

생쥐에서 Aminotriazole이 Paraquat의 신독성에 미치는 영향

정지숙 · 이병래* · 노영복

조선대학교 자연과학대학 생물학과, *의과대학 생화학교실

Catalase 억제제로 알려져 있는 AT가 PQ에 중독된 생쥐 생존율을 유의하게 감소시켰다. 생쥐의 간장, 폐 및 신장에서 catalase 활성도가 현저히 감소되었으며, PQ와 AT 병합투여군에서 catalase 활성은 PQ 단독투여군에 비하여 유의한 감소를 나타냈으나 glutathione량과 SOD 활성은 PQ 단독투여군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한 광학현미경 검색상 PQ 단독투여군에서 사구체와 요세관이 손상되었으나 PQ와 AT의 병합투여군에서 사구체와 요세관의 손상이 더욱 증가됨을 보여주고 있다. 이상의 실험 결과로 PQ의 신독성이 AT 병합투여로 더욱 증가됨을 알 수 있는데, 이러한 결과는 AT가 신장 catalase를 억제하여 증가된 과산화수소에 의해 나타난 독성의 결과로 생각되며, 과산화수소는 Haber-Weiss 반응이나 Fenton 반응 또는 paraquat radical과 직접 반응하여 hydroxyl radicals을 생성하므로 PQ 독성은 과산화수소의 생성과 관련이 있는 것으로 추정된다.

KEY WORDS: Paraquat (PQ), Aminotriazole (AT), Catalase, Kidney.

산소는 정상 대사과정에서 약 98%가 물로 전환되고, 나머지는 superoxide, hydroxyl radicals 등과 같은 반응성이 강한 독성물질들 생성하는데(Winterbourn and Sutton, 1984), superoxide anion(O_2^-)은 생체물질의 자가산화나, quinone(Kornbrust and Mavis, 1982), adriamycin(Oberley *et al.*, 1983) 및 paraquat(Hassan and Fridovich, 1979; Bus *et al.*, 1974; Winterbourn, 1981)와 같은 화학물질에 의해 서도 생성될 수 있다.

Superoxide anion(O_2^-)은 Haber-Weiss반응($H_2O_2 + O_2^- \rightarrow OH \cdot + OH^- + O_2$) (Haber and Weiss, 1934)이나 Fe^{2+} 과 Cu^+ 에 의해 촉매되는 Fenton반응($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH \cdot + OH^-$ 또는 $Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + OH \cdot + OH^-$)에 의해 보다 강력한 $OH \cdot$ 를 형성하여 핵산이나 지질 및 단백질 등을 손상시킬 수 있으므로 superoxide에 의한 독성은 주로 $OH \cdot$ 형성에 의해 간접적으로

나타난다고 할 수 있다(Kellogg III and Fridovich, 1977). 조직에 산화적 손상산물의 증가는 여러가지 질병, 특히 암발생과도 관련이 있으며(Buege and Aust, 1978), 최근에는 노화에 연관된 것으로 알려져 있어서 많은 관심의 대상이 되고있다(Harman, 1984).

Oxygen radicals를 생성하는 물질로 알려진 paraquat (N, N'-dimethyl-4, 4'-bipyridilium; methyl viologen)는 광범위 제초제로 널리 사용되고 있으며, 미생물이나 동물 및 사람에게 매우 치명적인 독성을 나타내는데(Naoko *et al.*, 1986), *Escherichia coli*(*E. coli*)에서 paraquat는 전자를 받아서 paraquat radical로 환원되고 산소가 존재하면 자가산화에 의해 superoxide가 형성되므로 paraquat 독성기전은 세포내 superoxide 형성과 관련이 있는 것으로 생각되나(Hassan and Fridovich, 1979), Forman 등(1980)은 세포내 NADPH 저하를 paraquat 독성의 주 요인으로 보고하여 paraquat 독성의 생화학적 기전

은 아직도 명확치 않다.

본 실험에서는 superoxide 소거효소인 SOD와 과산화수소 소거효소인 catalase가 PQ 독성에 미치는 영향을 알기위해서 catalase의 억제제인 3-amino-1,2,4-triazole(AT) (Guidet and Shah, 1989a, b)와 PQ를 생쥐에 투여하여 생쥐의 생존율과, PQ에 의한 주 손상 장기인 신장에서 항산화 효소 활성, glutathione 량과 조직학적 관찰로서 PQ의 신독성에 대한 AT의 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 동물

Balb/C계 생쥐(20-30g)를 사용하였다.

생쥐 생존율 측정

생쥐 60마리를 각각 20마리씩 PQ 단독투여군, AT 단독투여군 및 PQ와 AT 병합투여군으로 나누어, PQ(0.5 g/kg BW)를 복강내로 1회 투여하고, 1시간 후에 AT(1.0 g/kg BW in saline)를 복강내로 투여하여 1일 간격으로 14일까지 생존한 생쥐의 수를 관찰하였다.

시료의 조제

생쥐를 정상대조군, PQ 단독투여군, PQ와 AT 병합투여군으로 나누어 PQ(0.5 g/kg BW)를 경구 투여하고 1시간 후에 AT(0.5 g, 1.0 g, 2.0 g/kg BW)를 주사하여 72시간 경과 후에 경추탈골에 의해 희생시켜 좌신은 조직학적 관찰을 위해 10% 포르말린 용액에 고정하였고, 우신은 50 mM phosphate buffer(pH 7.0), 20배 용량(W/V)을 가해 균질화하였다. 균질액의 1/2은 4°C에서 12,000 × g로 10분간 원심분리하여 상청액을 취해 조효소액으로 사용하였으며, 나머지 균질액에 10% sulfosalicylic acid를 첨가해 4°C에서 10,000 × g로 10분간 원심분리하여 상청액을 PQ와 glutathione 정량의 시료로 사용하였다.

Paraquat량은 Berry와 Grove(1971)의 방

법에 의해 측정하였다. 5%(W/V) sulfosalicylic acid로 제단백한 시료 2 ml에 1 N NaOH에 용해한 10% sodium hydrosulfate 용액 1 ml를 첨가하고 혼합하여 396 nm에서 흡광도를 측정하였으며 paraquat 표준시료를 시료와 같은방법으로 측정하여 계산하였다.

Glutathione 정량은 Tietze(1969)의 방법에 의해 측정하였다. 즉, 반응액(2 mM Ethylenediamine tetra acetic acid(EDTA), 1mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzenic(DTNB)와 0.45 U glutathione reductase를 함유한 100 mM phosphate buffer, pH 7.5) 2.9 ml에 시료액 0.025 ml와 NADPH를 최종 농도가 1 μM이 되게 가하여 415 nm에서 변화되는 흡광도를 1분간 측정하였다.

효소활성의 측정 및 단백질 정량

Catalase 활성도는 Aebi(1983)의 방법에 의해 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

SOD 활성도는 Crapo 등(1978)의 방법에 따라 superoxide radicals에 의해 환원되는 cytochrome C가 SOD에 의해 억제되는 량을 측정하였으며, cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

Glutathione peroxidase 활성도는 Flohe 등(1984)의 방법에 따라 NADPH가 산화 되는 량을 340 nm에서 측정하였다.

단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 측정하였다.

이상의 실험결과는 Student t-test에 의해서 검정하였다.

광학현미경 검사

조직을 절취한뒤 10% 중성 포르말린 용액에 고정하고 탈수과정과 파라핀 포매과정을 거쳐 4 μm 두께의 연속절편을 만들어 Hematoxylin 및 Eosin(H-E) 염색법으로 염색을 실시하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

Paraquat는 DT-diaphorase에 의해 paraquat radical로 환원되고, 산소가 존재하면 superoxide를 형성하기 때문에, superoxide 생성은 paraquat의 독작용에 매우 중요한 요인으로 알려져 있다(Kelner and Bagnell, 1989; Lind *et al.*, 1982). Paraquat radicals는 또한 과산화수소와 작용하여 hydroxyl radicals를 생성하므로 (Winterbourn, 1981), 세포내 과산화수소량의 증가는 paraquat 독성에 매우 중요한 요인이 될 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 catalase 억제제로 알려져있는 AT가 PQ 독성에 미치는 영향을 PQ(0.5 g/kg BW)를 투여한 생쥐에 AT(1.0 g/kg BW)를 병합투여하여 생쥐 생존율로서 관찰한 결과, PQ와 AT 병합투여군의 생존율이 PQ 단독투여군에 비하여 현저히 감소하여 PQ의 독성이 AT 병합투여로 증가됨을 알 수 있다(Fig. 1). AT를 투여하면 catalase 활성 감소로 인해 세포내 과산화수소량이 증가되는데(Guidet and Shah, 1989a), 본 실험에서 AT를 투여하여 간, 폐 및 신장에서 catalase 활성도를 측정된 결과 신장에서 가장 큰 감소를 나타내, AT에 의한 과산화수소 생성량의 증가가 신장에서 가장 클 것으로 생각된다

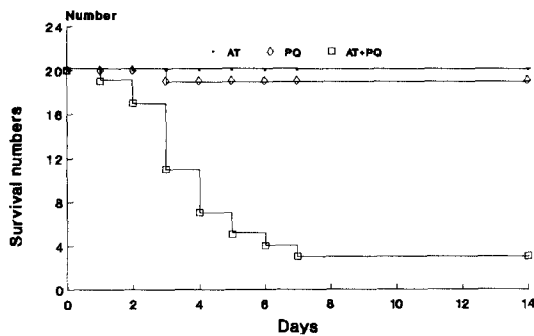


Fig. 1. Effects of AT on the survival of PQ-treated mice. AT: 3-amino-1,2,4-triazole (1.0 g/kg BW), PQ: paraquat (0.5 g/kg BW).

(Fig. 2).

Glutathione은 γ -glutamylcysteine synthetase와 GSH synthetase에 의해 cysteine과 glutamate로부터 합성된 tripeptide로서 단백질의 분해나 합성, DNA의 합성 및 여러가지 화학약품이나 약제의 대사에 직접 또는 간접적으로 관여하는데, 유리산소나 free radicals에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 기능이 있어서 생물학적으로 대단히 중요한 물질이다(Flohe *et al.*, 1976). 본 실험에서 PQ 투여로 신장 총 glutathione량은 18.6% 정도 감소되었으나(Table 2), PQ 단독투여군에 비하여 PQ와 AT 병합투여군에서 총glutathione량의 변화가 없는 점으로 보아 PQ 독성 증가에 AT 투여로 인한 총 glutathione량 변화에 의한 영향은 적은 것으로 사료된다.

생체에는 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 selenium을 함유한 glutathione

Table 1. Effects of AT on paraquat contents in kidney of PQ-treated mice (mean \pm S.D., n = 5)

Groups	Paraquat contents A _{396nm}
PQ	120.00 \pm 20.46
PQ + AT(0.5 g/kg BW)	112.00 \pm 33.36
PQ + AT(1.0 g/kg BW)	115.20 \pm 36.86

PQ: paraquat(0.5 g/kg BW), AT: 3-amino-1,2,4-triazole.

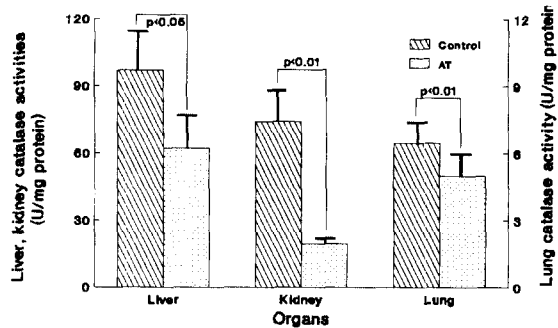


Fig. 2. Effects of AT on catalase activity in various organs of mice AT: 3-amino-1,2,4-triazole (1.0 g/kg BW).

Table 2. Effects of AT on levels of glutathione in kidney of PQ-treated mice (mean \pm S.D., n = 5)

Groups	Glutathione levels (μ M/g tissue)
Control	91.27 \pm 3.87
PQ	74.58 \pm 9.26**
PQ + AT (0.5 g/kg BW)	72.26 \pm 12.02**
PQ + AT (1.0 g/kg BW)	67.05 \pm 5.96**

PQ: paraquat (0.5 g/kg BW), AT: 3-amino-1,2,4-triazole. **: p < 0.01 vs control group.

peroxidase(GPx) 등 항산화효소(Fridovich, 1989)와 glutathione(Meister and Anderson, 1983), uric acid(Ames et al., 1981) 및 thiol groups(Al-Thannon et al., 1974)를 함유한 항산화 물질이 있어서 free radical에 의한 산화적 손상으로부터 세포 구조물을 보호하고 있다. SOD는 superoxide를 H₂O₂와 O₂로 전환시키며, H₂O₂는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 소거되므로, SOD, catalase 및 glutathione peroxidase는 세포내에 생성된 superoxide radicals 제거에 중요한 역할을 하는 효소이다(Fridovich, 1978). PQ 투여로 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 활성이 모두 유의한 감소를 나타냈는데, 특히 catalase 활성이 현저히 감소하여 catalase 활성 감소가 PQ 독성에 연관이 있는 것으로 생각되며 PQ와 AT 병합투여군에서 catalase와 glutathione peroxidase 활성은 PQ 단독투여군에 비하여 유의한 활성 감소를 나타냈으나, SOD에서는 효소 활성의 변화가 감지되지 않았다(Fig. 3). 따라서 PQ와 AT를 병합투여하면 catalase와 glutathione peroxidase 활성이 감소되어 세포내 과산화수소가 증가될 것으로 추정되는데, 세포내 과산화수소의 증가는 hydroxyl radical증가를 초래하여 DNA나 세포막 지질 및 단백질 등을 손상시켜 세포 독성이 나타날 것으로 생각된다.

PQ를 투여한 생쥐 신장에서 근위 및 원위곡 요세관의 상피세포에 심한 공포성 변화와 사구체 신소동맥 기저막의 비대가 관찰되었고(Fig. 4B). PQ와 AT(1.0 g/kg BW) 병합투여군에

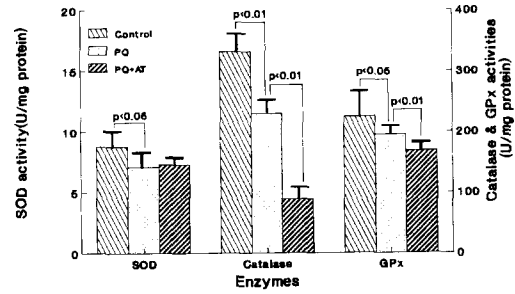


Fig. 3. Effects of AT on the antioxidant enzymes in kidney of PQ-treated mice. AT: 3-amino-1,2,4-triazole (1.0 g/kg BW), PQ: paraquat (0.5 g/kg BW).

서는 근위 및 원위곡 요세관의 심한 퇴행성 변화와 사구체 신소동맥 기저막의 비대 및 특징적인 mesangial cells이 관찰되었으며(Fig. 4C). PQ와 AT(2.0 g/kg BW) 병합투여군에서는 원위곡 요세관의 상피세포가 심하게 파괴되어 있고, 요세관 강내에서 hyalin cast가 관찰되며, 사구체내에 mesangial cells의 증식성 변화가 관찰되었다(Fig. 4D). 따라서 광학현미경 소견상 PQ와 AT 병합투여로 사구체 및 요세관의 손상이 증가된 것을 알 수 있다.

이상의 실험결과로 PQ에 의한 신독성이 AT의 병합투여로 더욱 증가됨을 알 수 있는데, 이러한 결과는 AT투여로 catalase 활성이 억제되어 과산화수소가 증가되어 나타난 결과로 생각되는데, 과산화수소는 Haber-Weiss 반응이나 Fenton 반응에 의해서 또는 paraquat radicals이 직접 과산화수소와 반응하여 반응성이 더욱 강한 hydroxyl radical을 생성하므로, PQ 독성에 H₂O₂의 생성이 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다.

인용문헌

- Aebi, H., 1983. Catalase, *In: Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer, and M. GraB1, eds., 3rd ed.). Verlag. Chem., Vol. 3, pp.273-286.
- Al-Thannon, A.A., J.P. Barton, J.E. Packer, R.J. Sims, C.N. Trumore, and R.V. Winchester, 1974. The radiolysis of aqueous solutions of cysteine in the presence of oxygen. *Int. J. Rad. Phys. Chem.* **6**:

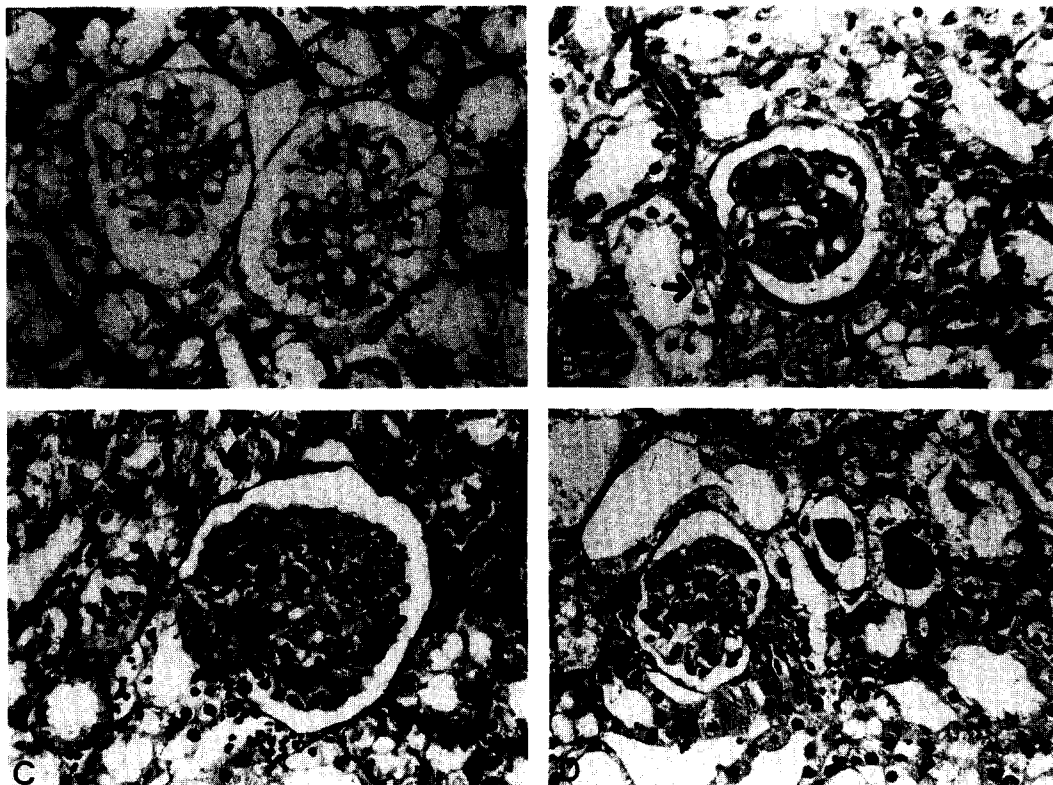


Fig. 4. A: Saline treatment. B: PQ treatment. Severely vacuolar changes of tubular epithelium and thickened glomerular basement membrane. C: PQ and AT (1.0 g/kg BW) treatment. Degenerative changes of tubules and hypercellularity mesangial cell of glomerulus. D: PQ and AT (2.0 g/kg BW) treatment. Impacted hyaline cast in the tubular lumen and mesangial cell proliferation of glomerulus. Magnification of all figures (H-E, $\times 400$).

233-248.

- Ames, B.N., R. Cathcart, E. Schiviers, and P. Hochstein, 1981. Uric acid an antioxidant defence in human against oxidant- and radical-caused aging and cancer. A hypothesis., *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 6858-6862.
- Berry, D.J. and J. Grove, 1971. The determination of paraquat in urine *Clin. Chem. Acta.* **34**: 5-11.
- Buege, J.A. and S.D. Aust, 1978. Microsomal lipid peroxidation, *In: Methods in enzymology* (Fleischer, S. and L. Packer, eds.), Academic Press., New York, Vol. 52, pp.302-310.
- Bus, J.S., S.D. Aust, and J.E. Gibson, 1974. Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**: 749-755.
- Crapo, C.H., J.M. McCord, and I. Fridovich, 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase, *In:*

Methods in enzymology (Fleischer, S. and L. Packer, eds.), Academic Press., New York, Vol. 53, pp.382-387.

- Flohe, L., W.A. Gunzies, and R. Ladenstein, 1976. Glutathione peroxidase, *In: Glutathione metabolism and function* (Arias, I.N. and W.B. Jakoby, eds.), Raven Press, New York, pp.115-138.
- Flohe, L., A. Wolfgang, and W.A. Gunzler, 1984. Assay of glutathione peroxidase, *In: Methods in enzymology* (Packer, L., ed., Academic Press,) New York, Vol. 105, pp.114-121.
- Forman, H.J., J. Nelson, and A.B. Fisher, 1980. Rat alveolar macrophage require NADPH for superoxide production in the respiratory burst. *J. Biol. Chem.* **255**: 9879-9883.
- Fridovich, I., 1978. The biology of oxygen radical. *Science.* **201**: 875-889.
- Fridovich, I., 1989. Superoxide dismutases. *J. Biol. Chem.* **264**: 7761-7764.

- Guidet, B.R. and S.V. Shah, 1989a. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am. J. Physiol.* **256**: 158-164.
- Guidet, B.R. and S.V. Shah, 1989b. Enhanced in vivo H₂O₂ generation by rat kidney in glycerol-induced renal failure. *Am. Physiol.* **257**: 440-445.
- Haber, F. and J. Weiss, 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond.* **147**: 332-351.
- Harman, D., 1984. Free radicals and the origination, evolution and present status of the free radical theory of aging, *In: Free radicals in molecular biology, aging and disease* (Armstrong, D., R.S. Sohal, R.G. Culter, and T.F. Slater, eds.). Raven Press., New York, pp.1-12.
- Hassan, H.M. and I. Fridovich, 1979. Paraquat and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**: 10846-10852.
- Kellogg III, E.W. and I. Fridovich, 1977. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **252**: 6721-6728.
- Kelner, M.J. and R. Bagnell, 1989. Paraquat resistance associated with reduced NADPH reductase in an energy-dependent paraquat-accumulating cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 366-374.
- Kornbrust, D.J. and R.D. Mavis, 1982. The effect of paraquat on microsomal lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**: 323-332.
- Lind, C., P. Hochstein, and L. Ernster, 1982. DT-Diaphorase as a quinone reductase (A cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation). *Arch. Biochem.* **216**: 178-185.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 256-277.
- Meister, A. and M.E. Anderson, 1983. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 711-760.
- Naoko, W., S. Yasuko, M. Nobuhiro, S. Yasushi, and Y. Sho, 1986. Cytotoxic effects of paraquat and inhibition of them by vitamin E. *Biochem. Biophys. Acta.* **883**: 423-425.
- Oberley, L.W., A.E. Schreiber, K.L. Rogers, L. Schutt, D.P. Loven, T.D. Oberley, and R.F. Pasternack, 1983. Antitumor therapies based on inhibition of antioxidant enzymes, *In: Oxygen radicals and their scavenger systems* (Greenwald, R.A. and G. Cohen, eds.). Elsevier Science Publishing Co., pp.173-179.
- Tietze, F., 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**: 502-522.
- Winterbourn, C.C., 1981. Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H₂O₂. *FEBS Lett.* **128**: 339-342.
- Winterbourn, C.C. and H.C. Sutton, 1984. Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 116-125.

The Effect of AT on Nephrotoxicity of PQ-Treated Mice

Ji-Sook Chung, *Byoung-Rai Lee, Young-Bok Roh (Department of Biology, College of Natural Science; *Department of Biochemistry, College of Medicine, Chosun University, Kwangju, 501-759, Korea)

Paraquat, a widely used herbicide, is extremely toxic, causing multiple organ failure in human and may result in death. This study was to look at the effects of 3-amino-1,2,4-triazole (AT), a catalase inhibitor, on PQ-treated mice.

The rate of mortality of the mice treated to PQ with AT was significantly increased in comparison with PQ alone. The activity of catalase was significantly decreased in PQ and AT-treated group compared with PQ-treated group. But the changes of glutathione level and SOD activities were not significant between PQ-treated group, and AT and PQ-treated group. Light microscopic findings in kidney of PQ and AT-treated mice were observed of severely degenerative changes in proximal and distal convoluted tubules and hyaline casts in the tubular lumens and in glomerulus, showing proliferative mesangial cells and thickened basement membrane.

These results suggest that production of hydroxyl radicals, the most reactive oxygen metabolite, were accelerated due to increased hydrogen peroxide by catalase inhibition and paraquat-induced renal damage is probably results from nonspecific tissue injury of hydroxyl radicals.