

## 삼백초 추출물의 항암활성과 카드뮴에 대한 독성억제효과

박승정<sup>1)</sup> · 유현주<sup>2)</sup> · 최희석<sup>2)</sup> · 서병운<sup>2)</sup> · 양선호<sup>2)</sup> · 김영훈<sup>1)</sup>  
정재열<sup>2)</sup> · 이기남<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>원광대학교 대학원 한의학과, <sup>2)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과

## Effects of *Saururus Chinensis* Bail Extracts on Anticancer Activity and Cadmium Induced Cytotoxicity

Seung-Joung Park,<sup>1)</sup> Hyun Ju Yoo,<sup>2)</sup> Hee-Seok Choi,<sup>2)</sup> Byeong Yun Seo,<sup>2)</sup>  
Seon Ho Yang,<sup>2)</sup> Yeong-Hun Kim,<sup>1)</sup>  
Jae Yeal Jeong<sup>2)</sup> & Ki-Nam Lee<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Wonkwang University

<sup>2)</sup>Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
Wonkwang University

### Abstract

1. The cell viability was determined by MTT method. Their cytotoxic activities against three cancer cell lines such as A549, MDA-MB-231 and SNU-C4 cell line were tested. Among them, The methanol extract of *Saururus chinensis* Baill. showed the strongest cytotoxic effect against SNU-C4 cells. These results suggest that the methanol extract of *Saururus Chinensis* Baill. possessed a potential antitumorous agent.

2. In vitro the antitoxic activity of ethanol extract of *Saururus Chinensis* Bail on NIH 3T3 fibroblasts was evaluate by the MTT (3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and SRB (sulfurhodamine B protein) assays. The number of NIH 3T3 fibroblasts were increased and tend to regenerate. These results suggest that *Saururus Chinensis* Bail extract retains a potential antitoxic activity.

3. Complexation of Cd (II) ion with ligands such as quercetin has been determined by UV-vis spectrophotometric method in tris buffer solution at various pH. It was found that only 1 : 1 Cd-complex

\* Corresponding author : Seung-Joung Park, Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University Tel : 82-63-850-6836. E-Mail : kinaml@wonkwang.ac.kr

is formed by the interaction between catechol moiety in ring B and cadmium [Cd(II)] in aqueous solution. The spectral parameters for Cd-complex were determined by Beer's law at various pH. It has shown that 1 : 1 Cd-complex has a maximum absorbance and red shift by the alkaline pH.

**Key words :** *Saururus Chinensis* Baill Extracts, Anticancer Activity, Cadmium Induced Cytotoxicity

## I. 서론

한약재는 생물 체내에 생합성되어 축적된 유기화합물의 화학구조, 대사, 생합성, 분포, 생물합성 등을 의미하며, 당, 지방산, 아미노산 등이 포함된다. 동물이나 미생물은 대부분 최종 대사산물을 체외로 배설하지만 식물은 대부분 체내에 축적하므로 2차 대사산물이라 할 수 있어 모두가 식물성분이라 할 수 있으며,<sup>1)</sup> 전통적으로 민간약이나 질병의 예방에 사용되어 왔으며, 인체에 부작용이 적어 한약재가 가지고 있는 활성효과에 대한 연구가 진행되고 있다.<sup>2-8)</sup>

삼백초(*Saururus Chinensis* Bail)는 삼백초과에 속한 다년생 초본인 삼백초의 뿌리와 전초를 건조한 것으로 전초에는 methyl-n-nonyl-ketone이 많이 함유되어 있으며, 잎과 줄기에는 quercitrin, quercetin, rutin, tannin, 아미노산, 유기산, 당류 등이 많이 함유되어 있다. 性味는 無毒하고 苦辛하며, 효능은 해독, 급성중독, 농약중독, 습진, 각기, 황달, 대하, 임탁, 용종, 적취, 수종, 요도염, 방광염, 이질, 항균, 고혈압, 피로회복, 타박상에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.<sup>10-16)</sup>

현대의학의 발달에도 불구하고 암 치료는 여전히 어려운 문제이다. 암 발생 원인중 80~90 %는 환경적 요인에 있으며, 치료는 수술요법, 방사선요법, 면역요법, 약물요법 등으로 한

다. 암의 예방과 치료를 위하여 많은 연구자들은 항암제를 개발하여 사용하고 있으나 결정적인 효과를 가지는 약제나 화합물을 발견하지 못하고 있는 실정이다.<sup>16-21)</sup> 대기, 수질 및 토양 오염으로 인하여 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속 때문에 식수, 식품, 공기의 오염이 심각한 환경문제로 대두되고 있다.

카드뮴은 1932년 Prodan이 인체에 악영향을 미치는 것을 처음으로 기술하였으며, 주로 안료, 염화비닐의 안정제, 합금 등에 사용되고 있고, 1946년 일본에서 Itai-Itai 병의 발생을 시초로 환경오염에 의한 질병으로 카드뮴 중독 문제가 대두되기 시작하였다.<sup>22-26)</sup>

이 등은 삼백초가 흰쥐 체내에 축적된 카드뮴의 독성 경감효과가 있는 것으로 보고하였으며, 조 등은 감잎으로부터 분리한 polyphenol 화합물이 카드뮴 제거에 효과가 있다고 하였고, 이 등은 인진쑥 열수 추출물이 흰쥐 생체내 지질과산화 물질의 생성을 억제해 카드뮴으로부터 간보호작용을 한다고 보고되어 있다. 이에 삼백초를 물과 메탄올로 추출하여 A549(lung cancer), MDA-MB-231(breast cancer), SNU-C4(colon cancer) cell에 대하여 MTT 정량분석법으로 세포독성과 NIH3T3 섬유모세포를 이용하여 카드뮴에 대한 독성완화 효과를 측정하였으며 삼백초의 주요 물질인 quercetin을 분광학적인 방법으로 카드뮴과 quercetin의 결합을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

삼백초는 1997년 7월에 충남 공주군 반포면에서 재배한 것을 채취하여 사용하였다.

### 2. 검액의 조제

삼백초 메탄올 추출물은 삼백초를 잘게 썰어 음건한 삼백초 50 g을 1,000 ml 등근플라스크에 넣고 메탄올을 250 ml를 가한 후, 상온에서 24시간 동안 stirring한 후 추출하였다. 삼백초 물 추출물은 삼백초 50 g에 물 250 ml를 넣어 75°C에서 4시간동안 환류 추출하였다. 이와 같이 세 번 반복하여 얻은 추출물을 0.4  $\mu$ m 필터 (Advantec. No 5B)로 감압여과한 후, 여과액을 진공증류기로 감압농축시켰다. 삼백초 메탄올 추출물 1.240 g (2.48 %)을 얻었으며, 물 추출물 10.774 g (21.55 %)을 얻었다. 이 추출물을 필요에 따라 물에 희석하여 사용하였다.

### 3. 시약 및 기기

삼백초 추출에 사용된 용매는 3차 증류수와 methanol로 증류하여 사용하였고, 항암활성 측정에 실험은 FBS (fetal bovine serum), RPMI (Rosewell Park Memorial Institute)-1640 배지, trypsin-EDTA는 Gibco제 GR급을 사용하였으며, 3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetra-zoliumbromide (MTT), dimethylsulfoxide(DMEM)등은 Sigma사에서 구입하였으며. 세포배양은 CO<sub>2</sub> incubator (Shellab Co., U.S.A.), Turk형 혈구계산기, 도립현미경(In-

verted Microscope, Olympus), ELISA reader (Spectra Max 250, U.S.A.)를 사용하였다.

NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴에 대한 해독경감 실험은 MEM (Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. Micropipette (Glison), 96 well (Falcon), Conical tube (Falcon), RPMI medium 1640, antibiotic-antimyzolic, hepes, L-glutamine, D-PBS (Dulgecos phosphate buffer solution), HBSS (Hank's balanced salt solution) 등을 사용하였으며, Dimethylsulfoxide, 0.4 % trypan blue solution, SDS(sodium dodecyl sulfate) 등은 Sigma 제품을 사용하였고, Adriamycin은 Aldrich 제품을 사용하였으며, Ampicillin(종근당)을 사용하였다. 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT 정량분석 및 SRB 정량분석은 ELISA reader (Spectra Max 250, USA)를 사용하였다.

Cadmium착물의 분광화학적 측정은 CdCl<sub>2</sub> (Sigma Co.), Tris buffer, UV-Spectrophotometer Hewlett Packard사의 model HP 8453A를 사용하였다.

### 4. 암세포에 대한 항암활성

#### 1) 암세포배양

A549(lung cancer), MDA-MB-231(breast cancer), SNU-C4(colon cancer)은 CO<sub>2</sub> 배양기 (37°C, 5%)에서 10 % FBS와 1% antibiotics가 포함된 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양하였다. 각 세포는 약 72시간을 주기로 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 계대배양한 후 포집하여 사용하였다.

2) 세포독성 측정

암세포의 세포독성 측정은 MTT검정법<sup>27,28)</sup>으로 96 well plate에 A549, MDA-MB-231, SNU-C4를  $2 \times 10^4$  cells/ml로 분주시켜 48시간 동안 배양한 후 시료의 농도를 25, 50, 100, 150  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24시간동안 배양시켜 상등액을 제거하고 tetrazolium bromide salt 0.2  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 후 3시간동안 배양시켰다. 생성된 formazan 결정을 dimethylsulfoxide에 용해시켜 ELISA reader을 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과 분석은 실험군의 평균 OD 540 nm값을 구하여 대조군 (100 % 생존군)의 평균 OD 540 nm값에 대한 백분율로 환산하였다.

5. NIH 3T3 섬유모세포의  
해독 경감효과

1) 세포배양

조제한 시료는 즉시 4 °C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에탄올로 동량희석하였다. 각 1 : 1 (mg/ml)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution하여  $10^{-2} \sim 10^{-5}$  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  $\mu\text{g/ml}$ )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  $5 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

2) MTT정량분석법

Mosmann의 방법에 따라 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 조절하여, 1 ml씩 24 well plate에 분주하고, 24시간 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 물추출물의  $10^{-2} \sim 10^{-5}$  mg/ml 농도를 배양액에 넣어, 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후, 분석당일 조제한 MTT (Sigma) 50  $\mu\text{g/ml}$ 가 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.<sup>27,28)</sup>

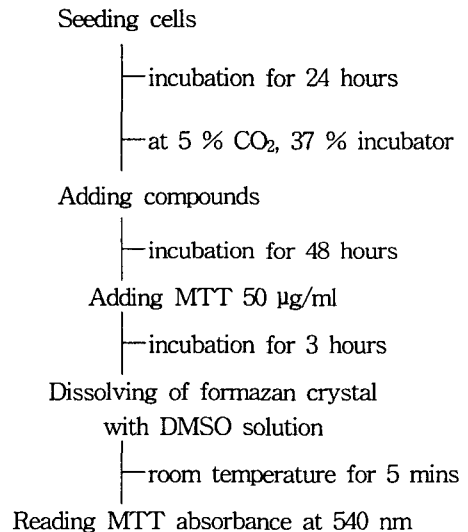


Fig. 1. Flow scheme of MTT assay

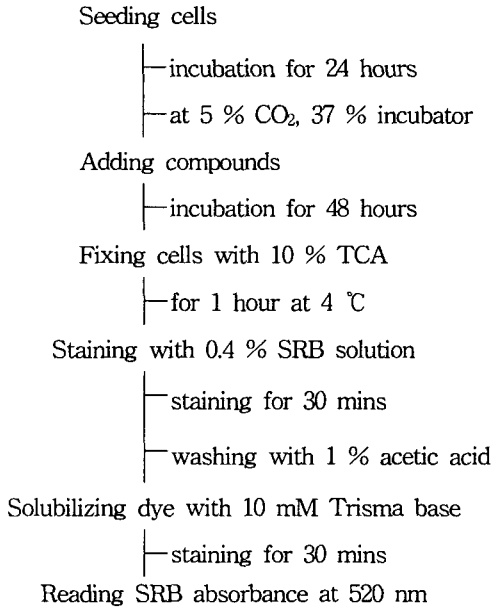


Fig. 2. Flow scheme of SRB assay

### 3) SRB정량 분석법

세포를  $5 \times 10^4$  cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고, 24시간 배양하였다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의  $SRB_{50}$  농도를 결정하였다. MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군,  $SRB_{50}$ 군 및 실험군으로 하여 삼백초 물추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4 % sulforhodamine B를 200  $\mu$ l씩 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  $SRB_{50}$ 군과 비교하였다.<sup>27-29)</sup>

### 4) 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, NIH 3T3 fibroblasts는 MTT정량 및 SRB정

량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

## 6. 카드뮴 착물의 분광화학적 성질에 관한 연구

Cadmium과 시료의 complex를 측정하기 위한 pH 용액은 Tris base buffer용액과 HCl을 이용하여 pH 7.4 용액을 조제하였고,  $CdCl_2$  용액을  $1.0 \times 10^{-3}$  M  $CdCl_2$  용액으로 조제하여 Table 5와 같이 희석하여 사용하였다. Quercetin 3.383 mg으로  $1.0 \times 10^{-4}$  M quercetin 농도가 되도록 Tris buffer pH 7.4 용액으로 조제하여 사용하였다.<sup>30,31)</sup>

## 7. 통계처리

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

Table 1. Preparation of cadmium solution

$1.0 \times 10^{-3}$ M $CdCl_2$	Tris buffer pH 7.4	Cadmium concentration
0.0 ml	10.0 ml	$1.0 \times 10^{-6}$ M
0.2 ml	9.8 ml	$0.2 \times 10^{-4}$ M
0.4 ml	9.6 ml	$0.4 \times 10^{-4}$ M
0.6 ml	9.4 ml	$0.6 \times 10^{-4}$ M
0.8 ml	9.2 ml	$0.8 \times 10^{-4}$ M
1.0 ml	9.0 ml	$1.0 \times 10^{-4}$ M
1.2 ml	8.8 ml	$1.2 \times 10^{-4}$ M
1.4 ml	8.6 ml	$1.4 \times 10^{-4}$ M
1.6 ml	8.4 ml	$1.6 \times 10^{-4}$ M
1.8 ml	8.2 ml	$1.8 \times 10^{-4}$ M
2.0 ml	8.0 ml	$2.0 \times 10^{-4}$ M

### III. 결 과

삼백초 메탄올 추출물과 물 추출물에 대한 A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer) cell에 대한 *in vitro* 세포 생존율을 MTT 정량분석법을 이용하여 측정하였으며, NIH3T3 섬유모세포를 이용하여 카드뮴에 대한 독성완화 효과를 측정하였으며, Tris base buffer 용액을 이용하여 삼백초의 주요성분이 quercetin과 cadmium 간의 착물형성을 UV-spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

#### 1. 암세포에 대한 세포독성

##### 1) A549 cell의 세포독성

폐암세포인 A549 cell에서 삼백초 메탄올 추출물과 물 추출물의 농도가 증가하여도 세포 독성은 나타나지 않았으며, 메탄올 추출물의 처리농도 50  $\mu\text{g/ml}$  ( $106.98 \pm 0.73$ )와 물 추출물의 처리농도 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $108.2 \pm 2.33$ )에서  $p < 0.05$ 와 물 추출물의 처리농도 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $109.36 \pm 0.95$ ), 150  $\mu\text{g/ml}$  ( $109.01 \pm 1.72$ )에서  $p < 0.01$ 의 통계적인 유의성이 나타났다. (Fig. 3)<sup>32-35</sup>

##### 2) MDA-MB-231 cell의 세포독성

유방암 세포인 MDA-MB-231 cell에서 삼백초 메탄올 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하는 경향을 보였으며, 처리농도가 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서  $93.93 \pm 2.81 \%$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ ,  $88.16 \pm 0.29 \%$ , 100  $\mu\text{g/ml}$   $75.11 \pm 2.5 \%$  ( $p < 0.05$ ), 150  $\mu\text{g/ml}$   $63.61 \pm 5.59 \%$  ( $p < 0.01$ )와 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서  $53.16 \pm 4.0 \%$  ( $p < 0.05$ )의 세포독성이 나타났다.

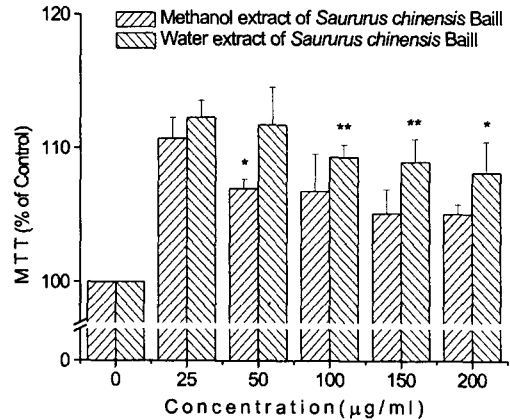


Fig 3. Effect of *Saururus chinensis* Baill. extracts on the viability of A549 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of medicinal plants extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

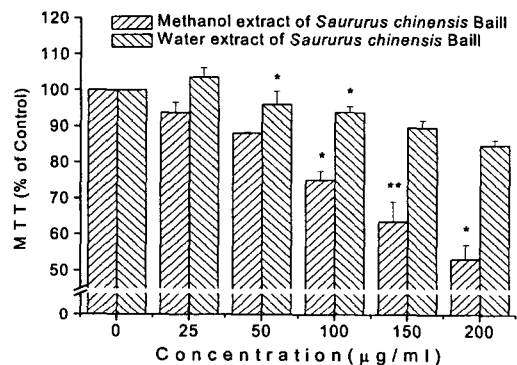


Fig 4. Effect of *Saururus chinensis* Baill. extracts on the viability of MDA-MB-231 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of medicinal plants extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

물 추출물은 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였으며, 처리농도가 고농도인 200 µg/ml에서 84.8 ± 1.44 %의 세포독성이 나타났으며, 물 추출물의 처리농도가 50 µg/ml (96.11 ± 3.64)와 100 µg/ml (93.93 ± 1.5)에서 p < 0.05의 통계적 유의성이 나타났다.(Fig. 4)<sup>34-38)</sup>

### 3) SNU-C4 cell의 세포독성

결장암세포인 SNU-C4 cell에서 삼백초 메탄올 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였으나 처리농도가 25 µg/ml (102.67±2.22 %)는 세포가 더 증식되었지만, 처리농도가 50 µg/ml에서 81.48 ± 3.01 %, 100µg/ml 42.98 ± 8.01 % (p < 0.01), 150 µg/ml 12.48 ± 4.29 % (p < 0.01), 200 µg/ml 3.65 ± 0.41 (p < 0.05)로 세포독성이 우수하게 나타났으며 물 추출물보다 높은 세포독성이 나타났다.

삼백초 물 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였으며, 처리농도가 150 µg/ml에서 81.89±2.35 %와 200 µg/ml에서 77.01±3.32 %로 비슷한 세포독성이 나타났으며, 물 추출물의 처리농도가 100 µg/ml에서 p < 0.01, 200 µg/ml에서 p < 0.05로 통계적 유의성이 나타났다.(Fig. 5)<sup>37-42)</sup>

## 2. NIH 3T3 섬유모세포의 해독 경감효과

### 1) MTT 정량분석법

NIH 3T3 섬유모세포를 여러농도의 카드뮴으로 처리한 후, MTT 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100 %로 하여 마이크로몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정된 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 µM이었

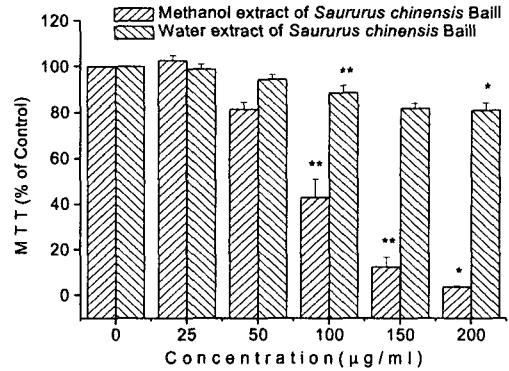


Fig 5. Effect of *Saururus chinensis* Baill. extracts on the viability of SNU-C4 cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of medicinal plants extracts for 48 hrs. The viability of the cells were measured by MTT assay. Result were expressed as % control and data were mean ± S.D. of at least five different experiments. Significantly different from the control value :

\*p<0.05, \*\*p<0.01.

다. MTT 정량분석법을 이용하여 MTT 농도를 측정된 결과, 삼백초 메탄올 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 독성완화 효과를 나타냈다. 삼백초 물 추출물의 경우 10<sup>-2</sup> mg/ml~10<sup>-3</sup> mg/ml농도에서 82.59 %~74.06 % 범위의 통계적으로 유의성 (p < 0.01) 있는 카드뮴 독성완화 효과를 나타났으며, 일반적으로 삼백초 추출물의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 증가하였으며, 카드뮴 독성완화 효과가 증가하였다. 삼백초 물 추출물이 메탄올 추출물보다 카드뮴 독성완화 효과가 약간 증가하여, 물 추출물의 10<sup>-2</sup> mg/ml농도에서 카드뮴 독성완화 효과가 높게 나타났다.(Fig. 6)<sup>25,27,26,33)</sup>

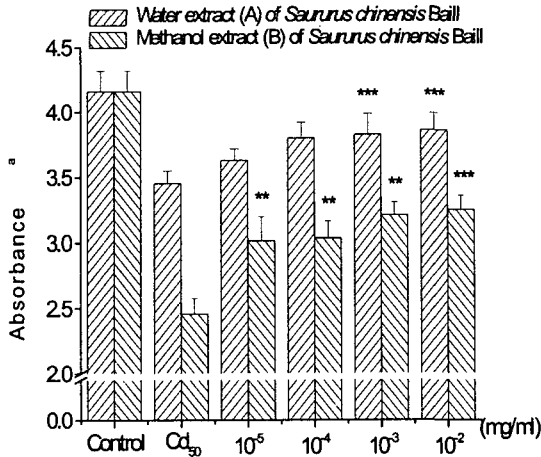


Fig. 6. The MTT absorbance of water extract (A) and methanol extract (B) of *Saururus Chinensis* Bail. on 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT50). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. aThe values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value ; \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

## 2) SRB 정량분석법

핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein 량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여, SRB농도를 측정한 결과 MTT 농도에서와 같이, 삼백초 메탄올 추출물의 10<sup>-2</sup> mg/ml ~ 10<sup>-5</sup> mg/ml농도에서 통계적으로 유의성 (p < 0.05) 있는 카드뮴 독성완화 효과를 나타냈다. 삼백초 물 추출물의 경우에는 10<sup>-2</sup> mg/ml ~ 10<sup>-5</sup> mg/ml농도에서 유의성 (p<0.01)이 나타났으며, 모든 농도에서 메탄올 추출물이 카드뮴 독성완화 효과가 높게 나타났다. 비색분석법에 의한 삼백초 메탄올 추출물과 물 추출물의 카드뮴 독성완화 효과는 추출물의 농도증가에 따라, 흡광도의 증가와 함께 방어효과도 증가하였으며, 흡광도의 변화는 MTT정량분석법보다 SRB정량분석법이 민감

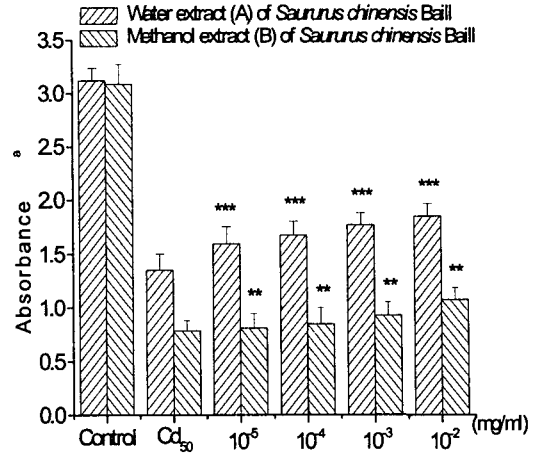


Fig. 7. The SRB absorbance of water extract (A) and methanol extract (B) of *Saururus Chinensis* Bail. on 3T3 fibroblasts treated with cadmium (SRB50). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. aThe values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value ; \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001.

하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다.(Fig 7)<sup>25-27,33)</sup>

## 3) 세포의 광학현미경적 관찰

세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, NIH 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있었고 (Fig. 8), IC<sub>50</sub> (MTT<sub>50</sub>)의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 9). IC<sub>50</sub>농도의 카드뮴과 삼백초 메탄올 추출물 10<sup>-2</sup> mg/ml를 처리한 군에서는 IC<sub>50</sub>군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다 (Fig. 10). 본 실험결과에 의하면, 삼백초 메탄올 추출물이 독성경감효과가 있는 것으로 인정된다.<sup>41-44)</sup>



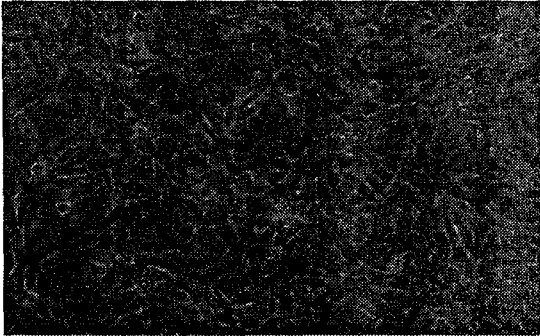


Fig. 8. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days x 200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape.

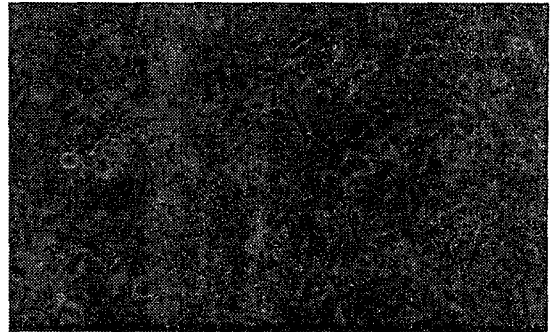


Fig. 10. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing  $Cd_{50}$  concentration plus  $10^{-2}$  mg/ml quercetin for 2 days x 200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased.

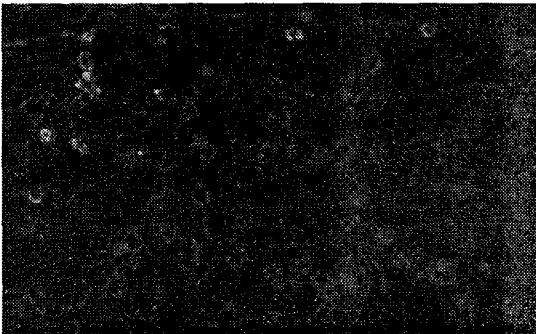


Fig. 9. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the  $Cd_{50}$  concentration for 2 days x 200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased.

Table 2. Mole ratio methods of quercetin and cadmium concentrations

Sample	Cadmium Concentration	Mole ratio
50 $\mu$ M	0 $\mu$ M	0
50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	0.2
50 $\mu$ M	20 $\mu$ M	0.4
50 $\mu$ M	30 $\mu$ M	0.6
50 $\mu$ M	40 $\mu$ M	0.8
50 $\mu$ M	50 $\mu$ M	1.0
50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	1.5
50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	2.0

### 3. Quercetin과 Cadmium complex

삼백초의 주 성분인 quercetin을 이용하여 cadmium과의 complex관계를 알아보려고 quercetin과 cadmium간의 스펙트라 측정은 pH 농도와 온도를 일정하게 유지시켜 190~700 nm 범위에서 측정하였으며, 흡수분광학적 방법에 의한 복합체의 결합비의 결정은 몰비법을 사용하였다.<sup>42-46)</sup> 즉,  $[M] / [L]$  을 바꾸면서 착물의 최대흡수 파장에서 흡광도를 측

정하여 흡광도 변화와 반응물의 몰비를 도출하였다.<sup>45)</sup>

Mole ratio에 따른 희석은 quercetin을 고정시키고 cadmium의 농도를 변화시켜서 complex를 측정하였다.

흡광도가 303 nm와 388 nm에서 isosbestic point가 나타났으며, 303 nm 이후에서 mole ratio가 증가함에 따라 흡광도는 감소하였으며, 388 nm 이후에서는 mole ratio가 증가함에 따라 흡광도도 증가하였으며, hyperchromic effect가 나타났고, 271 nm 이후에서는 hypochromic effect로 나타났다. 흡수 spectrum은  $\lambda_1=374$  nm

와  $\lambda_2=257$  nm에서 흡수대가 나타났으며, 이들 반응과정에서 나타난 두 isosbestic point는 중간단계의 활성화 착물로 생각된다. 271 nm에서 나타난 새로운 흡수 스펙트럼은 cadmium과 quercetin이 1:1로 complex 되는 것을 알 수 있었으며, 착물의 흡광도와 몰흡광계수를 이용하여 quercetin과 cadmium이 1:1로 complex될 때의 농도가 60.1  $\mu$ M임을 알 수 있었다 (Fig. 11, Table. 3).

Quercetin에 cadmium을 농도별로 첨가하면

spectra가 변화하였고 spectra의 변화는 cadmium과 quercetin간의 안정한 착물 형성에 의한 것으로 생각된다 (Fig. 12). Quercetin과 cadmium의 흡광도를 mole ratio method에 도 시하면 mole ratio가 1.0이 되면 흡광도의 변화가 최대가 되고, mole ratio가 높거나 낮으면 흡광도가 hypochromic effect 현상을 보였으며, mole ratio가 1.0에서 가장 안정된 분자구조의 착물을 형성하는 것으로 생각된다 (Fig.13).<sup>44-50)</sup>

Table 3. Spectral parameters of quercetin and its cadmium complex in aqueous of tris buffer solution at pH 7.4

Mole ratio	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0
A	0.79392	0.82293	0.84986	0.88180	0.91769	0.95028	0.94593	0.93400
$\lambda$ (nm)	374	374	374	374	374	374	374	374
C ( $\mu$ M)		52.08	53.79	55.81	58.08	60.10	59.87	59.11

A : Absorbance                       $\lambda$  : wavelength                      C : micro molar concentration  
 R = [Cd] / [Quercetin] ; 0.0(A), 0.2(B), 0.4(C), 0.6(D), 0.8(E), 1.0(F), 1.5(G), 2.0(H).

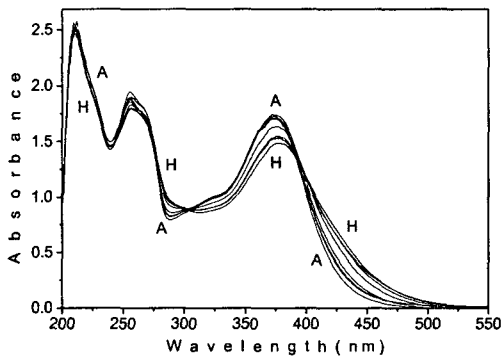


Fig. 11. Absorption spectra of quercetin (50  $\mu$ M) at tris buffer pH 7.4 in the presence of various concentrations of cadmium. R= [cadmium] / [quercetin] ; R= 0.0 (A), 0.2 (B), 0.4 (C), 0.6 (D), 0.8 (E), 1.0 (F), 1.5 (G) and 2.0 (H).

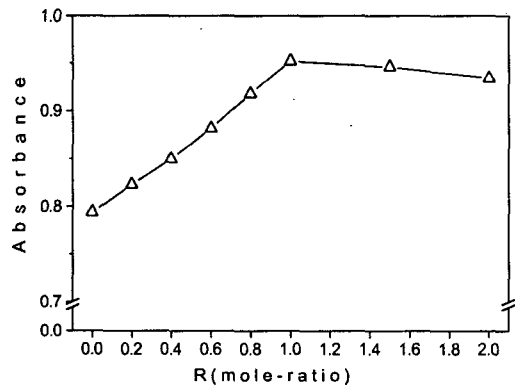


Fig. 12. Mole-ratio plots at various pH for 1 : 1 complex of cadmium and quercetin.

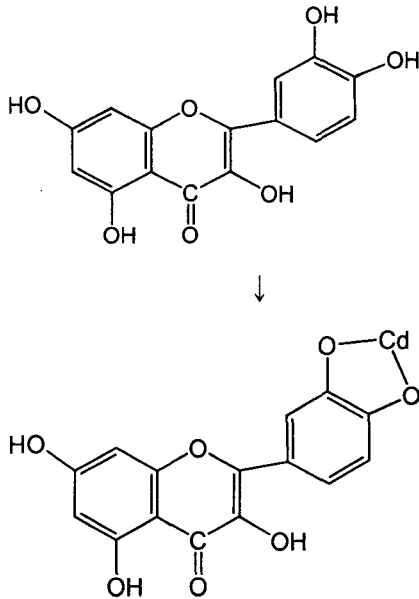


Fig. 13. The structures of quercetin and 1 : 1 complex of cadmium and quercetin.

#### IV. 고 찰

삼백초는 삼백초과에 속한 다년생 초본인 삼백초의 대근전초로서 《新修本草》<sup>2)</sup>에 처음으로 기재되었고, 水木通, 水牛草, 白花蓮, 白水鷄, 白面枯, 田三白, 三點白, 五路白, 五葉白, 九節藕, 天性草, 過塘蓮 등의 이명이 있다. 삼백초의 명칭은 잎, 꽃 및 뿌리가 백색이기 때문에 또는 윗부분에 달린 2~3개의 잎이 회색이기 때문에 삼백초라 하였다.<sup>2-3,11-13)</sup>

성미는 고신한, 무독하여 청열해독, 이뇨소종 등의 효능이 있어서 황달, 옹종, 소변부리, 임력삼통, 대하, 요로감염, 요로결석, 신염수종, 각기, 간염, 사교상, 외치로는 창양종독, 습진에

사용한다고 되어 있다.<sup>2-3,10-15)</sup>

성분으로는 대근전초에 정유가 함유되어 있으며, 그 주성분은 methyl-n-nonyl-ketone이다. 또 줄기에는 가수분해성 tannin 1.72%가 함유되어있고, 잎에는 quercetin, quercitrin, isoquercitrin, avicularin, hyperin, rutin 및 가수분해성 tannin 0.544%가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.<sup>11-15)</sup>

삼백초에 대한 약리학적인 연구보고로는 이뇨, 진해소염, 혈당하강, 혈소판응집억제 작용, 황색포도상구균, 장티푸스균의 성장억제작용이 보고되고 있다.<sup>4-8)</sup> 현재 임상에서는 간염, 간암, 신장암, 방광암, 전립선암, 자궁하수 등에 응용하고 있다.<sup>11-15)</sup>

현재 임상에서 사용되는 암 치료에 대한 화학요법제로 alkyl제, 대사길항물질, 항생물질 등이 있으나 부작용이 많고, 생체 내에 중요한 lymph세포, 골수세포 등을 파괴시키게 되어 체내에 암세포 뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 주어 인체의 면역계 등을 약화시켜 다른 감염증을 일으키기도 한다. 대부분의 항암제는 세포독성을 이용하여 암세포의 사멸과 증식억제를 이용하는 것으로 정상세포와 면역계 세포에도 독성을 발현하는 문제점을 나타내고 있다.<sup>22-26)</sup>

암세포에 손상을 주는 세포독성은 비특이적 방어기전을 갖고 있으며, 생체내 대식세포와 림프구와 같은 표적세포에 세포독성을 유발하여 세포를 자극하여 세포독성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이론적으로 화학요법은 빠른 속도로 증식하는 암세포를 죽이는 것이다. 생물학적 요법에는 백신, 항체, 사이토카인 등으로 암세포에 대한 환자의 면역 반응을 높여 주는 면역요법과 유전자의 결핍이나 돌연변이에 의해 암이 발생한 환자에게 유전 물질을 투여해 잘못된 유전자를 바로 잡아 주는 유전자 치료, 발암 유전자에 선택적으로 결합할 수 있는 짧은 핵산 조각을 이용해 발암 유

전자의 작용을 억제하는 안티센스 항암제, 암 세포에 영양을 공급하는 혈관 생성을 차단함으로써 암세포를 제거하는 신생혈관형성(angiogenesis) 억제제를 들 수 있다.<sup>25-28)</sup> Apoptosis는 신경계와 면역계 세포의 생성과 분화, 기능발현 등에 중요하게 작용하며, apoptosis의 기전에 장애가 발생하면 암의 발생이나 항암치료에 대한 내성발현, 자가면역발현, 퇴행성질환 및 HIV가 초래된다. 임상에서 사용되는 항암제들은 다양한 세포주에서 apoptosis를 유도하고 있다고 밝혀졌고, 작용기전은 발현초기유전자의 발현, apoptosis 관련 단백질 분해 효소인 caspase, DNA fragmentation을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이는 황색포도상구균, 장티푸스균의 성장 억제, 항돌연변이성 효과가 있는 것으로 보고하였고,<sup>16)</sup> 박 등은 인체 유래 암세포 (A549, AGS, HCT 15, SKOV3, HEP3B)등에 세포독성효과가 있었다.<sup>19, 25-28)</sup>

A549 (lung cancer) cell에서 어성초 메탄올 추출물의 처리농도가 200 µg/ml 88.76 %의 세포독성이 나타난 결과는 이 등의<sup>42)</sup> 엉퀴귀 에탄올 추출물이 A549 cell에 대한 세포독성 실험의 70.75 %의 억제효과가 있는 것으로 보고된 연구결과보다 세포독성의 결과는 낮게 나타났다지만 유방암 세포인 MDA-MB-231 cell에서 삼백초 에탄올 추출물의 150 µg/ml 63.61 %와 200 µg/ml에서 53.16 %로 세포독성이 본 실험의 삼백초 에탄올 추출물이 세포독성이 높게 나타났다. 결장암세포인 SNU-C4 (colon cancer) cell에서 삼백초 메탄올 추출물의 처리농도가 100 µg/ml 42.98 %, 150 µg/ml 12.48 %, 200 µg/ml 3.65 %의 세포독성으로 기존에 보고된 세포독성보다 우수한 결과로 나타났다. 삼백초 메탄올 추출물의 처리농도가 200 µg/ml에서 28.48%와 400 µg/ml 22.78%로 항산화 활성이 나타난 결과는 식물체내의 페놀화합물의 hydroxy group은 free radical에게 수

소원자나 전자를 공여하는 강력한 환원력을 가지고 있고, 화합물이 세포의 산화적 손상을 보호하여 심장질환이나 암 등의 질병의 진행을 막는 것으로 알려져 있다.<sup>44-55)</sup>

씀바귀 뿌리 추출물이 폐암세포인 A549 세포에서 항암활성이 나타났다고 보고하였으며, 식이 phenol이 항산화를 통해 암 예방에 영향을 미친다고 하였고, 녹차 잎에 함유된 catechin이 간암세포에 대하여 항암활성을 갖는다고 보고되었다.<sup>43,45)</sup> 어성초를 물과 유기용매로 추출한 추출물이 마우스의 백혈병 세포인 L1210세포, P388D1, Vero세포에 대하여 세포독성 효과와 항균, 항진균 효과가 있는 것으로 보고되었으며, 어성초 추출물이 카드뮴에 대한 독성완화 효과가 있는 것으로 보고되었다.<sup>46-48)</sup> 이와 같이 천연물은 전통적으로 민간약이나 질병의 예방에 사용되어 왔으며, 인체에 부작용이 적고 강력한 항암작용을 나타내는 천연물에서 항암 활성성분에 대한 연구가 진행되고 있다.

삼백초 메탄올 추출물과 물 추출물에 대한 A549 (lung cancer) cell에서 세포독성은 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였지만 물 추출물은 세포독성이 나타나지 않고 세포의 증식이 나타났다. MDA-MB-231 (breast cancer) cell에서는 처리농도가 증가함에 따라 세포독성도 증가하였으며, 메탄올 추출물의 투여농도가 200 µg/ml에서 53.16 %의 세포독성이 나타난 것은 이 등의 연구결과로 비슷한 세포독성의 결과가 나타났다. SNU-C4 (colon cancer) cell에서는 메탄올 추출물의 처리농도가 고농도인 200 µg/ml에서 3.65 %로 가장 높은 세포독성이 나타났다. 이 결과는 삼백초 메탄올 추출물에 함유되어 있는 프라본 계열의 quercetin, quercitrin 등의 영향으로 인하여 세포독성이 우수하게 나타난 것으로 생각된다.<sup>42-52)</sup>

산업의 발전에 따른 대기의 오염, 공장폐수,

생활폐수 등으로 인한 수질의 오염, 과도한 농약살포 등으로 인한 토양 오염으로 인하여 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속으로 인한 식수, 식품, 공기의 오염이 심각한 환경문제로 대두되고 있다. 카드뮴은 용융점 321°C, 끓는점 765°C인 부드럽고, 은백색이고, 연성이 있는 금속으로 용해도는 카드뮴 화합물에 따라서 상당히 변이가 있다. 지각중의 카드뮴 농도는 평균 0.15 ppm 정도이지만, 토양중에는 암석의 풍화에 의해서 생성된 카드뮴이 토양 입자에 흡착되기 쉽기 때문에 0.5 ppm 정도이다.<sup>32-37)</sup> 세계의 카드뮴 생산량은 1910년부터 매년 증가하고 있으며, 안료, 염 비스머스 안정제, 도금에 전체의 70%가 원료로 사용되고 있는데 이러한 용도는 모두 회수 불가능하여 환경오염의 원인이 된다. 이와 같이 일반 환경중의 카드뮴 농도는 상당히 낮지만 어떤 종의 식품은 상당히 고농도의 카드뮴을 함유하고 있으며 그것을 사람이 먹음으로써 체내 카드뮴량의 증가를 볼 수 있다. 이것은 주로 먹이사슬을 통한 생물학적 농축이 있기 때문이다. 대기로부터 카드뮴의 1일 섭취량은 대기중 카드뮴 농도 0.02 µg/m<sup>3</sup>, 성인 1일 흡기량 15 m<sup>3</sup>으로 계산하여도 0.3 µg이 된다.<sup>33-36)</sup> 카드뮴은 자연에서 광범위하게 분포되어 있다. 대부분의 식품에서 카드뮴의 함량은 약 0.005~0.1 mg/kg이다. 굴, 소의 신장에도 0.1~0.5 mg/kg을 함유하고 있다. 카드뮴의 생물학적 추정 반감기는 10~30년이다. 카드뮴이 체내에 유입되면 적혈구와 결합하여 혈중내로 이행되어지는데 혈장내에 선 고분자 단백질질 특히 알부민과 결합되고 일부는 thionein과 결합하여 metallothionein을 형성하므로 각 장기에 이행되어지고, 체내에 유입된 카드뮴은 체내 총량 중 약 50%는 주로 간장과 신장에 축적되나 상당히 높은 양이 간장과 신장에 축적되어도 뚜렷한 독성효과가 나타나지 않는 것은 metallothionein 형성에 기인한다고 알려지고 있다. 즉 다시 말하면

metallothionein에 포함되지 않은 카드뮴이 체내에 전달되어지면 독성증상이 발현되는 것으로 보고 되었다. 생체내에 유해성 중금속이 유입되면 자체 해독기전으로 배설이 용이한 metallothionein을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 생체 중 간장, 신장, 비장, 조직 등에 주로 존재하며 시스테인을 다량 함유하고 있는 저분자량의 수용성 단백질로 sulfhydryl group이 Cd, Zn, Hg, Cu 등과 같은 중금속들을 포함하여 간장과 신장 등을 보호하는 것으로 보고되고 있다.<sup>39-55)</sup> 일반적으로 사람은 연령이 증가함에 따라 점차적으로 체내에 축적되어 60년 정도를 사는 동안 약 20~30 mg의 카드뮴이 인체내에 축적되고, 체내 총 카드뮴 축적량의 50~80%가 간장과 신장에 존재하며, 신생아나 성장기 어린이의 경우, 성인보다 카드뮴 흡수 및 보유능력이 높아 카드뮴 중독에 더욱 예민한 것으로 나타나 있다. 그러나 카드뮴의 체내 축적량이나 독성을 초기에 판단할 수 있는 방법이 아직 없어 카드뮴 중독을 초기에 발견하기 어렵기 때문에, 환경오염이 심화되고 있는 현대사회에서 카드뮴의 오염방지와 중독 예방에 관한 문제는 매우 중요한 실정이다.<sup>38-53)</sup>

중금속의 독성완화와 해독에 대한 연구는 동물실험결과 중금속에 대한 metallothionein의 해독작용의 기전을 보면, 체내로 중금속이 흡수될 경우 주로 간장 및 신장조직에서 metallothionein 합성이 증가되며, metallothionein은 조직내에서 독성이 강한 유리 중금속과 결합하여 무독화 형태로 전환시키고 간장조직에서 신장조직으로 운반을 시키거나 뇨를 통한 배설을 돕는 등 유독성 중금속 이온들의 체내대사에 관여한다고 한다.<sup>29-34)</sup> 일단 생합성된 metallo-thionein는 일정한 시효를 거친 후에 효소에 의해 분해되고, 이때 결합하고 있던 중금속 이온은 유리 중금속 이온으로 유리되어 조직 내에서 다시 metallothionein 재합성을 유

도하는 것으로 보고되고 있다. 또한 장기간 카드뮴에 노출될 경우, 신장조직에서 카드뮴과 metallothionein의 농도가 증가되고 카드뮴 및 metallothionein으로 부터 독성이 강한 유리 카드뮴 이온의 방출이 증가되어 세포내 여러 효소의 작용을 방해하고 증가되어 이들 자체가 고분자량의 단백질과 결합하여 세포막을 손상시키는 등 카드뮴 중독의 현상 특히 신장기능의 장애를 유발한다고 한다. Metallothionein의 생리학적 기전에 관해서는 아직까지 확실하게 정립되어 있지 않았고 그 주장이 분분하다. Metallothionein이 인체에 유해한 중금속을 포함하여 조직의 재분배에 관여한다고 주장하는 견해도 있고, 중금속을 수용성으로 전환시켜 배설함으로써 해독작용에 관여한다는 견해도 있다. 일반적으로 사람이 출생할 때에는 인체내에 카드뮴이 존재하지 않지만, 연령이 증가함에 따라 점차적으로 체내에 축적되어 60년 정도를 사는 동안 약 20~30 mg의 카드뮴이 인체내에 축적되고, 체내 총 카드뮴 축적량의 50~80%가 간장과 신장에 존재한다. 신생아나 성장기 어린이의 경우, 성인보다 카드뮴 흡수 및 보유능력이 높아 카드뮴 중독에 더욱 예민한 것으로 나타나있다. 그러나 카드뮴의 체내 축적량이나 독성을 초기에 판단할 수 있는 방법이 아직 없어 카드뮴 중독을 초기에 발견하기 어렵기 때문에, 환경오염이 심화되고 있는 현대사회에서 카드뮴의 오염방지와 중독 예방에 관한 문제는 매우 중요한 실정이다.<sup>29,31,33-41)</sup>

카드뮴 중독은 간장과 신장에서의 metallothionein 농도를 증가시키고, 투여기간과 투여용량이 증가함에 따라 조직내 metallothionein 농도가 증가한다고 하였다.<sup>51-55)</sup> 카드뮴과 삼백초 추출물과의 독성완화 효과를 평가하고자 NIH 3T3 섬유모세포로 MTT 및 SRB법을 이용하여 실시하였다. 연구결과를 삼백초 물 추출물과 메탄올 추출물의 처리농도가 증가함에

따라 NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성에 대한 재생효과가 증가하였으며,  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서 삼백초 메탄올 추출물은 87.03 %, 삼백초 물 추출물의 경우 82.59 %로 나타났다. 삼백초 추출물의 NIH 3T3 섬유모세포에서 카드뮴 독성에 대한 재생효과가 나타난 것으로 생각된다.

삼백초의 주 성분인 quercetin에 카드뮴을 농도별로 첨가하면 spectra가 변하는 것을 알 수 있었고, 이러한 변화는 카드뮴과 quercetin 간의 안정된 착물 형성에 의한 것으로 생각되며, mole ratio가 1.0에서 분자구조적 안정된 착물을 형성하였으며, 카드뮴 이온과 quercetin의 B환에 위치한 두 개의 hydroxyl기 두 자리 리간드 (bidentate ligand)와 안정된 카드뮴 착화합물을 형성한 것으로 생각된다. 이결과는 이 등<sup>42,43)</sup>의 연구결과와 유사한 경향을 보였다.

이상을 종합한 결과 삼백초 메탄올 추출물에서 SNU-C4 cell에서 세포독성이 우수하여 삼백초에 항암효과를 갖는 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 판단되며, 카드뮴 독성에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있으며, 삼백초의 주요성분인 quercetin은 Trin buffer pH 7.4 용액에서 60.1  $\mu$ M 농도에서 1:1 complex되는 것으로 나타났다.

## V. 결론

삼백초를 메탄올과 물로 추출하여 A549 (lung cancer), MDA-MB-231 (breast cancer), SNU-C4 (colon cancer) cell을 이용하여 세포독성을 측정하고 흰쥐에게 경구 투여하여 카드뮴 독성완화 효과를 측정한 결과는 다음과 같다.

- 1) 삼백초 메탄올 추출물 및 물 추출물 모두 처리농도가 증가할수록 세포독성도 증가하였다.

- 2) A549 cell에서 세포독성은 삼백초 메탄올 추출물과 물 추출물의 농도가 증가하여도 세포독성은 유의성 있게 증가하지 않았다.
- 3) MDA-MB-231 cell에서 삼백초 메탄올 추출물 200 µg/ml에서 53.16 %의 세포독성이 나타났다.
- 4) SNU-C4 cell에서 삼백초 메탄올 추출물에서 처리농도가 150 µg/ml에서 12.48 %와 200 µg/ml에서 3.65 %로 가장 우수한 세포독성이 나타났다.
- 5) 삼백초 물 추출물이 MTT 농도 및 SRB 농도에서 통계적으로 유의성 있는 독성완화 효과를 나타냈으나, 농도에 따른 흡광도의 변화는 SRB 정량분석법이 MTT 정량분석법보다 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 광학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.
- 6) 삼백초의 주요성분인 quercetin을 UV-spectrophotometer를 이용하여 Trin buffer pH 7.4 용액에서 시료와 카드뮴간의 1 : 1 착물 형성의 농도는 60.1 µM quercetin으로 나타났다.

이상을 종합한 결과 삼백초 메탄올 추출물에서 SNU-C4 cell에서 세포독성이 우수하여 삼백초에 항암효과를 갖는 성분이 많이 함유되어 있는 것으로 판단되며, 카드뮴 독성에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있으며, 삼백초의 주요성분인 quercetin은 Trin buffer pH 7.4 용액에서 60.1 µM 농도에서 1 : 1 complex되는 것으로 나타났다.

## 참고문헌

1. 우원식 (1996) : 天然物化學研究法, 서울대학교출판부, 서울, pp. 2-5.
2. 謝永光 (1877) : 抗癌中草藥, 香港星草圖書公司, 홍콩, p.110.
3. 王裕生 (1983) : 中藥藥理與應用, 人民衛生出版社, 北京, pp. 709-718.
4. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. (1991) : Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27, 897-900.
5. Kyoko, H., Mioko, K. and Toshimitsu, H. (1995) : Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza Virus, and HIV, *Planta Med.* 61, 237-241.
6. Sakaii, E., Shibata, T., Kawamura, T., Hisata, Y., Noro, Y., Yoshida, M. and Tanaka, T. (1996) : Pharmacognostical studies of *Houttuyniae Herba* (2) Growth and flavonoid glycoside contents of *Houttuynia cordata* THUNB. Cultivated under shade condition. *Nat. Med.*, 50(1), 45-48.
7. Mun, Y. J., Nam, Y. J., Lee, K. G., Choi, D. H., Lee, S. W., Ahn, S. H., Choi, M. K. and Woo, W. H. (2002) : The water extract of caesalpinia sappan induces apoptosis on Human lung cancer cell Line, A 549 Cells. *Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol.* 16(3). 521-527.
8. Choi, E. Y., Oh, H. J., Park, N. K., Chun, H. J., Ahn, J. W., Jeon, B. H., Han, D. S., Lee, H. D. and Baek, S. H. (2002) : screening of Cytotoxicity and Antimicrobial effects of extracts from *Atractylodes macrocephala* Koidz. *Kor. J. Orient. Physiol. & Pathol.* 16(2), 348-352.

9. 문관심 (1999) : 약초의 성분과 이용, 일월서각. 서울, pp 344-345.
10. 辛民教 (1986) : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp 336-337.
11. 李昌福 (1985) : 大韓植物圖鑑, 鄉文社, 252.
12. 金在佑 (1984) : 原色天然物事典, 下卷, 南山堂, 서울, 174
13. 小學館 (1978) : 中藥大事典, 上港科學技術出版社, 동경, 507.
14. 商務印書館 (1985) : 常用中草藥手冊, 홍콩, 710.
15. 李時珍 (1987) : 圖解本草綱目, 商文社, 서울, 640.
16. Lee, I. S. : Effect of water extract from *Saururus Chinensis* (Lour.) Baill water extracts on the cancer cells and antioxidative activity in cytotoxicity. Kor., J. Postharvest. Sci. Technol, 8(2) : 213-216, 2001.
17. Kim, B. H. and Song, W. S. : The dyeability and antimicrobial activity of *Saururus chinensis* (I), Korean Home Economics Association, 38(1) : 1-9, 2000.
18. Pontieri, V. and Lynn Sage, T. : Evidence for stigmatic self-incompatibility, pollination induced ovule enlargement and transmitting tissue exudates in the paleoherd, *Saururus cernuus* L. (Saururaceae), Annals of Botany, 84 : 507-519, 1999.
19. Park, J. H., Park, B. G., Kim, M. J., Park, S. G. and Kim, J. H. : Effects of tuber position and number of nodes on growth of *Saururus chinensis* Baill. Korean J. Medicinal Crop Sci, 6(4) : 286-293, 1998.2
20. Lee, S. T., Park, J. M., Lee, H. K., Kim, M. B., Cho, J. S. and Heo, J. S. : Component comparison in different growth stages and organs of *Saururus chinensis* BAILL. Korean J. Medicinal Crop Sci, 8(4) : 312-318, 2000.
21. Park, J. S., Shin, M. K., Shn, H. S., Park, R. K., Kim, M. S and eong, W. H. (2002) : Green tea(-)EGCG induces the apoptotic death og lung cancer cells via activation of c-Jun N-terminal 1 and activating protein-1. *Kor. Nutr. Soc.*, 35(1), 53-59.
22. 이종섭, 김남송, 유일수, 김종수, 이기남, 한두석, 강길웅, 이정호, 백승화 : 천화분 메탄을 추출물이 흰쥐장기내 카드뮴 축적에 미치는 영향( I ). 한국노화학회지, 9 : 28-33, 1999.
23. Goyer, R.A., Miller, C.R. and Zhu, S.Y. : Nonmetallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 101 : 232-244, 1989.
24. Settle, D.M. and Patterson, C.C. : Lead in albocore : Guide to lead pollution. *Americans Science*, 207 : 1167-1176, 1980.
25. Jaruup, L., Elinder, C.G. and Spang, G. : Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria : A dose-response relationship. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 60 : 223-229, 1988.
26. Bonnel, J.A., Ross, J.H. and King, E. : Renal lesions in experimental cadmium poisoning, *Brit. J. Ind. Med.*, 17 : 69-72, 1960.
27. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65 : 55-63, 1983.



28. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. : Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27 : 897-900, 1991.
29. Roles, H.A., Lauwerys, R.R., Bernard, A.M. Buchet, J.P., Vos, A. and Oversteyns, M. : Assessment of the filtration reserve capacity of the kidney in workers exposed to cadmium. *Br. J. Ind. Med.*, 48 : 365-374, 1991.
30. Dean, J. A. (1985) : *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, pp. 90-105.
31. Lee, J. H., Park, N. K., Yang, E. Y., Lee, H. O., Han, D. M. and Baek, S. H. : Studies on the cytotoxicity and antimicrobial effects of the extract of *Houttuynia Cordata* (IV). *Kor. J. Oriental Preventive Medical Society*. 4(1) : 144-151, 2000.
32. Rhee, H. Jin., Kim, S. W., Lee, S. O., Park, Y. M. and Na, D. S. (1999) : Translocation of annexin I to the nucleus by epidermal growth factor in A547 cells. *J. Biochem. Mol. Bio.*, 32(1), 28-31.
33. Choe, W. K., Park, J. H., Kim, S. H., Lee, D. Y., and Lee, Y. C. (1999) : Antitumor effects of green tea catechin on different cancer cells. *Kor. Nutr. Soc.*, 32(7), 838-843.
34. 宋昊竣, 辛民教 (1986) : 魚腥草 抽出物이 肺炎誘發 생쥐의 免疫反應 및 組織變化에 미치는 影響, 大韓本草學會誌, 12(1), 65-87.
35. Kim, G. S. (1997) : Effects of dietary phenol on body tissue oxidative state and cancer prevention. *Korean J. Food & Nutr*, 20(1), 74-81.
36. Lee, C. K., Park, S. W., Chung, H. Y., Young, H. S., Suh, S. S. and Park, K. Y. (1991) : Mechanism of antitumor effect of ursolic acid from *Eriobotrya Japonica*. *J. Kor. Cancer*, 23(2), 206-210.
37. Hwang, S. G., Lee, H. C., Kim, C. K. Chun, H. J., Jeung, S. I. and Jeon, B. H. (2001) : Induction of apoptosis in Jurkat T Lymphocytes by extract of *Ailanthus altissima*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 32(4), 274-279.
38. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdr, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) : Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47, 936-943.
39. Bremer, I. : Cadmium toxicity-nutritional influence and the role of metallothionein world. *Rev. Nutr. Diet.*, 32 : 165, 1978.
40. Onosaka, S., Tanak, K., Doi M. and Okahara, K. : A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues. *Eisei Kagaku*, 24 : 128-133, 1978.
41. Piotrowski, J.K., Trojanowska, B. Wisniewska-Knypl, J.M. and Biolanowska, W. : Mercury binding in the kidney and liver of rat repeatedly exposed to mercuric chloride : Induction of metallothionein by mercury and cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 27 : 11, 1974.
42. Piscator M. : On cadmium in normal human kidney together with a report on the isolation of metallothionein from

- livers of cadmium exposed rabbits. Nord. Hyg. T 45 : 76-82, 1964.
43. Roles, H.A., Lauwerys, R. and Dardenne, A.N. : The critical level of cadmium in human renal cortex : A reevaluation. *Toxicol. Lett.*, 15 : 357-360, 1988.
44. Lee, J. H., Jeong, S. I., You, I. S., Kim, S. K., Lee, K. N., Han, D. S., and Baek, S. H. : The inhibitory effects of the methanol extracts of *Houttuynia cordata* THUNB against cadmium induced cytotoxicity (V). *Kor. J. Pharmacogn.*, 32(1) : 61-67, 2000.
45. Lee, J. H., Lee, K. N., Lee, C. W., Chun, H. J., You, I. S. Lim, J. A. and Baek, S. H. : The inhibitory effects of quercitrin from *Houttuynia cordata* against cadmium induced cytotoxicity (VII). *J. Korean Chemical Society.* 47(2) : 175-178, 2003.
46. Perego, P., Weghe, J. V., David, W. D. and Howell, S. B. (1997) : Role of determinants of cadmium sensitivity in the tolerance of *Schizosaccharomyces pombe* to cisplatin, *Pharmacology*, 52(12), 12-18.
47. 백승화, 유일수, 이종섭, 한두석 : 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제2보) 흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 금은화 추출물의 영향. *한국독성학회지*, 1995, 11, 223-227.
48. Dean, J. A. (1985) : *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, pp. 5.90-5.105.
49. Oxtoby. D. W. and Freeman, W. A. (1998) : *Chemistry science of change* -third edition, Saunders golden sunburst series, pp. 317-319
50. Skoog, D. A., West, D. M. and Holler, F. J. (1992) : *Fundamentals of analytical chemistry*, 6th. ed, Saunders College Publishing, pp. 22-45.
51. Goyer, R. A., Miller, C. R. and Zhu, S. Y. (1989) : Nonmetallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 101, 232-244.
52. Keepers, Y. P., Pozao, P. E., Peters, G. T., Otte, J. A., Winograd, B. and Pinedo, H. M. (1991) : Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27, 897-900.
53. Nogawa, K., Honda, R. and Kido, T. (1989) : A dose-response analysis of cadmium in the general environment with special reference to total cadmium intake limit. *Environ. Res*, 48, 7-16.
54. Zhong, X. N., Otsuka, H., Ida, T., Hirata, O.E., Takushi, A. and Takeda, Y. (1997) : Three flavonol glycosides from leaves of myrsine. *Phytochemistry*, 46(5), 943-946.
55. Bodini, M. E., Copia, G., Tapia, R., Leighton, F. and Herrera, L. (1999) : Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron*, 18, 2233-2239