

# 배양 섬유모세포에서 6가 크롬의 세포독성에 대한 Poncirin의 영향

한두석<sup>##</sup>, 진성우<sup>1</sup>, 양승진<sup>1</sup>, 최병남<sup>1</sup>, 석승한<sup>2</sup>, 홍기연<sup>2</sup>, 송호준<sup>3</sup>

1: 원광대학교 치과대학, 2: 의과대학, 3: 한의과대학

## The Effect of Poncirin on Hexavalent chromium in NIH3T3 Fibroblasts in Vitro

Du-Suk Han<sup>##</sup>, Sung-Woo Jeon<sup>1</sup>, Seung-Jin Yang<sup>1</sup>, Byung-Nam Choi<sup>1</sup>,  
Seung-Han Suk<sup>2</sup>, Gi-Yun Hong<sup>2</sup>, Ho-Joon Song<sup>3</sup>,

1: College of Dental Medicine, 2: School of Medicine, 3: College of Oriental Medicine, Wonkwang  
University, Jeonbuk, Iksan, 570-749, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : It is well known that hexavalent chromium has toxic effect on normal cells. Recently, toxic effect of hexavalent chromium is diminished by the some extracts derived from herbs or plants . But, the toxic or protective mechanism of hexavalent chromium is well unknown. This study was performed to examine the protective effect of poncirin against  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced cytotoxicity on NIH3T3 fibroblasts.

**Methods** : The protective effect of the cytotoxicity induced by  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  was measured by the cell viability after NIH 3T3 fibroblasts were cultured with or without  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  for 48 hours. Antitoxic effects of poncirin on the cytotoxicity induced by  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  were examined by colorimetric assays such as MTT or XTT assay.

**Results** :  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  decreased cell viability by the decreased absorbance in MTT or XTT assay, but, the poncirin increased cell viability which was decreased by  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced cytotoxicity on NIH3T3 fibroblasts.

**Conclusion** : These results suggest that  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  showed cytotoxic effect on NIH3T3 fibroblasts by the decrease of cell viability, and poncirin was effective in the protection of  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced cytotoxicity in these cultures.

**Key words** : NIH3T3 fibroblast, hexavalent chromium, Poncirin

## 서 론

중금속의 몇종류는 인체의 구성성분을 이루는데 없어서는 안될 필수적인 요소이다<sup>1)</sup>. 그러나 대부분의 중금속은 독성이 있기 때문에 인체에 축적이 될 경우 배출되는데 장기간이 소요되기 때문에 각종 장기의 손상은 물론 나아가서 생명을 위협하게 된다<sup>2)</sup>. 적은 양의 중금속은 간에서 만들어지는 metallothioneine이라는 착화합물질에 의해서 불활성화 된 후 배출되어 지지만 다량이 축적된 경우 대부분 건강을 심히 해치게 된다<sup>3)</sup>. 수많은 중금속류는 각종 산업분야에서 제품생산공정에서 원료로 사용되어지는 매우 중요한 자원의 하나이다<sup>4)</sup>. 그러나 이들은 공장폐수나 차량배기 등에 포함되어 수질과 대기를 오염시켜 환경을 파괴할 뿐만 아니라 더욱이 먹이연쇄를 통하여 인체내에 직접 노출이 될 경우 심각한 부작용을 야기하게 된다<sup>5,6)</sup>. 중금속중 크롬은 수은이나 카드뮴과 같이 독성이 강한 금속류로서 자연에는 3가 크롬의 형태로 존재하고 있다<sup>7)</sup>. 특히, 6가 크롬은 3가 크롬에 비하여 독성이 매우 강하기 때문에 주로 인체에 해를 주는 것은 6가 크롬을 함유하고 있는 중크롬산과 같은 화합물이며<sup>8)</sup>, 주로 산업장에서 널리 사용되고 있는 크롬화합물은 3가와 6가 크롬을 포함하고 있는 화합물로서 이의 부식과 산화작용은 매우 위험한 요소의 하나이다<sup>5,9)</sup>.

크롬화합물중 중크롬산소다는 가장 용도가 넓어 산화제나 감미료의 제조에 사용되며, 그 밖에도 염색을 비롯하여 안료, 도금 및 강철합금등 다양한 용도로 이용되고 있다<sup>7)</sup>. 산업장에서의 크롬의 폭로는 치명적인 직업병을 유발하는데 호흡기가 가장 주된 통로로 작용하고 있다<sup>2,6)</sup>. 즉, 크롬 분진이나 흙(fume)이 호흡기를 통해 폐에 축적이 되는데 이 때 6가 크롬이 3가 크롬보다 더욱 빨리 축적이 되며 세포속으로의 침투 역시 빠르게 이루어진다<sup>10)</sup>. 크롬의 중독은 폐는 물론 신장에도 손상을 주어 폐암이나 신부전을 유발하며 또한 설사나 구토 및 위장장애와 같은 증상을 호소하게 된다<sup>11)</sup>. 크롬에 의한 피부 접촉시 동근 괴양을 형성하면서 심한 동통을 유발하게 되며 나아가서 조직의 괴사와 염증반응을 초래하기도 한다<sup>7,10)</sup>. 크롬의 독성기전을 살펴보면 세포내 DNA합성의 저해나 효소활성의 억제나 세포소기관의 손상에 의한 세포고사나 사멸을 유도함으로써 세포독성을 나타낸다고 한다<sup>8)</sup>. 그러나 크롬의 독성효과에 대한 기전은 아직도 자세히 알려져 있지 않다<sup>5,11)</sup>. 근래에는 유기수은이

나 구리, 철 및 크롬과 같은 몇몇 중금속류등은 이들이 산화하거나 붕괴될 때 산화유리기를 발생하여 그 결과 산화적 손상으로서 세포에 독성을 나타낸다고 제시된 바 있다<sup>1,12)</sup>. 따라서 크롬의 독성기전도 자세히 규명되어야 하겠지만 무엇보다도 시급한 것은 크롬과 같은 맹독성 중금속류에 중독이 되었을 경우 아직까지 이에 대한 효과적인 치료방법이 정립되어 있지 않다는 것이다<sup>3,6)</sup>. 따라서 많은 선진국들은 중금속에 의한 중독증을 치료하기 위하여 정상세포에는 독성이 적거나 또는 거의 없으면서 암세포와 같은 병적인 세포에만 독성을 나타내는 물질을 한약재나 천연물에서 발굴하기 위하여 막대한 지원을 아끼지 않고 연구에 박차를 가하고 있다<sup>13,14)</sup>. 최근에는 한약재를 비롯한 천연물질중에 항암작용이 강하면서 정상세포에는 아무런 손상을 주지 않은 성분들이 다량 함유되어 있다는 것이 제시되면서 이에 대한 많은 연구가 시도되고 있다<sup>15,16)</sup>. 실제로 인삼의 주성분인 사포닌을 비롯하여<sup>17)</sup>, 한약재인 사군자를 비롯하여 오배자나 천마등과 같은 약용식물에는 폴리페놀류가 다량 포함되어 있으며<sup>15,18)</sup>, 수수꽃다리나 족두리등에는 페놀산이 많이 포함되어 있다고 알려져 있다<sup>19)</sup>. 이 외에도 citrus속에 많이 포함되어 있는 flavonoid류를 비롯하여<sup>20)</sup>, 이소플레노이드, 터펜, 벤젠류와 같은 방향족 화합물들도 한약재나 약용식물의 열매나 줄기, 뿌리등에 다량 함유되어 있다<sup>13,21,22)</sup>. Pocirin은 citrus속의 열매에서 추출, 분리되어진 flavonoid의 주요성분으로서 페놀성 수산기와 함께 glucoside로 존재하고 있으며 그 밖에도 다년생 초본으로서 질경이과에 속하는 차전초(Plantaginis Herba)나 차전자(Plantaginis Semen)에 다량 함유되어 있는 flavonoid의 주요성분이다<sup>15,22)</sup>. 이의 화학적 분자구조는 수산기와 산소, 수소로 형성되어 있어 산소유리거나 독성감소에 적합한 구조식을 가지고 있어 항산화능이나 해독작용의 약리활성을 나타낸다고 알려져 있다<sup>23)</sup>. 근래에 citrus속에서 pocirin 뿐만 아니라 narirutin, didymin, nobiletin, tangeretin 및 hexamethoxyflavone과 같은 여러 생리활성물질들이 정제되었으며 이들은 발암억제의 기능을 비롯하여 항돌연변이효과, 항알러지효과, lipoprotein의 산화방지효과와 같은 기능을 가지고 있다고 밝혀졌다<sup>20,23)</sup>.

본 연구에서는 flavonoid의 주요성분인 pocirin이 6가크롬( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )의 세포독성에 미치는 영향을 세포 생존율의 분석에 의하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

세포배양에 사용된 시약으로서 DMEM(Dulbeccos' modified eagle medium)을 비롯한 FBS (Fetal bovine serum), streptomycin, penicillin 및 fungizone, fetal bovine serum은 Gibco사에서 구입하였으며, MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide)와 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), phosphate buffered saline (PBS) 및 6가크롬 ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )은 Sigma Chemical사에서 각각 구입하였다.

### 2. 실험기구

NIH3T3섬유모세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 항온기 (Shellab Co., Cornelius, U.S.A.)를 사용하였으며 세포수의 계산은 Turk 형 혈구계산기 (Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 사용하였다. MTT와 XTT의 정량분석은 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A.)를 사용하였다.

### 3. 세포배양

NIH3T3섬유모세포의 배양은 DMEM 배지에 10% FBS를 비롯하여 penicillin (25 unit/ml), fungizone을 혼합하여 사용하였으며, 세포의 계대배양은 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리한 후 Turk 형 혈구계산기로 세포를  $5 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다. 부유된 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 항온기내에서 일정시간 배양하였으며 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

### 4. MTT 정량분석

Mosmann 의방법<sup>24)</sup>에 의하여 NIH3T3섬유모세포를 각 배양용기에  $5 \times 10^4$  세포수를 넣고 24 시간 배양한 후 크롬의 세포독성을 측정하기 위하여 1-100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후 분석 당일 제조한 MTT(Sigma Chemical Co.) 50  $\mu\text{g/ml}$ 가 포함된 배양액을 배양 용기당 1 ml 씩 넣어 3 시간 배양하였다. 배양 완료후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣

어 5 분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후 분광광도계 ELISA reader로 540 nm에서 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. 실험적인 개요는 Fig. 1과 같다.

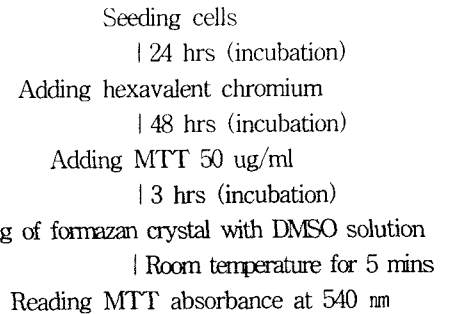


Fig. 1. Flow Scheme of MTT assay

### 5. XTT 정량분석

PBS에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 하루밤 동안 건조시켰다. 건조 완료후 PBS로 두세번 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well 당 200  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두 세 번 세척하였다. 배양된 NIH3T3섬유모세포를  $5 \times 10^4$  cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 완료후  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 를 각각의 농도를 처리한 다음 48 시간 동안 배양한 다음 PBS로 두 세 번 세척하였다. 세척 완료후 XTT와 혼합후 각 배양용기에 200  $\mu\text{L}$ 씩을 주입하여 4~6 시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 분석방법의 개요는 Fig. 2와 같다.

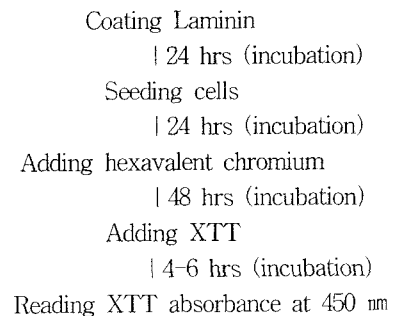


Fig. 2. Flow Scheme of XTT assay

## 6. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 성적

### 1. MTT 정량에 의한 $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 poncirin의 영향

$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 NIH3T3 섬유모세포를 1-100  $\mu\text{M}$  poncirin이 각각의 농도로 포함된 배양액에서 NIH3T3 섬유모세포를 48 시간 동안 배양한 다음 poncirin이  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 독성에 미치는 영향을 MTT 정량에 의하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과  $\text{IC}_{50}$  농도에서 세포를 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군인 100%(4.14±0.04)에 비하여 48.6%(2.02±0.19)로 감소한 것으로 나타났다. 그러나 1  $\mu\text{M}$  농도의 poncirin을 처리한 실험군에서는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 실험군에 비하여 56.3%(2.33±0.09)로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p<0.05). 한편,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 50  $\mu\text{M}$ 의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율은 69.1%(3.86±0.02)로 나타나 이는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 실험군에 비하여 매우 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.01). 이에 비하여  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 100  $\mu\text{M}$ 의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율은 53.9%(2.23±0.01)로 나타나 이는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 실험군에 비하여 다소 세포생존율의 증가를 나타냈으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 1).

Table 1. The cell viability of poncirin on hexavalent chromium ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) in NIH3T3 fibroblasts in concentration by MTT assay.

Division Concentration of poncirin( $\mu\text{M}$ )	MTT assay	
	Mean±S.D.	(% of control)
control	4.14±0.04	100
$\text{IC}_{50}$	2.02±0.19	48.6
1	2.33±0.09	56.3*
50	3.86±0.02	69.1**
100	2.23±0.01	53.9

NIH3T3 fibroblasts were incubated with or without 1-100  $\mu\text{M}$  poncirin for 48 hours after treatment of  $\text{IC}_{50}$  of hexavalent chromium ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.001 (Student's t-test).

### 2. XTT 정량에 의한 $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 poncirin의 영향

NIH3T3 섬유모세포를  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 1-100  $\mu\text{M}$  농도로 각각 포함된 poncirin의 배양액에서 48 시간 동안 NIH3T3 섬유모세포를 항온기에서 배양한 다음  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 poncirin의 영향을 XTT 정량에 의하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 NIH3T3 섬유모세포를  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 경우 세포생존율은 대조군인 100%(3.68±0.29)에 비하여 54.8%(2.01±0.01)로 감소한 것으로 나타났다. 이에 비하여 1  $\mu\text{M}$  농도의 poncirin이 포함된 배양액에서 세포를 처리한 실험군에서는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 처리한 실험군에 비하여 72.7%(2.67±0.04)로 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p<0.01). 한편,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 50  $\mu\text{M}$ 의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율은 83.9%(3.09±0.09)로 나타나 이는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 실험군에 비하여 매우 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.01). 이에 비하여  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 100  $\mu\text{M}$ 의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율은 81.0%(2.98±0.13)로 나타나 이는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 처리한 실험군에 비하여 매우 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.01)(Table 2).

Table 2. The cell viability of poncirin on hexavalent chromium ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) in NIH3T3 fibroblasts by XTT assay.

Division Concentration of poncirin ( $\mu\text{M}$ )	XTT assay	
	Mean±S.D.	(% of control)
control	3.68±0.29	100
$\text{IC}_{50}$	2.01±0.01	54.8
1	2.67±0.04	72.7**
50	3.09±0.09	83.9**
100	2.98±0.13	81.0**

NIH3T3 fibroblasts were incubated with or without 1-100  $\mu\text{M}$  poncirin for 48 hours after treatment of  $\text{IC}_{50}$  of hexavalent chromium ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \*\*p<0.001 (Student's t-test).

### 3. MTT 정량과 XTT 정량에 대한 세포독성 비교

MTT 정량과 XTT 정량에 있어  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포 독성에 대한 poncirin의 세포생존율에 있어서  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 1 uM의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율은 각각  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 처리한 실험군에 비하여 MTT 정량에서 보다( $p < 0.05$ ), XTT 정량에서 유의성이 더욱 높은 것으로 나타났다( $p < 0.01$ ). 또한  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 50 uM의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율에 대한 유의성은 MTT 정량과 XTT 정량에서 모두 동일한 것으로 나타났다( $p < 0.01$ ). 한편,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 처리한 후 100 uM의 poncirin으로 처리한 경우 세포생존율의 유의성은 MTT 정량에서는 유의성이 없는 것으로 나타났으나 XTT 정량에서는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 처리한 실험군에 비하여 매우 유의성이 높은 것으로 나타났다( $p < 0.01$ )(Table 3).

Table 3. The significant comparison of the poncirin effect on hexavalent chromium( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) in NIH3T3 fibroblasts by MTT assay and XTT assay.

Division Concentration of poncirin (uM) control	Colorimetric assay (% of control)	
	MTT	XTT
100	100	100
$\text{IC}_{50}$	48.6	54.8
1	56.3*	72.7**
50	69.1**	83.9**
100	53.9	81.0**

The significancy of poncirin effect by MTT or XTT assay in cell viability after NIH3T3 fibroblasts were treated poncirin with or without hexavalent chromium( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). The value represent the mean±SD for triplicate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

### 고찰

크롬은 은백색의 단단한 금속으로 염산이나 황산에 용해되나 질산이나 왕수에는 용해되지 않은 성질을 가지고 있다<sup>2,9</sup>. 크롬화합물은 화합물이 갖는 원자가에 의하여 독성이 달라지는 금속으로서 자연계에는

주로 3가 크롬으로 존재하기 때문에 이의 독성이 문제가 되지 않는다<sup>8</sup>). 그러나 즉, 금속크롬은 원자가가 0으로서 다른 화합물과 결합에 따라 2-6가의 원자를 갖게 된다<sup>7</sup>). 이중 3가와 6가 크롬이 독성과 관련이 깊은데 이 두 종류의 크롬은 생리활성에 있어서 서로 많은 차이점이 있다<sup>5,9</sup>). 즉, 3가 크롬은 피부의 흡수가 용이하지 않은 반면 6가 크롬은 피부를 빠르게 통과한다<sup>10</sup>). 또한, 6가 크롬은 3가 크롬보다 빠르게 인체에 흡수된다<sup>2,11</sup>). 3가 크롬은 세포막의 통과가 어렵지만 6가 크롬은 세포막을 쉽게 통과할 수 있어 6가 크롬과에 노출된 경우 심한 세포독성을 야기시킬 수 있다<sup>6,11</sup>). 본 연구에서는 독성이 강한 6가 크롬의 독성에 대하여 flavonoid의 주성분인 poncirin의 영향을 조사하기 위하여 정상 섬유모세포인 NIH3T3 섬유모세포에 6가 크롬을 처리하여 세포독성을 유발한 후 1-100 uM의 poncirin이 농도별로 포함된 배양액에서 48 시간 동안 처리하여 세포생존율을 MTT 정량과 XTT 정량에 의하여 조사하였다. 먼저 MTT의 정량에 있어서  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 세포를 처리한 후 경우 세포생존율은 대조군에 비하여 48.6%로 많은 감소를 보였으며, XTT 정량에 있어서도  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 세포를 처리한 후 경우 세포생존율은 대조군에 비하여 48.6%로 많은 감소를 보였다. 이러한 결과는 6가 크롬인  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 가 세포독성을 가지고 있다는 것을 말해주고 있다<sup>11</sup>). 6가 크롬도 유기수은이나 카드뮴과 같이 맹독성 물질로 세포내 DNA 합성억제나 단백질합성 억제 및 세포소기관의 효소활성의 저해와 같은 인자들중에 영향을 주었을 것으로 생각되며<sup>3,8</sup>), 이 중에서도 세포소기관의 효소활성에 많은 영향을 주었을 가능성이 높다. 이러한 이유로는 MTT 정량이나 XTT 정량을 통해 사립체의 효소활성을 측정할 수 있기 때문이다<sup>24,25</sup>). 즉, 세포내 세포소기관의 하나인 사립체내의 석신산가수분해효소와 밀접한 관련이 있기 때문이다<sup>24</sup>). 한편, 근래에 크롬의 독성효과가 산소유리기와 관련이 있다고 제시되면서 본 연구에서도 크롬의 독성이 산소유리기의 산화적 손상에 의해 세포내 항산화효소계의 손상을 비롯하여<sup>11,26</sup>) 칼슘유입의 세포내 유입, 또는 막의 지질과산화반응과 같은 산화적 손상시 나타나는 일련의 세포퇴화에 의한 영향일 수도 있음을 배제할 수만은 없어 산소유리기의 산화적 손상측면에서도 접근할 필요성이 있다고 생각된다<sup>27</sup>). 본 연구에서 poncirin이  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 NIH3T3 섬유모세포를 처리한 후 poncirin이 1-100 uM의 각각의 농도로 포

함된 배양액에서 48 시간 동안 배양한 후 이의 영향을 MTT 정량과 XTT 정량에 의하여 분석조사하였다. 그 결과 MTT 정량에 있어서는 1 uM과 50 uM에서 XTT의 정량에서는 1 uM, 50 uM, 100 uM에서 세포생존율이  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 세포를 처리한 경우에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 본 실험의 이같은 결과는 poncirin이 6가 크롬인  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 독성효과로부터 세포손상을 방어하였다는 것을 말해주고 있다. poncirin의 독성방어 효과는 아마도 poncirin의 분자구조를 이루고 있는 수산기를 비롯하여<sup>20,28)</sup>, 산소, 수소등이 6가 크롬에 의해 DNA합성억제를 비롯한 단백질합성저해 또는 산소유리기발생등 이들중 어느 특정 경로를 통해 나타나는 독성기전을 방어 내지는 차단할 결과일 것으로 생각된다<sup>58)</sup>. 예를 들면, poncirin의 분자구조는 산소유리기와 잘 결합될 수 있어 이로부터 야기되는 산화적 손상을 제거할 수 있다는 근거를 감안하여 볼 때 이러한 산화현상에 의해 세포의 생존율이 증가되었을 가능성을 전혀 배제할 수는 없다<sup>20,23)</sup>. 한편, 본 실험에서 MTT 정량과 XTT 정량에 의해  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 에 대한 poncirin의 방어능의 유효성을 세포생존을 측면에서 분석한 결과 XTT 정량이 MTT 정량에 비하여 poncirin의 처리 농도별로 더욱 유의성이 높은 것으로 나타났다. 이러한 분석의 차이는 MTT나 XTT의 정량이 모두 세포생존율을 분석하는 시험관내 방법이지만 XTT가 세포부착능의 검정과 더욱 연관성이 깊은 것을 감안할 때 XTT 정량이 MTT 정량보다 다소 민감하다고 생각된다<sup>24)</sup>. 그러나 6가 크롬의 세포독성 기전이나 poncirin과 같은 성분의 항독성 생리활성능을 보다 자세히 밝히기 위해서는 성분활성이나 독성 기전을 분자적 수준에서 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

6가 크롬인  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 poncirin의 영향을 조사하기 위하여  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 NIH3T3 섬유모세포를 처리한 후 1-100 uM의 poncirin이 여러 농도별로 포함된 배양액에서 48 시간 배양한 다음 이의 영향을 MTT 정량과 XTT 정량에 의하여 조사하였다. 그 결과  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서 NIH3T3 섬유모세포를 처리한 경우 대조군에 비하여 세포생존율이 유의하게 감소하였다. 또한  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 poncirin의 영향을 세포생존을 측면에서 분석한 결과 MTT 정량과 XTT 정

량에 있어서  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도에서만 세포를 처리한 경우에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 위의 결과로부터 6가 크롬인  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 는 NIH3T3에 대하여 세포독성을 나타냈으며 poncirin과 같은 약리활성물질은 세포생존율을 증가시킴으로서 6가 크롬인  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성을 방어한 것으로 나타났다.

## 감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

## 참고문헌

1. Ferm VH, Hanlon DP. Toxicity of copper salts in hamster embryonic development. *Biol Reprod.* 1974. 11: 97-101.
2. Levis AG, Majone F. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compound on mammalian cell cultures. *Br J Cancer* 1979. 40: 523-528.
3. Coogan TP, Bare RM, Waalkes MP. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992. 113: 227-233.
4. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol.* 1996. 17: 37-46.
5. Gale TF, Bunch JD. The effect of time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters. *Teratology.* 1979. 19: 81-86. 6. Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. *Toxicol Lett.* 1981. 9: 101-108.
7. Gilani SH, Marano M. Chromium poisoning and chick embryogenesis. *Environ Res.* 1979. 19: 427-432.
8. Norseth T. The carcinogenicity of chromium. *Environ Health Perspect.* 1981. 40: 121-125.
9. Gale TF. Embryonic effects of chromium trioxide in hamster. *Environ Res.* 1978. 16:101-106.
10. De Flora S, Watterhahn, KE. Mechanisms of

- chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep.* 1989;169-224.
11. Reddad Z, Gerente C, Andres Y, Le Cloirec P. Mechanism of Cr(III) and Cr(VI) removal from aqueous solution by sugar beet pulp. *Environ Technol.* 2003;24(2):257-264.
  12. Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1975. 32: 374-354.
  13. Abd El-Mawla AA, Beerhues L. Benzoic acid biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androseum*. *Planta* 2002;214(5): 727-33.
  14. 조재천. 시험관내에서 Gallic Acid와 Vitamin A의 세포독성 평가. 원광대학교 박사학위 논문. 2003.
  15. Duthie GG. Parsley, polyphenols and nutritional antioxidants. *Br J Nutr* 1999;81:425-626.
  16. Sakagami H, Yokote Y, Akahane K. Changes in amino acid pool and utilization during apoptosis in HL-60 cells induced by epigallocatechin gallate or gallic acid. *Anticancer Res.* 2001;21(4A): 2441-7.
  17. Furuya S, Takayama F, Mimaki Y, Sashida Y, Satoh K, Sakagami H. Cytotoxic activity of saponins from *Camassia leichtlinii* against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res.* 2001;21(2A): 959-64.
  18. Ray D, Sarma KD, Antony A. Differential effects of tri-n-butylstannyl benzoates on induction of apoptosis in K562 and MCF-7 cells. *IUBMB Life.* 2000;49(6):519-25.
  19. Nunez Selles AJ, Velez Castro HT, Aguero-Aguero J, Gonzalez-Gonzalez J, Naddeo F, De Simone F, Rastrelli L. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement. *J Agric Food Chem* 2002;13:50(4): 762-6.
  20. Di Cario G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999;65: 337-353.
  21. Reichelt M, Brown PD, Schneider B, Oldham NJ, Stuber E, Tokuha J, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Gershenzon J. Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 2002;59(6):663-71.
  22. Wu TS, Chan YY, Leu YL. The constituents of the root and stem of *Aristolochia cucurbitifolia* Hayata and their biological activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2000;48(7): 1006-9.
  23. Lee JJ, Son MW, Yoo MH, Jang MS, Kim WB, Lee KC. Analysis of DA-6034, a new flavonoid derivative in biological fluids by HPLC. *Yakhak Hoeji.* 1988;42(2):149-152.
  24. Mosmann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1984. 65: 55-63.
  25. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1984. 9: 7-9.
  26. Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem.* 1989. 53: 3383-3389.
  27. Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 1993. 121: 1-13.
  28. Isuzugawa K, Ogihara Y, Inoue M. Different generation of inhibitors against gallic acid-induced apoptosis produces different sensitivity to gallic acid. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(3): 249-53.