

## 여성초 메탄올 추출물의 카드뮴에 대한 독성억제효과(V)

이정호<sup>1</sup> · 정승일<sup>1</sup> · 유일수<sup>2</sup> · 김신기<sup>3</sup> · 이기남<sup>4</sup> · 한두석<sup>5</sup> · 백승화<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실, <sup>4</sup>산업한의학교실,

<sup>5</sup>치과대학 구강해부학교실, <sup>2</sup>익산대학 공업화학과, <sup>3</sup>환경원예과

## The Inhibitory Effects of the Methanol Extract of *Houttuynia cordata* THUNB against Cadmium Induced Cytotoxicity (V)

Jeong Ho Lee<sup>1</sup>, Seung Il Jeong<sup>1</sup>, Il Soo You<sup>2</sup>, Shin Kee Kim<sup>3</sup>,

Ki Nam Lee<sup>4</sup>, Du Seok Han<sup>5</sup> and Seung Hwa Baek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Natural Products and <sup>4</sup>Department of Industrial Oriental Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, <sup>5</sup>Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749,

<sup>2</sup>Department of Industrial Chemistry and

<sup>3</sup>Department of Environmental Horticulture, Iksan College, Iksan 570-110, Korea

**Abstract** – This study was conducted to investigate the antitoxic agent in methanol extract of *Houttuynia cordata* THUNB. Detoxication effects by *H. cordata* THUNB extract increased in proportion to the extract concentrations. When 40 mg/kg dosage of *H. cordata* THUNB extract was administered, it showed the highest antitoxic effects in metallothionein induction. After the extract treatment, body weights generally increased in proportion to the extract concentrations. From the above results, *H. cordata* THUNB extract increased metallothionein concentrations and decreased the toxicity of cadmium in rats. *In vitro* the antitoxic activity of methanol extract of *H. cordata* THUNB on NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by the MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide} and SRB (sulforhodamine B protein) assays. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of the treated cells, 10<sup>-2</sup> mg/ml Concentrations of *H. cordata* THUNB extract was shown significant antitoxic activity. The number of NIH 3T3 fibroblasts were increased and tend to regenerate. These results suggest that *H. cordata* THUNB extract retains a potential antitoxic activity.

**Key words** – *Houttuynia cordata* THUNB., Antitoxic agent, Metallothionein, MTT assay, SRB assay.

여성초(*Houttuynia cordata* THUNB.)는 삼백초과 (Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로서, 본초강목에서는 산열독용종, 치창탈항, 단점질, 해요독, 청열, 해독, 이뇨, 소종의 효능을 보고하였다.<sup>1)</sup> 최근의 보고에 의하면 흰쥐에게 여성초 물 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록 카드뮴의 독성에 대한 경감효과는 증가하였으며, 신장에서보다 간장에서 독성경감효과가

좋았다. 또한 신장 및 간장의 MT의 농도는 간장에서보다 신장에서 우수한 결과를 보였으며, 흰쥐의 체중 변화는 여성초 물 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록, 흰쥐의 체중변화도 증가하는 경향을 보였으나, 3주 이후에는 체중의 증가가 적게 나타났다. 여성초 물추출물이 MTT 농도 및 SRB 농도에서 정량적으로 유의성있는 독성경감효과를 나타냈으나, 농도에 따른 흡광도의 변화는 SRB 정량분석법이 MTT 정량분석법보다 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었으며, 광

\*교신저자 : Fax : 063-841-4893

학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.<sup>2,3,4)</sup> 이에 본 연구는 건조 어성초와 생엽을 메탄올로 추출하여 카드뮴에 중독된 흰쥐에게 경구 투여한 후, 조직내 카드뮴의 농도와 MTT의 농도와 체중변화를 측정하고, 카드뮴 세포독성효과를 1차 검색방법인 비색법 중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 카드뮴에 대한 독성경감효과를 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 본 실험에 사용한 어성초는 1998년 8월 전북 익산시 팔봉동에서 채집하여 음건한 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어 있다.

**실험동물** - 실험에 사용된 동물은 원광대학교 의과대학 실험동물 사육장에서 사육한 생후 6~8주 정도의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷으로  $150 \pm 10$  g을 사용하였으며, 실험시작 1주전부터 안정화 시켰고, 사육온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $50 \pm 10\%$ 의 동물사육실에서 흰쥐용 깔집을 깔고 1군당 5마리씩으로 하였으며, 2개군은 대조군과 카드뮴 대조군, 6개군은 실험군 즉, 건조한 어성초 추출물 투여군 3개군과 건조하지 않은 어성초 추출물 투여군 3개군으로 총 40마리를 사육하였다. 고령 pellet사료(삼양유지)와 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 충분히 공급하였으며, 사육기간(투여기간)은 4주로 하였다.

**검액의 조제** - 어성초의 잎을 잘게 썰어 음건한 후 건조된 어성초 잎 500 g을 5,000 ml 등근 플라스크에 메탄올 2,500 ml를 넣고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출하였다. 이와 같이 세 번 반복하여 얻은 추출물을  $0.4 \mu\text{m}$  필터로 여과한 후, 여과액을 진공농축기로 감압농축시켰다. 건조된 양의 메탄올 추출물 113.02 g(22.60%)과 생엽 메탄올 추출물 162.37 g(32.47%)를 얻었다. 이 추출물을 필요에 따라 희석하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 어성초 추출에 사용된, 용매로는 MeOH를 사용하였으며, 흰쥐 신장과 간장내의 카드뮴 함량 분석에 사용된 Cd 표준용액은 Sigma제를 사용하였다. 전처리에 사용된 초차기구는 질산으로 세척하여 중금속을 완전히 제거한 후 사용하였으며, 분석용기는 원자흡광광도계(Hitachi Z-5700)을 사용하였다. 세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential

**Table 1.** Dosage of cadmium and methanol extract of *H. cordata* THUNB in rats

Group		Cd dosage (mg/kg)	<i>Houttuynia cordata</i> THUNB (mg/kg)
Control	Group 1	0	0
Cd control	Group 2	4	0
	Group 3	4	10
Dried plant	Group 4	4	20
	Group 5	4	40
Fresh plant	Group 6	4	10
	Group 7	4	20
	Group 8	4	40

Experimental animals were treated with cadmium and methanol extract of *H. cordata* THUNB by oral administration.

Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT 정량 및 SRB 정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은  $\text{CO}_2$  incubator(Shellab Co., U.S.A.)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT 정량 및 SRB 정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A.)를 사용하였다.

**카드뮴 및 어성초 추출액 투여** - 실험에 사용한 중금속은 cadmium chloride( $\text{CdCl}_2$ ; Sigma GR급)이며, 어성초의 건조한 것과 건조하지 않은 것의 메탄올 추출물의 rat 구강내 투여용량은 Table 1과 같으며, 1군당 5마리씩으로 실험하였다.<sup>2)</sup>

**흰쥐 장기내의 카드뮴의 농도측정** - 실험 24시간 전부터 절식시킨 흰쥐를 에테르로 마취시키고, 신장과 간장을 적출하여 3차 증류수로 3회 세척하여, 진공건조기( $110^\circ\text{C}$ )내에서 24시간 건조시킨 후,  $200^\circ\text{C}$  hot plate상에서 각각 질산, 황산, 및 과염소산을 이용한 습식탄화방법에 의하여 유기물을 분해시키고, 25%의 ammonium citrate용액 10 ml와 0.1% bromothymol blue(BTB) indicator 용액을 2~3방울 넣고, 용액의 색이 황색에서 녹색으로 변할 때까지 ammonium hydroxide 용액으로 중화시켰다. 여기에 10 ml의 40% ammonium sulfate 용액과 10 ml의 sodium diethyl dithiocarbamate(DDTC) 용액을 넣고 세차게 흔든 후 수분간 방치한 다음, 20 ml의 methyl isobutyl ketone (MIBK)층을 가하고 흔든 후 방치한 다음, MIBK층을

취하여 120°C hot plate상에서 휘산시켜 0.1 N HCl로 용해한 후, wave length 228.8 nm, slit path 1.3 nm, lamp current 9 nm의 분석조건하에서 원자흡광광도계(Hitachi Z-5700)를 이용하여 장기내의 카드뮴 함량을 측정하였다.

**흰쥐 장기내의 metallothionein의 농도 측정** - Onosaka 등<sup>5)</sup>의 방법에 따라 조직중의 metallothionein (MT)은 간과 신장조직을 0.5 g 취하여 생리적 식염수로 세척한 다음, 0.25 M 설탕용액을 가하면서 teflon glass homogenizer를 이용하여 조직이 균질화되도록 하였으며, 4°C에서 20분간 원심분리하여 세포질액을 얻었다. 세포질액 0.2 ml를 0.03 M Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 첨가한 후, 10 ppm의 CdCl<sub>2</sub>(standard solution) 1 ml로 포화시키고, 실온에서 5분간 배양하였다. 여기에 rat RBC hemolysate 0.2 ml를 가하여 과량의 카드뮴과 MT이외의 모든 bioligand를 제거하고, 100°C 수욕탕에 1분간 정지시켜 Cd-bound hemoglobin을 변성시킨 후, 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이와 같이 rat RBC hemolysate 첨가와 열처리 및 원심분리 과정을 3회 반복하여, MT 분획층을 분리하여 측정하였다. 최종적인 MT 농도 계산은 원자흡광광도계에 의해 검출된 카드뮴의 양을 기초로, MT 분자량 6,050 g당 카드뮴 6 g 원자가 포함되는 것으로 환산하여 조직 µg당 mgMT 농도를 표시하였다.

**체중 측정** - 모든 동물에 대해서 시험 개시일로부터 시험종료일 까지 매주 2회 측정하였다.

**시료의 처리** - 조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하였다. 각각 1:1(mg/ml)로 희석한 자료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution하여 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

**세포배양** - 어성초 추출물에 대한 독성경감작용을 측정하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포를 사용하였다. 배양액으로는 MEM(Gibco, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(0.25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

**MTT 정량분석법** - Mosmann<sup>6)</sup>의 방법에 따라, 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24

well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유세포에 대한 카드뮴의 MTT<sub>50</sub>(midpoint inhibition value) 농도를 결정하였다. 수복효과 실험은 6개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT<sub>50</sub>량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT<sub>50</sub>군, MTT<sub>50</sub>량과 각각의 어성초 물추출물의 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> mg/ml 농도를 배양액에 넣어, 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후, 분석당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 함유된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치후, MTT formazan을 용해한 후 분광광도계 ELISA reader(520 nm)로 흡광도를 측정하여 MTT<sub>50</sub>군과 비교하였다.

**SRB 정량분석법** - Skehan 등<sup>7)</sup>의 방법에 따라, 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 SRB<sub>50</sub> 농도를 결정하였다. MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB<sub>50</sub>군 및 실험군으로 하여 어성초 물추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1.0% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 nM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader(520 nm)로 측정하여 SRB<sub>50</sub>군과 비교하였다.

**세포의 광학현미경적 관찰** - 광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, NIH 3T3 섬유모세포는 MTT 정량 및 SRB 정량을 하기 전에 도립현미경으로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

**통계학적 해석** - 실험결과와 통계학적처리에는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

**흰쥐 신장내 cadmium의 농도** - 흰쥐에게 카드뮴 농도를 4 mg/kg와 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물을 단독 또는 병용하여 경구투여 시킨 후, 각 실험군의 신장내의 카드뮴의 농도는 Table 2와 같다. 카드뮴과 어성초 메탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서 카드뮴의 농도는 5.58±0.09 mg/kg으로 나타났으나, 이

**Table 2.** Concentrations of cadmium in kidney and liver of rats treated with methanol extract of *H. cordata* THUNB

Dosage of <i>H. cordata</i> THUNB extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	Kidney		Liver		
	Cd contents <sup>a</sup> (mg/kg)	Antitoxicity of Cd (% decrease)	Cd contents <sup>a</sup> (mg/kg)	Antitoxicity of Cd (% decrease)	
Control	5.58±0.92	-	6.55±1.03	-	
Cd control	33.50±2.01	100.00	29.40±2.20	100.00	
Dried plant	HC 10 + Cd 4	15.20±1.37	45.37	21.93±1.82	74.59
	HC 20 + Cd 4	14.13±1.72*	42.18	19.79±1.37	67.31
	HC 40 + Cd 4	13.16±1.52**	39.28	17.10±1.07	58.16
Fresh plant	HC 10 + Cd 4	30.30±0.99	90.45	28.48±1.82	96.87
	HC 20 + Cd 4	30.15±1.28	90.00	28.43±1.67*	96.70
	HC 40 + Cd 4	27.13±1.91*	80.99	28.43±1.58**	96.70

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and methanol extract of *H. cordata* THUNB by oral administration. Significantly different from the control values; \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 (Students's *t*-test).

함량은 실험결과에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.<sup>8)</sup> Table 2에서 보는 바와 같이, 카드뮴 대조군에서의 농도는 33.50±1.97 mg/kg(100%)으로 나타났으며, 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 경구 투여농도가 증가할수록, 흰쥐 신장내 카드뮴의 농도가 저하된 것을 알 수 있다.<sup>2)</sup> 건조 어성초의 메탄올 추출물의 경구 투여농도가 40 mg/kg에서 카드뮴 독성에 대한 경감효과는 13.16±0.73 mg/kg(39.29%)로 가장 우수한 결과를 보였으며, 신장에서의 카드뮴에 대한 독성경감효과는 간장에서 보다 높게 나타났다.

**흰쥐 간장내 cadmium의 농도** - 흰쥐에게 카드뮴 농도를 4 mg/kg와 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물을 단독 또는 병용하여 경구 투여한 후, 각 실험군

에서의 간장내 카드뮴 농도는 Table 2와 같다. 카드뮴과 어성초 메탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서 카드뮴의 농도는 6.55±1.04 mg/kg으로 낮게 나타났으며, 이 함량은 실험결과에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.<sup>7)</sup> 어성초의 생엽 메탄올 추출물의 경구 투여용량이 10 mg/kg 이상에서는 카드뮴의 독성경감효과가 거의 증가하지 않았으나 간장에서는 어성초 메탄올 추출물의 경구 투여농도가 높을수록 카드뮴의 농도의 변화가 작게 나타나는 경향을 볼 수 있다. 어성초 건조한 것의 메탄올 추출물이 경구 투여용량이 40 mg/kg에서 17.10±0.49 mg/kg (58.16%) (*p*<0.05) 값으로 나타나, 물 추출물의 카드뮴의 독성에 대한 경감효과 보다 높게 나타났다.<sup>2,10)</sup>

**Table 3.** Concentrations of metallothionein in kidney and liver of rats treated with methanol extract of *H. cordata* THUNB

Dosage of <i>H. cordata</i> THUNB extract (HC) <sup>b</sup> (mg/kg)	Kidney		Liver		
	MT contents <sup>a</sup> (mg/kg)	MT (% decrease)	MT contents <sup>a</sup> (mg/kg)	MT (% decrease)	
Control	0.88±0.01	-	0.40±0.00	-	
Cd control	0.91±0.00	0.00	1.28±0.16	0.00	
Dried plant	HC 10 + Cd 4	0.92±0.03*	1.10	1.37±0.09	7.03
	HC 20 + Cd 4	1.23±0.13*	35.16	1.59±0.08*	24.22
	HC 40 + Cd 4	1.24±0.09*	36.26	1.69±0.21*	32.03
Fresh plant	HC 10 + Cd 4	0.91±0.03*	0.00	1.30±0.02	1.56
	HC 20 + Cd 4	1.11±0.08*	21.98	1.41±0.05*	10.16
	HC 40 + Cd 4	1.24±0.07*	36.26	1.69±0.14*	32.03

<sup>a</sup>The values represent the mean ± standard deviations for five experiments. <sup>b</sup>Experimental animals were treated with cadmium and methanol extract of *H. cordata* THUNB by oral administration. Significantly different from the control values; \**p* < 0.05 (Students's *t*-test)

**흰쥐 신장내 MT의 농도** - 신장내 metallothionein의 농도는 Table 3과 같다. 카드뮴과 어성초 메탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는  $0.88 \pm 0.09 \text{ mg/kg}$ 으로 나타났으나, 카드뮴 대조군의 MT양은  $0.91 \pm 0.04 \text{ mg/kg}$ 으로 약간 증가하였다. 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록 신장내 MT양이 증가하였다. 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 경구 투여용량이 건조 메탄올과 생엽의 메탄올 추출물의 투여용량이  $40 \text{ mg/kg}$  ( $37.78\%$ )에서는 MT 형성이 동일하게 나타났으나, 일반적으로 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물보다 건조 메탄올 추출물을 흰쥐에게 경구투여했을 경우, 신장에서 MT의 형성이 높게 나타났다.<sup>11)</sup>

**흰쥐 간장내 MT의 농도** - 간장내 metallothionein의 농도는 Table 3과 같다. 카드뮴과 어성초 메탄올 추출물을 투여하지 않은 군에서의 MT의 농도는  $0.40 \pm 0.07 \text{ mg/kg}$ 으로 나타났으며, 카드뮴 대조군의 MT 농도는  $1.28 \pm 0.07 \text{ mg/kg}$ 으로 3배 이상 증가하였으며, 신장에서보다 많은 MT의 농도가 나타났다. 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 경구투여용량이  $40 \text{ mg/kg}$ ( $37.78\%$ )로 나타났으나 건조 어성초의 메탄올 추출물을 경구투여했을 때, 신장보다 MT 형성이 많이 나타났다.<sup>2)</sup>

**체중변화** - 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 경구투여한 흰쥐의 무게변화는 Fig. 1과 같다. 카드뮴만 경구투여한 대조군의 경우, 체중이 1주일 후부터

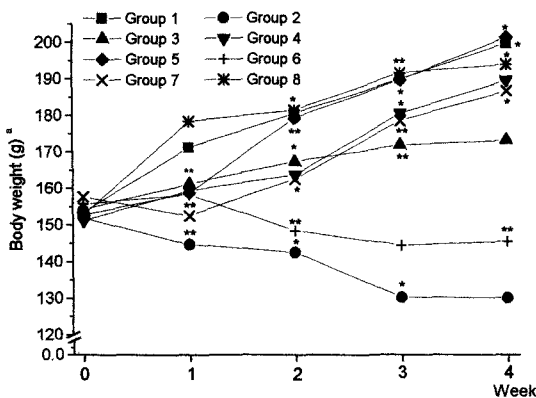


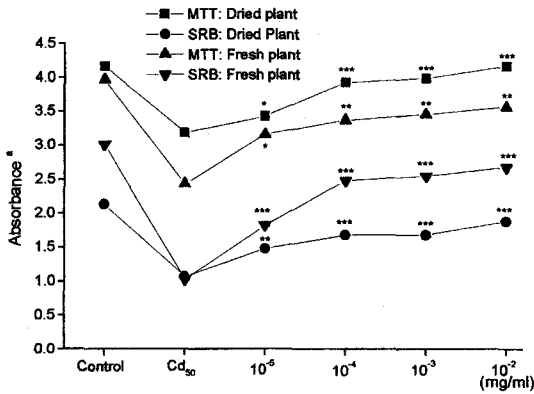
Fig. 1. Body weights in rats treated with methanol extract of *H. cordata* THUNB. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for five experiments. Experimental animals were treated with cadmium and methanol extract of *H. cordata* THUNB by oral administration. Significantly different from the control values (\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ ).

체중이 감소하는 경향을 보였으나, 건조 어성초 메탄올 추출물의 경구투여한 군은 1주부터 흰쥐의 체중이 증가하는 경향을 보였으며, 3주부터는 경구투여용량이  $20 \text{ mg/kg}$  이상에서 높은 체중증가를 보였다. 따라서 흰쥐의 카드뮴에 대한 독성은 시간이 경과함에 따라 독성이 완화되는 것으로 사료된다.<sup>12)</sup>

**MTT 정량분석** - 3T3 섬유모세포를 여러농도의 카드뮴으로 처리한 후, MTT 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 마이크로볼농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정된 결과, MTT 및 SRB의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며,  $IC_{50}$ 인  $MTT_{50}$ 은  $33.04 \mu\text{M}$  및  $SRB_{50}$ 은  $54.72 \mu\text{M}$ 이었다.<sup>13)</sup> MTT 정량분석법을 이용하여 MTT 농도를 측정된 결과, 건조 어성초의 메탄올 추출물의  $10^2 \text{ mg/ml}$ - $10^4 \text{ mg/ml}$ 농도에서는 100%~94.3% 범위의 통계적으로 유의성( $p < 0.001$ ) 있는 카드뮴 독성경감효과를 나타냈으며,  $10^5 \text{ mg/ml}$  분석농도에서도 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ )이 있었다. 건조 어성초의 메탄올 추출물과 물 추출물의  $10^2 \text{ mg/ml}$ 농도는 대조군의 흡광도와는 같이 나타나, 카드뮴에 대한 독성이 제거되었음을 관찰할 수 있었다.

**SRB 정량분석** - 핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여, 어성초 추출물을 처리한 SRB 농도를 측정된 결과 MTT 농도에서와 같이, 건조 어성초의 메탄올 추출물의  $10^2 \text{ mg/ml}$  농도에서 통계적으로 82.42%로 유의성( $p < 0.001$ ) 있는 카드뮴에 대한 독성경감효과를 나타냈으나,  $10^3$ - $10^4 \text{ mg/ml}$  농도에서 통계적으로 유의성( $p < 0.001$ )이 있었지만, 독성경감효과를  $10^5 \text{ mg/ml}$  농도에서는 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ )이 있었다. 어성초 생엽의 메탄올 추출물의  $10^2$ - $10^5 \text{ mg/ml}$  농도에서 통계적으로 유의성( $p < 0.001$ ) 있는 카드뮴에 대한 독성경감효과를 나타냈다. 비색분석법에 의한 건조 어성초와 생엽의 메탄올 추출물의 카드뮴에 대한 독성경감효과는 추출물의 농도증가에 따라 흡광도가 증가하며, 흡광도의 변화는 SRB 정량분석법보다 MTT 정량분석법이 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 2).<sup>2)</sup>

**세포의 광학현미경적 관찰** - 세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있다(Fig. 3-1).  $IC_{50}$ ( $MTT_{50}$  및  $SRB_{50}$ )의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감



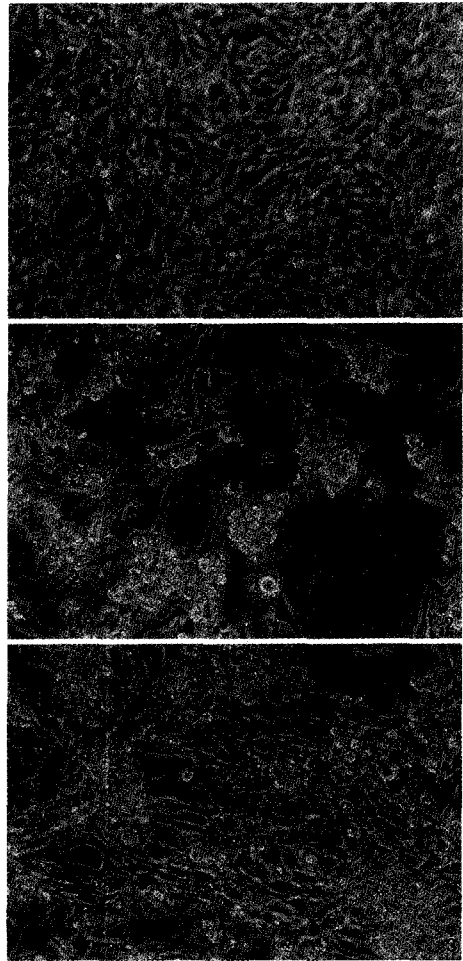
**Fig. 2.** The MTT and SRB absorbance of methanol extract of *H. cordata* THUNB on 3T3 fibroblasts treated with cadmium (MTT<sub>50</sub>, SRB<sub>50</sub>). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (Student's t-test)

소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 3-2). IC<sub>50</sub> 농도의 카드뮴 및 건조 어성초와 생엽 메탄을 추출물을 처리한 군에서는 IC<sub>50</sub>군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다(Fig. 3-3). 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 어성초 메탄을 추출물이 억제하는 독성경감효과가 있는 것으로 인정된다. 이에 어성초의 메탄을 추출물의 카드뮴에 대한 해독물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어 분광학적인 방법으로 분자구조를 규명하는 계획을 진행 중에 있다.

### 결 론

흰쥐에게 카드뮴 경구 투여시, 어성초의 건조한 것과 건조하지 않은 것의 메탄을 추출물을 경구투여한 후, 카드뮴의 독성에 대한 경감효과와 카드뮴이 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고, 카드뮴 IC<sub>50</sub>(MTT<sub>50</sub> 및 SRB<sub>50</sub>)에 의하여 손상된 3T3 섬유모세포의 재생효과에 대하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 흰쥐에게 어성초 메탄을 추출물의 경구 투여용량이 증가할수록, 카드뮴의 독성에 대한 경감효과가 증가하였으며, 건조 어성초의 메탄을 추출물이 생엽의 메탄을 추출물보다 카드뮴에 대한 독성경감효과가 높게 나타났다. 간장보다는 신장에서 카드뮴에 대한 독성 경감효과가 높게 나타났다.



**Fig. 3.** Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3 hrs after incubation unmodified medium (control) for 2 days×200. Most cells had abundant cytoplasm and formed round shape (1). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the Cd<sub>50</sub> concentrations for 2 days×200. Most cells were formed round type and number of cells were decreased (2). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing Cd<sub>50</sub> concentrations plus 10<sup>-2</sup> mg/ml concentrations of *H. cordata* THUNB for 2 days×200. Most cells were showed regenerative and number of cells were increased (3).

2. 흰쥐 신장 및 간장의 MT의 농도는 간장에서 보다 신장에서 우수한 결과를 보였으며, 신장에서는 건조 어성초 메탄을 추출물의 경구투여농도가 20 mg/kg 이상 되면, MT 형성은 추출물의 투여농도가 증가하여도 크게 증가하지는 않았다.

3. 흰쥐의 체중변화를 보면, 어성초 메탄을 추출물

의 경구 투여용량이 증가할수록, 흰쥐의 체중변화도 증가하는 경향을 보였으나, 3주 이후에는 체중변화의 증가가 적게 나타났다.

4. MTT 및 SRB 분석은 배양액만으로 배양한 균을 대조군, 세포독성실험에 의하여 결정된 IC<sub>50</sub> 농도의 카드뮴과 어성초 메탄을 추출물을 배양액에 넣어 배양한 균을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 균은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT 흡광도 및 SRB 농도를 측정하고, 광학현미경적 관찰을 실시하였다. 어성초 메탄을 추출물이 MTT 농도 및 SRB 농도에서 정량적으로 유의성있는 독성경감효과를 나타냈으나, 농도에 따른 흡광도의 변화는 MTT 정량분석법이 SRB 정량분석법보다 민감하게 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 광학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.

이상과 같이 어성초 메탄을 추출물의 경구 투여시켰을 경우, 어성초 메탄을 추출물의 경구 투여농도가 증가할수록 카드뮴에 대한 독성 경감효과를 보였으며, 건조 메탄을 추출물이 독성경감효과가 우수하였으며, 카드뮴에 의하여 손상된 3T3 섬유모세포의 재생효과가 있는 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비와 BK 21 사업지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사한다.

## 인용문헌

1. 신민교(1994) 임상본초학, 336-337, 영림사, 서울.
2. Lee, J. H., You, I. S., Kim, J. S., Lee, K. N., Chung, W. Y., Han, D. S. and Baek, S. H. (2000) The inhibitory effects of *Houttuynia cordata* THUMB against cadmium induced cytotoxicity (II). *Kor. J. Pharm. Korea.* 44: 432-439.
3. Han, D. S., Kim, J. S., Han, J. H., Lee, H. S., Kim, J. J., Kang, K. U. and Baek, S. H. (2000) Antitoxic effects of Palsun Brewing Water against bacterial endotoxin

and cadmium induced cytotoxicity (II). *J. Toxicol. Pub. Health.* 16: 39-45.

4. Lee, J. H., You, I. S., Kim, S. K., Lee, K. N., Han, D. S., Chung, W. Y. and Baek, S. H. The inhibitory effects of *Trichosanthes kirilowii* against cadmium induced cytotoxicity (III). *Kor. J. Pharmacogn.* in Press.
5. Onosaka, S., Tanak, K., Doi M. and Okahara, K. (1978) A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues, *Eisei Kagaku.* 24: 128-133.
6. Mosmann, T. (1978) Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
7. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.
8. 백승화, 유일수, 이종섭, 한두석 (1995) 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발 (제2보) 흰쥐 간장내의 카드뮴 축적에 미치는 금은화 추출물의 영향. *한국독성학회지*, 11: 223-227.
9. Kwon, O. R. and Kim, M. K. (1992) The effect of dietary protein and calcium levels on the cadmium detoxification in rats. *J. Kor. Home Econom. Assoc.* 30: 99-113.
10. 조현욱, 김명훈, 황규영, 민병운, 박종철, 김종홍 (1999) 미나리 추출물이 마우스의 장기내 수은 축적에 미치는 영향. *한국독성학회*, 15(1): 1-8.
11. 이종섭, 김남송, 유일수, 김종수, 이기남, 한두석, 강길웅, 이정호, 백승화 (1999) 천화분 메탄을 추출물이 흰쥐장기내 카드뮴 축적에 미치는 영향(I). *한국노화학회지*, 9: 28-33.
12. 이정호, 강길웅, 정재열, 한종민, 이기남, 정우영, 한두석, 유일수, 김종수, 백승화 (1999) 어성초 전탕액이 흰쥐 장기내 카드뮴 축적에 미치는 영향 (I), *대한예방한의학회지*, 3(2): 79-90.
13. Han, D. S., Lee, K. N., Lee, J. S. and Baek, S.H. (1998) The inhibitory effects of *Taraxaci Herba* against cadmium induced cytotoxicity, *J. Pharm. Soc. Korea.* 42: 307-311.

(2001년 1월 25일 접수)