Korean J. Toxicol.
Vol. 11, No. 2, pp. 295-302, 1995

Menadione의 대사체인 Menadione-Glutathione Conjugate(MEN-SG)가 흰쥐 혈소판에 미치는 세포독성의 평가 및 MEN-SG의 안정성에 관한 연구

서동철 · 정선화 · 이주영 · 김미정 · 정진호*
서울대학교 약학대학

Evaluation of Cytotoxicity to Rat Platelets by Menadione-Glutathione Conjugate and its Stability in Biological Assay System

Dong-Chul Seo, Sun-Hwa Chung, Joo-Young Lee, Mee-Jeong Kim and Jin-Ho Chung*
College of Pharmacy, Seoul National University, Shinrim-dong San 56-1 Seoul 151-742 Korea

(Received November 18, 1995)
(Accepted November 30, 1995)

ABSTRACT : *Menadione-glutathione conjugate (MEN-SG), a metabolite of menadione, is known to be a redoxcycler in rat hepatocyte subcellular fraction. Therefore, it was assumed that MEN-SG could exert cytotoxicity to rat platelets, another target tissue of menadione. We first synthesized MEN-SG, the identity of which was verified by mass, ^{1}H-NMR and UV-visible spectra. In addition, the stability of MEN-SG was investigated in biological assay system. MEN-SG was degraded in a time-dependent manner in DMSO which had been used as a vehicle and thus, tris-HCl buffer was used as a vehicle of MEN-SG despite the low solubility in it. Perchloric acid as well as platelets itself did not affect the stability of MEN-SG. Our next attempt was the evaluation of cytotoxicity of MEN-SG in rat platelets. MEN-SG did not induce cytotoxicity to rat platelets measured by two different methods, LDH release and turbidity changes. The extents of oxygen consumption by MEN-SG in intact platelets were significantly lower than those by menadione, though it had been observed that oxygen consumptions by menadione and MEN-SG were similar in subcellular fractions of platelets. These results suggest that MEN-SG is not toxic to rat platelets despite its redox cycling capacity and glutathione conjugation reaction of menadione could be regarded as a detoxification process.*

Key Words : *Menadione, Menadione-glutathione conjugate, Platelets, Cytotoxicity*

I. 서 론

Menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone)은 quinone 계 화합물로서, hypothrombinemia의 치료, 혹은 multi-vitamin제의 성분으로 쓰이고 있으나(Mandel 등, 1980), isolated rat hepatocytes 등의 세포에서 oxidative stress를 통해 세포 독성을 유발한다는 것이 밝혀졌다(Orrenius, 1985). Menadione은 DT-diaphorase(NAD(P)H: (quinone-acceptor) oxidoreductase)에 의해서나(Lind 등, 1982) 혹은 NADPH-cytochrome P450 reductase, NADH-cytochrome b_5 reductase, NADH-ubiquinone reductase에 의해서 대사된다(Thor 등, 1982). 전자의 경우는 two-electron reduction으로 hydroquinone (menadiol)으로 대사되어 glucuronide나 sulfate conjugation 반응을 거쳐 체외로 배설되나(Losito 등, 1967), 후자에 의해서는 one-electron reduction이 일어나 semiquinone radical이 생성되고 이들은 곧 산소 분자와 redox cycle을 돌아 active oxygen species인 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등을 생성하여 oxidative stress를 유발한다(Brune 등, 1991).

이러한 oxidative stress에 대하여 세포내 방어를 수행하는 가장 중요한 물질은 glutathione(γ-glutamyl-cys-

*To whom correspondence should be addressed.

teinyl-glycine; GSH)이라고 알려져 있다(Lauterberg 등, 1984). Glutathione이 cytosol과 mitochondria에 존재하는 glutathione peroxidase에 의해 hydrogen peroxide 및 lipid hydroperoxides를 제거하면서 산화되면, 생성된 glutathione disulfide(GSSG)는 환원형 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)의 존재 하에서 glutathione reductase에 의해 다시 환원형 glutathione (GSH)으로 환원된다. 이러한 reductant로의 작용 외에 GSH은 electrophilic compounds와 conjugate를 이루어 세포 밖으로 배출되는데 쓰이기도 하므로 oxidative stress에 대한 세포내 방어 기전에서 차지하는 역할이 크다(Meister 등, 1988). 이러한 conjugation reaction은 주로 간에서 비효소적으로 혹은 glutathione-S-transferase에 의해 일어난다(DiMonte 등, 1984). 간에서 생성된 GSH-conjugate는 바로 혈장이나 담낭으로 능동적인 배출이 일어난다고 알려져 있다(Akerboom 등, 1988).

GSH과 menadione이 반응하여 생성되는 menadione-glutathione conjugate(MEN-SG)는 conjugate 상태이나, menadione의 quinone moiety를 유지하므로 모체인 menadione과 마찬가지로 간세포내 microsome 분획 또는 cell-free system 등에서 redox cycling capacity를 가지고 있으며 그 potency가 menadione보다 더 크거나 비슷하다고 알려져있다(Wefers 등, 1983). 그러므로 MEN-SG는 세포 내에서 menadione과 마찬가지로 oxidative stress에 의한 독성작용을 나타내리라 예상할 수 있다.

본 연구실에서는 menadione이 혈소판에 독성을 유발함을 보고한 바 있다(Kim 등, 1995). 혈소판에서 menadione의 대사체인 MEN-SG가 세포독성을 유발할 수 있을지를 규명하기 위하여, 먼저 MEN-SG를 합성하고 합성된 화합물의 안정성을 확인하였다. 그리고, 혈소판에서 MEN-SG가 원물질인 menadione과 마찬가지로 redox cycling을 일으켜 세포독성을 유발하는지를 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

Menadione, glutathione, NADH, NADPH, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 60% perchloric acid(PCA)는 Junsei Chemical Co.(Japan)로부터 구입하였다. HPLC에 쓰이는 시약은 모두 HPLC grade를 사용하였으며, 그 밖의 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

2. Menadione-Glutathione Conjugate(MEN-SG)의 합성 및 확인

Menadione-glutathione conjugate(2-methyl-3-glutathionyl-1,4-naphthoquinone)는 Nickerson 등(1963)의 방법으로 합성하였다. Menadione 16 mmoles를 ethanol 100 m*l*에 녹여 물 30 m*l*에 녹인 GSH 8 mmoles와 섞은 후 혼합액을 4°C의 암소에서 하룻밤 방치하여 생긴 결정체는 여과하고 상층액은 하루 더 방치하였다. 이틀간 모은 생성물은 ethanol로 두번 세척한 후 건조시켰다. 합성된 MEN-SG는 JEOL GSX 400 FT-NMR spectrometer, VG Trio-2 Mass Spectrometer, Shimadzu 2201 UV-VIS Spectrophotometer(Japan)를 사용하여 확인하였다.

3. 실험동물

Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 유한양행(Korea)으로부터 공급받아, 4주 이상 물과 사료(삼양사, Korea)의 제한없이 사육하였으며, 체중 200±20 g의 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 12시간이 되도록 하였다.

4. Platelet Rich Plasma의 분리

흰쥐를 diethyl ether로 마취후 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하였다. 이때 3.8% trisodium citrate를 항응고제로 하여 혈액과의 비율을 1:9로 하였으며, 18 gauge 주사바늘을 이용, 채혈시 용혈에 의한 혈소판의 활성화를 억제시켰다. 채혈액을 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻었으며, 잔사를 계속해서 1,500 g에서 20분간 원심분리하여 platelet poor plasma(PPP)를 얻었다. PRP를 PPP로 희석하여 혈소판의 수를 5×10^8 cells/m*l*로 맞추었다.

5. Menadione 및 대사체 확인과 정량

1) Sample Preparation

PRP에서의 MEN-SG와 menadione 분석실험은 다음과 같은 방법으로 하였다. 준비된 PRP(1×10^9 cells/m*l*) 또는 PPP 1 m*l*을 37°C incubator에서 1분간 미리 가온한 후 menadione 1 mM을 가하여 배양한다. 정해진 시간에 60% PCA(50 μ*l*/m*l*)을 가한 후 15,000 g에서 2분간 원심분리하여 상층액을 HPLC에 20 μ*l*씩 injection

하였다.

2) HPLC 분석법

Menadione 및 MEN-SG의 정량은 HPLC(Hitachi, Japan)를 사용하였다(Lin 등, 1982). Column은 30 cm × 3.9 mm × 10 μm 역상 C_{18} Bondapak(Waters, USA)을 사용하였다. Elution 방식은 다음과 같이 gradient method를 사용하였다. 20분 동안 Solvent A와 Solvent B를 65 : 35(v/v)의 비율로 흘려준 후, 5분간 linear gradient를 사용하여 100% Solvent B로 변화시켜 30분까지 이를 유지시켰다. Solvent A는 sodium acetate buffer(100 mM, pH 4.0)이고, Solvent B는 methanol-water(8 : 2, v/v) mixture를 뜻한다. Menadione 및 MEN-SG의 peak는 UV detector를 이용하여 254 nm에서 측정하였다. Sample 내에서의 menadione과 MEN-SG의 농도는 각 peak의 면적을 기지농도의 면적과 비교하여 구하였다.

6. 산소 소모율의 측정

혈소판 및 혈소판 세포내 분획들의 산소 소모율을 O_2-electrode가 연결된 biological oxygen monitor(YSI 5300, USA)를 이용하여 측정하였다(Kim 등, 1995). PRP 또는 혈소판 세포내 분획 1 m*l*을 sample chamber에 넣고 37°C에서 3분 동안 교반시킨 후 electrode를 꽂고 산소 소모량을 측정하였다. 기준선을 2분 동안 설정한 후 PRP의 경우에는 바로 MEN-SG나 menadione을 농도별로 가하고 나서 산소소모율 증가를 측정하였다.

7. Turbidity 실험

혈소판의 cell lysis 정도를 Lumi-Aggregometer (Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화로써 측정하였다(Kim 등, 1995). PPP의 light transmittance를 100%, PRP의 light transmittance를 0%로 맞춘 후 혈소판의 cell lysis 정도에 따른 light transmittance를 측정, 기록하였다. 이때 PRP와 PPP를 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette에 가한 후 PRP의 경우 1,200 rpm에서 지속적으로 교반시켰으며 1분간 방치하여 37°C가 되도록 한 후 시료를 가하였다. Menadione의 vehicle로는 DMSO 0.5%(v/v)를, MEN-SG의 vehicle로는 Tris · HCl buffer 5%(v/v)를 사용하였는데, 두 가지 경우 모두 혈소판의 light transmittance에 영향을 미치지 않았다.

8. Lactate Dehydrogenase 유출 실험

혈소판으로부터의 lactate dehydrogenase(LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 이용하였다(Bergmeyer 등, 1965). Tris-EDTA-NADH buffer(pH 7.4) 2.0 m*l*에 0.5 m*l*의 원심분리한 menadione 혹은 MEN-SG를 처리한 PRP의 상층액을 가한 후 37°C에서 10분 동안 배양시켰다. 여기에 37°C에서 미리 배양시켜 놓은 0.2 m*l*의 14 mM pyruvate를 가하고 340 nm에서의 흡광도 감소를 측정했다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화 속도를 의미하며 이를 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도로 나타냈다.

9. Data 처리 및 통계

실험결과는 means±SEM로 표시하였다. 또 ANOVA test를 통하여 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test($P < 0.05$)를 사용하여 각 군간의 유의적인 차이를 결정하였다.

III. 실험 결과

1. Menadione-glutathione conjugate(MEN-SG)의 확인

Menadione으로부터 합성된 menadione-glutathione conjugate(MEN-SG)는 mass와 ^{1}H-NMR로 확인하였다. Fig. 1은 MEN-SG의 mass data로서, parent compound인 477[M^+]와 예상되는 fragments로서 374[M^+—$CONHCH_2COOH$], 215[menadione+SCH_2], 204[menadione+S]를 확인하였다. 이상의 결과는 다음과 같다. EI-MS; (30 eV) m/z(rel. int.) 477[M^+], 174(100), 172(70.7), 144(19.0), 204(13.8), 215(0.1), 374(0.1 미만).

Fig. 2는 ^{1}H-NMR의 분석결과로서 문헌보고와 일치하였다(Lau 등, 1990). D_2O에 녹인 MEN-SG는 다음과 같은 특징적인 spectrum을 보이고 있다. 400 MHz ^{1}H-NMR; 7.8 ppm(H_α of menadione), 7.6 ppm(H_β of menadione), 4.5 ppm(cysteine-α), 3.8 ppm(glycine), 3.5 ppm (glutamate-α), 3.2, 3.3 ppm(cysteine-β), 2.3 ppm(glutamate-γ), 2.1 ppm(CH_3 of menadione), 1.9 ppm(glutamate-β).

다른 문헌보고에 의하면 Menadione의 3-C와 glutathione의 thiol(-SH)이 결합된 thioether linkage는 420-430 nm에서 특징적인 흡광을 갖는다고 알려져 있는데 (Nakai 등, 1968), 합성한 MEN-SG의 UV-VIS spectrum을 분석한 결과는 문헌보고와 일치하였다(Fig. 3). 이상의 결과를 토대로 menadione과 glutathione을 반응시켜 MEN-SG가 생성됨을 확인하고 다음 실험을 진행하였다.

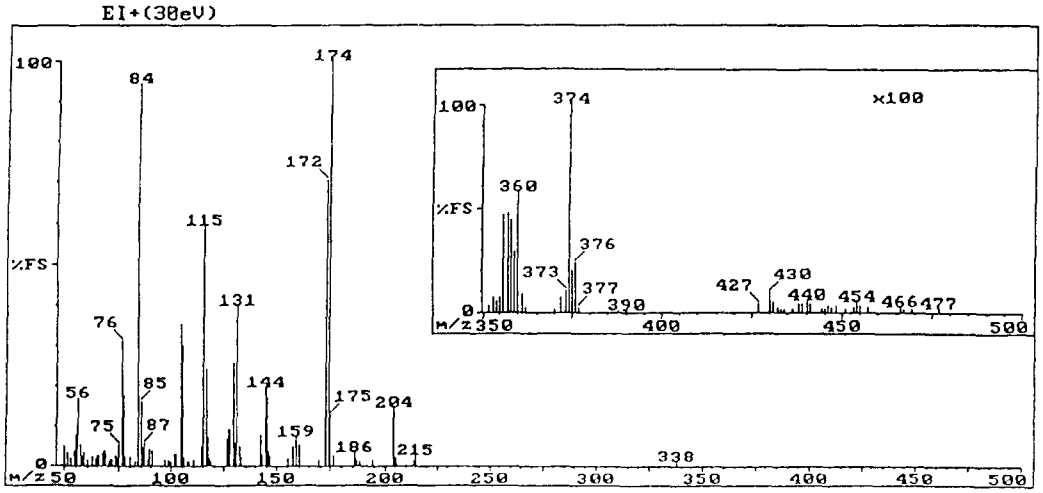

Fig. 1. Mass spectrum of menadione-glutathione conjugate (MEN-SG).

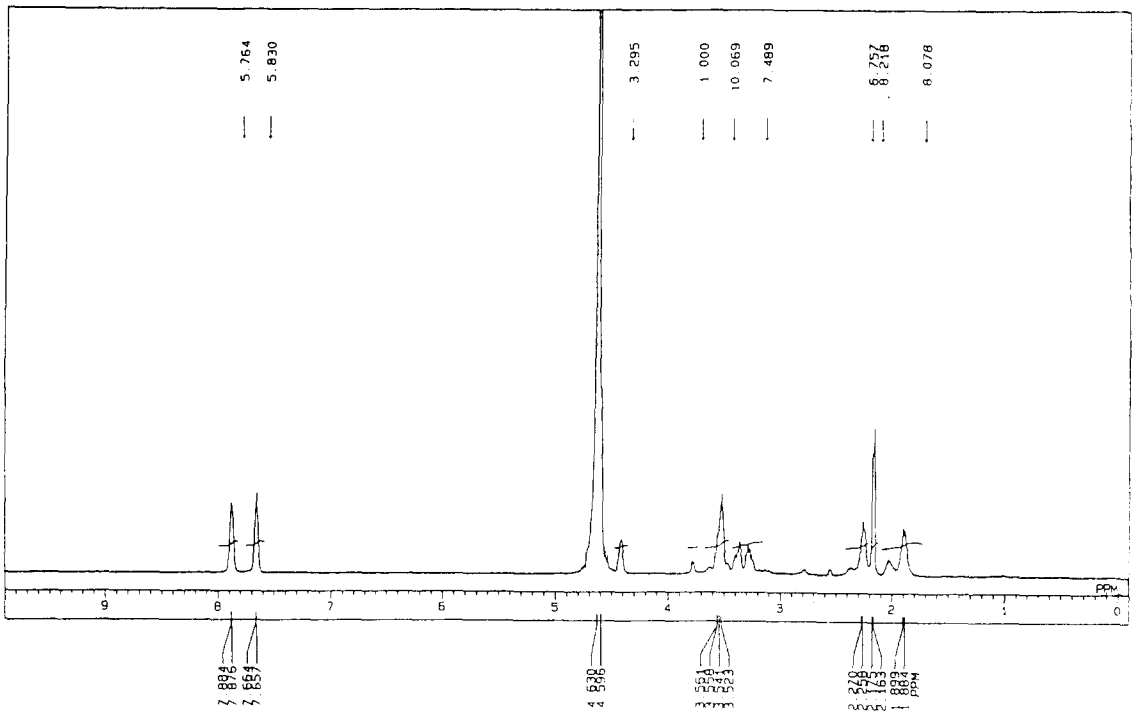

Fig. 2. ^{1}H-NMR spectrum of menadione-glutathione conjugate (MEN-SG).

2. DMSO에 녹인 MEN-SG의 분해

합성된 MEN-SG는 DMSO에 잘 녹았으나 물이나 methanol에는 상대적으로 용해도가 낮았다. 또한 앞선 실험에서 menadione을 DMSO에 녹여 사용하였기 때문에 MEN-SG 역시 DMSO를 vehicle로 사용하려 했으나 menadione과는 달리 물성의 변화가 관찰되었다. 즉 DMSO에 녹인 MEN-SG액은 시간이 지남에 따라 처음의 오렌지색으로부터 붉은 갈색(reddish-brown)으로 색의 변화를 보였다. 이러한 현상을 UV-visible Spectrophotometer로 확인한 결과, 시간이 지남에 따라 300 nm와 440 nm 부근에서의 absorbance가 변하였으며 (Fig. 4), 300 nm 이하에서도 absorbance의 변화가 있음을 확인하였다(결과 제시 안함). 이러한 변화를 HPLC로 확인한 결과(Fig. 5)가 보이는데, 즉 MEN-SG peak는 DMSO 용매 하에서 시간에 따른 감소를 보이는 반

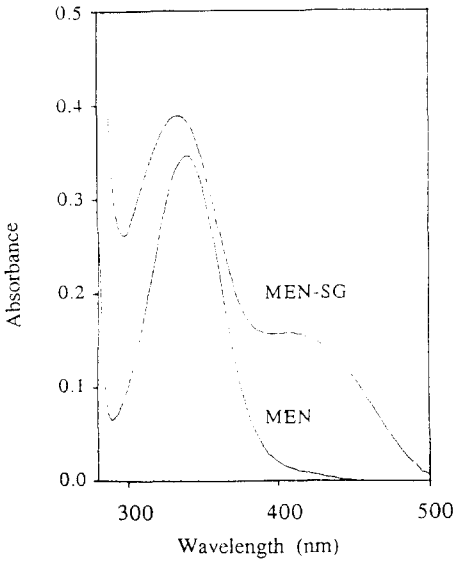

Fig. 3. Comparison of UV spectrum of menadione (MEN) and MEN-SG.

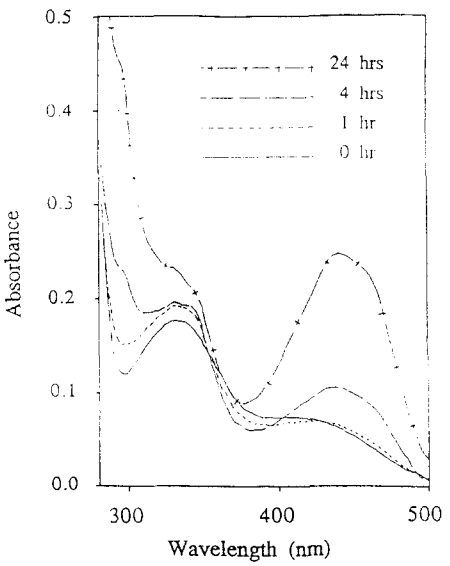

Fig. 4. Time-dependent changes of UV spectrum of MEN-SG dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO).

면 새로운 peak(peak I at 5 min, peak II at 27 min, peak III at 28 min)들이 형성됨을 관찰할 수 있다. Fig. 6은 HPLC chromatogram상의 peak들의 시간에 따른 변화를 plot한 결과로서 MEN-SG는 24시간 내에 90% 이상 분해됨을 알 수 있고, peak I, II, III의 경우는 4시간까지 증가하였고 24시간 후에도 같은 농도로 관찰되었다. 현재, 분해산물인 peak I, II, III의 구조는 확인되지 않았으나 DMSO용액에서 보인 MEN-SG의 분해현상은 수용액상에서는 관찰되지 않았으므로 물보다 비교적 용해도가 높은 Tris · HCl buffer(pH 7.5)를 vehicle로 사용하였다.

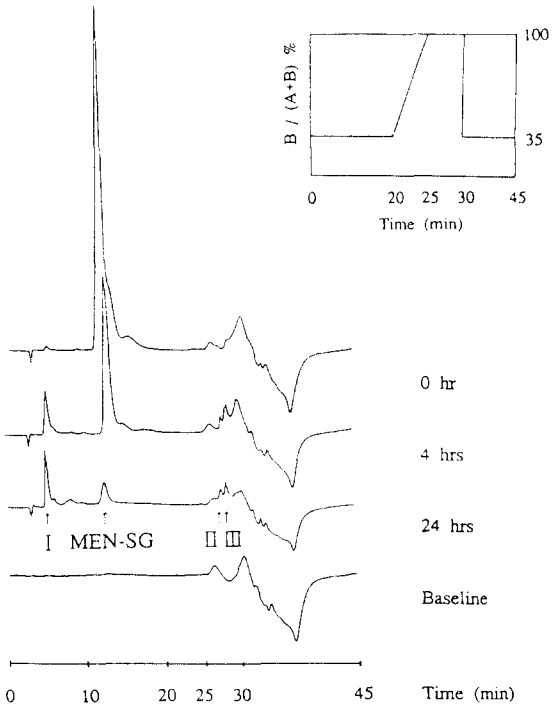

Fig. 5. Time-dependent changes of HPLC elution profile of MEN-SG dissolved in DMSO. The roman characters represent unidentified peaks. The box in Fig. shows HPLC solvent-gradient system. 'A' and 'B' represent solvent A (100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0) and solvent B (80% MeOH), respectively.

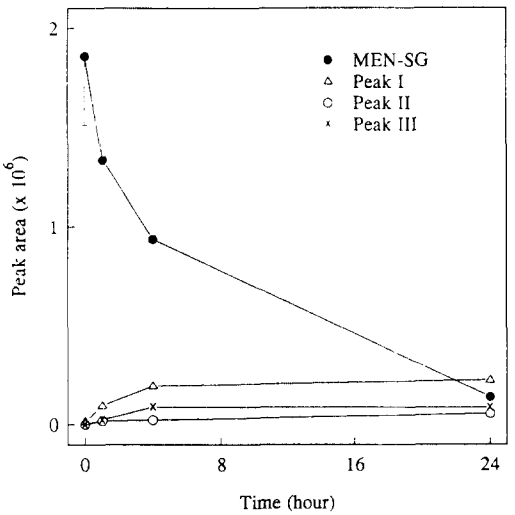

Fig. 6. Time-dependent changes of HPLC peak of MEN-SG dissolved in DMSO. Results represent means ± SEM (n=3).

3. HPLC 분석을 위한 조건실험

본 실험에서 menadione metabolite들을 HPLC로 확

Table 1. Stability of MEN-SG in 3% perchloric acid at room temperature

Time (min)	Percent of peak area at zero-time	
	MEN-SG 5 μM	MEN-SG 10 μM
0	100	100
15	102.2±3.4[a]	102.6±11.0
60	103.8±5.6	101.8± 9.8
240	98.9±9.0	98.3± 4.4

[a]Values represent means±SEM (n=3).

Table 2. Stability of MEN-SG formed in platelets by the time of HPLC analysis

Storage time (hour)[a]	Percent of peak area at zero-time
0	100
1	95.5± 2.4[b]
6	98.2± 5.8
24	112.0±11.3

[a]Prepared samples were stored at 4°C.
[b]Results represent means±SEM (n=3).

인하기 위해서는 PCA를 단백질 침전 및 반응종결의 목적으로 사용하기 때문에 PCA 추출시 MEN-SG의 안정성을 관찰하기 위하여 다음의 실험을 행하였다. 먼저 합성된 MEN-SG에 3% PCA액을 가하고 난 후 시간에 따라 분해정도를 관찰한 결과(Table 1) 시간에 따른 유의적인 변화를 보이지 않았다. 따라서 MEN-SG는 추출용매인 PCA에 안정한 것으로 추정된다. 앞선 실험에서 합성된 MEN-SG가 추출용매하에서는 안정하다 할지라도, biological sample 내에 MEN-SG가 존재할 경우, HPLC로 분석할 때까지 추출, 보관하는 과정중에서의 MEN-SG의 안정성을 확인하기 위하여 다음 실험을 수행하였다. 혈소판에서 생성된 MEN-SG를 추출한 후 냉장보관하였다가 각 시간마다 HPLC로 분석한 결과, 24시간이 지나도 MEN-SG의 peak에는 큰 변화가 없었다(Table 2). 상기 두 결과로부터 혈소판에서 생성된 MEN-SG는 PCA로 추출한 후 HPLC 분석시까지 24시간 냉장보관하여도 무방함을 알 수 있다.

4. MEN-SG의 redox-cycling capacity 및 세포독성

Wefers와 Sies(1983)는 liver microsome에서 MEN-SG에 의한 redox-cycling capacity가 menadione과 유사함을 보고한 바 있다. 한편 혈소판에서는 menadione에 의한 redox-cycling이 간세포와는 다른 효소계에 의해 일어날 가능성을 Kim 등(1995)이 제시한 바 있다. 따라서 혈소판에서 menadione으로부터 생성된 주요 대사체인 MEN-SG가 혈소판에서도 redox-cycling을 돌아 세포독성을 유발하는지 여부를 PRP를 대상으로 실험하였다.

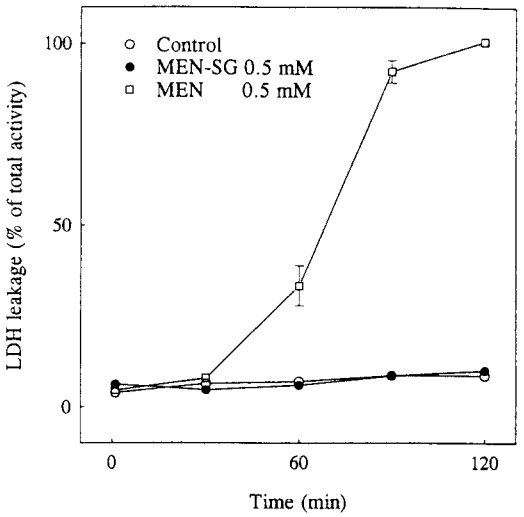

Fig. 7. Effects of MEN-SG and menadione (MEN) on lactate dehydrogenase (LDH) release from platelets.

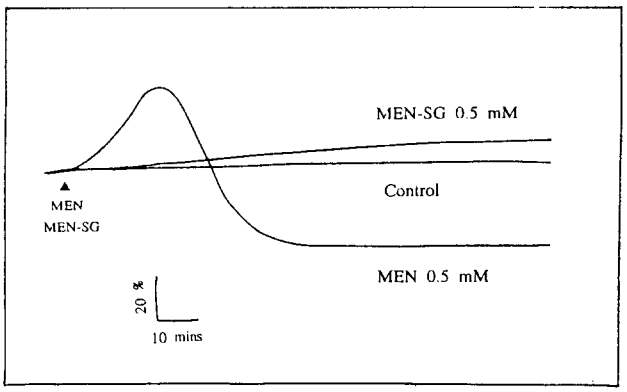

Fig. 8. Effects of MEN-SG and menadione (MEN) on turbidity in platelets.

세포독성을 LDH 유리로 관찰한 결과, menadione 0.5 mM은 60분부터 lysis가 증가하여 120분에는 100% lysis를 유발하였으나 앞서의 추정과는 달리 MEN-SG 0.5 mM은 120분까지도 lysis를 유발하지 않았다(Fig. 7). 또 다른 독성지표로서 혈소판의 turbidity를 관찰한 결과(Fig. 8), menadione 0.5 mM은 1시간 이후에는 turbidity를 30% 정도로 감소시키므로 혈소판 lysis를 보이고 있다. 그러나 MEN-SG 0.5 mM은 menadione과 같은 turbidity의 변화를 보이지 않고 대조군과 유사하였다.

혈소판의 세포 분획에서 산소소모를 증가시킨다는 실험 결과와는 달리(결과 제시 안함) MEN-SG는 세포독성을 유발하지 않았으므로 intact한 혈소판에서 menadione과 MEN-SG에 의한 산소소모의 증가를 비교

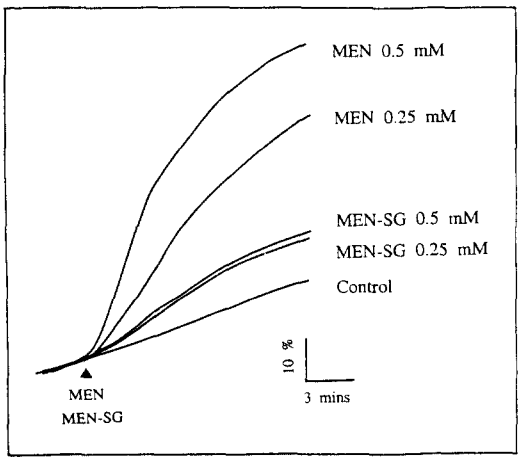

Fig. 9. Effects of MEN-SG and menadione (MEN) on oxygen consumption rate in intact platelets.

하여 보았다(Fig. 9). 대조군으로 사용한 PRP에서의 산소소모율은 0.06±0.01 μl O_2/min이었다. Menadione은 0.25 mM, 0.5 mM의 농도에서 각각 0.30±0.02, 0.54±0.03 μl O_2/min로서 대조군에 비하여 5배, 9배로 농도의 존적으로 증가함을 보였다. 그러나 MEN-SG는 동일한 농도인 0.25 mM, 0.5 mM의 농도에서 0.14±0.01, 0.15±0.01 μl O_2/min 정도의 큰 차이가 없는 산소소모율을 보여 대조군의 2.3, 2.5배 정도로만 증가하였다. 결국 MEN-SG는 menadione과는 달리 PRP에서의 산소소모율이 현저히 낮았으며 농도의존성도 보이지 않았다.

IV. 고 찰

이번 연구에서는 혈소판에서의 menadione의 대사체 MEN-SG를 합성하고 그 대사체에 의해 나타날 수 있는 세포독성을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 1) 대사체 MEN-SG의 vehicle로 사용되는 DMSO에 의한 시간에 따른 분해양상을 관찰하였으며, 2) 혈소판에서 MEN-SG는 세포분획에서와는 달리 PRP에서는 redox-cycling의 potency가 훨씬 낮았으며, 3) MEN-SG은 menadione과 달리 PRP에서 세포독성을 유발하지 않았다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, menadione으로부터 MEN-SG가 생성되는 반응은 비록 세포내에서 redox-cycling 능력을 가지고 있다고 하더라도 PRP에서는 cytotoxicity가 관찰되지 않으므로 detoxification 반응이라고 추정된다.

혈소판은 간에서 혈장으로 배출되는 MEN-SG에 노출될 가능성이 큰 세포이며 자체로도 MEN-SG이 대사과정의 주요한 부분을 차지하고 있었다. 따라서 혈소판에서의 MEN-SG의 redox-cycling과 세포독성과의 관계를 연구하는 것은 중요하다.

세포 분획을 사용한 실험결과와는 달리 intact한 혈소판에서는 MEN-SG에 의한 효과가 menadione에 의한 산소소모 증가의 30% 미만으로(Fig. 9) 나타났는데 이러한 원인은 menadione과 MEN-SG의 세포내 이용율 및 투과력의 차이로 보인다. MEN-SG가 혈소판에 세포 독성을 일으키지 않는 또 다른 해석은 다음과 같다. 최근 menadione에 의한 세포독성은 oxidative stress에 의한 영향보다는 arylation에 의한 세포독성 가능성이 제시 되었다(Gant 등, 1988). 따라서 MEN-SG가 비록 menadione과 같은 정도의 redox-cycling을 일으킨다 하더라도 세포내 arylation 능력은 거의 없으므로 세포독성이 나타나지 않을 가능성이 있다. 이러한 가설을 뒷받침하기 위한 연구가 앞으로 수행되어야 할 것이다.

일반적으로 phase II reaction은 detoxification mechanism으로 알려져 있다. 그러나 최근 GSH conjugation 반응이 오히려 xenobiotics의 activation일 수 있다는 일련의 보고가 있었다(Dekant 등, 1993). Menadione의 경우, GSH conjugate인 MEN-SG가 liver microsome에서 redox-cycle을 통해 oxygen-radicals을 생성할 수 있다는 보고 이후(Wefers 등, 1983). MEN-SG의 세포독성에 대한 많은 연구가 진행되었다. 특히 GSH conjugate는 간에서 생성되어 혈장으로 배출된 후 신장에서 능동적으로 흡수되는 특성이 있기 때문에 MEN-SG의 신장독성이 최근 연구되었다. Brown 등(Brown 등, 1991)의 연구에서 MEN-SG은 isolated renal epithelial cell에서 redox-cycle을 하지만 세포독성이 없는 것으로 나타났는데 이는 신장세포에서 흡수된 MEN-SG로부터 γ-glutamyltranspeptidase와 β-lyase에 의해 dipeptide가 깨지고 그 산물인 menadione-cyscteine conjugate가 세포 내에서 바로 thiazine 형태로의 구조적인 변화가 일어나 quinone체가 변형되기 때문이라고 주장하였다. Lau 등(1990) 및 Haenen 등(1994)은 각각 *in vivo* 및 rat renal proximal tubular cells계를 사용하여 MEN-SG의 신장세포 독성을 관찰하였는데 독성은 나타나지 않았다. 반면에 Redegeld 등(1990)은 isolated perfused kidney에서 MEN-SG를 가했을 때 세포독성이 나타났다고 보고하고 있다. 이러한 상반된 결과는 실험에 사용한 세포 및 실험계에 따른 차이에 기인한 것으로 여겨진다.

본 실험에서는 MEN-SG의 vehicle로는 DMSO가 적합하지 않으며 buffer에는 비교적 안정한 것으로 밝혀졌으므로 용해도는 낮을지라도 MEN-SG를 buffer에 녹여 사용하였다. 앞서 언급한 Lau 등(1990)의 실험에

서는 MEN-SG를 DMSO에 녹여 *in vivo*로 투여하였기 때문에 실험결과의 해석에 의문점이 남는다. 앞으로 MEN-SG를 이용한 실험에서는 반드시 용액 내에서의 안정성을 확인해 볼 필요가 있다.

결론적으로 MEN-SG는 자체로 효소에 의한 redox cycling을 돌 수 있으나, intact한 혈소판에서는 산소소모증가 및 세포독성을 야기하지 않는다. 따라서 생체 내에서 일어나는 menadione으로부터 MEN-SG가 생성되는 반응은 결과적으로 menadione의 세포독성을 감소시키는데 기여하리라 사료된다.

참고문헌

Akerboom, T., Bultmann, T. and Sies, H. (1988): Inhibition of biliary taurocholate excretion during menadione metabolism in perfused rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, **263**, 10-18.

Brown, P.C., Dulk, D.M. and Jones, T.W. (1991): The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) and two thioester conjugates studied with isolated renal epithelial cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 187-196.

Brune, B., Von Appen, F. and Ullrich, V. (1991): Oxidative stress in platelets *in Oxidative Stress* (Sies, H. (Ed) (Academic press, London), p.421-445.

Dekant, W. and Vamvakas, S. (1993): Glutathione-dependent bioactivation of xenobiotics, *Xenobiotica.*, **23**, 873-883.

DiMonte, D., Ross, D., Bellomo, G., Eklow, L. and Orrenius, S. (1984): Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 334-342.

Gant, T.W., Rao, D.N.R., Mason, R.P. and Cohen, G. M. (1988): Redox cycling and sulfhydryl arylation: their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes, *Chem.-Biol. Interactions*, **65**, 157-173.

Haenen, H.E.M.G., Rogmans, P., Temmink, J.H.M. and van Bladeren, P.J. (1994): Differential detoxification of two thioester conjugates of menadione in confluent monolayers of rat renal proximal tubular cells, *Toxicol. in Vitro.*, **8**, 207-214.

Kim, K.A., Lee, J.Y., Park, K.S., Kim, M.J. and Chung, J.H. (1995): The mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat platelets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, in press.

Lau, S.S., Jones, T.W., Highet, R.J., Hill, B.A. and Monks, T.J. (1990): Differences in the localization and extent of the renal proximal tubular necrosis caused by menadione, Toxicol. *Appl. Pharmacol.*, **104**, 334-350.

Lauterberg, B.H., Smith, C.V., Huges, H. and Mitchell, J.R. (1984): Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rats; regulation and response to oxidative stress, *J. Clin. Invest.*, **73**, 124-133.

Lind, C., Hochstein, P. and Ernster, L. (1982): DT-diaphorase as a quinone reductase: a cellular control device against semiquinone and superoxide radical formation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 178-185.

Losito, R., Owen, C.A. and Flock, E.V. (1967): Mechanism of [^{14}C]-menadione, *Biochem.*, **6**, 62-68.

Mandel, H.G. and Cohn, V.H. (1980): Vitamin K *in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* (Gilman A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A. (Eds), (Macmillan Publishing, New york), p.1592-1596.

Meister, A. (1988): Glutathione *in The Liver: Biology and Pathobiology* (Arias, I.M., Jacoby, W.B., Popper, H., Schacter, D. and Shafritz, D.A. (Eds), (Raven, New York), p.401-417.

Nakai, N. and Hase, J. (1968): The reaction of 2-methyl-1,4-naphthoquinone with sulfhydryl compounds, *Chem. Pharmacol. Bull.*, **16**, 2334-2338.

Nickerson, W.J., Falcone, G. and Strauss, G. (1963): Studies on quinone-thioesters. I. mechanism of formation and properties of thiodione, *Biochem.*, **2**, 537-543.

Orrenius, S. (1985): Oxidative stress studied in intact mammalian cells, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **311**, 673-677.

Redegeld, F.A.M., Hofman, G.A., Van De Loo, P.G.F., Koster, A.S.J. and Noordhoek, J. (1990): Nephrotoxicity of the glutathione conjugate of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) in the isolated perfused rat kidney. Role of metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase and probenecid-sensitive transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 665-669.

Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1982): The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes, *J. Biol. Chem*, **257**, 12419-12425.

Wefers, H. and Sies, H. (1983): Hepatic low-level chemiluminescence during redox cycling of menadione and menadione-glutathione conjugate: Relation to glutathione and NAD(P)H: quinone reductase (DT-diaphorase) activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, **224**, 568-578.