J. Fd Hyg. Safety 17(4), 188-192 (2002)

In vitro 실험법에 의한 천연물 중의 UVB 광독성 억제제 검색

김현진* · 이경아 · 김봉희
한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, 충남대학교 약학대학*

In vitro Screening of Natural Product Inhibitors on the UVB Phototoxicity

Hyun-Jin Kim*, Kyung-A Lee, Bong-Hee Kim
**Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 107, Yusong-ku, Taejon 305-606, Korea*
College of Pharmacy, Chungnam National University Taejon, Korea

ABSTRACT – The phototoxicity inhibitory activity of 15 natural products having antiinflammatory effect was screened by three *in vitro* methods : yeast growth inhibition test with *Candida albicans*, RBC photohemolysis and MTT assay. We induced phototoxic reaction by irradiating UVB (312 nm) on chlorpromazine (CPZ) that has been widely documented as phototoxic agent in clinical and experimental studies and then observed the effects of the natural products after treating them with CPZ. In yeast growth inhibition test, *P. persica* and *E. officinalis* showed the inhibitory effect on the UVB phototoxicity and *E. officinalis*, yeast, *P. suffruticosa* showed phototoxicity inhibitory effect in that their % hemolysis compared with control were 45.76 ± 0.91, 34.42 ± 1.01, 35.30 ± 4.76 on UVB. In MTT assay, all tested natural products increased cell viability compared with the contorl.

Key words: UVB phototoxicity inhibitors, Natural producets, Yeast growth inhibition, RBC photohemolysis, MTT assay, Chlorromazine

90년대에 들어서면서부터 남반구에서 오존이 감소함에 따라 UVB 조사량이 증가하는 것이 관측되었고[1], 캐나다에서는 수년 동안의 오존감소에 의해 UV 조사량이 증가하고 있다는 것이 보고된 바 있다[2]. 또한 한반도 상공의 오존 감소 추세는 지난 10년 동안 오존 전량의 4% 가량 감소한 것으로 나타났으며[3], 이에 의한 피부암의 유해도가 증가된다고 보고되었다[4]. 오늘날 생활의 여유가 생김에 따라 야외 레저 활동에 대한 일반의 요구가 증가됨과 동시에 환경 오염 물질이나 프레온 가스로 대표되는 halogenated hydrocarbon류 등에 의한 오존층의 파괴에 기인한 자외선량의 증가로 인해 자외선의 폐해는 자못 심각한 상태에 이르렀으므로 화학물질에 대한 광독성 및 광알러지에 대한 학자 및 일반인의 관심이 증가하고 있는 추세이다[5,6].

독성과 관련된 자외선은 UVA(320~400 nm), UV-B(280~320 nm), UV-C(220~280 nm)의 3부분으로 나뉘는데[7], 이 중 UVC는 성층권에 존재하는 오존층에 흡수되어 지구에 거의 도달되지 않으며, UVA, UVB만이 지표에 도달되어 피부에 영향을 미친다. UVA는 직접 또는 간접으로 색소 침착 등에 영향을 미치고, 진피의 유두층, 망상층까지 영향을 미쳐 탄력섬유(elastin)와 콜라겐(collagen)의 붕괴에 의한 탄력 감소, 조기 노화, 모세혈관의 확장 및 파괴등을 일으키고, UVB는 지표에 도달하는 태양광선의 에너지 중 1.5%에 불과하지만 일광 화상(sun burn)[8], 피부암, 피부 노화 등 생물학적 변화를 초래하는 주된 원인이 되지만 세포 파괴작용은 거의 없는 것으로 알려져있다. 이와 같은 광독성 반응을 억제하기 위해 많은 억제 물질들이 발표되었는데, tannic acid, ascorbic acid, quinidine, 천연물의 추출물들이 피부 등에서 광독성을 억제한다고 보고되었으며[9], ascorbic acid, reduced glutathione, α-tocopherol, retinol, uric acid, cystine 등은 free radical을 제거하는 보호 활성을 갖고 있는 것으로 보고되었다[10,11].

본 연구에서는 광독성은 화학물질에 의해 비면역학적으로 일어나는 피부의 자외선 및 가시광선 등 광자극에 대한 이상반응으로 그 외적 증상인 홍반, 부종 등이 염증의 증상과 비슷하다는 것과, 비스테로이드 계열 항염 약물들과 광독성의 상관관계에 대한 동물실험 및 임상실험이 다수 보고된 바가 있는 사실에 착안해[12,13], 소염 효과를 나타내는 생약을 15종(Table 1) 선별하여, 이들 생약의 추출물질이 화학물질

†Author to whom correspondence should be addressed.

에 의한 광독성에 미치는 영향을 조사, 광독성 억제 활성을 갖는 종들을 검색해 보고자 하였다. 수종의 식품, 의약품, 화장품 등의 화학물질이 광과민 물질(photosensitizer)로 작용을 하는데, 본 실험에서는 향정신 의약품으로 사용되는 phenothiazine tranquilizer 중 연구가 가장 많이 되어있는 chlorpromazine을 광독성 유발 물질로 사용하였다[14]. chlorpromazine의 화학구조 중 2번 위치의 -Cl기에 의해 독성이 증가된다고 보고되었고[15], 그 구조과 독성과의 관계[16], toxic photoproduct의 형성[17,18], free radical 생성[19,21], 생세포와 광결합[22,23] 등에 대한 연구가 많이 보고되어왔다.

이러한 chlorpromazine에 UVB를 각각 조사하여 광독성을 유발시키고, 다양한 *in vitro* 실험법 중 *Candida albicans* test, RBC photohemolysis, MTT assay에 의한 cytotoxicity 측정법의 방법을 이용하여 생약 추출물들의 광독성 억제 활성 효과의 유무 및 정도를 검색해 보았다.

재료 및 시험방법

시료 및 시약

시료 – 문헌조사 결과 소염효과를 나타내느 것으로 알려져 있어 광독성 억제 효과의 검색실험에 사용된 생약 15종의 학명 및 생약명은 Table 1과 같다.

각 생약은 전초를 20 g씩 취해 80% methanol을 100 m*l* 씩 가한 후, 3시간 동안 환류추출을 2회 반복하고, 온시에 여과하여 감압하에서 농축하였다. 원래 여액의 1/10정도로 될 때까지 농축시킨 후, -76°C에서 1~2일 동안 동결시킨 후 동결건조하여 분말상으로 만들어 밀폐하여 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

Table 1. List of the 15 natural products investigated

Sample No.	Scientific name	Crude drug name
1. 박하	*Mentha arvensis*	Menthae Herba
2. 대추	*Zizyphus jujuba*	Zizyphi Fructus
3. 창이자	*Xanthium stramonium*	Xanthii Fructus
4. 결명자	*Cassia obtusifolia*	Cassiae Semen
5. 도인	*Prunus persica*	Persicae Semen
6. 오수유	*Evodia officinalis*	Evodiae Fructus
7. 맥문동	*Liriope platyphylla*	Liriopis Tuber
8. 황백	*Phellodendron amurense*	Phellodendri Cortex
9. 효모	*Yeast*	Yeast
10. 구기자	*Lycium chinense*	Lycii Fructus
11. 상백피	*Morus bombycis*	Mori Cortex Radicis
12. 목단피	*Paeonia suffruticosa*	Moutan Cortex Radicis
13. 감초	*Glycyrriza glabra*	Glycyrrhizae Radix
14. 원지	*Polygala tenuifolia*	Polygalae Radix
15. 방기	*Sinomenium acutum*	Sinomeni Caulis et Rhizoma

시약 – Chlorpromazine(CPZ)은 국립보건원에서 공급받아 사용하였으며, 균주 및 세포 실험에 사용된 trypsin-EDTA, Sabouraud's dextrose agar medium, nutrient agar, peptone, yeast extract, glucose, DMEM 분말배지, fetal bovine serum은 Gibco에서 trypan blue, penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate는 Sigma에서 각각 구입하여 사용하였으며, 기타 시약 및 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다.

사용기기

Freeze dryer(ALPHA1-4, Christ, Germany), Refrigerated centrifuge(UNION 32R, Hanil, Korea), UV/VIS Spectrophotometer(V-550, Jasco Co., Japan), Clean bench(MM-80, Shin Seang Instrument Co., Korea), Autoclave(Koma, Korea), UV irradiator(RMX-3W), UV detector(RMX-3W, VILBER LOURMAT, France), Low temperature incubator(BI-600M, Jeio Tech, Korea), CO_2 incubator(Forma Scientific Inc., USA), Ice-maker(AK-325A, Vetec Corp., USA), Phase contrast microscope(Axiovert 25, ZEISS, Germany), Micro plate reader(Molecular Devices) 등을 사용하였다.

적정 UVB 조사량 결정

27°C에서 48시간 배양한 *Candida albicans* 균주를 YPD 배지로 희석하여 균주 현탁액(약 10^8 spores/ml)을 만들어 Sabouraud dextrose(SD) agar plate 상에 고르고 접종하였다. CPZ은 3차 증류수에 용해하여 3, 4, 5, 6, 8 및 10 mg/m*l* 농도의 용액을 조제하였고, 지름 8 mm의 paper disk에 100 μ*l*씩 분주한 후 충분히 흡수되도록 4시간 방치하였다. 4시간 경과후 SD agar plate에 paper disk를 위치시킨 후, UVB를 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 3.0 J/cm^2 조사하고, 27°C에서 72시간 배양하였으며, 배양 후 paper disk 주위에 형성된 투명대의 크기(mm)를 측정하여 최적 UVB 조사량을 결정하였다.

Candida albicans test

Candida albicans 균주 현탁액을 준비하고, 생약 시료 및 CPZ은 증류수에 용해하여 각각 1 mg/m*l*, 6 mg/m*l* 농도의 것을 준비하였다. paper disk에 CPZ 용액 100 μ*l*를 흡수시키고 충분히 확산시킨 다음 생약 시료 용액을 100 μ*l*씩 흡수시켰다. 미리 *Candida albicans* 균주를 접종시켜 놓은 SD agar plate 상에 paper disk를 올려놓고, UVB를 2.1 J/cm^2 조사한 후, 72시간 배양하고, 투명대의 생성 여부 및 그 크기(mm)를 관찰하였다. 각 plate에는 CPZ만 흡수시킨 대조군을 하나씩 두었으며, 시료 자체에 의한 광독성 여부를 알아보기 위하여 CPZ을 제외하고 시료만 처리하여 같은 시

험을 수행하였다.

Photohemolysis test

Khan 등의 방법[15]을 사용하여 두가지 방법으로 실험하였다. phosphate buffer를 이용하여 CPZ은 50 μg/m*l*, 생약시료는 1 mg/m*l* 농도의 용액을 조제하고, 석영튜브에 CPZ 3 m*l*, 시료용액 3 m*l* 및 적혈구 20 μ*l*를 함께 취하여 섞어준 다음, UVB를 3.0 J/cm^2 조사하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각의 상등액을 3 m*l* 취해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 0.04% NH_4OH 5 m*l*과 적혈구 20 μ*l*를 혼합한 후 상기와 같은 방법으로 측정한 값을 100% hemolysis용액에 대한 값으로 하고 시료용액에 대한 % hemolysis를 비교하여 각 약물의 photohemolysis에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한 L-ascorbic acid와의 결과 비교를 위하여 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/m*l* 농도의 L-ascorbic acid를 이용하여 위와 같은 실험을 하였다.

MTT assay

Fibroblast 13p cell은 계대배양하여 96 well plate에 1×105개를 분주하였으며, 37°C, CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 시험세포가 배양된 plate의 배양액을 제거한 후 PBS에 용해시킨 100 μg/m*l* CPZ 100μl 및 1 mg/m*l* 농도의 각 시료용액 100 μ*l*를 넣은 다음 1시간 동안 배양해 시험물질에 노출시키고, UVB 1.5 J/cm^{2}를 조사한 후 각 well의 시험물질을 제거하고 PBS로 세척하여 배지로 교환한 후 20시간 동안 배양하였다. UVB 조사 후 37°C, CO_2 배양기에서 20시간 배양한 plate에 well 당 MTT 시액(5 mg/m*l*)을 20 μ*l*을 넣고, 4시간 더 배양한 다음 원심분리하여 배지를 버리고 formazan 잔사를 DMSO에 녹인 후 Micro plate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 세포 생존율을 의미하며 인산 완충액만 처리했을 때의 흡광도를 100으로 하여 %로 나타내었다.

실험 성적은 mean±S.D.로 표시하였고, 통계적 유의성은 Student t-test에 준하여 검정하였다.

결과 및 고찰

적정 UVB 조사량 결정

CPZ 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 mg에 대하여 각각 UVB를 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1, 3.0 J/cm^2 조사하고 paper disk 주위에 형성된 투명대를 관찰한 결과, 투명대의 크기가 3.5 mm일 때인 CPZ 0.6 mg, UVB 2.1 J/cm^{2}가 UVB에 의한 광독성 유발에 적정치로 생각되었다. (Fig. 1) 실제로 한국 대구지방의 경우 하루동안 조사되는

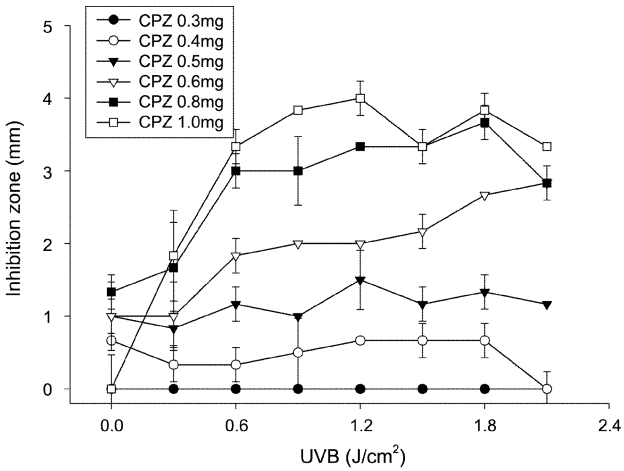

Fig. 1. The phototoxicity is dependent on the irradiated capacity of UVB and chemical concentration.
*Results are the diameters (mm) of inhibition zones formed around the paper disks.
*UVB - 312 nm.
*All values are the mean±S.D. of experiments (n=3).

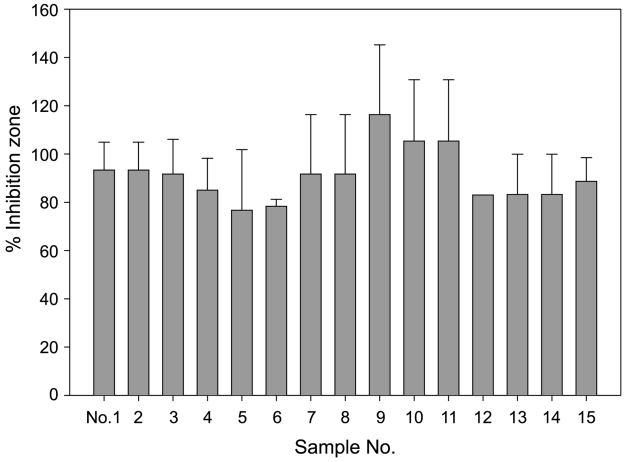

Fig. 2. The effect of samples on the inhibition zone size on Candida albicans followed by UVB irradiation.
*UVA-312 nm, 2.1 J/cm^2
*sample (1 mg/m*l*) - 100 μ*l*
*All values are the mean±S.D. of experiments (n=3)

UVB 양은 1995년부터 1998년까지 평균 1.045 J/cm^{2}인 것으로 보고되었으므로, 이 실험에서 결정한 2.1 J/cm^{2}은 현실적으로도 타당한 수치로 생각되었다.

UVB의 경우 1.8 J/cm^{2}까지는 UV조사량 및 CPZ 농도의 증가에 따라 투명대의 크기가 점차 증가되는 것을 관찰할 수 있었으나, UVB의 양을 더 증가시키자 오히려 투명대의 크기가 감소했으며, 3.0 J/cm^2 조사시에는 *Candida albicans*가 생장 증식하지 않아 투명대의 형성을 관찰하는 것이 불가능

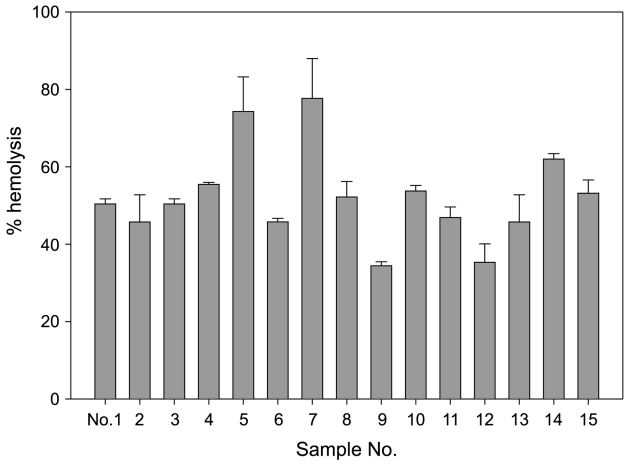

Fig. 3. The effect of samples on RBC photohemolysis followed by UVB irradiation.
*conrol : 0.04% NH_4OH 6 m*l*, 1~15 : 3 m*l* CPZ + 3 m*l* Sample soln.
*UVB-312 nm, 1.5 J/cm^2.
*All values are the mean±S.D. of experiments (n = 4).
**Significantly different from the control ($p < 0.01$).

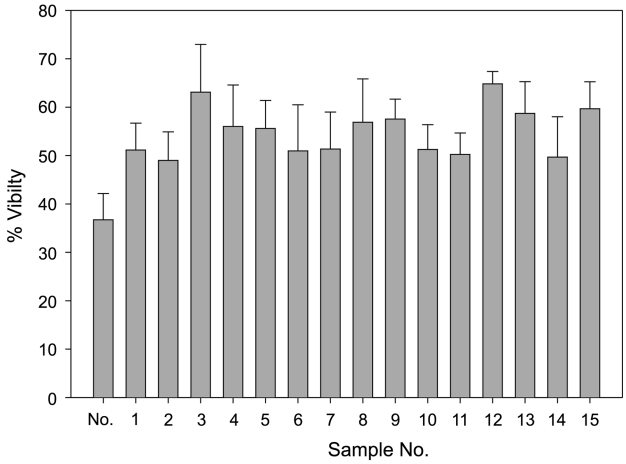

Fig. 4. Phototoxicity inhibitory effect of the natural products in the MTT assay.
*fibroblast 13p cells were exposed to CPZ and sample and irradiated with UVB
*Results are % viability.
*UVB-312 nm, 1.5 J/cm^2.
*All values are the mean±S.D. of experiments (n = 5)
*All samples were significantly different from the control ($p < 0.05$).

해지는 결과를 얻었다. *Candida albicans*는 광조사 후에 화학물질이 효모의 발육을 억제하는 정도를 투명대의 크기를 측정함으로써 평가하는 것인데, 3.0 J/cm^{2}의 UVB는 *Candida albicans*의 생육 자체를 억제하는 정도의 독성을 나타내는 조사량이기 때문에 이러한 결과가 나온 것으로 사료되었다.

Candida albicans test

CPZ 0.6 mg을 미리 흡수시킨 paper disk에 1 mg/m*l* 농도의 생약 시료를 100 μ*l*씩 가하고, UVB를 2.1 J/cm^2 조사하여 *Candida albicans* test를 행한 결과, *P. persica, E. officinalis*의 경우 생약시료를 처리했을 때의 투명대 크기는, CPZ만 처리한 대조군을 100으로 보았을 때, 각각 76.67±25.17, 78.33±2.89로 큰 감소효과를 보였다(Fig. 2). UVB 조사시 생약자체에 의한 광독성 유발 효과는 paper disk 주위에 투명대가 거의 생기지 않는 것으로 보아 자체효과는 없는 것으로 생각되었다.

Photohemolysis test

UVB 조사시 CPZ에 의한 photohemolysis에 미치는 생약시료의 영향을 알아보기 위하여 0.04% NH_4OH 용액에 대한 % hemolysis를 살펴본 결과 Yeast, *P. suffruticosa*가 각각 34.42±1.01, 35.30±4.7로 유의성있는($p<0.01$) 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3). 적혈구는 세포내 소기관이 없이 세포막만이 존재하는 단일체계로 이루어져 있으므로 photohemolysis test는 세포막 손상을 일으키는 약제의 검사에 적합하다고 알려져 있으므로, 여기에서 효과를 나타낸 생약 추출물들은 막손상을 억제하는 기전에 의해 광독성을 억제하는 것으로 판단되었다.

MTT assay

UVB 조사시 UV를 조사하지 않은 대조군에 비하여 세포생존율이 감소함을 알 수 있었으며, CPZ만 처리한 대조군에 비해 생약 추출 시료 처리군의 세포생존율은 모두 증가되는 결과를 나타내었다(Fig. 4).

국문요약

소염효과를 나타내는 생약 15종을 선별하여 이들 생약 추출물이 Chloropromazine에 의한 UVB 광독성에 미치는 영향을 *in vitro* 실험법 중 *Candida albicans* test, RBC photohemolysis, MTT assay에 의한 cytotoxicity 측정법의

방법을 이용하여 조사 하였다. *Candidal albicans* teat에 의해 광독성의 광량 및 화학물질 의존성을 관찰할 수 있었으며, 광독성 억제 효과를 검색하기에 적당한 UVB 조사량 및 CPZ 농도는 2.1 J/cm^2, 0.6 mg인 것으로 생각되었다. *Candida albicans* test에 의해 CPZ에 의한 UVB 광독성에는 *P. persica*, *E. officinalis*가 억제효과를 보임을 알 수 있었으며, RBC photohemolysis 결과 모든 생약시료들에 대해 hemolysis가 감소되었으며, 특히, Yeast, *P. suffruticosa*에 의한 % hemolysis는 34.42±1.01, 35.30±4.7로 유의성있는 억제효과를 나타냄을 관찰할 수 있었다. MTT assay에 의한 cytotoxicity 측정 결과, UVB 조사에 이하여 세포생존율은 감소되었고, 시료처리시 세포생존율은 증가됨을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Seckmeyer, G. B., Mayer, R. E. and Bernhard, G.: UV-B in Germany Higher in 1993 than in 1992. *Geography, Res. Lett.* **21**, 577 (1994).
2. Augustin C, *et al.*: Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds *in vitro*, *Photoderm Photoimmun & Photomed*, **13**, 27-36 (1997).
3. 조희구, 김해경, 이규태: 서울의 오존전량 변화 경향. *한국기상학회지* **30**(2), 219 (1994).
4. Shin, *et al.*: Estimating skin cancer caused by UVB. *Kor. J. ENVIRON. TOXICOL.* **11**, 1-10 (1996).
5. Edward, S. M., *et al.*: Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model, skin^{2TM}, *Photoderm Photoimmun & Photomed*, **10**, 111-117 (1994).
6. Kerr, J. B. and Wardle, D. I.: Ozone and UV-B Monitoring Program in Canada in Private Communication. (1994).
7. Woodcock, A. and Magnus, I. A. : The sunburn cell in mouse skin: preliminary quantitative studies on its production. *Br. J. Dermatol.*, **95**, 459-468 (1979).
8. Donald, L. B., Daniel, P. H. and Thomas, V. O.: An animal model of solar aged skin : Histological, physical, and visible changes in UV irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**(3), 367-378 (1987).
9. Gensler, H. L., Gerrish, K. E., Williams, T., and Roe, G.: Provontation of photocarcinogensis and UV-induce immunosuppression in mice by topical tannic acid. *Nutr. Cancer.*, **22**, 121 (1994).
10. Halliwell, B. and Gutteridge, J.: *M. C. Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 1 (1990).
11. Keino, H., M. S, N. H., B. T.,and K. S.: Protection by L-ascorbic acid against phototoxicity in tin-protoporphyrin-treated suckling rats. *Biol. Neonate*, **63**(2), 183-190 (1993).
12. Klingman, A. M. and Kaidbey, K. H.: Phototoxicity to benozaprofen, *Eur. J. Rheum. Inflam.*, **5**, 123-137 (1982).
13. Ljunggren, B.: Propionic acid-derived non-steroidal antiinflammatory drugs are phototoxic in vitro, Photodermatology, **2**, 3-9 (1985).
14. Raymond J. M. Niesink, John de Vries, and Mannfred A. Hollnger: Toxicology Principles and Applications, CRC Press 512-514 (1996).
15. Kahn. G., Fleischaker. B.: Red blood cell hemolysis by photosensitizing compounds. *J. Inverst. Dermatol.* **56**, 85-90 (1971).
16. Ljinggern, B., Moller, H.: Phototoxic reaction to chlorpromazine as studied with the quantitative mouse tail technique. *Acta. Derum.*, **56**, 373-376 (1976).
17. Saucin, M.: Mechanism of photosensitization by phenothiazine derivatives. *Acta. Int. Physiol. Biochem.*, **87**, 1051-1052 (1979).
18. Guy, F. W., Kays, H. K., and Alvert, M. K. : Phototoxicity from benoxaprofen; *In vivo* and *in vitro* studies. *Photochem. Photobiol.*, **36**, 59-64 (1982).
19. Moore, D. E. and Tamat, S. R. : Photosensitization by drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 172-177 (1989).
20. Lijunggern, B., Moller, H.: Phenothiazine phototoxicity; An experimental study on chlorpromazine and its metabolites. *J. Invest. Dermatol.*, **68**, 313-317 (1977).
21. Chignell. C. F., Motten. A. G. and Buettner. G. R.: Photoinduced free radicals from chlorpromazine and related phenothiazines : relationship to phenothiazine induced photosensitization. Environ. Health. Perspect. **64**, 103-110 (1985).
22. Marko, J., Vermeersch, G., Febvay-Garot, N., and Lablache-Combier, A.: Photo-CIDNP in nuclei acid bases and their nucleotides induced by chlorpromazine and analogs. *Photochem. Photobiol.*, **42**, 213-221 (1985).
23. Tomas, A. C., Gary, A. E., and Irene, E. K.: Photoaddition of chlorpromazine to guanosine-5-monophosphate. *Photochem. Photobial.*, **43**, 607-613 (1986).