Biomedical Science Letters 2018, 24(4): 357~364 https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357

eISSN: 2288-7415

# The Antioxidative Effect of *Eclipta prostrata* L. Extract on Cultured NIH3T3 Fibroblasts Injured by Manganese-Induced Cytotoxicity

Sang-Hee Lee<sup>1,\*</sup>, In-Ju Jung<sup>2,\*</sup> and Hyesook Jang<sup>3,†,\*</sup>

<sup>1</sup>Sanbon Hospital, School of Medicine, Wonkwang University, Gunpo 15865, Korea <sup>2</sup>Department of Cosmetology, Dongshin University, Naju 58245, Korea <sup>3</sup>Department of Nursing, Jeonju University, Jeonju-city 55069, Korea

Manganese (Mn) is used as main materials in various chemical processes of industry, but it suggested that Mn brings about its toxicant by fume or dust through respiratory system and skin barrier. Mn toxicant induces the loss of mental health and life quality by cerebrovascular and skin diseases. Nevertheless, it lefts much unknown on the mechanism and the effectively therapeutic methods about Mn toxicant. Therefore, this study was evaluated the cytotoxicity induced by manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>) in cultured NIH3T3 fibroblasts, and also, the correlation between MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity and oxidative stress was examined. While, the effect of *Eclipta prostrata* L. (EP) extract belong to Compositae was assessed against MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in the view of antioxidative effect for searching the natural resources mitigating or preventing the MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. In this study, MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity was revealed as mid-toxic by Borenfreud and Puerner's toxic criteria, and catalase (CAT), an antioxidant prevented MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity by the remarkable increase of cell viability in these cultures. While, in the protective effect of EP extract on MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity, EP extract effectively prevented the cytotoxicity induced by MnO<sub>2</sub> via antioxidative effects such as xanthine oxidase (XO) inhibitory ability and DPPH-radical scavenging ability. From the above results, EP extract showed the effective prevention against MnO<sub>2</sub>-induced cytotoxicity correlated with oxidative stress by antioxidative effects. Conclusively, this study may be useful to research or development the alternatively therapeutic agent from natural resources like EP extract for the treatment of diseases resulted in oxidative stress.

Key Words: Toxicant, Manganese oxide, Alternative therapeutic agent, Antioxidative effect

# 서 론

망간과 같은 중금속을 비롯하여 농약이나 매연과 같은 유해물질들이 지구환경을 오염시켜 인간의 건강은 물론 삶의 질을 떨어뜨리는데 주된 역할을 하고 있다(Pearce et al., 1989). 특히, 산업공정의 재료로 많이 사용되고 있는 각종 중금속류의 흄이나 분진들은 매연과 함께 대기오염 과 지구온난화를 초래함으로써 인간의 생태계를 급속히 파괴하고 있다(Jung et al., 2017b). 중금속 중 망간은 회백색의 광물질로 산업부문에서 건전지 제조를 비롯하여 도자기 제조, 전기용접 및 타일 제조 등 여러 제조업 공정의주원료로 사용되고 있다(Cho, 1991). 이같은 공정 과정 중 망간의 작은 입자나 분진이 피부를 비롯한 소화기, 호흡기를 통하여 인체에 노출되면 혈액에서 일부는 제거되나일부는 간이나 뇌혈관, 지라 및 폐조직에 축적됨으로써

Received: November 7, 2018 / Revised: December 4, 2018 / Accepted: December 13, 2018

<sup>\*</sup>Professor.

<sup>&</sup>lt;sup>†</sup>Corresponding author: Hyesook Jang. Department of Nursing, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro Wansan-gu, Jeonju-city 55069, Korea. Tel: +82-63-220-4698, Fax: +82-63-220-2054, e-mail: hyesookjang@gmail.com

<sup>©</sup>The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

<sup>©</sup>This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중독을 유발하게 된다(Pearce et al., 1989). 망간화합물 중 이산화망간(MnO<sub>2</sub>)은 주로 건전지 제조에 사용되고 있으 며, 원석 분쇄 시 이의 분진이나 흄에 의해 인체 내로 폭 로되면 중독을 유발한다고 한다. 특히, 피부에 침투되면 크 롬이나 수은처럼 접촉성 피부염과 같은 알러지원(allergen) 으로 작용하여 피부 장벽의 손상을 초래한다고 알려져 있 다(Jung et al., 2014a). 그러나 아직까지 망간 중독에 대한 효과적인 치료방법이 확립되어 있지 않을 뿐만 아니라 이 의 독성현상에 대한 병인기전도 자세히 밝혀지지 않았으 며(Cho, 1991), 세포나 분자수준에서 망간의 피부독성평가 나 기전에 대한 연구는 많지 않다(Fulle et al., 2013). 최근, 망간과 같은 중금속류인 수은이나 카드뮴, 크롬의 독성이 산화적 손상(oxidative stress)과 관련이 있다고 제시되면서 이의 독성에 자유라디칼(free radicals)이 관여하고 있음이 보고된 바 있다(Son et al., 2017). 따라서, 이들의 독성 치료 를 항산화 측면에서 접근하려는 시도가 이루어지고 있다. 근래, 식물화학성분(phytochemicals) 중에는 항산화를 비롯 한 항암, 항염 및 항균 등에 효능이 높은 유효물질들이 다량 함유되어 있어 각종 질환 치료에 유효한 효과를 나 타낸다고 보고되고 있다(Jung et al., 2017a). 식물 중 한련초 (Eclipta prostrata L., EP)는 국화과(Compositae)에 속하는 한 해살이풀로 우리나라 전국에 분포하고 있으며, 주로 논두 렁이나 도랑 등 습지나 논밭주변에 자생하고 있다(Chang, 2003). EP 전초는 8~9월에 개화할 때 채취하여 깨끗이 씻 은 후 햇볕에 건조하여 사용한다. EP는 생약명으로 연자 초나 수한련이라고도 부르는데 맛은 달고 시며, 성은 차 다. 이의 성분으로는 폴리페놀류의 탄닌(tannin)을 비롯한 플라보노이드 계통의 사포닌(saponin), 그리고 웨델로락톤 (wedelolactone)이나 니코틴(nicotine)과 같은 다양한 성분들 을 함유하고 있어(Kim and So, 1995), 오래전부터 만성 감 염을 비롯하여 해독, 항균, 지혈, 음부습양(부인과 질환)과 같은 여러 질환의 치료에 사용되어 왔다. 특히, 이의 성분 중 페놀화합물인 폴리페놀류의 일종인 tannin이나 플라보 노이드 계통의 saponin과 같은 물질은 항산화나 항염에 뛰 어난 효과가 있음은 잘 알려져 있다(Arditi et al., 2000). 그럼에도 불구하고 아직까지 EP를 비롯한 캐모마일과 같 은 국화과 식물 계통의 항산화 작용에 대해서는 소수의 연구 밖에 이루어져 있지 않으며(Jin et al., 2011), 특히, 배 양 세포를 이용한 세포수준에서의 망간독성에 대한 EP 추 출물의 영향을 항산화 측면에서 조사한 연구는 많지 않다 (Kim and So, 1995).

본 연구는 망간화합물의 일종인 MnO2의 독성을 피부

손상 측면에서 알아 보기 위하여 피부에 널리 분포하고 있는 섬유모세포(Kim and Jekal, 2016)인 NIH3T3 섬유모세포주를 배양한 후 세포독성을 정량적으로 분석함과 동시에 이산화망간(MnO<sub>2</sub>)의 독성과 산화적 손상 간의 관련성을 조사하였다. 또한, MnO<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 EP 추출물의 영향을 광도비색분석법(colorimetric assay)에 의해 항산화 측면에서 분석함으로써 산화적 손상과 관련된 독성을 완화 내지는 억제할 수 있는 대체물질의 소재를 천연추출물을 통해 알아 보았다.

# 재료 및 방법

# 실험재료

본 실험에 사용한 NIH3T3 섬유모세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA)에서 분양 받아 사용하였다.

#### 시약 제조

본 실험에 사용한 manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>)를 비롯한 trypsin, ethylalcohol, dimethylsulfoxide (DMSO), aluminum nitrate, xanthine, xanthine oxidase (XO), acetic acid, naphthylamine, catalase (CAT), phosphate buffered saline (PBS) 및 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide disodium salt (XTT)는 Sigma사(Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

# 한련초(EP) 추출

EP는 8월경 전라북도 야산부근에서 채취한 후 대학부설 생명자원과학연구소에서 확인 동정 후 사용하였다. 전초는 깨끗이 세척한 다음 통풍이 잘되고 서늘한 곳에서 말린 후 일정한 길이로 잘라 냉암소에 보관한 다음 시료로 사용하였다. 시료추출을 위해 시료 69.4 g을 파쇄한 다음 시료의 3배 정도의 증류수와 함께 1,000 mL의 환저플라스크에 넣고 2시간 동안 가열하였다. 이 과정을 3회 반복한 다음 추출한 액을 모아 여과후 3,000 rpm에서 30분동안 원침시켰다. 원침 후 진공농축기에서 농축감압한 다음 2.9 g의 시료를 얻었으며 이 때 수율은 4.2%로 나타났다.

# 세포 배양

세포 배양은 Kim and Jekal (2016)의 방법에 따라 trypsin 으로 세포를 배양 용기로부터 탈부착시켰다. 분리된 세포 를  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 산정하여 혈청이 첨가된 배양액에 넣어 96-well plate에 분주하였으며 36<sup>℃</sup>, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 정온기 내에서 72시간 동안 배양 후 실험에 사용하였다.

#### Catalase (CAT)의 항산화능 측정

CAT의 항산화능 조사를 위하여 산소자유라디칼인 35  $\mu$ M  $H_2O_2$ 를 배양 세포에 처리하기 전 CAT가 35  $\mu$ M과 45  $\mu$ M로 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전 배양하였다. 배양 완료 후 세포생존율에 의하여  $H_2O_2$ 의 처리군과 비교 조사하였다.

# MnO<sub>2</sub> 처리

 $MnO_2$ 가 배양 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $110\sim150~\mu M~MnO_2$ 가 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

#### EP 추출물의 세포독성

EP 추출물에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 EP 추출물이 50~130 μg/mL로 각각 포함된 배양액에서 세포를 72시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 세포생존율의 분석방법에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

# 폴리페놀(polyphenol) 및 플라보노이드(flavonoid) 화합 물 함량 분석

폴리페놀 분석은 A.O.A.C. (2005) 방법에 의하여, 추출시료 0.2 mL에 phenol reagent 0.2 mM을 첨가하여 3분 동안 정치하였다. 정치 완료 후 0.4 mL sodium carbonate를 가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 ELISA reader로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 tannic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드 분석은 Nieva Moreno et al. (2000)의 방법에 따라 시료용액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에 에탄올 4.7 mL를 가하여 25℃에서 40분 동안 반응 후 ELISA reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 quercetin을 이용하여 검량곡선을 작성하였다.

# MnO<sub>2</sub>에 대한 EP 추출물의 영향

 $MnO_2$ 에 대한 EP 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT $_{50}$  농도의  $MnO_2$ 를 처리하기 전에 90  $\mu g/m$ L와 110  $\mu g/m$ L 농도의 EP 추출물이 각각 들어 있는 배양액에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후  $MnO_2$ 의

처리군과 세포생존율을 비교 조사하였다.

#### 세포생존율(cell viability) 측정

Mosmann (1983)의 방법에 따라 약제나 추출물을 처리한 세포에 제조한 XTT 50 mg/mL를 배양용기당 10 μL씩 넣고 4시간 동안 정치하였다. 정치 완료 후 DMSO를 넣은 다음 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

# Xanthine oxidase (XO) 저해능 측정

XO 저해활성(XO inhibitory activity)의 측정은 Stirpe and Corte (1969)의 방법에 따라 농도별 희석추출물 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 2 mM xanthine 기질액 0.2 mL를 첨가하고 여기에 XO (0.2 U/mL) 0.1 mL를 가한 후 25℃에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 ELISA reader로 292 nm에서 생성된 uric acid를 측정하였다. XO 저해능(XO inhibitory ability)은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율을 시료첨가군에 의한 백분율로 표시하였다. 또한, CAT의 활성을 양성대조군으로 하여 비교 조사하였다. XO 저해능(%) = 100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100].

#### DPPH-radical 소거능 측정

DPPH-radical 소거활성(DPPH-radical scavenging activity, DPPH-RSA)은 Blois (1958)의 방법에 따라 메탄올에 녹인 시료에 0.3 mM DPPH 메탄올용액 100 μL를 넣고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 ELISA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH-radical 소거능 (DPPH-radical scavenging ability)은 시료첨가군과 무첨군간의 차이를 시료무첨군에 의한 백분율로 나타냈으며 CAT의 활성을 양성대조군으로 하여 비교 조사하였다. DPPH-radical 소거능(%) = 100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100].

#### 통계 처리

실험 결과는 SPSS/WIN 18.0을 이용하여 군간의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA를 시행하였고 사후 분석은 Tukey's HSD로 하였다. 모든 통계의 유의수준은 *P*-value가 0.05 미만의 경우를 유의한 것으로 채택하였다.

Table 1. The manganese dioxide ( $MnO_2$ )-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentrations of MnO <sub>2</sub> (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean ± SD			
Control <sup>a</sup>	0.26±0.03	82.65	<.001	a>b>c>d
110 <sup>b</sup>	$0.18\pm0.02$			
130°	$0.15\pm0.02$			
150 <sup>d</sup>	$0.11\pm0.02$			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were incubated with media containing concentrations of 110, 130 and 150  $\mu M$  MnO2, respectively. The data indicate the mean  $\pm SD$  for triplicate experiments. Significantly different from the control

# 결 과

### MnO<sub>2</sub>의 독성 측정

 $MnO_2$ 의 독성 측정을 위하여  $MnO_2$ 가  $110\sim150~\mu Mz$  농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 유의하게 감소하였으며, 이 과정에서  $XTT_{50}$  값은  $140.0~\mu Mz$  나타났다(P<0.001) (Table 1).  $MnO_2$ 의 세포생존율에 대한 사후분석 결과 대조군,  $MnO_2$   $110~\mu M$ ,  $130~\mu M$ ,  $150~\mu M$  순으로 세포생존율이 높음을 알 수 있었다.

## CAT의 항산화능 측정

CAT의 항산화능을 조사하기 위하여, 자유라디칼의 일 종인  $H_2O_2$ 를 배양 세포에 처리하기 전에 항산화제인 CAT 35  $\mu$ M과 45  $\mu$ M을 각각 세포에 2시간 동안 전 처리한 결과, 35  $\mu$ M  $H_2O_2$ 만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 51.6% (0.16±0.01)로 나타났다(P<0.001). 반면, 35  $\mu$ M CAT의 처리에서는 83.9% (0.26±0.02), 45  $\mu$ M CAT 처리에서는 93.5% (0.29±0.02)로 나타났다(P<0.001) (Table 2). CAT의 항산화능에 대한 사후분석 결과 대조군, CAT 45  $\mu$ M, CAT 35  $\mu$ M,  $H_2O_2$  35  $\mu$ M 순으로 세포생존율이 높음을 알 수 있었으며, CAT 45  $\mu$ M은 대조군과 CAT 35  $\mu$ M 각각에 통계적인 차이가 없었다.

# MnO2의 세포독성에 대한 CAT의 영향

 $MnO_2$ 의 세포독성에 대한 항산화제인 CAT의 영향을 알아보기 위하여  $XTT_{50}$  농도의  $MnO_2$ 를 배양 세포에 처리하기 전 CAT가 35  $\mu$ M과 45  $\mu$ M로 각각 포함된 배양액에서 세포를 2시간 동안 전 처리한 결과,  $XTT_{50}$  농도인

**Table 2.** The antioxidative ability of catalase (CAT) on the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentrations of CAT (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean ± SD			
Control <sup>a</sup>	0.31±0.05	60.10	-0.001	1
$35 H_2O_2^b$	$0.16\pm0.01$			
35 <sup>c</sup>	$0.26\pm0.02$	60.10	< 0.001	a>c>b
45 <sup>d</sup>	$0.29\pm0.02$			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were preincubated with CAT at concentrations of 35 and 45  $\mu$ M, respectively. The data indicate the mean  $\pm$ SD for triplicate experiments. Significantly different from the H<sub>2</sub>O-treated group

Table 3. The effect of catalase (CAT) on the manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>)-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts

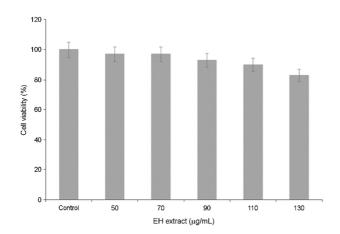
Concentrations	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey
of CAT (μM)	Mean ± SD			HSD
Control <sup>a</sup>	0.26±0.02			
$XTT_{50} (MnO_2)^b$	$0.12\pm0.01$	02.51	د0.001	-> -1 -> 1-
35°	$0.19\pm0.02$	92.51	< 0.001	a>d,c>b
45 <sup>d</sup>	$0.21\pm0.02$			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were preincubated with CAT at concentrations of 35 and 45  $\mu$ M, respectively. The data indicate the mean  $\pm$ SD for triplicate experiments. Significantly different from the MnO<sub>2</sub>-treated group

MnO<sub>2</sub>만의 처리에서는 세포생존율이 46.2% (0.12±0.01) 로 나타난 반면, 35 μM CAT 처리에서 73.1% (0.19±0.02), 45 μM CAT 처리에서 80.8% (0.21±0.02)로 나타나 통계적으로 모두 유의한 차이를 보였다(*P*<0.001) (Table 3). MnO<sub>2</sub>의 세포독성과 항산화제의 영향에 따른 사후검정 결과 대조군, 45 μM CAT와 35 μM CAT, XTT<sub>50</sub> (MnO<sub>2</sub>) 순으로 세포생존율이 높음을 알 수 있었다.

### 한련초(EP) 추출물의 세포독성

EP의 세포독성을 알아보기 위하여 추출물이 50~130 μg/mL로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양하였다. 그 결과 50 μg/mL과 70 μg/mL의 처리에서는 세포생존율이 대조군(0.30±0.03)에 비하여 97.0% (0.29±0.02)와 97.0% (0.29±0.02)로 모두 같게 나타났다. 또한, 90 μg/mL, 110 μg/mL, 130 μg/mL 처리에서는 93.0% (0.28±0.01), 90.0% (0.27±0.02), 83.0% (0.25±0.02)로 각각 나타났다(Table 4) (Fig. 1).



**Fig. 1.** The cytotoxicity of *Eclipta prostrata* L. (EP) extract by XTT assay. The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments.

Table 4. The cytotoxicity of Eclipta prostrata L. Extract

Concentrations of EP extract	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey
(μg/mL)	$\text{Mean} \pm \text{SD}$			HSD
Control <sup>a</sup>	0.30±0.03			
50 <sup>b</sup>	$0.29 \pm 0.02$			
70°	$0.29\pm0.02$	2.60	0.000	- > <b>f</b>
$90^{d}$	$0.28\pm0.01$	3.60	=0.008	a>f
110 <sup>e</sup>	$0.27 \pm 0.02$			
130 <sup>f</sup>	$0.25\pm0.02$			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were incubated with EP extract at concentrations of 50, 70, 90, 110 and 130  $\mu$ g/mL, respectively. The data indicate the mean  $\pm$ SD for triplicate experiments. Significantly different from the control

따라서, 최대허용한계농도가 110 μg/mL 이상에서 나타남으로써 본 실험에서는 110 μg/mL 이하 농도를 사용하였다. 한편, 50~110 μg/mL 처리 사이에서는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 130 μg/mL 처리에서는 유의한 차이를 나타냈다(P<0.001). EP의 세포독성에 따른사후검정 결과 대조군에 비해 EP 130 μg/mL는 세포생존율이 낮았으나, 다른 농도들에서는 대조군과 통계적인 유의성이 없는 것으로 나타났다.

# 폴리페놀 및 플라보노이드 화합물 함량 분석

EP 추출물에 대한 성분 함량 분석 결과 폴리페놀의 총 함량은 51.4 mg/g으로 나타났으며, 플라보노이드 총 함량 은 25.9 mg/g으로 각각 나타났다(Fig. 2).

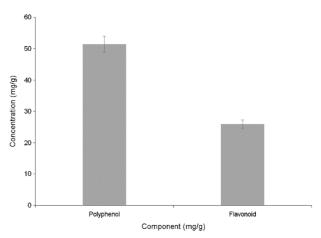


Fig. 2. Total polyphenol and flavonoid of EP extract. The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments.

**Table 5.** The protective effect of *Eclipta prostrata* L. (EP) extract on manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>)-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentrations of EP extract	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
$(\mu g/mL)$	Mean ± SD			пор
Control <sup>a</sup>	0.37±0.03			
$XTT_{50} (MnO_2)^b$	$0.15 \pm 0.02$	11400	-0.001	a>d>c>b
90°	$0.23 \pm 0.02$	114.08	<0.001	a>u>c>b
110 <sup>d</sup>	$0.28 \pm 0.02$			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were preincubated with EP extract at concentrations of 90  $\mu$ g/mL and 110  $\mu$ g/mL, respectively. The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. Significantly different from the MnO<sub>2</sub>-treated group

# MnO2의 세포독성에 대한 EP 추출물의 영향

MnO<sub>2</sub>의 세포독성에 EP 추출물이 미치는 영향을 조사하기 위하여 XTT<sub>50</sub> 값의 MnO<sub>2</sub>를 배양 세포에 처리하기전에 90 μg/mL와 110 μg/mL의 EP 추출물이 포함된 배양액에서 세포를 각각 2시간 동안 전 배양한 결과, MnO<sub>2</sub>만의 처리에서는 세포생존율은 대조군인 100% (0.37±0.03)에 비하여 40.5% (0.15±0.02)로 매우 감소한 것으로 나타났다. 반면, 90 μg/mL EP 추출물 처리에 있어서 세포생존율은 62.2% (0.23±0.02)로, 110 μg/mL 추출물의 처리에서는 75.7% (0.28±0.02)로 나타났다(P<0.001) (Table 5). EP 추출물이 MnO<sub>2</sub>의 세포독성에 미치는 영향에 대한 사후검정결과 대조군, EP 추출물 110 μg/mL, EP 추출물 90 μg/mL, XTT<sub>50</sub> (MnO<sub>2</sub>) 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었

**Table 6.** The xanthine oxidase (XO) inhibitory activity of *Eclipta prostrata* L. (EP) extract

Concentrations of EP extract (µg/mL)	XO inhibitory activity (292 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean ± SD			
Control <sup>a</sup>	0.28±0.02			
45 μM CAT <sup>b</sup>	$0.04\pm0.01$	102.01	-0.001	L. J
90°	$0.22 \pm 0.02$	102.91	< 0.001	b>d,c>a
110 <sup>d</sup>	$0.20\pm0.05$			

The data indicate the mean  $\pm SD$  for triplicate experiments. CAT was used as positive control. Significantly different from the control

#### 다(Table 5).

#### Xanthine oxidase (XO) 저해능 측정

EP 추출물에 대한 XO 저해활성(XO inhibitory activity)의 측정 결과 EP 추출물 90 μg/mL 농도에서는 대조군에 비 하여 활성이 78.6% (0.22±0.02)로 나타났으며, EP 추출물 110 μg/mL 농도에서는 71.4% (0.20±0.05), CAT 45 μM 처리 에서는 14.3% (0.04±0.01)로 점차 감소한 것으로 나타났다 (Table 6). 따라서, EP 추출물 90 μg/mL와 110 μg/mL의 XO 저해능(XO inhibitory ability)은 각각 21.4%와 28.6%로, CAT 45 μM의 저해능은 85.7%로 대조군에 비하여 통계적으로 유의하였다(P<0.001). XO 저해능은 사후검정 결과 CAT 45 μM, EP 추출물 110 μg/mL과 90 μg/mL, 대조군 순으로 높은 것으로 나타났다. 대조군과 CAT, 대조군과 EP 추출 물 90 μg/mL, 대조군과 EP 추출물 110 μg/mL은 각각 그룹 간 차의가 유의하였다(P<0.001, P=0.002, P<0.001). CAT와 EP 추출물 90 μg/mL, CAT와 EP 추출물 110 μg/mL도 각각 그룹간의 차의가 유의하였다(P<0.001, P<0.001). EP 추출 물 90 μg/mL과 EP 추출물 110 μg/mL은 유의한 차이가 없 었다(P=0.374).

# DPPH-radical 소거능 측정

EP 추출물 시료에 대한 DPPH-radical 소거활성(DPPH-radical scavenging activity, DPPH-RSA)을 조사한 결과 90 μg/mL EP 추출물 처리에서는 소거활성이 81.8% (0.27±0.01)로 나타났으며, 110 μg/mL EP 추출물 처리에서는 75.8% (0.25±0.03)로 나타났다. 또한 CAT 45 μM 처리에서는 12.1% (0.04±0.01)로 나타났다(Table 7). 따라서, EP 추출물라디칼 소거능(radical scavenging ability)은 90 μg/mL와 110 μg/mL, CAT 45 μM에서 각각 18.2%와 24.2%, 87.9%로

**Table 7.** The DPPH-radical scavenging activity (DPPH-RSA) of *Eclipta prostrata* L. (EP) extract

Concentrations of EP extract	DPPH-RSA (517 nm)	F	P	Tukey
$(\mu g/mL)$	Mean ± SD	-		HSD
Control <sup>a</sup>	0.33±0.04			
45 μM CAT <sup>b</sup>	$0.04\pm0.01$	166.40	-0.001	
90°	$0.27 \pm 0.01$	100.40	<0.001	a>c,d>b
110 <sup>d</sup>	$0.25 \pm 0.03$			

The data indicate the mean  $\pm$  SD for triplicate experiments. CAT was used as positive control. Significantly different from the control

대조군에 비하여 통계적으로 유의하였다(*P*<0.001). DPPH-radical 소거능의 사후검정 결과 CAT 45 μM, EP 추출물 110 μg/mL와 90 μg/mL, 대조군 순으로 높은 것으로 나타났다. 대조군과 CAT, 대조군과 EP 추출물 90 μg/mL, 대조군과 EP 추출물 110 μg/mL은 각각 그룹간 차이가 유의하게 나타났다(*P*<0.001, *P*=0.001, *P*<0.001). CAT와 EP 추출물 90 μg/mL, CAT와 EP 추출물 110 μg/mL도 각각 그룹간에 유의한 차이가 있었다(*P*<0.001, *P*<0.001). EP 추출물 90 μg/mL과 EP 추출물 110 μg/mL은 유의한 차이가 없었다(*P*=0.560).

### 고 찰

망간은 중금속의 일종으로 환경오염원이면서도 니켈이 나 카드뮴과 같이 접촉성 피부염의 알러젠으로 작용하고 있다(Jung et al., 2014a). 망간산화물 중 이산화망간(MnO<sub>2</sub>) 은 건전지나 전기용접봉제조와 같은 일상생활과 밀접한 관련이 있는 화학공정에 사용되기 때문에 이의 중독이 사회적 문제로 떠 오르게 되었다(Pearce et al., 1989). 따라 서, 본 연구에서는 MnO<sub>2</sub>의 세포독성을 배양 NIH3T3 섬 유모세포를 재료로 조사한 결과 MnO2는 처리 농도에 비 례하여 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로써 세포독성 을 나타냈다. 또한, XTT<sub>50</sub> 값이 140.0 μM로 나타나 이는 Borenfreund and Puerner (1984)의 독성판정기준에 의하여 중간독성(mid-cytotoxic)인 것으로 나타남으로써 MnO2가 알루미늄과 비슷한 세포독성을 가지고 있음을 알 수 있었 다(Jung et al., 2017b). 한편, 납이나 수은 및 크롬과 같은 몇몇 중금속류는 붕괴 시 자유라디칼을 발생함으로써 이 들의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시된 바 있 다(Jung et al., 2017a). 본 연구에서는 MnO2의 세포독성이

산화적 손상과 관련이 있는가를 알아보기 위하여 항산화 제의 일종인 catalase (CAT)를 배양 세포에 전 처리한 후 MnO2의 처리군과 세포생존율을 비교 조사하였다. 그 결 과 CAT의 처리군이 MnO2의 처리군에 비하여 유의한 세 포생존율의 증가를 보였다. 본 실험 결과는 MnO2의 독성 을 항산화제인 CAT가 방어한 것으로서, 이는 다시말해 MnO2의 독성이 산화적 손상과 관련이 있음을 제시하고 있다. 이와 상통한 연구의 하나로 Jung et al. (2014b)이 항 산화제인 vitamin E가 납독성을 방어했다는 연구 보고가 이를 뒷받침하고 있다. CAT나 vitamin E는 모두 자유라디 칼을 제거하는 항산화제로서, 특히 CAT는 인체 내에서 superoxide dismutase (SOD)와 함께 대사 과정 중에 생성되 는 자유라디칼을 제거해 주는 중요한 항산화 효소인 것을 근거로 할 때 위 연구들은 모두 납이나 망간독성이 자유 라디칼과 관련되어 있음을 시사하고 있다. 한편, MnO2의 세포독성에 대한 한련초(Eclipta prostrata L., EP) 추출물의 영향을 알아 보기 위하여  $XTT_{50}$  농도의  $MnO_2$ 를 배양 세 포에 처리하기 전에 90 μg/mL와 110 μg/mL의 EP 추출물 을 각각 배양 세포에 전 처리한 결과 모두 MnO2만의 처 리에 비하여 유의한 세포생존율을 보였다. 이는 EP 추출 물이 MnO2의 독성을 효과적으로 방어하였음을 말해 주고 있다. 이같은 이유로는 본 연구의 성분 함량 분석에서와 같이 EP 추출물속에 함유되어 있는 폴리페놀과 플라보노 이드 계통인 tannin이나 saponin과 같은 강력한 항산화 성 분의 영향인 것으로 생각된다(Kim and So, 1995). 따라서, 본 연구에서는 EP 추출물에 대한 항산화능을 조사하기 위 하여 XO 저해능을 비롯하여 DPPH-radical 소거능을 분석 하였다. 먼저, XO 저해능의 분석에서, EP 추출물 90 μg/mL 와 110 μg/mL의 농도에서 모두 대조군에 비하여 21.4%와 28.6%의 유의한 저해능을 나타냈다. XO는 비특이적 효 소로서 이는 산소를 전자수용체로 이동하여 xanthine이나 hypoxanthine (HX)으로부터 uric acid를 합성하는데, 이 과 정 중에 자유라디칼이 생성된다. 따라서, XO 활성은 자 유라디칼과 밀접한 관련이 있다(Hwang et al., 2011). 한편, DPPH-radical 소거능의 분석에 있어서 EP 추출물 90 μg/ mL와 110 μg/mL의 농도에서 모두 대조군에 비하여 18.2% 와 24.2%의 유의한 라디칼 소거능을 나타냈다. 라디칼 소 거능 분석은 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제 하는 능력을 분석하는 것을 의미하고 있다(Lim et al., 2007). 따라서, EP 추출물은 본 실험에서 XO 저해능과 DPPHradical 소거능과 같은 항산화능이 있음이 증명되었다. 이 같은 결과는 EP 추출물 속에 함유되어 있는 폴리페놀류나

플라보노이드류의 항산화 성분이 단독 또는 복합적으로 작용한 결과일 것으로 생각된다.

#### ACKNOWLEDGEMENT

이 논문은 2018년도 원광대학교 산본병원의 연구지원 에 의해 수행됨.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

#### REFERENCES

- A.O.A.C. Official method of analysis. 18th ed., Association of official analytical chemists. Washington DC USA. 2005. 45: 21-21.
- Arditi T, Meredith T, Floweman P. Renewed interest in soy isoflavones and saponin. Cereal Foods World. 2000. 45: 414-417.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1958. 26: 1199-1200.
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). Journal of Tissue Culture Methods. 1984. 9: 7-9.
- Chang JK. Wild flower for body health. 1st ed. Seoul: Nexusbook academic publishing; 2003. p.150.
- Cho KS. Occupational health. 2nd ed. Seoul: Sumunsa academic publishing; 1991. pp. 315-319.
- Fulle S, Withers-Martinez C, Blackman MJ, Morris GM, Finn PW. Molecular determinants of binding to the plasmodium subtilism -like protease 1. Journal of Chemistry and Inflammatory Model. 2013. 53: 573-583.
- Hwang JD, Choi JS, Kim JB, Lee YS. Antioxidant activities of bark extracts from *Kalopanax pictus*. Journal of Investigative Cosmetology. 2011. 7: 329-337.
- Jin EY, Han SH, Seo YM. Effect of German chemomile extract on the cell adhesion activity and melanin synthesis in cultured human skin melanoma cells damaged by xanthine oxidase/ hypoxanthine. Journal of Korean Society People Plants Environment. 2011. 14: 215-220.
- Jung JY, Oh SK, Park SH, Yoon MY, Yu YW, Rim YS, Jung IJ.
  Antioxidative effect of Ajuga multiflora BUNG extract on chromium trioxide, dermatitis induced in cultured NIH3T3 fibroblast. Journal of Investigative Cosmetology. 2014a. 10: 21-26
- Jung JY, Oh YH, Park SH, Yoon MY, Pyo AJ, et al. Antioxidative

- and whitening effects of *Houttuynia cordata* extract on lead acetate of hair dye component. Journal of Investigative Cosmetology. 2014b. 10: 99-105.
- Jung JY, Jang HS, Seo YM. Protective effect of *Ajuga multiflora* BUNG extract on lead toxicity of environmental pollutant. Journal of Korean Society People Plants Environment. 2017a. 20: 341-350.
- Jung IJ, Seo YM, Jekal SJ. The protective effect of rosmarinic acid on the aluminum of dementia inducer. Korean Journal of Clinical Laboratory Society. 2017b. 49: 8-14.
- Kim JC, So BK. Traditional drugs of the East. 1st ed. Seoul: Youngrim academic publishing; 1995. p.339.
- Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. Korean Journal of Clinical Laboratory Society. 2016. 48: 1-7.
- Lim JA, Oh HJ, Baek SH. Antiaging ability of methanol extract from *Euonymus alatus*. Journal of Cosmetology and Public Health. 2007. 3: 41-45.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxic assays. Journal of Immunological Methods. 1983. 65: 55-63.

- Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the three radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethmopharmacology. 2000. 71: 109-114.
- Pearce N, Checkoway H, Dement JM. Design and conduct of occupational epidermology studies: III. Design aspects of casecontrol studies. American Journal of Industrial Medicine. 1989. 15: 395-401.
- Son YW, Rim YS, Seo YM. Protective effect of NMDA receptor antagonist on the neurotoxicity induced by lead as an environmental pollutant. Journal of Korean Society of Occupational and Environmental Hygiene. 2017. 27: 193-200.
- Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Journal of Biology and Chemistry. 1969. 244: 3855-3861.

#### https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357

**Cite this article as:** Lee SH, Jung IJ, Jang H. The Antioxidative Effect of *Eclipta prostrata* L. Extract on Cultured NIH3T3 Fibroblasts Injured by Manganese-Induced Cytotoxicity. Biomedical Science Letters. 2018. 24: 357-364.