



ORIGINAL ARTICLE

Protective Effects of *Lespedeza bicolor* Extract on B16/F10 Melanoma Cell Lines Damaged by Lead Acetate, Heavy Metal Compounds

Young-Mi Seo

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

중금속 화합물인 초산납으로 손상된 B16/F10 멜라닌세포주에 대한 싸리나무 추출물의 보호 효과

서영미

원광보건대학교 간호학과

ARTICLE INFO

Received November 8, 2021
Revised 1st November 29, 2021
Revised 2nd December 3, 2021
Accepted December 5, 2021

Key words

Antioxidative effect
Lead acetate
Melanization
Oxidative stress

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the dermal cytotoxicity of lead acetate (LA) and other heavy metal compounds, and the protective effect of *Lespedeza bicolor* (LB) extract on LA-induced cytotoxicity in cultured B16-/F10 melanoma cells. The study evaluated the antioxidative effects of LB due to its electron-donating ability (EDA), inhibitory effects on melanization and improving cell viability. LA significantly decreased cell viability in a dose-dependent manner, and the XTT₅₀ value was determined at 52.7 μM in the studied cultures. Based on the Borenfreund and Puerner's toxicity criteria, LA was estimated to be highly cytotoxic. LA-induced cytotoxicity and cell damage was reversed by the antioxidant activity of kaempferol (KAE), thereby remarkably improving cell viability. A study of the protective effects of the LB extract on LA-induced cytotoxicity showed that the LB extract remarkably increased cell viability in the LA-treated group, and also inhibited the EDA and the total amount of melanin. The above results suggest oxidative stress-mediated cytotoxicity of LA. In the study, LB extract effectively prevented LA-induced cytotoxicity via its antioxidative activity and inhibition of melanization. In conclusion, natural resources like LB extracts may be useful agents for the prevention of oxidative stress-mediated cytotoxicity and melanization by heavy metallic compounds such as LA.

Copyright © 2021 The Korean Society for Clinical Laboratory Science.

서론

납화합물은 아동의 장난감제조를 비롯하여 페인트나 축전지 등의 다양한 산업공정에 사용되고 있다[1]. 납화합물은 일단 인체에 노출되면 체외로 배출이 어렵고, 많은 시간을 통해 축적되

므로 각종 장기에 영향을 미치게 된다. 특히, 납화합물은 뇌혈류를 통해 조혈기능의 손상은 물론이고 두통, 기억장애, 경련, 수면장애와 같은 뇌와 관련된 각종 후유증을 유발한다고 알려져 있다[2]. 특히, 어린이들의 장난감이나 유아놀이기구 등에 함유된 납화합물은 어린이는 물론, 성인조차도 피부에 접촉되면 심한 가려움증을 비롯한 홍반이나 발진과 같은 피부염(dermatitis)을 유발하기 때문에 사용시 각별한 주의가 요구되고 있다[3]. 납중독에 의한 임상적 징후로는 위에서 언급한 것처럼 수면장애를 비롯한 조증(mania) 및 조혈기능의 손실과 같은 다양한 병변을

Corresponding author: Young-Mi Seo

Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, 514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

E-mail: dudn0408@wu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2836-647X>

초래한다[4]. 현재 사용되는 치료로 penicillamine과 같은 납 배설 촉진제 투여나 안정제 또는 진정제와 같은 약물 처치가 있으나, 효과적인 치료라고 하기에는 매우 미흡하다[5]. 따라서, 납독성에 대한 사회적 관심이 집중되면서 독성기전을 비롯하여 효과적인 치료약제나 치료방법에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다. 특히, 납의 피부독성의 경우 피부세포를 이용한 세포고사나 DNA 손상에 관한 연구, 납 미세먼지에 의한 피부 및 장기의 산화적 스트레스나 멜라닌화에 대한 연구[6, 7] 외에 다른 연구들은 많이 되어 있지 않다[8, 9]. 최근, 납을 비롯한 크롬이나 철, 수은과 같은 몇몇 중금속화합물들은 붕괴될 때 자유라디칼(free radicals)을 생성함으로써 이들의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제기되면서 이들의 독성치료를 산화적 손상 측면에서 접근하려는 연구가 시도되고 있다[10].

근래, 각종 식물에 항산화물질을 비롯한 항암, 항독, 항균 등에 유익한 생리활성물질이 다량 함유되어 있다고 밝혀지면서 이를 이용한 병변의 치료적 연구가 이루어지고 있다[11]. 이들 활성물질에는 항암에 유효한 curcumin이나 carnosol을 비롯하여, 항염에 좋은 tannin과 saponin, 항산화에 유용한 quercetin과 kaempferol과 같은 다양한 성분들이 알려져 있다[12]. 식물 중 싸리나무(*Lespedeza bicolor*, LB)는 콩과(*Leguminosae*)에 속하는 낙엽활엽관목으로 우리나라 전국의 산이나 들판에 자생하고 있으며, 잎은 달걀모양으로 되어 있고, 꽃은 홍자색으로 7~10월 사이에 개화 후 9~10월경에 열매를 맺는다. 성질은 평범하고 맛은 달아 일명 호지자라고도 불리운다. LB는 quercetin을 비롯한 isoquercetin, orientin, flavonol, eriodictyol, kaempferol과 같은 여러가지 성분을 함유하고 있어, 오래전부터 해열이나 이뇨, 기침, 백일해, 임질과 같은 여러 질환에 널리 사용되어 왔다. 특히, Kaempferol이나 quercetin, trifolin, isoquercetin, flavonol과 같은 플라보노이드류(flavonoids)는 항산화 작용이 뛰어나다고 잘 알려져 있다[13]. LB의 항산화에 대한 연구로는 LB 함유물질 중 flavonoid성분에 대한 ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)]나 Xanthine oxidase (XO)과 같은 항산화 분석에 대한 연구가 있으며[14], 피부세포에 대한 연구로는 B16/F10 멜라닌세포를 대상으로 티로시나제 활성억제[15] 및 NO (nitric oxide)와 같은 항염에 대한 분석이 있다[16]. 그러나, 멜라닌세포를 이용한 LB에 대한 전자공여능(EDA)을 비롯한 SOD (superoxide dismutase)-유사 활성이나 LDH (lactate dehydrogenase) 저해능과 같은 항산화 분석이나, 멜라닌 총량변화 측면에서의 멜라닌화에 대한 연구는 찾아보기 어렵다.

근래 세포배양기법에 의해 질환의 병태적 기전이나 치료를 위한 대체물질의 효능 및 안전성 검사와 같은 분석이 이루어지고 있다. 이는 배양 세포가 생체세포처럼 형태나 생화학적 특성이 동일하여 시험물질에 대해 정량적인 분석이 가능하다는 이점이 있다[11]. 본 연구는 환경오염원이면서 동시에 돌연변이원인 초산납(LA)에 대한 세포독성을 피부세포인 B16/F10 멜라닌세포종을 배양하여 산화적 손상측면에서 분석하였으며, LA의 독성에 대한 LB 추출물의 영향을 EDA분석에 의한 항산화 및 멜라닌총량 변화에 따른 멜라닌화에 대한 영향을 조사하여 산화적인 손상과 관련된 중금속화합물 독성의 치료적 대체물질을 천연물질로부터 알아보았다.

재료 및 방법

1. 싸리나무(LB) 채취 및 추출

전북 야산에서 7~10월경에 LB 전초를 채취한 후 깨끗이 잘 씻어 통풍이 잘되는 곳에서 햇볕에 잘 말린 다음 시료로 보관 사용하였다. 추출을 위해 시료 75.4 g과 약 260 mL의 증류수를 환저플라스크에 넣고 3시간 동안 가열하는 과정을 4회 반복하여 얻은 액을 모아서 574 ×g에서 30분 동안 원심분리 후 회전농축장치(EYELA rotary evaporator N-1000; SUNILEYELA CO., Seongnam, Korea)로 감압농축한 다음 동결건조 후 분말화하여 수율이 3.2%인 2.4 g의 시료를 얻었다.

2. 세포 배양 및 세포생존율(cell viability) 분석

B16/F10 멜라닌세포주(ATCC, CRL, 6322)는 배양액 [MEM, 10% FCS (Gibco, USA), 100 IU/mL-100 ug/mL/penicillin-streptomycin, 2 mM-glutamin (Sigma Aldrich Co, St, Louis, MO, USA)]에 넣어 배양한 후 trypsin으로 배양 용기에 부착된 세포를 분리하였다. 분리된 세포는 혈청이 함유된 배양액에 분주 후 1×10^5 cells/well의 밀도로 96-well에서 72시간 동안 36°C, 5% CO₂의 항온기에서 배양하였다. 세포생존율은 Mosmann [17]의 분석방법에 따라 각 well당 10 µL의 XTT (50 µg/mL)를 넣고 항온기에서 4시간 동안 처리한 다음 DMSO로 처리하여 ELISA reader (SpectraMax[®] 250, Molecular Devices, CA, USA)로, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 초산납(LA) 처리

1×10^5 cells/well의 밀도로 96-well plate에 자란 배양 B16/F10 멜라닌세포에 LA가 20~60 µM의 농도로 각각 포함

된 배양액에서 48시간 동안 처리 후 세포생존율을 조사하였다. 세포생존율에 의한 XTT₅₀값을 측정하는 다음 이를 본 실험분석에 사용하였다.

4. Kaempferol (KAE)의 항산화능 측정 및 초산납(LA)에 대한 영향

KAE의 항산화능 조사를 위해 1×10⁵ cells/well의 밀도로 96-well plate에 자란 세포에 KAE, 100 μM과 120 μM의 각각 농도를 2시간 동안 전처리 후 30 μM H₂O₂를 배양 세포에 처리 하여 이의 영향을 세포생존율에 의하여 조사하였다. 또한, LA에 대한 KAE의 영향은 100 μM과 120 μM KAE를 배양 세포에 2 시간 동안 전처리한 후 XTT₅₀ 농도의 LA를 처리한 다음 각각의 세포생존율을 조사하였다.

5. 싸리나무(LB) 추출물의 세포독성 측정 및 초산납(LA)에 대한 추출물 처리

LB 추출물에 대한 독성 조사를 위하여 1×10⁵ cells/well의 밀도로 96-well plate에 자란 세포에 100~160 μg/mL 추출물 각각의 농도를 배양 세포에 48시간 동안 처리한 후 세포생존율을 조사하였다. 이 과정에서 추출물의 최대허용한계농도를 측정하고 한계농도 바로 이하의 두 농도인 120과 140 μg/mL를 분석에 사용하였다. 또한, LA에 대한 LB 추출물의 영향조사는, XTT₅₀ 농도의 LA 배양 세포에 처리하기 전에 120 μg/mL와 140 μg/mL의 추출물을 2시간 동안 처리한 후 세포생존율에 의한 각각의 영향을 조사하였다.

6. 싸리나무(LB) 추출물의 성분함량 분석

폴리페놀분석은 AOAC [18] 방법에 따라, 추출시료 0.2 mL와 phenol reagent 0.2 mM을 혼합하여 3분간 반응시킨 후 0.4 mL sodium carbonate로 1시간 동안 처리한 다음 ELISA reader를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid를 표준시약으로 하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드 분석은 Nieva Moreno 등[19]의 방법에 따라, 25°C에서 시료용액 0.1 mL와 10% aluminum nitrate, 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에, 에탄올 4.7 mL를 첨가하여 40분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며 rutin을 표준시약으로 하여 검량곡선을 작성하였다.

7. 전자공여능(EDA) 활성 측정

Blois [20]의 방법에 의해 메탄올시료에 0.3 mM DPPH 용

액 100 μL를 넣고 30분 동안 처리하였다. 처리 완료 후 ELISA reader로, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. EDA의 활성은 대조군에 대한 백분율로 나타냈으며, 활성 억제능은 KAE를 양성대조군으로 EDA 활성 억제능(%)=[100-(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다.

8. 총 멜라닌양 생성을

Hosoi 등[21]의 변형된 방법에 의해 배양 세포를 PBS로 3회 세척 후 375 ×g에서 원침하였다. 침전물을 10% DMSO가 첨가된 200 μL의 1 N NaOH를 넣고 80°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 ELISA reader로, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 멜라닌양은 대조군에 의한 백분율로 표시하였으며, LA를 양성대조군으로 하여 멜라닌 저해능(%)=LA - [(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)×100]으로 나타냈다. 즉, 대조군의 흡광도(무첨가군)를 100%로 하였을 때 무첨가군에 대한 LA처리군, 시료첨가군의 흡광도를 각각 %로 구한 다음 LA처리군을 양성대조군으로 하여 이와 시료처리군과의 % 차이를 저해능으로 표시하였다.

9. 통계 처리

모든 실험값은 SPSS/WIN 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 표시하였으며, 각 군간의 비교를 위해 one way ANOVA를 시행한 후 Tukey HSD로 사후 분석을 하였다. 유의성 수준은 P<0.05에서 채택하였다.

결과

1. 초산납(LA)의 세포독성

배양 B16/F10 멜라닌세포에 LA, 20~60 μM 각각의 농도를 48시간 동안 배양한 결과, 세포생존율이 LA의 처리농도에 따라 유의한 감소를 보임으로서 독성을 나타냈다(P<0.001). LA 20 μM, 40 μM, 60 μM에서 대조군에 비하여 각각 76.2%

Table 1. The cytotoxicity of lead acetate (LA) by XTT assay

Concentrations of LA (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	%			
Control ^a	0.42±0.06	100	36.14	<0.001	a>b, c>d
20 ^b	0.32±0.07	76.2			
40 ^c	0.28±0.02	66.7			
60 ^d	0.17±0.02	40.5			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: LA, lead acetate.

(0.32±0.07), 66.7% (0.28±0.02), XTT₅₀ 농도의, 40.5% (0.17±0.02)의 세포생존율을 보여 XTT₅₀ 값은 52.7 μM의 처리에서 나타났다(Table 1). 세포독성에 대한 사후분석 결과 60 μM, 40 μM과 20 μM, 대조군의 순으로 세포독성이 높은 것으로 나타났다.

2. Kaempferol (KAE)의 항산화능

배양 세포에 각각 KAE, 100 μM과 120 μM을 2시간 동안 처리한 다음 30 μM의 H₂O₂를 처리하였다. 그 결과, H₂O₂만의 처리에서는 대조군에 비하여 세포생존율이 35.0% (0.14±0.02)로 나타난 반면, 100 μM과 120 μM의 KAE의 처리에서는 각각 70.0% (0.28±0.03), 72.5% (0.29±0.04)로 나타나 이는 H₂O₂만을 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율 증가를 나타냈다(P<0.001) (Table 2). KAE의 항산화능의 사후분석 결과 세포생존율이 대조군, 120 μM KAE와 100 μM KAE, 30 μM H₂O₂ 순으로 높게 나타났다.

3. 초산납(LA)의 독성에 대한 kaempferol (KAE)의 영향

XTT₅₀ 농도의 LA를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 KAE, 100 μM과 120 μM 각각 농도를 처리하였다. 그 결과, LA만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 39.5% (0.17±0.02)로 나타난 것에 비하여 100 μM과 120 μM KAE의 처리에서는

Table 2. The antioxidative ability of kaempferol (KAE) on the 30 μM hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured B16/F10 melanoma cells

Concentrations of KAE (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	%			
Control ^a	0.40±0.02	100	114.33	<0.001	a>d, c>b
30 μM H ₂ O ₂ ^b	0.14±0.02	35.0			
100 ^c	0.28±0.03	70.0			
120 ^d	0.29±0.04	72.5			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviations: KAE, kaempferol; H₂O₂, hydrogen peroxide.

Table 3. The effect of kaempferol (KAE) on the cytotoxicity induced by lead acetate (LA) in cultured B16/F10 melanoma cells

Concentrations of KAE (μM)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	%			
Control ^a	0.43±0.02	100	156.80	<0.001	a>d, c>b
LA μM (XTT ₅₀) ^b	0.17±0.02	39.5			
100 ^c	0.27±0.02	62.8			
120 ^d	0.30±0.03	69.8			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: See Table 1, 2.

각각 62.8% (0.27±0.02)와 69.8% (0.30±0.03)로 나타났다 (P<0.001) (Table 3). LA의 세포독성에 대한 KAE 영향의 사후분석결과 대조군, 120 μM KAE와 100 μM KAE, LA (XTT₅₀) 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다.

4. 싸리나무(LB) 추출물의 세포독성

LB 추출물이 각각 100~160 μg/mL 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 결과 100 μg/mL와 120 μg/mL 농도에서 세포생존율이 대조군에 비하여 97.1% (0.33±0.02)와 94.1% (0.32±0.02)로 각각 나타났다. 또한, 140 μg/mL와 160 μg/mL 농도에서 세포생존율은 각각 91.2% (0.31±0.02)와 88.2% (0.30±0.03)로 나타났다(P=0.039) (Table 4). LB 추출물의 독성에 대한 사후분석결과 100, 120, 140 μg/mL 간에는 통계적으로 차이가 없었으나 100, 120, 140 μg/mL 순으로 세포생존율이 높았다. 또한 100 μg/mL는 대조군과 통계적인 차이가 없었으며, 140 μg/mL와 160 μg/mL와도 통계적인 차이가 없었다. 그러나 대조군과 160 μg/mL의 세포생존율이 통계적으로 차이를 보여, 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타내는 최대 허용한계 농도는 160 μg/mL 이상에서 나타나는 것으로 확인됨에 따라 본 실험에서는 LB 추출물을 160 μg/mL 이하의 농도로 사용하였다.

5. 싸리나무(LB) 추출물의 성분함량

LB 추출물성분 중 폴리페놀의 함량은 119.8 mg/g으로, 플라보노이드 함량은 21.9 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 1).

6. 초산납(LA)의 세포독성에 대한 싸리나무(LB) 추출물의 영향

LA의 세포독성에 대한 LB 추출물의 영향에 있어서, 120 μg/mL와 140 μg/mL의 LB 추출물을 각각 전처리 후 XTT₅₀ 농도의 LA를 처리한 결과, LA의 처리에서는 세포생존율이 대조군

Table 4. The cytotoxicity of *Lespedeza bicolor* (LB) extract on cultured B16/F10 melanoma cells by XTT assay

Concentrations of LB extract (μg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	%			
Control ^a	0.34±0.03	100	2.83	0.039	a>e
100 ^b	0.33±0.02	97.1			
120 ^c	0.32±0.02	94.1			
140 ^d	0.31±0.02	91.2			
160 ^e	0.30±0.03	88.2			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: LB, *Lespedeza bicolor*.

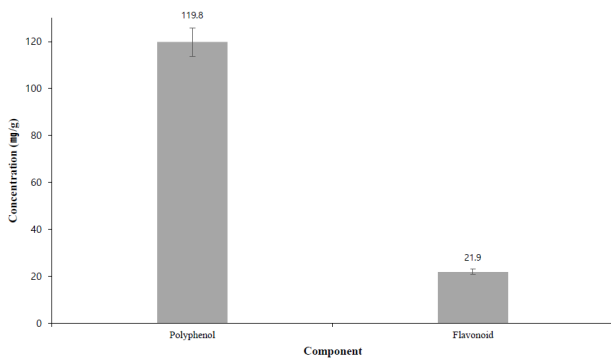


Figure 1. The component of *Lespedeza bicolor* (LB) extract. Data are mean±SD. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

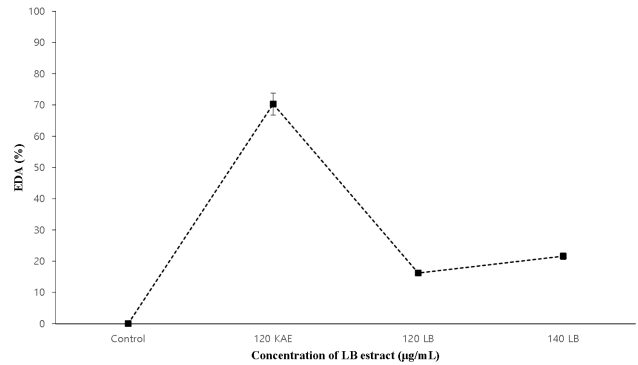


Figure 2. The inhibitory activity of electron donating activity (EDA) of *Lespedeza bicolor* (LB) extract at a wavelength of 517 nm.

Table 5. The protective effect of *Lespedeza bicolor* (LB) extract on the cytotoxicity induced by lead acetate (LA) in cultured B16/F10 melanoma cells

Concentrations of LB extract (µg/mL)	XTT assay (450 nm)		F	P	Tukey HSD
	Mean±SD	%			
Control ^a	0.45±0.02	100	292.33	<0.001	a>d>c>b
LA (XTT ₅₀) ^b	0.16±0.02	35.6			
120 ^c	0.21±0.02	46.7			
140 ^d	0.25±0.02	55.6			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Abbreviation: See Table 1, 4.

에 비하여 35.6% (0.16±0.02)로 나타났는데 비하여 120 µg/mL 추출물 처리에서는 46.7% (0.21±0.02)로 나타났다. 또한 140 µg/mL 추출물 처리에서는 55.6% (0.25±0.02)로 나타나 LA만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다($P<0.001$) (Table 5). LA의 세포독성에 LB 추출물이 미치는 영향에 대한 사후분석 결과 대조군, 140 µg/mL LB 추출물, 120 µg/mL LB 추출물, LA 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

7. EDA 활성

EDA 활성이란 자유라디칼의 활성도를 의미한다. 120 µg/mL와 140 µg/mL 농도의 LB 추출물 시료를 처리하여 분석한 결과 EDA 활성은 120 µg/mL 농도의 LB 추출물 처리에서는 83.8% (0.31±0.03)로, 140 µg/mL의 처리에서는 78.4% (0.29±0.02)로 각각 나타났다(Figure 2). 따라서, LB 추출물에 대한 EDA 활성 억제능은 120 µg/mL와 140 µg/mL 각각 16.2%와 21.6%로 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며, 이는 또한, 양성대조군인 KAE의 억제능인 70.3%의 20~30%인 것으로 나타났다. EDA 활성 억제능의 사후분석 결과 KAE, 140 µg/mL LB 추출물, 120 µg/mL LB 추출물 순으로 억제능이 높았으며, 이는 또한, 양성대조군인 KAE의 억제능인 70.3%의 20~30%인 것으로 나타났다.

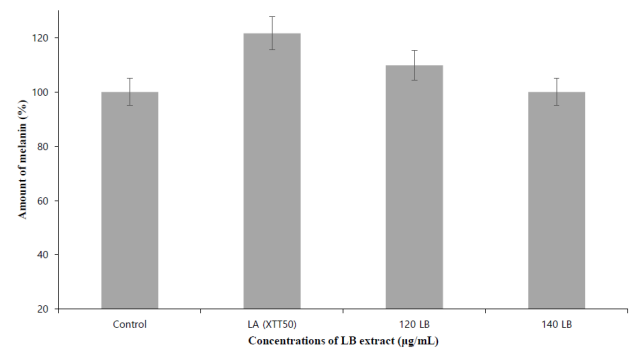


Figure 3. The inhibitory activity of melanin of *Lespedeza bicolor* (LB) extract on total amount of melanin determined at a wavelength of 405 nm.

8. 총 멜라닌양 생성을

120 µg/mL와 140 µg/mL의 추출물 시료를 각각 분석한 결과 120 µg/mL 추출물의 처리에서는 총멜라닌양은 대조군에 비하여 109.8% (0.56±0.04)로 나타났으며, 140 µg/mL의 처리에서는 100.0% (0.51±0.03)로 나타났(Figure 3). 따라서, 멜라닌 저해능은 120 µg/mL와 140 µg/mL에서 LA만의 처리에 비하여 각각 11.8%와 21.6%로 나타나 유의한 저해능을 보였다($P<0.001$), LB 추출물에 대한 멜라닌 저해능의 사후분석 결과 140 µg/mL LB 추출물, 120 µg/mL LB 추출물, 대조군 순으로 저해능이 높았다.

고찰

초산납(LA)은 자동차 축전지나 페인트제조뿐만 아니라 특히, 아동의 장난감제조의 원료로 사용됨에 따라 독성의 중요성이 부각되었다[22]. 산화적 손상 측면에서는 피부세포보다는 타 세포에서 더 많이 이루어져 있으며[23], 피부의 배양 세포를 재료로 한 독성연구는 드물다. 따라서, 본 연구에서는 세포생존율에 의

한 LA의 피부독성을 비롯하여, LA독성에 대한 싸리나무(LB) 추출물의 항산화와 항멜라닌화의 영향을 각각 전자공여능(EDA)과 LA의 산화적 손상에 자극된 멜라닌세포로부터 형성되는 총멜라닌 생성율에 의하여 조사하였다. 먼저, LA의 세포독성을 위하여 배양 B16/F10 멜라닌세포에 LA, 20~60 µM 농도 각각을 처리한 후 세포생존율을 조사한 결과 처리 농도에 의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈으며, 이 때 XTT₅₀값이 52.7 µM로 나타나 이는 Borenfreund와 Puerner [24]의 독성판정기준에 의하여 고독성(highly-cytotoxic)인 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 LA가 피부독성이 있다는 것을 말해주고 있으며, 이는 LA가 세포의 핵산물질에 손상을 주었거나 단백질 합성계에 영향을 주었음을 배제할 수는 없지만[9], 그보다는 LA에 의한 산화적 손상에 의해 세포가 손상되었을 가능성이 클 것으로 생각한다. 이 같은 이유의 하나는 LA 독성이 항산화제인 vitamin E에 의해 방어되었다는 연구보고가 이를 증명하고 있다[4].

따라서, 본 연구에서는 LA의 독성이 산화적 손상과 관련이 있는가를 알아보기 위하여, 배양 세포에 XTT₅₀ 농도의 LA를 처리하기 전에 항산화제의 일종인 KAE의 항산화능이 70% 이상 범위농도인[25], 100 µM과 120 µM을 각각 처리한 결과, LA의 처리에서는 세포생존율이 39.5%로 나타났는데 비하여 KAE 처리에서는 62.8%와 69.8%로 나타나 모두 LA만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 본 결과는 항산화제인 KAE가 LA에 의한 산화적 손상을 방어한 것으로, LA의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 말해주고 있다.

한편, LA에 대한 LB 추출물의 영향조사에 있어서, 배양 세포에 XTT₅₀ 농도의 LA를 처리하기 전에 LB 추출물, 120 µg/mL와 140 µg/mL를 각각 처리한 결과, LA의 처리에서는 세포생존율이 35.6%로 나타났는데 비하여 LB 추출물 처리에서는 각각 46.7%와 55.6%로 나타났다. 이는 LA만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 이같은 결과는 LB 추출물이 LA의 산화적 손상을 방어한 것으로서, 이는 지금초(*Euphorbiae humifusae* L.) 추출물처럼 페놀성 성분을 가지고 있는 LB 추출물의 항산화 성분들의 상호작용에 의한 것으로 생각된다[10]. 따라서, 본 연구에서는 LB 추출물 속의 항산화 성분들에 대한 함량분석을 시행하였다. 그 결과 총 polyphenol과 flavonoid 함량은 각각 119.8 mg/g과 21.9 mg/g으로 나타났다. 이는 항산화능이 높은 부들(*Typha orientalis* L., TO) 추출물의 43.5 mg/g, 23.8 mg/g보다 높으며[25], 자귀나무(*Albizia julibrissin*, AJ) 잎 추출물, 149.7 mg/g, 71.8 mg/g보다는 낮으나 모두 높은 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있었다[26].

따라서, 본 연구에서는 LB 추출물의 항산화능과 항멜라닌화에 대한 분석을 통해 알아보기 위하여 전자공여능(EDA) 활성과 총 멜라닌생성율의 분석을 시행하였다. 먼저, EDA 활성 조사에서, LB 추출물 120 µg/mL, 140 µg/mL 처리에서 EDA 활성억제는 16.2%와 21.6%로 나타나 이는 모두 대조군에 비하여 유의한 EDA활성 억제력을 보였다. 본 결과는 항산화능이 높은 한련초(*Eclipta prostrata* L., EP)의 24.2% (110 µg/mL)와 거의 유사한 것으로 나타났다[27]. 또한, 총 멜라닌 양적 분석에서는 LB추출물 120 µg/mL, 140 µg/mL 처리에서 모두 LA만의 처리에 비하여 각각 11.8%와 21.6%의 유의한 멜라닌 저해능을 나타냈다. 본 결과는 애기똥풀(*Chelidonium majus*, CM) 추출물의 21.4% (50 µg/mL)와 유사하였다[28]. 본 연구 결과와 다른 연구 결과들 모두, 추출물에 함유된 페놀성 성분들의 항산화 작용에 의한 것으로 생각된다. 추후 본 실험의 분석외에도 HPLC나 LC-MS를 이용한 superoxide dismutase (SOD)-유사능, 지질과산화(lipid peroxidation) 및 티로시나제 활성과 같은 다양한 항산화나 항멜라닌분석을 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 중금속화합물인 초산납(LA)의 피부독성을 B16/F10 멜라닌세포를 배양하여 조사하였으며, LA의 독성에 대한 싸리나무(*Lespedeza bicolor*, LB) 추출물의 보호효과를 조사하였다. 본 연구를 위하여 세포생존율을 비롯하여 항산화능 분석인 전자공여능(EDA)활성 억제능과 총 멜라닌량 저해능을 조사하였다. 그 결과 LA는 배양 세포에 처리한 농도 의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서 독성을 나타냈다. 이 때 XTT₅₀값은 52.7 µM로서 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 한편, 항산화제인 kaempferol (KAE)은 LA의 독성에 손상된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 또한, LA의 독성에 대한 LB 추출물의 보호효과에 있어서, LB 추출물은 LA만의 처리에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며, 이와 동시에 전자공여능(EDA) 활성 억제능과 멜라닌 저해능과 같은 항산화 효과 및 멜라닌화의 억제력을 나타냈다. 이상의 결과로부터 LA의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, LB 추출물은 항산화와 멜라닌화의 저해 효과에 의하여 LA의 독성을 효과적으로 방어하였다. 따라서, LB 추출물과 같은 천연물질은 LA와 같이 산화적 손상과 관련이 있는 중금속화합물의 독성방어나 또는 멜라닌화로 인한 질환을 위한 치료 및 간호중재 보완물질로 개발할 가치가 있다고 생각된다. 본 연구결과를 기반으로 산화

적 손상이 원인인 질환에 LB 추출물을 적용가능한 형태 및 방법에 대해 추가 연구가 필요함을 제언한다.

Acknowledgements: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2021.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Seo YM, Professor.

REFERENCES

- Busselberg D, Evans M, Rahmann H, Carpenter D. Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia neurons. *J Neurophysiol.* 1991;65:786-795. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.4.786>
- Kim YW, Rim YS, Seo YM. Protective effect of NMDA receptor antagonist on the neurotoxicity induced by lead as an environmental pollutant. *J Korean Soc Occup Environ Hyg.* 2017;27:193-200. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2017.27.3.193>
- Ahrens FA, Vistica DT. Microvascular effects of lead in the neonatal rat: I. Histochemical and light microscopic studies. *Exp Mol Pathol.* 1977;26:129-138. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(77\)90072-7](https://doi.org/10.1016/0014-4800(77)90072-7)
- Jung J, Oh Y, Park S, Yoon M, Pyo A, Kim S, et al. Antioxidative and whitening effects of Houlttuynia cordata extract on lead acetate of hair dye component. *J Invest Cosmetol.* 2014;10:99-105. <https://doi.org/10.15810/jic.2014.10.2.002>
- Dabrowska A, Venero JL, Iwasawa R, Hankir Mk, Rahman S, Boobis A, et al. PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis and dynamics in lead-induced neurotoxicity. *Aging (Albany NY).* 2015;7:629-643. <https://doi.org/10.18632/aging.100790>
- Moon CS. High influential factor of cadmium and lead exposure in outdoor workers. *J Korean Soc Occup Environ Hyg.* 2020;30:163-173. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2020.30.2.163>
- Kim DM, Jung JY, Lee HK, Park SK, Kwon YS, Yang SK, Han IS. Novel composition of multifunctional sunblock from Eisenia bicyclis and Aloe vera extract and a mixed compound of titanium dioxide. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2020;18:297-308. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2020.0039>
- Gong C, Tao G, Yang L, Liu J, He H, Zhuang Z. The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. *Mol Biol Rep.* 2012;39:4915-425. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1287-z>
- Gong C, Yang L, Zhou J, Guo X, Zhuang Z. Possible role of PAPR-1 in protecting human HaCaT cells against cytotoxicity of SiO₂ nanoparticles. *Toxicol Lett.* 2017;280:213-221. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.213>
- Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbia humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Korean J Clin Lab Sci.* 2018;50:501-510. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.501>
- Kim S, Yang B, Choi Y. Cytotoxicity and effect of Lonicerae flos extract against chromium, contact dermatitis-induced agent in cultured human skin fibroblasts. *J People Plants Environ.* 2012;15:407-412. <https://doi.org/10.11628/ksppe.2012.15.6.407>
- Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicera japonica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2003;51:333-335. <https://doi.org/10.1248/cpb.51.333>
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta.* 2001;212:323-331. <https://doi.org/10.1007/s004250000400>
- Lee JH, Jhoo JW. Antioxidant activity of different parts of *Lespedeza bicolor* and isolation of antioxidant compound. *Korean J Food Sci Technol.* 2012;44:763-771. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2012.44.6.763>
- Ha SY, Jung JY, Kang HY, Kim TH, Yang JK. Tyrosinase activity and melanogenic effects of *Lespedeza bicolor* extract *in vitro* and *in vivo*. *BioRes.* 2020;15:6244-6261.
- Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YJ, Woo WH, Kim YM, et al. Dermal bioactive properties of the ethanol extract from flowers of *Lespedeza bicolor*. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* 2007;20:1-9.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Andersen WC, Casey CR, Nickel TJ, Young SL, Turnipseed SB. Dye residue analysis in raw and processed aquaculture products: matrix extension of AOAC international official Method 2012.25. *J AOAC Int.* 2018;101:1927-1939. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0015>
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000;71:109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0)
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 1958;181:1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985;45:1474-1478.
- Jung JY, Jang HS, Seo YM. Protective effect of *Ajuga multiflora* BUNGE extract on lead toxicity of environmental pollutant. *J. People Plants Environ.* 2017;20:341-350. <https://doi.org/10.11628/ksppe.2017.20.4.341>
- Ude VC, Brown DM, Maciaszek K, Stone V, Johnston HJ. Comparing the sensitivity of different intestinal Caco-2 *in vitro* monocultures and co-cultures to amorphous silicon dioxide nanomaterials and the clay montmorillonite. *NanoImpact.* 2019;15:100165. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2019.100165>
- Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Methods.* 1985;9:7-9. <https://doi.org/10.1007/BF01666038>
- Yoon KC, Sohn TW. Antioxidative effect of *Typha orientalis* L. extract on the oxidative stress induced by cytotoxicity of cadmium sulfate. *J Environ Health Sci.* 2019;45:62-70. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.1.62>
- Chung JH, Rim YS, Seo YM. Protective effect of *Albizia julibrissin* leaf extract on the cytotoxicity induced by cupric acetate metallic mordant. *J Environ Health Sci.* 2019;45:520-528. <https://doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.1.62>

doi.org/10.5668/JEHS.2019.45.5.520

27. Lee SH, Jung IJ, Jang H. The antioxidative effect of *Eclipta prostrata* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by manganese-induced cytotoxicity. *Biomed Sci Lett*. 2018;24:357-364. <https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357>
28. Son Y, Oh S, Choi Y, Park S, Seo Y, Lee H, et al. Effects of *Chelidonium majus* extract on mercury-induced cytotoxicity and melanogenesis. *J Invest Cosmetol*. 2013;9:229-235. <https://doi.org/10.15810/jic.2013.9.3.004>