

벤조산 유도체의 Chromium Trioxide 독성에 대한 세포 재생효과

한두석 · 최병남 · 이재숙* · 최화정** · 백승화***#

원광대학교 치과대학 구강해부학교실, *광주여자대학교 미용과학과,
생명공학연구원 천연의학연구부, *원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과
(Received June 18, 2008; Revised August 25, 2008)

The Cell Regenerative Effect of Benzoic Acid Derivatives Against Chromium Trioxide-Induced Cytotoxicity

Du Seok Han, Byung Nam Choi, Jae Sug Lee*, Hwa Jung Choi** and Seung Hwa Baek***#

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

*Department of Beauty Science, Kwangju Women's University, Kwangju 506-713, Korea

**Natural Medicine Research Centre, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea

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

Abstract — In order to evaluate the cytotoxicity of chromium trioxide, and the cell regenerative effect of phenolic acid against chromium trioxide-induced cytotoxicity, cell viability, cell adhesion activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and morphological changes of cells were performed in these cultures. The toxicity of chromium trioxide (IC₅₀, 44.0 μM) was high according to the toxic criteria. Cell regeneration of benzoic acid derivatives against IC₅₀ value of chromium trioxide in cell morphology was increased in concentration-dependent manner. These results suggest that benzoic acid derivatives may be used as a cell regenerative agent against chromium-mediated cytotoxicity.

Keywords □ inhibitory effect, nickel-mediated cytotoxicity, cell viability, cell adhesion activity

중금속 중 크롬(chromium)은 대부분 자연계에 원자가 상태 (valence states)는 6가 크롬(hexavalent chromium(VI))과 3가 크롬(trivalent chromium(III))으로 존재한다. 특히 치과분야에서 사용하고 있는 니켈-크롬합금(nickel-chromium alloy)에는 크롬 함량이 회사제품에 따라 약간 다르기는 하지만, 평균 18% 크롬을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이들 제품으로부터 유리 되는 크롬(VI)은 증명된 독소 중 하나이며, 돌연변이원(mutagen) 또는 발암원(carcinogen)으로 작용하지만,³⁻⁵⁾ 아직 크롬(VI)에 의한 세포독성의 기전에 대하여는 확실히 밝혀지지 않고 있다. 그동안의 연구에 의하면, 크롬(VI)은 산화적 스트레스(oxidative stress), DNA손상, 세포고사(apoptotic cell death) 및 변형된 유전자 발현(altered gene expression) 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다.⁶⁻¹¹⁾ 그러나 크롬(III)은 인슐린(insulin)작용에 필수적

이며, 정상 단백질, 지방 및 탄수화물 대사에 필요한 미량 무기물로 알려져 있다.^{12,13)} 이와 같이 크롬(III)보다 크롬(VI)이 인체에 미치는 독성효과가 크기 때문에, 최근 크롬(VI)의 독성억제에 관한 연구가 이루어지고 있다. Wise 등³⁾은 크롬(VI)은 폐의 상피세포암종을 일으키는 발암원이며, 10 μM sodium chromate는 모든 세포를 사멸시킬 정도로 세포독성이 강하다고 보고하였다. 3-Hydroxybenzoic acid(3-HBA)는 각종 식물로부터 분리되고 있으나,^{14,15)} 중금속 이온과의 착물관계는 연구되지 않고 있으며, 반면에 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA)와 quercetin은 중금속이온과 금속착물을 형성하는 것으로 연구되고 있다.^{16,17)} Tannin gel은 pH 3의 크롬(VI)용액에서 크롬(VI)을 흡수할 수 있으며, quercetin-5-sulfonic acid sodium salt는 급성 크롬(CrO₃) 독성 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.¹⁸⁾ 이에 본 연구는 폐놀화합물의 방향족 고리구조에 결합된 수산기의 수가 중금속이온에 대한 세포독성에 어떠한 영향을 미치는 가를 알아보기 위한 목적으로, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 선정하여 NIH3T3 섬유모세포에 적용한 후, 세포 생존율, 세포부착 저지능

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6225 (팩스) 063-841-4893
(E-mail) shbaek@wonkwang.ac.kr

및 LDH 활성을 측정하고, 세포를 형태학적으로 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험 방법

시약 및 기기

세포배양에 사용한 minimum essential medium(MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)사에서 구입하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)과 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) 정량에 사용한 시약과 3-hydroxybenzoic acid (3-HBA), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA)와 quercetin (Fig. 1)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

세포의 배양은 CO₂ 배양기(Vision Scientific Co., Bucheon, Korea.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 및 XTT 정량에는 분광광도계 ELISA Reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 사용하였다.

세포배양

3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 정상세포에 대한 세포독성

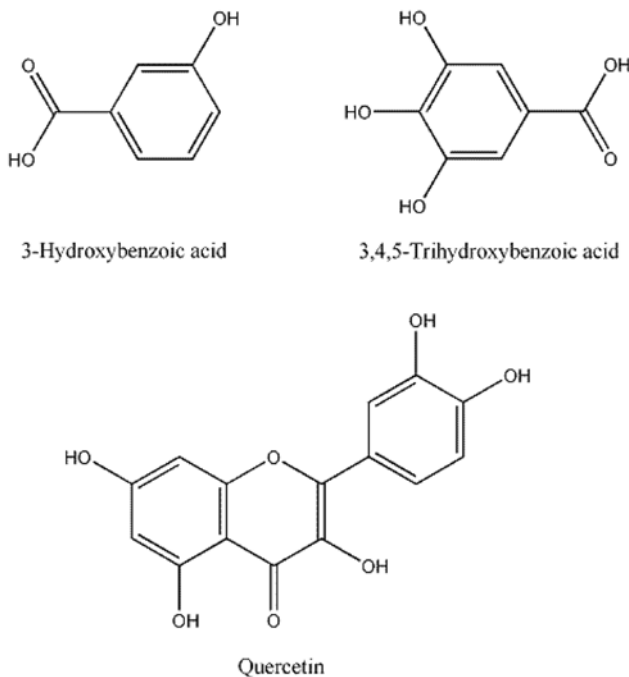


Fig. 1 – Molecular structures of 3-hydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid and quercetin.

을 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양 받은 NIH3T3 섬유모세포(NIH3T3)는 MEM배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/ml) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

MTT 정량분석법

Mosmann의 방법¹⁹⁾에 의하여, NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기에 5×10^4 cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양 후, chromium trioxide의 세포독성과 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 세포독성을 측정하기 위하여, chromium trioxide과 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μ M)로 첨가하고 48시간 배양하여, chromium trioxide IC₅₀ 농도의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포재생 효과를 측정하기 위하여, 24시간 배양한 세포에 IC₅₀ 농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 각각 농도별로 첨가하여 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 첨가하고 3시간 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온에 방치하여 MTT formazan을 용해하고, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1 mg을 PBS 2 ml에 용해하여 냉장고에 보관하면서, 필요시에 laminin의 농도(20 μ g/ml)를 결정하여, 찬 PBS 용액으로 희석하고, 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200 μ l씩 분주하여 하룻밤동안 건조시킨 후, PBS로 2회 세척하고 3% BSA를 각 well에 200 μ l씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음, 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 배양된 NIH3T3 섬유모세포 5×10^4 cells/ml 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24시간 배양한 후, MTT 정량분석법과 같은 방법으로 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 넣고 다시 48시간 배양한 후, 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 여기에 XTT와 혼합하여 MEN의 최종농도를 25 μ M로 한후, 각 well에 200 μ l씩 주입하고 4~6시간 동안 배양한 후, 450 nm에서 분광광도계 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 측정방법

검체중의 젖산 탈수소효소는 젖산을 탈수소시켜 피루빈산을 생성하는 데, 이때 보조소 NAD는 환원되어 NADH로 되고, NADH는 1-methoxy PMS의 존재하에 NTB(nitrotetrazolium

blue)를 환원시켜 디포르마잔을 생성하며, 이 디포르마잔의 적색을 비색 정량하는 원리를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다. MTT 정량분석방법과 같이 NIH3T3 섬유모 세포 각 배양용기에 5×10^4 cells/ml 세포수를 넣고 24시간 배양 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin 자체의 세포독성을 측정하기 위하여, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 각각 농도별(1, 25, 50 및 100 μ M)로 첨가하고, chromium trioxide에 대한 세포재생 효과를 측정하기 위하여, chromium trioxide IC₅₀ 농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 후, 기질액 0.5 ml와 정색시약 0.5 ml를 섞은 용액에 혈청과 증류수 0.05 ml를 각각 첨가한 희석반응 정지액(Asan Co, Seoul, Korea)과 시약 blank를 잘 혼합하여 60분 이내에 570 nm에서 흡광도를 측정하고 상호 비교하였다.

IC₅₀ 결정

3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 IC₅₀ 결정은 배양 중인 NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기당 5×10^4 cells/ml씩 넣고 24시간 배양 후, 1, 25, 50, 100 μ M의 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 첨가하여 48시간 배양한 후, MTT 정량 및 XTT 정량을 하여, 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC₅₀을 회귀방정식²⁰⁾에 의해 구하였다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 Students' t-test를 시행하였고, one way ANOVA 분석의 결과와 비교하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

세포의 광학현미경적 관찰

세포의 광학 현미경적 관찰을 위하여 NIH3T3 섬유모세포는 각각 세포분주 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 처리하여, MTT와 XTT를 처리하기 전에 도립위상차 현미경(Inverted Microscope, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

실험 결과

Chromium trioxide의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

니켈-크롬 합금의 재료인 크롬 중 신장에 비교적 독성이 강하게 나타나는 것으로 알려진 chromium trioxide(CrO₃)를 선정하여, CrO₃를 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후 세포 생존율을 측정하기 위하여, MTT 정량분석법과 세포의 부착 저지능을 측정하기 위하여, XTT 정량분석법을 이용하여 흡광도를 측정하였다. CrO₃를 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후, MTT 정량분석법으로 흡광도를 측정한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 흡광도가 감소하였으며, 1 μ M

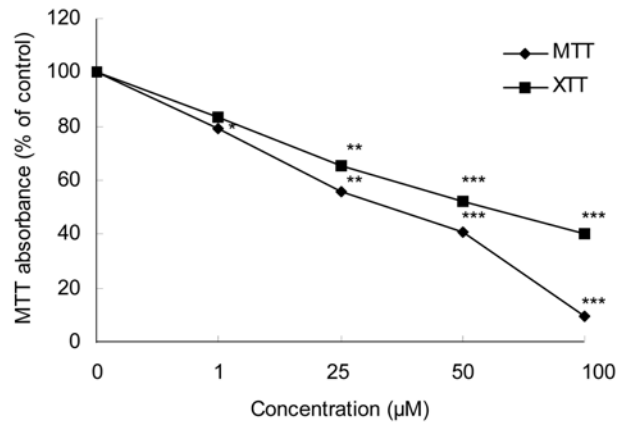


Fig. 2 – The cytotoxic effect of chromium trioxide by the MTT and XTT methods against NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Students' t-test).

CrO₃에서부터 통계적 유의성이 관찰되었다. 대조군에 비해 1 μ M CrO₃는 약 21% 정도의 세포독성이 나타났으며, 100 μ M CrO₃에서는 흡광도를 대조군 100%에 대하여 9.62% 까지 감소시켰으며, 50 μ M CrO₃와 100 μ M CrO₃의 세포독성의 차이는 약 31% 정도로 큰 변화를 관찰할 수가 있었다. XTT 정량분석법으로 흡광도를 측정한 결과에서도 대조군에 비하여 흡광도는 농도 의존적으로 감소시켰으며, 25 μ M CrO₃에서부터 통계적으로 유의한 감소가 나타났으며, 100 μ M CrO₃에서는 대조군에 비하여 40.1%까지 감소시켰으나, MTT 분석법에서 측정된 것에 비하면 약 4.2배 정도로 낮은 활성이 검색되었다. CrO₃의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 IC₅₀ 농도는 MTT 정량분석법과 XTT 정량분석법에서 각각 44.0 μ M과 69.5 μ M 농도로 측정되었으며, MTT 정량 분석법에 의하면 세포독성의 활성이 높게 관찰되었다(Fig. 2).

NIH3T3 섬유모세포에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포독성

MTT 정량분석법에 의한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포 생존율은 농도 의존적으로 흡광도가 미약하게 감소하였으며, 100 μ M 3-HBA와 100 μ M 3,4,5-THBA에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다(p<0.05). 3-HBA의 최소억제농도(692.45 μ M)는 다른 방향족 화합물보다 독성이 높게 나타났으며, 3-HBA의 4.5배 위치에 수산기를 갖는 3,4,5-THBA보다 약 1.4배 정도로 강한 세포독성이 관찰되었으며, BA는 quercetin의 세포 생존율보다 약 2.1배 정도로 강한 활성이 관찰되었다. 벤조산 유도체의 세포 생존율에 대한 연구결과에 의하면, 세포독성의 활성은 벤조산의 수산기 위치와 수에 따라 생존율의 변화가 있으나, quercetin보다는 독성이 높게 관찰되었다. MTT 정량분석법에 의한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의

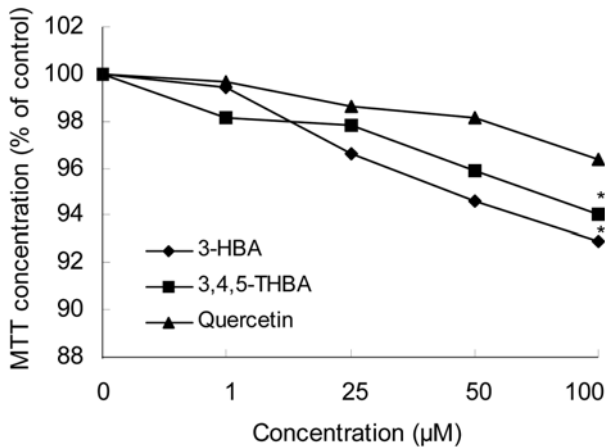


Fig. 3 – The cytotoxic effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin by the MTT method on NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05 (Students' t-test).

세포독성은 3-HBA>3,4,5-THBA>quercetin의 감소 순서로 활성이 측정되었다(Fig. 3).²¹⁾

3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 NIH3T3 섬유모 세포주에 처리한 후 48시간이 지나면, XTT 흡광도가 농도 의존적으로 미약하게 감소함을 관찰할 수 있었으며, 100 µM 3-HBA에서만 통계적인 유의성이 나타났다. Fig. 4의 세포부착 저지능을 XTT 정량분석법으로 측정할 결과에 의하면, 3-HBA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포 부착 저지능(IC₅₀=943.3 µM)은 3,4,5-THBA(IC₅₀=1,116.1 µM)보다 약 2.2배 정도로 강한 활성이 관찰되었으며, quercetin에 대한 세포부착 저지능(IC₅₀=2,410.8 µM)은 3-HBA에 대한 세포부착 저지능보다 약 2.6배 정도로 약한

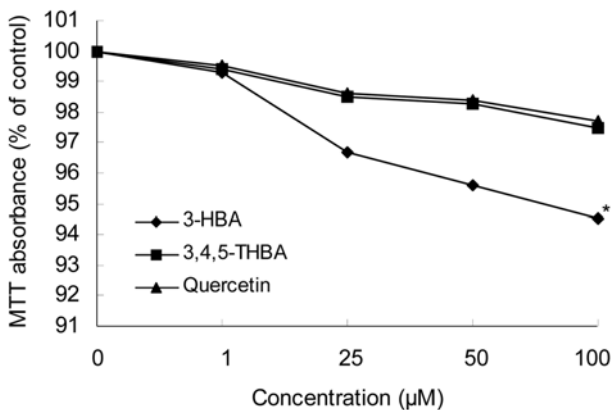


Fig. 4 – The cytotoxic effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin by the XTT method on NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: *p<0.05 (Students' t-test).

민감성이 관찰되었으며, 3,4,5-THBA보다는 세포 민감성이 약 2.2 배 정도로 약하게 관찰되었다. 벤조산 유도체의 최소억제농도에 대한 NIH3T3 섬유모 세포주의 세포부착 저지능은 세포 생존율에서와 같은 민감성이 3-HBA>3,4,5-THBA>quercetin 순서로 감소되었다. 이러한 벤조산 유도체의 분자구조와 세포의 민감성관계는 방향족산에 수산기의 수와 위치에 따라 활성관계가 다르게 관찰되었다. 앞으로 방향족산과 flavonoid의 분자구조와 세포부착 저지능관계에 대한 연구의 필요성이 요구된다고 생각된다(Fig. 4).²¹⁾

Chromium trioxide의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포재생효과

NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 생존율을 측정할 결과에 의하면, chromium trioxide의 IC₅₀ 농도와 세포 생존율은 농도 의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 흡광도를 측정할 값에 의하면, 3-HBA의 IC₅₀값 [2.26±0.02(57%)]은 3,4,5-THBA의 IC₅₀값 [2.26±0.01(59%)], quercetin의 IC₅₀값 [2.33±0.02(59%)]과 유사한 값을 얻게 되었다. 3-HBA에 대한 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으며, 3,4,5-THBA는 quercetin보다 낮은 농도에서 통계적인 유의성이 관찰되었다(p<0.01). NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포독성은 3-HBA의 IC₅₀값에 대한 100 µM 3-HBA [2.50±0.03(63%)]에 비교해보면, chromium trioxide독성에 대한 3-HBA의 세포 재생효과는 약 6% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA의 IC₅₀값에 대한 100 µM 3,4,5-THBA [3.60±0.03(94%)]는 약 35% 정도로 가장 높은 세포 재생효과가 나타났으며, quercetin의 IC₅₀값에 대한 100 µM

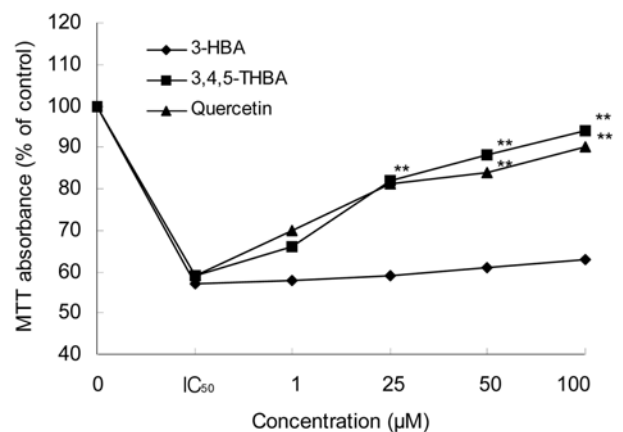


Fig. 5 – The cell regenerative effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin by the MTT method against chromium trioxide-induced cytotoxicity on NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the IC₅₀ value: *p<0.05, **p<0.01 (Students' t-test).

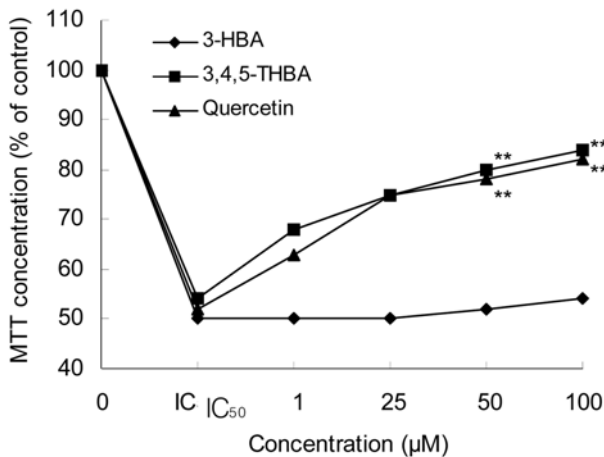


Fig. 6 – The cell regenerative effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin against chromium trioxide-induced cytotoxicity by the XTT method on NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the IC₅₀ value: **p<0.01 (Students' t-test).

quercetin [3.55±0.03(90%)]는 약 31% 정도로 세포 재생효과가 측정되었다. 이와 같은 chromium trioxide 독성에 대한 벤조산 유도체의 세포 재생효과에 대한 세포 생존율은 3,4,5-THBA>quercetin>3-HBA 순서로 감소하였음을 알 수가 있었다(Fig. 5).²¹⁾

NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포 재생효과에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포부착 저지능을 측정된 결과에 의하면, chromium trioxide의 IC₅₀ 농도에 비교하여, 세포부착 저지능은 세포 생존율처럼 농도 의존성이 약하게 증가함을 알 수 있었다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 흡광도를 측정된 값에 의하면, 3-HBA의 IC₅₀값 [1.99±0.17(50%)]은 3,4,5-THBA의 IC₅₀값 [2.13±0.09(54%)]와 quercetin의 IC₅₀값 [2.04±0.02(52%)]의 값과 유사한 흡광도를 얻게 되었다. 50 µM 3,4,5-THBA와 50 µM quercetin에 대한 통계적인 유의성 (p<0.05)이 관찰되었으나, 3-HBA는 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다. NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포부착 저지능은 3-HBA의 IC₅₀값에 대한 100 µM 3-HBA [2.15±0.20(54%)]에 비교해보면, chromium trioxide 독성에 대한 3-HBA의 세포 재생효과는 약 4% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA의 IC₅₀값에 대한 100 µM 3,4,5-THBA [3.32±0.14(84%)]는 약 30 정도로 세포 재생효과가 나타났으며, quercetin의 IC₅₀값에 대한 100 µM quercetin [3.22±0.09(82%)]는 약 30 정도로 3,4,5-THBA의 세포 재생효과와 같은 활성이 측정되었다. 이와 같은 chromium trioxide 독성에 대한 벤조산 유도체의 세포 재생효과에 대한 세포부착 저지능은 세포 생존율처럼 3,4,5-THBA>quercetin>3-HBA 순서로 감소하였음을 알 수가 있었다(Fig. 6).²¹⁾

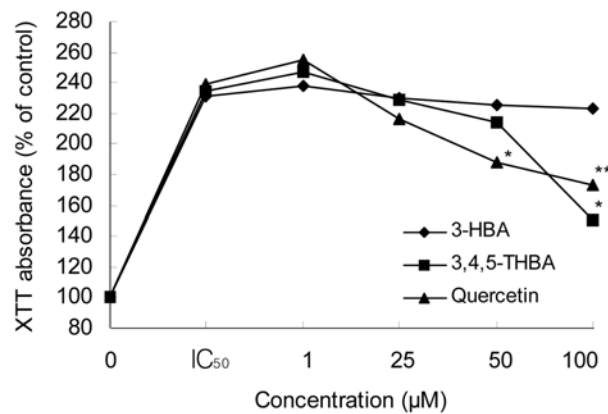


Fig. 7 – LDH activity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin against chromium trioxide-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts. The values represent the mean±standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the IC₅₀ value: *p<0.05, **p<0.01 (Students' t-test).

Chromium trioxide의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 LDH 활성

Chromium trioxide의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포막의 파괴 정도에 따라 양이 결정되는 LDH 활성도를 측정하였으나, MTT 정량분석법과 XTT 정량분석법에서와 같이, chromium trioxide의 IC₅₀ [0.068±0.005(231)] 농도를 NIH3T3 섬유모세포에 처리하고 24시간이 지난 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin은 농도별로 처리한 후, 48시간째에 LDH 활성도를 측정된 결과, 모든 화합물은 chromium trioxide IC₅₀ 농도 처리군에 대하여, 1 µM CrO₃는 LDH 흡광도를 증가시켰지만, 25 µM CrO₃에서부터는 농도 의존적으로 감소시켰다. 3-HBA는 IC₅₀ 농도에 대하여, 농도증가에 따라 큰 차이가 없었으나, 3,4,5-THBA는 IC₅₀ 농도에 대하여, 50 µM와 100 µM 3,4,5-THBA 차이는 약 63% 정도로 관찰되었으며, 100 µM 3,4,5-THBA의 [0.044±0.006(151%)]은 3,4,5-THBA의 IC₅₀값 [0.068±0.001(235%)]보다 약 84% 정도로 가장 높은 LDH 활성이 관찰되었다. 100 µM Quercetin의 [0.067±0.001(173%)]값은 quercetin의 IC₅₀ [0.093±0.002(239%)]값보다 약 66% 정도 높은 LDH 활성이 관찰되었다. Chromium trioxide IC₅₀ 농도치리에 의한 LDH 활성도에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 활성도 감소는 3,4,5-THBA>quercetin>3-HBA 순서로 관찰되었으므로, chromium trioxide에 의한 세포막 손상에 대한 억제효과는 3,4,5-THBA가 가장 높은 감소현상이 일어났으며, 3-HBA가 chromium trioxide에 의한 세포막 손상에 대한 억제효과는 가장 낮은 감소현상이 관찰되었다(Fig. 7).

세포의 광학현미경적 관찰

대조군의 NIH3T3 섬유모세포는 배양 24시간째가 되면, 대부

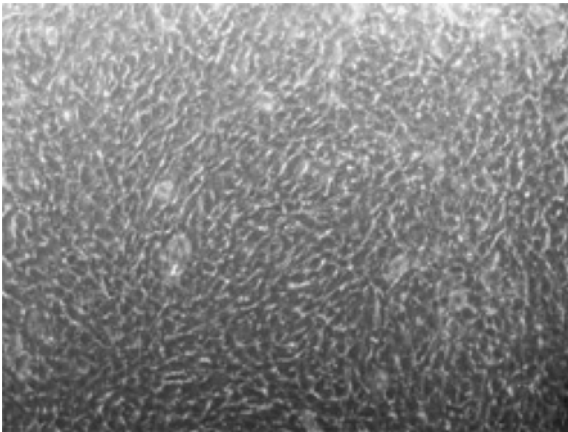


Photo 1 – Inverted photomicrograph of NIH fibroblast cells treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in unmodified medium (control) for 2 days $\times 100$. Most cells had abundant cytoplasm and cytoplasmic process.

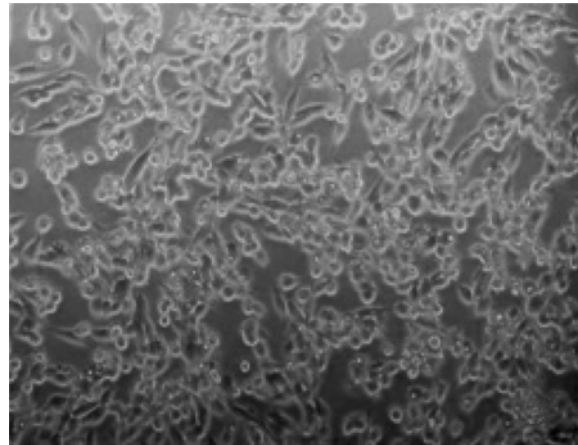


Photo 3 – Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in the IC_{50} value of chromium trioxide and $100 \mu M$ 3-HBA containing medium for 2 days $\times 100$. Most cells were regenerative and number of cells were increased.

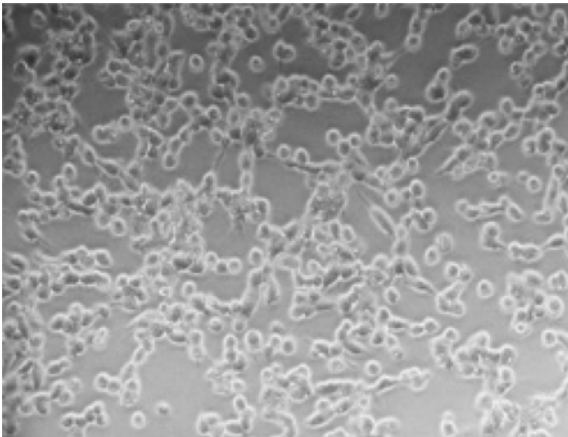


Photo 2 – Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in the IC_{50} value of chromium trioxide containing medium for 2 days $\times 100$. Most cells were formed cell cluster and number of cells were decreased.

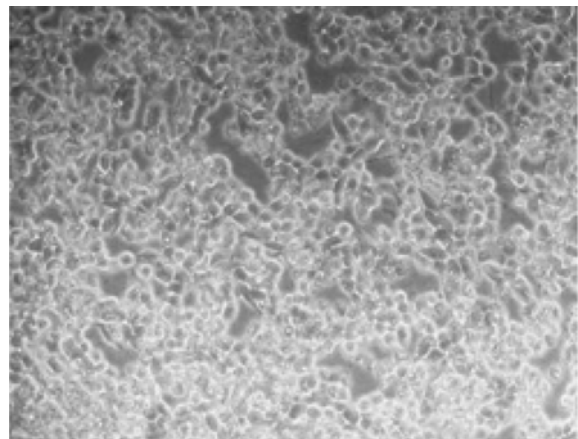


Photo 4 – Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for an additional 3 hrs after incubation in the IC_{50} value of chromium trioxide and $100 \mu M$ 3,4,5-THBA containing medium for 2 days $\times 100$. Most cells were regenerative and number of cells were increased.

분의 정상세포들과 같이 배양용기의 바닥에 다수의 방추형 세포들이 단층(monolayer)을 이루어 빈틈없이 부착된다(Photo 1). 크롬(VI)을 농도별로 처리하면, 농도 의존적으로 세포밀도가 감소하여, 세포의 크기는 원형으로 변형되며, 일부세포는 배양액내에 떠다니는 부유세포(floating cell)로 나타났다. 크롬의 IC_{50} 농도를 처리하면, Photo 2와 같이 세포밀도의 감소, 세포크기와 모양의 변화 및 배양액내에 세포 부스러기들이 나타났다. 크롬 IC_{50} 농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 농도별로 동시에 처리하면, 농도 의존적으로 세포의 재생현상 즉 세포수의 증가와 세포의 방추형으로 변화가 일어났다. 세포의 재생현상은 3,4,5-THBA와 quercetin이 3-HBA 보다 빠르게 진행되었으나, 3,4,5-THBA와 quercetin와의 차이는 크게 관찰되지 않았다(Photo 3과 4).

고 찰

본 연구에서 CrO_3 의 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 IC_{50} 농도는 MTT와 XTT 정량에서 각각 $44.0 \mu M$ 과 $69.5 \mu M$ 로 측정되었으며, 이 결과는 Biedermann과 Landolp²²⁾의 LDH 농도보다 높아 세포독성이 낮게 관찰되었다. CrO_3 의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포독성은 고독성으로 판정할 수 있었으며,²³⁾ 정²⁴⁾의 보고와 일치하였다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin 자체의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 Fig. 3, 4에서 보는 바와 같이, 농도 의존적으로 MTT 흡광도와 XTT 흡광도를 감소시키나, 대조군에 비하여 $100 \mu M$ 3-HBA가 통계적으로 유의

한 차이가 있었으며, 3,4,5-THBA와 quercetin은 통계적으로 유의한 차이를 인정할 수 없었다. 이 결과는 정²⁵⁾의 결과와 일치하였으며, Borefreund 등²³⁾의 세포독성 판정 기준에 의하면 무독성으로 판정할 수 있었다. Szlag 등²⁶⁾은 flavonoids인 quercetin-5-sulfonic acid salt(NaQSA)는 크롬(VI)에서 크롬(III)의 상태로 전환하며, 크롬이온을 감소시킬 수 있다. CrO₃의 급성중독을 나타내는 Wistar rat에 100 mg/kg의 NaQSA를 위내에 투여하면, 치사율을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 3-HBA와 3,4,5-THBA 및 quercetin를 CrO₃ IC₅₀ 농도를 처리한 NIH3T3 섬유모세포에 농도별로 처리하여, MTT와 XTT 흡광도를 측정할 결과, CrO₃, IC₅₀ 처리시 MTT 흡광도는 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 3-HBA는 IC₅₀ 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으나, 통계적으로 유의성은 없었다. 반면에 3,4,5-THBA는 IC₅₀ 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으며, 25 μM 3,4,5-THBA에서부터 통계적으로 유의한 차이가 있었다. Quercetin도 3,4,5-THBA와 유사하게 흡광도를 증가시켰으며, 50 μM quercetin에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3,4,5-THBA와 quercetin는 3-HBA 보다 CrO₃의 세포독성을 통계적으로 유의하게 경감할 수 있음을 알 수 있었으며, 3,4,5-THBA와 quercetin와 세포 재생효과는 차이가 거의 없었다. XTT 흡광도는 3-HBA는 IC₅₀ 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 3,4,5-THBA와 quercetin는 IC₅₀ 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 XTT 흡광도를 증가시켰으며, 50 μM 3,4,5-THBA와 50 μM quercetin에서부터 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3,4,5-THBA와 quercetin는 3-HBA 보다 CrO₃의 세포독성을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었으며, 3,4,5-THBA와 quercetin의 세포독성 감소는 큰 차이가 없었다. 이와 같은 결과는, 본 연구의 실험결과와 유사한 문헌이 없어 비교할 수 없으나, Szlag 등²⁶⁾의 보고와 비교한다면, 3,4,5-THBA와 quercetin는 6가 크롬의 세포독성을 감소시킬 수 있는 물질로 판정할 수 있다. LDH 활성은 세포막의 손상정도를 측정하는 정량적인 분석방법의 하나로 배양액내로 유출된 LDH량을 비색 분석법에 의하여 측정하는 방법이다.²⁷⁾ 따라서 본 연구의 결과에서 처럼 크롬 IC₅₀ 농도를 처리한 군에서 대조군에 비하여, LDH 활성이 높게 나타남은 크롬이 NIH3T3 섬유모세포의 막손상을 초래하였음을 증명하고 있다.²⁵⁾ MTT 정량분석, XTT 정량분석 및 LDH 활성 측정을 종합해보면, 크롬이 정상 NIH3T3 섬유모세포에 대하여, 효소의 활성과 막 손상을 초래 함으로서 세포에 독성을 나타냄을 말해 주고 있다.²⁸⁾ 크롬에 의한 막 손상을 감소시키기 위하여, IC₅₀ 농도의 크롬을 처리한 NIH3T3 섬유모세포에 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 농도별로 동시에 처리한 결과, 1 μM 농도의 적은량에서는 LDH 활성의 감소는 나타나지 않았으나, 25 μM 이상에서는 LDH 활성이 급속히 감소하였는데, 이는 페놀산인 3-

HBA와 3,4,5-THBA 및 quercetin가 막손상을 감소시켰다고 판단할 수 있다. 막손상의 감소정도는 quercetin>3,4,5-THBA>3-HBA 순으로 나타났다. 이 결과는 페놀산과 flavonoid에 결합되어 있는 수산기 수와 위치에 따라 막손상을 일으키는 크롬에 결합하여 독성을 감소시켰을 것으로 추측된다.²⁹⁾ 세포의 형태학적 관찰에서도 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 NIH3T3 섬유모세포에 처리하고 48시간이 지나면, 농도 증가에 따라 세포수의 감소와 세포형태의 변화 즉 방추형의 세포에서 원형으로서 변화가 관찰 되었으나, 크롬(VI)의 IC₅₀ 농도를 처리한 군에 비하여 약하게 관찰되었다. 3-HBA 처리군에서 세포의 퇴행성 변화는 가장 심하였고, 3,4,5-THBA와 quercetin 처리군에서는 3-HBA 처리군에서 보다 약하였다. NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 크롬(VI)>3-HBA>3,4,5-THBA>quercetin 순서로 나타났다. Szlag²⁶⁾의 보고는 본 연구결과를 뒷받침 할 수 있는 것으로 판단할 수 있으며, 이러한 연구는 정 등²⁴⁾은 크롬(VI)에 ferulic acid와 vitamin C를 조합처리하면, 크롬(VI)의 세포독성을 77.3%~91.4% 까지 감소시킬 수 있다고 보고 하였다. 이상의 연구결과에 의하면, 크롬 독성에 대한 NIH3T3 섬유모세포주의 세포 재생효과는 3,4,5-THBA(IC₅₀, 2,552.4 μM)²³⁾ 프라보노이드 그룹의 galocatechin의 B고리의 형태를 갖는 화합물로서, 벤젠고리에 위치한 카르복실기와 3,4,5번에 위치한 하이드록실기와 경쟁반응에 의한 카르복실기의 염기성있는 두자리 리간드로 형성되어, Lewis acid인 크롬(VI)과 complex가 형성되는 안정한 분자구조 착물로, 크롬의 독성을 경감시키는 크롬(VI)-3,4,5-THBA 착물을 형성하는 것으로 생각된다. Quercetin(IC₅₀, 1,463.9 μM)는 B고리에 있는 3'4'-dihydroxy 구조와 크롬착물을 형성할 것으로 생각되며, 이는 3'4'-dihydroxy 구조의 두자리 리간드가 카르복실기의 두자리 리간드보다 낮은 염기성으로 크롬착물 형성의 낮은 안정도상수를 갖으리라 사료된다.^{16,17,30-32)} 본 연구의 결과를 기초로 하여, 여러 종류의 중금속의 독성을 경감시킬 수 있는 페놀산과 프라보노이드 화합물의 분자구조와 세포의 재생활성관계에 대한 연구를 계속하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

크롬(VI)의 세포독성을 감소시킬 수 있는 물질을 탐색하기 위한 목적으로, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후, 세포 생존율, 세포 부착 저지능, 및 광학 현미경적 관찰하여, 세포의 형태변화를 대조군과 비교한 결과, CrO₃의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 MTT 및 XTT 정량분석에서 각각 고독성으로 판정되었다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 감소하였으며, 모든 화합물은 100 μM 이하의 농도에서는 세포에 영향

을 주지 않았다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin는 CrO_3 의 독성효과를 농도 의존적으로 감소시켰으며, 3,4,5-THBA와 quercetin는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나, 3-HBA는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 CrO_3 IC_{50} 농도에 대한 LDH 활성은 농도 의존적으로 감소하였으며, 3,4,5-THBA와 quercetin는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나, 3-HBA는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. NIH3T3 섬유모세포에 대한 CrO_3 의 세포수의 감소와 세포의 형태의 변화는 심하게 나타났다. CrO_3 IC_{50} 농도에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포수와 세포형태의 변화는 농도 의존적으로 약하게 나타났으며, 3-HBA > 3,4,5-THBA \geq quercetin 순서로 강한 활성이 측정되었다. 이상의 결과에 의하면, polyphenols의 방향족 고리구조에 카르복실기와 수산기의 위치와 수는 크롬(VI)인 CrO_3 의 세포독성을 감소시켜, 세포의 재생효과와 밀접한 관계가 있는 것으로 판단할 수 있었다.

문헌

- 1) Brokhurst, P. J. and Pham, H. L. : Orthodontic silver brazing alloys. *Aust. Orthod. J.* **11**, 96 (1989).
- 2) Berge, M., Gherdet, N. R. and Erichsen, E. S. : Corrosion of siver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol. Scand.* **40**, 75 (1982).
- 3) Sr. Wise, J. P., Wise, S. S. and Little, J. E. : The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mutat. Res.* **517**, 221 (2002).
- 4) Chuang, S. M. and Yang, J. L. : Comparison of roles of three mitogen-activated protein kinases induced by chromium (VI) and cadmium in nonsmallcell lung carcinoma cells. *Mol. Cell Biochem.* **222**, 85 (2001).
- 5) Bagchi, D., Stohs, S. J., Downs, B. W., Bagchi, M. and Preuss, H. G. : Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* **180**, 5 (2002).
- 6) Flores, A. and Perez, J. M. : Cytotoxicity, apoptosis, and in vitro DNA damage induced by potassium chromate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **161**, 75 (1999).
- 7) Tsou, T. C., Lai, H. J. and Yang, J. L. : Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damage by chromium (VI) reduction with ascorbate. *Chem. Res.* **12**, 1002 (1999).
- 8) Bagchi, D., Bagchi, M. and Stohs, S. J. : Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol. Cell Biochem.* **222**, 149 (2001).
- 9) Blasiak, J. and Kowalik, A. : A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutat. Res.* **469**, 135 (2000).
- 10) Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Garcia, J. J., Manchester, L. C., Karbownik, M. and Calvo, J. R. : Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ. Health Perspect.* **108**, 399 (2000).
- 11) Isuzugawa, K., Ogihara, Y. and Inoue, M. : Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 249 (2001).
- 12) Ghosh, D., Bhattacharya, B., Mukherjee, B., Manna, B., Sinha, M., Chowdhury, J. and Chowdhury, S. : Role of chromium supplementation in Indians with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 690 (2002).
- 13) Shrivastava, R., Upreti, R. K., Seth, P. K. and Chaturvedi, U. C. : Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**, 1 (2002).
- 14) Peng, X., Misawa, N. and Harayama, S. : Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1417 (2003).
- 15) Riaz, N., Anis, I., Khan, P. M., Shah, R. and Malik, A. : Alysinal-a new triterpene from Alysicarpus monolifer. *Nat. Prod. Lett.* **16**, 415 (2002).
- 16) Cornard, J. P., Dangleterre, L. and Lapouge, C. : Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb (II)-quercetin complex. *J. Phys. Chem. A* **109**, 10044 (2005).
- 17) Esparza, I., Salinas, I., Salinas, C., Garcia-Mina, J. M., Fernandez, J. M. : Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Anal. Chim. Acta* **543**, 267 (2005).
- 18) Nakajima, A. and Baba, Y. : Mechanism of hexavalent chromium adsorption by persimmon tannin gel. *Water Res.* **38**, 2859 (2004).
- 19) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 (1983).
- 20) 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만 : 기초생물통계학 제 9장 직선회귀, 학문사, 서울 p. 179 (1991).
- 21) Han, D. S., Chun, J. W., Jeon, S. W. and Baek, S. H. : The inhibitory effect of ferulic acid and related phenolic compounds against cancer cell lines. *J. Pharm. Soc. Kor.* **49**, 365 (2005).
- 22) Biedermann, K. A. and Landolph, J. R. : Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res.* **50**, 7835 (1990).
- 23) Borenfreund, E., Babichi, H. and Matin-Alcuacil, N. : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay. The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* **2**, 1 (1988).

- 24) 정영균 : 인체 치은섬유모세포에 대한 니켈의 세포독성과 Ferulic Acid와 Vitamin C의 세포독성경감효과, 원광대학교 대학원 박사학위 논문 (2003).
- 25) Chung, Y. T., Park, S. T., Choi, M. K., Kim, J. J., Mun, Y. J., Woo, W. H., Han, D. S., Choi, B. K. and So, J. T. : A study on the cytotoxicity of cadmium *in vitro*. *Korean J. Toxicol.* **9**, 45 (1999).
- 26) Szlag, A., Magdalan, J., Kopacz, M., Kuzniar, A., Kowalski, P. and Piesniewska, M. : Assessment of efficacy of quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt in the treatment of acute chromium poisoning: experimental studies. *Pol. J. Pharmacol.* **55**, 1097 (2003).
- 27) Takahashi, K., Fujita, Y., Mayumi, T., Hama, T. and Kishi, T. : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 326 (1987).
- 28) Busselberg, D., Evans, M. L., Rahmann, H. and Carpenter, D. O. : Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of *Aplysia* neurons. *J. Neurophysiol.* **65**, 786 (1991).
- 29) 박종운 : 인체 치은섬유모세포에 대한 니켈화합물의 독성과 Syringic Acid와 Vitamin C의 항독성효과, 원광대학교 대학원 박사학위 논문 (2004).
- 30) Baek, S. H., Lee, H., Pae, H. O., Kim, Y. O., Kwak, J. S., Yoo, Y. H. and Han, D. S. : Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. antitoxic effects of binding of caffeic acid and cadmium on cultured rat neuroglial cells. *Kor. J. Toxicol.* **11**, 241 (1995).
- 31) 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. Kor. Chem. Soc.* **47**, 175 (2003).
- 32) Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C. and Rice-Evans, C. A. : Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**, 1173 (1998).