

# Antioxidative Effect of *Chelidonium majus* Extract on Cultured NIH3T3 Fibroblasts Injured by Cadmium Chloride of Toxicant

Tae-Yoon Kim<sup>1</sup> and Seung-Joo Jekal<sup>2</sup>Departments of <sup>1</sup>Physical Therapy, <sup>2</sup>Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 54538, Korea

## 독성물질인 염화카드뮴으로 손상된 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 애기뚥풀 추출물의 항산화 효과

김태윤<sup>1</sup>, 제갈승주<sup>2</sup>원광보건대학교 <sup>1</sup>물리치료학과, <sup>2</sup>임상병리학과

The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), toxicant, and the protective effect of *Chelidonium majus* (CM) extract on CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts. Cell viability, the effect of butylated hydroxytoluene (BHT) against CdCl<sub>2</sub>, and the antioxidative effects including DPPH-free radical scavenging activity, superoxide anion-radical scavenging activity (SSA), and lactate dehydrogenase (LDH) activity were assessed. CdCl<sub>2</sub> caused a significant dose-dependent decrease in cell viability, and XTT<sub>50</sub> value was determined at 38.7 μM of CdCl<sub>2</sub>. It was determined as highly-toxic by Borenfreund and Puerner' toxic criteria. BHT of antioxidant significantly increased cell viability severely damaged by CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in these cultures. In the protective effect of CM extract on CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity, CM extract significantly increased cell viability, DPPH-free radical scavenging activity, SSA and inhibitory activity of LDH. From these results, it is suggested that oxidative stress is involved in the cytotoxicity of CdCl<sub>2</sub>, and CM extract showed protective efficacy on CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity via antioxidative effects. Conclusively, natural resources like CM extract may be a putative antioxidative agent for the detoxification or diminution of toxicity correlated with oxidative stress.

**Keywords:** Cytotoxicity, Antioxidative effect, Oxidative stress, Natural resources

Corresponding author: Seung-Joo Jekal  
Department of Clinical Laboratory Science,  
Wonkwang Health Science University, 514  
Iksan-daero, Iksan 54538, Korea  
Tel: 82-63-840-1215  
Fax: 82-63-840-1219  
E-mail: sjjei@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2016 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: February 1, 2016  
Revised 1<sup>st</sup>: February 25, 2016  
Revised 2<sup>nd</sup>: February 29, 2016  
Accepted: March 3, 2016

### 서론

카드뮴은 은백색의 중금속류 일종으로 크롬과 같이 자연계에서는 산소나 염소, 황과 결합하여 다양한 화합물을 형성하고 있다[1]. 카드뮴은 돌연변이원이면서도 독성이 강하기 때문에 이타이-이타이병(itai-itai disease)으로도 잘 알려져 있다. 그 이유로는 1968년 일본 도마야현에 있는 미쯔이 제련공장의 폐광석에서 흘러나온 카

드뮴에 노출된 주민들에서 이의 독성으로 인해 골다공증을 비롯한 전신통증, 골연화증 폐암 및 신장기능장애와 같은 후유증을 일으켰던 대표적인 사례가 있었는데 특히 뼈나 근육의 통증을 호소함으로써 붙여진 이름이다[2]. 카드뮴의 인체내 축적은 대부분 먹이사슬에 의하여 이루어지며 일부는 피부접촉을 통해 피부병변 유발은 물론, 그 밖에도 화석원료나 쓰레기 소각시에 분진에 의한 공기오염에 의해서 호흡기를 통하여 흡입되기도 한다[3]. 공기중 0.1 mg/m<sup>3</sup>

의 카드뮴 농도에 장기간 노출된 경우 폐병을 비롯한 신장병 및 골다공증과 같은 질환의 위험율이 높아진다고 한다. 따라서 미국의 경우 EPA에서는 공장에서 물이나 토양, 공기중으로 방출되는 카드뮴 양을 엄격히 제한함으로써 국민건강에 기여하고 있다[4]. 카드뮴의 독성이 강함에도 불구하고 이의 중독시 아직까지 독성기전은 물론, 효과적인 치료약제의 개발이 미흡한 상태에 있다[5].

최근, 카드뮴을 비롯한 몇몇 독성이 강한 크롬이나 수은과 같은 중금속류는 이들이 붕괴될 때 자유라디칼(free radicals)을 생성한다고 알려지면서 이의 독성에 산화적 손상(oxidative stress)이 관여하고 있다는 것이 제시된 바 있다[6]. 카드뮴의 독성에 관한 한 연구에서 항산화제의 일종인 vitamin E가 카드뮴의 독성을 방어하였다는 연구 결과가 보고됨에 따라 카드뮴의 독성과 산화적 손상간의 관련성이 제시되었다[7]. 따라서, 카드뮴 독성에 의한 치료적 접근을 항산화 측면에서 시도할려는 연구가 이루어지고 있다[1].

한편, 천연물의 성분분석에 대한 연구에서 한약재를 비롯한 약용식물의 성분 중에는 항산화를 비롯한 항염, 항암 및 항균과 같은 인체에 유효한 생리활성물질이 다량 함유되어 있다고 보고되고 있다[8]. 이들 성분 중에는 flavonoid와 같은 페놀화합물(phenolic compound)을 비롯하여 anthocyanin과 같은 배당체들과 같은 다양한 물질들이 알려져 있다[9].

식물 중 애기똥풀(*Chelidonium majus*, CM)은 양비귀과(Papaveraceae)에 속하는 초본식물로서 우리나라 전국 각지의 헛별이 마스한 양지바른 곳이나 산기슭의 나무 주변 등과 같이 약간 시원하고 그늘진 곳에서 자생하고 있다. 흔히 CM은 백골채라고도 널리 알려져 있으며 대개 여름과 가을에 꽃을 비롯한 잎이나 줄기를 채취하여 햇빛이 직접 들지 않은 서늘한 곳에서 말린 다음 이를 약재로 사용한다. CM은 오래전부터 해독이나 이뇨는 물론 위궤양이나 창종과 같은 염증성 병변 치료에 자주 사용되어 왔으며 그 밖에도 완선이나 수증, 황달과 같은 질환 등에도 유효한 효능이 있는 것으로 알려져 있다[10]. CM에서는 palmitic acid를 비롯한 stigmasterol이나 taraxerol 성분들이 분리 정제되었으며, 그 밖에도 berberine이나 malic acid, polyphenol, flavonoid와 같은 성분들이 함유되어 있다고 밝혀져 있다[11]. 특히, polyphenol이나 flavonoid와 같은 페놀성분들은 이의 분자구조에 다른 물질과의 결합력이 강한 수산기(-OH)를 한 개 이상 가지고 있어 항산화나 항독 등에 뛰어난 효능이 있다고 알려져 있다[12].

근래 세포 배양기술이 발전함에 따라 배양 세포를 이용하여 병변의 모델제작은 물론, 병인의 기전규명 및 치료적 접근을 위한 최적의 도구로 자리잡고 있다[4]. 특히, 결합조직의 구성성분 하나인 섬유모세포는 비만세포나 형질세포와 함께 조직의 세포성분을 이루고 있으며, 특히 콜라겐을 생성함으로써 피부의 찰과상이나 화상

과 같은 피부병변이나 또는 뼈의 인대나 힘줄 손상과 같은 외상으로 인한 병변의 경우 이의 회복을 위하여 중요한 역할을 담당하고 있다[13].

본 연구는 천연소재를 이용한 병변의 치료물질에 대한 탐색이나 발굴을 위한 목적의 일환으로 독성물질인 염화카드뮴( $CdCl_2$ )의 독성분석과 함께 이에 대한 CM 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 시험관 내 분석을 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

NIH3T3 섬유모세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 사용하였다.

### 2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로는 cadmium chloride ( $CdCl_2$ )를 비롯한 butylated hydroxytoluene (BHT), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ethanol, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), minimum essential medium (MEM), xanthine, nitroblue tetrazolium (NBT), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 및 XTT는 Sigma사(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)에서, LDH CytoTox detection kit는 Takara사(Takara Biochemical Company, Kangnam, Korea)에서 각각 구입하였다.  $CdCl_2$ 의 제조는 FBS가 없는 배양액을 사용하여 최종 농도가 각각 30  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$  및 150  $\mu M$ 의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 직전 필요한 양을 배양액에 직접 첨가하여 사용하거나 또는 필요농도로 희석하여 사용하였다.

XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt)는 실험 전날 PBS를 이용하여 50  $\mu g/mL$ 의 저장액을 제조한 후 사용하였다.

### 3. 애기똥풀(*Chelidonium majus*, CM) 추출

CM은 7월경 전라북도 익산시 야산부근에서 채취하여 시에 위치하고 있는 대학부설 생명자원과학연구소에서 확인 동정 후 사용하였다. 채집한 전초는 세척한 후 통풍이 잘되고 서늘한 곳에서 말린 다음 일정 길이로 잘라 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 시료추출을 위해 시료 73.8 g을 파쇄한 다음 시료의 3배 정도의 증류수와 함께 1,000 mL의 환저플라스크에 넣고 2시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 5회 반복하여 추출한 액을 여과 후 3,000 rpm에서 30분 동안 원침시켰으며, 원침 후 진공농축기에서 농축압입시

켜 4.3 g의 시료를 얻었다. 이 때 수율은 5.8%로 나타났다.

#### 4. 세포 배양

세포 배양은 Rim 등[8]의 방법에 의하여 배양용기로부터 효소 해리술에 의하여 세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 일정 시간 동안 원침 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣어  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 조절된 후 96 well plate에 삽주하였다. 삽주된 세포들은 36°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 항온기 내에서 72시간 동안 배양하였다.

#### 5. CdCl<sub>2</sub> 처리

CdCl<sub>2</sub>가 25~45 uM까지의 농도별로 각각 포함된 배양액에서 NIH3T3 섬유모세포를 72시간 동안 배양한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

#### 6. BHT의 항산화능 측정

항산화제의 일종인 BHT의 항산화능의 조사를 위하여 활성산소의 하나인 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 20 uM을 배양세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 각각 20~50 uM의 농도로 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

#### 7. CdCl<sub>2</sub>에 대한 BHT의 영향

XTT<sub>50</sub>값의 CdCl<sub>2</sub>를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 각각 30 uM과 50 uM의 농도로 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율을 양성대조군인 CdCl<sub>2</sub>의 처리군과 비교 조사하였다.

#### 8. 애기똥풀(CM) 추출물 처리

CdCl<sub>2</sub>에 대한 CM 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 CdCl<sub>2</sub> XTT<sub>50</sub>값을 처리하기 2시간 전에 60 ug/mL와 80 ug/mL의 추출물 농도에서 세포를 처리한 다음 세포 생존율을 양성대조군인 CdCl<sub>2</sub>의 처리군과 비교 조사하였다. CM 추출물 분석농도는 Jung 등[14]에 의한 CM 추출물의 항산화능(DPPH-free radical 소거능, xanthine oxidase 저해능) 분석 농도인 0.05 mg/mL-2.0 mg/mL의 범위를 근거로 하여 이에 가장 근접 농도인 0.06 mg/mL와 0.08 mg/mL를 선정하여 분석하였다.

#### 9. 세포생존율 분석

세포생존율의 분석은 Borenfreund와 Puerner [15]의 방법에 따랐다. 즉, 배양 세포에 농도별로 약제나 추출물을 일정 시간 처리한 후 실험 당일 제조한 50 ug/mL XTT를 well당 100 uL씩 넣고

36°C로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 DMSO를 넣고 일정시간 정치한 다음 varioskans flash ELISA reader (Thermofisher Scientific Company, Vantaa, Finland)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. XTT<sub>50</sub>값의 산출은 회귀직선식에 의하여 산정하였다.

#### 10. DPPH-자유라디칼 소거능 측정

DPPH-자유라디칼 소거능(DPPH-free radical scavenging activity)의 측정은 Blois [16]의 방법에 의하여 메탄올에 녹인 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올용액 100 uL를 넣고 실온에서 30분간 처리하였다. 처리 완료 후 varioskans flash ELISA reader (Thermofisher Scientific Company, Finland)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 시료무첨가군간의 차이를 시료무첨가군에 의한 백분율로 나타냈으며, BHT의 활성을 비교군으로 하여 조사하였다.

#### 11. Superoxide anion-radical 소거능 측정

Superoxide anion-radical 소거능의 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)환원 방법에 따라, 각 시료용액 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.4 mL에 0.4 mM xanthine과 0.24 mM NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시켜 반응액중에 생성된 superoxide anion radical 양을 varioskans flash ELISA reader (Thermofisher Scientific Company, Finland)로 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감수율을 백분율로 나타냈다.

#### 12. LDH (lactate dehydrogenase) 활성 측정

LDH 활성 조사를 위하여 배양 세포에 약제나 추출물을 농도별로 처리한 다음 250 × g에서 15분 동안 원침시켰다. 원침 완료 후 50 uL의 상등액을 취한 다음 LDH CyTox detection kit의 반응용액(0.05 U/mL) 50 uL를 넣은 다음 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 490 nm에서 varioskans flash ELISA reader (Thermofisher Scientific Company, Finland)로 흡광도를 측정하였으며 LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

#### 13. 통계 처리

자료분석은 Windows SPSS 프로그램 버전 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)에 의하여 행하였으며 군간 차이값의 비교를 위하여 ANOVA를 실시하였고 사후 검정은 Scheffe test에 의하여 하였다.

**결 과**

**1. CdCl<sub>2</sub>의 독성 효과**

CdCl<sub>2</sub>의 독성 조사를 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 25 ~ 45 uM 농도의 CdCl<sub>2</sub> 각각을 배양 세포에 72시간 동안 처리한 결과, CdCl<sub>2</sub>는 농도처리에 따라 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며( $p < 0.001$ ), 이 때 XTT<sub>50</sub>값은 38.7 uM의 농도에서 나타났다 (Table 1).

**2. BHT의 항산화능 측정**

20 uM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만을 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (0.163 ± 0.02)에 비하여 39.9% (0.065 ± 0.01)로 나타난 반면, 20 uM 농도의 BHT의 처리에서는 46.0% (0.075 ± 0.01)로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 약간의 증가를 보였다. 또한, 30 uM과 50 uM의 처리에서는 세포생존율이 각각 61.3% (0.100 ± 0.01)와 74.8% (0.122 ± 0.02)로 나타나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보였다( $p < 0.001$ ) (Table 2).

**3. CdCl<sub>2</sub>에 대한 BHT의 영향**

CdCl<sub>2</sub>의 세포독성과 산화적 손상간의 상호관계를 알아보기 위하여 XTT<sub>50</sub>값의 CdCl<sub>2</sub>를 배양 세포에 처리하기 전에 항산화제인 BHT 30 uM과 50 uM의 농도를 세포에 각각 처리하였다. 그 결과 CdCl<sub>2</sub>만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100% (0.175 ±

0.02)에 비하여 37.1% (0.065 ± 0.01)로 나타난 반면, 30 uM과 50 uM 농도의 BHT의 처리에서는 각각 59.4% (0.104 ± 0.02)와 64.0% (0.112 ± 0.02)로 나타나 이는 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 모두 유의하게 증가하였다( $p < 0.001$ ) (Table 3).

**4. CdCl<sub>2</sub>의 독성에 대한 애기뿔풀(CM) 추출물의 영향**

CdCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 CM 추출물의 영향을 조사하기 위하여 XTT<sub>50</sub>값의 CdCl<sub>2</sub>를 배양 NIH3T3 섬유모세포에 처리하기 전에 60 ug/mL와 80 ug/mL의 CM 추출물을 전처리한 결과, CdCl<sub>2</sub>만의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (0.187 ± 0.01)에 비하여 41.2% (0.077 ± 0.01)로 나타난데 비하여 60 ug/mL CM 추출물 처리에서는 56.1% (0.105 ± 0.01)로 나타나 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $p < 0.001$ ). 한편, 80 ug/mL 추출물 처리에서는 세포생존율이 84.5% (0.158 ± 0.02)로 나타남으로서 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다( $p < 0.001$ ) (Table 4).

**5. DPPH-자유라디칼 소거능 측정**

DPPH-자유라디칼 소거능(DPPH-free radical scavenging activity)을 측정하기 위하여 60 ug/mL와 80 ug/mL 농도의 CM 추출물 시료를 분석한 결과 60 ug/mL 추출물 시료의 처리에서는 소거능이 28.5%로 이는 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈다 ( $p < 0.001$ ). 또한, 80 ug/mL 추출물 처리에서는 50%로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다( $p < 0.001$ ). 특히, 80

**Table 1.** The cytotoxicity of CdCl<sub>2</sub> on cultured NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Incubation Concentrations of CdCl <sub>2</sub> (uM)	XTT assay (450 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.196±0.05	100	
25 <sup>†</sup>	0.128±0.01	65.3	
35 <sup>‡</sup>	0.113±0.05	57.7	0.001
45 <sup>§</sup>	0.072±0.02	36.7	* > † > ‡ > §
38.7 (XTT <sub>50</sub> )	0.098±0.04	50.0	

**Table 2.** The antioxidative effect of BHT on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Incubation Concentrations of BHT (uM)	XTT assay (450 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.163±0.02	100	
20 uM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>†</sup>	0.065±0.01	39.9	
20 <sup>‡</sup>	0.075±0.01	46.0	0.001
30 <sup>§</sup>	0.100±0.01	61.3	* > ‡ > § > †
50 <sup>  </sup>	0.122±0.02	74.8	

**Table 3.** The effect of BHT on the cytotoxicity induced by CdCl<sub>2</sub> in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation Concentrations of BHT (uM)	XTT assay (450 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.175±0.02	100	
CdCl <sub>2</sub> (XTT <sub>50</sub> ) <sup>†</sup>	0.065±0.01	37.1	0.001
30 <sup>‡</sup>	0.104±0.02	59.4	* > ‡ > § > †
50 <sup>§</sup>	0.112±0.02	64.0	

**Table 4.** The protective effect of *Chelidonium majus* (CM) extract on CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation Concent. of CM extr. (ug/mL)	XTT assay (450 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.187±0.01	100	
CdCl <sub>2</sub> (XTT <sub>50</sub> ) <sup>†</sup>	0.077±0.01	41.2	0.001
60 <sup>‡</sup>	0.105±0.01	56.1	* > ‡ > § > †
80 <sup>§</sup>	0.158±0.02	84.5	

ug/mL의 추출물 시료에서 소거능은 비교군으로 사용한 50 uM BHT 활성값인 68.7%의 50% 이상인 것으로 나타났다(Table 5).

6. Superoxide anion-radical 소거능 측정

CM 추출물 시료 60 ug/mL와 80 ug/mL에 대한 superoxide anion-radical 소거능에 있어서 60 ug/mL 처리에서는 대조군에 비하여 30.9% ( $p < 0.001$ )의 소거능을 나타냈으며, 80 ug/mL에서는 48.0% ( $p < 0.001$ )의 소거능을 나타냈다. 특히, 80 ug/mL의 추출물 시료 처리에서는 비교군인 50 uM BHT 소거능값인 70.4% ( $p < 0.001$ )의 65% 이상의 높은 값을 나타냈다(Table 6).

7. LDH 활성 측정

CdCl<sub>2</sub>에 대한 CM 추출물의 LDH (lactate dehydrogenase) 활성에 대한 영향을 조사하기 위하여 60 ug/mL와 80 ug/mL 농도의 추출물을 분석한 결과 XTT<sub>50</sub>값의 CdCl<sub>2</sub>의 LDH 활성은 대조군에 비하여 136.2%로 높게 나타났다. 이에 비하여 60 ug/mL 추출물 처리에서는 113.8%로 나타나 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의한 활성 감소를 보였다( $p < 0.001$ ). 또한, 80 ug/mL 추출물 처리에서는 105.7%로 나타나 이 역시 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 유의한 활성 감소를 보였다( $p < 0.001$ ) (Table 7).

Table 5. DPPH-free radical scavenging activity of *Chelidonium majus* (CM) extract determined at a wavelength of 517 nm

Incubation Concent. of CM extr. (ug/mL)	DPPH-free radical scavenging activity (517 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.214±0.02	0	
50 uM BHT <sup>†</sup>	0.067±0.01	68.7	0.001
60 <sup>‡</sup>	0.153±0.01	28.5	<sup>†</sup> > <sup>‡</sup> > *
80 <sup>§</sup>	0.138±0.01	35.5	

Table 6. Superoxide anion-radical scavenging activity of *Chelidonium majus* (CM) extract determined at a wavelength of 560 nm

Incubation Concent. of CM extr. (ug/mL)	Superoxide anion-radical scavenging activity (560 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.152±0.02	0	
50 uM BHT <sup>†</sup>	0.045±0.01	70.4	0.001
60 <sup>‡</sup>	0.105±0.02	30.9	<sup>†</sup> > <sup>‡</sup> > *
80 <sup>§</sup>	0.079±0.01	48.0	

고찰

염화카드뮴(CdCl<sub>2</sub>)의 독성분석에 있어서 배양 NIH3T3 섬유모세포에 25~45 uM 농도의 CdCl<sub>2</sub>를 각각 72시간 동안 처리한 결과, 대조군에 비하여 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서( $p < 0.001$ ), 세포독성을 나타냈다. 본 실험에서 처럼 CdCl<sub>2</sub>에 의한 세포생존율의 감소는 CdCl<sub>2</sub>가 배양 NIH3T3 섬유모세포에 세포독성이 있음을 말해주고 있으며, 이같은 독성은 CdCl<sub>2</sub>의 XTT<sub>50</sub>값이 100 uM 이하인 38.7 uM로 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner [15]에 의한 독성판정기준에 의하여 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 이들에 의한 독성판정기준을 보면 XTT<sub>50</sub>값이나 MTT<sub>50</sub>값이 100 uM 이하인 경우를 고독성(highly-toxic)으로 판정하였고, 100~1,000 uM인 경우는 중간독성(mid-toxic)으로, 1,000~2,000 uM인 경우는 저독성(low-toxic)으로, 또한 2,000 uM 이상인 경우를 무독성(non-toxic)인 것으로 각각 판정하였다. 본 연구 결과는 Jung 등[7]에 의한 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴 독성에 대한 보고나, Son 등[5]에 의한 배양 섬유모세포에 대한 카드뮴의 독성 보고와도 일치하였다. 본 연구 결과에서와 같이 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 CdCl<sub>2</sub>의 독성효과에 대한 현상은 CdCl<sub>2</sub>에 의한 세포내 DNA의 가교결합이나 RNA와 같은 핵산물질의 합성저해와 같은 가능성도 배제할 수는 없겠지만[17], 그 보다는 CdCl<sub>2</sub>의 독성이 자유라디칼과 관련이 있어 그 결과 이의 산화적 손상으로 인해 세포생존율의 감소를 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다[5]. 따라서, 본 연구에서는 CdCl<sub>2</sub>와 산화적 손상간에 대하여 조사하였다.

한편, 본 연구에서 활성산소의 일종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 BHT의 항산화능을 분석한 결과, 30 uM과 50 uM 농도의 BHT의 처리는 20 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보여 높은 항산화능을 나타냈다( $p < 0.001$ ). BHT는 tocopherol이나 ascorbic acid와 같이 강력한 항산화제의 일종으로서 산화방지와 세포노화를 막아준다고 알려져 있다[18].

위에서 말한 바와 같이, 본 연구에서는 CdCl<sub>2</sub>의 독성과 산화적 손상간의 관련성 조사를 위하여 CdCl<sub>2</sub>에 대한 항산화제의 일종인

Table 7. LDH activity of *Chelidonium majus* (CM) extract on CdCl<sub>2</sub>-induced cytotoxicity determined at a wavelength of 490 nm

Incubation Concent. of CM extr. (ug/mL)	LDH activity (490 nm)		<i>p</i>
	Mean±SD	(% of control)	
Control*	0.174±0.04	100	
CdCl <sub>2</sub> (XTT <sub>50</sub> ) <sup>†</sup>	0.237±0.06	136.2	0.001
60 <sup>‡</sup>	0.198±0.03	113.8	<sup>†</sup> > <sup>‡</sup> > *
80 <sup>§</sup>	0.184±0.01	105.7	

BHT의 영향을 분석하였다. 그 결과 30 uM과 50 uM 농도의 BHT를 전처리한 결과 CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 처리농도 모두에서 유의한 세포생존율의 증가를 보였다( $p < 0.001$ ). 위의 결과에서 처럼 항산화제인 BHT에 의한 CdCl<sub>2</sub>의 독성방어는 CdCl<sub>2</sub>의 독성이 산화적 손상과 관련되어 있음을 증명하고 있으며, 이는 Son 등[5]의 연구에서 항산화제인 vitamin E가 CdCl<sub>2</sub> 독성을 감소하였다는 보고와도 일치하였다.

한편, CdCl<sub>2</sub>의 독성에 대한 CM 추출물의 영향 분석을 위하여 60 ug/mL와 80 ug/mL의 CM 추출물 농도를 배양 세포에 전처리하였다. 그 결과, CdCl<sub>2</sub>만의 처리에 비하여 추출물 처리농도 모두에서 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다( $p < 0.001$ ). 이같은 결과는 CM 추출물이 CdCl<sub>2</sub>의 세포독성을 방어했음을 말해주고 있으며, 이는 또한 Son 등[10]에 의한 CM 추출물이 강독성의 유기수은의 세포독성을 방어하였다는 연구 결과와도 상통하였다. 본 결과에서와 같이 CdCl<sub>2</sub>에 대한 CM 추출물의 방어효과는 Koizumi와 Waalkes [17]의 보고서와 같이 카드뮴에 대한 CM 추출물의 항독작용이나 또는 세포내 DNA나 RNA와 같은 핵산물질의 합성저해에 대한 방어효과와 같은 일부 원인이 있겠지만, 그 보다는 CM 추출물의 항산화 작용이 CdCl<sub>2</sub>의 산화적 손상을 방어한 결과로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 CM 추출물에 대한 항산화능을 조사하기 위하여 DPPH-자유라디칼 소거능을 비롯한 superoxide anion-radical scavenging activity (SSA) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 활성을 조사하였다. 그 결과 CM 추출물은 항산화 분석 모두에서 유효한 효과가 있는 것으로 나타났으며, 특히 80 ug/mL CM 추출물 시료처리에서는 DPPH-자유라디칼 소거능과 SSA에 있어서 비교군인 BHT 활성의 50~65% 이상의 활성을 보여 BHT와 같은 항산화능을 나타냈다. 또한, 본 연구의 분석결과 중 CM 추출물은 유의한 LDH 활성 억제능을 보임으로서 자유라디칼의 막지질과산화에 대한 방어능을 증명하였다. 따라서, 본 연구에서 행한 항산화능에 대한 분석은 CM 추출물이 자유라디칼 제거를 위한 소거능을 가지고 있음을 말해 주고 있으며 이같은 효능은 추출물 성분 중에 polyphenol, flavonoid와 같은 강력한 항산화 성분들에 의한 것으로 생각된다 [11]. 특히, polyphenol이나 flavonoid와 같은 페놀화합물은 항산화능이나 항염, 항독과 같은 유효한 약리활성을 가지고 있음은 이미 잘 알려져 있다[19]. 따라서, CM 추출물과 같은 천연성분을 대상으로 항산화에 대한 생리활성의 분석은 산화적 손상과 연관된 다양한 측면에서 지속적으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요약

본 연구는 배양 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 독성물질인 염화카드뮴(CdCl<sub>2</sub>)의 세포독성과 이에 대한 애기뫄풀(*Chelidonium majus*, CM) 추출물의 방어효과를 조사하기 위하여 세포생존율(cell viability)을 비롯한 CdCl<sub>2</sub>에 대한 BHT의 영향 및 DPPH-자유라디칼 소거능, superoxide anion-radical scavenging activity (SSA), lactate dehydrogenase (LDH) 활성과 같은 항산화효과를 분석하였다. 그 결과 CdCl<sub>2</sub>는 농도 의존적으로 배양 NIH3T3 섬유모세포의 생존율을 유의하게 감소하였으며, XTT<sub>50</sub> 값이 38.7 uM로 나타나 Borenfreund와 Puerner의 독성판정기준에 따라 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제인 BHT는 CdCl<sub>2</sub>의 독성으로 인하여 심하게 손상된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 한편, CdCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 CM 추출물의 방어효과에서, CM 추출물은 CdCl<sub>2</sub>에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며, 또한 DPPH-자유라디칼 소거능을 비롯한 SSA 및 LDH 활성 억제와 같은 항산화능을 나타냈다. 이상의 결과에서 CdCl<sub>2</sub>의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, CM 추출물은 항산화 효과에 의하여 CdCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 방어효과를 나타냈다. 결론적으로, CM 추출물과 같은 천연소재는 산화적 손상과 관련된 독성의 제독 내지는 저감을 위한 항산화물질로서의 개발적 가치가 있다고 사료된다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

## References

1. Jung JY, Oh SK, Park SH, Yoon MY, Yu YW, Rim YS, et al. Antioxidative effect of *Ajuga multiflora* BUNGE extract on chromium trioxide, dermatitis inducer in cultured NIH3T3 fibroblasts. *J Invest Cosmetol*. 2014;10:21-26.
2. Waalkes MP, Poirier LA. In vitro cadmium-DNA interaction: Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984;75:539-546.
3. Nomiya K. Recent progress and perspective in cadmium health effects studies. *Sci Total Environ*. 1980;14:199-232.
4. Park ST, Choi MK, Lee KC, Cho KH, Jeon BH, Woo WH. Study on the effect of vitamin E on methylmercury in cultured spinal motor neurons. *Kor J Oriental Med Pathol*. 2000;14:7-10.
5. Son YW, Rim YS, Yu YW, Jung IJ. Effect of persimmon leaves extract on the cytotoxicity induced by cadmium of hair dye component. *J Invest Cosmetol*. 2012;8:9-15.
6. Kim MS, Seo YM, Park ST. Antioxidative effect of kaempferol

- on cultured human skin fibroblasts damaged by methyl-mercuric chloride. J Kor Soc People Plants Environ. 2010;13:23-29.
7. Jung JY, Joe DY, Park SH, Seo YM, Protective effect of *Rumex crispus* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts damaged by cadmium of environmental pollutant. J Kor Soc People Plants Environ. 2014;17:15-21.
  8. Rim YS, Song WS, Seo YM, Park ST, Kim SM. A study on the cytotoxic effects of several plant extracts on the cell viability and cell adhesion activity in cultured NIH3T3 fibroblast. Kor J Clin Lab Sci. 2010;42:116-124.
  9. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer cell lines. J Ethnopharmacol. 2007;113:115-124.
  10. Son YW, Oh SK, Choi YR, Park SH, Seo YM, Lee HJ, et al. Effects of *Chelidonium majus* extract on mercury-induced cytotoxicity and melanogenesis. J Invest Cosmetol. 2013;9:229-235.
  11. Lenfeld J, Kroutil M, Marsalea E, Stavik J, Preininger V. Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. Planta Med. 1981;43:161-165.
  12. Rim YS, Seo YM, Son YW, Oh YL. Effect of *Salicornia herbacea* L. extract on protein synthesis and detoxicity in cultured C6 glioma cells. J Kor Soc People Plants Environ. 2012;15:149-154.
  13. Wang EA. Bone morphogenetic protein (BMPs). Therapeutic potential in healing bony defects. Trends Biotechnol. 1993;11:379-383.
  14. Jung HM, Seo SJ, Kim JB, Kim NW, Joo EY. The study of physiological activities from *Chelidonium majus var. asiaticum* extract. J Invest Cosmetol. 2011;7:359-366.
  15. Brenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J Tiss Cult Meth. 1984;9:7-9.
  16. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958;26:1199-1200.
  17. Koizumi T, Waalkes MP. Effect of zinc on the binding cadmium to DNA: assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs. Toxicol In Vitro. 1990;4:51-55.
  18. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alphatocopherol administration. Stroke. 1983;14:977-982.
  19. De-Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compound oxidation by fenton's reagent. Chemosphere. 2001;45:85-90.