

황산카드뮴독성의 산화적 손상에 대한 부들 추출물의 항산화 효과

윤기철 · 손영우[†]

원광대학교 의과대학 산본병원 소화기내과

Antioxidative Effect of *Typha orientalis* L. Extract on the Oxidative Stress Induced by Cytotoxicity of Cadmium Sulfate

Ki Chul Yoon and Young Woo Sohn[†]

Department of Digestive Internal Medicine, Sanbon Hospital, School of Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives: This study was carried out to analyze the cytotoxicity of cadmium sulfate (CdSO_4) and the antioxidative effect of *Typha orientalis* L. (TO) extract on the oxidative stress induced by cytotoxicity of CdSO_4 in the cultured NIH3T3 fibroblasts.

Methods: For this study, the cell viability and the antioxidative effects such as the inhibitory activity of lipid peroxidation (LP) and superoxide dismutase (SOD)-like activity and xanthine oxidase (XO)-inhibitory activity were assessed.

Results: The cadmium sulfate significantly decreased cell viability in dose-dependently, and XTT_{50} value was measured at $47.4 \mu\text{M}$ of CdSO_4 . The cytotoxicity of CdSO_4 was determined as highly toxic by Borenfreund and Puerner's toxic criteria. The butylated hydroxytoluene (BHT) as antioxidant significantly increased cell viability injured by CdSO_4 -induced cytotoxicity in these cultures. In the protective effect of TO extract on CdSO_4 -induced cytotoxicity, TO extract remarkably increased the inhibitory ability of LP and XO as well as SOD-like ability.

Conclusions: From the above results, it is suggested that the oxidative stress is involved in the cytotoxicity of CdSO_4 , and TO extract effectively protected CdSO_4 -induced cytotoxicity by antioxidative effects. The natural component like TO extract may be a putative therapeutic agent for treatment of the toxicity induced by heavy metallic compound like CdSO_4 correlated with the oxidative stress.

Keywords: Oxidative stress, heavy metallic compound, antioxidative effects

I. 서 론

카드뮴을 비롯한 각종 중금속은 인체를 비롯한 식물이나 환약제 등에 소량 분포하여 대사활동에 도움을 주지만 다량 함유된 경우는 병인으로 작용한다.¹⁾ 카드뮴은 수은이나 납처럼 환경오염물질의 하나로 푸른색의 은백색 물질로 자연상태에서는 주로 아연이나 동, 납과 같은 광석에 섞여 있어 이들의 제련

시에 부산물로 얻어진다.²⁾ 카드뮴의 독성은 1910년 경 일본의 도야마현 진쓰강 유역의 주민들에게 증상이 나타나기 시작하면서 알려졌는데 1968년경에서야 일본 후생성에서 폐광내의 카드뮴이 원인임을 밝혀냈다. 카드뮴은 자동차나 항공기산업을 비롯하여 농약이나 비료, 치과용아말감 등과 같은 다양한 산업부문에서 중요 원료로 사용되고 있다.³⁾ 카드뮴이 인체내로 노출될 경우, 간이나 신장손상은 물론, 피

[†]Corresponding author: Department of Internal Medicine, Wonkwang University College of Medicine, Sanbon Hospital, 327 Sanbon-ro, Kunpo-city, Gyeonggi-do 15865, Korea, Tel: +82-31-390-2202, Fax: +82-31-398-2223, E-mail: giyoung@wku.ac.kr

Received: 31 January 2019, Revised: 18 February 2019, Accepted: 20 February 2019

부접촉 시에는 염증을 동반한 피부염을 유발한다고도 알려져 있다.⁴⁾ 카드뮴 중독시에는 오심이나 구토와 같은 자각증상을 나타내는 동시에 신장을 비롯한 골격이나 피부 등에도 심각한 영향을 준다고 한다.⁵⁾ 신장의 경우, 근위신세뇨관세포 손상에 의한 단백뇨를 비롯하여 아미노산뇨, 인의 신세관 재흡수 저해와 같은 여러 임상적 증상을 나타내며, 또한, 골격계에도 극심한 통증과 함께 뼈골절(fracture)이나 뼈연화(osteomalasia), 골다공증(osteoporosis)과 같은 여러 병변을 일으킴으로서 이타이-이타이(itai-itai)병으로도 잘 알려져 있다.⁶⁾ 그럼에도 불구하고 아직까지 카드뮴의 독성현상에 대한 자세한 병인기전은 물론, 중독에 의한 효과적인 치료약제나 방법에 있어서 매우 부족한 실정에 있다.⁷⁾ 최근, 카드뮴을 비롯한 수은이나 납과 같은 몇몇 중금속의 독성이 산화적 손상(oxidative stress)과 관련이 있다고 제시되면서 이에 대한 치료를 항산화 측면에서 접근하려는 시도가 이루어지고 있다.⁵⁾ 산화적 손상은 세포내 catalase나 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화효소의 활성저해를 비롯하여 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 반응촉진, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 활성 및 peroxynitrite 독성물질의 생성과 같은 세포퇴행성 변화를 초래한다고 알려져 있다.⁸⁾ 카드뮴염화합물 중 황산카드뮴(cadmium sulfate, CdSO₄)은 염화카드뮴과 같이 사용용도가 넓어 카드뮴전지의 전극제조를 비롯한 광전지중간체, 안료나 형광체, 분석시약 및 의약품제조 등과 같은 여러 공정에 사용되는데 이의 독성때문에 취급시에는 각별한 주의를 요하고 있다.⁵⁾ 더욱이, CdSO₄에 의한 노출은 발암성을 비롯하여 돌연변이성, 생식독성과 같은 증상을 유발하기 때문에 이의 사용량의 증가와 함께 독성에 대한 관심이 점점 높아가고 있다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 CdSO₄ 역시 독성평가나 작용현상에 대한 규명이 미흡한 상태에 있을 뿐만 아니라 더욱이 배양세포를 대상으로 한 산화적 손상 측면에서의 연구는 매우 드물다.⁹⁾ 최근, 각종 식물에는 항산화를 비롯한 항암, 항염증, 항균 등에 유효한 생리활성성분이 다량 함유되어 있다고 알려지면서 이들의 성분에 대한 약리적 연구가 이루어지고 있다.¹⁰⁾ 특히, 식물함유성분 중 페놀화합물(phenolic compound)이나 이소프레노이드(isoprenoids)와 같은

성분은 항산화나 항염효과가 뛰어나 각종 질환에 유효한 효과가 있다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 이 중, 페놀화합물들은 이들의 분자구조에 한 개 또는 수개의 수산기(-OH)를 가지고 있어 다른 물질과의 화합력이 뛰어나기 때문에 강력한 항산화 작용을 나타낸다고 한다.¹¹⁾ 한편, 식물 중 부들(*Typha orientalis* L., TO)은 부들과(Typhaceae)에 속하는 여러해살이풀로서 주로 우리나라 전국의 강가나 연못 또는 수로에 서식하고 있다. TO는 감포 또는 포화 등으로도 불리우는데 전초를 약재로 사용하지만, 특히 개화할 때 솜뭉치에 붙어 있는 화분을 약재로 많이 사용하여 왔다. TO에는 플라보노이드 배당체인 이소람네티(isorhamnetin)와 퀘세틴(quercetin)을 비롯한, 시스테인(cysteine), 세린(serine), 프롤린(proline)과 같은 아미노산 및 지방유를 다량 함유하고 있다.¹²⁾ 따라서, 오래전부터 지혈과 통증을 위시하여 항염, 항균, 약성종기나 대하증과 같은 질환에 사용하여 왔으며 특히, 플라보노이드나 폴리페놀류는 뛰어난 항산화작용을 나타낸다고 잘 알려져 있다.¹²⁾ 그럼에도 불구하고, TO에 대한 항산화 측면에서의 연구는 많이 되어 있지 않다.¹⁴⁾ 근래, 세포배양기술이 널리 보급되면서 배양 세포를 이용하여 병인현상에 대한 기전이나 병변치료 및 화학물질의 안전성 검사 등에 유용한 분석도구로 자리잡고 있다.¹⁵⁾ 특히, 배양세포는 동물의 희생없이 형태적, 화학적 특성이 동일한 재료를 단시간내에 다량 확보할 수 있을 뿐만 아니라 수회의 반복실험이 가능하기 때문에 재현성이 뛰어나다는 장점을 가지고 있다.¹⁶⁾ 본 연구는 CdSO₄의 세포독성에 대한 기전을 산화적 손상 측면에서 밝히기 위하여 CdSO₄ 독성이 항산화제에 미치는 영향을 대한임상검사학회지의 Jung 등¹⁴⁾을 근거로 세포생존율에 의해 조사함으로써 CdSO₄의 독성과 산화적 손상과의 연관성을 분석하였으며, 또한 CdSO₄의 산화적 손상에 대한 TO 추출물의 영향을 LP 저해능¹⁷⁾을 비롯한 SOD-유사 활성능¹⁸⁾ 및 xanthine oxidase (XO) 저해능¹⁸⁾과 같은 항산화 측면에서 분석하였다. 이를 위하여, 피부에 널리 분포하고 있는 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 산화적 손상과 관련된 중금속류의 중독에 대한 예방 내지는 치료적 대체물질을 천연소재에서 찾고자 하였다.

II. 연구 방법

1. 세포주

NIH3T3 섬유모세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, CRL 1658)에서 분양 받아 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로는 cadmium sulfate (CdSO_4)를 비롯한 trypsin, butylated hydroxytoluene (BHT), linoleic acid, pyrogallol, xanthine, linoleic acid, xanthine, potassium phosphate buffer (pH 7.5), ferrous chloride, isopropanol, hydrogen peroxide (H_2O_2), phosphate buffered saline (PBS) 및 XTT는 Sigma사(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CdSO_4 의 제조는 XTT₅₀값을 구하기 위하여 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 없는 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)을 사용하여 각각 40~60 μM 의 저장액을 만들어 사용하였다.

XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt)는 PBS를 이용하여 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저장액을 만든 후 냉암소에 보관한 다음 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. 부들(TO) 채취 및 추출

전북 야산에서 TO의 전초를 채취하여 잘 씻은 다음 햇볕이 들지 않고 통풍이 잘 되는 그늘에서 말린 후 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 추출을 위하여 보관중인 시료 78.3 g을 잘게 파쇄한 다음 시료와 이의 3배 정도의 물을 1,000 mL의 환저 플라스크에 함께 넣고 3시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 4회 반복 추출하여 여과한 다음 3,000 rpm에서 30분 동안 원심 후 진공농축기로 감압농축시킨 다음 3.0 g의 시료를 얻었으며, 이 때 추출재료의 총무게에 대한 농축추출시료총량의 백분율인 수율¹⁹⁾은 3.8%로 나타났다.

4. 세포 배양

NIH3T3 섬유모세포의 배양은 Jung 등³⁾의 방법에 따라 배양용기에 부착된 세포를 trypsin을 이용한 효소해리술에 의하여 분리하였다. 배양 용기로부터 분

리된 세포들은 원심시킨 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣고 균질화 한 다음 1×10^5 cells/well 이 되도록 96-well 배양용기에 분주하였다. 분주된 세포들은 36°C, 5% CO_2 로 조절된 항온기내에서 72 시간 동안 배양하였다.

5. 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann²⁰⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉, 약제나 추출물의 처리가 끝난 배양 세포에 실험 당일 제조한 XTT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 well당 10 μL 씩 넣고 36°C로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 isopropanol을 넣어 실온에서 일정 시간 정치한 다음 ELISA (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. XTT₅₀값의 산출은 회귀직선식에 의하여 산출하였다.

6. CdSO_4 처리

배양중인 NIH3T3 섬유모세포에 CdSO_4 추출물이 40~60 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포생존율을 대조군과 비교하여 XTT₅₀ 농도를 측정하였다.

7. BHT의 항산화능 측정

BHT의 항산화능 조사를 위하여 H_2O_2 25 μM 를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 BHT, 40 μM 과 55 μM 농도를 각각 배양 세포에 처리한 다음 H_2O_2 로 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

8. CdSO_4 독성에 대한 BHT의 영향

XTT₅₀ 농도의 CdSO_4 를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 40 μM 과 55 μM 로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 CdSO_4 를 처리한 후 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

9. 부들(TO) 추출물 처리

CdSO_4 에 대한 TO 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 CdSO_4 XTT₅₀ 농도를 처리하기 2시간 전에 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 추출물이 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 CdSO_4 를 처리한 후 이의 영향을 세포생존율에 의하여 대조군

과 비교 조사하였다.

10. 부들(TO) 추출물의 함량 분석

폴리페놀분석은 A.O.A.C.²¹⁾의 방법에 따라, 추출 시료 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 ELISA로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 tannic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드 분석은 Nieva Moreno 등²²⁾의 방법에 따라, 시료용액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에 에탄올 4.7 mL를 가하여 25°C에서 40분 동안 반응 후 ELISA로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 quercetin을 이용하여 검량곡선을 작성하였다.

11. 지질과산화(lipid peroxidation, LP) 저해능 측정

LP 저해능(LP inhibitory ability)의 측정은 Kikuzaki와 Nakatani²³⁾의 방법에 따라, 시료 3.9 mL를 에탄올과 혼합하고 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH 7.0)용액 12.1 mL를 첨가하여 40°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate로 처리한 다음 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 가하여 실온에서 3분 동안 정치하였다. 정치 완료 후 ELISA로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수를 대조군으로 사용하였으며, BHT를 양성대조군으로 하여 비교 조사하였으며, LP 저해능은 대조군에 대한 백분율로 나타났다. 또한, LP 저해능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈으며, 시료 3.9 mL를 넣은 군과 시료를 넣지 않은 군을 각각 시료첨가군과 시료무첨가군으로 하였고, 이 때 대조군을 0으로 표시하였다.

12. SOD-유사 활성능 측정

SOD-유사활성능(SOD-like ability)의 측정은 Marklund와 Marklund²⁴⁾의 방법에 따랐다. 즉, 시료 0.2 mL에 산화반응액인 Tris-HCl buffer와 10 mM pyrogallol을 넣고 25°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 HCl로 반응을 정지시킨 다음 ELISA로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, BHT의 유사 활성능을 양성대조군으로 하여 조사하였다. 유

사활성능은 대조군에 대한 백분율로 나타났다. 또한, 유사활성능(%)=100×[(시료첨가군의 흡광도-시료무첨가군 흡광도/시료무첨가군의 흡광도)]로 나타냈으며, 반응액에 0.2 mL 시료를 넣은 군과 시료를 넣지 않은 군을 각각 시료첨가군과 시료무첨가군으로 하였고, 이 때 대조군을 0으로 표시하였다.

13. XO 저해능 측정

XO 저해능(XO inhibitory ability)의 측정은 Stirpe와 Corte²⁵⁾의 방법에 따라 추출물 시료 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°C에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 다음 ELISA로 292 nm에서 생성된 uric acid를 측정하였다. XO 저해 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였으며, BHT의 저해능을 양성 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 또한, XO 저해능(%)=100-[(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈으며, 0.1 mL 시료를 넣은 군과 시료를 넣지 않은 군을 각각 시료첨가군과 시료무첨가군으로 하였으며, 이 때 대조군을 0으로 표시하였다.

14. 통계 처리

실험결과는 SPSS/WIN 18.0을 이용하여 mean±SD로 표시하였으며 군간의 비교는 Student's t-test에 의하였다. 실험결과에 대해 one way ANOVA를 시행하였으며, 사후 분석은 Tukey's post-hot test에 의하였으며, 유의수준은 p<.05에서 채택하였다.

III. 결 과

1. CdSO₄의 세포독성 측정

CdSO₄의 독성조사를 위하여 CdSO₄가 40~60 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양 세포를 48시간 동안 처리한 결과, CdSO₄는 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보임으로서 독성을 나타냈다(p<0.001). 이 과정에서 XTT₅₀ 값은 47.4 μM에서 나타났다(Table 1).

2. BHT의 항산화능 측정

BHT의 항산화능 측정을 위하여 25 μM 농도의

Table 1. The cytotoxicity of cadmium sulfate (CdSO₄) on cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation Concentrations of CdSO ₄ (μM)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.378±0.02	100
40	0.215±0.05	56.9***
50	0.180±0.02	47.6***
60	0.150±0.04	39.7***
CdSO ₄ (XTT ₅₀)	0.189±0.02	50.0***

***p<.001

Table 2. The antioxidative ability of butylated hydroxytoluene (BHT) on the hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation Concentrations of BHT (μM)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.535±0.04	100
25 H ₂ O ₂	0.174±0.03	32.5
25	0.275±0.05	51.4***
40	0.365±0.03	68.2***
55	0.424±0.04	79.3***

***p<.001

H₂O₂를 배양 세포에 처리하기 전에 BHT가 각각 25, 40, 55 μM로 각각 포함된 배양액에서 세포를 2시간 동안 전 처리한 다음 H₂O₂로 처리 후 조사하였다. 그 결과, H₂O₂만을 처리한 경우 대조군에 비하여 세포생존율이 32.5% (0.174±0.03)로 나타난 반면, 25, 40, 55 μM 농도의 BHT 처리에서는 각각 51.4% (0.275±0.05), 68.2% (0.365±0.03), 79.3% (0.424±0.04)로 모두 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.001) (Table 2).

3. CdSO₄독성에 대한 BHT의 영향

CdSO₄의 세포독성에 대한 항산화제인 BHT의 영향을 알아보기 위하여 CdSO₄ XTT₅₀ 농도를 배양 세포에 처리하기 전에 BHT가 각각 40 μM과 55 μM로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전 처리한 다음 CdSO₄로 처리한 후 조사하였다. 그 결과, XTT₅₀ 농도의 CdSO₄만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 42.7% (0.178±0.02)로 나타난 것에 비하여

Table 3. The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the cytotoxicity induced by cadmium sulfate (CdSO₄) in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation Concentrations of BHT (μM)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.417±0.05	100
CdSO ₄ (XTT ₅₀)	0.178±0.02	42.7
40	0.304±0.06	72.9***
55	0.349±0.07	83.7***

***p<.001

Table 4. The protective effect of *Typha orientalis* L. (TO) extract on the oxidative stress induced by cytotoxicity of cadmium sulfate (CdSO₄) in cultured NIH3T3 fibroblaststs

Incubation Concentrations of TO extract (μg/mL)	XTT assay (450 nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.562±0.03	100
CdSO ₄ (XTT ₅₀)	0.215±0.05	38.3
90	0.268±0.02	47.7
120	0.385±0.04	68.5***

***p<.001

40 μM과 55 μM의 BHT의 처리에서는 각각 72.9% (0.304±0.06)와 83.7% (0.349±0.07)로 모두 CdSO₄만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.001) (Table 3).

4. CdSO₄독성의 산화적 손상에 TO 추출물의 영향

TO 추출물이 CdSO₄독성의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT₅₀ 농도의 CdSO₄를 처리하기 2시간 전에 90 μg/mL와 120 μg/mL의 TO 추출물을 각각 배양 세포에 처리한 다음 CdSO₄로 처리한 결과, CdSO₄의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 38.3% (0.215±0.05)로 나타난데 비하여 90 μg/mL 추출물 처리에서는 47.7% (0.268±0.02)로 나타났다. 또한 120 μg/mL 추출물 처리에서는 68.5% (0.385±0.04)로 나타나, 이는 CdSO₄만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였다(p<0.001) (Table 4).

Table 5. The total polyphenols and flavonoids contents of *Typha orientalis* L. (TO) extract

Components of TO extract ($\mu\text{g/mL}$)	Total contents (mg/g)
Polyphenols	43.5
Flavonoids	23.8

Table 6. The inhibitory ability of lipid peroxidation (LP) in *Typha orientalis* L. (TO) extract determined at a wavelength of 500 nm

Concentrations of TO extract ($\mu\text{g/mL}$)	LP inhibitory ability (500 nm) % of control
Control	0
55 BHT	81.6***
90	22.9***
120	35.7***

*** $p < .001$

5. TO 추출물의 함량 분석

TO 추출물의 함량분석 결과 총 폴리페놀(polyphenols)은 43.5 mg/g으로 나타났으며, 총플라보노이드(flavonoids)는 23.8 mg/g으로 나타났다(Table 5).

6. LP 저해능 측정

TO 추출물에 대한 LP 저해능 측정을 위하여 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 추출물 시료를 분석한 결과 90 $\mu\text{g/mL}$ 농도처리에서는 LP 활성이 대조군에 비하여 77.1% 저해로 나타났으며, 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리에서는 64.3% 저해로 나타났다. 따라서, LP 저해능은 대조군인 0에 비하여 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 22.9%와 35.7%로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의한 저해능을 나타냈다($p < 0.001$). 특히, 120 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 18.4% 저해를 보인 양성대조군, BHT의 저해능인 81.6%($p < 0.001$)의 40% 이상의 높은 저해능을 보였다(Table 6).

7. SOD-유사 활성능 측정

TO 추출물에 대한 SOD-유사 활성능 측정을 위하여 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 추출물 시료를 각각 분석한 결과, 90 $\mu\text{g/mL}$ 추출물의 처리에서는 115.7%, 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리에서는 121.3%의 유사 활성을 나타냈다. 따라서, SOD-유사 활성능은 대조군

Table 7. The superoxide dismutase (SOD)-like ability of *Typha orientalis* L. (TO) extract determined at a wavelength of 420 nm

Concentrations of TO extract ($\mu\text{g/mL}$)	SOD-like ability (420 nm) % of control
Control	0
55 BHT	36.8***
90	15.7***
120	21.3***

*** $p < .001$

Table 8. Xanthine oxidase (XO) inhibitory ability of *Typha orientalis* L. (TO) extract determined at a wavelength of 292 nm

Concentration of TO extract ($\mu\text{g/mL}$)	XO inhibitory ability (292 nm) % of control
Control	0
55 BHT	83.8***
90	17.5***
120	25.3***

*** $p < .001$

인 0에 비하여, 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 15.7%와 21.3%로 모두 유의한 활성능을 나타냈으며 ($p < 0.001$), 특히 추출물 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 양성대조군인 BHT 유사 활성능인 36.8%값의 55% 이상인 것으로 나타났다(Table 7).

8. XO 저해능 측정

TO 추출물에 대한 XO 저해능에 대한 영향을 조사하기 위하여 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물 시료 각각을 분석한 결과 90 $\mu\text{g/mL}$ 추출물 시료에서는 활성이 대조군에 비하여 82.5% 저해로 나타났으며, 120 $\mu\text{g/mL}$ 추출물 시료의 처리에서는 74.7% 저해로 나타났다. 따라서, XO 저해능은 대조군인 0에 비하여, 90 $\mu\text{g/mL}$ 와 120 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 17.5%와 25.3%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다($p < 0.001$). 특히, 120 $\mu\text{g/mL}$ 의 추출물 시료 처리에서는 비교군인 BHT의 활성능인 83.8% ($p < .001$)의 30% 이상의 활성을 나타냈다(Table 8).

IV. 고 찰

항산카드뮴($CdSO_4$)은 카드뮴의 염화합물의 일종으로 안정제나 도금, 안료와 같은 여러 공정의 원료로 그 사용 범위가 매우 넓다. 반면, 이의 중독으로 인한 각종 부작용이 발생됨에 따라 이의 독성에 대한 관심이 높아지게 되었다. 특히, 카드뮴화합물을 포함한 몇몇 중금속류의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시되면서, 이같은 산화적 손상을 항산화 측면에서 정량적으로 분석할 수 있는 방법들이 개발되고 있다. 간단히 몇가지 예를 들면, LP 활성 분석은 세포의 막지질이 산화적 손상에 의해 과산화되는 것을 측정하는 것으로서 결국 세포내 환경 및 수송체계에 손상을 주어 세포퇴화를 초래하게 된다. 또한, SOD-유사 활성 분석은 세포내 항산화 효소의 하나인 SOD는, catalase와 함께 대사과정 중에 생성된 자유라디칼을 물로 변환시킴으로서 세포를 산화적 손상으로부터 보호하는 기능을 담당하고 있는데, 이같이 SOD 항산화 효소와 유사한 기능을 측정하는 것이다.¹⁶⁾ 한편, XO 저해 활성 분석은 XO가 hypoxanthine (HX)을 xanthine으로, 이를 다시 산화시켜 uric acid를 생성케 하는데 이 과정에서 자유라디칼(free radical)도 함께 생성된다. 그러므로, XO 저해 활성은 다시말해 자유라디칼의 생성억제를 측정하는 것이다.²⁶⁾ 따라서, 이들에 대한 분석은 항산화 능력을 측정할 수 있는 정량적 분석법인데 최근, 위와 같은 분석법과 더불어서 나노물질에 대한 미세적 분석법이나,²⁷⁾ 또는 휘발성 화합물과 같은 비가시적인 유해물질에 대한 정량적, 정성적 평가를 위한 특수분석법이 최첨단 분석장비와 함께 꾸준히 개발되고 있다.²⁸⁾ 따라서, 본 연구에서는 $CdSO_4$ 에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 40~60 μM 농도의 $CdSO_4$ 를 각각 처리한 결과, 처리 농도에 비례하여 세포생존율을 점차 감소시켰으며, 이 과정 중 XTT_{50} 값이 47.4 μM 로 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner²⁹⁾의 독성판정기준에 의하여 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 본 실험 결과는 Son과 Choi⁷⁾가 $CdSO_4$ 와 같은 카드뮴염일종인 $CdCl_2$ 가 배양 인체피부섬유모세포에 고독성을 나타냈다는 보고와도 상호 상통함을 알 수 있었다. 본 연구에서 처럼 $CdSO_4$ 가 세포독성을 나타낸 것은 $CdSO_4$ 가 세포내 DNA내로 삽입되어 핵산

물질의 복제를 억제하였거나¹⁵⁾, 또는 세포내 단백질 합성저해나 칼슘채널 손상 등에 영향을 주었을 가능성도 배제할 수는 없지만¹⁵⁾, 그 보다는 $CdSO_4$ 의 산화적 손상에 의한 세포퇴화의 가능성이 클 것으로 생각된다.⁵⁾ 따라서, 본 연구에서는 $CdSO_4$ 의 독성과 산화적 손상간의 연관성을 조사하기 위하여, 항산화제의 일종인 BHT를 40 μM 과 55 μM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 각각 2시간 동안 전 처리한 후 $CdSO_4$ 를 처리한 결과 $CdSO_4$ 만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다($p < .001$). 이같은 결과는 Kim과 Jekal²⁾이 $CdSO_4$ 와 같은 카드뮴염 일종인 $CdCl_2$ 의 독성이 BHT에 의하여 방어되었다는 연구 보고와 일치함을 알 수 있었으며, 또한 Jung 등³⁾도 카드뮴염의 독성이 항산화제인 vitamin E에 의해 방어되었다는 보고와도 상호 일치함을 알 수 있었다. 본 연구나 위의 타 연구들은 모두 $CdSO_4$ 의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 제시하고 있다. 한편, 부들(TO) 추출물이 $CdSO_4$ 독성인 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 TO 추출물이 90 $\mu g/mL$ 와 120 $\mu g/mL$ 로 함유된 배양액에서 세포를 2시간 동안 전 처리한 다음 $CdSO_4$ 로 처리 후 조사한 결과, $CdSO_4$ 만의 처리에 비하여 모두 세포생존율이 증가하였으며, 특히 120 $\mu g/mL$ 농도에서는 $CdSO_4$ 만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다($p < .001$). 본 연구 결과는 TO 추출물이 $CdSO_4$ 의 산화적 손상을 방어함으로써 세포손상을 보호한 것으로서 이는 추잉검나무(*Manikara zapota*) 추출물속에 함유된 polyphenol에 속하는 isorhamnetin이나 quercetin과 같은 항산화 성분에 기인한 것으로 생각된다.³⁰⁾ 이같은 증거로는 지금초(*Euphorbiae humifusae* L.)나 한련초(*Eclipta prostrata* L.) 추출물속에 함유된 quercetin과 같은³¹⁾ flavonoid나 polyphenol과 같은 성분들이³²⁾ 강력한 항산화능을 보였다는 연구보고들이 이를 뒷받침하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 TO 추출물에 대한 항산화능을 조사하였다. 그 결과 TO 추출물은 지질과산화(LP) 저해능을 비롯하여 SOD-유사 활성능 및 XO 저해능과 같은 항산화 작용을 나타냈다. 본 연구에서 나타난 항산화능을 타 연구와 상호 비교해 볼 때, 먼저 LP 저해능에 있어서, 본 연구의 TO 추출물 120 $\mu g/mL$ 처리에서 35.7%로 나타났는데, 이는 초산납에 대한 지금초 추출물

(100 µg/mL)에서의 25%나³²⁾ 염화알루미늄에 대한 금은화 추출물(100 µg/mL)에서의 37.3%와¹⁴⁾ 같이 높은 저해능을 보였다. 또한, SOD-유사 활성능에 있어서는, 본 연구의 TO 추출물 120 µg/mL에서 21.3%로 나타나 이는 초산납에 대한 지금초 추출물(100 µg/mL)의 27.8%와³⁰⁾ 함께 높은 유사 활성능을 나타냈다. 한편, XO 저해능에 있어서, 본 연구의 TO 추출물 120 µg/mL에서 25.3%로 나타나 이는 염화알루미늄에 대한 한련초 추출물(110 µg/mL)의 28.6%와³²⁾ 비교해 볼 때 거의 유사한 높은 저해능을 보였다. 따라서, 이같은 항산화 효과는 플라보노이드의 항산화나 항염효과처럼, 본 연구의 함량분석에서와 같이 TO 추출물속에 함유되어 있는 폴리페놀(43.5 mg/g)이나 플라보노이드(23.8 mg/g)와 같은 성분들의 단독 또는 상호작용에 의한 생리활성작용현상에 따른 결과일 것으로 생각된다.³³⁾

V. 결 론

본 연구는 중금속 오염원인 황산카드뮴(cadmium sulfate, CdSO₄)의 세포독성 및 이에 대한 부들(TO) 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하였다. 이를 위해 XTT assay에 의한 세포생존율을 비롯하여 지질과산화(LP) 저해능, superoxide dismutase (SOD)-유사 활성능 및 xanthine oxidase (XO) 저해능과 같은 항산화 효과를 조사하였다. 본 실험에서 배양 NIH3T3 섬유모세포에 40~60 µM의 CdSO₄를 각각 처리한 결과 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 이 때 XTT₅₀ 값이 47.4 µM에서 나타남으로서 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제 일종인 butylated hydroxytoluene (BHT)은 CdSO₄의 세포독성을 유효하게 방어하였다. 한편, CdSO₄의 세포독성에 대한 부들(TO) 추출물의 영향에 있어서, TO 추출물은 CdSO₄에 의한 산화적 손상에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 세포손상을 방어하였다. 이와 동시에, TO 추출물은 대조군 대비 35.7%의 LP 저해능, 대조군 대비 21.3%의 SOD-유사 활성능 및 대조군 대비 25.3%의 XO 저해능을 보임으로서 유효한 항산화 효과를 나타냈다. 위의 결과로부터 CdSO₄의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, 또한 TO 추출물은 CdSO₄ 독성에 의한 산

화적 손상을 항산화능에 의하여 유의하게 방어하였다. 따라서, TO 추출물과 같은 천연성분은 CdSO₄와 같이 산화적 손상과 관련된 독성을 방어함으로써 차후 항산화 측면에서 질환치료를 위한 대체물질의 개발에 있어 활용적 가치가 크다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 연구되었음.

References

1. Jang S, Lee AR, Choi GY, Kim HK. Monitoring of heavy metal contents in commercial herbal medicines cultivated in the Seoul and Daegu areas. *J Environ Health Sci.* 2015; 41(1): 30-39.
2. Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci.* 2016; 48(1): 1-7.
3. 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(1): 15-21.
4. Jin T, Nordberg GT. cadmium toxicity in kidney cells. resistance induced by short term pretreatment in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol et Toxicol.* 1983; 58(3): 137-143.
5. Son YW, Rim YS, Yu YW, Jung I. Effect of persimmon leaves extract on the cytotoxicity induced by cadmium of hair dye component. *J Invest Cosm.* 2012; 8(1): 9-15.
6. Choi MK, Chung YT. A study on the cytotoxic effect of cadmium, copper, mercury and chromium on cultured mouse fibroblasts. *J Wonkang Med Sci.* 1990; 6(1): 77-91.
7. Son YW, Choi YS. Protection of *chenopodium album* var. *centrorubrum* extract by oxidative effect in cultured human skin fibroblasts damaged by cadmium. *J Kor Soc People Plants Environ.* 2012; 15(3): 155-161.
8. Son YW, Rim YS, Seo YM. Protective effect of NMDA receptor antagonist on the neurotoxicity induced by lead as an environmental pollutant. *J Kor Soc Occup Environ Hyg.* 2017; 27(3): 193-200.
9. Jung JY, Oh SK, Park SH, Yoon MY, Yu YW, Rim

- YS, Jung IJ. Antioxidative effect of *Ajuga multiflora* BUNGE extract on chromium trioxide, dermatitis inducer in cultured NIH3T3 fibroblasts. *J Invest Cosm*. 2014; 10(1): 193-199.
10. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Hung YP, et al. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(1): 115-124.
 11. Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *Euglena gracillis*. *Mutat Res*. 2000; 469(1): 107-114.
 12. Fujisawa S, Kadoma Y. Anti-and pro-oxidant effects of oxidized quercetin, curcumin-related compounds with thiols or ascorbate as measured by the induction priod method. *In Vitro*. 2006; 20(1): 39-44.
 13. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007; 121(10): 2225-2232.
 14. Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The protective effect of *Lonicerae flos* extract on cultured C6 glioma cells damaged by aluminum of dementia induced. *Kor J Clin Lab Sci*. 2017; 49(3): 271-278.
 15. Tsou TC, Lai HJ, Yang JL. Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damaged by chromium (VI) reduction with ascorbate. *Hem Res Toxicol*. 1999; 12(10): 1002-1009.
 16. Seo YM, Kim NS. Effect of superoxide dismutase on oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin melanocyte. *J Kor Soc Occp Environ Hyg*. 2009; 19(3): 261-269.
 17. Lim JA, Dh HJ, Back SH. Antiaging ability of methanol extract from *Euonymus alatus*. *J Cosm & Public Health*. 2007; 3(2): 41-45.
 18. Han MR, Kim NW, Lee YS. Anti-wrinkle antioxidative effects of ethanol extracts of *Inula flos*, *Chrysanthemi flos* and *Carthami flos*. *J Invest Cosm*. 2013; 9(4): 361-369.
 19. Kim SJ, Yu YW, Lee JK. Cytotoxicity and protective effect of *Portulaca oleracea* L. extract on cultured neuroglioma cells damaged by aluminum of dementia-induced agent. *J Kor People Plants Environ*. 2013; 16(5): 251-256.
 20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983; 65(1-2): 55-63.
 21. A.O.A.C. Official method of analysis. 18th ed., Association of official analytical chemists. Washington DC USA. 2005; 45(3): 21-21.
 22. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the three radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 2000; 71(5): 109-114.
 23. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci*, 1993, 58(6): 1410-1420.
 24. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974; 47(3): 468-474.
 25. Stirpe F, Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol & Chem*. 1969; 244(23): 3855-3861.
 26. Kong MR, Lee YS. Physiological activity of *Equisetum arvense* fertile stems extracts as beauty materials. *J Invest Cosm*. 2014; 10(2): 119-127.
 27. Jo EH, Lee JW, Park SY, Kim PP, Choi KH, Eom IC. Pre-validation of colony forming efficiency assay for assessing the cytotoxicity of nanomaterials. *J Environ Health Sci*. 2015; 41(1): 17-23.
 28. Kim JK, Seo JK, Kim TS, Park GH. Risk assessment for non-cancer effects of volatile organic compounds in childrens' products. *J Environ Health Sci*. 2014; 40(3): 178-186.
 29. Borenfreund, E., and J.A. Puerner. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*. 1984; 9(1): 7-9.
 30. Ma J, Luo XD, Protiva P, Tang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota* (Sapodolla). *J Nat Prod*. 2003; 66(7): 983-986.
 31. Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbiae humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Kor J Clin Lab Sci*. 2018; 50(4): 501-510.
 32. Lee SH, Jung IJ, Jang HS. The antioxidative effect of *Eclipta prostrata* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by manganese-induced cytotoxicity. *Biomed Sci Lett*. 2018; 24(4): 1-8.
 33. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distingtive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonoids. *J Agric Food Chem*. 2006; 54(26); 9798-9804.

<저자정보>

손영우(교수), 윤기철(임상 조교수)