

Paraquat의 독성 parameter 검색 및 그 독성 경감제 연구

정 세영
경희대 약대

1. Introduction

Paraquat(PQ)는 식물의 광합성 과정중 세포내 전자전달과정을 차단함으로써 제초작용을 나타내는 농약으로 사람에게 있어서의 치사량이 4mg/kg으로 비교적 독성이 강한 농약에 해당된다.

자살 또는 실수로 마실 경우 운동실조, 이상흥분, 경련을 거쳐 신부전, 간기능이상을 일으키고 수일후에 호흡곤란을 일으켜 사망하게 된다. PQ의 폐로의 유입은 type I, type II alveolar cell에 의한 active transport에 기인하며 이는 PQ노출경로에 관계없이 폐에 고농도로 존재하는 원인이 된다.

PQ의 폐독성 기전으로는 NADPH Cyt P₄₅₀ reductase에 의한 PQ의 산화 환원과정에서 생성되는 superoxide anion (O₂⁻)이 폐세포막의 불포화지방산 함유 지질을 공격하여 lipid peroxide를 생성한다는 것과 폐내의 alveolar macrophage로 부터 분비된 neutrophil chemotactic factor에 의한 neutrophil 대량유입과 염증유발이 그 원인이라는 것이 일반적으로 받아들여지고 있다.

PQ독성경감 목적으로 초기에는 Fuller's earth suspension, 활성탄, bentonite 등 체내 흡수저하나 배설촉진제가 사용되고 있으며 약물로는 항염증제인 glucocorticoid, D-propranolol 등이 가장 많이 이용되며 항산화제인 vitC, vitE, SOD(superoxide dismutase) 등이 연구되어지고 있다.

1995년 이후 PQ가 폐로 유입되는 과정에서 putrescine과 같은 amine화합물의 receptor를 이용한다는 점에 착안하여 spermine, spermidine 등의 polyamine화합물과 oxygen radical생성 차단제로 NADPH Cyt P₄₅₀ reductase inhibitor, xanthine oxidase inhibitor 및 장에서의 흡수억제 목적으로 sugar sulfate제제, polyvinyl sulfate류가 연구 진행중에 있다.

그러나 아직까지는 임상에서 paraquat독성을 억제 또는 치료하기 위해 효과적으로 사용할 수 있는 약물은 없는 상태이며 그 원인으로서는 paraquat의 신장, 간장, 폐독성의 생화학적 parameter가 확립되지 않았다는 점과 이제까지 사용되던 약물들은 주로 생체내 존재하는 항산화 성분으로서 체내 모든 조직, 장기에서 필요로 함으로 고용량을 투여하여도 실제 폐로 가는 양이 거의 없으며 SOD와 같은 radical scavenger효소도 반감기가 짧다는 문제점을 지니고 있기 때문이다.

따라서, paraquat 독성 발현에 따른 생체 각 장기의 생화학적 parameter를 우선 확립하고 강한 항산화능 (oxygen radical제거능)을 가지며 체내 대사속도가 늦어 폐를 비롯한 신장, 간장에 다량 분포 할 수 있는 물질을 개발하는 것이 독성 경감제 개발의 지름길이 된다 하겠다.

이런 의미에서 본 연구실에서는 paraquat의 각장기에 대한 독성 발현 정도를 파악 할 수 있는 혈액 및 각 장기의 생화학적 parameter를 효소 활성 변화, 생체상 성분의 양적 변화 등의 분석을 통하여 확립하고 이를 토대로 천연성분을 이용하여 in vitro, in vivo에서의 독성 경감 정도를 봄으로써 paraquat 독성경감제 개발에 도움이 되고자 하였다.

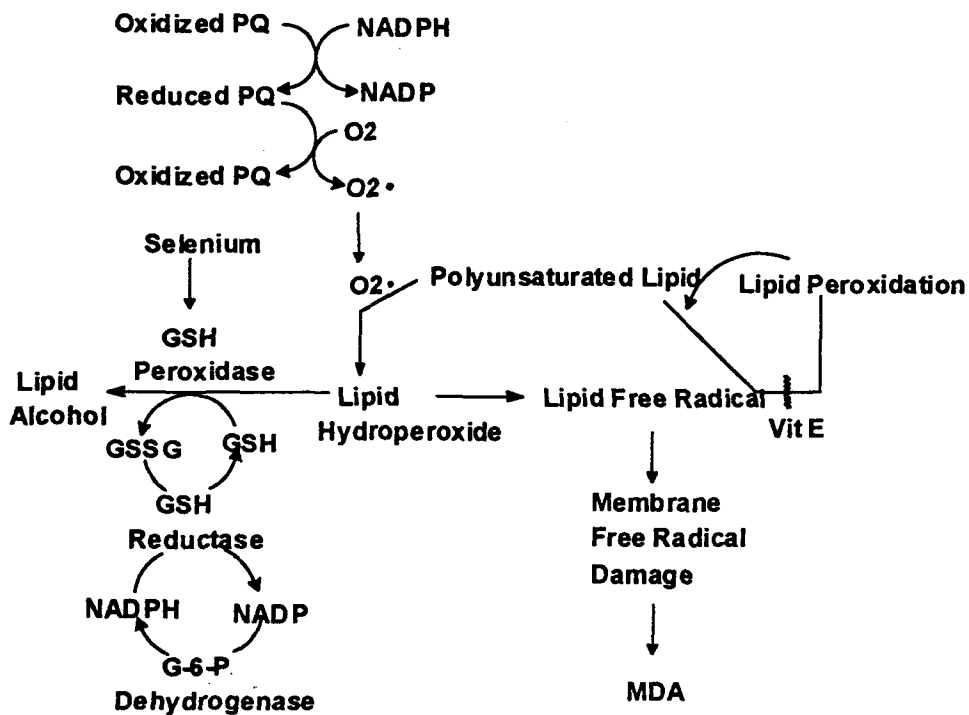


Fig 1. Proposed mechanism of PQ toxicity.

2. Paraquat 독성 발현 parameter 검색

Paraquat 독성 발현 parameter로서 혈액생화학적 인자, 조직중 효소활성, collagen, MDA 생성량을 검토하였다.

1) 혈액 생화학적 인자

혈액생화학적 인자로서 간독성지표인 GOT, GPT, 신독성지표인 BUN, creatininc, 조직손상지표인 alkaline phosphatase(ALP), 과산화물인 malon dialdehyde(MDA)량을 측정하였다.

그 결과 간독성지표인 GOT, GPT는 정상치의 5배, 신독성지표인 BUN은 정상치의 2배, creatinine은 4배로 증가되었으며 MDA는 5배 증가된 수치를 나타냈다.

ALP활성은 약 50%의 활성증가가 보였다.

이들 인자들은 재현성도 우수하였으며 통계처리결과 유의성이 검증되었으므로 PQ독성 발현인자로서의 의의를 갖는 것으로 판명되었다.

2) 조직 생화학적인자

① Malon dialdehyde(MDA) 생성량

PQ의 주된 독성기전중의 하나가 radical생성에 의한 조직손상이므로 지질과산화물의 최종생성물인 MDA생성량을 조직 (간, 폐)에서 측정하였다.

폐조직에서의 MDA생성량은 PQ투여군이 정상군에 비해 약간 증가하였으나 간조직중에서는 오히려 증가하는 추세를 보였다.

이는 조직중 MDA 생성량과 혈중 MDA량과의 동시 분석을 통하여 조직손상을 해석하여야 한다는 것을 뜻한다 하겠다.

② Glucose-6-phosphate(G-6-Pase) 활성

G-6-Pase 활성은 MDA가 생성되는 과정에서 MDA생성보다 민감하게 이 효소의 활성저하가 나타난다는 보고에 따라 폐, 간 조직중 활성을 측정하였다.

간, 폐조직의 G-6-Pase활성은 정상군에 비해 10% 정도 감소하여 MDA생성과 유사한 경향을 나타냈다.

③ Alkaline phosphatase(ALP) 활성

혈중 ALP 활성증가는 폐, 간조직의 손상에 따른 2차적인 현상으로 생각되어 폐, 간조직중의 ALP 활성을 보았으며 간, 폐조직 양쪽 다 50%의 감소가 나타남을 확인할 수 있었다.

④ Collagen 생성량

PQ에 의한 폐독성의 최종단계가 fibrosis에 의한 호흡부전 및 사망이므로 폐조직중의 collagen량을 hydroxyproline량으로 측정하였으며 정상군에 비해 30% 정도 증가되는 것을 볼 수 있었다.

이들 결과로 부터 paraquat는 SD rat에 간장, 신장, 폐독성을 유발하여 혈액 생화학적 검사에서 간독성 지표로 sGOT, sGPT치의 상승, 신장독성 지표로 BUN, creatinine치의 상승 및 조직손상 지표인 ALP, MDA치의 상승을 나타내었음을 확인할 수 있었다. 조직중에서는 간 및 폐조직중 MDA량의 증가, G-6-Pase 활성의 저하, ALP 활성의 저하 및 폐조직중 collagen량의 증가가 나타났다. 특히 혈액중 MDA 및 조직중 ALP 활성이 PQ 투여로 가장 민감하게 반응하였으므로 초기 PQ 급성 중독시 parameter로서의 좋은 지표가 된다고 여겨진다.

3. 천연물로 부터 독성경감제 개발

PQ에 의한 폐, 간조직 과산화물 생성에 따른 조직손상이 혈액, 조직중 생리 활성물질, 효소활성의 변화를 초래한다는 가정하에 항산화능을 가지며 천연에서 쉽게 구할 수 있는 gallic acid와 그 ester화합물을 대상으로 독성억제 정도를 측정하여 보았다.

Ester화합물로서는 methyl, ethyl, propyl, butyl, octyl, dodecyl gallate를 사용하였으며 이는 탄소수 증가에 따른 지용성 증가가 조직세포에 대한 친화성을 높여줌으로써 gallate 자체의 항산화능에 대한 효율증가 효과를 보고자 함이었다.

그 결과 gallic acid 및 그 유도체들은 in vitro에서 효소적, 비효소적 지질과산화 유도에 대하여 강한 항산화 작용을 나타내었으며 octyl gallate 및 dodecyl gallate는 NADPH Cyt P₄₅₀ reductase activity에 영향을 미치지 않았으므로 paraquat 독성 경감제로서 유리함을 보였다. In vivo에서는 paraquat로 유도된 혈액 생화학적 인자들을 정상치로 회복시키는 경향을 나타내었다. 또한 조직중 alkaline phosphatase 활성의 회복 및 폐조직중 collagen 생성을 억제하는 경향을 나타내어 paraquat 독성 경감제로서의 가능성을 보였다.

이외에도 천연항산화제인 β -carotene, aloesin, taurine의 PQ 독성 억제 효능을 검색한 바 있으며 taurine과 aloesin이 효능이 우수함을 확인 하였다.

4. 금후의 전망

PQ는 자살 또는 실수로 마신 환자가 병원에 입원하여 임상적으로 치료가 되어 살아나는 case는 드물게 학회에 발표될 정도로 사망률이 높은 농약으로 해독제를 개발하는 것이 매우 시급한 실정이다.

따라서, 체내에서 오랜기간 항산화 작용을 나타낼수 있거나 SOD, catalase, GSH peroxidase와 같은 항산화 효소계 활성을 높여줄 수 있는 천연성분을 찾으려는 노력은

매우 중요하며 서론에서 제시한 약물 이외에도 PQ 대사 과정에 관여하는 NADPH Cyt P₄₅₀ reductase 활성을 조절하거나 염증유발에 따른 면역세포의 과활성화를 제어할 수 있는 약물을 찾으려는 새로운 시도가 되어야 할 것이다.

Table 1. Effects of gallic acid and its derivatives on biochemical parameters in serum of PQ treated rats.

Fig 2. Effect of gallic acid and its derivatives on hepatic ALP activity in PQ treated SD rats.

Fig 3. Effect of gallic acid and its derivatives on pulmonary ALP activity in PQ treated SD rats.

Fig 4. Lung hydroxyproline contents of SD rats treated with PQ and Gallates.

Fig 5. Inhibitory effect of gallic acid and its derivatives on lipid peroxidation induced by PQ and lung microsomal fraction.

Table 1. Effects of gallic acid and its derivatives on biochemical parameters in serum of PQ treated rats

	GOT (unit)	GPT (unit)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	ALP (KA unit)	MDA (μ g/ml)
normal	37.5 \pm 0.95	19.0 \pm 1.93	14.3 \pm 0.83	0.476 \pm 0.084	13.6 \pm 0.40	1.71 \pm 0.04
PQ	176.6 \pm 13.58	52.6 \pm 4.16	34.6 \pm 1.73	1.711 \pm 0.212	19.8 \pm 1.55	7.55 \pm 0.49
PQ + GA	74.8 \pm 5.82	31.0 \pm 4.29	29.7 \pm 4.26	0.662 \pm 0.059**	14.2 \pm 1.49	3.65 \pm 0.29**
+ EG	101.0 \pm 13.62	52.4 \pm 13.17	26.3 \pm 2.23*	0.686 \pm 0.081**	14.0 \pm 1.33*	3.60 \pm 0.25**
+ PG	172.0 \pm 4.90	82.0 \pm 14.17	24.4 \pm 3.85*	0.642 \pm 0.033**	11.2 \pm 2.43*	3.40 \pm 0.31**
+ OG	157.0 \pm 9.25	48.3 \pm 2.43	36.5 \pm 6.61	0.600 \pm 0.083**	16.1 \pm 1.61	3.20 \pm 0.50**
+ DG	180.0 \pm 8.00	58.0 \pm 2.90	22.5 \pm 3.90	0.630 \pm 0.059**	15.5 \pm 3.40	4.96 \pm 0.51*

Values are expressed as mean \pm S.E of five rats.

Significant difference between PQ and GA & its derivatives treated group.

(* P > 0.05 ** P > 0.01)

Rats were administered with PQ(ip, 50mg/kg) alone or GA & its derivatives(2 mole folds of PQ) 1 hr before injection of PQ

PQ : Paraquat GA : Gallic acid EG : Ethyl gallate PG : Propyl gallate OG : Octyl gallate

DG : Dodecyl gallate ALP : Alkaline phosphatase MDA : Malondialdehyde

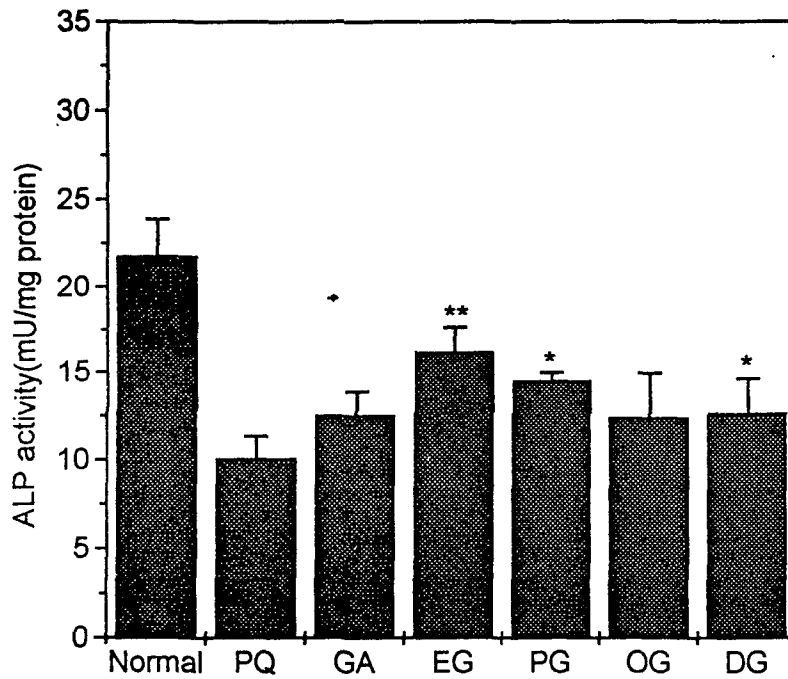


Fig 2. Effect of gallic acid & its derivatives on hepatic ALP activity in PQ treated SD rats. Each value is Mean \pm S.E of data from 5 rats. Significant difference between PQ and gallate treated group. (* P<0.05 ** P<0.01)

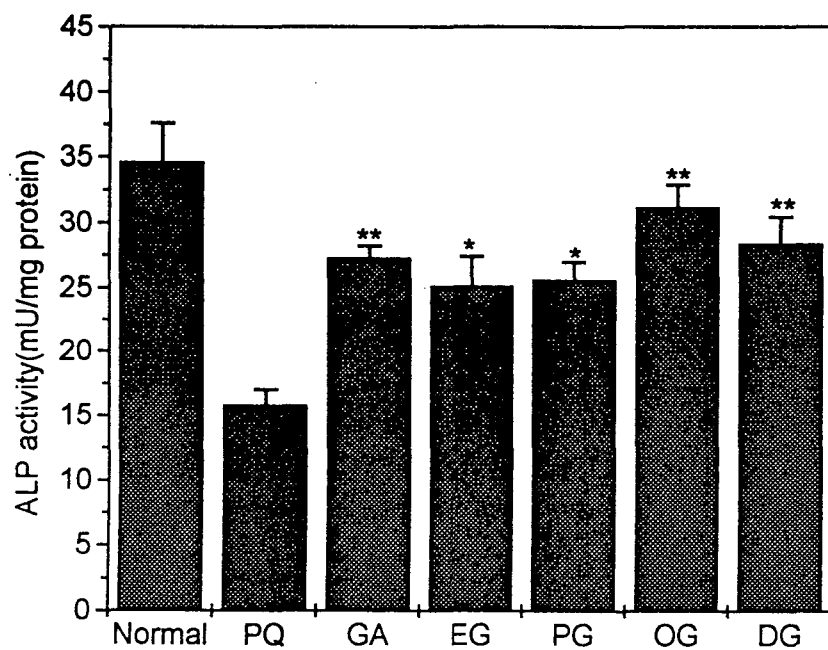


Fig 3. Effect of gallic acid & its derivatives on pulmonary ALP activity in PQ treated SD rats. Each value is Mean \pm S.E of data from 5 rats. Significant difference between PQ and gallate treated group. (* P<0.05 * P<0.01)

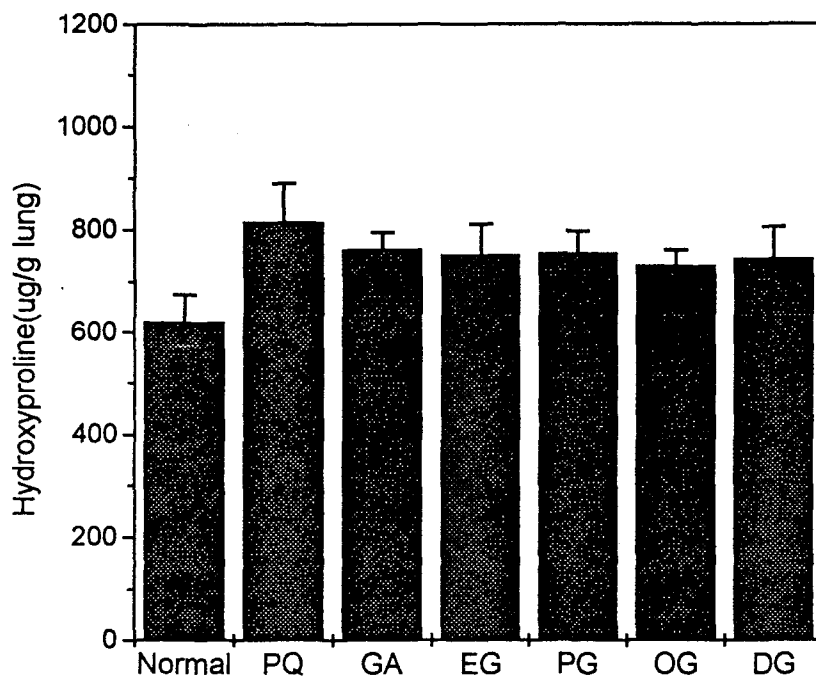


Fig 4. Lung hydroxyproline contents of SD rats treated with PQ & Gallate.

Each value is Mean \pm S.E

Rats received i.p injection of PQ(25mg/kg/day) and gallate(2mole folds of PQ) for 3 days.

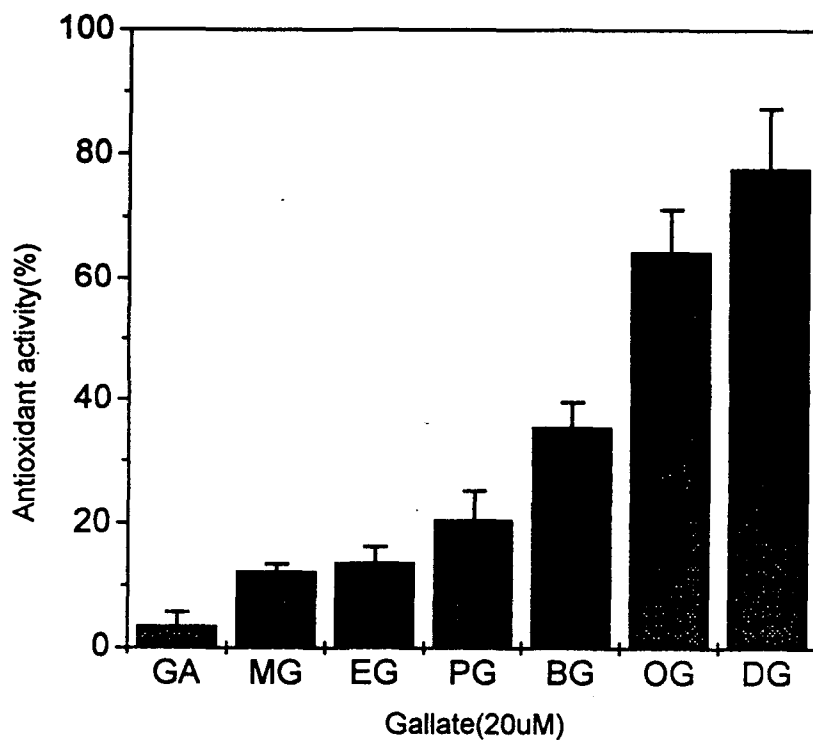


Fig 5. Inhibitory effect of gallic acid & its derivatives on lipid peroxidation induced by PQ & lung microsomal fraction.

Concentration of each compound is 20uM.

GA : Gallic acid MG : Methyl gallate
 EG : Ethyl gallate PG : Propyl gallate
 BG : Butyl gallate OG : Octyl gallate
 DG : Dodecyl gallate