

갈근 추출물이 Cisplatin으로 손상된 HEI-OC1 청각세포보호와 유리라디칼 소거능에 미치는 영향

유현희 · 서세정¹ · 문해남¹ · 박래길² · 소홍섭² · 전병훈³ · 정수영⁴ · 유용욱^{1*}

군산대학교 식품영양학과, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실 · VCRC,
2: 원광대학교 의과대학 미생물학과 · VCRC, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 4: 원광대학교 식품영양학과

Protective Effect of Pueraria Radix Extract on the Cisplatin-induced Cytotoxicity of HEI-OC1 Cells Via Scavenging of Free Radicals

Hyeon Hee Yu, Se Jeong Seo¹, Hae Dalma Moon¹, Raekil Park², Hong Seob So², Byung Hun Jeon³, Su Young Jung⁴, Yong Ouk You^{1*}

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,

1: Department of Oral Biochemistry & Vestibulocochlear Research Center, School of Dentistry,

2: Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology, School of Medicine,

3: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 4: Department of Food and Nutrition, Wonkwang University

The radix of *Pueraria thunbergiana* BENTHAM (Leguminosae) is traditionally prescribed to attenuate the clinical manifestations of inner ear dysfunction and various clinical situations including fever, gastrointestinal disorders, skin problems, migraine headaches, lowering cholesterol and treating chronic alcoholism in Oriental Medicine. In the present study, we examined the effect of ethanol extract of *P. thunbergiana* radix (EPR) on cisplatin-mediated HEI-OC1 auditory cell death. In addition, to investigate the protection mechanism of EPR, we examined the effects of EPR on lipid peroxidation of cisplatin-treated cells and scavenging activity of EPR on free radicals. Treatment of EPR protected cells from cisplatin and reduced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. Furthermore, EPR demonstrated significant scavenging activity against various free radicals, including superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, and DPPH radical. These results indicate that EPR protects cisplatin-induced damages of HEI-OC1 cells through inhibition of lipid peroxidation and augmenting scavenging activities against free radicals.

Key words : Pueraria radix, HEI-OC1 cell, Cisplatin, Reactive oxygen species, Free radical

서 론

2004년 한국인의 주요사망원인 중 1위가 암으로 전체 사망자의 26.3%를 차지하였으며, 국민건강보험공단에 따르면 2001년 암진료를 받은 사람이 모두 25만명이며, 암환자 치료에 지출한 보험료만 6,000억원에 이른다고 한다^{1,2}. 암치료를 위한 약물 중 하나인 cisplatin은 화학 요법의 일환으로 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 등의 다양한 종양

치료에 유효한 효과를 나타내고 있다. 그러나 고농도로 투여 시 이독성, 신독성, 골수독성, 위장관 장애, 및 알리지 등의 부작용 때문에 임상적 사용이 제한 받고 있다³. 특히 고용량의 cisplatin은 이명(耳鳴), 청력 소실과 같은 강력한 이독성을 초래할 수 있는데⁴, 이는 cisplatin에 의한 산소유리기의 발생, 항산화 물질의 감소, 항산화 효소들의 감소, 및 과산화지질 증가 등이 작용기전으로 보고 되어 있다⁵⁻⁷.

활성산소(reactive oxygen species: ROS)는 superoxide radical (O₂⁻), hydroxyl radical (OH⁻), 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 있으며, 이들은 항암치료시 불활성 산화환원작용의 물질로 인하여 생성되어진다⁸. 활성산소의 불활성 및

* 교신저자 : 유용욱, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 치과대학

· E-mail : hope7788@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6926

· 접수 : 2006/11/14 · 채택 : 2007/02/09

제거작용은 산화방지 방어 시스템을 구성하는 효소 시스템과 비효소적인 시스템에 의하여 이루어진다. 효소 시스템은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), D-T diaphorase, 및 glutathione 생성 효소 시스템 등이 알려져 있다^{9,10}. 항산화 효소는 세포막의 지질 과산화 손상, sulfhydryl-함유 효소의 불활성화 시키거나, 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 ROS를 불활성화 또는 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다. 특히, CAT는 과산화수소 (H₂O₂) 제거에 가장 효과적인 효소의 하나로서 산화적 손상으로부터 세포를 보호하고 세포의 apoptosis를 억제 한다¹¹.

갈근(Pueraria Radix)은 콩(Leguminosae)과에 속하는 칩(Pueraria thunbergiana BENTHAM)의 뿌리를 적당히 썰어서 건조한 것을 말한다. 갈근은 건갈(乾葛), 감갈(甘葛), 분갈(粉葛), 야갈이라고도 불리며, 예로부터 생즙을 내서 먹거나 건조시켜 차로 마시기도 하고 전분을 내어 떡, 죽, 국수 등에 이용하기도 하였다. 동의보감에 의하면 열을 내리고 근육을 풀어주며 피부를 열어 땀을 나게 하며 주독을 풀어주고 갈증과 식체를 내리는 효능이 있으며, 그 성질이 단맛이 나고 위(胃)의 경락의 열을 내려 준다고 기록되어 있다¹². 또한 한방에서는 급성중이염, 비염, 편도염, 숙취제거, 당뇨병, 고혈압, 관상동맥경화증, 협심증, 혈압강하, 콜레스테롤 저해 등에 이용되고 있고 이러한 효과를 관찰한 여러 연구들이 보고 된 바 있다¹³⁻²⁰. 그러나 갈근의 이명과 관련된 기전에 대한 연구결과는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 청각각 유모 세포주 HEI-OC1 세포에서 갈근의 cisplatin 세포독성에 대한 보호 효과와 지질과산화 억제 작용을 조사하였다. 또한 *in vitro* cell-free system에서 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, 및 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 등의 라디칼 소거능을 측정하여 갈근의 항산화 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 갈근 에탄올 추출물 준비

갈근은 서울 경동시장에서 국내산을 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 잘게 부순 갈근 100 g을 2 L의 에탄올에 72 시간 냉침 후 여과지 (Watman No. 1)에 거른 후²¹, 감압농축 후 냉동 건조시킨 후 -20 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

형질변환 쥐 (ImmortomouseTM, Charles River Laboratories, USA)의 와우 (cochlea)로부터 분리 배양한 HEI-OC1 세포는²² Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco, USA)에 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 50 U/ml gamma-interferon (INF-γ, R&D System, USA)이 첨가된 배양액으로 배양하였다. 세포 배양기 (5 % CO₂, 33 °C)의 세포 배양액은 2일 마다 교환해 주었다²³.

3. 세포의 생존율 측정

갈근 에탄올 추출물과 cisplatin의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA) assay^{24,25} 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. HEI-OC1 세포는 24-well plate의 각 well당 4×10⁴ 세포를 분주하였다. 세포를 배양기에서 24 시간 동안 안정화 시킨 후, 0.1 %의 dimethylsulfoxide (DMSO, Junsei, Japan)에 녹인 갈근 에탄올 추출물 (5, 10, 50, 100, 200 μg/ml)은 실험군에 그리고 0.1 % DMSO는 대조군에 첨가하였다. 하루 동안 배양한 세포는 PBS로 용해한 MTT 용액 300 μl을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. DMSO (200 μl)를 첨가하여 용해시킨 formazan 결정의 흡광도는 96-well plate로 이동하여, 540 nm 파장의 ELISA analyser (Spectra MAX 250, Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 측정하였으며 1mM N-acetyl-cystein은 양성대조군으로 사용하였다. 갈근 에탄올 추출물(0, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml)은 cisplatin (10 μM)을 처리하기 1시간 전처리한 후, 세포의 생존율은 MTT assay 방법으로 측정하였다.

4. 지질과산화 측정

지질과산화는 thiobarbituric acid (TBA) 방법²⁶에 의해 측정하였다. 초음파로 분쇄한 cell lysate 80 μl에 8.1 % sodium dodecyl sulfate 20 μl를 넣고 10분간 반응시킨 후 20 % acetic acid (pH 3.5) 150 μl, 0.8 % TBA (in 0.05 N NaOH) 150 μl를 부가하여 잘 혼합한 후 1시간 동안 가열하였다. n-buthanol-pyridine(1:3)을 1 ml를 첨가한 후에 15000 × g에서 5분간 원심 분리하여 상층액의 흡광도는 532 nm 파장에서 측정하였다. 지질과산화 생성물은 thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)로 측정하였으며, malonaldehyde nmole/mg protein으로 표시하였으며 1 mM N-acetyl-cystein은 양성대조군으로 사용하였다.

5. 활성산소 소거능 측정

1) Superoxide radical 소거능 측정

갈근 에탄올 추출물의 superoxide radical 소거능은 Beauchamp와 Fridovich의 방법²⁷을 변형하여 사용하였다. xanthine/xanthine oxidase system이 생성하는 superoxide radical을 제거하는 정도는 nitroblue tetrazolium (NBT) 생성 정도를 측정하였다. Superoxide radical 소거능은 96well plate에 시료용액 10 μl, 10 mM xanthine 45 μl, 1 mM NBT 45 μl, 0.05 mM EDTA (in 50mM potassium phosphate buffer (KPB) (pH8.0)) 10 μl, 0.5 unit/ml xanthine oxidase를 10 μl 넣고 37 °C에서 30분 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도 (Spectra Max 250)를 측정된 수치를 다음 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{소거능(\%)} = [(A_0 - A_1/A_0)] \times 100$$

A0 : 대조군의 흡광도 (시료 용액 대신 50 mM KPB (pH 7.4)를 넣은 경우의 흡광도)
A1 : 실험군의 흡광도
100 μg/ml butylated hydroxy toluene (BHT) 을 양성 대조군으로 사용하였다

2) Hydrogen peroxide 소거능 측정

갈근 에탄올 추출물의 hydrogen peroxide 소거능은 Gulcin

의 방법²⁹⁾을 사용하였다. 소거능은 96 well plate에 각 시료용액 500 µl, 40mM hydrogen peroxide 500 µl를 넣은 후 37 °C에서 10분 동안 반응시킨 후 230 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{소거능(\%)} = [(A0 - A1/A0)] \times 100$$

A0 : 대조군의 흡광도 (시료 용액 대신 50 mM KPB (pH 7.4)를 넣은 경우의 흡광도)
 A1 : 실험군의 흡광도
 100 µg/ml butylated hydroxy toluene (BHT) 을 양성 대조군으로 사용하였다

3) Hydroxyl radical 소거능 측정

Fenton reaction에 의해 hydroxy radical을 가지고 있는 2-deoxy-D-ribose가 분해하면서 TBA로부터 TBAR를 생성하는 방법을 이용하였다²⁹⁾. 2-Deoxy-2-ribose (200 µL, 2.8 mM)에 500 µl의 시료, 200 µM FeCl₃ 200 µL, 104 mM EDTA (1:1 v/v) 200 µL, 1.0 mM H₂O₂ 200 µL, 1.0 mM ascorbic acid 200 µl을 넣고, 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 0.5 % thiobarbituric acid (in 10 % trichloroacetic acid) 1.5 ml과 100 °C에서 15분간 반응시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{소거능(\%)} = [(A0 - A1/A0)] \times 100$$

A0 : 대조군의 흡광도 (시료 용액 대신 20 mM KPB (pH 7.4)를 넣은 경우의 흡광도)
 A1 : 실험군의 흡광도
 100 µg/ml butylated hydroxy toluene (BHT) 을 양성 대조군으로 사용하였다

4) DPPH 라디칼 소거능 측정

Blosi³⁰⁾ 등이 기술한 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma, USA) 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉 시료는 96-well plate에 농도별로 메탄올에 녹여 준비하고, 실험직전 준비한 0.05 mM로 희석한 DPPH 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{소거능(\%)} = [(A0 - A1/A0)] \times 100$$

A0 : 대조군의 흡광도 (시료 용액 대신 메탄올을 넣은 경우의 흡광도)
 A1 : 실험군의 흡광도
 100 µg/ml butylated hydroxy toluene (BHT) 을 양성 대조군으로 사용하였다

6. 연속자료의 통계분석

실험은 3회 반복하였으며, 얻은 결과는 통계프로그램 SPSS (ver 10.0)를 이용하여, 평균과 표준오차로 표시하였으며, α=0.05 수준에서 실험군과 대조군의 평균치를 Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 갈근 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성

갈근 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대하여 직접적인 독성작용은 MTT 방법으로 조사하였다. 다양한 농도의 갈근 에탄올 추출물 5, 10, 50, 100, 200 µg/ml을 24 시간 동안 처리한 결과

100 µg/ml 농도에서는 세포 생존율에 유의한 차이를 관찰할 수 없었으나, 200 µg/ml 농도의 갈근 에탄올 추출물에서는 세포 생존율이 유의하게 감소하여 세포독성을 나타냈다. 이 결과를 근거로 갈근 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포 보호효과 및 라디칼 소거능 실험은 100 µg/ml 미만의 농도에서 수행하였다(Fig. 1).

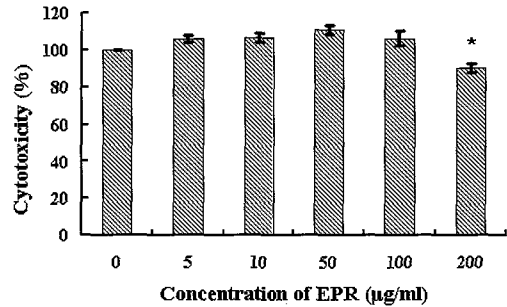


Fig. 1. Cytotoxicity of the ethanol extract of steamed roots of *P. thunbergiana* radix (EPR) on HEI-OC1 cells. Cells were pretreated with various concentrations of EPR for 24 h and cell viability was determined by the MTT assay. Data are mean±S.E. in triplicate. *P<0.05 when compared with control group.

2. 갈근 에탄올 추출물의 cisplatin 세포독성 억제 효과

Cisplatin을 처리한 HEI-OC1 청각 세포에 갈근 에탄올 추출물의 보호효과를 조사하기 위하여, HEI-OC1 세포에 cisplatin (10 µM)을 처리 한 후 1시간 뒤 다양한 농도의 갈근 에탄올 추출물(5-100 µg/ml)을 처리한 후 24시간 후 MTT 방법으로 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 2와 같이 cisplatin 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군에 비교하여 53.7 %로 감소한 반면, 갈근 에탄올 추출물 처리군은 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하여 5 µg/ml 이상에서부터는 유의적 세포 생존율 증가를 관찰할 수 있었다 (p<0.05). 특히, 100 µg/ml 처리군에서는 92.0 %의 높은 생존율을 보였으며, 양성 대조군인 1mM NAC 처리군 66.4 %와 비교시 더욱 높은 생존율을 나타냈다.

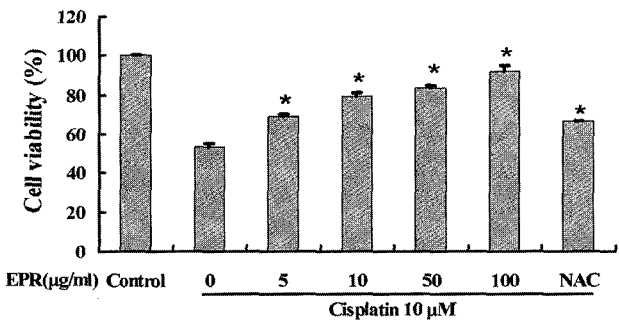


Fig. 2. Protective effect of the ethanol extract of EPR on cisplatin-induced cytotoxicity. Pretreatment of EPR resulted in increase of HEI-OC1 viability after cisplatin treatment. Cells were preincubated with the indicated doses of EPR for 1 h prior to the addition of cisplatin and further maintained for 24 h. Data are mean±S.E. in triplicate. *P<0.05 when compared with cisplatin-treated group. NAC, 1 mM of N-acetyl cystein.

3. 갈근 에탄올 추출물의 지질과산화 억제 효과

Cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포의 지질과산화에 대한 갈근 에탄올 추출물의 효과를 조사하기 위하여 cisplatin (10 μ M) 처리 1시간 전 갈근 에탄올 추출물 (5-100 μ g/ml)을 처리한 후 지질과산화량을 측정하였다(Fig. 3). 갈근 에탄올 추출물 처리는 10 μ g/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 cisplatin에 의한 지질과산화를 억제하였다 ($p < 0.05$). 100 μ g/ml 처리군에서는 77.4 %의 억제율을 보였으며, 1 mM NAC 처리군 60.0 %와 비교하여 효과적으로 지질과산화를 억제시켰다.

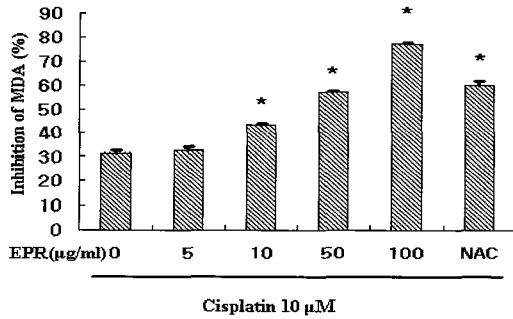


Fig. 3. Inhibitory effect of the ethanol extract of EPR on lipid peroxidation by cisplatin in HEI-OC1 cells. Cells were preincubated with various doses of EPR for 1 h prior to the addition of cisplatin and further maintained for 24 h. Data are mean \pm S.E. in triplicate. * $P < 0.05$ when compared with cisplatin-treated group. NAC, 1 mM of N-acetyl cystein.

4. 갈근 에탄올 추출물의 활성산소 소거능

Table 1에 갈근 에탄올 추출물에 의한 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, DPPH 유리라디칼 소거능에 대한 결과를 나타냈다. 갈근 에탄올 추출물의 직접적인 superoxide radical 소거능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 생성 정도³¹⁾를 측정하였다. 갈근 에탄올 추출물 (5-100 μ g/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 superoxide radical 소거능을 나타냈으며($p < 0.05$), 5, 10, 50, 100 μ g/ml 처리군에서 각각 38.1 %, 52.4 %, 59.5 %, 78.6 %의 superoxide radical 소거능을 관찰할 수 있었다. 특히 갈근 에탄올 추출물 100 μ g/ml 농도의 superoxide radical 소거능은 100 μ g/ml BHT (16.7 %)에 비교하여 4배 이상 높게 나타났다.

갈근 에탄올 추출물의 직접적인 hydrogen peroxide 소거능은 Gulcin의 방법²⁸⁾을 이용하였다. 갈근 에탄올 추출물 (5-100 μ g/ml)은 대조군에 비해 유의적인 hydrogen peroxide 소거능을 나타냈으며 5, 10, 50, 100 μ g/ml 처리군에서 각각 18.6 %, 37.0 %, 62.1 %, 83.2 %로 농도 의존적으로 증가하였다($p < 0.05$). 갈근 에탄올 추출물 100 μ g/ml의 hydrogen peroxide 소거능은 BHT (100 μ g/ml)의 45.0 % 보다 2배정도 높았다.

갈근 에탄올 추출물의 직접적인 hydroxyl radical 소거능은 TBAR를 생성 정도²⁹⁾로 측정하였다. 갈근 에탄올 추출물 (5-100 μ g/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 hydroxyl radical 소거능을 나타냈으며($p < 0.05$), 100 μ g/ml 처리군에서는 53.2 % 정도 hydroxyl radical 소거능을 관찰할 수 있었다. 갈근 에탄올 추출물 100 μ g/ml 농도의 hydroxyl radical

소거능은 100 μ g/ml BHT(33.9 %)에 비교하여 더 높은 소거능을 나타냈다.

갈근 에탄올 추출물 (5-100 μ g/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 직접적인 DPPH 소거능 효과는 나타내어, 갈근 에탄올 추출물 5, 10, 50, 100 μ g/ml 처리군에서 각각 대조군에 비해 14.0 %, 32.3 %, 42.3 %, 68.0 %로 대조군에 비교하여 50 μ g/ml 농도이상에서 유의한 수준의 소거능을 나타냈다($p < 0.05$). 갈근 에탄올 추출물 100 μ g/ml의 DPPH 소거능은 BHT (100 μ g/ml)의 65.8 %와 비슷하였다.

Table 1. Scavenging activity of the ethanol extract of *P. thunbergiana* radix (EPR) against superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and DPPH.

Concentration (μ g/ml)	Superoxide radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	DPPH scavenging activity (%)
0	0.0 \pm 2.00	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 1.0	0.0 \pm 2.0
5	38.1 \pm 5.1*	18.6 \pm 0.4*	18.9 \pm 0.7*	14.0 \pm 2.1
EPR 10	52.4 \pm 5.8*	37.0 \pm 1.9*	22.1 \pm 0.4*	32.3 \pm 1.45
50	59.5 \pm 5.8*	62.1 \pm 4.2*	26.1 \pm 0.44*	42.3 \pm 1.45*
100	78.6 \pm 2.9*	83.2 \pm 2.6*	53.2 \pm 0.54*	68.0 \pm 1.73*
BHT 100	16.7 \pm 1.0*	45.0 \pm 5.6*	33.9 \pm 0.6*	65.8 \pm 1.8*

* $P < 0.05$ when compared with control group

고 찰

본 연구에서 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포독성에 대한 갈근 에탄올 추출물의 보호효과를 관찰할 수 있었다. HEI-OC1 세포에서 10 μ M cisplatin의 세포독성은 대조군의 53.6 % 수준으로 생존률을 감소하였으나, 갈근 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 cisplatin 세포독성을 억제하여 100 μ g/ml 농도 처리군의 생존률은 92.0 %까지 증가하였다. Cisplatin은 DNA cross-linking agent로 항암효과 면에서 우수할 뿐 아니라 비교적 치료범위도 넓어 많이 사용되고 있는 항암제 중 하나이다³¹⁾. 그러나 고농도의 cisplatin 투여는 청각 신경세포 뿐 만 아니라, 청각각 유모세포 (sensory hair cells) 주변의 혈관줄무늬 (stria vascularis)와 지지 세포 (supporting cell)의 퇴화에 영향을 주어 내이의 손상을 유발한다^{32,33)}. 그러나 cisplatin의 내이 손상기전은 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않다. 최근 cisplatin이 활성산소와 유리라디칼을 생성하고 glutathione과 같은 항산화 물질과 SOD, CAT, GPX와 같은 항산화 효소들의 활성을 감소시켜 malondialdehyde와 같은 지질과산화물질의 축적에 의한 청각에 관련된 세포 및 조직에 산화적 손상을 줌으로써 독성을 나타낸다고 한다³⁴⁾. 많은 연구에서 α -tocopherol, glutathione, glutathione monoethyl ester, sodium thiosulfate, diethyldithiocarbamate, fosfomycin, WR-2721, 및 lipoic acid 등^{33,35,36)}과 같은 항산화제와 유리라디칼 제거 또는 억제 물질들이 cisplatin에 의한 이독성을 억제한다고 보고하고 있다. 이에 본 연구에서도 HEI-OC1 세포에 cisplatin을 투여하였을 때 대조군과 비교시 3배 이상 증가된 지질과산화를 유도되었으며, 갈근 에탄올 추출물의 처리에 의하여 농도 의존적으로 억제되었으며, 특히 100 μ g/ml 처리군에서는 77.4 %의 억

제올을 관찰할 수 있었다. 이러한 같은 에탄올 추출물의 지질과 산화 억제 효과는 cisplatin에 의한 세포독성을 방어하는 주된 작용기전의 하나로 추정된다.

또한 같은 에탄올 추출물은 *in vitro* cell-free system에서 유리라디칼인 superoxide radical, hydroxyl radical, DPPH와 hydrogen peroxide 등을 현저하게 제거하는 기능을 확인할 수 있었다. Superoxide radical는 호흡에 의해 세포내 미토콘드리아에서 생성되는데 산소분자에 전자가 하나 더 붙어서 만들어지는 물질로서 이들 전자 불균형은 강한 반응성을 갖게 하여 지질과 산화에 직접적으로 영향을 미칠 뿐만 아니라 지질과산화 개시자인 hydroxyl radical의 전구물질이 되기도 한다³⁷. Superoxide radical은 superoxide dismutase에 의해 hydrogen peroxide로 전환이 가능하며 hydrogen peroxide는 금속이온이나 UV에 의해 hydroxyl radical을 생산할 수 있다. Hydroxyl radical은 짧은 시간 존재하지만 가장 반응력이 강한 활성 산소로 인체에 가장 큰 손상으로 주는 radical로 알려져 있다³⁸. 같은 에탄올 추출물 농도 5 µg/ml 또한 superoxide radical, hydrogen peroxide, 및 hydroxyl radical 등의 유리라디칼을 대조군에 비교하여 유의하게 제거하는 효과를 나타냈다. Hydrogen peroxide는 스스로는 반응성이 크지 않지만, hydroxyl radical로 전환 가능한 물질로 독성 잠재능을 가진 물질이라 할 수 있다³⁹. 따라서 hydrogen peroxide 뿐만 아니라 hydroxyl radical의 소거능은 세포내 항산화 작용 중 매우 중요한 역할이라 할 수 있다.

DPPH 라디칼 소거능 또한 50 µg/ml 이상에서 대조군에 비해 유의하게 증가한 것으로 보아 같은 에탄올 추출물의 cisplatin의 HEI-OC1세포 독성에 대한 보호 효과는 유리 라디칼 제거를 통한 지질과산화 감소와 관련이 있을 것으로 생각되어진다. 같은 주요 성분으로 isoflavone인 puerarine, puerarinxyloside, daidzein, daidzine 과 β-sitosterol, stigmasterol이 포함되어 있는 것으로 보고되었으¹³), 다른 연구에서 puerarine과 daidzine의 항산화제 역할이 보고 되었다⁴⁰⁻⁴²). 같은 에탄올 추출물의 유리라디칼 소거능 및 지질과산화 감소 효과는 이들 구성성분에 의한 효과로 추정된다. 이들 유효 구성성분의 순수정제, 효과와 작용기전에 대한 추후 연구는 cisplatin 같은 이독성 물질에 의한 내이 손상을 예방, 치료하는 물질의 개발에 유용한 정보를 제공할 수 있으리라 판단된다.

결 론

HEI-OC1 세포에서 같은 에탄올 추출물의 cisplatin에 의한 지질과산화 생성 억제효과와 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, DPPH 라디칼 등의 소거능을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 같은 에탄올 추출물은 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포의 세포독성을 유의하게 억제하는 효과를 나타냈다($p < 0.05$). 또한, 같은 에탄올 추출물은 cisplatin에 의한 세포의 지질과산화 정도를 억제하였으며 유리라디칼인 superoxide radical, hydroxyl radical, DPPH와 hydrogen peroxide 등을 현저하게 제거하였다. 이상의 결과는

같은 에탄올 추출물이 지질과산화 억제 기능과 직접적인 유리라디칼 제거 효과를 통하여 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포의 세포독성을 억제할 수 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 원광대학교 Vestibulocochlear Research Center (VCRC) 지원으로 수행되었음 (R13-2002-055-01003-0).

참고문헌

1. 통계청. 2004년 사망원인통계결과. 2005.
2. 건강보험연구센터. 국민건강보험공단 보도자료. 2002.
3. 정세영. 천연성분을 이용한 Cisplatin 신장독성 억제물질 개발. 전통약물로부터 신약개발. 서울, 경희대학교 경희동서약학연구소, pp 71-79, 1994.
4. Kalkanis, J.G., Whitworth, C., Rybak, L.P. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. Laryngoscope 114(3):538-542, 2004.
5. Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. Pharmacol Toxicol 76(6):386-394, 1995.
6. Lopez-Gonzalez, M.A., Guerrero, J.M., Rojas, F., Delgado, F. Ototoxicity caused by cisplatin is ameliorated by melatonin and other antioxidants. J Pineal Res 28(2):73-80, 2000.
7. Rybak, L.P., Ravi, R., Somani, S.M. Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. Fundam Appl Toxicol 26(2):293-300, 1995.
8. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine, 3rd end, Oxford University Press, New York, 1998.
9. Sies, H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. Am J Med 91: 31S-38S, 1991.
10. Krinsky, M. Mechanism of action of biological antioxidants. Proc Soc Exp Biol Med 200: 248-234, 1992.
11. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. Cell Mol Life Sci 61(2):192-208, 2004.
12. 허준 편. 동의보감편찬위원회 역. 동의보감. 서울, 학력개발사, p 378, 1988.
13. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. 서울, 정담, pp 33-40, 1998.
14. 조수열, 장주연, 김명주. 갈화와 같은 열수추출물이 에탄올 투여 흰쥐의 혈청성분에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 30(1):92-96, 2001.
15. 부일권, 김연섭. 같은이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마신경세포 손상에 미치는 영향. 대한분초학회지 19(1):77-82, 2004.
16. 이옥희. 같은 에탄올 추출물이 흰쥐의 항산화계에 미치는 영

- 향. 한국영양학회지 37(10):872-880, 2004.
17. 이정숙, 이경희, 정재홍. 갈근추출물이 고지방식이를 섭취한 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 28(1):218-224, 1999.
 18. 이정숙, 김은실, 김석환. 갈근추출물이 에탄올을 투여한 흰쥐의 지질 과산화에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 28(4):901-906, 1999.
 19. 한성희. 갈근 추출물이 납을 투여한 흰쥐의 혈청 효소활성도 및 조직의 납 축적에 미치는 영향. 한국식품과학회지 32(4):914-919, 2000.
 20. 정영희, 한성희, 신미경. 카드뮴을 급여한 흰쥐에서 갈근 열수 추출액의 해독작용효과. 한국식생활문화학회지 17(4):456-464, 2002.
 21. Alade, P.I., Irobi, O.N. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. J Ethnopharmacol 39: 171-174, 1993.
 22. Kalinec, G.M., Webster, P., Lim, D.J., Kalinec, F.A. Cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. Audiol Neurootol 8(4):177-189, 2003.
 23. Devarajan, P., Savoca, M., Castaneda, M.P., Park, M.S., Esteban-Cruciani, N., Kalinec, G., Kalinec, F. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. Hear Res 174(1-2):45-54, 2002.
 24. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J Immunol Methods 119(2):203-210, 1989.
 25. Watson, J.M., Parrish, E.A., Rinehart, C.A. Selective potentiation of gynecologic cancer cell growth in vitro by electromagnetic fields. Gynecol Oncol 71: 64-71, 1998.
 26. Teranishi, M., Nakashima, T., Wakabayashi, T. Effects of alpha-tocopherol on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. Hear Res 151(1-2):61-70, 2001.
 27. Beauchamp, C., Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 44(1):276-287, 1971.
 28. Gulcin, I., Buyukokuroglu, M.E., Oktay, M., Kufrevioglu, O.I. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. J Ethnopharmacol 86(1):51-58, 2003.
 29. Neyens, E., Baeyens, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. J Hazard Mater 98: 33-35, 2003.
 30. Blosi, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200, 1958.
 31. Willams, C.J., Whitehouse, J.M. Cis-platinum: a new anticancer agent. Br Med J 1: 1689-1991, 1979.
 32. Estrem, S.A., Babin, R.W., Ryu, J.H., Moore, K.C. Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. Otolaryngol Head Neck Surg 89(4):638-645, 1981.
 33. Cardinaal, R.M., de Groot, J.C., Huizing, E.H., Veldman, J.E., Smoorenburg, G.F. Dose-dependent effect of 8-day cisplatin administration upon the morphology of the albino guinea pig cochlea. Hear Res 144(1-2):135-146, 2000.
 34. Rybak, L.P., Whitworth, C., Somani, S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. Laryngoscope 109(11):1740-1744, 1999.
 35. Church, M.W., Kaltenbach, J.A., Blakley, B.W., Burgio, D.L. The comparative effects of sodium thiosulfate, diethyldithiocarbamate, fosfomycin and WR-2721 on ameliorating cisplatin-induced ototoxicity. Hear Res 86(1-2):195-203, 1995.
 36. Hou, F., Wang, S., Zhai, S., Hu, Y., Yang, W., He, L. Effects of alpha-tocopherol on noise-induced hearing loss in guinea pigs. Hear Res 179(1-2):1-8, 2003.
 37. Day, B.J. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. Drug Discovery Today. 9(13):557-566, 2004.
 38. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, 1999.
 39. Djordjevic, V.B. Free radicals in cell biology. Int Rev Cytol 237: 57-89, 2004.
 40. 박종욱, 김경순, 지영애, 류병호. 갈근에서 분리한 Daidzin 및 Puerarin의 사람 Low Density Lipoprotein 대한 항산화 효과. 한국식품영양과학회지 26(1):25-31, 1997.
 41. Lai, H.H., Yen, G.C. Inhibitory effect of isoflavones on peroxynitrite-mediated low-density lipoprotein oxidation. Biosci Biotechnol Biochem 66(1):22-28, 2002.
 42. Toda, S., Shirataki, Y. Comparison of antioxidative and chelating effects of daidzein and daidzin on protein oxidative modification by copper in vitro. Biol Trace Elem Res 79(1):83-89, 2001.