ORIGINAL ARTICLE
Korean J Clin Lab Sci. 2015, 47(4):175-181
http://dx.doi.org/10.15324/kjcls.2015.47.4.175
pISSN 1738-3544 eISSN 2288-1662

KJCLS

Effect of Smilax China L. Extract on Cultured NIH3T3 Fibroblasts Damaged by Mercury as Allergic Contact Dermatitis Inducer

Sun-Hee Han[1] and Seung-Joo Jekal[2]

Departments of [1]Nursing, [2]Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 54538, Korea

알러지성 접촉피부염 유발제인 수은으로 손상된 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 청미래덩굴 추출물의 효과

한선희[1], 제갈승주[2]

원광보건대학교 [1]간호학과, [2]임상병리학과

In order to examine the effect of Smilax china L. (SC) extract on the cytotoxicity of methymercuric chloride (MMC), allergic contact dermatitis, The cytotoxicity of MMC was assessed after cultured NIH3T3 fibroblasts were treated with various concentrations of MMC for 72 hours. And also, the following results were obtained by measuring the antioxidative effect of SC extract on the cytotoxicity of MMC. In this study, MMC remarkably decreased the cell viability of NIH3T3 fibroblasts in a dose-dependent manner, and MMC was seen to be highly-toxic below 100 uM of XTT50 value. In addition, the toxicity of MMC was involved in oxidative stress via a blockage of MMC-induced cytotoxicity by vit. E as antioxidant. In the protective effect of SC extract on MMC-induced cytotoxicity, SC extract defended the cytotoxicity of MMC by a significant increase of cell viability which was decreased by MMC-induced cytotoxicity. It also showed antioxidative effects such as electron donating ability (EDA), superoxide dismutase (SOD)-like activity (SLA) and the lipid peroxidation activity (LPA). From these results, the natural component as SC extract may be a putative resource as the antioxidative agent for the treatment of inflammatory skin disease associated with the oxidative stress.

Keywords: Allergic contact dermatitis, Antioxidative effect, Inflammatory skin disease

Corresponding author: Seung-Joo Jekal
Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 54538, Korea
Tel: 82-63-840-1210
E-mail: sjjei@wu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2015 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: November 1, 2015
Revised 1st: November 17, 2015
Revised 2nd: November 25, 2015
Accepted: November 26, 2015

서 론

수은은 돌연변이원인인 동시에 알레르기성 접촉피부염 유발제로 알려져 있으나 일상생활에 필요한 온도계를 비롯하여 수은전지, 치아 아말감 및 자동차부품과 같은 산업부문에 주된 원료로 사용되고 있으며, 미백이나 살균을 목적으로 화장품부문에서도 승홍($HgCl_2$)이란 이름으로 널리 사용되어 왔다(Son 등, 2013). 수은화합물은 승홍이나 뇌홍과 같은 무기수은화합물과 페닐수은이나 알킬수은 및 메틸수은과 같은 유기수은화합물로 나뉘는데 유기수은화합물은 무기수은화합물 보다 독성이 훨씬 강하기 때문에 취급 시 특별한 주의를 요한다(Greener와 Kochen, 1983). 1953년 일본의 미나마타만의 수은중독이나 1972년 이라크의 알킬수은농약 오염에 의한 중독의 사건을 계기로 독성이 강한 수은중독에 의한 부작용은 관심의 대상이 되었다(Tsubaki와 Takahashi, 1986). 그럼에

도 불구하고 아직까지 이의 중독현상에 대한 자세한 기전은 물론, 효과적인 치료방법이나 치료약제가 매우 부족한 실정이다(Kim 등, 2010). 수은에 대한 한 연구에서 수은을 포함한 크롬이나 구리와 같은 몇몇 중금속류는 이들의 붕괴 시 자유라디칼을 생성한다는 것이 제시되면서 수은독성이 산화적 손상과 관련이 있다는 것이 보고된 바 있다(Gage, 1975). 실제로 수은으로 손상된 배양 세포에 항산화제를 투여한 결과 수은의 독성이 경감되었다고 보고된 바 있다(Park 등, 1996). 현재, 수은중독에 대한 기전을 산화적 손상(oxidative stress) 측면에서 접근하는 연구가 진행되고 있다. 자유라디칼에 의한 산화적 손상은 세포내 항산화 효소의 활성저해를 비롯한 세포내 칼슘과 연관된 N-methyl-D-aspartate 수용체의 활성, 흥분성 아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비와 같은 현상을 초래하여 세포를 퇴화 내지는 고사(apoptosis)시킨다고 알려져 있다(Park 등, 1996).

최근, 허브를 비롯한 한약제나 약용식물 중에는 항산화를 비롯한 항암, 항염, 항독 등에 유효한 성분들을 다량 포함하고 있다는 것이 밝혀지면서 이들 성분에 대한 생리활성을 규명하려는 연구가 진행되고 있다(Li 등, 2007; Rim 등, 2010). 그 결과 페놀화합물(phenolic compound)을 비롯한 이소프레노이드(isoprenoid) 및 배당체(glycoside)와 같은 물질들이 항균이나 항독, 항산화와 같은 유효한 활성을 나타낸다고 보고되었다(De-Heredia 등, 2001; Kwon, 2015).

식물 중 청미래덩굴(*Smilax china* L., SC)은 우리나라 전국에 서식하고 있는 낙엽활엽수로서 백합과(Liliaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 식물이다. 청미래덩굴의 꽃은 5월경에 개화하는데 9~10월경에는 붉은색의 열매를 맺는다(Li 등, 2007). 생약명은 토복령 또는 우계라고도 부르며, 주로 뿌리나 줄기를 약제로 많이 사용하여 왔으며, 관절염, 임파선염, 독중독과 같은 질환에 유효한 효과가 있다(Pyo 등, 2013). 특히 청미래덩굴의 잎은 발계엽이라 하여 중금속 독성에 대한 예방에 효과가 있으며, 줄기와 열매도 피부질환과 같은 병변에도 효과가 있어 전초 모두가 약제로서 사용 가능하다(Oh, 2011). 청미래덩굴에는 사포닌(saponin)을 비롯한 스밀라신(smilacin), 파릴린(parillin), 리놀레산(linoleic acid) 및 올레인산(oleic acid)과 같은 다양한 성분들이 함유되어 있으며, 이들 성분 중 사포닌이나 리놀레산 및 올레인산은 항산화 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있다(Chang, 2003).

최근, 세포 배양법이 발달함에 따라 배양 세포를 이용하여 각종 질환의 병인적 기전규명을 비롯하여 신물질의 효능이나 또는 독성물질의 독성정도를 측정하는 도구로 자리잡고 있다. 세포 배양은 동질의 재료를 쉽게 다량 확보할 수 있으며, 동일한 실험을 여러번 반복할 수 있어 재현성이 뛰어나다는 장점을 가지고 있다(Song 등, 2002).

따라서 본 연구는 알러지성 접촉피부염(allergic contact dermatitis)과 같은 염증성 피부질환에 치료적 효과를 가지고 있는 천연소재의 탐색 일환으로, 청미래덩굴 추출물을 재료로 배양 NIH3T3 섬유모세포에 알러지성 접촉피부염 유발제인 메틸수은(methymercuric chloride, MMC)을 처리한 후 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

NIH3T3 섬유모세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양 받아 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로는 methymercuric chloride (MMC)를 비롯한 vitamin E (vit. E), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), ethanol, pyrogallol, ammonium thiocyanate, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), minimum essential medium (MEM), 및 XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt)는 Sigma사(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하였다. MMC의 제조는 FBS가 없는 배양액을 사용하여 최종 농도가 각각 20 uM, 50 uM, 80 uM 및 100 uM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 직전 필요한 양을 배양액에 직접 첨가하여 사용하거나 또는 필요농도로 희석하여 사용하였다. XTT는 실험 전날 PBS를 이용하여 50 ug/mL의 저장액을 제조한 후 사용하였다.

3. 청미래덩굴(*Smilax china* L., SC) 추출

청미래덩굴은 8월경 전라북도 익산시 야산부근에서 채취하여 시에 위치하고 있는 대학부설 생명자원과학연구소에서 확인 동정 후 사용하였다. 채집한 청미래덩굴 전초는 깨끗이 세척 후 통풍이 잘되는 곳에서 말린 다음 일정 길이로 잘라 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 시료추출은 시료 82.6 g을 파쇄한 다음 열수추출을 위해 시료의 3배 정도의 증류수와 함께 1,000 mL의 환저플라스크에 넣고 2시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 5회 반복 추출한 다음 여과하여 3,000 rpm에서 30분 동안 원침시켰다. 원침 후 진공농축기에서 농축감압시킨 다음 5.1 g의 시료를 얻었다. 이 때 수율은 6.2%로 나타났다.

4. 세포 배양

NIH3T3 섬유모세포의 배양은 Han 등(2006)의 방법에 따라 배양용기에 부착된 세포를 효소해리술에 의하여 분리하였다. 분리된 세포들은 원침 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣어 1×10^5 cells/well의 농도로 조절한 후 96-well plate에 분주하였다. 분주된 세포들은 72시간 동안 36°C, 5% CO_2로 조절된 항온기 내에서 배양하였다.

5. MMC 처리

XTT_{50}값의 MMC를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 항산화능이 확인된 vit. E의 농도 중 연구자가 임의대로 선택한 30 uM과 40 uM의 농도가 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율을 양성대조군인 MMC의 처리군과 비교 조사하였다.

6. Vit. E 처리

Vit. E의 항산화능을 측정하기 위하여 활성산소의 일종인 20 mU/mL glucose oxidase (GO)를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 vit. E가 각각 20~40 uM의 농도로 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

7. MMC에 대한 vit. E 영향

XTT_{50}값의 MMC를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 항산화능이 확인된 vit. E의 농도 중 연구자가 임의대로 선택한 30 uM과 40 uM의 농도가 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율을 양성대조군인 MMC의 처리군과 비교 조사하였다.

8. SC 추출물 처리

MMC에 대한 청미래덩굴 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 MMC XTT_{50}값의 MMC를 처리하기 2시간 전에 70 ug/mL와 90 ug/mL의 추출물이 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율을 양성대조군인 MMC의 처리군과 비교 조사하였다.

9. 세포생존율 분석

세포생존율의 분석은 Borenfreund와 Puerner (1984)의 방법에 따랐다. 즉, 배양 세포에 약제나 추출물을 농도별로 처리한 다음 실험 당일 제조한 XTT_{50} ug/mL를 well당 100 ul씩 넣고 36°C로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 넣어 일정시간 실온에서 정치한 다음 Variskan flash ELISA reader (Thermo Scientific Co., Vantaa, Finland)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. XTT_{50}값의 산출은 회귀직선식에 의하여 산정하였다.

10. 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)의 측정은 Blois (1958)의 방법에 따라, 메탄올시료에 0.3 mM DPPH 메탄올용액 100 uL를 넣고 실온에서 30분간 처리하였다. 처리 완료 후 ELISA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. EDA는 시료첨가군과 시료무첨가군 간의 차이를 시료무첨가군에 의한 백분율로 나타냈으며, vit. E의 활성을 비교군으로 사용하기 위하여 vit. E의 항산화능 측정에서 활성이 50%를 넘은 농도를 선정하여 사전실험을 한 결과 vit. 35 uM 활성이 50%를 넘은 농도를 선택하여 비교 농도로 하였다.

11. SOD-유사활성 측정

SOD-유사활성(SOD-like activity)의 측정은 Marklund와 Marklund (1974)의 방법에 따랐다. 즉, 시료에 Tris-HCl buffer와 10 mM pyrogallol을 넣고 25°C에서 10분 동안 처리하였다. 처리 후 HCl로 반응시킨 다음 ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, vit. E의 활성을 비교군으로 하였으며, 활성은 시료첨가군과 시료무첨가군의 차이에 의한 백분율로 나타냈으며, vit. E의 활성을 비교군으로 사용하기 위하여 vit. E의 항산화능 측정에서 활성이 50%를 넘은 농도를 선정하여 사전실험을 한 결과 활성이 50%를 넘은 농도를 선택하여 비교 농도로 하였다.

12. 지질과산화 측정

지질과산화능(lipid peroxidation activity, LPA)는 Kikuzaki와 Nakatani (1993)의 방법에 따라, 에탄올에 3.9 mL의 시료를 넣어 혼합한 액에 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid와 0.05 M PBS (pH 7.0)용액 12.1 mL를 첨가한 후 40°C에서 24시간 동안 처리하였다. 처리 완료 후 30% ammonium thyocyanate로 처리하고 0.02 M ferrous chloride 0.1 mL를 가한 후 실온에서 반응시켰다. 반응 완료 후 ELISA reader로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. LPA는 대조군에 대한 시료첨가군의 차이를 백분율로 표시하였다.

13. 통계 처리

자료분석은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago. IL. USA)에 의하여 행하였으며 mean±SD로 표시하였다. 또한, 자료에 대한 유의성 검정은 independent t-test에 의하였으며, 통계처리에 대한 유의수준은 p값이 0.05 미만인 경우로 설정하였다.

결 과

1. MMC의 독성 측정

MMC의 세포독성을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 MMC가 20~40 uM 농도로 각각 포함된 배양액에서 72시간 동안 처리한 결과, 대조군에 비해 MMC의 농도가 증가할수록 세포생존율이 유의하게 감소되었으며(p<0.001), 이 때 XTT_{50}값은 33.7 uM의 처리에서 나타났다(Table 1).

2. Vit. E의 항산화능 측정

세포생존율은 대조군인 100% (0.226±0.05)에 비하여 20 mU/mL GO만을 처리한 경우 35.4% (0.080±0.01)로 나타났으나, 20 uM 농도의 vit. E의 처리에서는 52.2% (0.118±0.03)로 GO만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 또한, vit. E를 25 uM과 30 uM를 처리한 결과 세포생존율이 각각 61.5% (0.139±0.02)와 70.4% (0.159±0.06)로 나타났으며, 35 uM과 40 uM의 처리에서는 각각 81.9% (0.185±0.04)와 89.4% (0.202±0.07)로 나타났다. 따라서, GO만의 처리에 비하여 모두 유의한 세포생존율의 증가를 보였다(p<0.001) (Table 2).

3. MMC에 대한 vit. E의 영향

MMC의 세포독성에 산화적 손상이 관여하는지를 알아보기 위하여 XTT_{50}값의 MMC 33.7 uM를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 항산화제인 vit. E를 30 uM과 40 uM의 농도로 세포에 처리하였다. 그 결과 XTT_{50}값의 MMC만을 처리한 경우 세포생존율이 대조군인 100% (0.214±0.04)에 비하여 46.3% (0.099±0.01)로 나타난 반면, 30 uM와 40 uM 농도의 vit. E 처리에서는 각각 69.6% (0.149±0.05) (p<0.01)와 88.3% (0.189±0.02) (p<0.001)로 나타나 MMC만의 처리에 비하여 모두 유의하게 증가하였다(Table 3).

4. MMC의 독성에 대한 SC 추출물의 영향

MMC의 세포독성에 대한 SC 추출물의 영향을 조사하기 위하여 XTT_{50}값의 MMC 33.7 uM를 배양 NIH3T3 섬유모세포에 처리하기 전에 70 ug/mL와 90 ug/mL의 SC 추출물을 전처리한 결과, 대조군인 100% (0.238±0.05)에 비하여 MMC만의 처리에서 세포생존율이 52.5% (0.125±0.03)로 나타났으나 70 ug/mL SC 추출물 처리에서는 62.2% (0.148±0.01)로 나타나 MMC만의 처리에 비하여 다소 증가하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 그러나, 90 ug/mL SC 추출물 처리에서는 세포생존율이 71.8% (0.171±0.04)로 나타나 MMC만의 처리보다 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(p<0.01) (Table 4).

5. EDA 측정

EDA를 측정하기 위하여 70 ug/mL와 90 ug/mL 농도의 SC 추출물 시료를 분석한 결과 70 ug/mL SC 추출물 시료의 처리에서 EDA 활성이 32.6%로 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(p<0.01). 또한, 90 ug/mL SC 추출물 처리에서도 53.6%로 나타나 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가를 보였다(p<0.001).

Table 1. The cytotoxicity of MMC on cultured NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Incubation	XTT assay (450 nm)	
Concentrations of MMC (uM)	Mean±SD	(% of control)
Control	0.243±0.08	100
20	0.195±0.06	80.2**
30	0.142±0.05	58.4***
40	0.088±0.09	36.2***
33.7 (XTT_{50})	0.122±0.03	50.2***

Table 2. The antioxidative effect of vit. E on glucose oxidase

Incubation	XTT assay (450 nm)	
Concentrations of vit. E (uM)	Mean±SD	(% of control)
Control	0.226±0.05	100
20 mU/ml GO	0.080±0.01	35.4
20	0.118±0.03	52.2*
25	0.139±0.02	61.5***
30	0.159±0.06	70.4***
35	0.185±0.04	81.9***
40	0.202±0.07	89.4***

Table 3. The effect of vit. E on the cytotoxicity induced by MMC in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation	XTT assay (450 nm)	
Concentrations of vit. E (uM)	Mean±SD	(% of control)
Control	0.214±0.04	100
MMC (XTT_{50})	0.099±0.01	46.3
30	0.149±0.05	69.6**
40	0.189±0.02	88.3***

Table 4. The protective effect of *Smilax china* L. (SC) extract on MMC-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts

Incubation	XTT assay (450 nm)	
Concent. of SC extr. (ug/mL)	Mean±SD	(% of control)
Control	0.238±0.05	100
MMC (XTT_{50})	0.125±0.03	52.5
70	0.148±0.01	62.2
90	0.171±0.04	71.8**

특히, 90 ug/mL의 SC 추출물이 갖는 EDA 활성은 35 uM vit. E의 EDA 활성(74.2%)보다 70% 이상인 것으로 나타났다(Table 5).

6. SOD-유사활성 측정

MMC에 대한 SC 추출물의 SOD-유사활성에 대한 영향을 조사하기 위하여 70 ug/mL와 90 ug/mL의 SC 추출물 시료를 분석한 결과, 70 ug/mL SC 추출물 시료의 SOD-유사활성은 대조군에 비하여 21.4%로 유의하게 증가하였다(p<0.01). 또한 90 ug/mL SC 추출물 시료의 처리에서도 45.9%로 나타나 대조군에 비하여 유의한 활성 증가를 보였다(p<0.01). 특히, 90 ug/mL의 추출물 시료는 비교군인 20 uM vit. E의 SOD-유사활성인 53.5% (p<0.001)에 비해 85% 이상의 활성을 나타냈다(Table 6).

7. LPA 측정

MMC에 대한 SC 추출물의 LPA에 대한 영향을 조사하기 위하여 70 ug/mL와 90 ug/mL의 SC 추출물 시료 각각을 분석한 결과 70 ug/mL SC 추출물 시료의 LPA는 대조군인 100%에 비하여 83.1% 나타나 유의한 감소를 보였고(p<0.01), 90 ug/mL SC 추출물 시료의 처리에서는 76.8%로 나타나 대조군에 비하여 유의한 활성 감소를 보였다(p<0.01) (Table 6). 따라서 LPA는 70 ug/mL와 90 ug/mL 농도에서 각각 16.9%와 23.2%로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다(p<0.01) (Table 7).

고 찰

알러지성 접촉피부염 유발제인 MMC가 배양 NIH3T3 섬유모세포에 미치는 독성효과를 SC 추출물이 갖는 보호효과를 확인하기 위하여 실시된 연구이다.

배양 세포인 NIH3T3 섬유모세포를 MMC를 포함한 배양액에서 72시간동안 배양한 결과, MMC는 대조군에 비하여 농도 의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며(p<0.001), 이 때 XTT_{50} 값은 33.7 uM에서 나타나 MMC가 배양 NIH3T3 섬유모세포에 세포독성을 가지고 있음을 말해주고 있다. 또한 XTT_{50}값이 100 uM 이하인 33.7 uM에서 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner (1984)에 의한 독성판정기준에 의하여 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 이들은 독성판정기준을 XTT_{50}값이나 MTT_{50}값이 100 uM 이하인 경우를 고독성(highly-toxic)으로, 100~1,000 uM인 경우를 중간독성(mid-toxic)으로, 1,000~2,000 uM인 경우를 저독성(lower-toxic)으로, 2,000 uM 이상인 경우를 무독성(non-toxic)으로 각각 판정하였다. 이 같은 본 연구 결과는 Jung 등(2008)에 의한 MMC의 배양 심장근육세포에 대한 독성보고나, Kim 등(2010)에 의한 MMC의 배양 인체섬유모세포에 대한 독성보고와도 일치하였다. 이와 같이 MMC가 배양 NIH3T3 섬유모세포에 독성을 보인 것은 MMC에 의한 세포내 DNA의 손상이나, 아미노산 및 단백질합성저해와 같은 가능성도 배제할 수는 없지만(Olson과 Massaro, 1977), 그 보다는 MMC가 메틸라디칼과 같은 자유라디칼을 생성함으로서 산화적 손상에 의하여 세포생존율의 감소를 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다(Park 등, 1996). 따라서 본 연구에서는 MMC에 의한 독성이 산화적 손상인지를 확인하기 위하여 항산화의 일종인 vit. E를 적용하였다. 그러기 위해 먼저 활성산소의 일종인 GO에 대한 vit. E의 항산화능을 분석하였다. Vit. E 20~40 uM의 농도를 처리한 결과, 20uM/mL의 GO만을 처리한 것보다 모두 통계적으로 유의한 세포생존율의 증가를 나타내어 vit. E의 높은 항산화능을 확인하였다. Vit. E는 ascorbic acid와 같이 강력한 항산화제로서 식품의 불포화 지방산, 인지질, vit. A의 산화방지 및 세포노화를 막아준다고 알려져 있다(Yamamoto 등, 1983). 따라서, MMC에 대한 vit. E의 영향을 조사하기 위하여 XTT_{50}값의 MMC를 배양 세포에 처리하기 전 항산화제인 vit. E를 배양 세포에 처리한 결과 MMC만을 처리한 경우에 비하여 30 uM (p<0.01)과 40 uM (p<0.001)의 vit. E의 처리에서는 각각 유의한

Table 6. SOD-like activity of *Smilax china* L. (SC) extract determined at a wavelength of 420 nm

Incubation	SOD-like activity (420 nm)	
Experimental group	Mean±SD	(% of control)
20 uM vit. E	0.244±0.04	53.5***
70 ug/mL SC extract	0.193±0.05	21.4**
90 ug/mL SC extract	0.232±0.02	45.9**

Table 5. Electron donating ability (EDA) of *Smilax china* L. (SC) extract determined at a wavelength of 517 nm

Incubation	Electron donating ability (517 nm)	
Experimental group	Mean±SD	(% of control)
35 uM vit. E	0.581±0.03	74.2***
70 ug/mL SC extract	1.517±0.12	32.6**
90 ug/mL SC extract	1.044±0.08	53.6***

Table 7. lipid peroxidation activity of *Smilax china* L. (SC) extract determined at a wavelength of 500 nm

Incubation	Lipid peroxidation activity (500 nm)	
Concent. of SC extr. (ug/mL)	Mean±SD	(% of control)
Control	0.237±0.02	100
70	0.197±0.07	83.1**
90	0.182±0.05	76.8**

세포생존율의 증가를 보였다. 본 실험의 결과에서 항산화제인 vit. E가 MMC의 독성을 방어한 것은 MMC가 산화적 손상과 관련이 있다는 것을 증명하고 있으며, 이는 Park 등(2000)에 의한 vit. E의 MMC 독성감소에 대한 보고나 Son 등(2013)에 의한 MMC 독성에 대한 vit. E의 방어효과에 대한 보고와도 일치하였다.

MMC의 독성에 대한 SC 추출물의 영향을 조사하기 위하여 XTT_{50}값의 MMC를 배양 세포에 처리하기 전에 70 ug/mL와 90 ug/mL의 SC 추출물을 전 처리한 결과, 70 ug/mL와 90 ug/mL SC 추출물 처리에서 세포생존율이 각각 62.2% (0.148±0.01)와 71.8% (0.171±0.04)로 나타났으며, 특히 90 ug/mL의 처리에서는 MMC만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다($p<0.01$). 본 연구 결과는 SC 추출물이 MMC의 세포독성을 방어한 것으로서, Oh (2011)가 보고한 SC 추출물이 MMC와 같은 접촉피부염 유발제인 크롬의 세포독성을 방어하였다는 연구 결과와도 상통하였다. 위에서처럼 MMC에 대한 SC 추출물의 방어효과는 Song 등(2002)의 보고에 따라 MMC에 의한 세포내 단백질합성과 관련된 내형질세망(endoplasmic reticulum)의 기능저해나, DNA polymerase와 같은 전구물질의 저해와 같은 현상을 방어한 이유도 있겠지만, 그 보다는 SC 추출물의 항산화 작용이 MMC의 산화적 손상을 방어한 결과로 판단된다. 따라서 SC 추출물에 대한 항산화능의 조사를 위하여 EDA를 비롯한 SOD-유사활성 및 LPA를 분석하였다. 그 결과 SC 추출물은 EDA를 비롯하여, SOD-유사활성 및 LPA를 나타냄으로서 항산화 효과가 있음을 증명하였다. 특히, 90 ug/mL 추출물 시료처리에 있어서 EDA와 SOD-유사활성은 비교군인 vit. E 활성의 70~80% 이상의 활성을 보임으로서 vit. E와 같은 항산화능을 증명하였으며, 70 ug/mL와 90 ug/mL 농도에서 지질의 과산화를 감소시켰다. 이 같은 결과는 Seo 등(2012)이 SC 추출물에서 항산화능을 보고한 연구 결과와 Pyo 등(2013)이 SC 추출물이 LDH (lactate dehydrogenase)의 활성을 억제하였다는 연구 결과와 유사하였다. SOD-유사활성은 세포내 항산화 효소의 하나인 SOD와 같은 기능 정도를 측정하는 것으로서 이는 SC 추출물이 SOD 효소처럼 자유라디칼의 일종인 과산화수소(H_2O_2)를 물로 변환하는 유사기능을 가지고 있음을 제시하고 있다. SC 추출물의 항산화능은 추출물 성분 중에 saponin을 비롯한 리놀렌산(linoleic acid)이나 올레인산(oleic acid)과 같은 항산화 작용이 강한 성분들에 의한 것으로 생각되며, Li 등(2007)이 SC 추출물에서 강력한 항산화 성분의 하나인 플라보노이드(flavonoid) 물질을 분리하였다는 연구 보고가 이를 더욱 뒷받침해 주고 있다. 특히, saponin은 인삼의 주성분으로서 항산화능을 비롯한, 항암, 항염과 같은 유효한 약리활성을 나타낸다고 알려져 있다(Wang 등, 2006). 그러나, SC 추출물과 같은 천연성분에 대한 항산화 측면에서의 분석은 각 성분의 생리활성은 물론, 세포내 산화적 손상과 관련된 수용체 및 신호전달계와 같은 다양한 측면에서 체계적으로 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

알러지성 접촉피부염 유발제인 수은의 독성에 대한 청미래덩굴(Smilax china L.) 추출물의 영향을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 여러 농도의 메틸수은(methylmercuric chloride, MMC)을 72시간 동안 처리한 후 이들의 세포독성을 조사하였다. 또한, MMC의 독성에 대한 청미래덩굴 추출물의 보호효과를 항산화 측면에서 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. MMC는 농도 의존적으로 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율을 유의하게 감소하였으며 XTT_{50}값이 100 uM 이하로서 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, MMC의 독성이 항산화제인 vit. E에 의하여 방어됨으로서 MMC의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있는 것으로 나타났다. 한편, MMC의 세포독성에 대한 청미래덩굴 추출물의 방어효과에 있어서 청미래덩굴 추출물은 MMC에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 MMC의 독성을 방어하였다. 또한, 청미래덩굴 추출물은 전자공여능(EDA)을 비롯한 SOD-유사 활성(SLA) 및 지질과산화능(LPA)와 같은 항산화 효과를 나타냈다. 이상의 결과로부터 청미래덩굴과 같은 천연 성분은 산화적 손상과 관련된 염증성 피부질환의 치료를 위한 항산화제로서의 미래 가능한 천연소재라고 생각된다.

Acknowledgements: None
Funding: None
Conflict of interest: None

References

1. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958,26:1199-1200.
2. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tissue Cult Meth*. 1984,9:7-9.
3. Chang JK. The wild plants for health of human body. 2rd ed. 2003, p551. Nexusbook, Seoul.
4. De-Heredia JB, Torregrosa J, Dominguez JR, Peres JA. Kinetic model for phenolic compoud oxidation by fenton's reagent. *Chemosphere*. 2001,45:85-90.
5. Gage JC. Mehnism for the biodegradation of organic mercury compounds: The actions of ascorbate and of soluble proteins. *Toxicol App Pharmacol*. 1975,32:225-238.
6. Greener Y, Kochen JA. Methylmercuric toxicity in chick

embryo. *Teratol*. 1983,28:23-31.
7. Han DS, Jeon SW, Yang SJ, Choi BN, Suk SH, Hong GY, *et al*. The effect of poncirin on hexavalent chromoum in NIH3T3 fibroblasts in vitro. *Kor J Herbol*. 2006,21:101-107.
8. Jung JY, Choi YS, Lee KC. Effect of gallic acid on the cytotoxicity of mercury. *J Life Sci & Nat Res*. 2008,30:88-95.
9. Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci*. 1993,58:1410-1420.
10. Kim MS, Seo YM, Park ST. Antioxidant effect of kaempferol on cultured skin fibroblasts damaged by methylmercuric chloride. *J Kor People Plans Environ*. 2010,13:23-29.
11. Kwon PS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy using blue light emitting diode with photofrin and radachlorin against propionibacterium acnes. *Kor J Clin Lab Sci*. 2015, 47:6-10.
12. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, *et al*. A flavonoid glycoside isolated from Smilax china L. rhizome in vitro anticancer cell lines. *J Ethnophamacol*. 2007,113:115-124.
13. Marklund S, Marklund G. Involement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974,47:468-474.
14. Oh YY. Protective effect of Smilax china L. extract on the cytotoxicity of chromium, environnmental pollutant. *J Kor People Plans Environ*. 2011,14:29-34.
15. Olson FC, Massaro EJ. Effects of methymercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and plate closure. *Teratol*. 1977,16:187-194.
16. Park ST, Choi MK, Lee KC, Cho KH, Suk SH, Seo EA, *et al*. Study on the effect of vitamin E on methylmercury in cultured spinal motor neurons. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*. 2000,14:107-112.
17. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidant and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol*. 1996, 17:37-46.
18. Pyo AJ, Yoon MY, Yang HO. Cytotoxicity and protective effect of Smilax china L. extract on melanogenesis by FeSO4, an autooxidant of melanin formation. *Kor J Aesthet & Cosmetol*. 2013,11:77-83.
19. Rim YS, Song WS, Seo YM, Park ST, Kim SM. A study on the cytotoxic effects of several plant extracts on the cell viability and cell adhesion activity in cultured NIH3T3 fibroblast. *Kor J Clin Lab Sci*. 2010,42:116-124.
20. Seo HK, Lee JH, Kim HS, Lee CK, Lee SC. Antioxidant and antimicrobial activities of Smilax china L. leaf extract. *Food Sci Biotech*. 2012,21:1723-1727.
21. Son YW, Oh SK, Choi YR, Park SH, Seo YM, Lee HJ, *et al*. Effects of Chelidonium majus extract on mercury-induced cytotoxicity and melanogenesis. *J Invest Cosmetol*. 2013,9:229-235.
22. Song HJ, Ha DH, Yoo KS, Park ST, Lee KC, Seo BI. Effect of Sophorae radix on methylmercury-induced myotoxicity in cultured myocardial cells. *Kor J Herbol*. 2002,17:119-124.
23. Tsubaki T, Takahashi H. Recent advances in Minamata disease studies. 2rd ed. 1986, p142-146. Kodansa, Tokyo.
24. Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in celllular damage caused by cerebral ischemia and protective effect of alpa-tocopherol administration. *Stroke*. 1983,14:977-982.
25. Wang CZ, Wu JA, McEntee E, Yuan CS. Saponins composition in American ginseng leaf and berry assayed by high-performance liquid chromatography. *J Argic Food Chemetol*. 2006,54:2261-2266.