

Antioxidative Effects of *Cornis fructus* Extract on Chromium Trioxide Toxicity

Young-Mi Seo

Department of Nursing, College of Medicine, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

Chromium Trioxide의 독성에 대한 산수유 추출물의 항산화 효과

서영미

원광보건대학교 간호학과

This study examined the antioxidative effects of *Cornis fructus* (CF) extract on cultured C6 glioma cells. For this purpose, cytotoxicity analysis of chromium trioxide (CrO_3) was performed and the protective effects of the CF extract on CrO_3 -induced cytotoxicity was examined after the C6 glioma cells were cultured for 48 hours. The antioxidative effects, such as electron donating activity (EDA) and lactate dehydrogenase (LDH) activity were also analyzed. In this study, CrO_3 decreased the cell viability in a dose dependent manner. The XTT_{50} value was determined to be $33 \mu\text{M}$ after the cells were treated for 48 hours at a concentrations of $20 \sim 40 \mu\text{M}$ CrO_3 . The catalase (CAT) antioxidant increased significantly the cell viability that had been decreased by CrO_3 -induced cytotoxicity. Regarding the protective effect of the CF extract, the cell viability of the CF extract was increased significantly compared to that of CrO_3 only. In addition, the CF extract showed antioxidative effects, such as EDA and an inhibitory effect on the LDH activity. These findings suggest that the cytotoxicity of CrO_3 is correlated with oxidative stress, and the CF extract effectively prevented CrO_3 -induced cytotoxicity through the antioxidative effects. In conclusion, natural products, such as the CF extract may be a useful therapeutic agent for the prevention or treatment of toxicity induced by heavy metals via oxidative stress.

Key words: Antioxidative effect, Cytotoxicity, Natural products, Oxidative stress

Corresponding author: Young-Mi Seo
Department of Nursing, College of Medicine,
Wonkwang Health Science University, 514
Iksan-daero, Iksan 54538, Korea
Tel: 82-63-840-1314
Fax: 82-63-840-1319
E-mail: dudn0408@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 © 2018 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: May 15, 2018
Revised: May 27, 2018
Accepted: May 28, 2018

서론

크롬을 비롯한 납, 수은과 같은 중금속류는 인체에 노출되면, 배출이 어려울 뿐만 아니라 체내에 축적된 후에는 각 기관의 혈관을 통해 여러 장기에 손상을 초래하게 된다[1]. 크롬은 아말감을 비롯한 시멘트제조나 도금, 내화벽돌 및 화학비료제조 등 여러 산업 공정에 널리 사용되어 왔다[2]. 그러나 독성이 강해 인체가 갖은 노출에 폭로될 경우 심각한 질환을 일으키는 것으로 잘

알려져 있다[1]. 특히, 뇌조직과 같이 혈액-뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)이 잘 형성된 경우는 크롬이나 수은 및 카드뮴과 같은 중금속이 직접 뇌실질을 통과하기 어렵지만, 이들이 분진이나 흠(fume)에 의해 피부를 통해 체내로 들어온 경우, 혈액을 통해 허파를 비롯한 위, 신장 및 뇌조직 등 다양한 장기에 침투함으로써 각종 질환을 유발한다는 것은 이미 잘 알려져 있다[3]. 특히, 6가 크롬은 3가 크롬과는 달리 생체막을 쉽게 통과할 뿐만 아니라 독성이 매우 강하기 때문에 발암성과 돌연변이

성이 높아 취급 시 각별한 주의가 요구된다[4]. 그러나, 현재 구강 또는 호흡을 통한 크롬 중독 시 환원제인 vitamin C의 투여나 기관지확장제와 같은 처치 외에는 특별한 치료방법이 없는 실정이다[4]. 최근, 크롬의 독성이 산화적 손상(oxidative stress)과 직접적인 연관성이 있다고 제시되면서 크롬 중독에 의한 치료를 항산화 측면에서 접근하려는 시도가 이루어지고 있다[5]. 그러나 이에 대한 연구는 초기단계일 뿐만 아니라 연구가 많이 이루어지지 않아 매우 미흡한 상태이다[2]. 특히, 산화적 손상은 세포내 핵 전사 인자(nuclear transcription factor)인 NF- κ B(nuclear factor κ B)를 활성화시켜 세포 고사인자(apoptosis factor)를 활성화 시키는 동시에[6], 세포막의 N-methyl-D aspartate (NMDA) 수용체를 과 활성화시킨다[7]. 또한 막지질의 과산화[8] 및 활성질소(reactive nitrogen species, NOS)와 활성산소(reactive oxygen species, ROS)간의 상호작용에 의한 peroxynitrite라는 강력한 독성물질을 형성함으로써 세포를 퇴화 내지는 사멸에 이르게 한다[9]. 최근, 각종 식물에는 항산화제를 비롯한 항암, 항독, 항염 등에 유용한 다양한 생리활성성분들이 많이 함유되어 있다고 알려지고 있다[10]. 특히, 식물 중 산수유(*Cornis fructus*, CF)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽관목으로 우리나라 전역에서 자생하고 있다. 산수유는 3~4월에 잎보다 황색꽃이 먼저 피는데 8~10월경에는 붉게 열매를 맺으며 이의 생약명으로는 육조나 석조라고도 부른다[11]. 산수유는 cornin을 비롯한 loganin, linolic acid, saponin, gallic acid와 같은 성분들을 함유하고 있다. 특히, linoleic acid나 gallic acid와 같은 성분은 항산화에 유효한 생리활성성분으로 잘 알려져 있다[12]. 따라서, 산수유는 오래전부터 항균이나 항바이러스를 비롯한 다뇨증이나 월경과다 및 면역증강 등의 치료에 사용되어 왔다[13]. 그러나 아직까지 산수유의 항산화에 대한 연구는 소수에 불과하다[11]. 근래, 세포배양법이 발전되면서 이를 이용한 병변의 기전규명이나 약제의 안전성 검사 및 신약에 대한 효능 등을 세포수준에서 규명하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다[14]. 더욱이, 시험관내(in vitro) 정량적 분석방법이 개발되면서 정확하면서도 빠르고 간편하게 분석할 수 있는 계기가 마련되었다[15]. 본 연구는 중금속의 일종인 CrO₃의 독성을 산화적 손상과 관련하여 조사함과 동시에 이의 중독 시 천연소재로부터 치료할 수 있는 물질을 항산화 측면에서 규명함으로써 병변치료에 유효한 새로운 물질의 탐색을 행하고자 시행하였다.

재료 및 방법

1. 세포주

본 실험에 사용한 신경아교세포인 C6 glioma 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Maryland, USA)에서 분양 받아 사용하였다.

2. 약제 제조

사용시약으로는 catalase (CAT)를 비롯한 chromium trioxide (CrO₃), ethyl alcohol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trypsin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), phosphate buffered saline (PBS), dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetra-zolium-5-carboxanilide (XTT)는 Sigma-Aldrich 사(Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA.)에서 구입하였다. 또한, Hanker's balanced salt solution (HBSS)과 fetal bovine serum (FBS) 및 minimum essential medium (MEM)은 Gibco 사(Gibco Chemical, USA)에서 구입하였다. Lactate dehydrogenase (LDH) CytoTox detection kit는 Takara사(Takara Biomedicals, Seoul, Korea)에서 구입하였다. CrO₃의 제조는 FBS가 들어 있지 않은 MEM을 사용하여 각각 10 uM, 50 uM 및 100 uM의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 후 필요시 희석하거나 또는 배양액에 직접 첨가하여 사용하였다. XTT는 PBS를 이용하여 50 ug/mL의 저장액을 만든 후 냉암소에 보관한 다음 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. 세포 배양

C6 glioma 세포의 배양은 Kim 등[16]의 방법에 따라 trypsin을 이용한 효소 해리술로 배양용기에 부착된 세포를 분리하였다. 분리된 세포들은 튜브에 모아 원침시킨 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액으로 1×10^5 cells/well이 되도록 96-well 배양용기에 분주하였다. 분주된 세포들은 36°C, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 72시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

4. 산수유 추출

산수유는 전초를 채취하여 깨끗이 씻은 후 햇빛이 들지 않고 서늘한 곳에서 건조시켜 일정한 크기로 잘라 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 추출을 위하여 보관중인 시료 250 g을 이의 3배량의 물과 함께 1,000 mL의 환저 플라스크에 넣고 24시간 동안 가열하였다. 이를 3회 반복적으로 행한 후 추출액을 모아 3,000 rpm에서 20분간 원침하였다. 원침 완료 후 여과하

여 진공농축기로 감압 농축한 다음 24시간 동안 동결건조기에서 건조하여 13 g의 시료를 얻었다. 이 때 수율은 5.2%로 나타났다.

5. 세포생존율 조사

세포생존율의 분석은 Mosmann [17]의 방법에 따라 행하였다. 즉, 배양이 완료된 세포를 well당 1×10^5 /well의 밀도로 분주한 후 72시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포에 약제나 시료를 처리한 다음, 전날 제조한 XTT를 각 well당 10 uL씩을 넣고 37°C, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기 내에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 DMSO로 처리하여 450 nm에서 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. CrO₃에 대한 세포독성 조사

CrO₃의 세포독성 조사를 위하여 배양 세포에 20~40 uM의 CrO₃가 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 후 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

7. CAT의 항산화능 측정

CAT의 항산화능을 조사하기 위하여 H₂O₂ 40 uM를 배양 세포를 처리하기 2시간 전에 CAT가 20 uM과 40 uM이 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다.

8. CrO₃에 대한 항산화제의 영향

CrO₃의 독성에 대한 항산화제의 일종인 CAT의 영향을 알아보기 위하여 XTT₅₀ 농도의 CrO₃를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 CAT가 각각 20 uM과 40 uM이 포함된 배양액에서 배양한 후 세포생존율을 CrO₃만의 처리와 비교 조사하였다. XTT₅₀ 값은 직선 회귀식에 의하여 산출하였다.

9. CrO₃에 대한 산수유 추출물의 영향

XTT₅₀ 농도의 CrO₃를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 산수유 추출물이 각각 140 ug/mL과 160 ug/mL가 들어 있는 배양액에서 배양한 후 세포생존율을 CrO₃로만 처리한 세포와 비교 조사하였다

10. 전자공여활성(electron donating activity, EDA) 측정

EDA는 항산화물질에 대한 라디칼 소거활성을 측정하는 손

쉬운 측정물이다. 항산화물질에 대한 항산화 효과를 측정하기 위해 EDA에 의한 환원력을 사용한다. EDA 측정은 Blois [18]의 방법에 따라 행하였다. 즉, 메탄올시료에 0.3 mM DPPH 메탄올 용액 100 uL를 첨가하여 실온에서 30분간 처리하였다. 처리 후 ELISA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여 능은 시료 첨가군과 시료 무첨가군간의 차이를 시료 무첨가군에 의한 백분율로 나타냈으며, 또한 CAT의 활성을 양성대조군으로 사용하였다.

11. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정

LDH 측정을 위하여 약제나 시료를 처리한 세포의 배양액을 모은 후 1,500 rpm에서 15분 동안 원침시킨 다음 상등액 50 uL를 취하였다. 취한 상등액에 LDH kit 반응액 50 uM을 넣고 30분간 반응시켰다. 반응 완료 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

12. 통계 처리

실험의 모든 자료는 3회 이상 반복한 결과를 mean±SD로 나타냈으며, 실험결과는 SPSS (Win Version 18.0, SPSS, Chicago, USA)를 이용하여 군간의 차이를 비교하기 위하여 ANOVA를 시행하였다. 사후 분석은 Tukey's HSD (honest significant difference)로 하였으며, 모든 통계의 유의수준은 *P*-value가 0.05 미만의 경우를 유의한 것으로 채택하였다.

결 과

1. CrO₃의 세포독성 측정

CrO₃에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 배양세포에 20~40 uM의 CrO₃가 들어 있는 배양액으로 각각 처리한 결과, 20 uM

Table 1. The cytotoxicity of chromium trioxide (CrO₃) in cultured C6 glioma cells

Incubation of CrO ₃ (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	0.21±0.02	60.51	<0.001
20	0.14±0.01		
30	0.12±0.01		
40	0.07±0.00		
XTT ₅₀ (CrO ₃)	0.11±0.01		

The values are mean±SD (N=16).

Abbreviation: XTT, 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetra-zolium-5-carboxanilide.

처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (0.21±0.02)에 비하여 66.7% (0.14±0.01)로 나타났으며 30 uM에서 처리한 경우 57.1% (0.12±0.01)로 나타났다. 또한, 40 uM의 경우 세포 생존율은 33.3% (0.07±0.00)로 나타났다. 이 과정에서 XTT₅₀ 값은 33 uM에서 나타났다($P<0.001$) (Table 1). CrO₃에 대한 세포독성에 따른 사후분석 결과 세포생존율이 대조군, CrO₃ 20 uM, CrO₃ 30 uM, CrO₃ 33 uM, CrO₃ 40 uM 순으로 높음을 알 수 있었다. 다만 CrO₃ 20 uM, CrO₃ 30 uM, CrO₃ 33 uM은 통계적으로 유의한 차이는 아니었다.

2. CAT의 항산화능 측정

CAT의 항산화능 조사 결과, H₂O₂ 40 uM만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 45.0% (0.09±0.02)로 나타났다 ($P<0.001$). 그러나, 세포생존율이 CAT 20 uM의 처리에서는 60.0% (0.12±0.00), CAT 40 uM 처리에서는 90.0% (0.18±0.02)로 나타났다($P<0.001$) (Table 2). CAT의 항산화능에 대한 사후분석 결과 대조군과 CAT 40 uM, CAT 20 uM과 H₂O₂ 40 uM 순으로 세포생존율이 높음을 알 수 있었다.

3. CrO₃의 세포독성에 대한 항산화제의 영향

CrO₃의 세포독성에 대한 항산화제의 영향을 알아본 결과, XTT₅₀ 농도인 CrO₃만의 처리에서 39.5% (0.68±0.10), CAT 20 uM 처리에서 51.4% (0.89±0.07), CAT 40 uM 처리에서

72.7% (1.25±0.05)로 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.001$) (Table 3). CrO₃의 세포독성과 항산화제의 영향에 따른 사후검정결과 대조군, CAT 40 uM, CAT 20 uM, XTT₅₀ (CrO₃) 순으로 세포생존율이 높음을 알 수 있었다.

4. CrO₃의 세포독성에 대한 산수유추출물의 영향

산수유 추출물이 CrO₃의 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과 CrO₃만의 처리에서의 세포생존율은 대조군인 100% (1.83±0.03)에 비하여 41.5% (0.76±0.07)로 낮게 나타났다. 반면, 140 ug/mL 산수유 추출물 처리에서의 세포생존율은 52.5% (0.96±0.08), 산수유 추출물 160 ug/mL의 처리에서는 62.8% (1.15±0.05)로 나타났다($P<0.001$) (Table 4). 산수유 추출물이 CrO₃의 세포독성에 미치는 영향에 대한 사후검정결과 대조군, 산수유 160 ug/mL, 산수유 140 ug/mL, XTT₅₀ (CrO₃) 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다.

5. EDA 측정

전자공여활성(EDA)의 측정결과 산수유 추출물 140 ug/mL 농도에서는 대조군에 비하여 활성이 80.4% (1.23±0.09)로 나타났다, 산수유 추출물 160 ug/mL 농도에서는 77.8% (1.19±0.09), CAT 20 uM 처리에서는 21.6% (0.33±0.07)로 점차 감소한 것으로 나타났다(Table 5). 따라서, 산수유 추출물

Table 2. The antioxidative activity of catalase (CAT) on the hydrogen peroxide (H₂O₂) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CAT (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	0.20±0.01	35.97	<0.001
40 H ₂ O ₂	0.09±0.02		
20	0.12±0.00		
40	0.18±0.02		

The values are mean±SD (N=16).
Abbreviation: See Table 1.

Table 3. The effect of catalase (CAT) on the cytotoxicity induced by chromium trioxide (CrO₃) in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CAT (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	1.72±0.03	128.38	<0.001
XTT ₅₀ (CrO ₃)	0.68±0.10		
20	0.89±0.07		
40	1.25±0.05		

The values are mean±SD (N=16).
Abbreviation: See Table 1.

Table 4. The protective effect of *Cornis fructus* (CF) extract on chromium trioxide (CrO₃)-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CF extract (ug/mL)	XTT assay (450 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	1.83±0.03	168.78	<0.001
XTT ₅₀ (CrO ₃)	0.76±0.07		
140	0.96±0.08		
160	1.15±0.05		

The values are mean±SD (N=16).
Abbreviation: See Table 1.

Table 5. The electron donating activity (EDA) of *Cornis fructus* (CF) extract

Concentrations of CF extract (ug/mL)	EDA (517 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	1.53±0.06	130.58	<0.001
20 CAT	0.33±0.07		
140	1.23±0.09		
160	1.19±0.09		

The values are mean±SD (N=16).
Abbreviation: CAT, catalase; See Table 1.

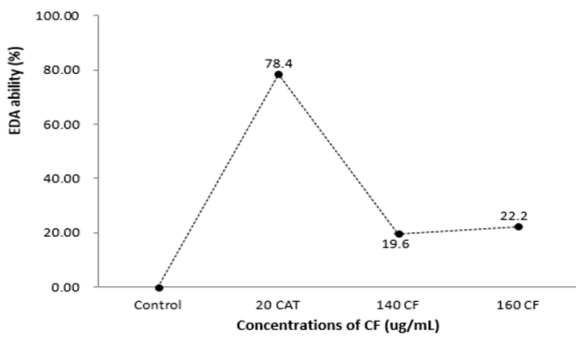


Figure 1. Electron donating ability of CF extract at concentrations of 140 ug/mL and 160 ug/mL, respectively. The data indicate the mean for 3 times on triplicate experiments. Electron donating activity of CF extract were significantly different from negative control. CAT was used as positive control.

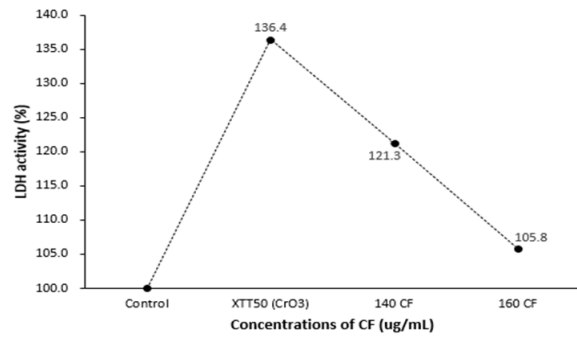


Figure 2. The LDH activity of CF extract at concentrations of 140 ug/mL and 160 ug/mL, respectively. The data indicate the mean for 3 times on triplicate experiments. LDH activity of CF extract were significantly different from negative control. CrO₃ was used as positive control.

Table 6. The lactate dehydrogenase (LDH) activity of *Cornis fructus* (CF) extract on chromium trioxide (CrO₃)-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells

Concentrations of CF extract (ug/mL)	LDH activity (450 nm)	F	P
	Mean±SD		
Control	1.76±0.04	35.56	<0.001
XTT ₅₀ (CrO ₃)	2.40±0.07		
140	2.13±0.13		
160	1.86±0.07		

The values are mean±SD (N=16).
Abbreviation: See Table 1, 4.

140 ug/mL와 160 ug/mL의 전자공여능은 각각 19.6%와 22.2%, CAT 20 uM의 전자공여능은 78.4%로 대조군에 비하여 통계적으로 유의하였다($P<0.001$) (Figure 1). 전자공여능의 사후검정결과 CAT 20 uM, 산수유 추출물 160 ug/mL와 140 ug/mL, 대조군 순으로 높은 것으로 나타났다.

6. LDH 활성 측정

CrO₃의 세포독성에 대한 산수유 추출물의 LDH 활성을 조사한 결과 CrO₃만의 처리에서는 LDH 활성이 대조군인 100% (1.76±0.04)에 비하여 136.4% (2.40±0.07)로 매우 높게 나타났다. 이에 비하여, 140 ug/mL 산수유 추출물 처리에서는 LDH 활성이 121.0% (2.13±0.13)로 나타나 CrO₃만의 처리에 비하여 매우 감소한 것을 확인하였다($P<0.001$) (Table 6). 또한, 160 ug/mL의 산수유 추출물 처리에서는 105.7% (1.86±0.07)로 CrO₃만의 처리에 비하여 유의한 LDH 활성 감소를 보였다($P<0.001$) (Figure 2). CrO₃의 세포독성에 대한 산수유 추출물의 LDH 활성에 대한 사후검정 결과 대조군과 160 ug/mL 산수유 추출물, 140 ug/mL 산수유 추출물, CrO₃ 처리군 순으로 LDH

활성 감소가 높은 것으로 나타났다.

고 찰

크롬을 비롯한 중금속의 성분은 인체에서 소량으로 존재하면서 생명에 필요한 물질을 구성하고 있지만 다량이 인체 내에 축적되면 심한 중독을 유발하여 각종 부작용을 일으키고 있다 [19]. 본 연구에서는 삼산화크롬인 CrO₃의 세포독성을 조사하기 위하여 배양 C6 glioma 세포에 20~40 uM의 CrO₃를 48시간 동안 처리한 결과 처리농도에 비례하여 세포생존율이 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. 이 과정에서 XTT₅₀값이 100 uM 이하인 33 uM로 나타나 Borenfreund와 Puerner [20]에 의한 독성판정기준에 의해 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 CrO₃가 세포독성을 가지고 있음을 말해 주고 있으며 Jung 등[21]에 의한 CrO₃의 세포독성을 보고한 결과와 일치하였다. 이 같은 현상은 CrO₃가 세포 내 핵산물질인 DNA (deoxyribonucleic acid)의 합성방해나 또는 단백질의 합성을 억제한 결과도 배제할 수는 없지만[3], 그 보다는 CrO₃의 산화적 손상에 의해 세포가 퇴화 내지는 고사한 결과일 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 CrO₃의 독성과 산화적 손상과의 연관성을 조사하였다. 항산화제의 일종인 CAT를 배양 세포에 전 처리한 결과, 처리한 CAT의 처리 농도에 비례하여 CrO₃에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 본 결과는 CrO₃의 독성이 산화적 손상과 관련이 있음을 제시하고 있으며, Jung 등[21]이 CrO₃의 독성을 항산화제인 vitamin E가 방어하였다는 연구 결과와도 상호 일치함을 알 수 있었다. 이 같은 현상은 CrO₃에 의해 생성된 hydroxyl radical이나 superoxide anion radical과 같은 자유라디칼을 CAT나

vitamin E와 같은 항산화제가 제거한 결과인 것으로 생각된다 [4]. 한편, 산수유 추출물이 CrO₃의 독성에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 산수유 추출물 140 ug/mL와 160 ug/mL를 배양 세포에 각각 전 처리한 결과, CrO₃만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 보였다. 본 결과는 산수유 추출물이 CrO₃에 의한 산화적 손상을 방어한 결과임을 말해주고 있으며, 이는 동시에 산수유 추출물의 항산화능을 제시하고 있다. 이의 증거 하나로서 Lee 등[22]이 산수유 추출물이 자유라디칼인 과산화 수소(H₂O₂)의 산화적 손상을 방어하였다는 연구 결과와도 일치한다. 이 같은 현상은 산수유 추출물 속에 함유된 linolic acid를 비롯한 gallic acid 및 saponin과 같은 항산화 성분의 상호작용의 결과에 기인한 것으로 생각된다[12]. 따라서, 본 연구에서는 산수유 추출물의 항산화능을 알아보기 위하여 전자공여활성(EDA)을 비롯한 LDH 활성을 조사하였다. 본 연구의 EDA 측정을 위해 140 ug/mL와 160 ug/mL의 산수유 시료를 처리한 결과 대조군에 비하여 유의한 전자공여능의 증가를 보였다. 이는 산수유 추출물이 자유기제거능이 있음을 말해주고 있으며 이는 곧 산수유 추출물의 항산화능을 증명해 주고 있다. 한편, 산수유 추출물의 LDH 활성조사 결과에서 140 ug/mL와 160 ug/mL의 산수유 추출물 처리에서는 CrO₃로만의 처리에 비하여 유의한 LDH 활성저해를 보였다. 위 결과는 산수유 추출물의 항산화능에 의하여 CrO₃의 산화적 손상으로 야기되는 막의 지질과산화가 방어된 것으로서, 이는 산수유 추출물이 과산화수소에 의한 산화적 손상을 방어하여 LDH 활성감소를 나타냈다는 연구 보고와도 일치하였으며[22], EDA와 함께 산수유 추출물의 항산화능을 증명하고 있음을 알 수 있다. LDH 활성분석은 지질과산화반응(reaction of lipid peroxidation)의 분석과 함께 막의 손상 정도를 측정할 수 있는 정량적 분석방법의 하나로 알려져 있다[8]. 이상의 결과로부터 산수유 추출물은 산화적 손상과 관련이 있는 CrO₃의 독성을 항산화능에 의하여 효과적으로 방어한다는 것을 확인하였다. 따라서, 산수유 추출물과 같은 천연성분에 대한 항산화적 생리활성 분석은 질병치료를 위한 약제의 부작용 염려는 물론 나아가서 치료적 효능이 높은 물질성분을 이용해 산화적 손상으로 야기되는 질환 치료적 측면에서 새로운 물질 개발을 위한 기초자료로서의 활용도가 높을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구 목적은 산수유 추출물의 항산화 효과를 배양 C6 glioma 세포를 대상으로 조사하였다. 이 같은 목적을 위하여 C6 glioma 세포를 48시간 동안 배양한 후 6가 크롬의 세포독성

및 산수유 추출물의 방어효과를 조사하였다. 이외에 EDA 및 LDH 활성과 같은 항산화 효과를 분석하였다. 본 연구에서 CrO₃는 처리농도에 비례하여 세포생존율을 감소시켰다. 또한 이 과정에서 세포를 48시간 동안 20~40 uM로 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 XTT₅₀ 값은 33 uM로 나타났다. 항산화제인 CAT는 CrO₃로 유도된 세포독성에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 한편 산수유 추출물의 보호효과에 있어서, 산수유 추출물은 CrO₃만의 처리군에 비하여 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 동시에 산수유 추출물은 EDA와 LDH 활성과 같은 항산화 효과를 보였다. 이와 같은 결과로부터 CrO₃의 독성에 산화적 손상이 관련되어 있는 것으로 나타났다. 또한 산수유 추출물은 이의 항산화 효과에 의하여 CrO₃의 세포독성을 효과적으로 방어하였다. 결론적으로, 산수유 추출물과 같은 천연소재는 산화적 손상과 관련된 증급속에 의해 유발된 세포독성을 방어 내지는 치료하는데 유용한 치료적 요소의 하나로 생각된다.

Acknowledgements: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2018.

Conflict of interest: None

REFERENCES

1. Pattison DI, Davies MJ, Levina A, Dixon NE, Lay PA. Chromium (VI) reduction by catecholamines results in DNA cleavage in vitro: relevance to chromium genotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2001;14:500-510. <http://dx.doi.org/10.1021/tx000229s>.
2. Tso TC, Lai HJ, Yang JL. Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damaged by chromium (VI) reduction with ascorbate. *Chem Res Toxicol.* 1999;12:1002-1009. <http://dx.doi.org/10.1021/tx9802264>.
3. Zhang Q, Kluz T, Salnikow K, Costa M. Comparison of the cytotoxicity, cellular uptake, and DNA-protein induced by potassium chromate in lymphoblast cell line derived three different individuals. *Biol Trace Elem Res.* 2002;86:11-22.
4. Leonard S, Wang S, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr (VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2000;19:49-60.
5. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptosis cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem.* 2001;222:149-158.
6. Gracia-Lopez D, Cuevas MJ, Almar M, Lima E, De-Paz JA, Gonzalez-Gallego J. Effects of eccentric exercise on NF-κB activation in blood mononuclear cells. *Med Sci Sport Exerc.* 2007;39:653-664. <http://dx.doi.org/10.1249/mss.0b013e31802f04f6>.
7. Jung IJ. The effect of NMDA/glycine receptor antagonist,

- 7-chlorokynurenic acid on cultured astrocytes damaged by ischemia-like condition. *J Exp Biomed Sci*. 2009;15:355-362.
8. Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS. Antioxidant effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Kor J Ver Res*. 2005;45:341-350.
 9. Endoh M, Maiese K, Wanger J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*. 1994;651:92-100. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90683-1](http://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90683-1).
 10. Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of *Chelidonium majus* extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. *Kor J Clin Lab Sci*. 2016;48:1-7. <http://doi.org/10.15324/kjcls.2016.48.1.1>.
 11. Peng Q, Wei Z, Lau BH. *Cornis fructus* enhances endothelial cell antioxidant defenses. *General Pharmacol*. 1998;31:221-225. [http://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00459-X](http://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00459-X).
 12. Shahrzad SK, Aoyagi A, Winter A, Koyama I, Bitsch B. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutrition*. 2001;131:1207-1210. <http://doi.org/10.1093/jn/131.4.1207>.
 13. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of *common fruits*. *J Agric Food Chem*. 2002;50:7449-7454.
 14. Oh YL, Choi YR, Chang BS, Jung IJ. Antioxidative effect of *Portulaca oleracea* L. extract on allergic contact dermatitis agent, copper in cultured human skin fibroblasts. *J Invest. Cosm*. 2012;8:243-249.
 15. Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De-Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2007;121:2225-2232. <http://doi.org/10.1002/ijc.22790>.
 16. Kim MS, Seo YM, Park ST. Antioxidant effect of kaempferol on cultured human skin fibroblasts damaged by methyl mercuric chloride. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2010;13:23-29.
 17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983;65:55-63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
 18. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;26:1199-1200. <http://doi.org/10.1038/1811199a0>.
 19. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonist. *Neurotoxicol*. 1996;17:37-45.
 20. Borenfreund E, Puerner A. A simple quantitative procedure using monolayer culture of cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth*. 1985;9:7-9.
 21. Jung JY, Oh SK, Park SH, Yoon MY, Yu YW, Rim YS, et al. Antioxidative effect of *Ajugamultiflora* BUNGE extract on chromium trioxide, dermatitis inducer in cultured NIH3T3 fibroblast. *J Invest Cosm*. 2014;10:1-6.
 22. Lee JK, Hong GY, Park YJ, Park ST. Effect of *Cornis fructus* extract on the cell adhesion ability and oxidative stress in cultured NIH3T3 fibroblasts injured by hydrogen peroxide. *J Kor Soc People Plants Environ*. 2008;11:49-57.