

백서에서 Paraquat가 장기 Glutathione 농도에 미치는 영향

高春男 · 俞義卿[†]

동신전문대학 환경위생과

[†]세종대학교 자연과학대학 화학과

(1993. 9. 7 접수)

Effects of Paraquat on the Glutathione Contents in Various Organs of Rats

Choon Nam Koh and Euy Kyung Yu[†]

Department of Environmental Hygiene, Dong Shin Junior College, Kwangju 500-714, Korea

[†]Department of Chemistry, Se-Jong University, Seoul 133-150, Korea

(Received September 7, 1993)

요 약. 백서에 paraquat(PQ) 투여로 간, 신장 및 폐 glutathione량이 감소되는데, 간과 신장은 유사한 감소양상을 나타냈고, 폐에서 감소율이 가장 높았으며, 혈액에서는 유의한 변화를 나타내지 않았다. PQ 투여로 γ -glutamylcysteine synthetase와 γ -glutamyl transpeptidase 활성이 감소되었다. 따라서 간과 신장의 glutathione 감소는 γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 감소되어 glutathione 합성저하에 의해 나타난 결과로 생각되고, 폐에서는 간과 신장의 γ -glutamylcysteine synthetase 활성감소로 glutathione 합성이 감소되고, 폐 γ -glutamyl transpeptidase 활성감소로 인해 혈액으로부터 폐세포로 glutathione 이동이 감소될 것으로 추정되므로 폐 γ -glutamyl transpeptidase 활성감소는 glutathione량 감소의 한 원인이 될 것으로 생각되며, 혈액에서는 γ -glutamylcysteine synthetase와 γ -glutamyl transpeptidase 활성감소로 glutathione의 혈액내로 유입과 타장기로 유출이 모두 저하되어 glutathione량의 변화가 없는 것으로 생각된다. PQ에 의한 장기내 glutathione량 감소는 유리기 소거기능이 저하되어 PQ에 의해서 생성된 유리기 제거가 미흡할 것으로 생각되므로 PQ 독성의 한 요인이 될 것으로 추측된다.

ABSTRACT. The effects of paraquat administration on glutathione was studied in rats. The contents of glutathione in the liver, kidney and lung were significantly decreased but the alteration was not significant in blood by paraquat administration. The decrease occurred without concomitant increases in oxidized glutathione (GSSG) or in the GSH/GSSG ratio. The activities of γ -glutamylcysteine synthetase in liver and kidney were decreased by paraquat administration. And γ -glutamyl transpeptidase activities were significantly decreased in kidney and lung of paraquat treated-rats. These results suggest that the decreased synthesis of glutathione by paraquat were an important mechanism of the decreased level of glutathione in liver and kidney, and decreased glutathione transport was a factor on the changes of glutathione contents in lung.

서 론

Paraquat(*N,N'*-dimethyl-4,4'-bipyridilium; methyl viologen; 이하 PQ로 약함)는 독성이 강한 물질로서 DT-diaphorase에 의해 PQ radical로 환원되고, 산소가 존재하면 PQ radicals는 oxygen radi-

cals를 생성한다¹⁻⁴.

생물체는 유리기에 의한 손상으로부터 자신을 보호할 수 있는 여러가지 방어기전을 갖고 있다⁵. 유리기 손상에 대한 방어제로는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 peroxidase 등 항산화 효소계와

glutathione, ascorbic acid, sulfhydryl groups, uric acid, vitamin E 및 bilirubin 등 비효소계 항산화 물질이 있다⁵⁻⁷. SOD는 superoxide를 과산화수소로 전환시키며, catalase와 glutathione peroxidase는 과산화수소를 제거하는데, glutathione peroxidase는 전자수용체로서 glutathione(GSH)을 이용한다^{5,7,8}.

Glutathione(L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine)은 단백질이나 DNA의 합성, 물질의 이동, thiol기의 저장 및 효소활성 조절 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 직접 또한 간접적으로 관여하며, 약물의 대사나, 방사선 조사 또는 활성산소에 대한 해독반응에도 작용한다⁷. Glutathione이 저하되면 glutathione의 효소적 및 비효소적 항산화 작용의 감소로 인하여 여러가지 산화적 손상에 대한 감수성이 증가되며⁷, PQ는 superoxide를 생성하므로 PQ 독성이 더욱 증가될 것으로 생각된다.

본 논문은 PQ 투여로 간, 신장 및 폐에서 glutathione량이 감소됨을 관찰하였는데, PQ에 의한 glutathione의 변화는 PQ 독성의 한 요인이 될 것으로 생각되므로 이의 원인을 glutathione 합성에 관여하는 효소인 γ -glutamylcysteine synthetase 활성과 glutathione 이동에 관여하는 γ -glutamyl transpeptidase 활성을 측정하여 추정하였다.

연구방법

시약 및 연구방법. Paraquat(PQ), glutathione reductase, L- γ -glutamyl-L- α -aminobutyrate(GAB), reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), adenosin 5'-phosphate(ATP), phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase(LDH), reduced glutathione(GSH), glycylglycine, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH), 2-vinyl pyridine(2-VP), L- γ -glutamyl-P-nitroanilid(GPNA), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), ethylene-diamine tetraacetic acid(EDTA) 및 5-sulfosalicylic acid(SSA) 등은 Sigma사에서, ethanol은 E. Merck사에서 구입해 사용하였고, 사용된 기기는 Refrigerated centrifuge(Backman), UV-Spectrophotometer(Gilford 2600)를

사용하였다.

조효소액의 조제. 실험동물은 Splague-Dawley 계 백서로 암수 구별없이 체중 200~250 g되는 것을 사용하였다. 실험동물에 PQ(50 mg/kg body weight)를 복강내로 주사하고 시간경과에 따라 30분, 1, 2, 4, 6 및 12시간 경과 후 각각 5마리씩 경추탈골에 의해 도살하고 간, 신장 및 폐를 적출하여 냉각된 100 mM phosphate buffer(pH 7.4) 용액을 가해 균질화시켰다. 균질액은 10000×g로 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

γ -Glutamylcysteins synthetase 활성도 측정. γ -Glutamylcysteine synthetase 활성도는 Meister 등⁹의 방법에 의해서 측정하였다. 효소반응액(50 mM KCl, 10 mM ATP, 5 mM glycine, 20 mM MgCl₂, 2 mM EDTA 및 50 mM GAB를 함유한 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8)에 조효소 용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 10% SSA 0.02 ml를 가하여 반응을 정지시켜 생성된 ADP를 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 1 unit pyruvate kinase, 0.2 mM NADH, 50 mM KCl 및 40 mM MgCl₂를 함유한 250 mM phosphate buffer 0.9 ml를 가하고 LDH 1 unit를 가하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 NADH 흡광계수 6.22 mM/cm을 이용하여 단위시간당 산화되는 NADH의 μ mole 수로 표시하였다.

γ -Glutamyl transpeptidase 활성도 측정. γ -Glutamyl transpeptidase 활성도는 Tate 등¹⁰의 방법에 의해 측정하였다. 효소반응액(1 mM GPNA와 20 mM glycylglycine를 함유한 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0) 2.95 ml를 37°C에서 3분간 방치시킨 후 조효소액 0.05 ml를 첨가해 410 nm에서 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 1분 동안에 1 μ mole의 p-nitroaniline을 생성할 수 있는 효소량을 1 unit로 하였다.

단백질 정량. 단백질의 정량은 Lowry 등¹¹의 방법에 의해서 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 측정하였다.

Glutathione 정량. Glutathione 정량은 Tietze¹²의 방법에 의해 측정하였다. 간과 신장을 절제한 후 즉시 dry ice-ethanol 혼합액으로 동결시킨 후 10배(w/v)의 5%(w/v) SSA를 가해 조직을 마쇄하고

10000×g로 15분간 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 총 glutathione은 반응액(2 mM EDTA, 1 mM DTNB 및 0.45 U glutathione reductase를 함유한 100 mM phosphate buffer, pH 7.5) 2.9 ml에 시료액 25 μl를 가해 30°C에서 3분간 방치한 후 NADPH를 최종농도가 1 μM이 되게 가하여 415 nm에서 흡광도의 변화를 1분간 측정하였고, oxidized glutathione(GSSG)는 2-VP를 가해 reduced glutathione (GSH)를 제거한 후 총 glutathione과 같은 방법으로 정량하였다.

실험결과의 유의성 판정. 이상의 실험결과는 Student t-test에 의해서 검정하였다.

결과 및 고찰

PQ가 백서 간, 신장, 혈액 및 폐 glutathione에 미치는 영향. PQ를 투여한 백서의 간 총 glutathione량은 PQ 투여 후 시간 경과에 따라 감소하여 PQ 투여 1시간 후 총 glutathion량은 6.03±0.79 mmole/g liver로 정상 대조군 7.13±1.02 mmole/g liver에 비해 약 15%가 감소되었고(*p*<0.05), PQ 투여 2시간 후부터는 회복되기 시작하여, 4시간 및 6시간 경과 후에는 정상대조군과 비슷한 양을 나타냈다. GSH가 감소된 세포는 방사선 조사에 대한 감수성이 증가되고^{13,14}, oxygen radicals에 의한 감수성이 증가될 것으로 생각되므로, PQ에 의한 GSH 감소는 PQ 독성의 한 요인이 될 것으로 생각된다. PQ를

투여한 백서의 간 GSSG량은 총 glutathione량과 유사한 유형의 변화를 나타냈고, GSSG/GSH + GSSG의 차이는 관찰되지 않았다(Table 1). GSH는 glutathione peroxidase, GSH oxidase, oxygen radicals 및 방사선 조사 등에 의하여 GSSG로 전환된다⁷. 본 실험에서 PQ 투여로 인해 간 GSSG+GSH는 감소되었으나, GSSG/GSH+GSSG 비율의 변화는 없는 것으로 나타나, GSH 산화의 증가나, GSSG 환원량의 감소로 인한 GSH량의 변화에 미치는 PQ의 영향은 적을 것으로 생각된다. 신장에서 PQ 투여에 의한 총 glutathione량의 변화는 간에서와 유사한 유형을 나타냈는데, PQ 투여 1시간 경과 후 총 glutathione량은 3.89±0.59 mmole/g kidney로 대조군의 5.45±0.75 mmole/g kidney에 비하여 약 28%가 감소되어 간보다 감소율이 더 컸다(Fig. 1). 혈액 총 glutathione은 PQ 투여 1시간 후 약간 감소되었고, 6시간 후에는 약간 증가되었으나 모두 통계적 의의는 없었다(Fig. 2).

폐에서 총 glutathione은 PQ 투여 1시간 경과 후 대조군에 비해 65%가 감소되었고, 그 이후로 서서히 회복되었으나, 6시간 후에도 정상 대조군에 비해 낮은 양을 나타냈다(Fig. 2).

Glutathione은 주로 간과 신장에서 합성되어 혈액을 통해서 폐 등 다른 장기로 이동되었는데⁷, 본 실험에서 간과 신장에서 PQ에 의한 glutathione 변화 유형이 유사하고, 혈액에서는 변화가 없으며, 폐에서

Table 1. Effects of paraquat on glutathione contents in liver of rats (Mean±S.D., n=5)

Times (hrs)	Glutathione content (mmole/g liver)		
	GSH+GSSG	GSSG	% GSSG
0	7.53 1.02	0.72 0.12	10.1
0.5	6.61 1.18	0.65 0.15	8.9
1	6.03 0.79	0.59 0.11	9.8
2	6.47 0.85	0.59 0.10	9.1
4	7.43 1.08	0.68 0.15	9.1
6	7.78 0.97	0.73 0.15	9.4

Paraquat (100 mg/kg) was administered by orally. After designated time, rats were sacrificed by cervical dislocation and glutathione contents in liver was determined by Tietze methods.

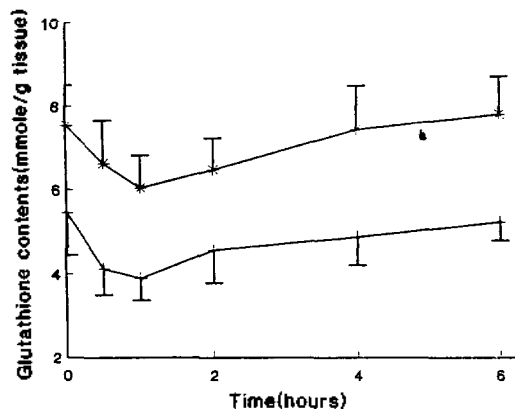


Fig. 1. Effects of paraquat administration (100 mg/kg) on glutathione contents in liver (*) and kidney (+) of rats. Values are mean±S.D., n=5.

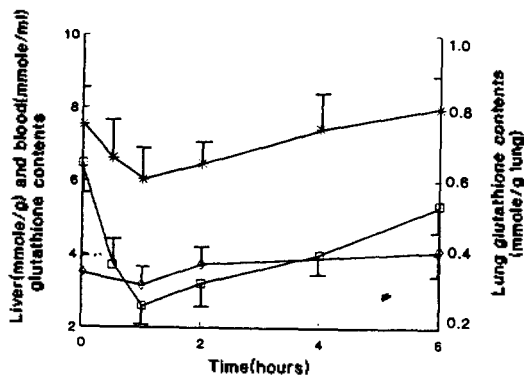


Fig. 2. Effects of paraquat administration (100 mg/kg) on glutathione contents in liver (*), blood (◇) and lung (□) of rats. Values are mean \pm S.D., $n=5$.

가장 큰 변화를 나타내 PQ 투여에 의한 glutathione 변화유형이 glutathione을 합성하는 장기와 재분배를 받는 장기 사이에 차이가 있음을 시사한다.

PQ가 glutathione 합성에 미치는 영향. Glutathione은 간과 신장에서 glutamic acid, cysteine 및 glycine을 기질로 γ -glutamylcysteine synthetase와 glutathione synthetase에 의해 합성된다^{7,15}. 본 논문에서는 PQ가 γ -glutamylcysteine synthetase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과 간과 신장에서 모두 PQ 투여 30분 후 유의한 효소활성 감소를 나타냈고, 1시간 경과 후부터는 서서히 회복되었다. 생쥐나 백서에 γ -glutamylcysteine synthetase 활성 억제제인 buthionine sulfoximine을 주사하면 간, 신장 및 혈액 등에서 glutathione량이 급속히 저하되므로⁷, buthionine sulfoximine은 glutathione을 저하시킬 목적으로 유용하게 쓰이고 있는데^{7,16}, γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 저하되면 세포내 glutathione량이 저하된다.

본 논문에서 PQ 투여로 인한 γ -glutamylcysteine synthetase 활성감소는 GSH 합성감소가 초래되며, GSH 감소는 PQ에 의해 생성된 유리기 제거능력이 저하되어 PQ 독성이 나타날 것으로 생각되므로 PQ 독성의 한 원인이 될 것으로 추측된다.

PQ가 γ -glutamyl transpeptidase 활성에 미치는 영향. 포유동물에서 세포내 glutathione량을 혈청보다 약 1000배 정도 더 높기 때문에 혈청 GSH가 수동적으로 세포내로 이동되는 것은 거의 불가능하

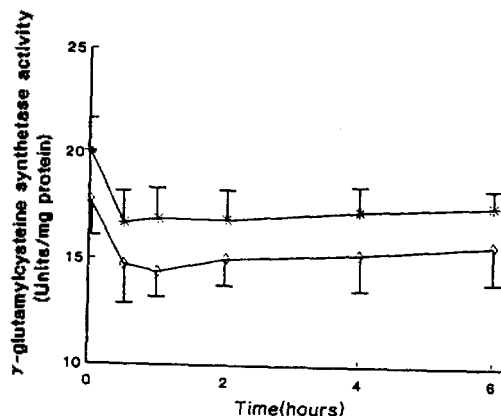


Fig. 3. Effects of paraquat administration (100 mg/kg) on the activity of r-glutamylcysteine synthetase in liver (*) and kidney (◇) of rats.

다⁷.

γ -glutamyl transpeptidase는 막단백질로서 세포막 내측과 외측에서 모두 GSH를 기질로 이용할 수 있으며, 세포 외 GSH를 세포내로 이동시켜 glutathione의 재분배에 작용하는데⁷, 생쥐나 백서에 γ -glutamyl transpeptidase 억제제를 주사하면 glutathione 혈중이나, glutathione 뇨증이 초래되어 GSH의 이동에 관여하는 γ -glutamyl transpeptidase 기능이 증명된다^{7,17}. γ -Glutamyl transpeptidase는 신장에서 가장 높은 효소활성을 나타내며, 췌장, 부고환, 소장 점막세포, 간 및 비장 순으로 효소활성이 낮아진다^{7,18}. 본 논문에서 PQ 투여로 신장 γ -glutamyl transpeptidase 활성이 정상대조군에 비해서 30분 후 31%, 2시간 후 33%가 각각 감소되었으며, 4시간 후에는 정상대조군과 같은 범위로 회복되었다. 또한 폐에서 PQ 투여 후 시간 경과에 따른 γ -glutamyl transpeptidase 활성변화는 신장에서와 유사한 유형을 나타냈다. 따라서 혈액으로부터 신장이나 폐로 이동되는 glutathione량이 저하되어 폐나 신장의 총 glutathione량이 저하된 것으로 생각된다.

이상의 실험결과 PQ를 투여한 백서의 간, 신장 및 폐 총 glutathione량이 감소되었는데, 간과 신장 총 glutathione 감소는 γ -glutamylcysteine synthetase 활성 감소로 인한 glutathione 합성 감소에 의해 나타난 결과로 생각되고, 혈액 glutathione 변화가 적은 것은 γ -glutamylcysteine synthetase 활성 감소로 glutathione 합성량이 저하되어 혈액내로 glu-

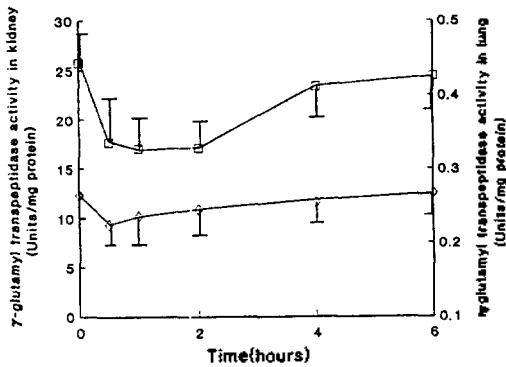


Fig. 4. Effects of paraquat administration (100 mg/kg) on the activity of γ -glutamyl transpeptidase in kidney (□) and (◇) of rats.

tathione 유출량이 저하되고, γ -glutamyl transpeptidase 활성 저하로 인해 혈액으로부터 각 장기내로 glutathione 이동이 감소되는 복합적 원인에 의해서 나타난 결과로 생각된다. 또한 폐에서 glutathione 감소가 간이나 신장에 비하여 높은 것도 간에서 γ -glutamylcysteine synthetase 활성이 감소되어 glutathione 합성량이 감소되고, γ -glutamyl transpeptidase 활성이 저하되어 혈액으로부터 폐세포로 유입되는 glutathione의 이동량이 저하되어 나타난 결과로 생각된다. 그러나 장기에 따라서 PQ에 의한 glutathione 감소율이 차이가 나는데, 이는 장기 PQ 농도의 차이나, glutathione이 단백질의 sulphhydryl기와 mixed disulfide를 형성하는 반응 등¹⁹과 관련이 있을 것으로 추측되나, 이의 원인규명에 대해서는 또다른 실험이 있어야 될 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

1. Krall, J.; Bagley, A. C.; Mullenbach, G. T.; Halliwell, R. A.; Lynch, R. E. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*,

1910.
 2. Sutton, H. C.; Winterbourn, C. C. *Arch Biochem Biophys.* **1984**, *235*, 116.
 3. Kornbrust, D. J.; Mavis, R. D. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1982**, *153*, 323.
 4. Hassan, H. M.; Fridovich, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **1979**, *196*, 385.
 5. Halliwell, B.; Gutte, J. M. C. *Methods in Enzymology*; Fleischer, S.; Packer, L., Ed.; Academic Press, Inc: New York, **1990**; Vol. 186, p 1.
 6. Naoko, W.; Yasuko, S.; Nobuhiro, M.; Yasushi, S.; Sho, Y. *Biochem. Biophys. Acta* **1986**, *883*, 423.
 7. Meister, A.; Anderson, M. E. *Ann. Revi. Biochem.* **1983**, *52*, 711.
 8. Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7761.
 9. Meister, A. *Methods Enzymol*; Ed.; Academic Press: New York, **1985**; Vol. 113, p 393.
 10. Tate, S. S.; Meister, A. *Methods Enzymol*; Ed.; Academic Press: New York, **1985**; Vol. 113, p 400.
 11. Lowry, C. H.; Rsenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 256.
 12. Tietze, F. *Anal. Biochem.* **1969**, *27*, 502.
 13. Deschavanne, P. J.; Malaise, E. P.; Revesz, L. *Br. J. Radiol.* **54**, 361 (1981).
 14. Edgren, M.; Lason, A.; Nilsson, K.; Revesz, L.; Scott, O. C. *Int. J. Radiat. Biol.* **1980**, *37*, 299.
 15. Sies, H.; Gerstenecker, C.; Summer, K. H.; Menzel, H.; Floh, L. *FEBS Lett.* **1972**, *27*, 171.
 16. Griffith, O. W.; Meister, A. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 7558.
 17. Meister, A.; Tate, S. S.; Griffith, O. W. *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 237.
 18. Tate, S. S.; Meister, A. *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *39*, 357.
 19. Keeling, P. L.; Smith, L. L.; Aldridge, W. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *716*, 235.