

Quinones (menadione, benzoquinone, 및 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone)의 혈소판 세포독성

승상에 · 이무열 · 이주영 · 김미정 · 정진호
서울대학교 약학대학

Effects of Various Quinones (Menadione, Benzoquinone and 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone) on Rat Platelets

Sang-Ae Seung, Moo-Yeol Lee, Joo-Young Lee, Mee-Jeong Kim and Jin-Ho Chung

Seoul National University, College of Pharmacy, Shinrim-dong San 56-1
Seoul 151-742 Korea

(Received October 30, 1996)

(Accepted November 7, 1996)

ABSTRACT : Our previous studies demonstrated that quinone (menadione) is cytotoxic to rat platelets. In an attempt to assess the relative contributions of redox cycling and/or arylation in quinone-induced cytotoxicity, we have studied three quinones with different mechanisms: 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ; pure redox cyler), menadione (both redox cyler and arylator), and 1,4-benzoquinone (pure arylator). The order of redox cycling capacity in platelet rich plasma (PRP) isolated from rats was menadione > DMNQ > 1,4-benzoquinone, which was consistent with the previous studies using isolated hepatocytes. 1,4-Benzoquinone was more toxic to rat platelets than menadione, while DMNQ did not cause cell death at all. Lactate dehydrogenase inhibition studies revealed that 1,4-benzoquinone inhibited significantly in a time-dependent manner, while menadione and DMNQ did not at all. These results suggested that arylation by quinone compounds might play a critical role in quinone-induced cytotoxicity in rat platelets.

Key Words : Platelets, Menadione, Oxidative stress, Arylation, Benzoquinone, 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone, Cytotoxicity

I. 서 론

Quinone은 자연계에 널리 존재하는 물질로서 세포내에서 biological role뿐 아니라 식품이나 공해물질에 포함된 독성물질로서의 중요성도 지니고 있다. Quinone 류들의 독성기전으로는 크게 두가지가 제시되고 있는데 첫째는, redox cycling으로써 microsomes 등의 biological system에서 불균형적인 NAD(P)H oxidation과 oxygen utilization을 유발하는 능력을 일컫고 이로 인한 active oxygen species의 생성과 그에 따르는 oxidative stress가 quinone류의 독성기전으로 제시되고 있다 (Thor *et al.*, 1982). 둘째는, arylation 능력으로써 quinone은 분자구조 내에 electrophilic한 위치를 가지고 있어 nucleophile 특히 thiol group과 특이적으로 반응한다 (Wilson *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1985). 즉 세포에 존재하는 glutathione (GSH) 등의 soluble thiol, protein thiol과 반응함으로써 세포내의

thiol redox state를 변화시키고 thiol group이 그 activity에 중요한 효소의 기능을 변화시킴으로써 세포의 정상적인 기능을 억제하는 것이다.

Quinone계 화합물의 독성기전으로는 다음의 세가지 quinone 물질을 이용하여 이루어졌다. Menadione은 분리간세포에서 oxidative stress와 arylation이 동시에 일어나며, 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)은 oxidative stress 만 일으키나 menadione보다 약한 세포독성을 나타내었다 (Ross *et al.*, 1986; Gant *et al.*, 1988). 한편 분리간세포에서 oxidative stress 능력을 갖지 않고 arylation 능력만을 갖는 quinone계 화합물의 세포독성도 연구된 바 있는데 1,4-benzoquinone은 산소소모의 증가를 유발하지 않으나 강한 arylation 능력을 가지며 그로 인해 세포독성을 유발함이 확인되었다 (Rossi *et al.*, 1986). 한편 최근 연구에 의하면 menadione이 혈소판에서도 세포독성을 유발함이 관찰되었고 (Kim *et al.*, 1996) menadione

dione에 의한 혈소판내 GSH의 고갈을 확인한 바 있다 (Chung, *et al.*, 1997). 그러나 간세포에서 확인된 바 있는, oxidative stress시에 수반되는 현상으로 알려진 GSSG의 증가를 확인하지 못한점이나 혈소판내에서 GSH depletion시 menadione-glutathione conjugate 생성의 높은 비율 (Chung, *et al.*, 1997) 등이 quinone계 물질에 의한 혈소판 독성은 간세포와는 다른 독성기전을 암시하고 있다.

따라서 본 연구에서는 menadione, 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone(DMNQ)과 1,4-benzoquinone을 이용하여 산소소모 유발능력을 비교함으로써 혈소판에서 oxidative stress 능력을 확인하고 효소 활성억제를 통한 arylation 능력을 비교함으로써 세물질에 의한 혈소판의 독성작용을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시 약

Menadione, dimethyl sufoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였고 1,4-benzoquinone, 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone, sodium methoxide, anhydrous methanol은 Aldrich Chemical Co. (Gillingham, Dorset, U.K.)로부터 구입하였다.

2. 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone 의 합성

2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone 2.2 g과 sodium methoxide 1.6 g을 50 ml의 anhydrous methanol 하에서 40분간 reflux 한 후 얻은 뜨거운 용액을 바로 Whatman No.1 여과지로 여과하였다. 여과액을 식혀서 얻어진 결정을 물로 세척한 후 3-4 ml의 methanol에 녹이고 4 ml의 methyl iodide 를 가하여 실온에서 차광상태로 1시간동안 교반하였다. 혼합액을 식힌 후 얻은 결정을 methanol로 재결정한 후 건조하였다. 얻어진 결정의 구조는 mass spectroscopy, NMR spectroscopy로 확인하였다.

3. 실험동물 및 Platelet Rich Plasma, Washed platelets의 분리

Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 유한양행으로부터 공급받아 4주 이상 물과 사료(제일 제당, Korea)의 제한 없이 사육하였으며 체중 220 ± 20 g되는 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12 시간씩 되도록 하였다. 흰쥐를 diethyl ether로 마취 후 개복하여 복대동맥으로부터 채혈하였다. 이 때 항응고제로는

3.8 % trisodium citrate를 혈액과 1:9의 비율로 사용하였으며 18 gauge 주사바늘을 이용, 채혈시 용혈에 의한 활성화를 억제시켰다 (Radomski *et al.*, 1983). 채혈액을 150 g에서 15분간 원심분리하여 상층액으로부터 platelet rich plasma (PRP)를 얻었으며 잔사를 계속하여 1,500 g에서 20분간 원심분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. Washed platelets (WP)은 Chung 등 (1997)의 방법을 사용하여 준비하였다. 이와 같이 얻은 PRP와 WP중의 혈소판수는 광학현미경에서 hematocytometer를 사용하여 세었으며, PRP는 PPP로 WP는 suspension buffer로 희석하여 5×10^8 또는 1×10^9 cells/ml이 되도록 한 후 실험에 사용하였다.

4. 산소 소모율의 측정

혈소판 및 혈소판 세포내 분획들의 산소 소모율을 O₂-electrode가 연결된 biological oxygen monitor (YSI 5300, USA)를 이용하여 측정하였다 (Nakagawa *et al.*, 1992). PRP 1 ml을 sample chamber에 넣고 37°C 에서 3분동안 교반시킨 후 electrode를 꽂고 산소 소모량을 측정하였다. 기준선을 2분 동안 설정한 후 menadione, benzoquinone, DMNQ를 농도별로 가하고 나서 산소소모율 증가를 측정하였다.

5. Lactate Dehydrogenase 측정

혈소판으로부터 lactate dehydrogenase (LDH) 유출은 spectrophotometry 방법을 사용하였다 (Bergmeyer *et al.*, 1965). 37°C로 가온한 Tris-EDTA-NADH buffer (pH 7.4) 1.0 ml에 0.025 ml의 원심분리한 Menadione, Benzoquinone 혹은 DMNQ를 처리한 WP의 상층액을 가한 후 37°C에서 10분 동안 배양하였다. 여기에 37°C에서 미리 배양시켜 놓은 0.1 ml의 14 mM pyruvate를 가하고 339 nm에서의 흡광도 감소를 측정했다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화 속도를 의미하며 이를 혈소판으로부터 유리된 LDH의 활성도로 나타냈다.

LDH 활성을 측정하기 위하여 혈소판을 0.45% Triton X-100을 처리하여 lysis 시킨후 10,000 g로 2분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 0.25 mM menadione, benzoquinone 혹은 DMNQ를 처리한 후 37°C에서 0, 30, 60, 90, 120분 동안 배양하여 LDH의 활성을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

먼저 합성된 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)

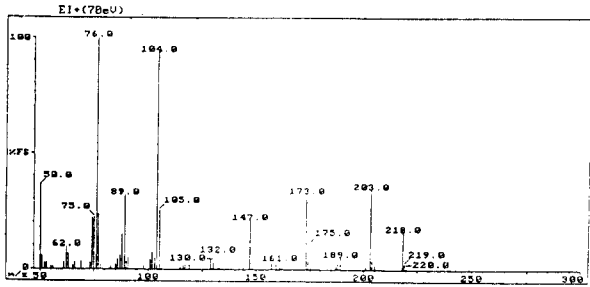


Fig. 1. Mass spectrum of 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)

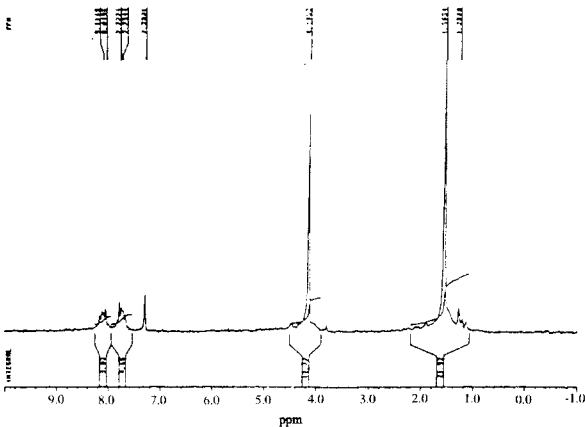


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)

의 identity는 mass와 $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy로 확인하였다. Mass spectrum의 주된 peak 중 가장 높은 peak는 m/z 218에서 나타나며 이는 DMNQ의 분자량과 일치하였으며, 하나의 methyl 기가 떨어진 fragment ion에 해당되는 m/z 203에서 주된 peak를 보였다 (Fig 1). $^1\text{H-NMR}$ spectrum은 4.14 ppm 에서 단일 peak, 7.73-7.78 ppm과 8.05-8.11 ppm에서 특징적인 four resonance의 peak를 보이고 있어 문헌보고 (Gant *et al.*, 1988)와 일치하는 결과를 나타내었다 (Fig 2).

분리 간세포에서 menadione은 redox cycling 활성화와 arylation 능력을 둘다 가지는 물질이며 (Thor *et al.*, 1982; Wilson *et al.*, 1987), benzoquinone은 강력한 arylation 능력을 가지나 redox cycling 활성화는 없는 물질이다 (Morrison *et al.*, 1969; Rossi *et al.*, 1986). 한편 합성된 DMNQ는 그의 arylation 가능위치가 methoxy 기로 치환되어 redox cycling 활성화는 가지나 arylation 능력은 없는 물질로 보고되어 있다 (Gant *et al.*, 1988). 이와 같이 분리간세포에서 보고된 바와 같은 세 물질의 특성을 혈소판에서 확인하기 위하여 다음 실험을 수행하였다. 세 물질이 platelet rich plasma (PRP) 상에서 redox cycling 활성을 산소소모 유발능력 정도로 측

Table 1. Oxygen consumption induced by quinones in rat platelet rich plasma

Quinone (μM)	Oxygen consumption (O_2 $\mu\text{l}/\text{min}$)		Benzoquinone
	Menadione	DMNQ	
250	0.449 ± 0.161	0.264 ± 0.009	0.080 ± 0.003
1000	1.449 ± 0.071	0.521 ± 0.085	0.417 ± 0.112

Values represent means \pm SEM from three experiments.

정하였다 (Table 1). Menadione과 DMNQ는 0.25 mM 농도에서 강한 산소소모 유발능력을 나타내었고 benzoquinone은 대조군과 차이를 나타내는 산소소모를 유발하지 않았다. 즉 세 물질의 redox cycling 활성화는 혈소판에서도 분리간세포와 같은 특성을 가짐이 확인되었다. 한편, 1 mM 농도에서는 DMNQ 및 benzoquinone은 각각 0.521, 0.417 O_2 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이었으며, menadione 다른 두가지 quinone에 비하여 3배 정도 증가하였다. 본 실험에서는 혈소판내에서의 세 물질의 redox cycling 능력은 Menadione>DMNQ>benzoquinone의 순이었으며 이는 간세포를 이용한 실험계의 문헌보고와 부분적으로 일치하였다 (Gant *et al.*, 1988). 그러나 1 mM benzoquinone에서는 상당량의 산소 소비가 보여주고있는데 이는 혈소판 세포 자체에 의한 것이 아니라 PRP 실험계에 존재하는 plasma에 의한 것으로 추정된다. 실제로 washed platelets 내의 산소 소비는 quinone의 동일한 농도에서 PRP에 비하여 현저히 낮음이 이를 뒷받침하고 있다. 따라서 하기 실험은 washed platelets(WP)을 사용하여 수행하였다.

흰쥐 혈소판에 대한 세 물질의 독성을 lactate dehydrogenase (LDH) leakage를 지표로 하여 알아본 결과 menadione과 동일한 redox cycling 활성을 가지나 arylation 능력은 갖지 않는 DMNQ는 200 μM 농도에서 2시간 배양후에도 LDH leakage를 유발하지 않았다. 반면 arylation 능력을 갖는 benzoquinone과 menadione은 독성을 유발하였으며 benzoquinone이 유발하는 혈소판 독성은 동일 농도에서 menadione보다 더욱 빠르게 나타났다 (Fig. 3). Benzoquinone에 의한 LDH 유출확인 실험에서 30분 이후의 LDH 활성화는 오히려 감소하는 경향을 보였으므로 benzoquinone에 의한 LDH 활성화의 억제가 추정되었다. 따라서 혈소판 lysate에서 세 물질에 의한 LDH 활성화의 변화를 관찰한 결과 menadione과 DMNQ는 LDH 활성화에 대조군과 큰차이가 없었으며 benzoquinone은 현저한 시간의존적인 LDH 활성화의 억제를 나타내었다 (Fig 4).

Quinone이 유발하는 세포독성기전의 연구는 분리간세포에서 광범위하게 수행되었으며 그 독성기전으

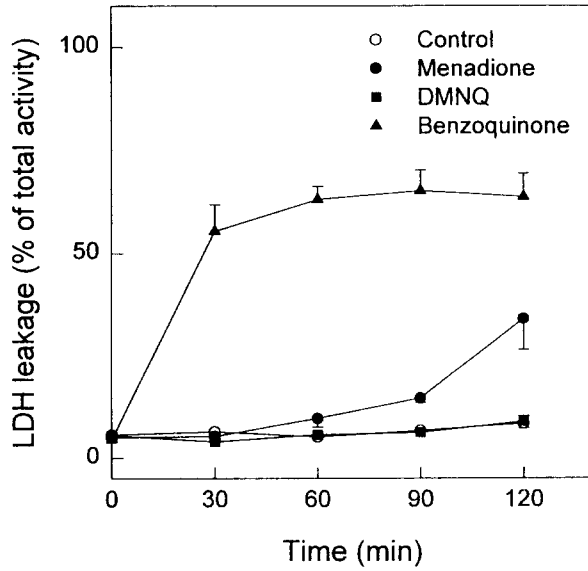


Fig. 3. Time course of toxicity of three quinones in rat platelets. Washed platelets were incubated in the presence of 200 μ M quinone, respectively. Values represent means \pm SEM from three experiments.

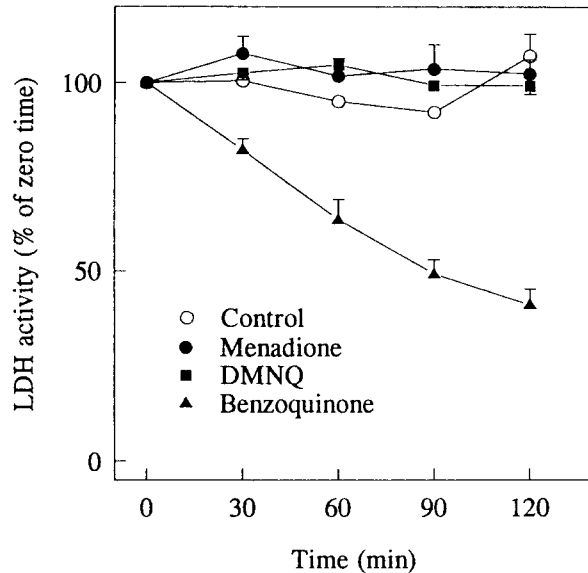


Fig. 4. Effect of three quinones on lactate dehydrogenase activity in rat platelet lysates. Platelet lysates were incubated in the presence of 250 μ M quinone, respectively. Values represent means \pm SEM from three experiments.

로서 세포내 nucleophile에의 arylation과 redox cycling을 경유한 oxidative stress가 주된 기전으로 제시되어 왔다. 그 중 특히 oxidative stress가 간세포에서의 주된 독성기전으로 알려져 왔다. 즉 DiMonte 등 (1984a and 1984b)은 menadione에 노출된 분리간세포에서 glutathione (GSH)의 고갈기전으로 oxidative stress의 결과

인 GSSG의 형성과 glutathione-protein disulfide의 형성, 또한 menadione과의 arylation산물인 menadione-glutathione conjugate를 제시하고 각각의 형성비율로서 75%, 10%, 15%를 제시하였다. 또한 이 보고에 따르면 menadione에 의한 protein thiol의 감소 또한 80% 정도가 oxidative stress의 결과임이 제시된 바 있다. 반면 menadione에 의한 혈소판 독성 연구시 menadione에 의한 혈소판 노출시 GSSG의 증가가 확인되지 않은 점이나 menadione에 노출된 혈소판 내에서의 GSH의 대사가 주되게 glutathione-menadione conjugate로 이루어진다는 결과 (Chung, 1997)에 의해 혈소판에서의 menadione의 독성기전은 분리간세포와 다를 것임이 본 실험결과에 의하여 예측되었다.

Menadione, DMNQ, benzoquinone 세 quinone의 혈소판에 대한 독성순서는 benzoquinone > menadione > DMNQ였는데 (Fig. 3), menadione은 가장 높은 redox cycling 활성을 가지나 독성은 크지 않았다. Arylation 능력을 갖지 않는 DMNQ는, 분리간세포에서 menadione보다 약한 독성을 나타내었지만 독성을 유발한 것 (Gant *et al.*, 1988)과는 대조적으로 혈소판에서는 전혀 독성을 유발하지 않았다. 또한 benzoquinone은 redox cycling은 제일 적게 일으키나 menadione보다 매우 강한 독성을 나타내었는데 이는 *in vitro* 실험에서 확인된 lactate dehydrogenase activity 억제와도 일치하였다 (Fig. 4).

이상의 결과를 종합하면 산소소모 유발능력을 menadione과 동일하게 가지는 DMNQ가 혈소판에서 독성을 유발하지 않은 점, 세 quinone의 혈소판 독성순서와 arylation 능력순서의 정확한 일치, menadione의 산소소모 유발능력에도 불구하고 GSSG가 검출되지 않은 점(결과 제시 않음) 으로부터 혈소판에서의 quinone에 의한 세포독성기전으로서 분리간세포와는 대조적으로 oxidative stress보다 arylation이 주된 작용기전임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Bergmeyer, H.U., Bernt, E. and Hess, B. (1965): Lactate dehydrogenase, in *Method in enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) pp. 736, New York.

- Chung, J.H., Seo, D.C., Chung, S.H., Lee, J.Y. and Seung, S.A. (1997): Metabolism and cytotoxicity of menadione and its metabolite in rat platelets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* in press.
- DiMonte, D., Ross, D., Bellomo, G., Ekl ow, L. and Orrenius, S. (1984a): Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 334-342.
- DiMonte, D., Bellomo, G., Thor, G., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1984b): Menadione-induced cytotoxicity with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis, *Arch. Biochem. Biophys.* **235**: 343-350.
- Gant, T.W., Rao, D.N.R., Mason, R.P. and Cohen, G. M. (1988): Redox cycling and sulphhydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes, *Chem. Biol. Interact.* **65**: 157-173.
- Kim, K.A., Lee, J.Y., Park, K.S., Kim, M.J. and Chung, J.H. (1996): The mechanism of menadione-induced cytotoxicity in rat platelets, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138**: 12-19.
- Morrison, M., Steele, W. and Danner, D.J. (1969): The reaction of benzoquinone with amines and proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 515-523.
- Nakagawa, Y. and Moldeus, P. (1992): Cytotoxic effects of phenyl hydroquinone and some hydroquinones on isolated rat hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1059-1065.
- Radomski, M. and Moncada, S. (1983): An improved method for washing human platelets with prostaglandin, *Thromb. Res.* **30**: 383-389.
- Ross, D., Thor, H., Orrenius, S. and Moldeus, P. (1985) Interaction of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) with glutathione, *Chem. Biol. Interact.* **55**: 177-184.
- Ross, D., Thor, H., Threadgill, M.D., Sandy, M.S., Smith, M.T., Moldeus, P. and Orrenius, S. (1986): The role of oxidative processes in the cytotoxicity of substituted 1,4-naphthoquinones in isolated hepatocytes, *Arch. Biochem. Biophys.* **248**: 460-466.
- Rossi, L., Moore, G.A., Orrenius, S. and O'Brien, P.J. (1986): Quinone toxicity in hepatocytes without oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 25-35.
- 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.
- Wilson, I., Wardman, P., Lin, T. and Sartorelli, A.C. (1987): Reactivity of thiols towards derivatives of 2- and 6-methyl-1,4-naphthoquinone bioreductive alkylating agent, *Chem. Biol. Interact.* **61**: 229-240.