ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of *Agrimonia pilosa* var. Extract on Cultured NIH3T3 Fibroblasts Damaged by Potassium DichromateJun-Hee Lee¹, Young Mi Seo²¹Department of Emergency Medicine, Sanbon Hospital, Wonkwang University College of Medicine, Gunpo, Korea²Department of Nursing, College of Medicine, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea

크롬염으로 손상된 배양 NIH3T3 섬유모세포에 대한 짚신나물 추출물의 보호 효과

이준희¹, 서영미²¹원광대학교 의과대학 산본병원 응급의학과, ²원광보건대학교 간호학과

ARTICLE INFO

Received May 15, 2019
Revised May 31, 2019
Accepted May 31, 2019

Key words

Agrimonia pilosa var.
Oxidative stress
Potassium dichromate

ABSTRACT

The protective effect of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract on potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)-induced cytotoxicity in cultured NIH3T3 fibroblasts, was examined by performing an XTT assay for the cell viability and antioxidative effects, such as lactate dehydrogenase (LDH) activity and superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity. In this study, $K_2Cr_2O_7$ decreased the cell viability significantly in a dose-dependent manner, and the XTT_{50} value was determined to be 37.5 μM , which was highly-toxic according to the Borenfreund and Puerner' toxic criteria. The antioxidant, butylated hydroxytoluene (BHT), increased remarkably the cell viability damaged by $K_2Cr_2O_7$ -induced cytotoxicity in these cultures. With regard to the protective effect of the AP extract on $K_2Cr_2O_7$ -induced cytotoxicity, AP extract produced a significant increase in cell viability and antioxidative effects as the inhibitory ability LDH and SAR scavenging ability. These findings suggest that oxidative stress is involved in the cytotoxicity of $K_2Cr_2O_7$, and the AP extract effectively protected the cells from $K_2Cr_2O_7$ -induced cytotoxicity by antioxidative effects. These results suggest that natural resources, such as AP extract, may be a putative therapeutic agent for the diminution or treatment of cytotoxicity induced by heavy metallic bases, such as $K_2Cr_2O_7$ correlated with oxidative stress.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

크롬(chromium)은 은백색의 단단한 물질로 대부분 자연상태에서 3가 형태로 존재하고 있으며, 산업장에서 많이 사용하고 있는 재료로는 3가와 6가 크롬의 화합물로서 특히 6가 크롬은 3

가 크롬보다 독성이 강하기 때문에 중독의 원인이 되고 있다[1]. 6가 크롬 중에서 중크롬산은 부식작용과 산화작용에 의해 인체에 유해함이 이미 잘 알려져 있으며, 특히, 중크롬산염 중 중크롬산칼륨(potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$)은 중크롬산소다와 함께 사용용도가 넓어 가죽제조를 비롯한 염색, 안료제조 및 시멘트제조와 같은 다양한 산업공정의 원료로 사용되고 있다[2]. 이 과정 중 $K_2Cr_2O_7$ 로부터 나오는 분진 입자나 흡은 인체의 피부장벽은 물론, 호흡기나 입을 통하여 인체내로 들어가 각종 장기에 손상을 초래하여 피부병변, 폐암, 백전공과 같은 많은 질병

* Corresponding author: Young Mi Seo
Department of Nursing, College of Medicine, Wonkwang Health Science University,
514 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea
E-mail: dudn0408@wu.ac.kr
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2836-647X>

환을 야기한다[3]. 특히, 인체의 점막조직이나 피부에 대한 부식성이 강하기 때문에 이의 취급시에는 각별한 주의를 요한다. 이와 같이, $K_2Cr_2O_7$ 은 환경오염원이면서 발암물질로 알려져 있으나 이로 인한 병변발생 시 뚜렷한 치료적 방법이나 효과적인 치료약제가 매우 빈약한 실정이다[4]. 그 외에도 $K_2Cr_2O_7$ 과 같은 크롬염에 대한 중독성현상을 비롯한 세포내 DNA와 같은 핵산물질의 손상이나 물질수송과 같은 기전에 대해서도 자세히 밝혀져 있지 않으며, 세포수준에서의 독성에 대한 연구도 많지 않다[2, 5]. 크롬을 비롯한 수은이나 카드뮴, 납과 같은 몇몇 중금속류는 붕괴될 때 자유라디칼(free radicals)이 발생되는데 그 독성이 산화적 손상(oxidative stress)과 연관이 있을 것으로 보고되면서 이들에 의한 병변치료를 항산화 작용 측면에서 접근하는 연구가 이루어지고 있다[6].

최근, 한약재, 약초 및 허브 등과 같은 각종 식물에는 항산화를 비롯한 항암이나 항염 및 항독에 효과적인 생리활성물질이 다량 함유되어 있는 것으로 알려지면서 이들 성분에 대한 약리작용은 물론, 병변에 대한 치료적 효능검정에 대한 연구가 진행되고 있다[7, 8]. 특히, 이들의 성분 중에 페놀화합물의 일종인 flavonols와 같은 폴리페놀류나 플라보노이드화합물은 항산화를 비롯한 항염이나 항균에 뛰어난 효능이 있다고 알려져 있다[7, 9]. 식물 중 짚신나물(*Agrimonia pilosa* var., AP)은 장미과(Rosaceae)에 속하는 여러해살이풀로 우리나라의 산이나 들의 풀밭 전역에서 자생하고 있다. 생약명으로는 지선초 또는 황화초라고도 불리우며 6~8월경에 5장의 노란 꽃잎을 피운다. 전초는 개화전에 채취하여 깨끗이 세척한 다음 그늘에서 말려 사용한다. AP에는 정유(oil)를 비롯하여 폴리페놀류의 탄닌(tannin) 또는 아그리모놀라이드(agrimonolide), 플라보노이드류인 사포닌(saponin), 항산화제인 vitamin C 및 스테롤(sterol)과 같은 다양한 성분을 함유하고 있어 오래전부터 장출혈을 비롯하여 항암, 고혈압, 강장, 대하증과 같은 병변치료에 사용하여 왔다[10]. Lee 등[11]은 AP의 물과 메탄올 추출물에 대한 항산화 영향을 superoxide (SOD)-유사활성을 비롯한 DPPH-라디칼 소거능, ABTS 양이온 소거능 및 폴리페놀함량 조사와 같은 측면에서 분석하였으나 본 연구는 이와 다른 방법인 막손상 저해능 및 자유라디칼 음이온-소거능에 의한 조사 및 폴리페놀과 플라보노이드 함량에 대한 분석에 의한 항산화 측면에서 조사하였다. 물론, 항산화 효과에 대한 분석은 reactive oxygen species (ROS)나 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx)와 같은 자유라디칼 제거능이나 항산화효소의 활성능을 측정하는 다양한 분석방법 등이 알려져 있다[12, 13]. 크롬염의 일종인 potassium chromate

나 $K_2Cr_2O_7$ 의 독성기전에는 DNA와 같은 핵산물질의 손상이나 세포대사장애[2] 등과 같은 여러 기전이 있지만 본 논문에서는 $K_2Cr_2O_7$ 의 독성을 산화적 손상 측면에 근거하여 분석하였다. 이는 위에서 언급한 바와 같이 Lee 등[11]에 의한 항산화 분석과는 달리, 세포생존율을 비롯한 lactate dehydrogenase (LDH) 및 superoxide anion radical (SAR)-소거능을 조사하였다.

근래 세포배양기법이 발달되면서 각종 병변에 대한 모델제작을 비롯하여 화학약제나 신물질의 효능검정은 물론, 줄기세포를 이용한 병변치료 및 태아의 세포배양에 의한 산전진단과 같은 다양한 목적에 활용되고 있다[14]. NIH3T3 섬유모세포종을 활용한 $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성을 산화적 측면에서 조사하였다. NIH3T3 섬유모세포종은 피부나 호흡계통을 비롯한 인체 내 여러 장기에 널리 분포하고 있는데, $K_2Cr_2O_7$ 같은 중금속염의 입자들이 쉽게 통과하기 때문이다. 또한 $K_2Cr_2O_7$ 독성에 대한 AP 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하여 산화적 손상과 관련된 중금속염과 같은 독성물질에 대한 독성경감이나 치료를 위한 물질을 천연소재로부터 알아보았다.

재료 및 방법

1. 약제 제조 및 $K_2Cr_2O_7$ 의 처리

본 실험에 사용한 시약으로 $K_2Cr_2O_7$ 을 비롯한 xanthine, potassium phosphate buffer (pH 7.5), dimethylsulfoxide (DMSO), butylated hydroxytoluene (BHT), hydrogen peroxide (H_2O_2), phosphate buffered saline (PBS), XTT, sodium carbonate, aluminum nitrate 및 ethyl alcohol은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. $K_2Cr_2O_7$ 의 제조는 Kim 등[15]의 연구를 근거로 XTT₅₀값을 구하기 위하여 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)이 없는 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)을 사용하였으며, 각각 0~40 μ M의 저장액을 만들어 사용하였다. XTT (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt)는 PBS를 이용하여 50 μ g/mL의 저장액을 만든 후 냉암소에 보관한 다음 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다. $K_2Cr_2O_7$ 의 처리는 배양중인 NIH3T3 섬유모세포에 $K_2Cr_2O_7$ 이 25~35 μ M 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포생존율을 대조군과 비교하여 XTT₅₀ 농도를 측정하였다.

2. AP 채취 및 추출

전북 아산에서 AP 전초를 개화전에 채취하여 원광대학교 부설 생명자원과학연구소에서 동정을 확인하고 사용하였다. 채취한 전초는 잘 씻어 통풍이 잘 되는 그늘에서 말린 후 일정한 길이로 잘라 냉암소에 보관해 시료로 사용하였다. 보관중인 시료 67.3 g을 잘게 파쇄한 다음 시료와 이의 3배 정도의 3차 증류수를 1,000 mL의 환저플라스크에 함께 넣고 3시간 동안 가열하였다. 위의 과정을 4회 반복 추출하여 여과한 다음 574 ×g에서 30분 동안 원침시켰다. 원침 후 진공농축기에서 농축감압시킨 다음 3.2 g의 시료를 얻었으며, 이 때 수율은 4.8%로 나타났다.

3. 세포 배양 및 세포생존율 분석

NIH3T3 섬유모세포(ATCC, CRL 1658)의 배양은 Oh 등 [14]의 방법에 따라 배양용기에 부착된 세포는 trypsin을 이용한 효소해리술에 의하여 분리하였다. 분리된 세포들은 원침 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣고 균질화한 다음 1×10^5 cells/well이 되도록 조절한 후 96-well 배양용기에 배분하였다. 배분된 세포들은 36°C, 5% CO₂로 조절된 항온기내에서 72 시간 동안 배양하였다. 세포생존율 분석은 Mosmann [16]의 방법에 따라, 배양 세포에 약제나 시료추출물을 농도별로 처리한 다음 실험 당일 제조한 XTT 50 µg/mL를 well당 20 µL씩 넣고 36°C로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 DMSO를 넣어 실온에서 정치한 다음 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. XTT₅₀값의 산출은 회귀직선식에 의하여 산출하였다.

4. BHT의 항산화능 측정 및 K₂Cr₂O₇에 대한 BHT의 영향

항산화제인 BHT의 항산화능을 조사하기 위하여 Son 등 [17]의 연구를 근거로 활성산소의 일종인 H₂O₂ 35 µM를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 30~50 µM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. K₂Cr₂O₇에 대한 BHT의 영향조사를 위하여, XTT₅₀ 농도의 K₂Cr₂O₇을 배양세포에 처리하기 2시간 전에 BHT가 40 µM과 50 µM로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

5. AP 추출물의 세포독성 및 추출물 처리

AP 추출물에 대한 독성을 조사하기 위하여 추출물이 각각 110~170 µg/mL로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양

한 후 대조군과 세포생존율을 비교 조사하였다 또한, K₂Cr₂O₇에 대한 AP 추출물의 최대효능 분석을 위하여 독성이 없는 최대 농도인 130 µg/mL와 150 µg/mL의 농도를 선정하였다. 배양 세포에 K₂Cr₂O₇ XTT₅₀ 농도를 처리하기 2시간 전에 AP 추출물 130 µg/mL와 150 µg/mL가 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 이의 영향을 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. AP 추출물의 함량 분석

폴리페놀분석은 AOAC [18] 방법에 의하여, 추출시료 0.2 mL에 phenol reagent 0.2 mM를 첨가하여 3분 동안 정치하였다. 정치 완료 후 0.4 mL sodium carbonate를 가하여 1 시간 동안 반응시킨 다음 ELISA reader로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시약으로 tannic acid를 이용하여 검량곡선을 작성하였다. 플라보노이드 분석은 Nieva Moreno 등 [19]의 방법에 따라 시료용액 0.1 mL에 10% aluminum nitrate와 1 M potassium acetate 혼합물 0.2 mL에 에탄올 4.7 mL를 가하여 25°C에서 40분 동안 반응 후 ELISA reader로 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 quercetin을 이용하여 검량곡선을 작성하였다

7. 항산화 분석

Lactate dehydrogenase (LDH) 활성 측정을 위하여 배양세포에 약제나 추출물을 각각 처리한 다음 배양액을 250 ×g에서 10분 동안 원침시켰다. 원침 후 50 µL의 상등액을 취한 다음 LDH CytoTox detection kit (Asan Co., Seoul, Korea)의 반응액(0.05 U/mL) 50 µL를 넣고 실온에서 30분 동안 정치하였다. 정치 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 하였다. 또한, LDH 활성 저해능(%)은 $100 - [(시료첨가군의 흡광도 / 무첨가군의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타났다. 또한, superoxide anion-radical (SAR) 소거활성 측정은 nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원방법에 따라, 시료용액 0.1 mL와 0.4 mL potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.4 mM xanthine과 NBT를 가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 1 N HCl 1mL를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 SAR 양을 ELISA reader 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거능의 측정은 시료첨가군과 무첨가군의 차이에 의한 백분율로 표시하였으며, BHT의 활성을 양성대조군으로 사용하였다. SAR 소거능(%)은 $100 - [(시료첨가군의 흡광도 / 무첨가군의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타났다.

8. 통계 분석

실험결과는 SPSS/WIN 18.0을 이용하여 mean $\pm$ SD로 표시하였다. 실험결과에 대해 ANOVA를 시행하였고 사후 분석은 Tukey HSD에 의하였으며, 유의수준은 $P < 0.05$ 에서 채택하였다.

결 과

1. $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성 측정

배양 NIH3T3 섬유모세포에 $K_2Cr_2O_7$ 의 독성을 조사한 결과, 처리 농도에 비례하여 $K_2Cr_2O_7$ 은 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시킴으로써 독성을 나타냈다($P < 0.001$). 이 과정에서 XTT_{50} 값은 $37.5 \mu M$ 의 처리에서 나타났다(Table 1).

2. BHT의 항산화능 측정

BHT의 항산화능 조사결과, $35 \mu M$ 의 H_2O_2 만을 처리한 경우는 대조군에 비하여 세포생존율이 43.5% (0.81 ± 0.17)로 나타난 반면, $30 \mu M$ 과 $40 \mu M$ 의 BHT의 처리에서 각각 67.7% (1.26 ± 0.09)와 75.3% (1.40 ± 0.17)로 나타났다. 또한, $50 \mu M$ 농도의 BHT의 처리에서는 87.1% (1.62 ± 0.13)로 나타났다($P < 0.001$) (Table 2). BHT 항산화능에 대한 사후검증결과 대조군, $50 \mu M$ BHT, H_2O_2 순으로 항산화능이 높았다. $50 \mu M$ BHT, $40 \mu M$ BHT, $30 \mu M$ BHT 간에는 통계적인 유의한 차이는 없었으나, $50 \mu M$ BHT, $40 \mu M$ BHT, $30 \mu M$ BHT 순으로 항산화능이 높았다. 또한 $50 \mu M$ BHT는 대조군과도 통계적인 유의한 차이가 없었다.

Table 1. The cytotoxicity of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) on cultured NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Concentrations of $K_2Cr_2O_7$ (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean $\pm$ SD			
Control ^a	1.53 $\pm$ 0.11	37.01	<0.001	a > b > c, d
25 ^b	1.10 $\pm$ 0.28			
30 ^c	0.87 $\pm$ 0.09			
35 ^d	0.73 $\pm$ 0.09			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

Table 2. The antioxidative ability of butylated hydroxytoluene (BHT) on hydrogen peroxide (H_2O_2) in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentrations of BHT (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean $\pm$ SD			
Control ^a	1.86 $\pm$ 0.24	44.61	<0.001	a > c > b
35 H_2O_2 ^b	0.81 $\pm$ 0.17			
30 ^c	1.26 $\pm$ 0.09			
40 ^d	1.40 $\pm$ 0.17			
50 ^e	1.62 $\pm$ 0.13			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

Table 3. The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the cytotoxicity induced by potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) in cultured NIH3T3 fibroblasts

Concentrations of BHT (μM)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean $\pm$ SD			
Control ^a	1.74 $\pm$ 0.12	244.07	<0.001	a > d > c > b
$K_2Cr_2O_7$ (XTT_{50}) ^b	0.65 $\pm$ 0.06			
40 ^c	0.89 $\pm$ 0.04			
50 ^d	1.11 $\pm$ 0.09			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

3. K₂Cr₂O₇에 대한 BHT의 영향

K₂Cr₂O₇의 세포독성에 대한 항산화제인 BHT의 영향을 조사한 결과, XTT₅₀ 농도의 K₂Cr₂O₇만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 37.4% (0.65 ± 0.06)로 나타난 것에 비하여 40 μ M과 50 μ M의 BHT의 처리에서는 각각 51.1% (0.89 ± 0.04)와 63.8% (1.11 ± 0.09)로 나타났다($P < 0.001$) (Table 3). K₂Cr₂O₇의 세포독성에 대한 BHT의 항산화 효과를 사후검증한 결과 대조군, 50 μ M BHT, 40 μ M BHT, K₂Cr₂O₇ 순으로 세포생존율이 높게 나타났다.

4. AP 추출물의 세포독성

AP 추출물에 대한 독성을 위하여 AP 추출물이 각각 110~170 μ g/mL로 포함된 배양액에서 배양한 결과 110 μ g/mL와 130 μ g/mL 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100% (1.92 ± 0.16)에 비하여 95.8% (1.84 ± 0.10)과 93.2% (1.79 ± 0.13)로 각각 나타났다. 또한, 150 μ g/mL와 170 μ g/mL에서는 추출물 처리에서는 91.7% (1.76 ± 0.15)와 88.5% (1.70 ± 0.13) ($P = 0.033$)로 각각 나타났다(Table 4). 따라서, 최대허용한계농도는 170 μ g/mL 이상에서 나타나 본 실험에서는 170 μ g/mL 이하의 농도를 사용하였다. AP 추출물의 세포독성에 대한 사후검증결과 대조군, 170 μ g/mL AP 순으로 세포생존율이 높았다. 110 μ g/mL AP, 130 μ g/mL AP, 150 μ g/mL AP는 통계적으로

유의한 차이는 없으나 110 μ g/mL AP, 130 μ g/mL AP, 150 μ g/mL AP 순으로 세포생존율이 높았다. 110 μ g/mL AP는 대조군과 150 μ g/mL AP는 170 μ g/mL AP와 통계적인 차이를 보이지 않았다.

5. AP 추출물의 함량 분석

AP 추출물의 함량조사에 있어서 폴리페놀(polyphenol)의 함량은 47.3 mg/g으로 나타났으며, 플라보노이드(flavonoid)

Figure 1. The component of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract. values are mean $\pm$ SD. The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

Table 4. The cytotoxicity of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract on cultured NIH3T3 fibroblasts by XTT assay

Concentrations of AP extract (μ g/mL)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean $\pm$ SD			
Control ^a	1.92 $\pm$ 0.16	2.96	0.033	a>e
110 ^b	1.84 $\pm$ 0.10			
130 ^c	1.79 $\pm$ 0.13			
150 ^d	1.76 $\pm$ 0.15			
170 ^e	1.70 $\pm$ 0.13			

Cultured NIH3T3 fibroblasts were treated with AP extract at the concentrations of 110, 130, 150 and 170 μ g/mL, respectively. The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

Table 5. The protective effect of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract on the cytotoxicity induced by potassium dichromate (K₂Cr₂O₇) in cultured NIH3T3 fibroblaststs

Concentrations of AP extract (μ g/mL)	XTT assay (450 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean $\pm$ SD			
Control ^a	1.33 $\pm$ 0.14	27.30	<0.001	a>d>c, b
K ₂ Cr ₂ O ₇ (XTT ₅₀) ^b	0.55 $\pm$ 0.16			
130 ^c	0.67 $\pm$ 0.10			
150 ^d	0.95 $\pm$ 0.29			

The data indicate the mean $\pm$ SD for triplicate experiments.

함량은 24.2 mg/g으로 각각 나타났다(Figure 1).

6. K₂Cr₂O₇의 세포독성에 대한 AP 추출물의 영향

AP 추출물이 K₂Cr₂O₇의 세포독성에 미치는 영향을 조사한 결과, K₂Cr₂O₇의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 41.4% (0.55±0.16)로 나타난데 비하여 130 µg/mL 추출물 처리에서는 50.4% (0.67±0.10)로 나타났다. 또한 150 µg/mL 추출물 처리에서는 71.4% (0.95±0.29)로 나타나 K₂Cr₂O₇만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다(*P*<0.001) (Table 5). AP 추출물이 K₂Cr₂O₇의 세포독성에 미치는 영향에 대한 사후검증 결과 대조군, 150 µg/mL AP, 130 µg/mL AP와 K₂Cr₂O₇의 처리 순으로 세포생존율이 높은 것을 알 수 있었다.

7. LDH 활성 측정

LDH 활성을 측정한 결과 130 µg/mL 농도처리에서는 활성이 대조군에 비하여 113.3% (2.21±0.22)로 나타났으며, 150 µg/mL의 처리에서는 102.6% (2.00±0.36)로 나타났다. 이는 K₂Cr₂O₇만의 처리 134.9% (2.63±0.34)에 비하여 모두 유의한 감소를 보였다(*P*<0.001). 따라서, LDH 활성 저해능은 추출물 130 µg/mL 와 150 µg/mL 농도에서 K₂Cr₂O₇ 처리군에 비하여 각각 21.6%와 32.3%로 높은 저해능 보였다(Table 6). AP 추출물의 LDH 활성 측정에 대한 사후검증결과 대조군에 비해 150 µg/mL AP와 130 µg/mL AP, K₂Cr₂O₇ 처리 순으로 LDH

활성 저해능이 높은 것을 알 수 있었다.

8. Superoxide anion-radical (SAR) 소거활성 측정

AP 추출물에 대한 SAR-소거활성 측정 결과, 130 µg/mL 추출물의 처리에서는 소거활성이 87.6% (1.34±0.13)로 나타났으며, 150 µg/mL의 처리에서는 73.9% (1.13±0.09)로 나타났다(*P*<0.001). 따라서, 소거능은 130 µg/mL 와 150 µg/mL에서 각각 12.4%와 26.1%로 대조군에 비하여 유의한 소거능을 나

Figure 2. The superoxide anion radical (SAR)-scavenging ability of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract. values are mean±SD. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. ****P*<0.001

Table 6. The lactate dehydrogenase (LDH) activity of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract determined at a wavelength of 490 nm

Concentrations of AP extract (µg/mL)	LDH activity (490 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean±SD			
Control ^a	1.95±0.15	9.85	<0.001	a, d, c>b
K ₂ Cr ₂ O ₇ (XTT ₅₀) ^b	2.63±0.34			
130 ^c	2.21±0.22			
150 ^d	2.00±0.36			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviation: K₂Cr₂O₇, potassium dichromate.

Table 7. The superoxide anion-radical (SAR) scavenging activity of *Agrimonia pilosa* var. (AP) extract determined at a wavelength of 560 nm

Concentrations of AP extract (µg/mL)	SAR scavenging activity (560 nm)	F	P	Tukey HSD
	Mean±SD			
Control ^a	1.53±0.22	123.92	<0.001	b>d>c>a
40 BHT ^b	0.28±0.05			
130 ^c	1.34±0.13			
150 ^d	1.13±0.09			

The data indicate the mean±SD for triplicate experiments.
Abbreviation: BHT, butylated hydroxytoluene.

타냈으며, 특히 추출물 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 양성대조군인 BHT 소거능인 $81.7\% (0.28 \pm 0.05)$ 값의 30% 이상인 것으로 나타났다(Table 7, Figure 2). AP 추출물의 SAR-소거활성 측정에 대한 사후검증결과 대조군에 비해 BHT, 150 $\mu\text{g/mL}$, 130 $\mu\text{g/mL}$ 순으로 높은 것을 알 수 있었다.

고 찰

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 을 포함한 6가 크롬은 독성이 강하기 때문에 중독이 원인이 되고 있으며, 산업장에서 생활과 밀접한 관련이 있는 제 조원료로 사용되고 있다. 또한 독성으로 인한 돌연변이성 물질로도 작용하고 있어 이의 취급 시 각별한 주의를 요한다[20]. 따라서, 본 연구에서는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성을 조사하기 위하여 배양 NIH3T3 섬유모세포에 25~35 μM 농도의 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 을 처리하였다. 그 결과 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 은 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 유의하게 감소되었으며, XTT_{50} 값이 100 μM 이하인 37.5 μM 로 나타남으로서 Borenfreund와 Puerner [21]에 의한 독성판정기준에 근거하여 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 이들은 약제의 독성을 XTT_{50} 값이 100 μM 이하인 경우는 고독성(highly-toxic), 100~1,000 μM 은 중간독성(mid-toxic), 1,000~2,000 μM 은 저독성(lower-toxic)으로 각각 판정하였다. 본 연구 결과는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 과 같은 6가 크롬인 삼산화크롬(CrO_3)의 독성을 배양 섬유모세포에서 보고한 연구 결과와도 일치하였다[5]. 이같이 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 이 배양 NIH3T3 섬유모세포에 독성을 나타낸 것은 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 이 세포내 DNA, RNA와 같은 핵산 물질의 합성을 저해했거나[13], 세포내 단백질합성을 저해하여 세포손상을 유발했을 가능성도 배제 할 수는 없지만[22], 그 보다는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 이 자유라디칼 생성에 의한 산화적 손상을 유발함으로써 세포독성효과를 나타냈을 가능성이 클 것으로 생각된다[19]. 따라서 본 연구에서는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 산화적 손상과 세포독성 간의 상호 관련성을 조사하였다. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 독성과 산화적 손상과의 관련성을 조사하기 위하여 XTT_{50} 농도의 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 을 세포에 처리하기 전 항산화제인 BHT를 배양 세포에 처리한 결과 세포생존율을 유의하게 증가시켰다. 본 실험의 결과는 BHT가 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성을 방어한 것으로써 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성은 산화적 손상이 관여되어 있음을 제시하고 있다. 또한, 본 실험 결과는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 과 같은 6가 크롬인 CrO_3 에 대해 항산화제인 vitamin E가 독성을 방어하였다는 연구 보고와도 일치하였다[20]. 또한, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 세포독성에 대한 AP 추출물의 영향을 조사하기 위하여 AP 추출물이 130 $\mu\text{g/mL}$ 와 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 포함된 각 배양액에서 세포를 전 배양한 결과 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

만의 처리에 비하여 처리 농도 모두에서 세포생존율의 증가를 보였으며 특히, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 유의한 증가를 보였다. 본 연구 결과는 AP 추출물이 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 독성을 방어한 것으로써 flavonoid나 saponin을 함유하고 있는 청미래덩굴 추출물이 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 과 같은 6가 크롬의 독성을 방어하였다는 연구 보고와 일치하였다[4]. 이같은 결과는 AP 추출물속에 함유된 폴리페놀류인 tannin이나 플라보노이드류인 saponin 및 항산화제인 vitamin C와 같은 성분들이 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 산화적 손상을 방어한 결과라고 생각된다. Tannin이나 Saponin [23] 및 vitamin C [13]와 같은 개개 성분의 효능이 이미 밝혀져 있으며, 특히 Jung 등[20]과 Kim 등[15]은, vitamin E가 크롬염의 일종인 CrO_3 의 산화적 손상을 방어하였다는 연구보고들이 이를 증명해 주고 있다. 차후 AP 추출물속의 각 성분에 대한 항산화 분석이 이루어져야 할 필요성이 있다고 생각되나, 본 연구에서는 위 각 성분에 대한 기능 보다는 오히려 이들이 속하고 있는 총폴리페놀류나 플라보노이드류의 함량에 대한 언급이 없어 이를 조사한 결과 각각 47.3 mg/g의 폴리페놀과 24.2 mg/g의 플라보노이드가 다량 함유된 것으로 측정되었다. 이는 Lee와 Seo [24]가 항산화능이 높은 지금초 추출물에서 조사한 51.2 mg/g과 26.5 mg/g과 거의 동일한 양적 수치를 나타냈다. 따라서, 본 연구의 성분분석에서와 같이 AP 추출물의 항산화 효과는 tannin이나 saponin 및 vitamin C가 속해 있는 플라보노이드나 폴리페놀의 강력한 항산화 작용의 영향인 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 AP 추출물의 항산화 효과를 알아보기 위하여 LDH 저해능을 비롯하여 superoxide anion-radical (SAR) 소거능을 조사하였다. 먼저 LDH 활성 저해능에서 AP 추출물 130 $\mu\text{g/mL}$ 와 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 처리에서는 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 만의 처리에 비하여 각각 21.6%와 32.3%로 모두 유의한 활성 저해능을 보였다. 본 실험 결과는 AP 추출물이 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 의 자유라디칼에 의한 막 지질의 산화를 방어한 것으로 추출물의 항산화 작용이 있음을 말해 주고 있다. 이같은 항산화 효과는 AP 추출물의 항산화 성분들의 단독 또는 복합적인 작용 때문인 것으로 생각된다[9]. 특히, vitamin C와 같은 항산화 물질은 분자구조에 페놀화합물처럼 수산기($-\text{OH}$)가 있어 타 물질과의 결합력이 매우 뛰어나 항산화를 비롯한 항염 등에 유효한 생리활성을 나타낸다[13]. 한편, SAR 소거능의 조사에 있어서, AP 추출물 130 $\mu\text{g/mL}$ 와 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 12.4%와 26.1%로 모두 유의한 소거능을 보였다. 본 실험 결과는 AP 추출물이 자유라디칼인 superoxide anion (O_2^-)을 소거할 수 있는 항산화능이 있다는 것을 나타내고 있다. 이같은 항산화능은 AP 추출물속에 함유된 saponin이나 tannin 또는 vitamin C와 같

은 폴리페놀류나 플라보노이드류 및 항산화 성분들의 상호작용 결과로 생각된다[9, 13].

요약

크롬염의 일종인 중크롬산칼륨($K_2Cr_2O_7$)의 세포독성을 배양 NIH3T3 섬유모세포를 재료로 산화적 손상측면에서 조사하였으며, 또한 $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성에 대한 짚신나물(*Agrimonia pilosa* var., AP) 추출물의 영향을 세포생존율을 비롯한 LDH 억제능 및 superoxide anion-radical (SAR) 소거능과 같은 항산화 측면에서 분석하였다. 본 실험에서 배양 NIH3T3 섬유모세포에 25~35 μM 의 $K_2Cr_2O_7$ 을 각각 처리한 결과, 처리 농도에 따라 대조군에 비하여 세포생존율이 유의하게 감소되었으며, 이 때 XTT_{50} 값은 37.5 μM 에서 나타나 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제인 BHT는 $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성을 유효하게 방어하였다. AP 추출물은 $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로써 세포독성을 방어하였다. 이와 동시에, AP 추출물은 LDH 활성 저해능을 비롯하여 SAR 소거능을 보임으로서 항산화 효과를 나타냈다. 위의 결과로부터 $K_2Cr_2O_7$ 의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있는 것을 확인하였고, AP 추출물은 $K_2Cr_2O_7$ 의 독성을 항산화능에 의하여 효과적으로 방어하였다. 따라서, AP 추출물과 같은 천연성분은 크롬과 같은 산화적 손상과 관련된 독성을 방어할 수 있으므로 산화적 손상에 의한 질환 치료를 위한 물질로 활용적 가치가 크다고 사료된다.

Acknowledgements: This paper was supported by Wonkwang Health Science University in 2019.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Lee JH¹, M.D.; Seo YM², Professor.

REFERENCES

1. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ. chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem*. 2001;222:149-158.
2. Zhang Q, Kluz T, Salnikow K, Costa M. Comparison of the cytotoxicity, cellular uptake, and DNA-protein crosslinks induced by potassium chromate in lymphoblast cell lines derived from three different individuals. *Biol Trace Elem Res*. 2002; 86:11-22.
3. Aija J, Broges KM, Floyd RA, Wetterhahn KE. Role of chromium (V), glutathione thiol radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol Environ Chem*. 1989;22:135-148. <https://doi.org/10.1080/02772248909357432>.
4. Oh YL. Protective effect of *Smilax china* L. extract on the cytotoxicity induced by chromium of environmental pollutant. *J Korean Soc People Plants Environ*. 2011;14:29-34.
5. Patlolla AK, Barnes C, Hackett D, Tchounwon PB. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma(HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6:643-653.
6. Son YW, Rim YS, Seo YM. Protective effect of NMDA receptor antagonist on the neurotoxicity induced by lead as an environmental pollutant. *J Korean Soc Occup Environ Hyg*. 2017; 27:193-200. <https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2017.27.3.193>.
7. 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 effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2007;113:115-124. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.016>.
8. Wang L, Yu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distingtive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem*. 2006;54:9798-9804. <https://doi.org/10.1021/jf0620719>.
9. Ma J, Luo XD, Protiva P, Yang H, Ma C, Basile MJ, et al. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota* (Sapodilla). *J Nat Prod*. 2003;66:983-986. <https://doi.org/10.1021/np020576x>.
10. Kim TG. The pictorial plant book. 1st ed, Seoul: Jeoydang academic publishing; 2009. p110.
11. Li YM, Bae JH, Jung HY, Kim JH, Park DS. Antioxidative activity in water and methanol extract from Korean edible wild plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40:29-36.
12. Seo YM, Kim NS. Effect of superoxide dismutase on oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin melanocyte. *J Korean Soc Occup Environ Hyg*. 2009;19:261-269.
13. Tsou 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. <https://doi.org/10.1021/tx9802264>.
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. Kim SE, Yang BS, Choi YS. Cytotoxicity and effect of *Lonicerae flos* extract against chromium, contact dermatitis-induced agent in cultured human skin fibroblasts. *J Korean Soc People Plants Environ*. 2012;15:407-412.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
17. Son YW, Choi YR, Seo YM. Protective effect of kaempferol on cultured neuroglial cells damaged by induction of ischemia-like condition. *Biomed Sci Let*. 2017;23:339-347. <https://doi.org/10.15616/BSL.2017.23.4.339>.
18. AOAC. Official methods of analysis. 18th ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists; 2005. p22.

19. Nieva Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol.* 2000;71:109-114. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00189-0).
20. Jung JY, Oh SK, Park SH, Yoon MY, Yu YW, Rim YS, et al. Antioxidative effect of *Ajuga multiflora* BUNGE extract on chromium trioxide, dermatitis inducer in cultured NIH3T3 fibroblasts. *J Invest Cosm.* 2014;10:193-199.
21. Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J Tiss Cult Meth.* 1985;9:7-9.
22. Rim YS, Seo YM, Son YW, Oh YL. Effect of *Salicornia herbacea* L. extract on protein synthesis and cytotoxicity in cultured C6 glioma cells. *J Korean Soc People Plants Environ.* 2012;15:149-154.
23. Kwak WJ, Han CK, Chang HW, Kim HP, Kang SS, Son KH. Loniceroside C, an antiinflammatory saponin from *Lonicerae japonica*. *Chem Pharm Bull.* 2003;51:333-335.
24. Lee SH, Seo YM. Alleviating effects of *Emphorbiae humifusae* L. extract on the neurotoxicity induced by lead. *Korean J Clin Lab Sci.* 2018;50:501-510.