

Paraquat가 Arachidonate Lipoxygenase의 대사에 미치는 영향

최 병 기

동덕여자대학교 약학대학

The Effects of Paraquat on Arachidonate Lipoxygenase Metabolism

Byung Ki Choi

College of Pharmacy, Dongduk Women's University

ABSTRACT

Using mixed incubation of cultured endothelial cells, cultured fibroblasts, neutrophils activated with PMA and paraquat, the production of superoxide anion, H_2O_2 and lipoxygenase metabolites (5-HETE and 12-HETE) of arachidonate was estimated.

The results was as follows:

1. Neutrophils activated with PMA was produced superoxide anion, H_2O_2 and lipoxygenase metabolites (5-HETE and 12-HETE) of arachidonate.
2. Fibroblasts did not alter the production of superoxide anion and H_2O_2 by neutrophils, it was markedly reduced by mixed incubation with endothelial cells.
3. Mixed incubation with endothelial cells significantly augmented the production of 5 or 12-HETEs, but fibroblasts did not.
4. Using mixed incubation of endothelial cells, fibroblasts, neutrophils and paraquat ($50\mu g/ml$ and $100\mu g/ml$), the production of superoxide anion, H_2O_2 and HETEs was significantly increased on both cells at low concentration ($50\mu g/ml$), but markedly reduced at high concentration ($100\mu g/ml$).
5. Paraquat showed concentration dependent effects on arachidonate lipoxygenase metabolism.

서 론

Paraquat (1, 1'-dimethyl 4, 4'-dipyridium di-chloride)는 국내에서 가장 빈용되는 비선택적 제초제로써 식물, 세균 및 동물에 대한 독성작용의 생화적 기전이 광범위하게 연구되어 있다.^{1,2,3,4,5)}

Paraquat의 일반 독성기전은 생체내에서 NADPH P-450 reductase와 관련된 redox cycle에 의해 생성된 paraquat radical이 분자상의 산소와 작용하여 활성산소인 superoxide anion과 hydroxy radical이 생성되어⁶⁾ 이로 인한 지질과산화에 의한 세포막 손상, hyaluronic acid의 depolymerization, 단백질의 불활성화 및 DNA의 손상, 생체내의 NADPH의 수소탈리에 의한 지방산 생합성의 저해 등이 일어나고 또한 quinone계 항암제와 같이 세포내 NADPH의 감소로 환원형 glutathion의 감소가 일어나 지질과산화를 촉진하여 장해⁷⁾를 일으킨다.

Paraquat 오용의 중독으로써는 폐가 표적장기의 하나로 급성기에는 폐포상피세포 장해, 다핵백혈구의 침윤, 폐공강내의 출혈, 폐수종의 형성이 나타나며 최근에는 호흡기 질환에 활성산소가 깊은 관련이 있음이 밝혀지고 있다. 또한 paraquat는 생체내에서 연속적으로 활성산소의 생성을 야기하여 폐에 용이하게 축적되며 여기서 생성된 free radical이 폐의 조직을 장해하여 폐선유화(fibrosis)를 일으킨다.⁸⁾

최근의 연구는 microcirculation에서 endothelial cell이 활성산소종의 대사에 밀접한 관계가 있음을 시준하고 있으며 이것들은 외인성산소 radical을 분해시킬 뿐만 아니라 자체에서도 활성산소를 산생한다.^{9,10)} 또한 arachidonate lipoxigenase 대사와도 관련성이 있다.

본 연구는 paraquat로 활성화시킨 neutrophil을 endothelial cell 및 fibroblast에 가하여 배양하고 여기에서 세개의 활성산소종인 superoxide anion, hydroxy radical 및 arachidonate lipoxigenase metabolite를 측정하여 상기 두 세포의 활성산소종

의 생성과 분해능 및 paraquat의 arachidonate lipoxigenase 대사에 대한 영향을 검토하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

Methyl viologen (paraquat), sodium caseinate, Tris ammonium chloride (ph 7.2), heparin, trypsin, superoxide dismutate, acetylated cytochrom C, phorphol myristate acetate (PMA), Medium 199, fetal bovin serum은 Sigma 사제 및 Gibco 사제를, 기타의 시약은 시판의 특급시약을 사용하였다.

CO₂ incubator (Napco, Model 5410, USA), High performance liquid chromatograph (Perkin-Elmer, Model Series 410, USA).

2. 실험방법

1) Neutrophil의 조제

흰쥐에 체중 200g당 7.5ml의 비율로 6% sodium caseinate를 복강내 투여하여 neutrophil을 유도하고 15시간 후에 복강내를 heparin 함유 생리식염수 (5000IU/ml)로 세척하였다.

세척액을 모아 4°C에서 1200rpm으로 7분간 원심분리하고 그 침전에 Tris ammonium chloride (pH 7.2) 50ml를 가하고 빙수 중에서 30분간 방치하였다. 다시 4°C에서 7분간 1200rpm으로 원심분리한 다음 침전을 Hank's BSS로 3회 세척하고 hemacytometer로 세포수를 측정하여 neutrophil 농도를 Hank's BSS액으로 10⁷cells/ml로 조제하였다.

2) Endothelial cell 및 fibroblast의 분리 및 배양

Bovin tracic aorta를 PBS로 세척하고 0.25% trypsin으로 37°C에서 30분간 처리하였다. 분리한 endothelial cell은 Medium 199로 aorta를 관류시키고 분쇄하여 20% fetal bovin serum을 함유한 Medium 199에서 배양하였다. Fibroblast는 caanine heart에서 0.25% trypsin 처리에 의하여

분리하고 상기와 동일한 조작과 배지에서 배양하였다. 세포는 실험하기 전 2~3회 subincubation하였다.

3) Superoxide anion 및 H₂O₂의 측정

Superoxide anion 및 H₂O₂의 생성은 아세틸화 ferric cytochrome C법¹¹⁾ 및 scopoletin 형광법¹²⁾에 의해 측정하였다.

아세틸화 ferricytochrome C 용액(10mg/ml)을 serum을 함유하지 않은 Medium 199 배지 중에 PMA로 활성화시킨 neutrophil(10⁷cell/ml)의 존재 또는 비존재하에서 paraquat(50μg/ml 및 100μg/ml)를 endothelial cell 및 fibroblast가 들어 있는 배양용기에 첨가하고 37°C에서 10분간 배양하였다. 배양 후 배양액의 상등액을 superoxide dimutase의 존재 또는 비존재하에서 흡광도를 측정하고 이의 측정을 위해 흡광계수 19.8mM·Cm⁻¹을 사용하였다.

Scopoletin 형광법은 상기와 동일한 조작으로 배양한 다음 402 및 417nm간의 흡광도차를 배양 전과 비교하였다. H₂O₂를 측정하기 위해 흡광계수는 50mM·Cm⁻¹을 사용하였다.

4) Arachidonate lipoxygenase metabolite의 측정

Arachidonate lipoxygenase 대사물의 생성은 reverse phase HPLC에 의하여 측정하였다. PMA로 활성화시킨 neutrophil의 존재 또는 비존재하에서 paraquat(50μg/ml 및 100μg/ml)를 endothelial cell 및 fibroblast가 들어 있는 배양용기에 첨가하고 37°C에서 10분간 배양한 다음 에탄올 3배 용량으로 대사산물을 추출하였다. 추출액을 농축하여 고정상으로 C₁₈ Bondpack, 이동상은 acetonitrile : 증류수 : methanol : acetic acid(30 : 25 : 20 : 0.1)을 사용해서 UV detector로 237nm에서 hydroxyeicosa tetraenoic acid(HETE)를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Superoxide anion 및 H₂O₂의 생성

PMA로 활성화시킨 neutrophil은 superoxide anion과 H₂O₂를 생성한다. Neutrophil을 endothelial cell과 혼합배양하면 superoxide anion 및 H₂O₂의 생성이 현저하게 감소하나 fibroblast와 혼합배양하면 생성에 변함이 거의 없다.

Neutrophil과 endothelial cell 및 neutrophil과 fibroblast에 paraquat를 각각 50μg/ml 및 100μg/ml를 가하였을 때 superoxide anion 및 H₂O₂의 생성은 두 개의 배양세포에서 paraquat의 저농도(50μg/ml)에서는 증가를, 고농도(100μg/ml)에서는 현저한 감소를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Superoxide anion and H₂O₂ produced by mixed incubation of paraquat, neutrophils, endothelial cells and fibroblasts.

	Superoxide anion (n mol/10mins)	H ₂ O ₂ (n mol/10mins)
Neutrophil	12.6±1.3	8.6±0.8
Neutrophil + endothelial cell	6.1±0.6	3.9±0.6
+ paraquat (50μg/ml)	8.5±1.0	5.1±0.8
+ paraquat (100μg/ml)	3.0±0.7	2.0±0.5
Neutrophil + fibroblast	13.0±2.3	8.9±0.7
+ paraquat (50μg/ml)	18.9±2.5	10.3±0.7
+ paraquat (100μg/ml)	8.0±1.0	4.3±0.6

(mean±SEM)

Paraquat의 저농도에서 superoxide anion 및 H₂O₂의 증가는 neutrophil 자극에 의하여, 고농도에서는 오히려 endothelial cell 및 fibroblast에 대한 세포독성에 의해 감소된 것으로 사료된다.

위의 결과는 표식 돼지흉부 대동맥 내피세포 및 돼지 폐선유아세포에 대한 superoxide anion 발생제인 xanthine·xanthin oxidase계에서 chrome-51 누출율을 조사한 결과 내피세포가 섬유아세포보다 활성산소의 공격에 약하며 catalase의 첨가로 chrome-51의 누출을 방지할 수 있으나 superoxide

dismutase 첨가로 방지할 수 없는 것을 보아 직접적인 상해인자가 H_2O_2 로 확인된 바와 유사한 경향을 나타내었다.¹⁰⁾

2. Arachidonate lipoxygenase 대사물의 측정

Neutrophil은 PMA에 의하여 활성화되어 그 자체에서 hydroxy radical을 생성한 후 hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HPETE)에서 유래하는 hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HETE)를 생성한다.

Arachidonate lipoxygenase 대사에서 5 및 12-HETE의 생성량은 endothelial cell에 neutrophil이 존재할 때 비존재에서 보다 현저히 증가하였으나 fibroblast에서는 5-HETE의 생성이 증가하였으나 12-HETE에서는 별 변동이 없었다.

Neutrophil과 endothelial cell 및 neutrophil과 fibroblast에 paraquat를 각각 $50\mu\text{g/ml}$ 및 $100\mu\text{g/ml}$ 를 가하였을 때 5-HETE 및 12-HETE의 생성은 paraquat의 저농도($50\mu\text{g/ml}$)에서는 증가를, 고농도($100\mu\text{g/ml}$)에서 오히려 감소를 나타내었는데 이는 고농도에서는 세포독성과 arachidonate lipoxygenase를 불활성화하기 때문이라고 사료된다.

Table 2. Effects of paraquat on production of arachidonate lipoxygenase metabolites in mixed incubation of neutrophil, endothelial cells and fibroblasts.

	5-HETE (n mol/10mins)	12-HETE (n mol/10mins)
Neutrophil	25.3±2.3	7.6±1.2
Endothelial cell	5.1±1.0	11.5±1.4
Neutrophil + endothelial cell	48.5±5.3	32.6±6.0
+ paraquat ($50\mu\text{g/ml}$)	54.6±6.0	43.6±7.3
+ paraquat ($100\mu\text{g/ml}$)	15.7±3.8	10.3±5.0
Fibroblast	8.3±1.2	28.9±6.5
Neutrophil + fibroblast	32.4±4.0	35.4±6.2
+ paraquat ($50\mu\text{g/ml}$)	37.2±4.7	34.7±7.0
+ paraquat ($100\mu\text{g/ml}$)	10.5±1.3	12.5±5.3

(mean±SEM)

Burghuber¹³⁾ 등에 의하면 적출 rat 폐에 H_2O_2 생성계의 glucose와 glucose oxidase(GOD)에 폭로하면 lipoxygenase의 대사물인 5-HETE가 상승하여 폐부종을 일으킨다고 하였으며 이는 상기의 결과와 관련하여 검토할 사항이다.

결 론

Paraquat를 PMA로 활성화한 neutrophil의 존재 또는 비존재하에서 endothelial cell이나 fibroblast와 혼합배양하여 활성산소종인 superoxide anion, H_2O_2 및 arachidonate lipoxygenase 대사산물인 hydroxyeicosatetraenoic acid의 생성량을 측정된 결과는 다음과 같다.

1. PMA로 활성화한 neutrophil은 superoxide anion, H_2O_2 및 HETE를 생성한다.

2. Fibroblast는 neutrophil에 의해 superoxide anion 및 H_2O_2 를 생성하지 않았으나 endothelial cell에서는 현저하게 감소하였다.

3. Endothelial cell은 neutrophil에 의한 HETE의 생성을 현저하게 증가시켰으나 fibroblast는 큰 변동이 없었다.

4. Paraquat를 neutrophil과 두개의 배양세포와 혼합배양을 하였을 때 저농도($50\mu\text{g/ml}$)에서 superoxide anion, H_2O_2 및 HETE의 생성이 증가하였으나 고농도($100\mu\text{g/ml}$)에서는 오히려 감소하였다.

5. Arachidonate lipoxygenase 대사에 paraquat가 농도 의존적인 영향을 주는 것으로 추정할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fisher, H.K., Life Sci., 19, 421 (1976).
2. Rose, M.S., Smith, L.L., Wyatt, I., Biochem. Pharmacol., 25, 1763 (1976)
3. Hassan, H.M., Fridovich, I.: "Biol. & Clin. Aspects of Superoxide and SOD," ed. by Bannis-

- ter, W.H., *et al.*, p. 57, Elsevier (1980)
4. Matkovics, B., Barabas, K., I. Varga, Sz., Szabo, L., Berencsi, G.: *Gen. Pharmac.*, 13, 333 (1982)
 5. Darr, D.J., Yanni, S., Pinnell, S.R.: *Free Rad. Biol. & Med.*, 4, 357 (1988)
 6. Sinha, B.K., Singh, Y. and Krishna, G.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 135, 583-588, 1986
 7. Nakano, m. and Totsune-Nakano, H: *Lipidperoxidation in biological Systems.* (ed Sevanian, H.) pp. 18, Am. oil chem. Soc., 1987
 8. Cantin, A.M., North, S.L., Fells, G.A., Hubbard, R.G., Crystal, R.G.: *J. Clin. Invest.* 79 : 1665-1673, 1987
 9. Dobrina, A., Patriarca, P.: *G. Clin. Invest.* 78 : 462-471, 1986
 10. Bishop, C.T., Mirza, Z., Crapo, J.D., Freeman, B.A.: *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21 : 229-236, 1985
 11. McCord, J.M., Fridovich, I.: *J.B.C.* 244(22) : 6049-6055, 1969
 12. Root, P.K., Metcalf, J.A.: *G. Clin. Invest.* 60 : 1266-1279, 1977
 13. Burghuber, O.C., Strife, R.J., Henson, P.M., Hensen, E.E., Mathias, M.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 : 778-785.