

## 금속매염제인 초산구리의 세포독성에 대한 자귀나무잎 추출물의 보호 효과

정정화\* · 임요섭\*\* · 서영미\*\*\*†

\*원광대학교 의과대학 산분병원, \*\*순천대학교 생물환경학과, \*\*\*원광보건대학교 간호학과

### Protective Effect of *Albizzia julibrissin* Leaf Extract on the Cytotoxicity Induced by Cupric Acetate Metallic Mordant

Jung-Hwa Chung\*, Yo-Sup Rim\*\*, and Young-Mi Seo\*\*\*†

\*Sanbon Hospital, School of Medicine, Wonkwang University

\*\*Department of Bioenvironmental Science, Suncheon National University

\*\*\*Department of Nursing, College of Medicine, Wonkwang Health Science University

#### ABSTRACT

**Objectives:** This study assessed the cytotoxicity of the metallic mordant cupric acetate (CA) and the protective effect of *Albizzia julibrissin* (AJ) leaf extract on CA-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts.

**Methods:** For this study, cell viability and antioxidative effects such as the inhibitory activity of lipid peroxidation (LP) and superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity were assessed.

**Results:** CA significantly decreased cell viability in a dose-dependent manner, and the XTT<sub>50</sub> value was measured as 55.0 μM of CA. The cytotoxicity of CA was determined as highly toxic by Borenfreund and Puerner's toxic criteria. The catalase antioxidant significantly increased cell viability diminished by CA-induced cytotoxicity in these cultures. Regarding the protective effect of AJ leaf extract on CA-induced cytotoxicity, AJ leaf extract remarkably increased the SAR scavenging ability and the inhibitory ability of LP. From these findings, it is suggested that oxidative stress is involved in the cytotoxicity of CA, and AJ leaf extract effectively protected CA-induced cytotoxicity via antioxidative effects.

**Conclusions:** Natural resources like AJ leaf extract may be a putative therapeutic agent for treatment or alleviation of the toxicity induced by CA metallic mordant.

**Key words:** *Albizzia julibrissin*, lipid peroxidation, metallic mordant, oxidative stress

## I. 서 론

구리(Copper, Cu)를 비롯한 카드뮴이나 수은, 철과 같은 중금속류는 독성이 강한 돌연변이원이면서도 환경오염물질로 잘 알려져 있다.<sup>1)</sup> 그 중 구리는 원자번호가 29인 적색을 띤 물질로 인체에서는 필수적인 미량 원소로 존재하며, 산업체에서는 전선제

조나 도금, 태양전지제조를 비롯하여 그 밖에도 직물매염제 및 도자기유약제조와 같은 공정 등에 중요한 산업원료로 널리 사용되고 있다.<sup>2)</sup> 그러나 이의 흡입이나 분진은 극미세입자로서 대기를 오염시켜 건강을 해치는 것은 물론,<sup>3)</sup> 체내에 과다 축적될 경우 피부와 같은 외피계를 비롯하여 소화계, 호흡계, 혈관계 등 여러 기관의 장기에 중독성을 나타냄으로써

†Corresponding author: Department of Nursing, College of Medicine, Wonkwang Health Science University, 514 Iksandae-ro, Iksan-city 54538, Korea, Tel: +82-63-840-1314, Fax: +82-63-840-1319, E-mail: dudn0408@wu.ac.kr  
Received: 31 August 2019, Revised: 17 October 2019, Accepted: 18 October 2019

심각한 후유증을 낳고 있다.<sup>4)</sup> 따라서, 우리나라의 산업안전보건법(노동부고시 제 88-69호)에서는 구리의 허용농도(TWA)를  $1 \text{ mg/m}^3$ 로 규정하고 있으며 만약 이의 기준을 어길 경우 강력한 처벌을 요구하고 있다.<sup>2)</sup> 구리화합물 중 초산구리(cupric acetate, CA)는 섬유나 직물을 염색하는 금속매염제로 많이 사용되고 있는데, 이는 색깔이 선명하고, 쉽게 탈색이나 변색이 되지 않으며, 특히 빛이나 마찰에 잘 견딜 수 있는 일광견뢰도가 비교적 다른 매염제보다 더 높기 때문이다.<sup>5)</sup> 그러나, 구리와 같은 금속매염제를 사용한 옷이나 직물류를 착용할 경우 이들 성분이 인체의 피부와 직접 접촉하게 되면서 피부염이나 홍반 및 색소변색과 같은 각종 피부병변을 유발하기 때문에 인체의 건강과도 밀접한 관련이 있어 이의 독성에 대한 역학적 중요성이 날로 높아지고 있다. 그럼에도 불구하고 아직도 구리에 대한 독성기전은 물론 이로 인한 손상 시 효과적인 치료약제나 치료방법도 매우 미흡할 뿐만 아니라, 세포를 대상으로 한 초산구리에 대한 독성 연구는 그리 많지 않다.<sup>6)</sup> 독성연구에서, 납이나 크롬, 알루미늄과 같은 중금속화합물의 독성은 산화적 스트레스(oxidative stress)와 연관한다고 제시되면서, 이들에 의한 독성치료를 항산화 측면에서 접근하려는 시도가 행해지고 있다.<sup>7)</sup> 실제로 염화알루미늄의 독성이 항산화제의 일종인 부틸하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene)에 의하여 방어되었다는 연구가 이를 뒷받침해주고 있다.<sup>8)</sup> 근래, 각종 식물화학성분(phytochemicals) 중에 페놀화합물(phenolic compound)이나 이소프레노이드(isoprenoid) 등과 같은 생리활성물질이 있어 항산화, 항염, 항균 등에 유효효과가 밝혀지면서 이를 적용한 병변의 치료방법을 모색하고 있다.<sup>9)</sup> 특히, 페놀화합물은 항산화 효능이 뛰어나 산화적 손상을 억제 내지는 방어하는데 매우 유용하다고 알려져 있다.<sup>10)</sup> 식물 중 콩과(Leguminosae)에 속하는 자귀나무(*Albizia julibrissin*)는 낙엽관목으로 꽃은 6~7월경에 분홍빛의 색깔로 10월경에 열매를 맺으며, 껍질과 꽃, 잎은 약제로 사용하는데, 껍질은 여름부터 가을에 채취하여 햇볕에 말려 사용한다.<sup>11)</sup> 특히, AJ잎에는 항산화작용이 뛰어난 플라보노이드(flavonoid), 배당체인 퀘세틴(querctin)을 비롯한 사포닌(saponin)과 같은 페놀화합물성분이 다량 들어 있어 오래전부터 불면증을 비롯한 임파선염, 후두염, 통증 및 회충구제 등에 사

용되어 왔다.<sup>12)</sup> 특히, 잎에는 항산화능이 강한 페놀 글리코시드(phenolic glycosides)를 비롯한 quercetin이나 saponin과 같은 flavonoid계통의 성분들이 다른 부위에 비해 다량 함유되어 있다.<sup>13)</sup> 근래, 세포배양기법이 발전되면서 배양세포를 이용한 각종 질환 모델을 대상으로 병변의 기전규명이나 약제의 효능 및 안전성 검사에 있어 최적의 분석도구로 자리잡고 있다.<sup>14)</sup> 본 연구에서는 금속매염제인 구리의 세포독성을 피부측면에서 분석하기 위하여 피부에 널리 분포하고 있는 배양 섬유모세포의 일종으로서 정상생쥐의 배아로부터 확립된 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 독성을 산화적 손상 측면에서 조사하였으며, 동시에 이에 대한 자귀나무잎 추출물의 보호 효과를 항산화 측면에서 조사함으로써 산화적 손상과 관련된 치료적 대체물질을 천연소재로부터 알아보고 자 하였다.

## II. 연구 방법

### 1. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 CA를 비롯한 linoleic acid, ammonium thiocyanate, xanthine, ferrous chloride, dimethyl sulfoxide (DMSO), catalase (CAT), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), phosphate buffered saline (PBS), hydrochloride (HCl), alcohol 및 XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. CA의 제조는 Oh 등<sup>15)</sup>의 연구를 근거로 하였다. XTT<sub>50</sub> 값의 확인은 태아소혈청(FBS, Gibco, USA)이 포함되지 않은 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)을 사용하였으며, 각각 30~60  $\mu\text{M}$ 의 저장액을 만들어 사용하였다. XTT 제조는 PBS로 0.05 mg/mL를 만든 후 이를 희석하여 사용하였다.

### 2. 자귀나무잎 채취 및 추출

전북 야산에서 채취한 자귀나무를 동정 확인 후 실험에 사용하였다. 채취한 전초줄기로부터 잎을 분리하여 잘 씻은 후 바람이 잘 통하는 곳에서 건조시킨 다음 시료를 제작하였다. 보관중인 시료 62.9 g을 잘게 파쇄한 다음 시료와 함께 약 220 mL 증류수를 1,000 mL 환저플라스크에 넣고 90°C에서 3시

간 동안 가열하였다. 위와 동일하게 4회 실시 후 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 진공농축기에서 감압 농축시킨 후 시료수율이 4.6%인 2.9 g의 시료를 얻었다.

### 3. 세포 배양 및 세포생존율 분석

Zhang 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 3~4회 계대배양한 NIH3T3 섬유모세포(ACTT, CRL 1658)를 PBS로 3회 수세 후 효소해리술을 이용하여 배양 용기로부터 세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 원심분리하여 모은 후 10% FBS가 포함된 MEM 배양액으로 well 당  $1 \times 10^5$  cells이 되도록 분주하였다. 분주된 세포는 36°C, 5% CO<sub>2</sub>의 항온기에서 72시간 동안 배양하였다. Mosmann<sup>15)</sup>의 방법에 따라, 세포생존율은 배양 세포에 약제 또는 시료추출물을 처리한 후 이에 반응하여 세포생존력에 따라 생성된 물질과 XTT간의 반응을 위하여 전날 재조한 XTT 저장액을 10 µL씩 넣고 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 다음 DMSO로 녹인 후 분광광도계(ELISA, Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) 450 nm에서 세포생성물질의 양을 흡광도에 의해 측정 후 대조군과 비교 조사하였다. XTT<sub>50</sub>값은 회귀직선식에 의하여 산출하였다.

### 4. 초산구리 처리

배양중인 NIH3T3 섬유모세포에 CA가 30~60 µM로 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리 후 흡광도를 대조군과 비교하여 XTT<sub>50</sub> 농도를 측정하였다.

### 5. 카탈라제의 항산화능 측정

항산화 분석의 양성대조군으로 항산화제(quercetin) 보다 훨씬 항산화능이 높은 효소인 CAT의 항산화능을 조사하기 위하여 Park 등<sup>16)</sup>의 연구를 근거로 활성산소의 일종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35.0 µM을 배양 세포를 처리하기 2시간 전에 카탈라제 25~35 µM에서 처리 후 흡광도를 대조군과 비교 조사하였다.

### 6. 초산구리의 독성에 대한 카탈라제의 영향

XTT<sub>50</sub> 농도의 CA를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 CAT 25와 35 µM에서 세포를 처리 후 흡광도에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 7. 자귀나무잎 추출물의 세포독성 및 추출물 처리

자귀나무잎 추출물의 독성 조사를 위해 40~120 µg/mL의 각각 농도에서 48시간 처리 후 Lee 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 대조군과 유의한 흡광도의 감소를 나타내는 최대 허용한계 농도를 측정하였으며 이를 기준으로 한계농도 바로 이하 농도인 80과 100 µg/mL 농도를 분석에 사용하였다. CA에 대한 추출물 영향 조사에서 80과 100 µg/mL의 추출물을 2시간 동안 처리한 다음 CA XTT<sub>50</sub> 농도를 처리한 후 흡광도에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 8. 자귀나무잎 추출물의 함량 분석

폴리페놀(polyphenol)분석은 A.O.A.C.<sup>18)</sup>에 따라 추출시료 0.2 mL를 phenol reagent 0.2 mM에서 3분 동안 처리하였다. 처리 후 0.4 mL sodium carbonate에 1시간 동안 반응 후 tannic acid를 표준시약으로 하여 흡광광도계, 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Flavonoid 분석은 Nieva Moreno 등<sup>19)</sup>에 의해 시료 용액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate, 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL, 에탄올 4.7 mL 등의 혼합액을 25°C에서 40분간 반응시킨 후, quercetin을 표준시약으로 하여 흡광광도계, 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 9. 지질과산화 활성 측정

지질과산화(lipid peroxidation) 활성 측정은 Kikuzaki와 Nakatani<sup>20)</sup>에 의해 에탄올 시료 3.9 mL와 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid, 0.05 M PBS 용액 12.1 mL를 혼합한 후 40°C에서 24시간 동안 처리하였다. 그 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate로 처리하고 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL에서 3분 동안 정치하였다. 정치 후 증류수를 대조군으로, CAT를 양성대조군으로 하여 흡광광도계, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 활성은 백분율로 나타냈으며, 지질과산화 저해능은 무첨가군의 흡광도에 대한 시료첨가군의 흡광도의 백분율을 100에서 뺀 차이로 나타냈다.

### 10. 과산화수소이온라디칼 소거활성 측정

과산화수소이온라디칼(superoxide anion-radical) 소거활성은 nitroblue tetrazolium (NBT) 방법에 의하여

시료용액 0.1 mL, 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 NBT와 0.4 mM xanthine을 첨가하여 37°C에서 20분 동안 처리하였다. 처리 후 반응정지를 위해 1 N HCl 1 mL를 넣어 생성된 과산화수이온라디칼양을 ELISA reader로, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능은 무첨가군의 흡광도에 대한 시료첨가군의 흡광도의 백분율을 100에서 뺀 차이로 나타냈다.

11. 통계 처리

통계는 SPSS/WIN 18.0을 이용하였으며, Mean±SD로 표시하였다. 실험결과는 ANOVA를 시행하였고, 이에 대한 사후 분석은 Tukey HSD로 하였다. 유의수준은  $p < 0.05$ 로 하였다.

III. 결 과

1. 초산구리의 세포독성 측정

CA의 독성조사 결과, CA는 처리 농도에 비례하여 흡광도를 유의하게 감소시켜 독성을 나타냈다 ( $p < 0.001$ ). 대조군에 비해 30  $\mu$ M CA의 흡광도는  $0.58 \pm 0.06$ 으로 나타났으며, 40  $\mu$ M CA, 50  $\mu$ M CA, 60  $\mu$ M CA는 각각  $0.45 \pm 0.05$ ,  $0.39 \pm 0.05$ ,  $0.33 \pm 0.03$ 로 나타났다. 이 과정에서  $XTT_{50}$  값은 55.0  $\mu$ M의 처리에서 나타났다(Fig. 1). CA의 독성에 대한 사후 분석결과 대조군, 30  $\mu$ M CA, 40  $\mu$ M CA, 60  $\mu$ M CA 순으로 세포독성이 낮음을 알 수 있었다. 50  $\mu$ M CA은 40  $\mu$ M CA, 60  $\mu$ M CA와 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

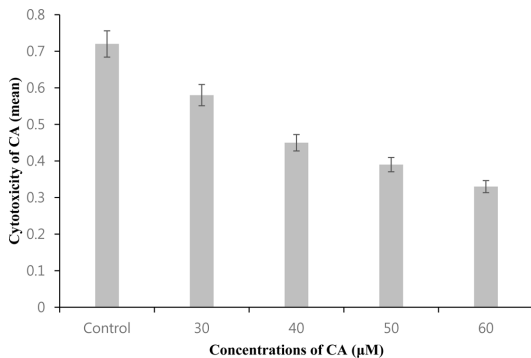


Fig. 1. The cytotoxicity of cupric acetate (CA) on cultured NIH3T3 fibroblasts by XTT assay. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

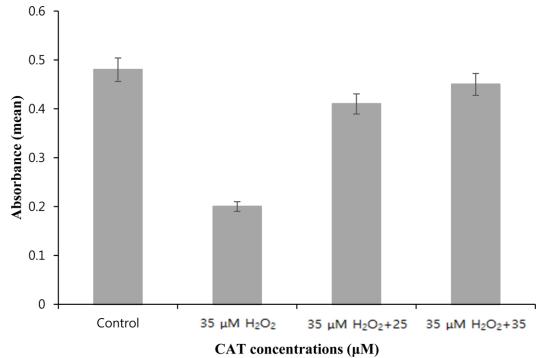


Fig. 2. The antioxidative ability of catalase (CAT) on the hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in cultured NIH3T3 fibroblasts. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

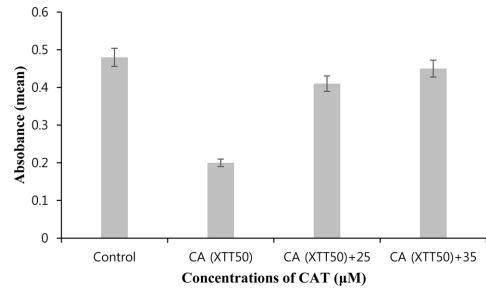


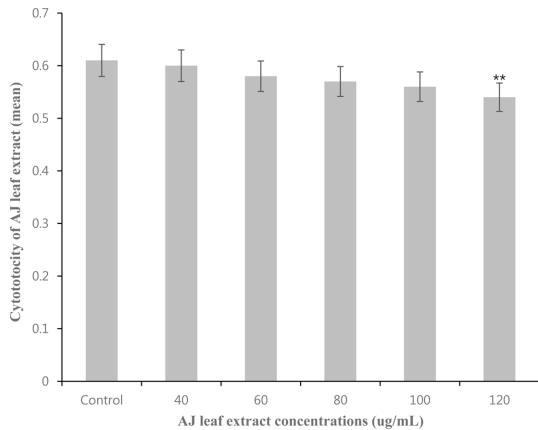
Fig. 3. The effect of catalase (CAT) on the cytotoxicity induced by cupric acetate (CA) in cultured NIH3T3 fibroblasts. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

2. 카탈라제의 항산화능 측정

CAT의 항산화능 측정 결과,  $H_2O_2$ 만을 처리한 경우 대조군에 비하여 흡광도가  $0.20 \pm 0.04$ 로 나타난 반면, 25와 35  $\mu$ M 농도의 CAT 처리에서는 각각  $0.43 \pm 0.03$ 과  $0.48 \pm 0.08$ 로 나타났다( $p < 0.001$ ) (Fig. 2). CAT의 항산화능 사후분석결과 대조군, 35  $\mu$ M CAT, 25  $\mu$ M CAT, 35  $H_2O_2$  순으로 흡광도가 높음을 알 수 있었다. 35  $\mu$ M CAT의 항산화능은 대조군, 25  $\mu$ M CAT과 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

3. 초산구리에 대한 카탈라제의 영향

CA의 세포독성에 대한 항산화제인 CAT의 영향을 확인한 결과,  $XTT_{50}$  농도의 CA만의 처리에서는 흡광도가 대조군에 비하여  $0.20 \pm 0.03$ 으로 나타난 것에 비하여 25와 35  $\mu$ M의 CAT의 처리에서는 각각

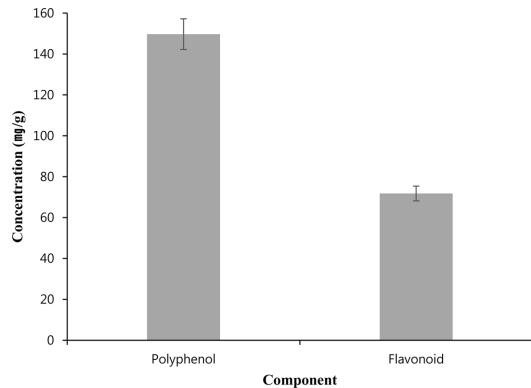


**Fig. 4.** The cytotoxicity of *Albizzia juribrissin* (AJ) leaf extract on cultured NIH3T3 fibroblasts. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from 120 µg/mL AJ leaf extract-treated group.

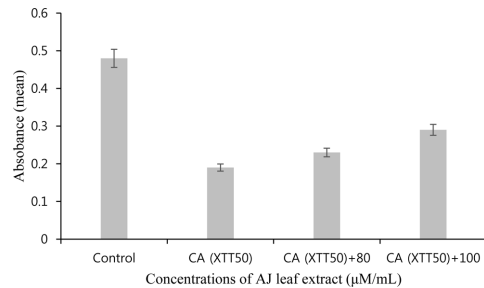
0.41±0.02와 0.45±0.04로 나타났다( $p<0.001$ ) (Fig. 3). CA의 세포독성에 대한 CAT의 항산화능 사후분석결과 대조군, 35 µM CAT, 25 µM CAT, CA (XTT<sub>50</sub>) 순으로 흡광도가 높음을 알 수 있었다. 35 µM CAT의 세포생존율은 대조군, 25 µM CAT와 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

#### 4. 자귀나무잎 추출물의 세포독성

자귀나무잎 추출물에 대한 독성 측정결과 40과 60 µg/mL 처리에서는 흡광도가 대조군인 0.61±0.03에 비하여 0.60±0.03과 0.58±0.06으로 각각 나타났다. 또한, 80, 100, 120 µg/mL 추출물 처리에서는 0.57±0.02, 0.56±0.06, 0.54±0.03으로 각각 나타났다( $p=0.006$ ) (Fig. 4). 자귀나무잎 추출물 독성에 대한 사후분석결과 40, 60, 80, 100 µg/mL 간에는 통계적으로 차이가 없었으나 40, 60, 80, 100 µg/mL 순으로 흡광도가 높았다. 또한 40 µg/mL는 대조군과 통계적인 차이가 없었으며, 100과 120 µg/mL와도 통계적인 차이가 없었다. 그러나 대조군과 120 µg/mL의 흡광도가 통계적으로 차이를 보여, 대조군에 비하여 유의한 흡광도의 감소를 나타내는 최대 허용한계 농도는 120 µg/mL 이상에서 나타나는 것으로 확인됨에 따라 본 실험에서는 자귀나무잎 추출물을 120 µg/mL 이하의 농도로 사용하였다.



**Fig. 5.** The component of *Albizzia juribrissin* (AJ) leaf extract. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.



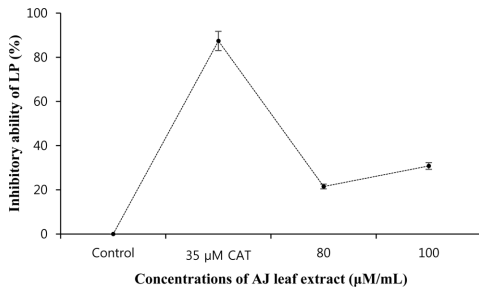
**Fig. 6.** The protective effect of *Albizzia juribrissin* (AJ) leaf extract on the cytotoxicity induced by cupric acetate (CA) in cultured NIH3T3 fibroblasts. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

#### 5. 자귀나무잎 추출물의 함량 분석

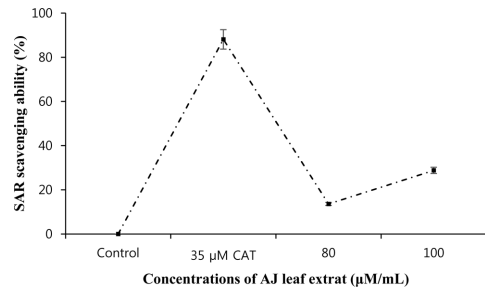
AJ잎 추출물의 함량조사에 있어서 총 polyphenol의 함량은 149.7±11.52 mg/g으로 나타났으며, 총 flavonoid 함량은 71.8±4.07 mg/g으로 각각 나타났다 (Fig. 5).

#### 6. 초산구리의 세포독성에 대한 자귀나무잎 추출물의 영향

자귀나무잎 추출물이 CA의 세포독성에 미치는 영향 조사 결과, CA의 처리에서는 흡광도가 대조군에 비하여 0.19±0.01로 나타났는데 비하여 80 µg/mL 추출물 처리에서는 0.23±0.02로 나타났다. 또한 100 µg/mL 추출물 처리에서는 0.29±0.02로 나타나 CA만의 처리에 비하여 유의한 흡광도의 증가를 보였다( $p<0.001$ ) (Fig. 6). 자귀나무잎 추출물이 CA의 세포



**Fig. 7.** The lipid peroxidation (LP) activity of *Albizzia juribrissin* (AJ) leaf extract determined at a wavelength of 500 nm. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.



**Fig. 8.** The superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of *Albizzia juribrissin* (AJ) leaf extract determined at a wavelength of 560 nm. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.

독성에 미치는 영향에 대한 사후분석결과 대조군, 100 µg/mL AJ잎, 80 µg/mL AJ잎, CA (XTT<sub>50</sub>) 처리 순으로 흡광도가 높았다.

### 7. 지질과산화 활성 측정

지질과산화 활성 측정을 위하여 자귀나무잎 추출물 시료를 분석한 결과 80 µg/mL 농도처리에서는 활성이 대조군에 비하여 78.5% (0.51±0.06)로 나타났으며, 100 µg/mL의 처리에서는 69.2% (0.45±0.03)로 나타났다. 따라서, 지질과산화 저해능은 80과 100 µg/mL에서 각각 21.5와 30.8%로 나타나 대조군에 비하여 모두 유의한 저해능을 나타냈다( $p < 0.001$ ). 특히, 100 µg/mL 농도에서의 저해능은 30.8%로 양성대조군인 CAT의 저해능 87.4% (0.08±0.02) ( $p < 0.001$ )에 대하여 35% 이상의 높은 저해능을 보였다(Fig. 7). 자귀나무잎 추출물의 지질과산화 저해능 측정에 대한 사후검증결과 35 µM CAT, 100 µg/mL 자귀나무잎 추출물, 80 µg/mL 자귀나무잎 추출물, 대조군 순으로 지질과산화 저해능이 높은 것으로 확인되었다.

### 8. 과산화수소이온라디칼 소거활성 측정

자귀나무잎 추출물에 대한 과산화수소이온라디칼 소거활성 측정을 위하여 80과 100 µg/mL의 농도의 추출물 시료를 각각 분석한 결과 80 µg/mL 추출물의 처리에서는 소거활성이 86.4%로 나타났으며, 100 µg/mL의 처리에서는 71.2%로 나타났다. 따라서, 소거능은 80과 100 µg/mL에서 각각 13.6% ( $p < 0.01$ )와 28.8% ( $p < 0.001$ )로 대조군에 비하여 유의한 소거능을

나타냈으며, 특히 추출물 100 µg/mL의 농도의 소거능은 28.8%로 양성대조군인 CAT 소거능 88.1%값에 대하여 30% 이상인 것으로 나타났다(Fig. 8). 자귀나무잎 추출물의 과산화수소이온라디칼 소거능 측정에 대한 사후검증결과 35 µM CAT, 100 µg/mL 자귀나무잎 추출물, 80 µg/mL 자귀나무잎 추출물, 대조군 순으로 과산화수소이온라디칼 저해능이 높은 것으로 확인되었다.

## IV. 고 찰

초산구리(CA)는 초산크롬과 같은 금속매염제의 일종으로 옷이나 천같은 섬유에 색상을 착색시켜주는 기능을 가지고 있다. 초산구리와 같은 금속매염제는 피부에 접촉되거나 인체 내로 폭로될 경우 접촉피부염이나 여러 장기를 손상시켜 각종 질환을 유발한다.<sup>21)</sup> 따라서, 본 연구에서는 CA의 세포독성을 조사하기 위하여 30~60 µM을 각각 배양 세포에 처리한 결과, 처리 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며, 이 때 XTT<sub>50</sub> 값이 55.0 µM로, 이는 Borenfreund와 Puerner<sup>22)</sup>의 독성판정기준에 따라 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 이들은 약제의 독성을 XTT<sub>50</sub> 값이 100 µM 이하인 경우는 고독성(highly-toxic)으로, 100~1,000 µM이면 중간독성(mid-toxic)으로, 1,000~2,000 µM이면 저독성(lower-toxic)으로 각각 판정하였다. 본 결과는 CA와 같은 구리염이 배양 세포에 세포독성을 나타냈다는 연구보고와 일치하였다.<sup>6)</sup> 본 연구에서 CA가 세포독성을 나타낸 것은 CA가 크롬처럼 세포내 DNA와 같은

핵산물질합성계에 영향을 미쳤거나,<sup>23)</sup> 또는 단백질 합성계에 영향을 주었을 가능성도 배제할 수는 없지만,<sup>24)</sup> 그 보다는 CA에 의한 산화적 손상에 의하여 세포가 퇴화되거나 사멸된 결과 세포생존율의 감소가 나타났을 가능성이 클 것으로 생각된다.<sup>7)</sup> 따라서, 본 연구에서는 CA 독성과 산화적 손상간의 상호 연관성을 조사하기 위하여 항산화효소의 일종인 카탈라제(CAT)를 배양 NIH3T3 섬유모세포에 전 처리한 결과 CA만을 처리한 실험군에 비하여 유의한 세포 생존율의 증가를 보였다. 본 연구 결과는 CAT가 CA의 독성을 방어한 것으로 이는 CA의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있다는 것을 제시하고 있으며, 동시에 CA와 같은 금속염의 일종인 염화카드뮴의 독성을 항산화제인 비타민(vitamin) E가 방어하였다는 연구보고<sup>7)</sup>가 이를 말해 주고 있다. 따라서, 위에서와 같이 본 연구나 타 연구의 결과들은 모두 CA 독성의 요인 하나가 산화적 손상을 증명하고 있다. 한편, CA 독성에 대한 자귀나무(AJ) 추출물의 영향을 알아보기 위하여, 배양 세포에 80과 100 µg/mL 농도의 추출물을 각각 2시간 동안 전 처리한 결과 CA만의 처리에 비하여 모두 세포생존율의 증가를 보였으며, 특히 100 µg/mL의 농도처리에서는 유의한 증가를 보였다. 본 결과는 자귀나무 추출물이 CA 독성을 방어한 것으로서, 이는 자귀나무 추출물이 CA의 산화적 손상에 따른 세포의 퇴행성 변화를 방어함으로써 세포생존율이 증가한 것으로 사료된다. 이같은 현상은 추출물 속에 함유된 quercetin이나 afzelin, saponin과 같은 페놀화합물에 속하는 flavonoid계통의 항산화 성분 작용에 의한 결과로 생각된다.<sup>25)</sup> 따라서, 본 연구에서는 자귀나무 추출물 성분인 quercetin<sup>26)</sup>이나 saponin<sup>27)</sup>에 대한 항산화능은 이미 밝혀져 있기 때문에 이들에 대한 정성분석 보다는 정량적분석 측면에서 추출물에 대한 polyphenol과 flavonoid의 함량을 조사하였으며, 동시에 추출물에 대한 항산화능을 알아보기 위하여 지질과산화 저해능과 과산화수이온라디칼 소거능을 각각 조사하였다. 지질과산화분석은 산화적 손상에 의한 막지질의 손상정도를 측정하는 정량분석이며, 또한 과산화수이온라디칼분석 역시 산화적 손상유발요인인 자유기(free radical)를 측정하는 분석이기 때문에, 지질과산화 저해능 분석이나 과산화수이온라디칼 소거능 분석은 모두 산화적 손상에 대한 항산화능을 알아보는

대표적인 분석방법의 하나이다.<sup>28)</sup> 먼저 항산화능의 양적측정을 위한 함량분석에 있어서, 자귀나무 추출물은 polyphenol과 flavonoid 함량이 각각 149.7과 71.8 mg/g으로 나타났다. 이는 자귀나무 추출물처럼 다량의 polyphenol과 flavonoid를 함유하고 있는 한련초(*Eclipta prostrata* L.) 추출물<sup>17)</sup>이나 지금초(*Euphorbia humifusae* L.) 추출물<sup>29)</sup>이 유의한 항산화능을 나타냈다는 연구보고가 이를 뒷받침해주고 있다. 한편, 자귀나무 추출물에 대한 지질과산화 저해능과 과산화수이온라디칼 소거능을 조사한 결과, 추출물은 대조군에 비하여 각각 높은 저해능과 소거능을 보임으로써 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 이 같은 결과는 saponin과 같은 flavonoid나 vitamin C와 같은 항산화제 성분을 함유하고 있는 쇠비름(*Portulaca oleracea* L.) 추출물이 황산구리의 산화적 손상으로 유발된 지질과산화에 대하여 저해능을 나타냈다는 연구보고나<sup>30)</sup> 또한 flavonol과 같은 페놀화합물의 일종인 탄닌(tannin) 성분을 가지고 있는 꽃향유(*Elscholtzia splendense*) 추출물이 초산납의 산화적 손상으로 유발된 과산화수이온라디칼과 같은 자유기를 소거하였다는 연구 보고들과 일치하였다.<sup>31)</sup> 위 연구 결과는 추출물 속에 함유되어 있는 tannin이나 quercetin 또는 saponin과 같은 페놀화합물 성분들의 강력한 항산화 작용에 의한 결과로 생각된다.<sup>10)</sup> 자귀나무 추출물과 같은 천연성분에 대한 항산화 분석방법에는 위의 분석외에도 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD)계열에 속하는 SOD-유사기능을 비롯하여<sup>32)</sup> 전자공여능(electron donating ability)<sup>17)</sup>이나 잔틴옥시다제(xanthine oxidase, XO) 저해능과 같은 많은 효소계열의 분석들이 개발되어 있다. 차후 위와 같은 다양한 측면에서 종합적인 분석을 함으로서 보다 자세한 기전이나 성분효능을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 결 론

본 연구는 금속매염제인 초산구리(CA)의 세포독성 및 이에 대한 자귀나무 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하였다. 이를 위해 XTT assay에 의한 세포생존율을 비롯하여 지질과산화 저해능 및 과산화수이온라디칼 소거능을 조사하였다. 본 실험에서 배양 NIH3T3 섬유모세포에 30~60 µM의 CA

를 각각 처리한 결과 처리 농도에 의존적으로 세포 생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰으며,  $XTT_{50}$  값이  $55.0 \mu\text{M}$ 에서 나타남으로써 고독성으로 나타났다. 또한, 항산화제인 카탈라제(CAT)는 CA의 세포독성을 유효하게 방어하였다. 한편, CA의 세포독성에 대한 자귀나무잎 추출물의 영향에 있어서, 자귀나무잎 추출물은 CA에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로써 세포독성을 방어하였다. 이와 동시에, 자귀나무잎 추출물은 대조군에 비하여 높은 지질과산화 저해능 및 과산소음이온라디칼 소거능을 보임으로서 항산화 작용을 나타냈다. 위의 결과로부터 CA의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, 또한 자귀나무잎 추출물은 CA의 독성을 항산화능에 의하여 유의하게 방어하였다. 따라서, 자귀나무잎 추출물과 같은 천연성분은 CA와 같은 금속매염제와 같이 산화적 손상과 관련된 독성을 경감 내지는 치료할 수 있는 물질을 천연소재로부터 개발하는데 있어 기초자료로서의 활용적 가치가 크다고 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2019년도 원광대학교 산본병원의 지원에 의해서 수행됨.

## References

1. Kim SC. Study on investigation and characteristics of metallic elements in industrial complex. *Journal of Environmental Health Science*. 2011; 37(3): 209-217.
2. Cho KS. Occupational health. 2nd (ed), Sumoonsa Academic Publishing: 1991, pp. 449.
3. Cho TJ, Jeon HL, Youn HS, Lee MY, Son BS. A study on the size of ultrafine particles and heavy metal concentrations in the atmosphere. *Journal of Environmental Health Science*. 2010; 36(6): 480-495.
4. Sandstead HH. Requirements and toxicity of essential trace elements illustrated by zink and copper. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995; 61(3): 621-624. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.621S>
5. Batista BL, Rodrigues JL, Nunes JA, Tormen L, Curtius AJ, FJ Barbosa. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: comparison with ETAAS. *Talanta*. 2008; 76(3): 575-579. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.046>
6. Choi MK, Chung YT. A study on the cytotoxic effect of cadmium, copper, mercury and chromium on cultured mouse fibroblasts. *Journal of Wonkwang Medical Science*. 1990; 6(1): 77-91.
7. Leonard S, Wang S, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr (VI)-induced carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology and Toxicological Oncology*. 2000; 19(1-2): 49-60.
8. Jung JY, Jung IJ, Jekal SJ. The protective effect of *Lonicerae flos* extract on cultured C6 glioma cells damaged by aluminum of dementia inducer. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2017; 49(3): 271-278. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2017.49.3.271>
9. Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation new directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19(5): 405-419. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.009>
10. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006; 54(26): 9798-9804. <https://doi.org/10.1021/jf0620719>
11. Hwang SG, Kim CJ, Kim YI, Ju SM, Kim WS, Jeon BH. Effect of the water extract of *Albizzia julibrissin* on apoptotic cell death in the human leukemic Jurket T cell line. *Yakhak Hoeji*. 2001; 45: 730-738.
12. Jung MJ, Kang SS, Jung YJ, Choi JS. Phenolic glycosides from the stem bark of *Albizzia julibrissin*. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin*. 2004; 52(12): 1501-1503. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1501>
13. Jang KG, Oh HC, Ko EK, Kang KH, Park SE, Oh MH, et al. Free radical scavenger from the leaves of *Albizzia julibrissin*. *Koran Journal of Pharmacology*. 2002; 33(1): 18-20.
14. Zhang Q, Kluz T, Salnikow K, Costa M. Comparison of the cytotoxicity, cellular uptake, and DNA-protein induced by potassium chromate in lymphoblast cell lines derived from three different individuals. *Biological Trace and Elemental Research*. 2002; 86(1): 11-22.



15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
16. Park ST, Kwang MJ, Jekal SJ, Lee JH, Yoon MY, Pyo AJ, et al. Protective effect of *Sanguisorba officinalis* L. extract on DNCB-induced cytotoxicity. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2013; 9(2): 115-120.
17. Lee SH, Jung IJ, Jang HS. The antioxidative effect of *Eclipta prostrata* L. extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by manganese-induced cytotoxicity. *Biomedical Science Letters*. 2018; 24(4): 357-364. <https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.4.357>
18. A.O.A.C. Official methods of analysis, 18th ed. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists. 2005. Vol 45, p.21-22.
19. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 71(1-2): 109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0)
20. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *Journal of Food Science*. 1993; 58(6): 1407-1410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x>
21. Sreenivasa RK, Balaji T, Prasada RT, Naidu GRK. Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasmaatomic emission spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*. 2002; 57(8): 1333-1338. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00045-9)
22. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods*. 1985; 9(1): 7-9.
23. 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. *Chemical Research and Toxicology*. 1999; 12(10): 1002-1009. <https://doi.org/10.1021/tx9802264>
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951; 193: 265-271.
25. Ikeda T, Fujiwara S, Araki K, Kinjo J, Nohara T, Ida Y, et al. Three new triterpenoidal saponins acylated with monoterpenic acid from *Albizia* cortex. *Bulletin of Chemical Society of Japan*. 1995; 68(12): 3483-3490. <https://doi.org/10.1246/bcsj.68.3483>
26. Graefe EU, Wittig J, Mueller S. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2001; 41(5): 492-499. <https://doi.org/10.1177/00912700122010366>
27. Arditi T, Meredith T, Flowerman P. Renewed interest in soy isoflavones and saponin. *Cerebral Foods World*. 2000; 45: 414-417.
28. Chen CY, Lin TH. Effects of nickel chloride on human platelets: enhancement of lipid peroxidation, inhibition of aggregation and interaction with ascorbic acid. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2001; 62(6): 431-438. <https://doi.org/10.1080/009841001505011692>
29. Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Euphorbia humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Biomedical Science Letters*. 2018; 50(4): 501-510. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.4.501>
30. Oh YL, Choi YR, Chang BS, Jung IJ. Antioxidative effect of *Portulaca oleracea* L. extract on allergic contact dermatitis agent, copper in cultured human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2012; 8(4): 243-249.
31. Son YW, Jung IJ. Alleviating effect of *Elscholtzia splendense* extract on the induced toxicity by lead acetate of hair dye compound in cultured glioma cells. *Journal of Investigative Cosmetology*. 2012; 8(2): 115-120.
32. Seo TM, Kim NS. Effect of superoxide dismutase on oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin melanocyte. *Journal of Korean Society of Occupational and Environmental Hygiene*. 2009; 19(3): 261-270.

#### <저자정보>

정정화(교수), 임요섭(교수), 서영미(교수)