

단 신

Quercitrin의 카드뮴에 대한 독성억제 효과(VIII)

이정호¹ · 이기남¹ · 이춘우¹ · 천현자¹ · 유일수² · 임진아 · 백승화*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과

원광대학교 자연과학대학 자연과학기술학부

*익산대학 환경·공업화학과

(2003. 1. 28 접수)

The Inhibitory Effects of Quercitrin from *Houttuynia Cordata*
Against Cadmium Induced Cytotoxicity(VII)

Jeongho Lee¹, Kinam Lee¹, Chunwoo Lee¹, Hyunja Chun², Ilsoo You²,
Jina Lim, and Seunghwa Baek*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

¹Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Division of Natural Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

*Department of Environmental Engineering & Chemical Technology, Iksan College, Iksan 570-110, Korea

(Received January 28, 2003)

주제어: 어성초, 카드뮴, quercitrin, 3T3 섬유보아세포

Keywords: *Houttuynia Cordata*, Cadmium, Quercitrin, NIH 3T3 Fibroblasts

서 론

현대사회의 오염원중 중금속은 독성을 가진 금속이며, 그중 cadmium은 사람이 출생할 때에는 인체에 존재하지 않지만, 연령이 증가함에 따라 점차적으로 체내에 축적되며, 생리적, 기능적 장애와 더불어 형태적, 유전적, 생화학적 변화를 일으켜 각종 질병을 유발한다.¹

어성초는 항염증 작용, 이뇨, 강심, 해열, 배농작용, 항간지염, 항암작용과 축농증, 폐렴, 관절염, 습진, 매독, 협심증, 단석증, 신장병, 통풍, 치질, 당뇨병, 고혈압, 중금속 해독작용, 기관지염, 간염, 위염, 무좀, 방광염, 청열, 소증, 열리, 팔라리아, 수종, 위병, 백대, 응지, 탈항 등에 효능이 있으며, 어성초의 성분중 quercitrin은 혈관수축작용, 항균작용과 강력한 이뇨작용이 있으며, decanoylacetaldehyde는 탁월한 항생제의 효과가 있는

것으로 알려져 있다.²⁻⁸

Flavonoid는 주로 배당체(glycoside)의 형태로 식물체에 널리 분포되어 있으며, 사람은 1일 약 1g 정도 섭취하는 화합물로서 항바이러스, 항혈액응고, 급성간염 억제, 고혈압, 당뇨병 백내장의 예방, 이뇨, 모세혈관투과성 억제, 항산화, 항염, 진경, 혈압강하, 살충효과 등에 활성이 있는 것으로 알려져 있다.⁹

실 험

실험재료. 어성초를 methanol로 추출하여 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate, *n*-butanol, 물로 계통분획한 것 중 ethyl acetate 분획물을 silica gel을 이용하여 chloroform과 methanol로 2회 분리한 후 methacrylic acid polymer가 충전된 recycling prep-TIPLC(SUNII, JAI)를 이용하

여 순수한 화합물을 분리하였다.

Compound. Yellow needle. TLC: $R_f=0.725$ (CHCl₃: MeOH=5:5), UV λ_{max} (MeOH nm) 256, 350, IR max (KBr cm⁻¹) 3424(br, -OH), 1655(α , β -unsaturated, C=O), 1607, 1498(aromatic C=C), 1088(C-O), ¹H-NMR(DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 12.64(brs, C-3-OH), 7.26(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-2'), 7.22(1H, dd, $J=2.3, 8.3$ Hz, H-6'), 6.82(1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6.21(1H, s, H-8), 6.04(1H, d, $J=0.7$ Hz, H-6), 5.23(1H, d, $J=1.0$ Hz, H-1''), 3.95(1H, dd, $J=1.4, 3.0$ Hz, H-2''), 3.49(1H, dd, $J=3.2, 9.2$ Hz, H-3''), 3.22(1H, m, H-5''), 3.15(1H, t, $J=9.7$ Hz, H-4''), 0.81(3H, d, $J=5.4$ Hz, H-6''), ¹³C-NMR(DMSO-*d*₆, 125 MHz) 156.71(C-2), 133.78(C-3), 176.97(C-4), 160.94(C-5), 99.61(C-6), 161.10(C-7), 94.08(C-8), 156.43(C-9), 102.60(C-10), 120.39(C-1'), 115.20(C-2'), 145.35(C-3'), 148.95(C-4'), 115.31(C-5'), 120.98(C-6'), 101.71(C-1''), 70.02(C-2''), 70.45(C-3''), 71.18(C-4''), 70.30(C-5''), 17.49(C-6'').

카드뮴 착물의 분광화학적 성질. 0.2 M NH₃-0.2 M NH₄Cl(pH 8.0) 용액으로 pH 농도를 유지시켜, 17~20°C 온도에서 실시하였다. 흡수 스펙트라의 측정범위는 190~700 nm 범위에서 측정하였으며, 흡수분광학적 방법에 의한 복합체의 결합비는 분비법을 사용하였다.¹⁶ 흡수광계수는 Beer의 법, $A = \epsilon b c$ 으로 계산하였다.¹⁰⁻¹²

결과 및 고찰

구조확인. UV/VIS spectrophotometer에서 256 nm, 350 nm에서 흡광점이 나타났으며, IR spectrophotometer에서는 3424 cm⁻¹에서 sugar의 OH가 broad하게 나타났으며, 1655 cm⁻¹에서 α , β -unsaturated C=O가 나타났고, 1607 cm⁻¹, 1498 cm⁻¹에서 aromatic C=C가 측정되었으며, 1088 cm⁻¹에서 glycosidic의 C-O가 측정되었다.¹³⁻¹⁵ ¹H-NMR spectrum에서 0.81(J=5.4 Hz) ppm에서 rhamnose CH₃ proton signal이 doublet으로 나타났으며, 5.23 ppm에서 rhamnose의 anomeric proton signal이 J=1.0 Hz로 doublet로 나타났고, 3.15~3.95 ppm에 rhamnose에 기인하는 전형적인 proton signal이 관찰되었다. A고리에서 나타난 signal이 6.04 ppm(d, J=0.7 Hz)과 6.21 ppm에서 각각 H-6, H-8 proton signal이 H-6' proton과 ortho-coupling하고 있음을 알 수 있다. H-8 proton이 6.21 ppm에서 singlet로 나타났고, A고리의 oxygenated pattern 가운데서 가장 많이 나타나고, 5,7-dihydroxy group에서

6번 proton이 8번 proton 보다 high field에서 관찰되었다. 7.26 ppm(J=2.3 Hz)에서 proton signal이 doublet으로 H-2'가 나타났으며, B고리의 5', 6' proton signal이 6.82 ppm(d, J=8.3 Hz)과 7.22 ppm(dd, J=2.3, 8.5 Hz)에서 나타나 A 고리보다 low field에서 관찰되었다. 12.64 ppm에서 5-OH proton signal이 나타나는 것을 알 수 있었다.¹³⁻¹⁵ ¹³C-NMR spectrum에서 C-3이 133.8 ppm, C-2, 156.7 ppm, C-4, 177.0 ppm, C-3' 145.4 ppm, C-4', 148.9 ppm, 177.0 ppm에서 C-4의 carbonyl기와 101.7 ppm에서 rhamnose anomeric carbon signal, 17.5 ppm에서 rhamnose의 C-6'가 나타났다.^{13,16} 이상의 결과로 quercitrin(Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside)인 것을 확인하였다.¹⁷

카드뮴 착물의 분광화학적 성질. 0.2 M NH₃-0.2 M NH₄Cl(pH 8.0) 용액에서 cadmium과 quercitrin의 UV 흡수 스펙트럼은 흡광도가 274 nm 이후에서 mole ratio가 증가함에 따라 흡광도는 hyperchromic effect 현상을 나타냈으며, 흡광도가 251 nm, 354 nm, 370 nm에서 isosbestic point가 나타났다. 흡광도가 267 nm에서 cadmium과 quercitrin이 1:1로 complex되는 것으로 나타났다. 착물의 농도와 불흡광계수로 이때의 농도가 53.52 μ M임을 알 수 있었으며, λ_1 370 nm, λ_2 270 nm 이후에서 새로운 흡수대가 나타났다 (Fig. 1). Quercitrin에 cadmium을 농도별로 첨가하면 spectra가 변하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 spectra의 변화는 cadmium과 quercitrin간의 안정적인 착분형성에 의한 것으로 생각된다.

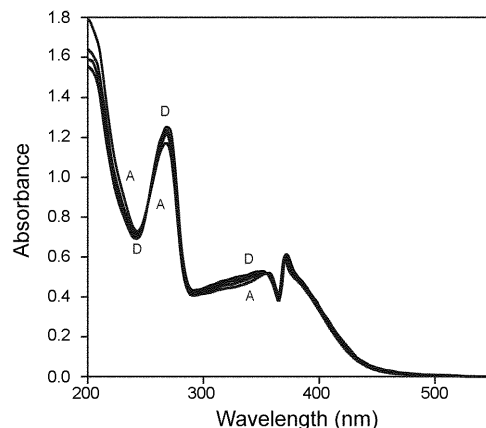


Fig. 1. Absorption spectra of quercitrin (50 μ M) at 0.2 M NH₃-0.2 M NH₄Cl (pH 8.0) in the presence of various concentrations of cadmium: R [quercitrin]/[cadmium]: R 0.0(A), 0.6(B), 0.8(C), and 1.0(D).

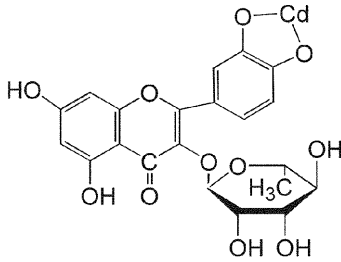


Fig. 2. The proposed structure of 1:1 complex of cadmium and quercitrin.

나. Cadmium과 quercitrin의 mole ratio가 1.0이 되면 흡광도의 변화가 최대가 되고, mole ratio가 높거나 낮으면 흡광도가 낮게 나타났다. Mole ratio가 1.0에서 분자구조적 차이를 형성하는 것으로 생각되며, Cadmium 이온과 B-고리의 diol인 두 자리 리간드(bidentate ligand)가 크리를 형성하여 안정한 cadmium 착화합물을 형성하는 것으로 판단된다(Fig. 2).^{13,18,19}

Table 1. The cytotoxicity of quercitrin by MTT assay against NIH 3T3 fibroblasts cell lines

Concentration (μM)	A ₅₄₉	
	Mean±S.D. ^a	(% of control)
Control	0.734±0.05	100.00
25.0 μM	0.755±0.04	102.86
50.0 μM	0.763±0.05	103.95
100.0 μM	0.702±0.06	95.64
150.0 μM	0.689±0.04	93.87

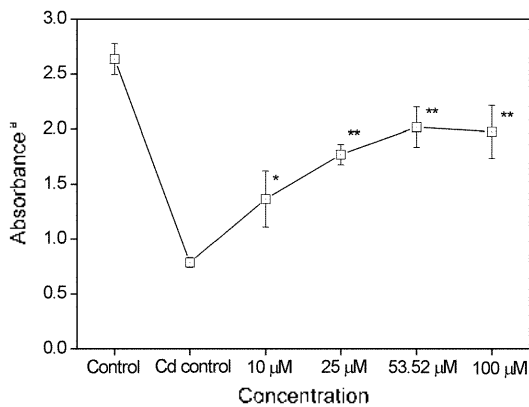


Fig. 3. The MTT absorbance of quercitrin on 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT50). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. aThe values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value. *p<0.05, **p<0.01(Student's t-test).

NIH 3T3 fibroblasts의 카드뮴 독성 측정. Mosmann의 방법으로 NIH 3T3 섬유모세포에 카드뮴을 처리한 후, 여성초에서 분리한 quercitrin에 대해 NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성에 대한 측정을 하였다. 내조균

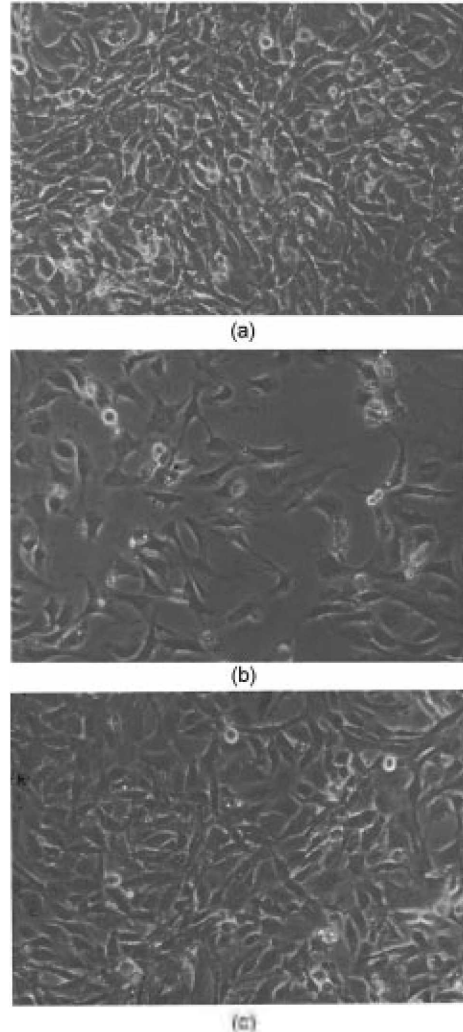


Fig. 4. (A) Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days ×200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape. (B) Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the Cd₅₀ concentration for 2 days ×200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased. (C) Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing Cd₅₀ concentration plus 53.52 μM quercitrin for 2 days ×200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased.

의 흡광도를 100%로 하여 나이키로몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정하였으며, IC₅₀인 MTT₅₀은 33.04 μM을 나타냈다.^{21,22} MTT의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며, 카드뮴만 처리한군에서는 29.9%의 흡광도를 보였으며, 10 μM quercitrin을 처리한 농도에서는 51.8%로 통계적 유의성(p 0.05)을 보였으며, 25.0 μM quercitrin의 농도에서는 67.1%, 53.52 μM에서는 76.6%의 해독경감효과를 보였고, 100 μM quercitrin을 처리한 농도에서는 74.9%로 카드뮴의 해독경감효과가 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 quercitrin에 의한 독성에 기인된 것으로 생각되며(Table 1), 카드뮴과 quercitrin의 착물형성(1:1)의 농도(53.52 μM)에서 가장 높은 해독경감효과 나타났다(Fig. 3).^{21,22}

세포의 광학현미경적 관찰. 세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, NIH 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있었고(Fig. 4A), IC₅₀(MTT₅₀)의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 4B). IC₅₀농도의 카드뮴과 quercitrin 53.52 μM을 처리한 군에서는 IC₅₀군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다(Fig. 4C). 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 quercitrin이 억제하는 독성경감효과가 있는 것으로 사료된다.^{21,22}

결 론

어성초(*Houttuynia cordata* THUNBERG)에서 분리한 quercitrin을 UV-spectrophotometer를 이용하여 0.2 M NH₃-0.2 M NH₄Cl pH 8.0 용액에서 치료와 카드뮴간의 1:1 착물형성의 농도는 53.52 μM의 농도에서 되는 것으로 나타났다. NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성에 대한 재생효과 53.52 μM quercitrin 농도에서 MTT 흡광도가 통계적으로 유의성 있는 해독경감효과를 나타냈으며, 광학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였으며, 순수한 quercitrin이 카드뮴에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있는 것으로 나타났다.

본 연구는 BK21사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

인 용 문 헌

1. Settle, D. M.; Patterson, C. C. *Americans Science*, **1980**, *207*, 1167.
2. Williams, P. L.; Burson, J. L. *Industrial Toxicology*, eds. Van Nostrand, Reihold, **1985**, p 197.
3. WHO. Cadmium in Recommended Health-Based Limits in Occupational Health to Heavy Metals. WHO Technical Report Series, **1980**, p 647.
4. WHO. Health hazard of the Human Environmental. Geneva, WHO, **1977**, p 35.
5. 임응규, 박선진, 노길형, 임달성, 유증자, 이성춘, 도서출판서원, **1996**, p 5.
6. 진민교, 임상본초학, 남산당, **1986**, p 213.
7. Sakaii, E.; Shibata, T.; Kawamura, T.; Hisata, Y.; Noro, Y.; Yoshida, M.; Tanaka, T. *Natural Medicines*, **1996**, *50*(1), 45.
8. Taguchi, K.; Hagiwara, Y.; Kajiyama, K.; Suzuki, Y. *Yakugaku zasshi*, **1993**, *113*(4), 327.
9. Cherian, M. G.; Nordberg, M. *Toxicology*, **1983**, *28*, 1.
10. Dean, J. A. *Lange's Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Book Company, **1985**, p 5.90.
11. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. *Fundamentals of analytical chemistry*, 6th. ed. Saunders College Publishing, **1992**, p 22.
12. Dinya, D.; Hetenyi, F. Y. *Topics in flavonoid chemistry and biochemistry*, Elsevier Scientific Publishing Comp, **1975**, p 589.
13. Kim, G. J.; Oh, I. S.; Whang, W. K.; Kim, I. H. *Yakhuk Hoeji*, **1995**, *39*(6), 600.
14. Park, J. C.; Yu, Y. B.; Lee, J. H. *J. Korean Soc. Food Nutr*, **1996**, *25*(1), 76.
15. Park, H. J.; Young, H. S.; Park, K. Y.; Rhe, S. H.; Chung, H. Y.; Choi, J. S. *Arch. Pharm. Res*, **1991**, *14*(2), 167.
16. Choi, J. S.; Young, H. S.; Park, J. C.; Choi, J. H.; Woo, W. S. *Arch. Pharm. Res*, **1986**, *9*(4), 233.
17. Choi, Y. H.; Kim, J. H.; Kim, M. J. *Korean J. Medicinal Crop. Sci*, **2000**, *8*(4), 373.
18. Bodini, M. E.; Copia, G.; Tapia, R.; Leighton, F.; Herrera, J. *Polyhedron*, **1999**, *18*, 2233.
19. Choi, H. S.; Kim, Y. S. *Korean Chem. Soc*, **1996**, *17*(4), 338.
20. Choi, J. H.; Rhee, S. J. *Kor Nutr Soc*, **2001**, *34*(4), 384.
21. Back, S. H.; You, I. S.; Lee, J. S.; Han, D. S. *Kor J. Toxicol*, **1995**, *11*(2), 223.
22. Perego, P.; Weghe, J. V.; David, W. D.; Howell, S. B. *Pharmacology*, **1997**, *52*(12), 12.