김충용, 조진국 (1999): 인진쑥의 열수 추출물이 흰쥐의 카드뮴 독성에 미치는 영향. *한국축산식품학회지*, **19**(2), 1888-197.
- 조국영, 최희진, 손준호, 배두경, 박무희, 우희섭, 안봉전, 배만중, 최청 (2000): 감잎으로부터 분리한 polyphenol 화합물의 카드뮴 제거효과. *한국농화학학회지*, **43**(3), 213-217.