

## 페놀 화합물의 Hexavalent Chromium 독성에 대한 세포 보호효과

한두석<sup>1)</sup> · 강정일<sup>2)</sup> · 백승화<sup>3)</sup> \*

<sup>1)</sup>원광대학교 치과대학 구강해부학교실, <sup>2)</sup>대불대학교 물리치료학과

<sup>3)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

## Cytoprotective Effect of Phenolic Compounds Against Hexavalent Chromium-Induced Cytotoxicity

Du Seok Han,<sup>1)</sup> Jeong Il Kang<sup>2)</sup> & Seung Hwa Baek<sup>3)</sup> \*

<sup>1)</sup>Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, South Korea,

<sup>2)</sup>Department of Physical Therapy, Daebul University, Youngam 526-702, South Korea,

<sup>3)</sup>Department of Herbal Resources, Professional School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, South Korea

### Abstract

**Objectives :** In order to evaluate the cytotoxicity of hexavalent chromium, the cytoprotective effect of phenolic compounds against hexavalent chromium-induced cytotoxicity, cell viability, cell adhesion ability, lactate dehydrogenase(LDH) activity, and morphological changes of cells were examined.

**Methods :** We measured the cytotoxicity of hexavalent chromium with 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT), LDH and DPPH methods.

**Results :** The cytotoxicity of hexavalent chromium(IC<sub>50</sub>, 44.0-51.0μM) was high according to the toxic criteria. Cytoprotective effect of phenolic compounds against IC<sub>50</sub> value of hexavalent chromium in cell morphology increased in a concentration-dependent manner.

**Conclusions :** These results suggest that 3,4,5-trihydroxybenzoic acid may be used as a cytoprotective agent against chromium(IV)-mediated cytotoxicity.

· 접수 : 2009년 5월 27일 · 수정접수 : 2009년 7월 21일 · 채택 : 2009년 7월 22일

\* 교신저자 : 백승화, 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

Tel : 063-850-6225, Fax : 063-850-6225, E-mail : shbaek wonkwang.ac.kr

**Key words** : Cytoprotective effect, Hexavalent chromium, Chromium-mediated cytotoxicity, Cell viability, Cell adhesion ability

## I. 서론

크롬은 superoxide ion, hydroxyl radicals 및 hydrogen peroxide와 같은 산소종을 생산하여, 산화적 스트레스를 유발하여,<sup>1,2)</sup> 완전한 발암원으로 작용할 수 있다. Leonard 등<sup>3)</sup>은 catalase는 hydroxyl radicals(OH·)의 생산을 억제하고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하면 OH· 생산은 증가되며, OH·는 물(H<sub>2</sub>O)과 크롬(VI)의 반응에 의하여 생산된다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 superoxide anion radicals(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 감소에 의하여 생산되며, OH·는 정상세포의 DNA의 strand breaks를 일으킬 수 있다고 보고하였다. Tsou 등<sup>4)</sup>은 vitamin C에 의한 크롬(VI) 감소의 일차 원인은 OH·와 5가 크롬이라고 보고하였다. 페놀 화합물은 야채, 과일 등의 식물에 광범위하게 분포되어 식생활에 규칙적으로 제공되고 있으며,<sup>5)</sup> 항산화 작용은 galloxy구조에 기인한다.<sup>3,6)</sup> 3-Hydroxybenzoic acid(3-HBA)는 각종 식물로부터 분리되고 있다.<sup>7)</sup> 3,4,5-Trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA)와 quercetin는 잘 알려진 항산화 물질이며,<sup>8)</sup> tannin gel은 pH 3의 크롬 용액에서 크롬을 흡수할 수 있으며, quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt는 급성 크롬(CrO<sub>3</sub>) 독성 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.<sup>9)</sup>

이에 본 연구는 페놀화합물의 방향족 고리 구조에 결합된 수산기의 수와 위치가 항산화능과 크롬(VI)이온에 대한 세포독성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위한 목적으로, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 선정하여,

NIH3T3 섬유모세포에 적용한 후, 세포 생존율, 세포부착 저지능, LDH 활성 및 항산화능을 측정하고, 세포를 형태학적으로 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험방법

### 1. 시약 및 기기

세포배양에 사용한 minimum essential medium (MEM)과 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 및 fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco/BRL(Grand Island, NY, USA)사에서 구입하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 정량과 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) 정량에 사용한 시약과 chromium trioxide, sodium dichromate, 3-hydroxybenzoic acid(3-HBA), 3,4,5-trihydroxybenzoic acid(3,4,5-THBA), pyrogallol(PG)와 quercetin는 Sigma Chemical Co.(ST. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(Vision Scientific Co., Bucheon, Korea.)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기(Marientfeld Co., Mergentheim, Germany)를 이용하였다. MTT 및 XTT 정량에는 분광 광도계 ELISA reader (Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 사용하였다.

## 2. 세포배양 및 관찰

3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 정상세포에 대한 세포독성 효과를 측정하기 위하여, 원광대학교 의과대학 해부학교실에서 분양받은 NIH3T3 섬유모세포(NIH3T3)는 MEM배지에 10% fetal bovine serum, penicillin(25 unit/mL) 및 fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 분리한 후, Turk형 혈구 계산기를 이용하여, 세포수가  $5 \times 10^4$  cells/mL가 되도록 세포 부유액을 만들었다.

## 3. MTT 정량분석법

Mosmann의 방법<sup>10)</sup>에 의하여, NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기에  $5 \times 10^4$  cells/mL 세포수를 넣고 24 시간 배양 후, 크롬의 세포독성과 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 세포독성을 측정하기 위하여, 크롬, 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 각각 농도별(1.0, 25.0, 50.0 및 100.0 $\mu$ M)로 첨가하여 48 시간 배양하고, 크롬 IC<sub>50</sub> 농도의 세포독성에 대한, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 보호효과를 측정하기 위하여, 24시간 배양한 세포에 IC<sub>50</sub> 농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 각각 농도별로 첨가하여 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT 50.0 $\mu$ g/mL가 포함된 배양액을 첨가하고 3시간 배양 후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2.0mL/well씩 넣어 5분간 실온에 방치하여, MTT formazan을 용해하고, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

## 4. XTT 정량분석법

Laminin-coated plate는 laminin 1.0mg을 PBS 2.0mL에 용해하여 냉장고에 보관하면서, 필요시에 laminin의 농도(20.0  $\mu$ g/mL)를 결정하여 찬 PBS 용액으로 희석하고, 이 용액을 24 well plate의 각 well에 200.0 $\mu$ L씩 분주하여 하룻밤 동안 건조시킨 후, PBS로 2회 세척하고 3% BSA를 각 well에 200.0 $\mu$ L씩 첨가해 잘 흔들어 준 다음, 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 배양된 NIH3T3 섬유모세포  $5 \times 10^4$  cells/mL 세포수를 laminin으로 coating한 배양용기에 넣고 24 시간 배양한 후, MTT 정량 분석법과 같은 방법으로 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin을 넣고 다시 48시간 배양한 후, 배지는 조심스럽게 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 여기에 XTT와 혼합하여, 각 well에 200.0 $\mu$ L씩 주입하고 4~6시간 동안 배양한 후, 450nm에서 분광광도계 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

## 5. 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 측정방법

검체중의 젖산 탈수소 효소는 젖산을 탈수소시켜 피루빈산을 생성하는 데, 이때 보조소 NAD<sup>+</sup>는 환원되어 NADH로 되고, NADH는 1-methoxy PMS의 존재하에 NTB(nitrotrazolium blue)를 환원시켜 디포르마잔을 생성하며, 이 디포르마잔의 적색을 비색 정량하는 원리를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다. MTT 정량 분석법과 같이 NIH3T3 섬유모세포 각 배양용기에  $5 \times 10^4$  cells/mL 세포수를 넣고 24 시간 배양 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin 자체의 세포독성 효과를 측정하기 위하여, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin을 각각 농도별(1.0, 25.0, 50.0 및 100.0 $\mu$ M)로 첨가하고, 크롬에 대한 세포 보호효과를 측정

하기 위하여, 크롬 IC<sub>50</sub>농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 후, 기질액 0.5mL와 정색시약 0.5mL를 섞은 용액에 혈청과 증류수 0.05mL를 각각 첨가한 회색반응 정지액(Asan Co, Seoul, Korea)과 시약 blank를 잘 혼합하여, 60분 이내에 570nm에서 흡광도를 측정하고 상호 비교하였다.

## 6. 항산화능 실험

DPPH에 의한 항산화능 실험은 Hatano 등의 방법<sup>11)</sup>에 의하여, 시료를 1.0, 25.0, 50.0, 100.0 μM(99.5% ethanol)의 4가지 농도로 조제한 용액 0.1mL(control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH용액(99.5% ethanol) 1.9mL를 첨가하였다. Vortex mixer로 10초간 진탕한 후, 37°C에서 30분 동안 배양시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조약물로는 L-ascorbic acid를 1.0, 25.0, 50.0, 100.0 μM(99.5% ethanol)의 4가지 농도로 조제하여 측정하였다. 각 시료의 항산화작용은 DPPH에 대한 전자공여능(electron donating ability, EDA%)<sup>12)</sup>과 IC<sub>50</sub>치(DPPH radical형성을 50% 억제하는 데 필요한 μL농도)로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Control O.D} - \text{sample O.D}) \times 100 / \text{Control O.D.}$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 ethanol을 가한 시험액의 흡광도

## 7. IC<sub>50</sub> 결정

3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin의 IC<sub>50</sub> 결정은 배양 중인 NIH3T3 섬유모세포를 각 배양용기당  $5 \times 10^4$  cells/mL씩 넣고 24시간 배양

후, 1.0, 25.0, 50.0, 100.0 μM의 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin를 첨가하여 48시간 배양한 후, MTT 정량 및 XTT 정량을 하여 이들 각각에 대한 50% 억제농도인 IC<sub>50</sub>을 회귀방정식<sup>13)</sup>에 의해 구하였다.

## 8. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Students' t-test를 시행하였으며, one way ANOVA분석의 결과와 비교하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## 9. 세포의 광학 현미경적 관찰

세포의 광학 현미경적 관찰을 위하여, NIH3T3 섬유모세포는 각각 세포 분주 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin를 처리하여, MTT와 XTT를 처리하기 전에 도립위상차 현미경(Inverted Microscope, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

## III. 실험결과

### 1. Hexavalent Chromium의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성

니켈-크롬 합금의 재료인 크롬 중 신장에 비교적 독성이 강하게 나타나는 것으로 알려진 chromium trioxide(CrO<sub>3</sub>)와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>를 선정하여, 정상세포인 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후, 세포 생존율은 MTT 정량분석법을 사용하였으며, 세포부착 저지능을 측정은 XTT 정량분석법을 이용하여 흡광도를 측정하였다. CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>를 NIH3T3 섬유모세포에 처리한 후, MTT 정량분석법으로 흡광도를 측정 한 결과, 표 1에서 보는 바와 같이, 대조군에

비하여, 농도 의존적으로 흡광도가 감소하였으며, 1.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>에서부터 통계적 유의성이 관찰되었으며, 대조군에 비해 1.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>는 약 79% 정도의 세포독성 효과가 나타났다. 100.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>에서는 흡광도를 대조군 100%에 대하여 9.62%까지 감소시켰으며, 50.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>와 100.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>의 세포독성 효과의 차이는 약 31% 정도로 큰 변화를 관찰할 수가 있었다. XTT 정량분석법으로 흡광도를 측정된 결과에서도 대조군에 비하여 흡광도를 농도 의존적으로 감소시켰으며, 25.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>에서부터 통계적으로 유의한 감소가 나타났으며, 100.0 $\mu$ M CrO<sub>3</sub>에서는 대조군에 비하여 40.1%까지 감소시켰으나, MTT 분석법에서 측정된 것에 비하면 약 4.2배 정도로 낮은 세포독성 효과가 검색되었다. CrO<sub>3</sub>의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 IC<sub>50</sub> 농도는 MTT 정량분석법과 XTT 정량분

석법에서 각각 44.0 $\mu$ M과 69.5 $\mu$ M 농도로 측정되었으며, MTT 정량분석법에 의하면 세포독성 효과가 높게 관찰되었다(Table 1).<sup>14)</sup>

1.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>는 대조군에 비해 약 5% 정도의 세포독성 효과가 나타났으며, 100.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>에서는 흡광도를 대조군 100%에 대하여 11.6% 까지 감소시켰으며, 25.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>와 50.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 세포독성 효과의 차이는 약 41% 정도로 큰 변화를 관찰할 수가 있었다. XTT 정량분석법으로 흡광도를 측정된 결과에서도 대조군에 비하여 흡광도를 농도 의존적으로 감소시켰으며, 25.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>에서부터 통계적으로 유의한 감소가 나타났으며, 100.0 $\mu$ M Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>에서는 대조군에 비하여 61%까지 감소시켰으나, MTT 분석법에서 측정된 것에 비하면, 약 3.3배 정도로 낮은 세포독성 효과가 검색되었다. Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 NIH3T3

Table 1. The cytotoxicity of chromium trioxide on NIH3T3 fibroblasts by the MTT and XTT methods.

Group	MTT	XTT
Control	3.97 ± 0.09 (100)	4.01 ± 0.12 (100)
1	3.14 ± 0.11 (79.1)*	3.35 ± 0.07 (83.6)
25	2.22 ± 0.09 (56.0)**	2.63 ± 0.04 (65.5)**
50	1.62 ± 0.07 (40.7)***	2.09 ± 0.05 (52.0)***
100	0.38 ± 0.01 (9.62)***	1.61 ± 0.03 (40.1)***
IC <sub>50</sub>	44.0 $\mu$ M	69.5 $\mu$ M

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(Students' t-test).

Table 2. The cytotoxicity of Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> on NIH3T3 fibroblasts by the MTT and XTT methods.

Group	MTT	XTT
Control	3.97 ± 0.11 (100)	4.02 ± 0.08 (100)
1	3.70 ± 0.25 (95)	3.45 ± 0.04 (85.8)
25	3.13 ± 0.09 (78.9)**	2.76 ± 0.04 (68.6)**
50	1.50 ± 0.12 (37.8)***	1.93 ± 0.07 (47.9)***
100	0.46 ± 0.12 (11.6)***	1.56 ± 0.03 (38.9)***
IC <sub>50</sub>	51.20 $\mu$ M	69.20 $\mu$ M

The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001(Students' t-test).

섬유모세포에 대한 IC<sub>50</sub> 농도는 MTT 정량분석법과 XTT 정량분석법에서, 각각 51.2 μM과 69.2 μM로 측정되었으며, MTT 정량분석법에 의하면 세포독성 효과가 높게 관찰되었다 (Table 2).

## 2. NIH3T3 섬유모세포에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 독성

MTT와 XTT 정량분석법에 의한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 NIH3T3 섬유모 세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 흡광도가 미약하게 감소하였으며, 100.0μM 3-HBA와 100.0μM 3,4,5-THBA에서 통계적으로 유의성이 관찰되었다 (p<0.05). 3-HBA의 최소 억제농도(692.45μM)는 다른 방향족 화합물보다 세포독성 효과가 높게 나타났으며, 3-HBA의 4,5번위치에 수산기를 갖는 3,4,5-THBA보다 약 1.4배 정도로 강한 세포독성 효과가 관찰되었으며, BA는 quercetin의 세포 생존율보다 약 2.1배 정도로 강한 세포독성 효과가 관찰되었다. 벤조산 유도체의 세포 생존율에 대한 연구결과에 의하면, 세포독성 효과의 벤조산의 수산기 위치와 수에

따라 세포 생존율의 변화가 있으나, quercetin 보다는 독성이 높게 관찰되었다. MTT 정량분석법에 의한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포독성 효과는 3-HBA > 3,4,5-THBA > quercetin의 감소 순서로 활성이 측정되었다 (Table 3).<sup>14,15)</sup>

세포부착 저지능을 XTT 정량분석법으로 측정된 결과에 의하면, 3-HBA의 NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 세포부착 저지능(IC<sub>50</sub>= 943.3 μM)은 3,4,5-THBA보다 약 2.2배 정도로 세포독성 효과가 관찰되었으며, quercetin에 대한 세포부착 저지능(IC<sub>50</sub>= 2,410.8μM)은 3-HBA에 대한 세포부착 저지능보다 약 2.6배 정도로 약한 민감성이 관찰되었으며, 3,4,5-THBA보다는 세포 민감성이 약 2.2배 정도로 약하게 관찰되었다. 벤조산 유도체의 최소 억제농도에 대한 NIH3T3 섬유모 세포주의 세포부착 저지능은 세포 생존율에서와 같이 민감성이 3-HBA > 3,4,5-THBA > quercetin순서로 감소되어 관찰되었다. 이러한 분자구조와 세포 민감성의 관계는 페놀 화합물에 수산기의 수와 위치에 따라 활성관계가 다르게 관찰되었다. 앞으로 페놀 화합물의 분자구조와 세포부착 저지능 관계에 대한 연구의 필요성이 요구된다 (Table 4).<sup>14,15)</sup>

Table 3. The cytotoxicity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on NIH3T3 fibroblasts by the MTT method.

Compound Conc. (μM)	3-HBA	3,4,5-THBA	Quercetin
Control	3.90 ± 0.25 (100)	4.16 ± 0.00 (100)	4.09 ± 0.11 (100)
1	3.87 ± 0.06 (99.4)	4.08 ± 0.11 (98.1)	4.08 ± 0.09 (99.7)
25	3.76 ± 0.33 (96.6)	4.07 ± 0.09 (97.8)	4.03 ± 0.03 (98.6)
50	3.68 ± 0.13 (94.6)	3.99 ± 0.29 (95.9)	4.01 ± 0.04 (98.1)
100	3.62 ± 0.12 (92.9)*	3.91 ± 0.28 (94.0)*	3.94 ± 0.20 (96.4)
IC <sub>50</sub>	692.45	942.52	1,463.90

The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*p<0.05(Students' t-test).

Table 4. The cytotoxicity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on NIH3T3 fibroblast by the XTT method.

Compound Conc. ( $\mu$ M)	3-HBA	3,4,5-THBA	Quercetin
Control	2.48 $\pm$ 0.12 (100)	2.07 $\pm$ 0.00 (100)	2.40 $\pm$ 0.02(100)
1	2.46 $\pm$ 0.05 (99.4)	2.16 $\pm$ 0.14 (99.4)	2.33 $\pm$ 0.01(99.5)
25	2.39 $\pm$ 0.03 (96.7)	2.04 $\pm$ 0.05 (98.5)	2.32 $\pm$ 0.03(98.6)
50	2.37 $\pm$ 0.06 (95.6)	2.03 $\pm$ 0.02 (98.3)	2.30 $\pm$ 0.05(98.4)
100	2.34 $\pm$ 0.02 (94.5)*	2.02 $\pm$ 0.02 (97.5)	2.32 $\pm$ 0.07(97.7)
IC <sub>50</sub>	943.30	1,116.10	2,410.80

The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*p<0.05(Students' t-test).

### 3. Chromium trioxide의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 보호효과

NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 생존율과 세포부

착 저지능을 측정된 결과에 의하면, chromium trioxide의 IC<sub>50</sub> 농도와 비교해, 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 증가하였다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 흡광도에 의하면, 3-HBA의 IC<sub>50</sub>값[2.26  $\pm$  0.02(57%)]은 3,4,5-THBA의 IC<sub>50</sub>값[2.26  $\pm$  0.01(59%)], quercetin의 IC<sub>50</sub>값[2.33  $\pm$  0.02(59%)]과 유사한

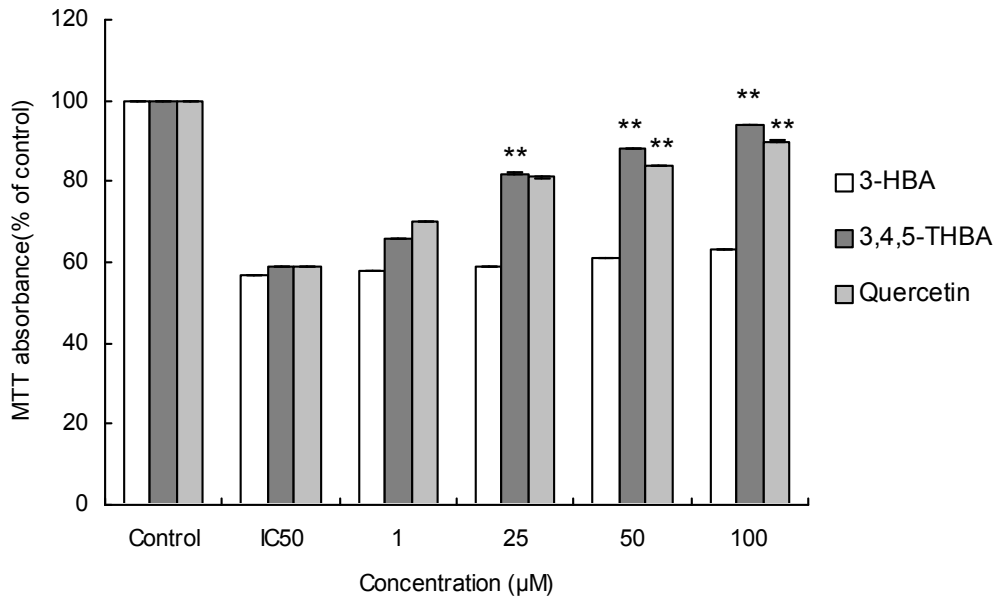


Fig. 1. The cytoprotective effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on chromium trioxide-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the MTT method. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*\*p<0.01(Students' t-test).

측정값이 관찰되었다. 3-HBA에 대한 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으며, 3,4,5-THBA는 quercetin보다 낮은 농도에서 통계적인 유의성이 관찰되었다( $p < 0.01$ ). NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포독성은 3-HBA의  $IC_{50}$ 값에 대한, 100.0 $\mu$ M 3-HBA[ $2.50 \pm 0.03$ (63%)]에 비교해보면, chromium trioxide 독성에 대한 3-HBA의 세포 보호효과는 약 6% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA의  $IC_{50}$ 값에 대한 100.0 $\mu$ M 3,4,5-THBA[ $3.60 \pm 0.03$ (94%)]는 약 35% 정도로 높은 세포 보호효과가 나타났으며, quercetin의  $IC_{50}$ 값에 대한 100.0 $\mu$ M quercetin[ $3.55 \pm 0.03$ (90%)]는 약 31% 정도로 세포 보호효과가 관찰되었다(Fig. 1).

NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 XTT흡광도에 의하면, 3-HBA의  $IC_{50}$ 값[ $1.99 \pm 0.17$ (50%)]은 3,4,5-THBA의  $IC_{50}$ 값[ $2.13 \pm 0.09$ (54%)]와

quercetin의  $IC_{50}$ 값[ $2.04 \pm 0.02$ (52%)]의 유사한 측정값이 관찰되었다. 50.0  $\mu$ M 3,4,5-THBA와 50.0 $\mu$ M quercetin에 대한 통계적인 유의성( $p < 0.05$ )이 관찰되었으나, 3-HBA는 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다. NIH3T3 섬유모세포에 미치는 chromium trioxide의 세포부착 저지능은 3-HBA의  $IC_{50}$ 값에 대한 100.0  $\mu$ M 3-HBA[ $2.15 \pm 0.20$ (54%)]에 비교해보면, chromium trioxide독성에 대한 3-HBA의 독성경감효과는 약 4% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA과 quercetin의  $IC_{50}$ 값에 대한, 100.0 $\mu$ M 농도에서 약 30% 정도의 세포 보호효과가 측정되었다. Chromium trioxide독성에 대한 폐놀 화합물의 독성 경감효과에 대한 세포부착 저지능은 세포 생존율처럼 3,4,5-THBA > quercetin > 3-HBA순서로 감소하였음을 알 수가 있었다 (Fig. 2).<sup>14,15)</sup>

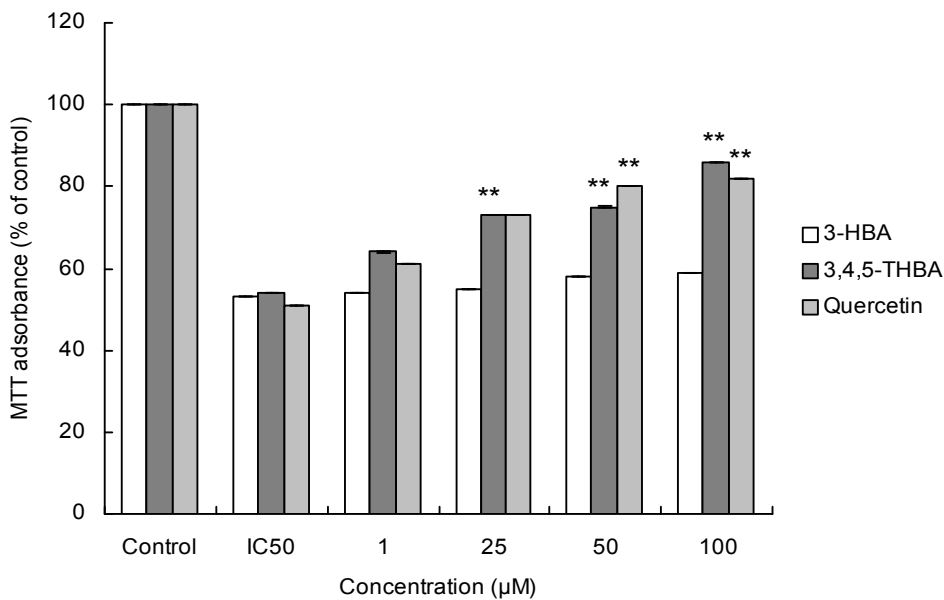


Fig. 3. The cytoprotective effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the MTT method. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*\* $p < 0.01$ (Students' t-test).



4. Sodium dichromate의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 보호효과

NIH3T3 섬유모세포에 미치는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포 생존율과 세포부착 저지능을 측정된 결과에 의하면,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의  $\text{IC}_{50}$  농도와 비교해, 세포 생존율과 세포부착 저지능을 농도 의존적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 흡광도에 의하면, 3-HBA의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.09 \pm 0.04(53\%)$ ]은 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.14 \pm 0.04(54\%)$ ], quercetin의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.05 \pm 0.02(51\%)$ ]과 유사한 측정값이 관찰되었다. 3-HBA에 대한 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으나, 3,4,5-THBA는 quercetin보다 낮은 농도에서 통계적인 유

의성이 관찰되었다( $p < 0.01$ ). NIH3T3 섬유모세포에 미치는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성은 3-HBA의  $\text{IC}_{50}$ 값에 대한  $100.0\mu\text{M}$  3-HBA[ $2.33 \pm 0.10(59\%)$ ]에 비교해보면,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 독성에 대한 3-HBA의 세포 보호효과는 약 6% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA와 quercetin의  $\text{IC}_{50}$ 값에 대한  $100.0\mu\text{M}$  농도는 chromium trioxide의 경우와 비슷한 약 30% 정도로 세포 보호효과가 측정되었다(Fig. 3).

NIH3T3 섬유모 세포주에 대한 XTT흡광도에 의하면, 3-HBA의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.16 \pm 0.06(53\%)$ ]은 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.26 \pm 0.10(57\%)$ ]와 quercetin의  $\text{IC}_{50}$ 값[ $2.22 \pm 0.17(55\%)$ ]의 측정값과 유사한 흡광도를 얻게 되었다.  $25.0\mu\text{M}$  3,4,5-THBA와  $25.0\mu\text{M}$  quercetin에 대한 통계적인 유의성( $p < 0.05, 0.01$ )이 관찰되었으나, 3-HBA는 통계적인 유의성이 관찰되지 않았다.

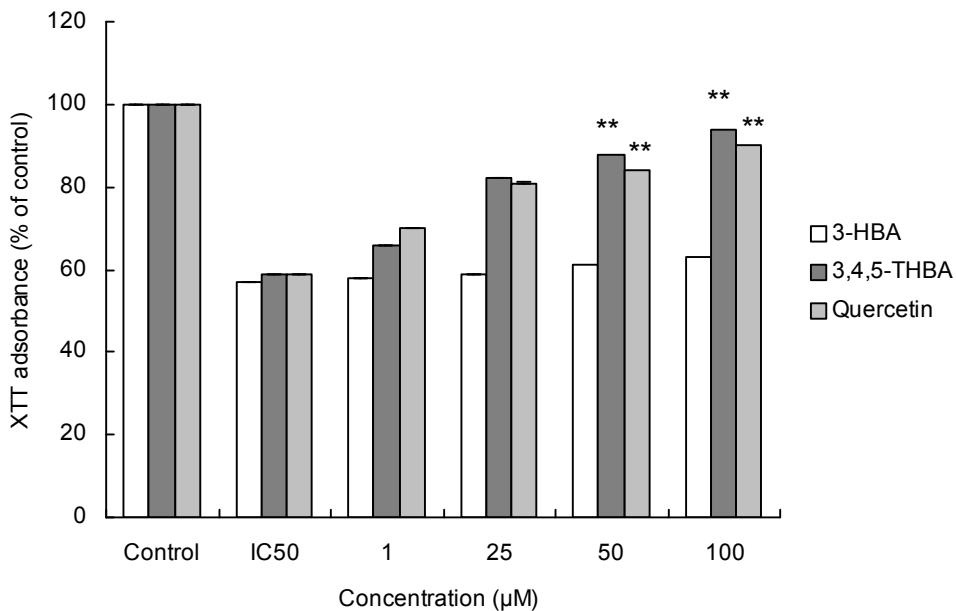


Fig. 2. The cytoprotective effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on chromium trioxide-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the XTT method. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*\* $p < 0.01$ (Students' t-test).

NIH3T3 섬유모세포에 미치는  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포부착 저지능은 3-HBA의  $\text{IC}_{50}$ 값에 대한  $100.0 \mu\text{M}$  3-HBA [ $2.49 \pm 0.01(62\%)$ ]에 비교해 보면,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 독성에 대한 3-HBA의 세포 보호효과는 약 9% 정도로 관찰되었으나, 3,4,5-THBA의  $\text{IC}_{50}$ 값에 대한  $100.0 \mu\text{M}$  3,4,5-THBA [ $3.41 \pm 0.12(86\%)$ ]는 약 29% 정도로 세포 보호효과가 나타났으며, quercetin의  $\text{IC}_{50}$ 값에 대한  $100.0 \mu\text{M}$  quercetin [ $3.28 \pm 0.18(81\%)$ ]는 약 28% 정도로 3,4,5-THBA의 세포 보호효과와 유사한 활성이 측정되었다. 이와 같은  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  독성에 대한 세포 보호효과는 세포부착 저지능은 세포 생존율처럼, 3,4,5-THBA > quercetin > 3-HBA순서로 감소하였음을 알 수가 있었다 (Fig. 4).<sup>15)</sup>

#### 5. Hexavalent Chromium의 세포독성에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 LDH 활성

$\text{CrO}_3$ 와  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포막의 파괴 정도에 따라 양이 결정되는 LDH 활성도를 측정하였으나, MTT 정량분석법과 XTT 정량분석법에서와 같이, chromium trioxide  $\text{IC}_{50}$  농도를 NIH3T3 섬유모세포에 처리하고 24시간이 지난 후, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin은 농도별로 처리한 후, 48 시간째에 LDH 활성도를 측정한 결과, 모든 화합물은 chromium trioxide  $\text{IC}_{50}$  농도 처리군에 대하여, LDH 흡광도를  $1.0 \mu\text{M}$   $\text{CrO}_3$ 는 증가시켰지만,  $25.0 \mu\text{M}$   $\text{CrO}_3$ 에서부터는 농도 의존적으로 감소시켰다. 3-HBA는  $\text{IC}_{50}$  농도에 대하여,

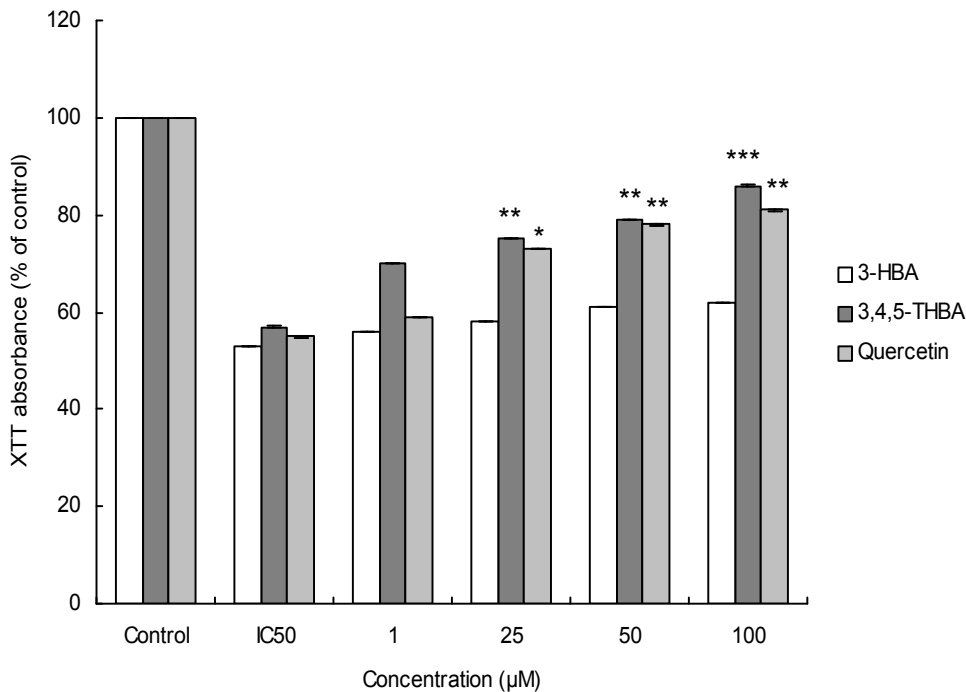


Fig. 4. The cytoprotective effect of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the XTT method. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  (Students' t-test).

농도증가에 따라 큰 차이가 없었으나, 3,4,5-THBA는 IC<sub>50</sub> 농도에 대하여, 50.0μM와 100.0 μM 3,4,5-THBA차이는 약 63% 정도로 관찰되었으며, 100.0μM 3,4,5-THBA[0.044 ± 0.006 (151%)]는 3,4,5-THBA IC<sub>50</sub>[0.068 ± 0.001 (235%)]보다 약 84%정도로 높은 LDH활성이 관찰되었다. 100.0μM quercetin[0.067 ± 0.001 (173%)]는 quercetin도 IC<sub>50</sub>[0.093 ± 0.002 (239%)]보다 약 66%정도 높은 LDH활성이 관찰되었다. Chromium trioxide IC<sub>50</sub> 농도치리에 의한 LDH 활성도에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 LDH 활성도 감소는 3,4,5-THBA > quercetin > 3-HBA순서로 관찰되었으므로, chromium trioxide에 의한 세포막 손상에 대한 억제효과는 3,4,5-THBA가 가장 높았으며, 반대로 3-HBA가 chromium trioxide에 의한 세포막 손상에 대한 억제효과는 가장 낮

게 관찰되었다(Fig. 5).<sup>14)</sup>

3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 농도별로 처리한 후, 48시간째에 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>에 대한 LDH 활성도를 측정된 결과, 1μM 3-HBA까지 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 대하여, LDH 활성도를 증가시켰으며, 25.0μM 3-HBA에서부터 농도 의존적으로 LDH 활성도를 감소시켰으며, 100.0μM 3-HBA에서는 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3,4,5-THBA와 quercetin의 IC<sub>50</sub> 농도에 대한 LDH 흡광도는 25.0 μM 농도에서부터 통계적으로 유의한 차이가 나타났으며, 3,4,5-THBA와 quercetin간의 차이는 크지 않았다.

이상의 연구결과에 의하면, 페놀 화합물의 고리구조에 수산기의 수는 크롬(VI)인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> IC<sub>50</sub> 농도의 처리군에 대한 LDH 활성도를 3,4,5-THBA > quercetin > 3-HBA 순서로 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 6).

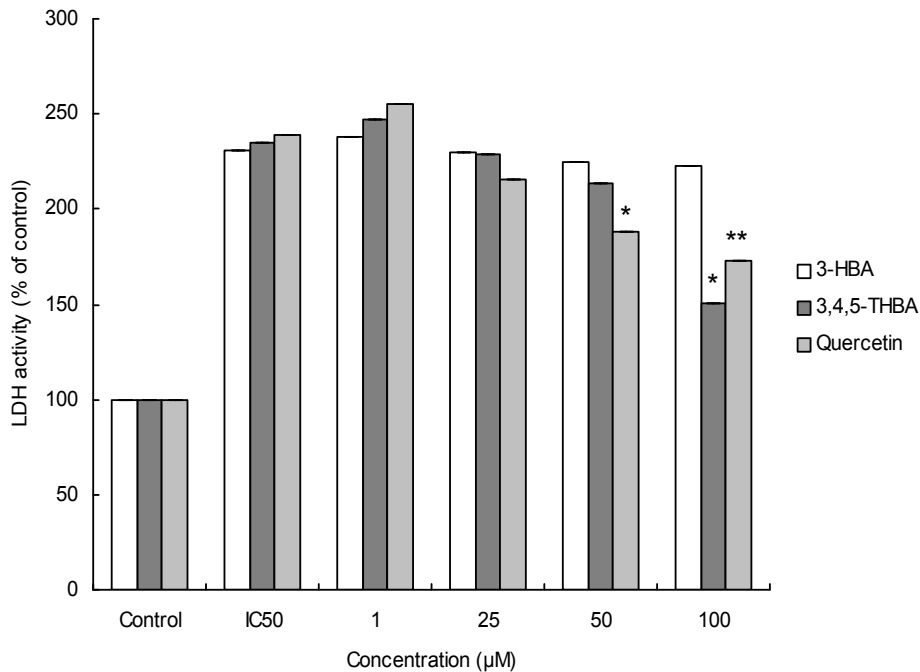


Fig. 5. The LDH activity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on chromium trioxide-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the XTT method. The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*p<0.05, \*\*p<0.01(Students' t-test).

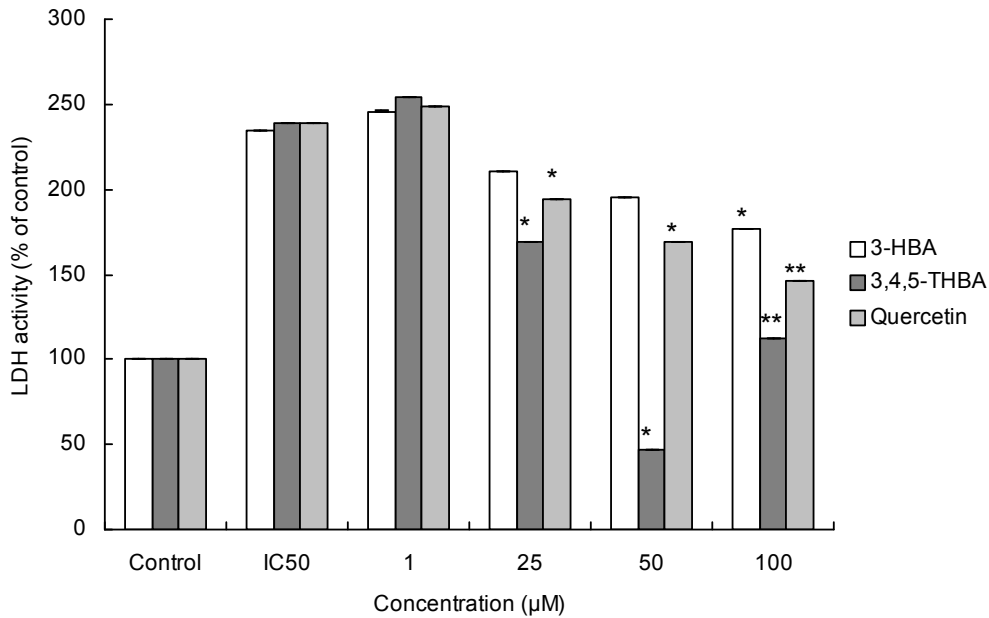


Fig. 6. The LDH activity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-induced cytotoxicity in NIH3T3 fibroblasts by the XTT method. The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value: \*p<0.05, \*\*p<0.01(Students' t-test).

### 6. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 항산화능 측정 결과

3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin에서 관찰된 크롬(VI)의 세포 보호효과와 항산화능과의 관계를 알아보기 위하여, 3-HBA, 3,4,5-THBA, PG 및 quercetin의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능에 의하여 측정된 결과, 3-HBA의 DPPH 라디칼 소거능은 1.0 - 100.0μM농도범위에서 3-HBA에서는 약 3%정도의 차이가 관찰되었으나, 3,4,5-THBA의 DPPH 라디칼 소거능은 약 27%정도로 차이의 활성이 측정되었으며, quercetin의 DPPH 라디칼 소거능은 약 21% 정도로 큰 차이는 없었다. 100.0μM 농도에서 DPPH 라디칼 소거능은 3,4,5-THBA > quercetin > 3-THBA 순서로 활성이 감소되었다. 3,4,5-THBA의 DPPH 라디칼 소거능은 galocatechin B고리의 quercetin에 대한 3'4-

dihydroxyl(B고리)와 A와 C고리의 hydroxyl보다 큰 라디칼 소거능이 측정되었다(Fig. 7).

### 7. 세포의 광학 현미경적 관찰

대조군의 NIH3T3 섬유모세포는 배양 24 시간째가 되면, 대부분의 정상세포들과 같이 배양용기의 바닥에 다수의 방추형 세포들이 단층을 이루어 빈틈없이 부착된다. 크롬(VI)을 농도별로 처리하면, 농도 의존적으로 세포밀도가 감소하여, 세포의 크기는 원형으로 변형되며, 일부세포는 배양액내에 떠다니는 부유세포(floating cell)로 나타났다. 크롬(VI)을 IC<sub>50</sub> 농도로 처리하면, 세포밀도의 감소, 세포크기와 모양의 변화 및 배양액내에 세포 부스러기들이 나타났다. 크롬 IC<sub>50</sub> 농도와 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin면, 농도 의존적으로 처리하면, 농도 의존적으로 세포의 재생현상 즉 세포

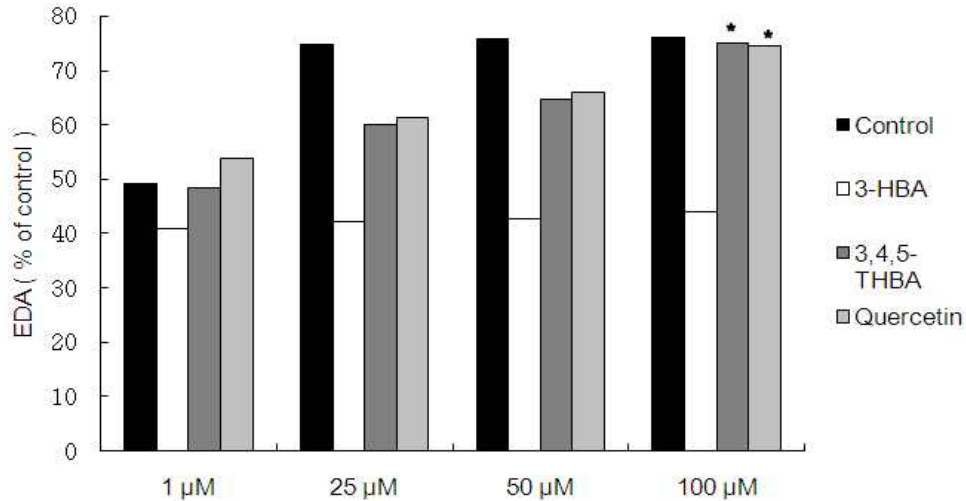


Fig. 7. The radical scavenging activity of 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin on DPPH. The values represent the mean  $\pm$  standard deviations for triplicate experiments. PG(control), 3-HBA, 3,4,5-THBA and quercetin was examined in four concentrations in triplicate experiments. Significantly different from the control value: \* $p < 0.05$  (Students' t-test).

수의 VI)와 세포의 방추형으로 변화가 일어났다. 세포의 재생현상은 3,4,5-THBA와 quercetin가 3-HBA 보다 빠르게 진행되었으나, 3,4,5-THBA와 quercetin와 BA와 quercetin은 유사하였다.<sup>14)</sup>

#### IV. 고 찰

본 연구에서 크롬(VI)인  $\text{CrO}_3$ 와  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 NIH3T3 섬유모세포에 대한  $\text{IC}_{50}$  농도는 MTT 정량은 44.0 ~ 51.2  $\mu\text{M}$  범위에서 관찰되었으며, XTT 정량에서 약 69.0  $\mu\text{M}$  농도에서 측정되었다. 이러한 연구 결과는 Biedermann 등<sup>16)</sup>의 LDH 농도와 Son 등의  $\text{IC}_{50}$  농도보다 높아 세포독성 효과가 약하게 나타났으나, 전<sup>17)</sup>의 연구 결과와는 거의 일치하였다. Borefreund 등<sup>18)</sup>에 의하면,  $\text{CrO}_3$ 와  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 NIH3T3 섬유모세포주에 대한 세포독성 효과는 고독성으로 판정할 수 있었으며, 3-HBA와 3,4,5-

THBA는 페놀산이나, quercetin은 프라보노이드 화합물로 항산화 활성이 있으며,<sup>3)</sup> 항산화 효과는 분자구조의 galloy 성분에서 기인한다.<sup>6)</sup> 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin 자체의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성 효과는 표 3, 4와 그림 6, 7에서 보는 바와 같이, 농도의존적으로 MTT 흡광도와 XTT 흡광도를 감소시키나, 100.0  $\mu\text{M}$  농도에서 대조군에 비하여, 3-HBA가 통계적으로 유의한 차이가 있으나, 3,4,5-THBA와 quercetin은 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 연구 결과는 전<sup>17)</sup>의 결과와 일치하였으며, Borefreund 등<sup>18)</sup>의 세포독성에 따른 판정 기준에 의하면, 무독성으로 판정할 수 있었다. Szelag 등<sup>19)</sup>은 flavonoid인 quercetin-5'-sulfonic acid salt (NaQSA)는 크롬(VI)이온을 크롬(III)이온 상태로 전환하며, 크롬이온을 감소시킬 수 있으며,  $\text{CrO}_3$ 의 급성중독을 나타내는 Wistar rat에 100 mg/kg의 NaQSA를 위내에 투여하면 치사율을

감소시킬 수 있다고 보고하였다. 3-HBA와 3,4,5-THBA 및 flavonoids인 quercetin을 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> IC<sub>50</sub> 농도로 NIH3T3 섬유모세포에 농도별로 처리하고, MTT와 XTT 흡광도를 측정된 결과, CrO<sub>3</sub>, IC<sub>50</sub> 처리시 MTT 흡광도는 그림 1에서 보는 바와 같이, 3-HBA는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으나, 100.0µM 3-HBA까지 통계적으로 유의성이 없었다. 반면에 3,4,5-THBA는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으며, 25.0µM 3,4,5-THBA에서부터 통계적으로 유의한 차이가 있었다. Quercetin도 3,4,5-THBA와 유사한 흡광도를 증가시켰으며, 50.0 µM quercetin에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3-HBA 보다 3,4,5-THBA와 quercetin는 CrO<sub>3</sub>의 세포독성 효과는 통계적으로 유의하게 경감할 수 있음을 알 수 있었으나, 3,4,5-THBA와 quercetin와 독성경감효과는 차이가 거의 없었다. XTT 흡광도는 3-HBA는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 비하여 농도 의존적으로 흡광도를 증가시켰으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 3,4,5-THBA와 quercetin는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 비하여, 농도 의존적으로 XTT 흡광도를 증가시켰으며, 50.0 µM 농도에서부터 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 3-HBA 보다 3,4,5-THBA와 quercetin는 CrO<sub>3</sub>의 세포독성 효과를 감소시킬 수 있음을 알 수 있었으며 3,4,5-THBA와 quercetin의 세포독성 효과에 대한 감소의 차이는 인정할 수 없었다. 이상의 결과에서, 페놀 화합물의 고리구조에 수산기의 수는 크롬(VI)인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>처리시, MTT 흡광도는 3-HBA는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 대하여, 농도 의존적으로 흡광도를 증가 시켰으나, 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 3,4,5-THBA는 IC<sub>50</sub> 농도 처리군에 대하여 농도 의존적으로 흡광도가 증가하였으며, 25.0 µM 3,4,5-THBA에서부터 통계적으로 유의한 차이가 있었다. Quercetin도

3,4,5-THBA와 유사한 결과가 나타났다. 3-HBA 보다 3,4,5-THBA와 quercetin는 페놀 화합물의 고리구조와 수산기의 수가 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성 효과를 감소시킬 수 있는 물질임을 알 수 있었다. Szlag 등<sup>19)</sup>의 보고와 비교한다면, 3,4,5-THBA와 quercetin는 크롬(VI)의 세포독성 효과를 감소시킬 수 있는 물질로 판정할 수 있다.

LDH 활성은 세포막의 손상정도를 측정하는 정량적인 분석방법의 하나로, 배양액내로 유출된 LDH량을 비색 분석법에 의하여 측정하는 방법으로,<sup>20)</sup> 크롬(VI) IC<sub>50</sub> 농도를 처리한 군에서 대조군에 비하여, LDH 활성이 높게 나타남은 크롬(VI)이 NIH3T3 섬유모세포의 막손상을 초래하였음을 증명하고 있다.<sup>21)</sup> MTT 정량분석, XTT 정량분석 및 LDH 활성 측정을 종합해보면, 크롬이 정상 NIH3T3 섬유모세포에 대하여, 효소의 활성과 막 손상을 초래함으로써 세포에 독성을 유발한다.<sup>22)</sup> 크롬(VI)에 의한 막손상을 감소시키기 위하여, IC<sub>50</sub> 농도의 크롬(VI)을 처리한 NIH3T3 섬유모세포에 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 농도별로 동시에 처리한 결과, 1.0µM 농도에서는 LDH활성의 감소는 나타나지 않았으나, 25.0µM 이상에서는 LDH 활성이 급속히 감소하였는데, 이는 페놀산인 3-HBA와 3,4,5-THBA 및 quercetin가 막손상을 감소시켰다고 판단할 수 있다. 막손상의 감소정도는 quercetin ≥ 3,4,5-THBA > 3-HBA 순으로 나타났다. 연구 결과는 페놀 화합물의 분자구조와 결합된 수산기 수가 막손상을 일으키는 크롬(VI)에 결합하여 세포독성 효과를 감소시켰을 것으로 추측된다.<sup>23)</sup>

사람이 젊었을 때는 지질과 산화반응을 억제할 수 있는 비타민 C나 E와 같은 항산화물질이 많이 존재하기 때문에, 생리적 장애 발생이 드물지만 나이가 들어감에 따라, 항산화 물질의 감소 또는 독성물질의 생성으로 인한 생체내 항산화 방어시스템이 원활하게 작동되지

않아, 여러 가지 질환의 발생 빈도가 높아질 수 있다.<sup>24)</sup> 특히 사람은 생체내 지질과산화 반응을 억제할 수 있는 항산화 물질, 즉 tocopherol이 많이 존재하기 때문에 다른 포유류 보다 수명이 길다는 것이 밝혀졌다.<sup>25)</sup> 이에 천연 활성산소 제거물질로 알려진 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 DPPH 라디칼 소거능은 1.0 $\mu$ M 3-HBA는 41.0%, 1.0 $\mu$ M 3,4,5-THBA는 48.4%, 1.0 $\mu$ M quercetin는 53.8%로 관찰되었으며, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 DPPH 라디칼 소거능은 농도가 증가함에 따라 그 차이는 더욱 증가하였다. 즉 quercetin > 3,4,5-THBA > 3-HBA 감소순으로 항산화능이 관찰되었다. 3-HBA의 항산화 작용에 관한 연구는 거의 없는 실정인 반면, 3,4,5-THBA와 quercetin의 항산화 작용에 관한 연구는 다양하게 보고 되고 있고,<sup>26,27)</sup> 특히 3,4,5-THBA와 quercetin의 항산화 작용은 강한 것으로 보고되고 있어, 본 연구의 결과와 일치하였다.

세포의 형태학적 관찰에서도 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 NIH3T3 섬유모세포에 처리하고, 48 시간이 지나면 농도 증가에 따라, 세포수의 감소와 세포형태의 변화, 즉 방추형의 세포에서 원형으로서 변화가 관찰 되었으나, 크롬(VI)의 IC<sub>50</sub> 농도를 처리한 군에 비하여 약하게 관찰되었다. 3-HBA 처리군에서 세포의 퇴행성 변화는 가장 심하였고 3,4,5-THBA와 quercetin 처리군에서는 3-HBA 처리군에서 보다 약하였다. NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성은 크롬(VI) > 3-HBA > 3,4,5-THBA  $\geq$  quercetin 순으로 나타났다. 크롬(VI)의 세포독성 효과에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA와 quercetin가 통계적으로 유의한 차이를 나타냈는데, 이는 3,4,5-THBA와 quercetin가 3-HBA 보다 DPPH 라디칼 소거능 즉 항산화 작용이 강하게 나타난 결과로 생각된다. Szlag<sup>19)</sup>의

보고는, 본 연구의 결과를 뒷받침 할 수 있는 이론으로 판단할 수 있다. 한편 김 등<sup>28)</sup>은 flavone화합물중 A와 B고리의 hydroxy 치환기의 수에 의하여, 상대적으로 우수한 항산화 작용과 항암효과를 보여주었으며, 치환기의 종류 및 위치에 따라 현저한 potency의 변화는 관찰되지 않았다. 크롬(VI)의 독성에 대한 NIH3T3 섬유모세포주의 세포 보호효과를 측정하기 위하여, 3,4,5-THBA(IC<sub>50</sub>, 2,552.4 $\mu$ M)는<sup>18)</sup> 프라보노이드 그룹의 galocatechin의 B고리의 형태를 갖는 화합물로서, 벤젠고리에 위치한 카르복실기와 3,4,5번에 위치한 하이드록실기와 경쟁반응에 의한 카르복실기의 염기성 있는 두 자리 리간드로 형성되어, Lewis acid인 크롬(VI)과 complex가 형성되는 안정한 분자구조 착물로, 크롬(VI)의 독성을 경감시키는 크롬착물을 형성하여 세포 보호효과가 관찰되리라 생각된다. Quercetin(IC<sub>50</sub>, 1,463.9 $\mu$ M)는 B고리에 있는 3'4'-dihydroxy구조와 크롬착물을 형성할 것으로 생각되며, 이는 3'4'-dihydroxy구조의 두 자리 리간드가 카르복실기의 두 자리 리간드보다 낮은 염기성으로 크롬착물 형성의 낮은 안정도상수를 갖으리라 사료된다.<sup>29,30)</sup> 본 연구의 결과를 기초로 하여, 여러 종류의 중금속의 독성을 경감시킬 수 있는 페놀산과 프라보노이드 화합물의 분자구조와 세포의 재생활성관계에 대한 연구를 계속하여야 할 것이다.

## V. 결론

크롬(VI)의 세포독성 효과를 감소시킬 수 있는 물질을 탐색하기 위하여, 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin를 선정한 후, 정상세포인 NIH3T3 섬유모 세포에 처리하여, 세포 생존율, 세포부착 저지능, LDH활성, 라디칼 소거능 및 광학 현미경적 관찰을 실시하였다. 방향족 화합물의 고리구조에 수산기의 수는 크롬(VI)

인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포독성 효과는 MTT 분석과 XTT 분석에서 각각 고독성으로 판정되었다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 NIH3T3 섬유모세포에 대한 세포 생존율과 세포부착 저지능은 농도 의존적으로 감소하였으며, 100.0 μM이하의 농도에서는 세포에 영향을 주지 않았다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 방향족 고리구조에 수산기의 수는 크롬(VI)인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 세포독성에 대한 경감효과와 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 IC<sub>50</sub> 농도에 대한 LDH활성은 농도 의존적으로 감소시켰으며, 3,4,5-THBA와 quercetin는 통계적으로 유의한 차이가 있었으나, 3-HBA는 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 항산화능은 PG > 3,4,5-THBA ≥ quercetin > 3-HBA순서로 활성이 감소되어 관찰되었다. 방향족 화합물의 고리구조에 수산기의 수는 크롬(VI)인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 IC<sub>50</sub> 농도에 대한 3-HBA, 3,4,5-THBA 및 quercetin의 세포수와 세포형태의 변화는 농도 의존적으로 약하게 나타났으며, 3-HBA > 3,4,5-THBA ≥ quercetin순서로 활성이 감소됨을 알 수가 있었다. 연구결과에 의하면, 방향족 화합물의 벤젠고리 구조에 카르복실기와 수산기의 수와 위치는 크롬(VI)인 CrO<sub>3</sub>와 Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>의 세포독성 감소와 밀접한 관계가 있으며, quercetin의 B ring에 결합된 3'4'-dihydroxy구조의 두자리 리간드로서 크롬(VI)이온의 감소가 더욱 밀접한 관계가 있는 것으로 판단된다.

### 참고문헌

1. Dubrovskaya VA, Wetterhahn KE: Effects of Cr(VI) on the expression of the oxidative stress genes in human lung cells. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1401-1407.
2. Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M: Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2001; 20: 77-88.
3. 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) reduction and its implication to Cr(VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000; 19: 49-60.
4. Tsou TC, Lai HJ, Yang JL: Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damage by chromium(VI) reduction with ascorbate. *Chem Res.* 1999; 12: 1002-1009.
5. Yanez J, Vicente V, Alcaraz M, Castillo J, Benavente-Garcia O, Canteras M and Teruel JA: Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. *Nutr Cancer*, 49(2): 191-199, 2004.
6. Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R and Vannini V: Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells(Caco2). *Br J Cancer*, 86(10): 1645-1651, 2002.
7. Peng X, Misawa N, Harayama S: Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 1417-1427.
8. Fujisawa S, Kadoma Y: Anti- and pro-oxidant effects of oxidized quercetin,



- curcumin or curcumin-related compounds with thiols or ascorbate as measured by the induction period method. *In Vivo* 2006; 20: 39-44.
9. Nakajima A, Baba Y: Mechanism of hexavalent chromium adsorption by persimmon tannin gel. *Water Res.* 2004; 38: 2859-2864.
  10. Mosmann T: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
  11. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatus M, Mori A, Fujita Y, Yasuhara T, Yoshida T, Okuda T: Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. IV. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37: 2016-2021.
  12. Ikeda N, Fukuzume K: Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J Japan Oil Chem Soc.* 1977; 26: 343-351.
  13. 채영암, 구자옥, 서학수, 이영만: 기초생물 통계학 제 9장 직선회귀. 서울: 학문사. 1991; pp.179-198.
  14. Han DS, Choi BN, Lee JS, Choi HJ, Baek SH: The cell regenerative effect of benzoic acid derivatives against chromium trioxide-induced cytotoxicity, *J Pharm Soc Korea* 2008; 52: 361-369.
  15. Han DS, Chun JW, Jeon SW, Baek SH: The inhibitory effect of ferulic acid and related phenolic compounds against cancer cell lines. *J Pharm Soc Korea* 2005; 49: 365-369.
  16. Biedermann KA, Landolph JR: Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis, and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Res.* 1990; 50, 7835-7842.
  17. 진성우: 배양섬유모 세포에서 6가 크롬의 세포독성과 poncirin의 독성경감효과. 원광대학교 대학원 석사학위 논문 2003.
  18. Borenfreund E, Babichi H, Matin-Alcuacil N: Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assay. The neutral red(NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro* 1988; 2: 1-8.
  19. Szelag A, Magdalan J, Kopacz M, Kuzniar A, Kowalski P, Piesniewska M: Assessment of efficacy of quercetin-5'-sulfonic acid sodium salt in the treatment of acute chromium poisoning: experimental studies. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55: 1097-1103.
  20. Takahashi K, Fujita Y, Mayumi T, Hama T, Kishi T: Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem Pharm Bull.* 1987; 35: 326-334.
  21. Chung YT, Park ST, Choi MK, Kim JJ, Mun YJ, Woo WH, Han DS, Choi B K, So JT: A study on the cytotoxicity of cadmium *in vitro*. *Korean J Toxicol.* 1993; 9: 45-60.
  22. Busselberg, D., Evans, M. L., Rahmann, H. and Carpenter, D. O.: Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of aplysia neurons. *J Neurophysiol.* 1991; 65: 786-795.
  23. 박종운: 인체 치은섬유모세포에 대한 니켈 화합물의 독성과 syringic acid와 vitamin

- C의 항독성효과. 원광대학교 대학원 박사 학위 논문 2004.
24. Cardoso SM, Rego AC, Penacho N, Oliveira CR: Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochem Int.* 2004; 45: 693-698.
25. Ozdil, S., Yanardag, R., Koyuturk, M., Bolkent, S. and Arbak, S.: Protective effects of ascorbic acid, di- $\alpha$ -tocopherol acetate, and sodium selenate on ethanol-induced gastric mucosal injury of rats. *Bio Trace Elem Res.* 2004; 99: 173-190.
26. Chen J, Ou YX, Da WM, Kang JH: Coadjustment of quercetin and hydrogen peroxide: the role of ROS in the cytotoxicity of quercetin. *Pharmazie* 2004; 59: 155-158.
27. Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS: The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* 2003; 291: 386-397.
28. 김정숙, 최연희, 서지희, 이정원, 김성기, 최상운, 강종성, 김영균, 김성훈, 김영섭, 유시용: 천연 유리 Flavonoid 화합물들의 암 세포성장 저해효과. *생약학회지* 2004; 35: 164-170.
29. Baek SH, Lee H, Pae HO, Kim YO, Kwak JS, Yoo YH, Han DS: Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 5. antitoxic effects of binding of caffeic acid and cadmium on cultured rat neuroglial cells. *Kor J Toxicol.* 1995; 11: 241-246.
30. Lee JH, Lee KN, Lee CW, Chun HJ, You IS, Lim JA, Baek SH: The inhibitory effects of quercitrin from *Houttuynia cordata* against cadmium induced cytotoxicity(VII). *J Kor Chem Soc.* 2003; 47: 175-178.