

숙지황 추출물이 Cisplatin으로 손상된 HEI-OC1 세포보호와 유리라디칼 소거능에 미치는 영향

유현희 · 서세정¹ · 김연화¹ · 박래길² · 소홍섭² · 전병훈³ · 신미경⁴ · 정수영⁴ · 김기영⁵ · 유용욱^{1*}

군산대학교 식품영양학과, 1: 원광대학교 치과대학 구강생화학교실 · VCRC, 2: 원광대학교 의과대학 미생물학과 · VCRC, 3: 원광대학교 한의과대학 병리학교실, 4: 원광대학교 식품영양학과, 5: 원광대학교 뷰티디자인학부

Protective Effect of *Rehmannia Radix Preparata* Extract on the Cisplatin-induced Cytotoxicity of HEI-OC1 Cells via Scavenging of Free Radicals

Hyeon Hee Yu, Se Jeong Seo¹, Yeon Hwa Kim¹, Raekil Park², Hong Seob So², Byung Hun Jeon³, Mee Kyung Shin⁴, Su Young Jung⁴, Ki-Young Kim⁵, Yong Ouk You^{1*}

Department of Food and Nutrition, Kunsan National University,

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

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

3: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

4: Department of Food and Nutrition, Wonkwang University

5: Department of Beauty Design, Wonkwang University

The steamed root of *Rehmannia glutinosa* has been used for treatment of inner ear diseases, such as tinnitus and hearing loss in traditional Oriental Medicine. In the present study, we investigated the effect of ethanol extract of steamed root *R. glutinosa* (SRG) on cisplatin cytotoxicity of HEI-OC1 auditory cells. In addition, to investigate the mechanism of SRG on cisplatin cytotoxicity, the effects of SRG on lipid peroxidation as well as scavenging activities against various free radicals were measured in cisplatin-treated cells. Treatment of SRG protected cells from cisplatin and reduced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. Furthermore, SRG demonstrated significant scavenging activity against various free radicals, including superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, and DPPH radical. These results indicate that SRG protects cisplatin-induced damages of HEI-OC1 cells through inhibition of lipid peroxidation and augmenting scavenging activities against free radicals.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, HEI-OC1 cell, Cisplatin, Reactive oxygen species, Free radical

서 론

Cisplatin은 현재 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종 등의 항암 치료에 사용되는 가장 중요한 약제 중의 하나이지만, 이독성, 신독성, 골수독성, 위장관 장애, 및 알러지 등의 부작용 때문에 임상적 사용이 제한 받고 있다¹⁾. 특히 고용량의 cisplatin은 이명(耳鳴), 청력 소

실과 같은 강력한 이독성을 초래할 수 있으며²⁾, cisplatin에 의한 산소유리기의 발생, 항산화 물질의 감소, 항산화 효소들의 감소 및 과산화지질 증가 등이 작용기전으로 보고 되어 있다^{3,5)}.

산소의 대사산물인 생체 내 활성산소 (reactive oxygen species: ROS)는 superoxide radical (O₂⁻), hydroxyl radical (OH[·]), peroxy radical (HO₂[·]), nitricoxide radical (NO[·])과 같은 유리라디칼과 라디칼 형태가 아닌 singlet oxygen (¹O₂), 오존(O₃), hypochlorous acid (HOCl) 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂) 등이 있다⁷⁾. 정상적인 상태의 세포는 활성산소를 제거하는 항산화 시스템에 의해 항상성을 유지하지만, 제거체계의 능력을 넘어 과

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

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

· 접수 : 2005/07/21 · 수정 : 2005/08/23 · 채택 : 2005/09/22

생산되거나 항산화 방어 기전의 활성이 감소하는 경우 여러 가지 기전을 통하여 이 활성산소에 의한 세포와 조직의 손상이 초래된다^{7,8)}. 즉, 항산화 시스템에 의한 활성산소 방어 기전은 생물체의 생존에 대단히 중요한 역할을 수행한다.

활성산소의 불활성 및 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, 및 구성 단백질의 교차결합 등을 일으키는 ROS를 불활성화 시키거나 제거함으로써 항산화 작용을 하게 된다. 특히, CAT는 과산화수소 (H₂O₂) 제거에 가장 효과적인 효소의 하나로서 산화적 손상으로부터 세포를 보호하고 세포의 apoptosis를 억제 한다¹¹⁾.

속지황 (*Rehmannia Radix Preparata*)은 지황 (*R. glutinosa* Liboschitz)의 뿌리를 가공한 후 찌서 햇볕에 말린 것으로 본초강목, 동의보감에 의하면 청력을 좋게 하며^{12,13)} 한국본초도감에는 이명의 치료에 사용한다고¹⁴⁾ 기록되어 있다. 또한 보음 (補陰), 보혈 (補血), 월경불조 (月經不調), 빈혈 (貧血), 두통 (頭痛), 하복통 (下腹痛) 등의 병증의 치료에도 사용 한다¹⁵⁾. 속지황 추출물의 항산화 효과^{16,17)}, 항돌연변이 효과¹⁸⁾, 간암세포 및 폐암 세포주에 대한 성장저해 효과¹⁹⁾, 및 혈당 강하 효과²⁰⁾가 보고되어 있다. 그러나 속지황의 이명 치료 기전에 대한 연구결과는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 청각 세포주 HEI-OC1 세포에서 속지황 에탄올 추출물의 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 속지황의 항산화 효과를 검증하였다.

재료 및 방법

1. 속지황 추출물 준비

속지황은 서울 경동시장에서 국내산을 구입한 후 냉암소에 보관하여 사용하였다. 잘게 부순 속지황 100 g을 2L의 에탄올에 72시간 냉침 후 여과지 (Watman No. 1)에 거른 후²¹⁾, 감압농축 후 냉동 건조시킨 후 -20℃에 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℃)의 세포 배양액은 2일 마다 교환해 주었다²³⁾.

3. 세포의 생존율 측정

속지황 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 24시간 동안 안정화 시킨 후, 0.1%의 dimethylsulfoxide (DMSO, Junsei, Japan)에 녹인 속지황 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 1 mM N-acetyl-cystein은 양성 대조군으로 사용하였다. 속지황 에탄올 추출물(0, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml)은 cisplatin (10 μM)을 처리하기 1시간 전 처리한 후, 세포의 생존율은 MTT assay 방법으로 측정하였다.

4. 지질과산화 측정

지질과산화는 TBA 방법²⁶⁾에 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-butanol-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 측정하여, malonedialdehyde nmole/mg protein으로 표시하였으며 1 mM N-acetyl-cystein을 양성대조군으로 사용하였다.

5. 활성산소 소거능 측정

1) Superoxide radical 소거능 측정

속지황 에탄올 추출물의 superoxide radical 소거능은 Beauchamp와 Fridovich의 방법²⁷⁾을 변형하여 사용하였다. xanthine/xanthine oxidase system이 생성하는 superoxide radical을 제거하는 정도는 nitroblue tetrazolium (NBT) 생성 정도를 측정하였다. Superoxide radical 소거능은 96-well plate에 시료용액 10 μl, 10 mM xanthine 45 μl, 1 mM NBT 45 μl, 0.05 mM EDTA (in 50 mM potassium phosphate buffer (KPB), pH 8.0) 10 μl, 0.5 unit/ml xanthine oxidase를 10 μl 넣고 37℃에서 30분 동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도 (Spectra Max 250)를 측정할 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

속지황 에탄올 추출물의 hydrogen peroxide 소거능은

Gulcin의 방법²⁸⁾을 사용하였다. 소거능은 96-well plate에 각 시료용액 500 µl, 40 mM 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 hydroxyl 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% tihobarbituric 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. 숙지황 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대한 세포독성

숙지황 에탄올 추출물의 HEI-OC1 세포에 대하여 직접적인 독성작용은 MTT 방법으로 조사하였다. 다양한 농도의 숙지황 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 숙지황 에탄올 추출물은 유의한 세포독성을 나타냈다. 이 결과를 근거로 숙지황 에탄올 추

출물의 HEI-OC1 세포 보호효과 및 라디칼 소거능 실험은 100 µg/ml 미만의 농도에서 수행하였다 (Fig 1).

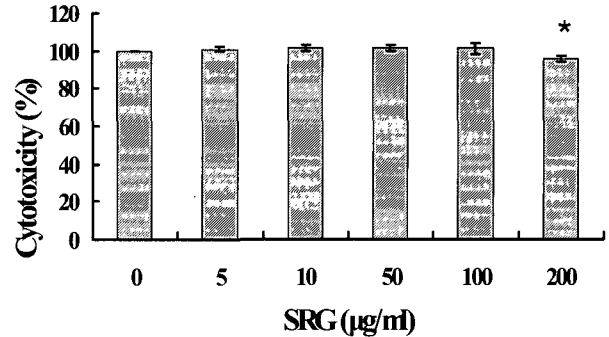


Fig. 1. Cytotoxicity of the ethanolic extract of steamed roots of *R. glutinosa* (SRG) on HEI-OC1 cells. Cells were pretreated with various concentrations of SGR for 24 h and cell viability was determined by the MTT assay. Data are mean±S.E. in triplicate. *P<0.05 when compared with control group.

2. 숙지황 에탄올 추출물의 cisplatin 세포독성 억제 효과

cisplatin 세포독성에 대한 숙지황 에탄올 추출물의 보호효과를 조사하기 위하여, cisplatin (10 µM)을 처리 1시간 전 다양한 농도의 숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)을 HEI-OC1 세포에 처리한 후 세포 생존율을 조사하였다. Fig. 2와 같이 cisplatin 단독 처리군의 세포 생존율은 대조군에 비교하여 46%로 감소한 반면, 숙지황 에탄올 추출물 처리군은 처리농도 10 µg/ml 이상에서부터 농도 의존적인 세포 생존율 증가를 관찰할 수 있었다 (p<0.05). 특히, 100 µg/ml 처리군에서는 86%의 높은 생존율을 보였으며, 양성 대조군인 100 µg/ml NAC 처리군에 비교하여 더욱 높은 생존율을 나타냈다.

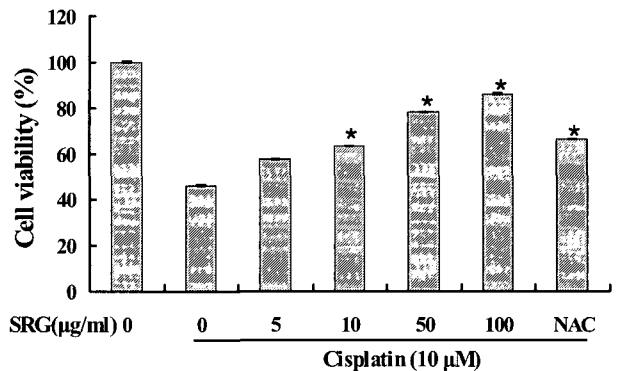


Fig. 2. Protective effect of the ethanolic extract of SRG on cisplatin-induced cytotoxicity. Pretreatment of SRG resulted in increase of HEI-OC1 viability after cisplatin treatment. Cells were preincubated with the indicated doses of SRG for 1 h prior to the addition of cisplatin and further maintained 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. 숙지황 에탄올 추출물의 지질과산화 억제 효과

cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포의 지질과산화에 대한 숙지황 에탄올 추출물의 효과를 조사하기 위하여 cisplatin (10 µM) 처리 1시간 전 숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)을 처리한 후

지질과산화량을 측정하였다 (Fig. 3). 숙지황 에탄올 추출물 처리는 5 µg/ml 이상의 농도에서 농도 의존적으로 cisplatin에 의한 지질과산화를 억제하였다 ($p < 0.05$). 특히, 고농도인 50, 100 µg/ml 처리군의 지질과산화 정도는 cisplatin을 처리하지 않은 대조군과 유사한 수준으로 감소하였으며, 100 µg/ml NAC 처리군에 비교하여 더욱 효과적으로 지질과산화를 감소시켰다.

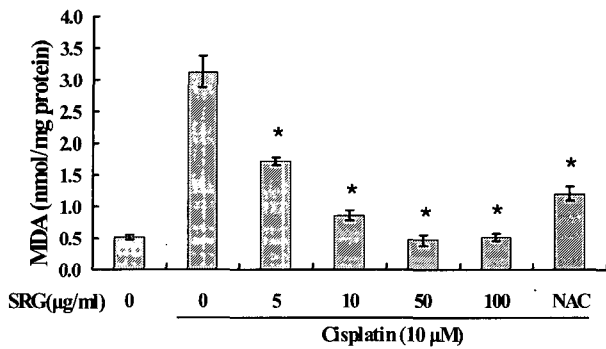


Fig. 3. Inhibitory effect of the ethanol extract of SRG on lipid peroxidation of HEI-OC1 cells by cisplatin. Cells were preincubated with various doses of SRG for 1 h prior to the addition of cisplatin and further maintained for 24 h. Data are mean±S.E. in triplicate. * $P < 0.05$ when compared with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

4. 숙지황 에탄올 추출물의 활성산소 소거능

Table 1에 숙지황 에탄올 추출물에 의한 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, DPPH 유리라디칼 소거능에 대한 결과를 나타냈다. 숙지황 에탄올 추출물의 직접적인 superoxide radical 소거능은 nitroblue tetrazolium (NBT) 생성 정도²⁷⁾를 측정하였다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 superoxide radical 소거능을 나타냈으며, 100 µg/ml 처리군에서는 29.4% 정도 superoxide radical 소거능을 관찰할 수 있었다. 숙지황 에탄올 추출물 100 µg/ml 농도의 superoxide radical 소거능은 100 µg/ml BHT (16.7%)에 비교하여 2배 이상 높게 나타났다.

숙지황 에탄올 추출물의 직접적인 hydrogen peroxide 소거능은 Gulcin의 방법²⁸⁾을 이용하였다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)은 대조군에 비해 유의한 hydrogen peroxide 소거능을 나타냈으며 5, 10, 50, 100 µg/ml 처리군에서 각각 38.6%, 40.5%, 41.6%, 41.6%로 유사한 수준이었다. BHT (100 µg/ml)의 hydrogen peroxide 소거능은 45.0%로서 숙지황 에탄올 추출물의 효과와 유사한 수준이었다.

숙지황 에탄올 추출물의 직접적인 hydroxyl radical 소거능은 TBAR를 생성 정도²⁹⁾로 측정하였다. 숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)은 농도 의존적으로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 hydroxyl radical 소거능을 나타냈으며, 100 µg/ml 처리군에서는 49.4% 정도 hydroxyl radical 소거능을 관찰할 수 있었다. 숙지황 에탄올 추출물 100 µg/ml 농도의 hydroxyl radical 소거능은 100 µg/ml BHT (33.9%)에 비교하여 더 높은 소거능을 나타냈다.

숙지황 에탄올 추출물 (5-100 µg/ml)은 농도 의존적으로 대

조군에 비교하여 유의한 수준의 직접적인 DPPH 소거능 효과는 나타내어, 숙지황 에탄올 추출물 5 µg/ml과 10 µg/ml에서는 각각 대조군에 비해 4.5%, 5.4%의 소거능을 보였으며, 50, 100 µg/ml에서는 각각 20.7%, 64.9%로 대조군에 비교하여 유의한 수준의 소거능을 나타냈다 ($p < 0.05$). BHT (100 µg/ml)의 DPPH 소거능은 65.8%이었다.

Table 1. Scavenging activity of the ethanol extract of steamed roots of *R. glutinosa* (SRG) against superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical and DPPH

Concentration (µg/ml)	Superoxide radical scavenging activity (%)	Hydrogen peroxide scavenging activity (%)	Hydroxyl radical scavenging activity (%)	DPPH scavenging activity (%)
SRG 5	16.20±2.10 [†]	38.56±0.70 [†]	34.75±0.81 [†]	4.50±0.90
SRG 10	21.50±1.12 [†]	40.47±0.97 [†]	48.50±0.62 [†]	5.40±1.56
SRG 50	22.70±2.59 [†]	41.57±1.32 [†]	47.84±0.38 [†]	20.70±2.38 [†]
SRG 100	29.40±1.58 [†]	41.53±0.25 [†]	49.36±0.40 [†]	64.90±2.70 [†]
BHT 100	16.70±0.70 [†]	45.00±3.94 [†]	33.93±0.39 [†]	65.83±1.77 [†]

Data are mean±S.E. in triplicate. [†] $P < 0.05$ when compared with control BHT, butylated hydroxy toluene.

고찰

본 연구에서 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포독성에 대한 숙지황 에탄올 추출물의 보호효과를 관찰할 수 있었다. HEI-OC1 세포에서 10 µM cisplatin 처리에 의한 세포독성을 나타내 대조군의 46% 수준으로 생존율이 감소하였으나, 숙지황 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 cisplatin 세포독성을 억제하여 100 µg/ml 농도 처리군의 생존율은 86%까지 증가하였다. Cisplatin은 암세포의 DNA에 비가역적으로 결합하여 구아닌 잔기 사이에 분자 내 그리고 분자간 교차결합을 형성함으로써 암세포를 죽게 하거나 또는 칼슘 운반 채널을 방해하여 세포에 손상을 줌으로써 항암 효과를 나타낸다³¹⁾. 그러나 고농도의 cisplatin 투여는 임상적으로 여러 가지 부작용을 가져오는데, 특히 회복이 불가능한 감각 신경성 청력 손실을 유발할 수 있다³²⁾. Cisplatin은 일차적으로 코르티 기관 (Corti organ)의 외측 유모세포 (outer hair cell)에 손상을 초래하고, 고농도의 cisplatin 투여는 청각 신경세포 뿐만 아니라, 유모세포 (sensory hair cells) 주변의 혈관줄무늬 (stria vascularis)와 지지세포 (supporting cell)의 퇴화에 영향을 주어 내이의 손상을 유발한다^{33,34)}. 그러나 cisplatin의 내이 손상 기전은 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않다. 최근 cisplatin은 활성산소와 유리라디칼의 생성과 방출을 촉진하여 glutathione과 같은 항산화 물질과 SOD, CAT, GPX와 같은 항산화 효소들의 감소와 더불어 malondialdehyde와 같은 지질과산화물질의 축적에 의한 세포손상을 초래한다고 밝혀졌다³⁵⁾.

활성산소와 유리라디칼은 세포내 항산화 효소의 활성저해는 물론이고 세포로 하여금 흥분성 아미노산을 방출하게 함으로써 세포내의 칼슘 유입의 증가와 이로 인한 세포 내 신호전달체계에 영향을 주어 정상적인 세포분열이나 분화를 방해한다. 특히

세포내 칼슘의 증가는 Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC)를 활성화시켜 이와 관련된 세포대사에 영향을 주고, 최종적으로는 세포의 사멸을 초래한다. 또한, 산소유리기는 질소유리기와 작용하여 peroxynitrate라는 맹독성 물질을 생성함으로써 세포를 더욱 손상시켜 퇴화를 촉진한다. HEI-OC1 세포에서 cisplatin은 대조군에 비교하여 3배 이상 증가된 지질과산화물을 유도하였으나, 숙지황 에탄올 추출물의 전처리에 의하여 농도 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 숙지황 에탄올 추출물의 지질과산화 억제 효과는 cisplatin에 의한 세포독성을 방어하는 주된 작용기전의 하나로 추정된다.

또한 숙지황 에탄올 추출물은 유리라디칼인 superoxide radical, hydroxyl radical, DPPH와 hydrogen peroxide 등을 현저하게 제거하는 기능을 확인할 수 있었다. Superoxide radical은 호흡에 의해 세포내 미토콘드리아에서 생성되는데 산소분자에 전자가 하나 더 붙어서 만들어지는 물질로서 이들 전자 불균형은 강한 반응성을 갖게 하여 지질과산화에 직접적으로 영향을 미칠 뿐만 아니라 지질과산화 개시자인 hydroxyl radical의 전구 물질이 되기도 한다³⁶). 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 있다³⁷). Cell-free system에서 저농도 (5-50 µg/ml)의 숙지황 에탄올 추출물은 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 잠재력을 가진 물질이라 할 수 있다³⁸). 따라서 hydrogen peroxide 뿐만 아니라 hydroxyl radical의 소거능은 세포내 항산화 작용 중 매우 중요한 역할이라 할 수 있다.

많은 연구에서 α-tocopherol, glutathione, glutathione monoethyl ester, sodium thiosulfate, diethyldithiocarbamate, fosfomycin, WR-2721, 및 lipoic acid 등^{34,39,40})과 같은 항산화제와 유리라디칼 제거 또는 억제 물질들이 cisplatin에 의한 이독성을 억제한다고 보고하고 있다. DPPH 라디칼 소거능 또한 50 µg/ml 이상에서 대조군에 비해 유의하게 증가한 것으로 보아 숙지황 에탄올 추출물의 cisplatin의 HEI-OC1 세포 독성에 대한 보호 효과는 유리 라디칼 제거를 통한 지질과산화 감소와 관련이 있을 것으로 생각되어진다. 숙지황의 주요 성분으로 sterol인 β-sitosterol, stigmasterol, campesterol과 iridoid glycosides인 catalpol, rehmannioside, ajugol, aucubin, melittoside가 포함되어 있는 것으로 보고 되었다^{41,42}). 다른 연구에서 sterols^{43,44})과 iridoid glycosides^{45,46})는 유리라디칼을 제거하는 항산화제 역할이 밝혀져 있으며 숙지황 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.

결론

HEI-OC1 세포에서 숙지황 에탄올 추출물의 cisplatin에 의한 지질과산화 생성 억제효과와 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, DPPH 라디칼 등의 소거능을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 숙지황 에탄올 추출물은 cisplatin에 의한 HEI-OC1 세포의 세포독성을 유의하게 억제하는 효과를 나타냈다 (p<0.05). 또한, 숙지황 에탄올 추출물은 cisplatin에 의한 세포의 지질과산화 정도를 억제하였으며 유리라디칼인 superoxide radical, hydroxyl radical, DPPH와 hydrogen peroxide 등을 현저하게 제거하였다. 이상의 결과는 숙지황 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. 정세영. 천연성분을 이용한 Cisplatin 신장독성 억제물질 개발: 전통약물로부터 신약개발. 경희대학교 경희동서약학연구소, 서울, pp 71-79, 1994.
2. Kalkanis, J.G., Whitworth, C., Rybak L.P. Vitamin E reduces cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 114(3):538-542, 2004.
3. Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* 76(6):386-394, 1995.
4. 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.
5. 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.
6. 김현수, 함준상. 유산균의 항산화 효과. *한국축산식품학회지* 23(2):186-192, 2003.
7. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*, 3rd end, Oxford University Press, New York, 1998.
8. Vergani, L., Floreani, M., Russell, A., Ceccon, M., Napoli, E., Cabrelle, A., Valente, L., Bragantini, F., Leger, B., Dabbeni-Sala, F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen

- species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* 271(18):3646-3656, 2004.
9. Sies H. Oxidative Stress: From basic research to clinical application. *Am J Med* 91:315-385, 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. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. *중약대사전*. 정담, 서울, pp 2582-2588, 1998.
 13. 허준 편. *동의보감편찬위원회 역. 동의보감. 학려개발사, 서울*, p 1168, 1988.
 14. 안덕균. *한국본초도감. 교학사, 서울*, p 834, 2000.
 15. 육창수 외. *한국본초학. 계축문화사, 서울*, p 316, 1993.
 16. 조수인. 흰쥐 신장 조직 손상에 대한 숙지황의 항산화 효과. *대한본초학회지* 18(4):119-127, 2003.
 17. 안상원, 이철완. 숙지황(熟地黃)과 육미지황탕(六味地黃湯)이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. *대전대한 의학논문집* 8(1):593-624, 1999.
 18. 안병용, 최동성, 한종현. 대장균에서 4-nitroquinoline 1-oxide의 변이원성에 대한 숙지황 물추출물의 항돌연변이 작용특성. *한국생물공학회지* 16(5):486-493, 2001.
 19. 안상욱, 김영길, 김민희, 이현용, 성낙술. 국내산 건지황과 숙지황의 생리활성 비교. *한국약용작물학회지* 7(4):257-263, 1999.
 20. 조응행, 김운상. 숙지황이 고과당사료를 식이한 쥐의 혈액상에 미치는 영향. *대한본초학회지* 18(1):73-79, 2003.
 21. Alade, P.I., Irobi, O.N. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *J Ethnopharmacol* 39, pp 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, pp 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):276-87, 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. Strauss, M., Towfighi, J., Lord, S., Lipton, A., Harvey, H.A., Brown, B. Cis-platinum ototoxicity: clinical experience and temporal bone histopathology. *Laryngoscope* 93(12):1554-1559, 1983.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Rybak, L.P., Whitworth, C., Somani, S. Application of antioxidants and other agents to prevent cisplatin ototoxicity. *Laryngoscope* 109(11):1740-1744, 1999.
 36. Day, B.J. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discovery Today*. 9(13):557-566, 2004.
 37. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
 38. Djordjevic, V.B. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol* 237, 57-89, 2004.
 39. 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.
 40. 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.
 41. Yao, S.C., Wang, L.L., Yeung, C.S. *Pharmacology and applications of chinese materia medica*. World Scientific, Hongkong, pp 461-467, 1981.
 42. Tang, W., Eisenbrand, G., *Chinese drugs of plant origin: Chemistry, pharmacology, and use in traditional modern medicine*. Springer-Verlag, Berlin, pp 849-854, 1992.

43. van Rensburg, S.J., Daniels, W.M., van Zyl, J.M., Taljaard, J.J. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation. *Metabolic Brain Disease*. 5(4):257-265, 2000.
44. Yoshida, Y., Niki, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* 49(4):277-280, 2003.
45. Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, Z.Y., Liu, P.C., Hsu, F.L. Antioxidant iridoid glucosides from *Wendlandia formosana*. *Nat Prod Res* 8(4):357-364, 2004.
46. Sridhar, C., Subbaraju, G.V., Venkateswarlu, Y., Venugopal, R.T. New acylated iridoid glucosides from *Vitex altissima*. *J Nat Prod* 67(12):2012-2016, 2004.